

# 环化酶阻断剂对三孢布拉氏霉菌发酵生产番茄红素的影响

丁长河, 白璐佳, 尹 萌

河南工业大学 粮油食品学院, 河南省天然色素制备重点实验室, 河南 郑州 450001

**摘要:**番茄红素具有良好的抗氧化活性,在清除自由基、抗癌、抗炎和预防心血管系统疾病等方面都表现出良好的功效。采用微生物发酵的方法,选择三孢布拉氏霉菌作为发酵菌株,加入环化酶阻断剂来提高三孢布拉氏霉菌发酵生产番茄红素的产量。以番茄红素产量作为筛选指标,对比4种环化酶阻断剂(2-氨基-6-甲基吡啶、2,6-二甲基吡啶、2-甲基咪唑和2-异丙基咪唑)对番茄红素产量的影响,选出最优环化酶阻断剂,在单因素的基础上进行正交试验优化。结果表明:与未添加环化酶阻断剂相比,添加环化酶阻断剂在一定程度上提高了番茄红素的产量,同时以2-氨基-6-甲基吡啶作为阻断剂,添加量0.5 g/L时番茄红素产量最高,故选择2-氨基-6-甲基吡啶进行正交试验;三孢布拉氏霉菌最优发酵条件为2-氨基-6-甲基吡啶的添加量0.4 g/L,发酵42 h时添加,发酵时间144 h,在此条件下,菌体生物量由39.88 g/L变为38.85 g/L,番茄红素产量由7.18 mg/L提高至498.59 mg/L。环化酶阻断剂对三孢布拉氏霉菌发酵生产番茄红素产生积极影响,可显著提高其产量。

**关键词:**三孢布拉氏霉菌;番茄红素;环化酶阻断剂

中图分类号:TS201.3

文献标志码:A

文章编号:1673-2383(2023)04-0067-07

DOI:10.16433/j.1673-2383.2023.04.009

## Effects of cyclase blockers on lycopene production by fermentation of *Blakeslea trispora*

DING Changhe, BAI Lujia, YIN Meng

College of Food Science and Engineering, Key Laboratory of Natural Pigment Preparation in Henan Province, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China

**Abstract:** Lycopene has shown good antioxidant activity due to its special structure, in addition to its good physiological functions in scavenging free radicals, inhibiting cancer cell proliferation, inducing apoptosis, anti-inflammatory and prevention of cardiovascular system diseases. In this experiment, the fermentation of lycopene was carried out using a microbial fermentation method, in which *Blakeslea trispora* (*B. trispora*) was selected as the fermenting strain and four different cyclase blockers were added to improve the production of lycopene by fermentation of *B. trispora*. Four cyclase blockers, such as 2-amino-6-methylpyridine, 2,6-dimethylpyridine, 2-methylimidazole and 2-isopropylimidazole, were compared for lycopene yield after fermentation, and lycopene yield was used as a screening index to select the best cyclase blocker for the next experiment. The addition of cyclase blocker increased the lycopene yield to a certain extent compared to the blank control group without the addition of the cyclase blocker, while the highest lycopene yield was obtained when 2-amino-6-methylpyridine was used as the blocker at an addition level of 0.5 g/L. Thus, 2-amino-6-methylpyridine was selected for the subsequent experiment. The effect of the addition of 2-amino-6-methylpyridine on the lycopene yield was investigated. The optimum fermentation conditions were obtained on the basis of single-factor orthogonal tests: the addition of 2-amino-6-methylpyridine at 0.4 g/L, the fermentation time with addition of 42 h, and the fermentation time of 144 h. Under these con-

收稿日期:2022-11-05

作者简介:丁长河(1968—),男,河南民权人,博士,教授,研究方向为功能性低聚糖及糖尿病食品,E-mail:2634012492@qq.com。

ditions, although the biomass of the bacteria decreased from 39.88 g/L to 38.85 g/L, the lycopene production increased from 7.18 mg/L to 498.59 mg/L, indicating that the yield was significantly increased. The results showed that cyclase blockers positively affected the production of lycopene by fermentation of *B. trispora* and significantly enhanced its yield.

