

# 5L 发酵罐高密度培养番茄红素工程菌及其发酵条件优化

李瑜, 李一萌, 杨丽, 姜建国

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 本研究对产番茄红素的工程菌 W-05 进行发酵条件优化。首先单因素实验确定培养基种类; 培养温度; 培养基中的较优碳源、氮源以及无机盐。然后根据单因素实验结果, 设置响应面实验确定各因素之间的交互影响, 响应面实验结果表明培养基各组分为: 蛋白胨 10.00 g/L、酵母浸出粉 5.00 g/L、甘油 7.80 mL/L、硝酸铵 3.30 g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.80 g/L、NaCl 11.62 g/L 时, 番茄红素得率达理论值为 3.42 mg/L。在 5 L 发酵罐中, 使用优化后的培养基高密度培养工程菌 W-05。实验结果显示工程菌 W-05 高密度培养较优发酵条件为: pH 值为 7.0, 溶氧百分数为 20% 左右及指数流加补料。此条件对比普通分批培养条件, 菌体的生物量和番茄红素产量显著提高( $p < 0.05$ )。优化发酵 29 h 后的菌体干重达到 16.55 g/L, 番茄红素得率为 19.93 mg/L。这说明改善培养基成分及发酵条件能大幅提高工程菌的番茄红素得率。

**关键词:** 工程菌 W-05; 番茄红素; 单因素; 响应面; 发酵罐

文章编号: 1673-9078(2020)06-137-146

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.6.0741

## High-density Cultivation of Lycopene-producing Engineered Bacteria in 5 L Fermenter and Optimization of Fermentation Conditions

LI Yu, LI Yi-meng, YANG Li, JIANG Jian-guo

(School of Food Sciences and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** In this study, the fermentation conditions of lycopene-producing engineered Bacteria W-05 were optimized. Firstly, single factor experiments were used to determine the type of culture medium, culture temperature, preferred sources of carbon and nitrogen, and inorganic salt. Then, according to the results of the single factor experiments, the response surface experiments were set up to determine the interaction between various factors. The results of the response surface experiments showed the components of the medium: peptone 10.00 g/L, yeast extract powder 5.00 g/L, glycerol 7.80 mL/L, ammonium nitrate 3.30 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.80 g/L, and NaCl 11.62 g/L, under which, the lycopene yield reached a theoretical value of 3.42 mg/L. W-05 was then cultured at a high density using the optimized medium in a 5 L fermenter, and the experimental results showed the optimal fermentation conditions: pH 7.0, dissolved oxygen percentage about 20%, and the use of exponential fed-batch strategy. Under these conditions, the biomass and lycopene production of W-05 increased significantly ( $p < 0.05$ ), compared with those obtained *via* batch fermentation. The dry weight of bacterial cells reached 16.55 g/L and lycopene yield reached 19.93 mg/L after the optimized fermentation for 29 h. These results show that improving the medium composition and fermentation conditions can greatly increase the yield of lycopene produced by engineered bacterium W-05.

**Key words:** engineered bacteria w-05; lycopene; single factor; response surface; fermenter

引文格式:

李瑜, 李一萌, 杨丽, 等. 5L 发酵罐高密度培养番茄红素工程菌及其发酵条件优化[J]. 现代食品科技, 2020, 36(6): 137-146

LI Yu, LI Yi-meng, YANG Li, et al. High-density cultivation of lycopene-producing engineered bacteria in 5 L fermenter and optimization of fermentation conditions [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(6): 137-146

收稿日期: 2019-08-05

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31871778)

作者简介: 李瑜 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 藻类次生代谢

通讯作者: 杨丽 (1983-), 女, 博士, 实验师, 研究方向: 天然产物化学; 共同通讯作者: 姜建国 (1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 藻类次生代谢与天然产物

在大肠杆菌中转入质粒 *pACCRT-EIB* (图 1A), 即构成能生产番茄红素的工程菌 W-05。*pACCRT-EIB* 即原核表达载体 *pACYC184* 里的 *EcoRV* 位点上插入欧文氏菌的 *crtE*, *crtI* 和 *crtB* 基因<sup>[1]</sup>。番茄红素又称  $\psi$ -胡萝卜素 (图 1B), 是一种不含氧的类胡萝卜素<sup>[2]</sup>, 与其他类胡萝卜素相比具有最优的清除自由基的效果<sup>[3]</sup>, 主要是其一个分子中具有 11 个共轭双键, 仅仅一个分子就可以清除  $10^3$  个单线态氧。同时番茄红素还表现出抗癌活性, 如乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、及皮肤癌等<sup>[4]</sup>。研究表明番茄红素主要通过通过阻滞癌细胞于 G0/G1 期<sup>[5]</sup>以及诱导细胞间连接, 控制细胞生长和诱导细胞分化<sup>[6]</sup>来抑制癌细胞的生长。此外番茄红素还具有多种非常宝贵的生理功效, 如预防心脑血管疾病、增强免疫力、促进骨骼生长、延缓衰老和抗辐射等<sup>[7]</sup>, 在食品、医药、保健和化妆品行业具有广阔的应用前景<sup>[8]</sup>。现已有番茄红素相关产品上市, 如饮料、护肤品、保健品等。目前番茄红素主要是从番茄中提取的, 但是通常每吨西红柿中仅含 20 克番茄红素, 且提取工艺复杂、提取技术含量高、生产成本极其昂贵<sup>[9]</sup>。且番茄生产受产地及季节等条件的限制, 无法满足市场对番茄红素的需求。而通过工程菌 W-05 生产番茄红素具有天然、绿色、无毒、无溶剂残留、无重金属残留、生产周期短等优点, 且生产原料来源广泛而廉价<sup>[10]</sup>。本文通过对产番茄红素的工程菌 W-05 的发酵条件进行单因素优化、响应面优化、5 L 发酵罐高密度培养条件优化等, 提高了番茄红素的最终产量。研究了不同发酵条件单独及组合对番茄红素产量的影响, 以期工程菌 W-05 生产番茄红素的进一步条件优化和研究利用提供理论依据。

