

β-胡萝卜素发酵过程中关键的代谢产物——三孢酸*

王见冬¹ 袁其朋^{1**} 钱忠明²

(北京化工大学生命科学与技术学院 北京 100029)¹

(香港理工大学应用生物及化学科技学系 香港)²

摘要: 利用三孢布拉氏霉菌 (*Blakelea trispora*) 发酵生产 β-胡萝卜素发现: 使用 (+)、(-) 菌混合的培养物与分别使用 “+”、“-” 菌的培养物相比, β-胡萝卜素产率可提高 3~15 倍; 既使用膜将 (+)、(-) 菌株隔开培养, 这种作用仍然很明显。究其原因, 主要是混合培养物中生成的 β 因子或称三孢酸在起作用。主要介绍了三孢酸的性质、作用机理和功能、合成路线及其分离纯化, 以期为类胡萝卜素实现工业化生产提供依据。

关键词: 三孢布拉氏霉菌, β-胡萝卜素, 三孢酸

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 0-0147-04

The New Advances in Trisporic Acid— a key Metabolite in Fermentation Production of β-Carotene

WANG Jian-Dong¹, YUAN Qi-Peng^{1*}, QIAN Zhong-Ming²

(Department of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029)¹

(Department of Chemistry Science and Applied Biology, Hong Kong Polytechnic University, Hongkong)²

Abstract: It was reported that the productivity of β-carotene could be enhanced 3~15 times when both plus and minus of *Blakelea trispora* were cultivated together compared with the plus or minus of *Blakelea trispora* cultured separately and that the result was still credible even they were kept apart by membrane. As a result of further research, the substance named trisporic acid had played an important role. In this paper, a review is presented on the property, action mechanisms, function, synthesized pathway and the isolation and purification of trisporic acid in order to provide reference to the industrialization of β-carotene and lycopene.

Key words: *Blakelea trispora*, β-carotene, Trisporic acid.

类胡萝卜素 (β-胡萝卜素、番茄红素和叶黄素等) 具有增强免疫功能、清除自由基、抗氧化、防治多种癌症等重要的生理功能, 从而成为近年的研究热点之一。三孢布拉氏霉菌 (*Blakeslea trispora*) 是世界上最常用的 β-胡萝卜素高产菌株。在利用 *Blakelea trispora* 真菌生产 β-胡萝卜素及番茄红素过程中发现^[1-5]: 使用混合的真菌培养物与分别使用 (+) 和 (-) 菌的培养物相比, 产率提高幅度很大, 既使用膜将 (+)、(-) 菌隔开, 这种作用仍然明显; 同时, 如在类胡萝卜素发酵开始或中途加入 0.001~1, 000 mg/mL 纯化的或未纯化的三孢酸, 其产量也会增加 3~15 倍。究其原因, 主要是混合培养时, 属于有性繁殖, 来源不同的 “+”、“-” 菌的菌丝体互相接触, 发生原生

* 国家自然科学基金资助项目 (No.20376007)

** 联系人 Email: yuanqp@mail.buct.edu.cn

收稿日期: 2003-08-18, 修回日期: 2003-10-10

质和细胞核的结合，生成接合孢子，最后减数分裂形成单倍的营养体——三孢酸（也称β因子）。发酵培养阶段，在三孢酸刺激作用下，菌体合成大量类胡萝卜素，从而提高了发酵产率。在一些已发表的类胡萝卜素的文章虽提到过三孢酸的作用，但对其性质、作用机理、生产方法及其功能却鲜有人提及。鉴于三孢酸对类胡萝卜素合成卓越的促进功能，本文将对之进行详细地叙述，以期类胡萝卜素的高产提供依据。