**Key words:** *Blakeslea trispora*; lycopene; cyclase blockers

番茄红素是一种脂溶性的四萜碳氢化合物<sup>[1]</sup>,由于其多烯烃的结构而具有良好的抗氧化活性<sup>[2]</sup>。此外,在清除自由基、抑制癌细胞增殖、诱导癌细胞凋亡、抗炎和预防心血管疾病等方面都表现出良好的功效<sup>[3-5]</sup>。但它不能在人体内合成,只能通过饮食摄入含有类胡萝卜素的食物得到补充<sup>[6-7]</sup>,多存在颜色偏红的水果中,如西瓜、葡萄柚<sup>[8]</sup>、红肉脐橙<sup>[9]</sup>、樱桃、木鳖果、红果仔<sup>[10]</sup>等,但含量较低。当前人们对于番茄红素的需求量越来越高,因此,需要生产出更多的番茄红素来满足实际需要。在工业化生产中,自然提取法和化学合成法都存在一定的缺点,微生物发酵法因不受限制且产量高,所以成为优选<sup>[11]</sup>。

在利用微生物发酵生产番茄红素的众多菌种(如酵母、细菌、藻类、丝状真菌等)中,三孢布拉氏霉菌(*Blakeslea trispora*)利用正负菌混合发酵,具有生长迅速、菌体生物量大、色素产量高的特点,是目前唯一实现工业化生产类胡萝卜素的菌株,而类胡萝卜素的“原型”就是番茄红素,番茄红素可通过环化、氧化或还原等形成其他的类胡萝卜素<sup>[12]</sup>。对 *B. trispora* 合成番茄红素代谢过程进行调控,阻断番茄红素向 $\beta$ -胡萝卜素转化。目前的研究发现多种吡啶和咪唑及其衍生物被用作番茄红素环化酶阻断剂<sup>[13-14]</sup>。在 Vereshchagina 等<sup>[15]</sup>的研究中,向 *B. trispora* 发酵过程中添加 2-氨基-6-甲基吡啶可显著增加番茄红素含量,并在类胡萝卜素总量中占比 90%~95%;在王婧等<sup>[16]</sup>的研究中,添加 2,6-二甲基吡啶有效阻断番茄红素向 $\beta$ -胡萝卜素转化;在 Pegklidou 等<sup>[13]</sup>的研究中,2-甲基咪唑的安全使用范围为 200~800 mg/L,在此范围内可使番茄红素占总类胡萝卜素的 90%以上;在 Wang 等<sup>[17]</sup>的研究中,2-异丙基咪唑通过增加番茄红素合成途径中关键酶的表达水平,增强番茄红素的代谢流动,在添加量为 0.3 g/L 时几乎完全抑制番茄红素环化酶活性,用量较少,且容易从番茄红素中去除,减少食物毒性。综上,加入环化酶阻断剂可使发酵过程停留在番茄红素积累阶段,进而提高番茄红素的积累量。

利用 *B. trispora* 发酵生产番茄红素,可采用加入各类环化酶阻断剂、溶氧载体、表面活性剂和抗氧化酶等<sup>[18]</sup>。本研究在选用环化酶阻断剂参与调控代谢时,主要选择含氮杂环胺类化合物,其安全性更可靠,但剂量问题仍是一个潜在的危险,未来是否有更安全的阻断剂获得高产番茄红素仍有待研究<sup>[19-20]</sup>。

作者研究多种环化酶阻断剂对 *B. trispora* 发酵生产番茄红素的影响,选择两类(吡啶类和咪唑类)4种环化酶阻断剂进行比较,筛选出发酵效果最好的阻断剂,在此基础上进行单因素试验和正交试验,以此获得产番茄红素的最优条件,为工业化生产番茄红素提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

三孢布拉氏霉正菌(CCTCC AF 97006)、负菌(CCTCC AF 96002):中国典型培养物保藏中心。2-氨基-6-甲基吡啶(BR)、2,6-二甲基吡啶(BR)、2-甲基咪唑(BR):上海麦克林生化科技有限公司;2-异丙基咪唑(BR):上海阿拉丁生化科技股份有限公司;番茄红素标准品(EP):Sigma-Aldrich 公司;石油醚(HPLC)、乙腈(HPLC)、甲醇(HPLC)、二氯甲烷(HPLC)等试剂均为国产产品。