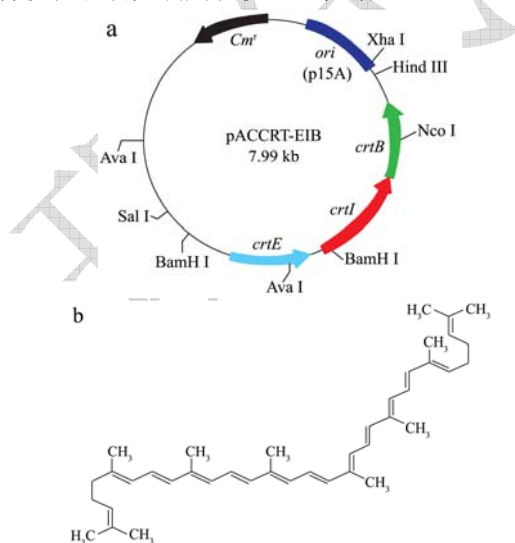


图 1 工程菌的质粒构建方式 (a) 和番茄红素的化学结构 (b)

Fig.1 Construction of plasmids for engineered bacteria (a) and chemical structure of lycopene (b)

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与仪器

主要实验材料: 菌种 W-05 (实验室构建); 蛋白胨、酵母浸出粉、NaCl、甘油、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乙酸铵、尿素、硫酸铵、氯化铵、硝酸铵、无水  $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、硫酸镁、磷酸氢二钠、氢氧化钠、氯霉素、丙酮均为国内分析纯; 纯品番茄红素, 上海源叶生物科技有限公司。

LB 液体培养基: 蛋白胨 10.00 g/L、酵母浸出粉 5.00 g/L、NaCl 10.00 g/L。固体培养基多加琼脂 15.00 g/L。2YT 液体培养基: 蛋白胨 16.00 g/L、酵母浸出粉 10.00 g/L、NaCl 5.00 g/L。

主要实验仪器: 高速冷冻离心机, Eppendorf, Centrifuge 5804R; 电子天平, 美国双杰兄弟集团有限公司; 电热恒温水浴锅, 上杭仪器有限公司; 涡旋振荡器, 其林尔贝尔仪器制造公司; 紫外可见分光光度计, UNICO 公司; 电加热毯式发酵罐, BioFlo/CelliGen 115; 控温摇床。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 番茄红素标准曲线的绘制

番茄红素丙酮溶液的浓度  $y(\text{mg/L})$  与 OD 472 nm 测量值  $x$  具有良好的线性关系, 不同浓度的标准番茄红素丙酮溶液在紫外可见分光光度计  $\lambda=472 \text{ nm}$  处测定其 OD 472 nm 值, 以 OD 472 nm 测量值为横坐标, 番茄红素浓度 (mg/L) 为纵坐标, 绘出番茄红素含量的标准曲线。标准曲线线性方程为:

$$y=2.126x+0.0051(R^2=0.9957)$$

#### 1.2.2 工程菌的培养及生长状况测定

$-80 \text{ }^\circ\text{C}$  冻藏的菌种需先平板培养使其活化, 之后在试管中加入 4 mL 液体培养基, 以摇床摇速为 230 r/min 进行种子培养 6~12 h。然后在 500 mL 摇瓶中加入 100 mL LB 或 2YT 培养基, 设置培养温度  $33 \text{ }^\circ\text{C}$  及摇床摇速为 250 r/min 培养 24~48 h<sup>[11]</sup>。大肠杆菌干重  $y(\text{mg}/100 \text{ mL})$  与菌液在 600 nm 吸光度 OD<sub>600</sub> (设定为  $x$ ) 在  $0.20 \leq \text{OD}_{600} \leq 0.80$  的区间内呈线性关系, 线性回归方程:  $y=29.464x-0.5407, R^2=0.9995$ <sup>[12]</sup>。取适量菌液稀释至合适倍数测量 OD<sub>600</sub> nm 值, 然后换算成菌体干重。以时间  $h$  为横坐标, 菌体干重为纵坐标, 即展示出工程菌的生长状况。

#### 1.2.3 番茄红素的提取与含量测定

番茄红素遇热、光和氧气不稳定, 所有提取与测量工作在低温暗处操作<sup>[13]</sup>。

提取：提取：菌液在离心机设置为 4 ℃ 及转速为 11000 r/min 条件下离心 1 min，蒸馏水洗涤过的菌泥以丙酮快速悬浮。避光条件下，悬浮液 55 ℃ 水浴 15 min，以离心机设置为 4 ℃ 及转速 11000 r/min 条件下离心 10 min，反复用丙酮萃取直至细胞碎片呈无色。

含量的测量：测量提取所得番茄红素丙酮溶液的 OD<sub>472 nm</sub> 值，以标准曲线对照得出色素浓度。

### 1.2.4 单因素优化

首先选择较适培养基：使用 LB、2YT、LB+1% 甘油、2YT+1% 甘油四种不同培养基；确定培养基种类后，设置培养温度分别为 29 ℃、33 ℃、37 ℃；确定培养基种类及培养温度后，选择相对较适碳源及其浓度：添加 1% 的甘油、葡萄糖、麦芽糖和蔗糖，碳源确定后设置浓度分别为 0.4%、0.7%、1.0%、1.3%、1.6%；确定培养基种类，温度，较适碳源及浓度后，选择相对较适氮源及其浓度：在 LB+最佳碳源培养基

中添加 0.2% 的尿素、硝酸铵、硫酸铵和乙酸铵，设置浓度分别为 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%；确定培养基种类，温度，较适碳源及浓度，较适氮源及浓度后，选择较适无机盐及其浓度：在 LB+较适碳源+较适氮源选择培养基中添加无水 CaCl<sub>2</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O。工程菌与色素含量的测定方法参照 1.2.2 及 1.2.3。

