

三孢布拉氏霉发酵生产 β -胡萝卜素的研究

陈 涛 陈宗胜 马国华 朱湘民 童 晓 宋冬林

(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

姜文侯 单志萍 孟 好 孙冬梅

(江苏省微生物研究所 无锡 214063)

摘要 利用三孢布拉氏霉发酵生产天然 β -胡萝卜素。在30L发酵罐中,平均生物量31.3g干菌重/L发酵液和胡萝卜素1213.1mg/L;在3M³发酵罐中,平均生物量38.0g干菌重/L发酵液和胡萝卜素1146.5mg/L。将中试样品经HPLC分析,在总色素中 β -胡萝卜素占92~96%,其他类胡萝卜素占8~4%;在 β -胡萝卜素中,反式异构体占90~95%,9-、13-、15-顺式异构体占10~5%。结晶 β -胡萝卜素呈多种形状,但大多数为两端锥形的棱柱体。在胡萝卜素提取中,工艺和技术可靠,色素提取率90%以上。试验产品安全和卫生指标符合国家制定的标准。研究结果表明,利用该菌株可以实现工业化生产天然 β -胡萝卜素。

关键词 三孢布拉氏霉, 发酵生产, β -胡萝卜素

分类号 TQ920.1

β -胡萝卜素与维生素C、维生素E一样是一种强抗氧化维生素,对防治人类疾病有着有益的作用,全世界的需求量每年以7~9%的速度递增,在欧美和日本等都有成熟的市场^[1]。据不完全统计,我国年销售量约为4~5吨纯胡萝卜素,并且基本上从国外进口。市场的需求刺激生产发展,在人工合成 β -胡萝卜素有较大发展的同时^[2],崭露头角的发酵法生产天然 β -胡萝卜素也得到长足的发展。Villa和Abalde^[3]对布拉氏须霉(*Phycomyces blakesleeanus*)和三孢布拉氏霉(*Blakeslea trispora*)产生 β -胡萝卜素进行了总结,并认为三孢布拉氏霉可以进行工业化生产。乌克兰用10M³发酵罐生产三孢布拉氏霉,由1992年发酵 β -胡萝卜素1200mg/L发酵液提高到1996年3000mg/L

发酵液,生物量达75g干菌重/L,主要作为饲料添加剂^[4]。我们自九十年代初就开始三孢布拉氏霉发酵生产 β -胡萝卜素的研究^[5,6],鉴于该菌发酵时生物量大,发酵液粘稠度高,溶解氧利用难等特点,主攻发酵技术和后处理工艺技术。此外还在胡萝卜素组份、提取、制配和安全性试验也开展了研究工作,现将其结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 三孢布拉氏霉所产胡萝卜素和鉴定

1.2 三孢布拉氏霉发酵试验

室内摇瓶,30L发酵罐和3M³发酵罐试验。

1997-02-16收稿

1.3 β -胡萝卜素的提取工艺研究

将收集的干菌体,用石油醚浸泡,在萃取蒸馏塔中进行加热提取,萃取液经皂化、水洗、浓缩、低温结晶、精制。可制成不同含量的水溶性粉剂和油溶品。

1.4 安全性评估和卫生指标的检测

按参考文献[7]介绍的方法进行检测。

2 结果

2.1 三孢布拉氏霉所产胡萝卜素的组分分析及晶体形状

用发酵菌体提取的色素在硅胶 G 板上可得到三条色带,其颜色分别为桔黄、桔红、浅红。色带清晰、不交界,三条色带的 R_f 值分别为 0.94、0.70 和 0.61。三条色带与 β -胡萝卜素标准品光吸收扫描图表明,第一条色带光吸收图与 β -胡萝卜素标准品图形完全相同。

在波长 340、455、483nm 处有三个吸收峰,三个吸收峰的消光值比值符合 GB8821-88 的指标,其 R_f 值与标准品相同。在 540~570nm 处无吸收峰,说明样品中无杂质存在,最大吸收峰在 448~450nm 和 474~478nm 之间,是 β -胡萝卜素的吸收峰。通过定量测定第一色带的色素量占全部色素的 70%,第二条色素带可能是 γ -胡萝卜素;第三条色带可能是 β -胡萝卜素顺式异构体。根据色谱归一化的百分峰面积计算三孢布拉氏霉菌中 β -胡萝卜素占全部胡萝卜素的 85%,经可见光谱和 HPLC 的分析在三孢布拉氏霉胡萝卜素中有顺式异构体的存在。中试的粉剂和结晶样品后经美国北卡罗来纳州大学食品系进行 HPLC 组分分析。结果表明发酵生产的 β -胡萝卜素含量为 92~96%,其它类胡萝卜素为 8~4%;在 β -胡萝卜素中顺式异构体占 5~10%,反式占 95~90%。

结晶 β -胡萝卜素在光学显微镜下,呈浅紫红色,并有多形状,但大多数为两端锥形的棱柱体。

2.2 摇瓶发酵试验

在摇瓶中,研究了培养基和培养条件对三孢布拉氏霉合成 β -胡萝卜素的影响。试验结果

表明:①以 4% 淀粉为碳源较为适宜,生物量、 β -胡萝卜素的产生水平都较高,虽然在此基础上添加 1% 葡萄糖,总色素水平有所提高,但 β -胡萝卜素未增加,因而无实际意义。②棉籽仁和黄豆饼粉为主要氮源组成的培养基较为适宜,而玉米浆与棉籽仁或黄豆饼粉混合使用更有利于提高生物量和 β -胡萝卜素的产生。③正交试验培养基:以淀粉、黄豆饼粉、玉米浆、植物油为主要配方,其生物量、胡萝卜素产生水平均高于其它组合。从而筛选出适用于发酵三孢布拉氏霉的培养基。