活化培养基(PDA):马铃薯去皮后称取 200 g 煮沸 30 min,纱布过滤后定容至 1 000 mL,加入葡萄糖 40 g,琼脂 30 g,煮沸溶解后,121 °C 灭菌 20 min。

种子培养基:玉米粉 44 g/L,黄豆粉 19 g/L,磷酸二氢钾 0.5 g/L,VB<sub>1</sub> 0.004 g/L,调至 pH 6.5,121 °C 灭菌 20 min。

发酵培养基:玉米粉 20 g/L,黄豆粉 45 g/L,大豆油 16 g/L,磷酸二氢钾 1.5 g/L,硫酸镁 0.6 g/L,VB<sub>1</sub> 0.004 g/L,调至 pH 6.5,121 °C 灭菌 20 min。

### 1.2 仪器与设备

LRH-250 生化培养箱:上海一恒科学仪器有

限公司;Sigma 1-14 非冷冻微型离心机;德国 Sigma-Aldrich 公司;UV-6000PC 紫外可见分光光度计;上海元析仪器有限公司;Agilent 1260 高效液相色谱仪;美国安捷伦科技有限公司;101 电热鼓风干燥箱;北京市永光明医疗仪器有限公司;ZKXF-2 电热真空干燥箱;上海树立仪器仪表有限公司;SW-CJ-1F 无菌操作台;苏州安泰空气科技有限公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 菌种活化

挑取 *B. trispora* 斜面划线于 PDA 培养基上,置于生化培养箱中 26 ℃ 培养 5 d。

#### 1.3.2 种子培养

250 mL 锥形瓶中装入 50 mL 种子培养基和 0.85% 生理盐水,121 ℃ 高压蒸汽灭菌 20 min。灭菌后将种子培养基和生理盐水放在无菌操作台上冷却。在无菌条件下吸取 5 mL 生理盐水分别反复抽吸冲洗 *B. trispora* 正菌和负菌斜面培养基,将正菌和负菌孢子悬浮液振荡混匀后,吸取 1 mL 接入种子培养基中,26 ℃、180 r/min 振荡培养 48 h。

#### 1.3.3 发酵培养

250 mL 锥形瓶中装入 50 mL 发酵培养基,灭菌后放置在无菌操作台上冷却。将 *B. trispora* 正菌和负菌种子培养基以体积比 1:5 进行混合,混合均匀后按照 10% 的接种量接入发酵培养基中,26 ℃、180 r/min 振荡培养 120 h。

#### 1.3.4 番茄红素的提取

取 10 mL 发酵液,3 500 r/min 离心处理 10 min,水洗 3 次后,菌泥放至已烘干称重的玻璃平板上,置于 45 ℃ 真空干燥箱中干燥。干燥后的菌丝经研磨后转移到棕色具塞锥形瓶中,加入 20 mL 石油醚置于振荡器中,室温下 180 r/min 振荡提取 1 h。研磨至振荡的过程中尽量避光。

#### 1.3.5 菌体生物量的测定

菌体在 45 ℃ 真空干燥箱中干燥至恒重。

$$\text{生物量}(\text{g/L}) = W/V \times 1\,000,$$

式中:W 为菌体干重,g;V 为发酵液体积,mL。

#### 1.3.6 番茄红素的测定

参考 Sevgili 等<sup>[21]</sup>的方法,并加以修改。使用高效液相色谱仪对番茄红素产量进行测定,色谱柱为 C18(5 μm,250 mm×4.6 mm)。色谱条件:流动相为 A,5% 娃哈哈水;B 为 12% 甲醇;C 为 60% 乙腈;D 为 23% 二氯甲烷;流速 1 mL/min;进样量 10 μL;检测波长 469 nm,柱