### 1.2.5 响应面优化

为更好地确定各因素的交互作用，依据单因素优化实验结果，选取甘油、硝酸铵、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、NaCl(CaCl<sub>2</sub>与KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>产生絮状沉淀磷酸钙，故用NaCl替代CaCl<sub>2</sub>调节渗透压及提供Cl<sup>-</sup>离子)设计四因素三水平的响应面优化实验。自变量 A、B、C、D 分别为甘油(mL/L)、硝酸铵(g/L)、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(g/L)、NaCl(g/L)，响应值 Y 为番茄红素的产量(mg/L)。设计 Box-Behnken 实验<sup>[14]</sup>，其中响应面分析因素与水平

表 1 响应面分析因素与水平

Table 1 Response surface analysis factors and levels

水平	A 甘油/(mL/L)	B 硝酸铵/(g/L)	C KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /(g/L)	D NaCl/(g/L)
-1	3.50	1.50	1.00	6.00
0	7.00	3.00	2.00	12.00
+1	10.50	4.50	3.00	18.00

### 1.2.6 发酵罐高密度培养

用优化后的培养基摇瓶培养后的菌液以 1% 接种至 5 L 发酵罐，装液量为 2.5 L，氢氧化钠溶液调节 pH 值为 7.0，可调节通气量和搅拌转速使溶氧量(%)保持约 20%。12 h 后，流加补料培养。每 2 h 测一次菌体生长状况及番茄红素含量。分批培养时期发酵温度为 37 ℃，流加补料培养时期发酵温度为 33 ℃。

恒速补料流加：以恒定的速率 25 mL/h 流加补料。指数补料流加：以菌体生长情况和发酵液体积变化为依据，指数流加补料培养基，控制平均比生长速率约 0.2 h<sup>-1</sup>。溶氧量保持约 20%。

菌体生长情况：以时间 h 为横坐标，菌体干重为纵坐标表示生长情况。色素含量测定：对照番茄红素丙酮溶液的 OD<sub>472 nm</sub> 值，以标准曲线为参考得出色素浓度。

### 1.2.7 数据处理

采用 Microsoft Excel 2010 进行数据分析，Origin 8.0 进行图形处理。实验重复 3 次。采用 Design expert 对响应面图进行分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 单因素实验结果

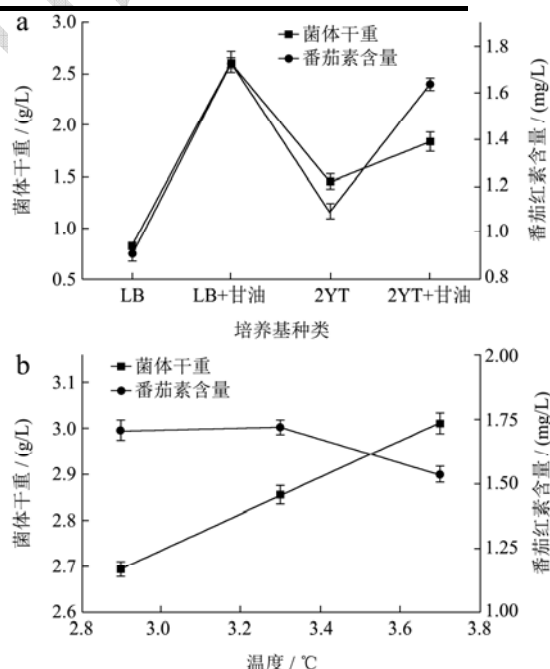


图 2 培养基优化(a)及温度优化(b)工程菌的发酵曲线

Fig.2 Fermentation curve of engineered bacteria of medium optimization (a) and temperature optimization (b)

较适合 W-05 工程菌生长的为 LB+甘油培养基(图 2a)，故碳源的添加对大肠杆菌的生长起促进作用，因此后续的实验将在 LB+碳源的培养基基础上继续进行优化。三种温度条件比较得出：37 ℃ 培养利于菌体生

长, 33 °C 培养利于番茄红素积累 (图 2b)。色素积累量主要与 W-05 工程菌的密度以及单一菌体基因表达有关。由三种温度条件综合得出: 初期 (0~10 h) 以 37 °C 使菌体大量繁殖, 合成期 (10~20 h) 以 33 °C 的培养温度可获得理想的番茄红素积累量。

## 2.2 确定响应面法中培养基的最适因子

甘油作为碳源对番茄红素积累具有较优促进作用 (图 3a)。且甘油作为菌体发酵培养的碳源时可抑制乙酸的积累<sup>[15]</sup>。培养基中添加 7.00 g/L 的甘油时的番茄红素产量较高 (图 3b), 因此响应面优化实验中甘油因素的中心点值为浓度 7.00 g/L。硝酸铵为色素积累较佳氮源 (图 3c)。3.00 g/L 作为响应面实验中硝酸铵因素的中心点值 (图 3d)。添加无水 CaCl<sub>2</sub> 和 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 时番茄红素积累量有较明显的提高 (图 3e), 故添加这两种无机盐。但是这两种无机盐会反应生成絮状沉淀磷酸钙, 故用 NaCl 代替无水 CaCl<sub>2</sub> (主要作用均为调节渗透压及提供少量的无机离子)。且响应面实验中 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 因素的中心值为 2.00 g/L (图 3f), NaCl 因素的中心值为 12.00 g/L (图 3g)。

