

用红球菌生产类胡萝卜素的试验研究*

郑晓冬 何国庆 王友永 庄 军
(浙江大学)

朱德权 刘志红
(清华大学生物化工研究所)

摘 要 用红球菌 ZAU 6 菌株在 10 L 具膜气体分布器内环流式反应器中进行了类胡萝卜素发酵研究。试验表明,红球菌在该反应器中有二次生长现象,氧是该菌生长限制性因子,提高通气量可提高细胞生物量,同时可缩短发酵周期。而流加糖发酵法对提高色素得率的作用不明显。在该体系中,在最适条件下细胞生物量可达 13.6 g/L ,色素量为 1.5 g/L 。

关键词 红球菌 类胡萝卜素 气升式内环流反应器 发酵

色泽是食品最悦目的属性之一,生产上为使食品具有良好的色泽常需添加食用色素。食品加工过程中对食用色素的需求不断增加。目前国内食品加工企业所使用的色素基本上是合成色素,而合成色素早已被证明具有致癌、致畸等作用。为确保消费者身体健康有必要开发天然色素,类胡萝卜素是具有保健与着色双重作用的色素。我们从土壤中分离到一株类胡萝卜素产生菌,经鉴定为红球菌属的一个种^[1]。Takaichi Shinichi^[2,3]等人曾对用红球菌生产类胡萝卜素做过研究外,国内尚未见到用红球菌生产类胡萝卜素的报道。作者前期对该菌的培养基及发酵条件进行了研究^[4,5]。并在此基础上用清华大学朱德权设计的 10 L 具膜气体分布器内环流式反应器中对其发酵过程、流加糖及通气量对细胞生物量及类胡萝卜素产率的影响进行了研究。

1 材料与方法

1.1 培养基

1) 斜面培养基 马铃薯蔗糖斜面培养基:马铃薯 20%,蔗糖 1%,琼脂 2%,pH 自然;酵母膏蔗糖斜面培养基:酵母膏 0.5%,葡萄糖 1%,琼脂 2%,pH 6.5;

2) 种子培养基 马铃薯蔗糖种子培养基:马铃薯 20%,蔗糖 2%,pH 自然;酵母膏蔗糖种子培养基:酵母膏 1%,蔗糖 2%,pH 6.5;

3) 发酵培养基 马铃薯蔗糖培养基:马铃薯 14%,葡萄糖 1%,蔗糖 2.5%,尿素 0.3%。

1.2 培养

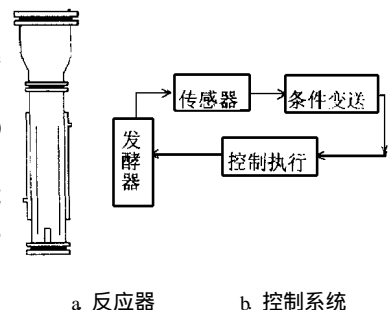
1) 斜面活化 从原始斜面挑取一菌环菌胎移入 PDA 斜面培养基中在 28℃ 培养 3 d。

2) 一级种子培养 接一菌环斜面培养物至种子培养基中(250 mL 三角瓶种子培养基 50 mL),28℃,180 r/min 下培养 20 h。

3) 10 L 气升式发酵罐发酵试验 在具膜气体分布器内环流式反应器中装入发酵培养基 6 L,按 8% 的接种量接入一级种子,28℃,通气量为 $0.4 \sim 1.5 \text{ L}/(\text{L} \cdot \text{min})$,发酵 3~4 d,离心收集菌体。

1.3 主要实验仪器及设备

< XJ-L 型离心沉淀机; < RH-250 型生化培养箱; > 21 型分光光度计; DV-265 FW 紫外可见分光光度计; 2FQ 85 A 型旋转蒸发器; DXY-I 型回旋式摇床; 10 L 具膜气体分布器内环流式反应器(见图 1)。



a 反应器 b 控制系统
图 1 10 L 气升式发酵罐结构及控制系统简图

收稿日期: 1998-10-12

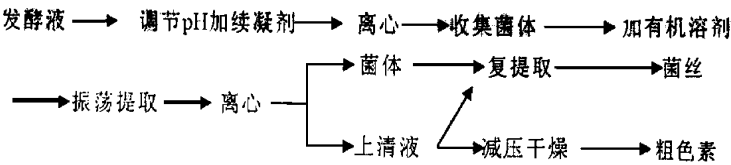
* 农业部“八五”重点课题

郑晓冬, 副教授, 杭州市凯旋路 268 号 浙江大学华家池校区食品科技系, 310029

1 4 分析及测试方法

- 1) 菌体浓度测定 OD 值测定: 取发酵液稀释 5 倍用 721 分光光度计在 260 nm 处测吸光值; 细胞生物量测定: 取一定量发酵液在 4000 r/min 下离心 30 min 去上清液, 得湿菌体, 用蒸馏水洗涤二次。置 80 烘箱烘至恒重, 称量。
- 2) 发酵液含糖量测定 还原糖测定: 采用 3, 5-二硝基水杨酸比色定糖法^[6]; 总糖测定: 采用斐林滴定法^[6]。