温 28 ℃。

#### 1.3.7 番茄红素纯度的测定

$$\text{纯度} = S_1/S_2 \times 100\%,$$

式中: $S_1$ 、 $S_2$  为番茄红素峰面积、总峰面积,mAU。

### 1.4 三孢布拉氏霉菌发酵生产番茄红素的环化酶阻断剂优化设计

#### 1.4.1 单因素试验设计

使用基础发酵培养基发酵生产番茄红素,选择不同添加量(2-氨基-6-甲基吡啶:0.2、0.5、0.8、1.1 g/L;2,6-二甲基吡啶:0.2、0.8、1.4、2.0 g/L;2-甲基咪唑:0.2、0.5、0.8、1.1 g/L;2-异丙基咪唑:0.2、0.4、0.6、0.8 g/L)的 4 种环化酶为阻断剂,以番茄红素产量作为筛选指标。在此基础上观察该环化酶阻断剂以不同添加量(0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 g/L)、不同添加时的发酵时间(以下简称“添加时间”)(30、36、42、48、54、60 h)以及不同发酵时间(84、96、108、120、132、144 h)对菌体生物量和番茄红素产量的影响,根据番茄红素的产量筛选影响显著的因素和最佳水平。

#### 1.4.2 正交试验设计

在单因素试验的基础上,以菌体生物量和番茄红素产量为指标,进行正交试验设计。

### 1.5 数据统计与分析

所有试验均重复 3 次,数据用平均值±标准差表示。采用 Excel 2010 统计数据,采用 Origin 2022 作图,采用 SPSS 24.0 软件分析显著性,采用正交设计助手设计正交试验。

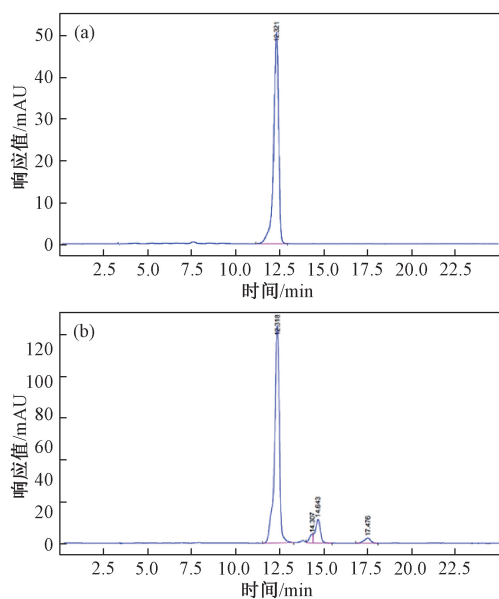
## 2 结果与分析

### 2.1 番茄红素高效液相色谱分析

将番茄红素标准品进行高效液相色谱分析,结果如图 1(a)所示,出峰时间在 12.321 min 左右;发酵产物色谱图如图 1(b)所示,出峰时间在 12.318 min 左右,与番茄红素标准品出峰时间相一致,但还有其他杂峰存在,应该是菌株发酵液中还存在其他成分,需做进一步研究。

### 2.2 不同环化酶阻断剂对 *B. trispora* 产番茄红素的影响

根据番茄红素的代谢途径,环化酶阻断剂加入的时间对菌体生长尤为重要。因此,本试验初步选择在发酵 48 h 时分别加入不同添加量的阻断剂,以不加任何阻断剂的作为空白对照。结果表明,选用的 4 种阻断剂均可积累大



注:(a)为标准品色谱图;(b)为发酵产物色谱图。

图1 番茄红素高效液相色谱

Fig. 1 High performance liquid chromatogram of lycopene

量的番茄红素,可知阻断剂抑制了番茄红素的环化。

从表1可知,当2-氨基-6-甲基吡啶作为阻断剂时,添加量为0.5 g/L时番茄红素产量最高;当2,6-二甲基吡啶作为阻断剂时,添加量为1.4 g/L时番茄红素产量最高;添加0.5 g/L的2-甲基咪唑作为阻断剂时,番茄红素产量最高;添加0.4 g/L的2-异丙基咪唑作为阻断剂时,番

茄红素产量最高。与空白组相比,随着4种阻断剂添加量的增加,菌体生物量呈降低趋势,这是由于阻断剂本身具有一定的毒性,对菌体生长产生抑制作用;番茄红素产量均呈先增再减的趋势;番茄红素纯度持续增加。综上,以番茄红素产量作为筛选阻断剂的标准,当2-氨基-6-甲基吡啶作为阻断剂时,番茄红素产量最高为 $(402.37 \pm 24.61)$  mg/L,所以选择2-氨基-6-甲基吡啶作为阻断剂进行后续试验。