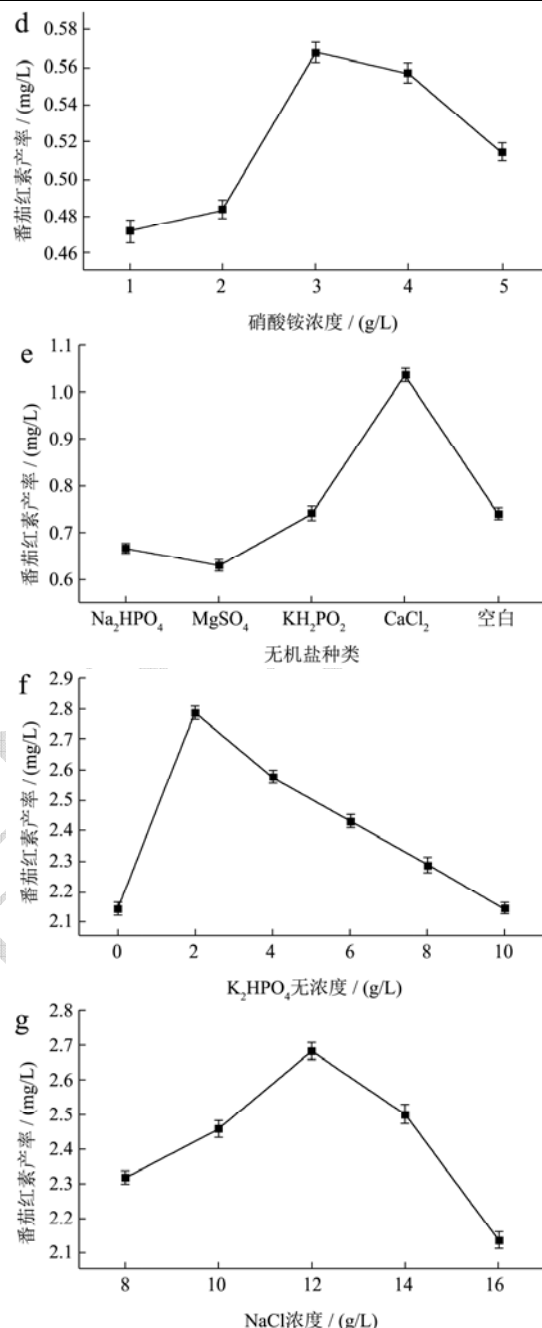
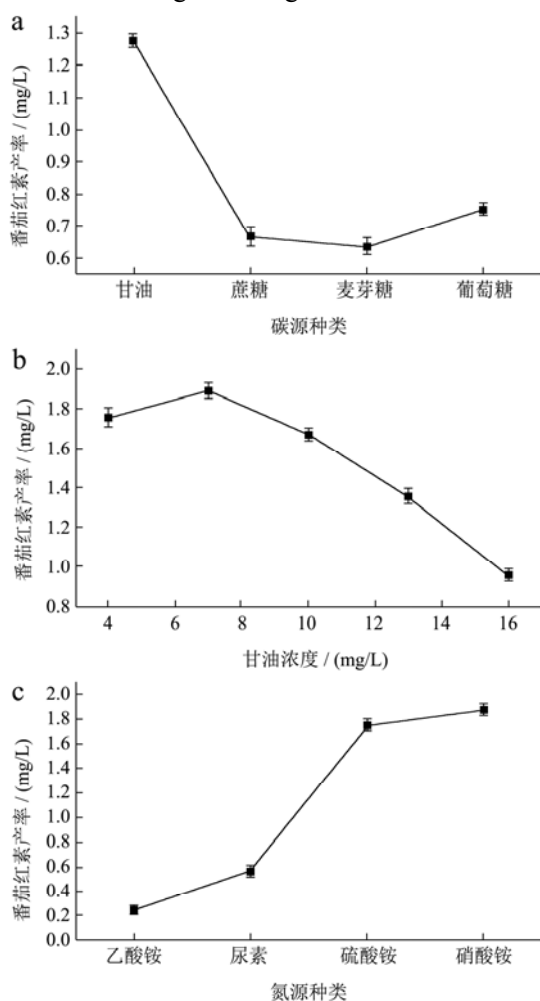


图 3 确定响应面最适因子实验中的工程菌的发酵曲线

Fig.3 Fermentation curve of engineered bacteria of determining the response surface optimum factor experiments

## 2.3 响应面分析

### 2.3.1 Box-Benhnken 中心组合实验设计

根据 Box-Benhnken 中心组合实验设计的原理, 利用 Design-expert 8.0 软件设计响应面分析实验方案。以甘油、硝酸铵、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、NaCl 为变量, 番茄红素得率 Y(mg/L) 作为响应值, 设计四因素三水平的响应面优化实验。响应面分析实验方案设计与结果见表 2。

表2 Box-Behnken 中心组合实验设计和响应值表

Table 2 Box-Behnken center combination experiment design and response table

实验序号	因素水平				番茄红素 得率 Y/(mg/L)
	A 甘油/(mL/L)	B 硝酸铵/(g/L)	C KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /(g/L)	D NaCl/(g/L)	
1	3.50	1.50	2.00	12.00	1.98
2	10.50	1.50	2.00	12.00	2.64
3	3.50	4.50	2.00	12.00	2.05
4	10.50	4.50	2.00	12.00	2.69
5	7.00	3.00	1.00	6.00	3.11
6	7.00	3.00	3.00	6.00	3.01
7	7.00	3.00	1.00	18.00	3.19
8	7.00	3.00	3.00	18.00	2.98
9	3.50	3.00	2.00	6.00	2.18
10	10.50	3.00	2.00	6.00	2.82
11	3.50	3.00	2.00	18.00	2.01
12	10.50	3.00	2.00	18.00	2.75
13	7.00	1.50	1.00	12.00	2.85
14	7.00	4.50	1.00	12.00	3.06
15	7.00	1.50	3.00	12.00	2.82
16	7.00	4.50	3.00	12.00	3.00
17	3.50	3.00	1.00	12.00	2.14
18	10.50	3.00	1.00	12.00	2.67
19	3.50	3.00	3.00	12.00	2.07
20	10.50	3.00	3.00	12.00	2.77
21	7.00	1.50	2.00	6.00	2.81
22	7.00	4.50	2.00	6.00	3.02
23	7.00	1.50	2.00	18.00	2.88
24	7.00	4.50	2.00	18.00	2.97
25	7.00	3.00	2.00	12.00	3.11
26	7.00	3.00	2.00	12.00	3.15
27	7.00	3.00	2.00	12.00	3.17
28	7.00	3.00	2.00	12.00	3.19
29	7.00	3.00	2.00	12.00	3.20