2.3 30 升罐发酵试验

在室内摇瓶试验的基础上,在 30 立升发酵罐中,连续进行 6 批次发酵试验,其中一罐因为发酵 48h 时停电未成功外,其余 5 罐平均生物量 31.3g 干菌重 / L 发酵液,总色素量 634.6~1857.5mg / L 发酵液,平均 1213.1mg / L; 每克干菌粉含色素 14.4~44.9mg / g, 平均 32.2mg / g。小试获得圆满成功。

2.4 3M³ 罐中试放大发酵试验

我们在继 30 升罐发酵成功后,进行放大 100 倍的 3M³ 罐发酵中试。经过艰苦细致的准备,使三批次连续发酵试验获得成功。平均生物量 38.0g 干菌重 / L 发酵液,在 3M³ 罐中胡萝卜素含量为 994.5~1328.4mg / L 发酵液,平均为 1146.5mg / L; 每升发酵液干菌重 32.0~45.0g, 每克干菌平均含胡萝卜素 31.0mg。

2.5 产品的提取及后处理

发酵后的固液分离极为方便,用普通离心机或压滤的方法就可达到分离的目的,完全适用于工业化生产。菌体内的 β -胡萝卜素以溶剂浸提效果较好,提取率 90% 以上。提取工艺流程、设备和技术十分成熟,安全性能可靠。

2.6 中试样品安全性评价和卫生指标检测

中试发酵的粉剂样品经湖北省卫生防疫站安全性评价,试验结果为急性毒性试验属实际无毒级,鼠精子畸变试验为阴性,微核试验为阴性,Ames 试验为阴性。表明样品有可靠的安全性。卫生测试砷、铅、铜三种重金属含量都低于国家要求控制标准以下。

3 讨 论

根据上述研究结果,采用三孢布拉氏霉发酵生产天然胡萝卜素不仅因其 β -胡萝卜素合成水平极大高于多种生物体, β -胡萝卜素占总胡萝卜素90%以上,其结构与标准的 β -胡萝卜素相同外;而且具有生产原料易得,不受自然条件制约,周期短和适于工业化生产等优点。因而,可以确认三孢布拉氏霉是目前应用于工业生产胡萝卜素最重要的菌株。

本研究获得 3M³罐发酵试验、后处理技术、胡萝卜素安全性评价、胡萝卜素的组份测试等结果,为三孢布拉氏霉的工业化生产奠定了基础。根据研究,总结出三孢布拉氏霉发酵 β -胡萝卜素的工业化生产技术的工艺流程。但我们的发酵水平与乌克兰^[4]相比,在生物量、胡萝卜素的产量有一定的差距,究其原因主要是条件限制,实践次数少所致。可根据实际需要生产出几种含量的 β -胡萝卜素的制剂,如干菌体粉碎后的粉剂可作为饲料添加剂,并加工成片剂和胶囊剂;浸提后浓缩加工成油溶剂可作为许

多保健品和化妆品的添加剂;皂化后的结晶胡萝卜素,其纯度高,可制成药品。

本研究于 1996 年 1 月和 1996 年 5 月分别通过中国科学院、江苏省科学技术委员会分别组织的专家评审和鉴定,认为该项研究水平属国内领先。我们希望通过与有关单位的合作,发挥各自优势,实现用三孢布拉氏霉工业化生产天然 β -胡萝卜素,并使其产品进入国内外市场。

参 考 文 献

- [1] 姜宁. 中国化工, 1996, 5: 32.
- [2] 森. 食品与油脂, 1996, 1: 51.
- [3] Villa T G, Abalde J, Profiles on Biotechnology, u-niversidade De santiago De compostela, 1992.
- [4] Stanislav Vasilchenko, 1996. personal Communication.
- [5] 姜文侯, 单志祥, 孟好等. 食品与发酵工业, 1994, 4: 65~71.
- [6] 陈涛, 卫文仲, 姜文侯等. 电子显微学报, 1996(待发表, 已修回.)
- [7] 郑鹏然, 周树南主编. 食品卫生全书, 北京: 红旗出版社, 753~780.

STUDIES ON PRODUCTION OF β -CAROTENE WITH *BLAKESLEA TRISPORA*

Chen Tao, Chen Zongsheng, Ma Guohua, Zu Xiangmin, Tong Xiao, Song Donglin
(Wuhan Institute of Virology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan, 430071)

Jiang Wenhou, Shan Ziping, Mong Yu, Sun Dongmei
(Jiang shu Institute of Microbiology, Wuxi, 214063)

Abstract Studies on production of natural β -carotene by fermentation with *Blakeslea trispora* are reported in this paper. When five fermentation trials were conducted in a 30L fermentor, an average yield of carotenoids and biomass was 1213. 1mg and 31.1g dried mycelia / L fermented broth, respectively. An average of 1146.5mg carotenoids and 38.0g dried mycelia was obtained in 3 fermentations performed in a 3M³ fermentor. Samples of mycelia and crystals prepared from 3M³ fermentor have been analyzed by RP-HPLC. The results demonstrated that β -carotene, as the predominant carotenoid, was 92~96%, other carotenoids were only 8~4% of total pigments. Of total β -carotene, the majority existed as all-trans isomer(90~95%), but 15-cis, 13-cis and 9-cis isomers (10~5%) were detected in each sample. The crystallized β -carotene

appears various shapes, but six-angle pyramid is the main shape. Downtreatment process for extracting pigments from mycelia has been designed, and > 90% of pigments has been regained. The preliminary product is coincident with the national standard of China both in safety and healthy. These results demonstrate that *B. trispora* can be used in industry to produce natural β -carotene.

Key words *Blakeslea trispora*, Fermentation, β -carotene