1 三孢酸的性质、生物合成途径、作用机理和功能

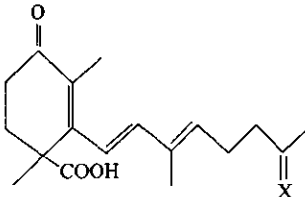


图1 三孢酸分子结构式
三孢酸 B, X=0, 三孢酸 C

1.1 三孢酸的性质 三孢酸为1, 1, 3-三甲基-2-(3-甲基辛基)环己烷氧化的不饱和衍生物^[6]，呈油状、淡黄色固体，是二萜类或类胡萝卜素降解中形成或产生的倍半萜类，为三孢布拉氏霉菌，*Phycomyces blakesleeanus* 和 *Mucedo* 等毛曲霉目的性激素。其特征在于它是3种物质的混合物：三孢酸 A、B、C，也称β1、β2、β3因子（因为它们刺激β-胡萝卜素的合成），而且只有在(+) (-)菌株混合培养时才会产生。其中β3因子占三孢酸总量的80%以上（其结构图见图1）。

实验证明，不仅三孢酸具有促进β-胡萝卜素生产的作用，就是其结构类似物也有此性质，如β-紫罗兰酮及其代用品如柠檬油萜烯和芳香族化合物等，它们的加入均能大幅度提高类胡萝卜素的产量。

1.2 三孢酸的生物合成途径 利用放射性同位素示踪技术标记C14确定三孢酸合成途径时发现：β-胡萝卜素是三孢酸生物合成的初始物，但对其具体的生物合成途径说法众多，Sutter等^[5]认为，在*Blakeslea trispora*混合培养中，正菌产生三孢酸的前体，负菌将之转化为三孢酸，三孢酸进而刺激菌体产生大量类胡萝卜素；在培养过程中，正菌生成前体的步骤为三孢酸合成的限速步骤。也有少部分认为(+)菌受到(-)菌刺激时产生三孢酸^[7]。但大多数研究者认为：“+”、“-”菌株混和培养时，不断生成接合

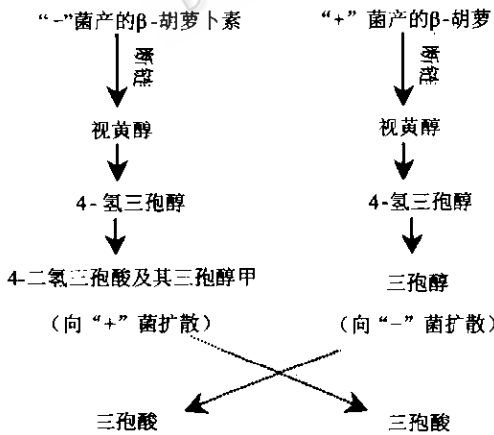


图2 三孢酸的生物合成途径

孢子，合成β-胡萝卜素。然后以β-胡萝卜素为代谢初始物，经过一系列氧化反应，各自产生不同的三孢酸前体：“-”菌产生4-二氢三孢酸及其三孢醇甲酯（俗称M因子），“+”菌产生三孢醇（俗称P-因子）。M因子和P-因子向相反菌株扩散时，可刺激相反菌株产生大量三孢酸，其途径如图2所示。从此途径可以看出，凡是生产类胡萝卜素的毛曲霉属均可生产三孢酸，且具体途径跟生产β-胡萝卜素一致^[2]，只是三孢酸属于胞外产物，分离纯化工艺不同。

1.3 三孢酸的作用机理及其功能^[7-9] 大量实验证明，在*Blakelea trispora*发酵生产类胡萝卜素过程中，当培养基中存在充当性孢子的三孢酸时，就会大量生产目的产物。从基因水平上来说，在*Blakelea trispora*的“+”、“-”菌株内，分别存在两种互补的基因I⁺和I⁻，混合培养时，I⁺和I⁻相互作用产

生三孢酸(从其合成途径上性孢子的相互扩散即能看出)。在 β -胡萝卜素合成过程中,存在一种酶系,此酶系主要在八氢番茄红素之后起作用。在单一菌株中,此酶系合成成为限速步骤,生成速率慢且量少,使得八氢番茄红素和 β -胡萝卜素之间的转换达到饱和,从而使得八氢番茄红素大量积累,阻断了到 β -胡萝卜素的生成途径,这也解释了利用单一菌株发酵时 β -胡萝卜素产量不高的原因。而在混合培养时,性孢子互相扩散生成三孢酸,而少量的三孢酸在培养基中促进上述酶系的大量产生,使得八氢番茄红素大量转化为 β -胡萝卜素,而后少部分的 β -胡萝卜素用于三孢酸的合成,这样在解除产物抑制的同时提高了 β -胡萝卜素的产量。