### 2.3.2 二次回归方程数学模型建立和方差分析

由 Design Expert 8.0 软件采用二次型进行变异分析 (Analysis of variance, ANOVA), 其分析结果见表 3。多项式模型方程拟合的性质由确定系数  $R^2$  表达, 其统计学上的显著性由  $p$  值确定<sup>[16]</sup>。通过 RSREG (响应面回归) 过程进行数据分析, 建立二次响应回归模型, 从而求得较稳定性响应因子水平。该模型对应的四元二次回归方程为:

$$Y=3.16+0.33\times A+0.067\times B-0.032\times C-0.012\times D-6.250E-003\times A\times B+0.036\times A\times C+0.023\times A\times D-9.000E-003\times B\times C-0.024\times B\times D-0.028\times C\times D-0.67\times A^2-0.17\times B^2-0.059\times C^2-0.050\times D^2。$$

$p$  值用来检验回归系数的显著性,  $p$  值越小影响越

显著。  $p\leq 0.05$  代表模型为显著,  $p$  值  $\leq 0.01$  代表高度显著, 当  $p>0.05$  时为不显著<sup>[17]</sup>。由表 3 可以得出, 回归模型的决定系数为  $R^2=0.9785$ , 说明该模型能够准确地描述实验结果。模型  $p$  值为  $1.00\times 10^{-4}\leq 0.01$ , 故改响应面模型高度显著, 而失拟项  $p$  值为  $1.11\times 10^{-1}>0.05$ , 则失拟项不显著, 说明失拟项相对纯误差项不显著, 未知因素几乎不会干扰试验<sup>[18]</sup>。因此, 该回归方程可描述各因素与响应值之间的真实关系, 从而用于确定最佳培养基条件。该模型显示: 四个单因素对番茄红素得率均影响显著; 交叉项  $p$  值则表明四个因素之间的交互作用影响不明显。在选取的各因素水平范围内, 四个因素的影响排序为: A(甘油)>B(硝酸

铵) $>C(KH_2PO_4)>D(NaCl)$ 。

根据所建立的数学模型模拟培养最优培养基为：甘油 7.83 mL/L、硝酸铵 3.30 g/L、 $KH_2PO_4$  1.80 g/L、NaCl 11.62 g/L。在此条件下得到番茄红素产量理论值为：3.42 mg/L。

2.3.3 各因素间的交互作用

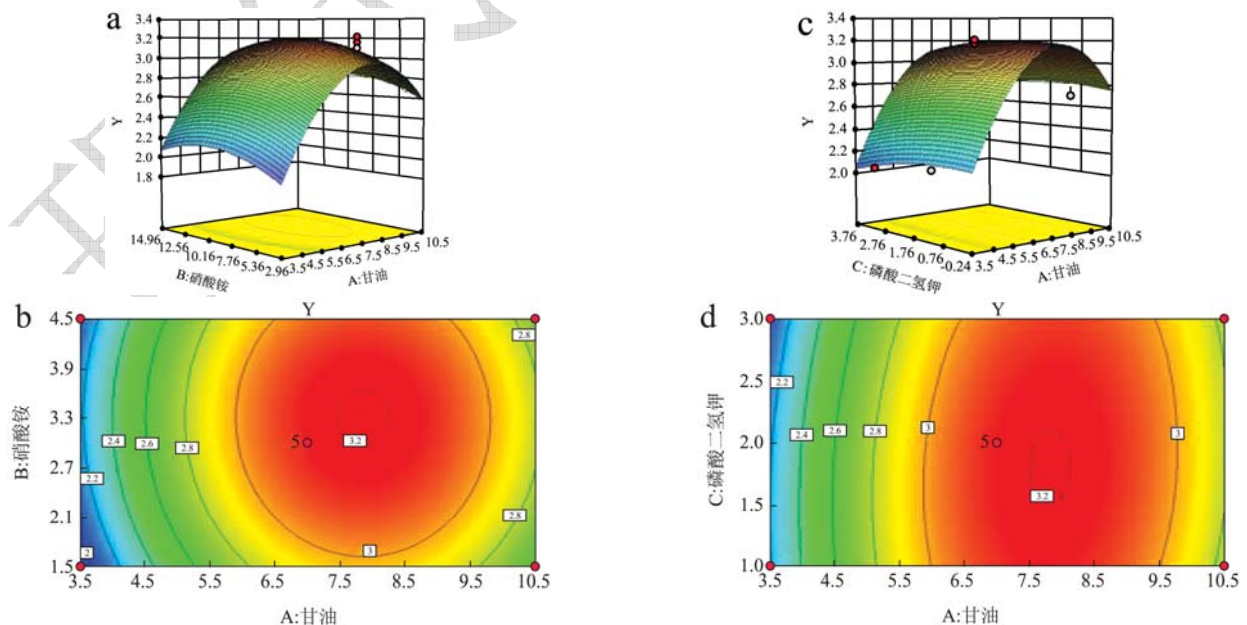
三维响应面图和二维等高线图如图 4 所示。三维响应面图表示当其它的因素保持在零水平时，考查两个变量对番茄红素产量的影响，都可以达到较大值。由二维等高线图得出各因素之间的交互作用不明显，这与  $p$  值检验的结果一致。