色素提取如下:



2 结果与分析

2 1 发酵过程研究

我们在清华大学反应工程实验室应用 10 L 具膜气体分布器内环流式反应器进行了 10 批次的发酵实验。图 2 为根据一批次实验数据得到的发酵进程曲线。由图 2 可知, 在发酵过程中菌体有二次生长现象。培养基中的底物葡萄糖对另外一种底物蔗糖的降解有抑制作用, 葡萄糖先于蔗糖利用完之后菌体生长有个相对“静止期”, 推测此阶段为蔗糖降解酶合成阶段, 随着蔗糖的利用细胞生物量有所增加, 同时发酵液的颜色也逐渐加深, 故可知色素形成与菌体量呈一定相关性。

在本体系发酵过程中, 菌体生长会经历一个连续的变化。在这种情况下系列生长时期常常不易分开, 每个时期都伴随有相继的生长速度的降低。在葡萄糖所控制的生长阶段, 按照通常所认为的分批培养指数生长动力学分析方法, 估算出一些比生长速率值 μ 并以此作出对葡萄糖底物的曲线图(见图 3)。从图 3 可以看出比生长速率与葡萄糖消耗有显著相关性。

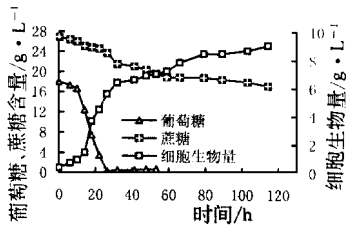


图 2 10 L 气升式发酵罐红球菌发酵进程曲线

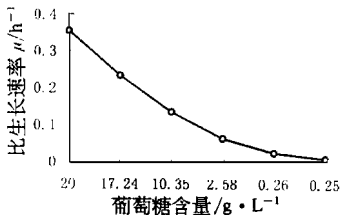


图 3 红球菌比生长速率与底物葡萄糖之间关系

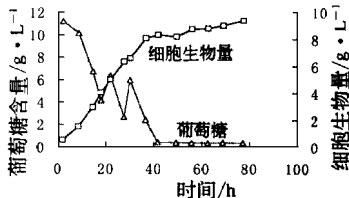


图 4 流加糖发酵进程曲线

2 2 发酵工艺研究

2 2 1 流加糖发酵对细胞生物量形成的影响

为了解流加糖对红球菌细胞生物量的影响, 本文共做了两次流加实验, 限于操作的可行性, 没有采用连续流加的方法而采用了间歇补料的方法。其中一批次的试验结果见图 4。

上述实验同非流加实验结果相比得知: 流加糖发酵法对提高细胞生物量作用不明显, 因此推测对色素产量提高作用不大。

2 2 2 通气量对细胞生物量形成的影响

为了解通气量对色素形成的影响, 在 10 L 气升式发酵罐中以 3 种不同通气量作了比较实验。结果表明, 提高溶氧水平有助于细胞生物量的增加和色素的形成, 但在本体系中, 当通气量过大会造成气泡过多, 这样一方面影响添料系数, 另一方面易造成杂菌污染, 因此, 通气量不易超过 1.5 L/(L·min)。

3 讨论

通气量等)直接影响菌体代谢,从而影响类胡萝卜素产量。因此优化培养条件是提高类胡萝卜素产量的前提。

本研究发现氧是红球菌类胡萝卜素发酵的限制性底物,提高通气量有助于提高类胡萝卜素产量,同时可缩短发酵周期。但在 10 L 气升式发酵罐试验与中试中发现,随着通气量的提高,发酵液泡沫大量增加,泡沫过多影响了填料系数,易造成杂菌污染,另外限制了氧的溶解。因此,通气量应控制在一定范围内为好。

参 考 文 献

- 1 贾小明,郑晓冬.一株类胡萝卜素产生菌的鉴定.生物技术,1995,5(6):26~28
- 2 Takaichi Shinichi, et al. Carotenoid pigments from *Rhodococcus rhodochrous* RNM S. *AgriBio Chem*, 1990, 54(8): 1931~1937
- 3 Takaichi Shinichi, et al. Influence of growth temperature on composition of carotenoid glucoside ester and from cellular lipids in *Rhodococcus rhodochs* RNM S1. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1993, 57(11): 1886~1889
- 4 郑晓冬,吴平谷,王友永.用红球菌生产类胡萝卜素的研究.中国食品学报,1998,2(3):54~61
- 5 郑晓冬,吴平谷,王友永.用大米水解糖生产类胡萝卜素的研究.中国粮油学报,1999,14(1):26~30
- 6 张龙翔.生化实验方法和技术(第2版).北京:高等教育出版社,1996.1~3