### 2.3 环化酶阻断剂2-氨基-6-甲基吡啶添加量对 *B. trispora* 产番茄红素的影响

在 Tereshina 等<sup>[22]</sup>的研究中添加0.01 g/L 2-氨基-6-甲基吡啶实现了抑制 $\beta$ -胡萝卜素的合成,推测添加微量阻断剂就能对发酵过程产生影响。由图2可知,随着阻断剂的添加,番茄红素产量先增后减,说明环化酶阻断剂有效地抑制了番茄红素的环化,番茄红素不断积累,实现产量增加,相应地 $\beta$ -胡萝卜素积累减少,番茄红素纯度增加;而阻断剂添加越来越多,相应的安全风险也会增加,对菌体的生长造成损害,番茄红素产量下降,但纯度仍在增加。综上,添加0.4 g/L 2-氨基-6-甲基吡啶时番茄红素产量最高,为 $(434.31 \pm 13.86)$  mg/L,故选择2-氨基-6-甲基吡啶的添加量为0.4 g/L。

### 2.4 环化酶阻断剂2-氨基-6-甲基吡啶添加时间对 *B. trispora* 产番茄红素的影响

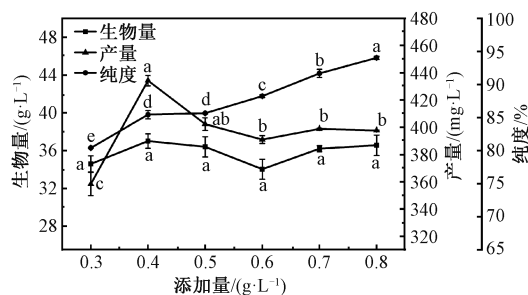
由图3可知,随着阻断剂添加时间的延长,

表1 不同阻断剂对 *B. trispora* 产番茄红素的影响

Table 1 Effects of different blocking agents on lycopene production by *B. trispora*

阻断剂	添加量/(g·L <sup>-1</sup> )	生物量/(g·L <sup>-1</sup> )	产量/(mg·L <sup>-1</sup> )	纯度/%
空白对照	0	39.88±2.02	7.18±0.40	23.36±5.95
2-氨基-6-甲基吡啶	0.2	38.70±2.42 <sup>a</sup>	310.57±42.08 <sup>c</sup>	76.17±0.86 <sup>d</sup>
	0.5	36.41±1.07 <sup>a</sup>	402.37±24.61 <sup>a</sup>	85.65±0.11 <sup>c</sup>
	0.8	36.57±1.08 <sup>a</sup>	397.65±0.37 <sup>ab</sup>	94.01±0.24 <sup>b</sup>
	1.1	34.09±2.50 <sup>a</sup>	329.75±4.88 <sup>bc</sup>	95.79±0.05 <sup>a</sup>
	2.0	38.74±6.24 <sup>a</sup>	20.13±5.27 <sup>b</sup>	21.58±2.78 <sup>c</sup>
2,6-二甲基吡啶	0.2	34.98±2.02 <sup>a</sup>	275.90±2.45 <sup>a</sup>	81.48±1.73 <sup>b</sup>
	0.8	34.89±0.95 <sup>a</sup>	370.42±4.77 <sup>a</sup>	79.65±0.42 <sup>b</sup>
	1.4	37.31±1.59 <sup>a</sup>	288.05±85.30 <sup>a</sup>	87.29±0.81 <sup>a</sup>
	2.0	36.43±2.14 <sup>a</sup>	196.70±14.83 <sup>ab</sup>	89.83±1.42 <sup>b</sup>
2-甲基咪唑	0.2	34.67±0.93 <sup>ab</sup>	220.89±12.92 <sup>a</sup>	93.03±0.26 <sup>a</sup>
	0.5	31.26±0.29 <sup>b</sup>	182.49±8.97 <sup>b</sup>	93.03±0.37 <sup>a</sup>
	0.8	32.45±1.41 <sup>b</sup>	176.05±0.19 <sup>b</sup>	94.23±0.17 <sup>a</sup>
	1.1	36.43±1.74 <sup>a</sup>	217.32±25.82 <sup>a</sup>	92.95±0.96 <sup>c</sup>
2-异丙基咪唑	0.2	33.47±2.21 <sup>a</sup>	228.61±2.24 <sup>a</sup>	94.77±1.22 <sup>bc</sup>
	0.4	34.61±1.48 <sup>a</sup>	195.77±2.96 <sup>a</sup>	95.68±0.03 <sup>ab</sup>
	0.6	33.17±2.87 <sup>a</sup>	148.52±5.23 <sup>b</sup>	97.66±0.02 <sup>a</sup>
	0.8			