表 3 回归方程的二次型变异分析结果

Table 3 Quadratic variation analysis results of regression equation

Source	SS	DF	MS	F Value	P
Model	4.37	14	0.31	92.06	$1.00 \times 10^{-4}$
A	1.28	1	1.28	377.03	$1.00 \times 10^{-4}$
B	$5.5 \times 10^{-2}$	1	$5.5 \times 10^{-2}$	16.08	$1.30 \times 10^{-2}$
C	$1.2 \times 10^{-2}$	1	$1.2 \times 10^{-2}$	3.60	$7.84 \times 10^{-1}$
D	$1.80 \times 10^{-3}$	1	$1.80 \times 10^{-3}$	0.53	$4.78 \times 10^{-1}$
AB	$1.56 \times 10^{-4}$	1	$1.56 \times 10^{-4}$	$4.60 \times 10^{-2}$	$8.33 \times 10^{-1}$
AC	$5.04 \times 10^{-3}$	1	$5.04 \times 10^{-3}$	1.49	$2.43 \times 10^{-1}$
AD	$2.12 \times 10^{-3}$	1	$2.12 \times 10^{-3}$	0.62	$4.43 \times 10^{-1}$
BC	$3.24 \times 10^{-4}$	1	$3.24 \times 10^{-4}$	$9.60 \times 10^{-2}$	$7.62 \times 10^{-1}$
BD	$2.40 \times 10^{-3}$	1	$2.40 \times 10^{-3}$	0.71	$4.14 \times 10^{-1}$
CD	$3.08 \times 10^{-3}$	1	$3.08 \times 10^{-3}$	0.91	$3.57 \times 10^{-1}$
A <sup>2</sup>	2.92	1	2.92	861.36	$1.00 \times 10^{-4}$
B <sup>2</sup>	0.19	1	0.19	55.97	$1.00 \times 10^{-3}$
C <sup>2</sup>	$2.30 \times 10^{-2}$	1	$2.3 \times 10^{-2}$	6.73	$2.12 \times 10^{-2}$
D <sup>2</sup>	$1.60 \times 10^{-2}$	1	$1.60 \times 10^{-2}$	4.84	$4.51 \times 10^{-2}$
Residual	$4.70 \times 10^{-2}$	14	$3.39 \times 10^{-3}$		
Lack of Fit	$4.30 \times 10^{-2}$	10	$4.28 \times 10^{-3}$	3.68	$1.11 \times 10^{-1}$
Pure Error	$4.66 \times 10^{-3}$	4	$1.17 \times 10^{-3}$		
Cor Total	4.42	28			

注：R<sup>2</sup>=0.9785。



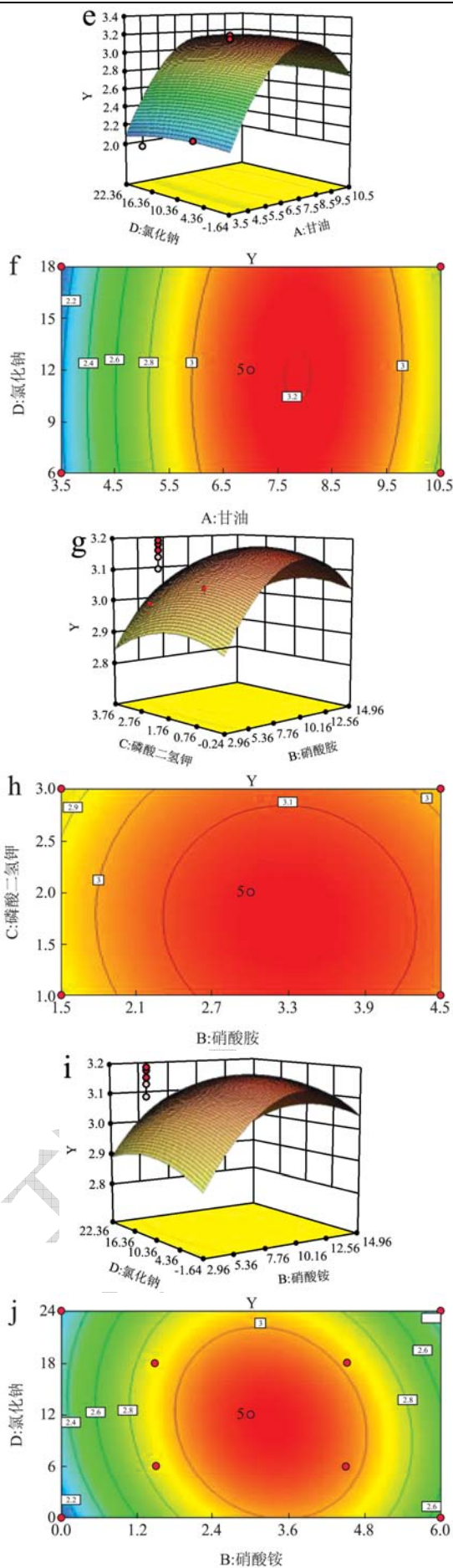


Fig.4 Three-dimensional response surface map and two-dimensional contour map

图4 三维响应面图和二维等高线图

注: a-b: 甘油和硝酸铵的交互作用; c-d: 甘油和磷酸二氢钾的交互作用; e-f: 甘油和氯化钠的交互作用; g-h: 硝酸铵和磷酸二氢钾的交互作用; i-j: 硝酸铵和氯化钠的交互作用; k-l: 磷酸二氢钾和氯化钠的交互作用。

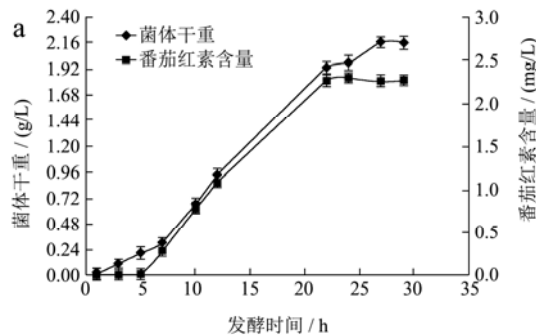
## 2.4 发酵罐高密度培养

### 2.4.1 发酵罐中工程菌生长曲线和番茄红素积累曲线

在发酵培养 22 h 左右生长周期进入了稳定期, 色素的得率基本稳定, 菌体总数增长减缓 (图 5a)。整个过程中菌体繁殖的速度较慢, 对数生长期的持续时间较长。分批发酵培养条件下, 色素得率为 2.30 mg/L。

### 2.4.2 溶氧量的优化

恒定发酵罐中的溶氧量约 20%, 测量菌体的生物量和色素得率如图 5b 所示。对比图 5a 可知, 保证充足的溶氧量使菌体生长繁殖速度增快, 同时缩短对数生长期。恒定溶氧量发酵过程中最大色素得率为 4.77 mg/L, 相比提高了 1 倍。故为提高细胞密度和产物得率可缩短对数期同时在对数期的后期进行补料。