2 三孢酸的生产方法

20世纪30年代始,Michael^[10]等就用化学合成法得到了三孢酸。但化学合成法主要采用手性合成的方法,过程复杂且难以控制,不适用于工业放大,在此不再赘述。

2.1 发酵法生产三孢酸 发酵流程:三孢酸是 *Blakelea trispora* 发酵生产 β -胡萝卜素中的副产物之一。同 β -胡萝卜素一样,都是在菌体生长速率下降时生成,为次级代谢产物。在发酵生产 β -胡萝卜素过程中发现:三孢酸达到最高产率的培养时间及其生成速率与 β -胡萝卜素一致;在发酵过程中添加表面活性剂 Span20^[11]时,三孢酸的增加倍数也与 β -胡萝卜素雷同。由此可知,利用三孢酸 *Blakelea trispora* 发酵生产三孢酸时,基本途径跟生产 β -胡萝卜素一样,只是分离纯化手段不同。具体流程见图3。

提高三孢酸产量的方法:从以上生物合成途径(图2)可知,三孢酸的产生实质上是一系列氧化反应,需要一系列多功能氧化酶的参与。因此增加这些酶的活性至关重要,如在真菌混合培养过程中添加巴比土酸盐可以提高这些酶的活性。跟未添加相比, β -胡萝卜素增加为原来的3倍,可达1860mg/L发酵液,而三孢酸的产量增加为原来的2倍^[12];另外, β -胡萝卜素作为三孢酸合成的前体,它的增加跟三孢酸的合成成正比,因此提高 β -胡萝卜素的含量也就是提高三孢酸的量,故凡是能够提高 β -胡萝卜素的方法均可提高三孢酸的产量,因此可以考虑在培养基中添加表面活性剂 Span20^[11]、 Cu^{2+} ^[13]、脂肪族碳水化合物、 β -紫罗兰酮^[14]、煤油、抗氧化剂 BHT 和 TBHQ^[15]、植物油或者改变通气搅拌等都可不同程度地促进其生产。

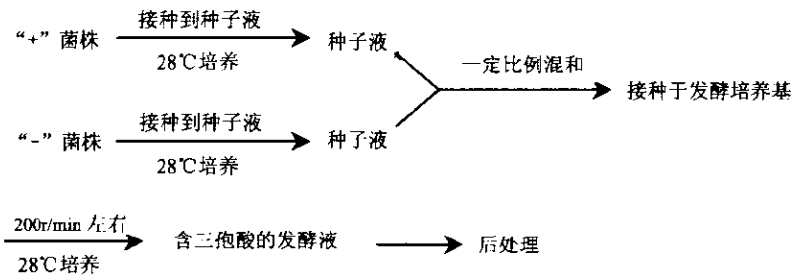


图3 发酵法生产三孢酸流程图

所使用的菌株可能会有所不同,具体培养条件根据菌株而定

2.2 三孢酸的分离纯化 *Bleaslea trispora* 发酵结束后,后处理过程如下^[7]:

发酵液 $\xrightarrow{\text{HCl, H}_2\text{SO}_4 \text{ 等无机酸酸化至 PH 为 } 1 \sim 2}$ 酸化液

有机溶剂(氯仿、二乙酸、芳香族碳水化合物) → 萃取液 $\xrightarrow{\text{无水 Na}_2\text{SO}_4 \text{ 干燥并蒸干}}$
 含油的粗制三孢酸 $\xrightarrow{\text{稀释的 NaOH、KOH 等进一步纯化}}$ $\xrightarrow{-20\% \text{ 无机酸酸化至 pH} \sim 2}$
 石油醚萃取 → 真空干燥得纯三孢酸