注:同列相同字母表示组间差异不显著( $P>0.05$ ),不同字母表示组间差异显著( $P<0.05$ )。



注:曲线中不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。图 3 和图 4 同。

图 2 环化酶阻断剂 2-氨基-6-甲基吡啶添加量对 *B. trispora* 产番茄红素的影响

Fig. 2 Effect of cyclase blocker 2-amino-6-methylpyridine addition on lycopene production by *B. trispora*

番茄红素产量和菌体生物量均呈现出先增后减的趋势,在 42 h 时产量和菌体生物量达到最高,而番茄红素纯度在 42 h 后不断增加,但差异性不显著。在王常玲<sup>[23]</sup>的研究中,发酵 40 h 时添加咪唑阻断剂的产量最大,推测过早添加阻断剂会对菌体造成损害,导致番茄红素产量不高。在裴敏<sup>[24]</sup>的研究中 *B. trispora* 发酵会产生三孢酸,可显著促进类胡萝卜素的合成。阻断剂过早加入,造成三孢酸合成不足,番茄红素产量不高,过晚加入会使番茄红素环化生成类胡萝卜素,导致番茄红素产量降低。在发酵 42 h 时添加 0.4 g/L 2-氨基-6-甲基吡啶的番茄红素产量最高,为  $(254.83 \pm 41.00)$  mg/L。故选择添加时间为 42 h。

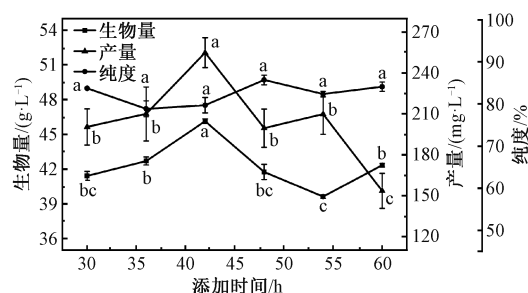


图 3 环化酶阻断剂 2-氨基-6-甲基吡啶添加时间对 *B. trispora* 产番茄红素的影响

Fig. 3 Effect of the timing of addition of the cyclase blocker 2-amino-6-methylpyridine on lycopene production by *B. trispora*

## 2.5 发酵时间对 *B. trispora* 产番茄红素的影响

在添加时间 42 h,添加量 0.4 g/L 的基础上,对 *B. trispora* 的发酵时间进一步研究。由图 4 可知,随发酵时间延长,番茄红素产量持续增加而

后再减少,在 132 h 时达到最高,同时菌体生物量也达到了最大值,而纯度在 108 h 后趋于稳定。原因是 *B. trispora* 在连续的发酵过程中,时间越长产生代谢物质越多,培养基中营养成分也不断被消耗,造成菌体生物量达到最大值后再减少,番茄红素产量也下降,但对纯度影响不大。综上,选择番茄红素产量最高的发酵时间 132 h 作为最佳发酵时间。

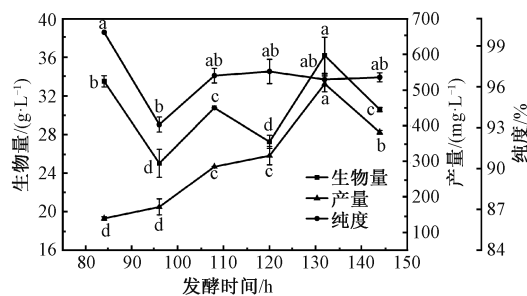


图 4 发酵时间对 *B. trispora* 产番茄红素的影响

Fig. 4 Effect of fermentation time on lycopene production by *B. trispora*

## 2.6 正交试验优化工艺

根据单因素试验结果,选用 2-氨基-6-甲基吡啶作为环化酶阻断剂,采用  $L_9(3^4)$ ,以 2-氨基-6-甲基吡啶添加时间(A)、添加量(B)和发酵时间(C)为三因素,正交试验因素与水平如表 2 所示。