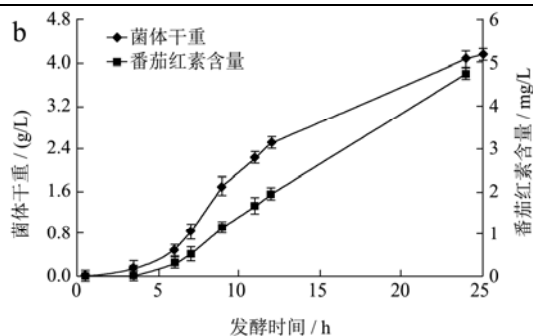


图5 分批发酵(a)及恒定溶氧下分批发酵(b)工程菌的发酵曲线

Fig.5 Fermentation curve of engineered bacteria of batch fermentation (a) and batch fermentation under constant dissolved oxygen (b)

### 2.4.3 恒速流加补料

根据上述结果,进行对数生长的后期恒速流加补料。细菌生物量和色素得率如图6a所示。溶氧量维持在20%,发酵培养13h后,溶氧量突然上升,表明菌体需氧量下降,其生长减缓,此时需要向发酵液中补料。补料后,下降的溶氧量表明菌体又开始了快速的繁殖,之后同样维持溶氧量在20%。发酵培养27h后,菌体生长速度再次减慢,表明恒速流加的培养液中的营养物质已不能满足菌体生长的需要,此时菌体干重达到10.36 g/L,色素的得率为14.02 mg/L。

### 2.4.4 指数流加补料

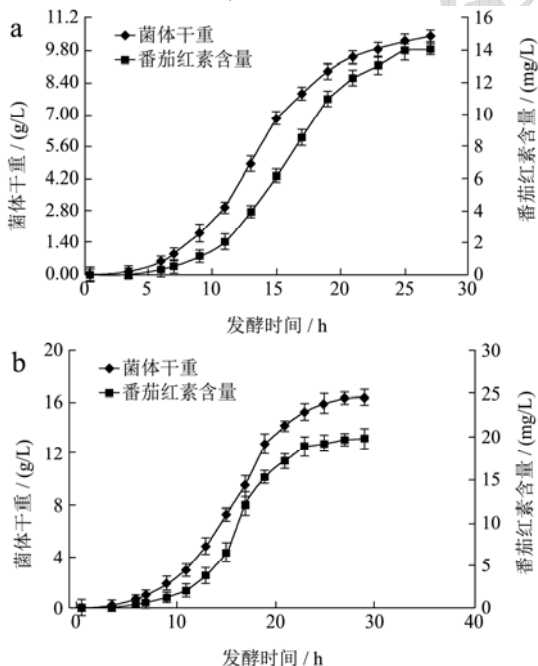


图6 恒速流加补料(a)及指数流加补料(b)发酵过程曲线

Fig.6 Curve of fermentation process of constant velocity fed-batch (a) and exponential fed-batch (b)

指数流加方式可以根据菌体密度及发酵液体积变化改变流加速率,还可以控制恒定的比生长速率,从

而避免乙酸的抑制和副产物的形成<sup>[19]</sup>。采用指数流加补料的方式进行发酵培养。测定结果如图6b所示。发酵13h后,随着溶氧量和pH值的上升,开始补料,同时通过流加磷酸使pH值保持在7.0,调节搅拌转速和空气通气量使溶氧量维持在20%。随着菌体密度的提高,维持溶氧量,调节补料速度。发酵29h时,菌体的生长已经基本停止,此时菌体干重达到16.55 g/L,色素得率为19.93 mg/L。图7为番茄红素工程菌的高密度发酵结果。



图7 番茄红素工程菌的高密度发酵

Fig.7 High density cultivation of lycopene engineering bacteria in 5 L fermenter

## 3 结论

3.1 以不同培养基对w-05工程菌的培养进行条件优化。在LB+甘油培养基、33℃培养时番茄红素得率最高。从而优化出最佳培养方式即不同阶段下不同培养温度:发酵初期(0~10h)培养温度为37℃使菌体快速繁殖,产物大量表达阶段(10~20h)培养温度为33℃使番茄红素大量积累。

3.2 对碳源、氮源、无机盐三种培养基中的主要成分以单因素实验进行优化,确定培养基中这三种主要成分的最优来源和最佳浓度。从而确定响应面实验中三种成分的选取物质及其中心点值分别为:甘油7.00 mg/L、硝酸铵3.00 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>2.00 g/L、NaCl12.00 g/L。

3.3 设计四因素三水平的响应面优化实验以求更好得确定w-05工程菌培养基成分的最优配比,在一定范围内建立各因素与番茄红素产量的回归模型。实验得出的最优培养基成分为:蛋白胨10.00 g/L、酵母浸出粉5.00 g/L、甘油7.83 mL/L、硝酸铵3.30 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>1.80 g/L、NaCl11.62 g/L。根据此优化结果得出的番茄红素产量理论值为3.42 mg/L。

3.4 发酵过程中发酵液的适宜pH值为7.0,适宜溶氧量为20%左右。而指数流加补料优于恒速流加补料,指数流加补料能更有效地提高菌体的生物量和番茄红



素产量。补料最佳时机为对数生长中后期(发酵 12~13 h)。最终的菌体干重达到 16.55 g/L, 番茄红素得率为 19.93 mg/L。相对于响应面优化后的普通摇瓶培养下番茄红素产量理论值 3.42 mg/L, 发酵罐中发酵条件优化后的番茄红素得率提高了近 5 倍。

3.5 本实验主要研究了 w-05 工程菌的最佳培养基成分。同时采用 5 L 发酵罐高密度培养该工程菌, 优化其培养条件及工艺, 使其番茄红素得率大幅提高。为微生物发酵产生高价值产物的条件及工艺优化提供参考。