2.3 三孢酸分析方法 定性分析法: 硅胶薄层层析法和 HPLC 分析法。可将发酵得到的三孢酸与标品三孢酸在以下四种溶剂体系中进行薄层层析分析^[2]: (1) 己烷-乙酸乙酯 (7: 3); (2) 甲苯-醋酸 (19: 1); (3) 氯仿-醋酸 (19: 1); (4) 乙酸乙酯-醋酸 (19: 1)。如果样品和标品在四种体系中重合, 且具有相同的紫外吸收和相近的生物学性质, 就可推断所得的就是三孢酸; 也可采用 HPLC 对其进行定性分析, 只是其标准品价格昂贵而已。

定量分析法: 分光光度法^[5]。可将得到的三孢酸溶解在乙醇或三硫酸盐缓冲液 (pH7.5) 中, 通过 325nm 处的吸收值 (OD) 测定样品中三孢酸的含量。325nm 处, 三孢酸在乙醇中的吸收率为 $70\text{mL} \times \text{mg}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, 则其含量计算公式为: 吸收率 \times OD 值 \times 稀释倍数 \times 总体积 (稀释前)。也可通过极谱法和高效液相色谱 (HPLC) 测含量。

3 展望

鉴于 *Blakeslea trispora* “+” “-” 株混合培养时能够大幅度提高 β -胡萝卜素的产量, 国外早在 20 世纪 40 年代就出现了用化学法生产三孢酸的报道; 60 年代起开始研究三孢酸的生物合成途径、在 β -胡萝卜素生产中作高效诱导剂的作用机理; 本世纪初, 西班牙的 Vitatane (维塔特内有限公司) 在发酵生产番茄红素时, 将发酵得到的部分纯化的三孢酸添加到发酵培养基中发现它能极大地提高番茄红素产量^[16]。而在国内, 发酵法生产 β -胡萝卜素及番茄红素刚刚起步, 对三孢酸及其作用机理尚未有相关报道。虽然国外研究的较早, 但对其作用机理研究的并不是很清楚, 本文已对现有的理论进行总结, 以期对三孢酸理论研究提供参考; 另外三孢酸对 β -胡萝卜素的生产及其重要, 可通过本文提到的相关方法, 制备少量三孢酸, 研究其对类胡萝卜素 (如 β -胡萝卜素和番茄红素) 发酵生产中代谢途径的影响, 从而为大幅度生成类胡萝卜素提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] BU' loc J D k, Jones B E, Taylor D, *et al.* Journal of General Microbiology, 1974, **80**: 301 ~ 306
- [2] Richard P S. Journal of Bacteriology, 1973, **18**: 1074 ~ 1082.
- [3] Herman V E, Arch Mikrobiol, 1972, **86**: 175 ~ 184.
- [4] Richard P. Biochemistry, 1989, **28**: 4060 ~ 4066.
- [5] Sutter S, Modi V V, Jani U K. Science, 1970, **168**: 1590 ~ 1592.
- [6] Thpmash D M, Harris R C, Kirk J T O, *et al.* Phychemistry, 1967, **6**: 361 ~ 366.
- [7] Richard P S, Rafflson M E. Journal of Bacteriology, 1968, **2**: 426 ~ 432.
- [8] Thomas D M, Googwin T W. Phychemistry, 1967, **6**: 355 ~ 360.
- [9] Den Ende HV. Journal of Bacteriology, 1968, **20**: 1298 ~ 1303.
- [10] Michael R R, Meyers A I. Tetrahedron Letters, 1999, **40**: 3115 ~ 3118.
- [11] Spon W K, Taek W, Young H P. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1997, **84** (4): 330 ~ 332.
- [12] Bu' Lock J D, Winstanley D J, Journal of General Microbiology. 1971, **69**: 391 ~ 394.
- [13] 滕洁. 新疆等冷饮与速冻食品工业, 2002, **8** (1): 30 ~ 32
- [14] Govind N S. hytochemistry, 1982, **21** (5): 1043 ~ 1044.
- [15] 何碧烟, 欧光南. 集美大学学报 (自然科学版), 2000, **5** (1): 47 ~ 51.
- [16] Marcos. Lycopene Production Method. European Patent EP1, 184, 464A2, 2002, 9.