### 参考文献

- [1] 叶志伟. 杜氏藻类胡萝卜素合成关键酶基因的分子克隆及外源表达系统的构建[D]. 广州: 华南理工大学, 2012  
YE zhi-wei. Molecular cloning of the key enzyme genes of carotenogenesis in *Dunaliella* and the construction of their heterologous expression system [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012
- [2] 李一萌. 基因工程菌发酵与杜氏藻环化酶的阻遏产番茄红素的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2015  
LI yi-meng. Research on lycopene production by optimizing fermentation conditions of genetically engineered bacteria and repressing lycopene cyclase *Lyc B1* of *Dunaliella bardawil* [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2015
- [3] 尚德军, 王军. 番茄红素研究现状与展望[J]. 检验检疫科学, 2004, 2: 59-61  
SHANG de-jun, WANG Jun. Current status and prospects of lycopene research [J]. Inspection and Quarantine Science, 2004, 2: 59-61
- [4] Sesso H D, Liu S, Gaziano J M, et al. Dietary lycopene, tomato-based food products and cardiovascular disease in women [J]. The Journal of Nutrition, 2003, 133(7): 2336-2341
- [5] 张涛, 邱青朝, 胡波. 番茄红素对人前列腺癌 PC-3 细胞周期的阻滞作用[J]. 南华大学学报(医学版), 2008, 6: 748-751  
ZHANG Tao, QIU Qing-chao, HU Bo. Arrest effect of lycopene on cell cycle in human prostatic cancer cell [J]. Journal of Nanhua University (Medical Edition), 2008, 6: 748-751
- [6] 成坚, 曾庆孝. 番茄红素的性质及生理功能研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2000, 2: 75-79  
CHENG Jian, ZENG Qing-xiao. Health effects and development of lycopene [J]. Food and Fermentation Industries, 2000, 2: 75-79
- [7] Boileau T W-M, Boileau A C, Erdman J W. Bioavailability of all-trans and cis-isomers of lycopene [J]. Experimental Biology and Medicine, 2002, 227(10): 914-919
- [8] 孙庆杰, 丁霄霖. 番茄红素的保健作用与开发[J]. 食品与发酵工业, 1997, 4: 72-75  
SUN Qing-jie, DING Xiao-lin. Health effects and development of lycopene [J]. Food and Fermentation Industries, 1997, 4: 72-75
- [9] 王锋. 番茄红素的提取与纯化工艺研究[D]. 济南: 山东大学, 2007  
WANG Feng. Study on extraction and purification process of lycopene [D]. Jinan: Shandong Normal University, 2007
- [10] 陈小龙, 张军, 吕杰, 等. 番茄红素生产方法的研究现状[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(6): 125-128  
CHEN Xiao-long, ZHANG Jun, LYU Jie, et al. Research actuality of lycopene production methods [J]. Food Research and Development, 2013, 34(6): 125-128
- [11] 晏露.  $\beta$ -胡萝卜素基因工程菌的构建表达及培养优化[D]. 广州: 华南理工大学, 2010  
YAN Lu. Construction and culture optimization of the genetic engineering bacterium for the production of  $\beta$ -carotene [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2010
- [12] 梁明华. 巴氏杜氏藻类胡萝卜素合成与降解相关基因的功能鉴定及盐胁迫响应机制研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2017  
LIANG Ming-hua. Functional identification of genes involved in carotenoids biosynthesis and degradation in *Dunaliella bardawil* and mechanisms in response to salt stress [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2017
- [13] 任云霞, 刘海洋, 丰淑红, 等. 番茄红素提取工艺的优化研究[J]. 食品工业科技, 2002, 5: 33-35  
REN Yun-xia, LIU Hai-yang, FENG Shu-hong, et al. Optimization of extraction process of lycopene [J]. Science and Technology of Food Industry, 2002, 5: 33-35
- [14] 刘志祥, 曾超珍. 响应面法在发酵培养基优化中的应用[J]. 北方园艺, 2009, 2: 127-129  
LIU Zhi-xiang, ZENG Chao-zhen. Application of response surface method in optimization of fermentation medium [J]. Northern Horticulture, 2009, 2: 127-129
- [15] 高红岩, 梅晓宏, 苏夜阳, 等. 番茄红素及其生物合成途径的研究[J]. 食品科技, 2005, 8: 42-45  
GAO Hong-yan, MEI Xiao-hong, SU Ye-yang, et al. Lycopene and its biosynthesis research by molecular biology

- [J]. Food Science and Technology, 2005, 8: 42-45
- [16] 苏文贵. 番茄红素的超声波辅助提取以及纯化研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2013
- SU Wen-gui. Study on the ultrasound-assisted extraction and purification of lycopene [D]. Wulumuqi: Xinjiang Agricultural University, 2013
- [17] 张希波, 刘洪海, 张晓丽, 等. 番茄红素化学合成的研究进展[J]. 西北药学杂志, 2009, 24(1): 78-80
- ZHAO Xi-bo, LIU Hong-mei, ZHAO Xiao-li, et al. Research progress on chemical synthesis of lycopene [J]. Northwest Pharmaceutical Journal, 2009, 24(1): 78-80
- [18] 王强, 余晓斌. 三孢布拉霉发酵产番茄红素的研究进展[J]. 微生物学通报, 2015, 42(2): 420-426
- WANG Qiang, YU Xiao-bin. Advance in production of lycopene by *Blakeslea trispora* [J]. Microbiology China, 2015, 42(2): 420-426
- [19] 李继安, 林惠敏, 牛金刚, 等. 流加补料技术在林可霉素发酵中的应用[J]. 中国医药工业杂志, 2012, 43(9): 739-742
- LI Ji-an, LIN Hui-min, NIU Jin-gang, et al. Application of flow feeding technology to *Lincomycin* fermentation [J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2012, 43(9): 739-742

## 欢迎订阅中文核心期刊 《现代食品科技》

邮发代号: 46-349 刊号: ISSN 1673-9078/CN 44-1620

每期定价 40 元, 全年 12 期 480 元。欢迎食品及相关行业的机构和科学工作者到各地邮局订阅, 并踊跃投稿和建立产学研合作关系。

地址: 广州五山华南理工大学食品科学与工程学院麟鸿楼 506 室, 邮编: 510640

电话: 020-87113352

E-mail: [xdspkj@126.com](mailto:xdspkj@126.com)

投稿系统: <http://xdspkj.ijournals.cn>