表 2 正交试验因素与水平

Table 2 Factors and levels for orthogonal tests

水平	因素		
	A 添加时间/h	B 添加量/(g·L⁻¹)	C 发酵时间/h
1	36	0.3	120
2	42	0.4	132
3	48	0.5	144

由表 3 可知,菌体生物量最优组合为  $A_2B_3C_3$ ,即阻断剂添加时间 42 h、添加量 0.5 g/L、发酵时间 144 h,因素主次顺序依次是添加时间>发酵时间>添加量;产量的最优组合为  $A_2B_2C_3$ ,即阻断剂添加时间 42 h、添加量 0.4 g/L、发酵时间 144 h,因素主次顺序为发酵时间>添加时间>添加量。对比菌体生物量和番茄红素产量发现,添加量之间存在差异,但其影响最小,同时考虑实际应用,选择  $B_2$  即添加量 0.4 g/L。

方差分析如表 4 所示,3 个因素中,阻断剂添加时间和发酵时间对番茄红素产量、生物量均有显著的影响( $P < 0.05$ ),方差分析结果与极差分析

表 3 正交试验结果

Table 3 Results of the orthogonal test

试验号	误差项	A	B	C	生物量/(g·L <sup>-1</sup> )	番茄红素产量/(mg·L <sup>-1</sup> )
1	1	1	1	1	31.42	253.08
2	1	2	2	2	35.07	401.45
3	1	3	3	3	36.40	328.99
4	2	1	2	3	35.26	435.46
5	2	2	3	1	36.74	311.62
6	2	3	1	2	32.61	237.28
7	3	1	3	2	33.61	339.55
8	3	2	1	3	37.71	454.41
9	3	3	2	1	32.60	256.69
生物量	$k_1$	34.30	33.43	33.91	33.59	
	$k_2$	34.87	36.51	34.31	33.76	
	$k_3$	34.64	33.87	35.58	36.46	
	R	0.57	3.08	1.67	2.87	$R_1 > R_3 > R_2 > R_{\text{误差}}$
产量	$k_1$	327.84	342.70	314.92	273.80	
	$k_2$	328.12	389.16	364.53	326.09	
	$k_3$	350.22	274.32	326.72	406.29	
	R	22.38	114.84	49.61	132.49	$R_3 > R_1 > R_2 > R_{\text{误差}}$

表 4 正交试验方差分析

Table 4 Analysis of variance for orthogonal test

指标	方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
产量	A	$2.00 \times 10^4$	2	$1.00 \times 10^4$	20.244	*
	B	$4.03 \times 10^3$	2	$2.02 \times 10^3$	4.075	
	C	$2.67 \times 10^4$	2	$1.34 \times 10^4$	27.015	*
	误差	989.03	2	494.52		
	总计	$1.06 \times 10^6$	9			
生物量	A	16.611	2	8.306	33.257	*
	B	4.568	2	2.284	9.145	
	C	15.522	2	7.761	31.076	*
	误差	0.499	2	0.250		
	总计	$1.080 \times 10^4$	9			

注: \* 表示影响显著 ( $P < 0.05$ )。

一致。

验证试验结果显示最优组合  $A_2B_2C_3$  实现菌体生物量 38.85 g/L, 番茄红素产量 498.59 mg/L, 番茄红素纯度 90.11%。

### 3 结论

本试验通过对比 4 种环化酶阻断剂(2-氨基-6-甲基吡啶、2,6-二甲基吡啶、2-甲基咪唑、2-异丙基咪唑)对番茄红素产量的影响,筛选出 2-氨基-6-甲基吡啶作为阻断剂,在此基础上对 2-氨基-6-甲基吡啶的添加量、添加时间和发酵时间进行单因素试验和正交试验,得到最优组合:添加量 0.4 g/L,添加时间 42 h,发酵时间 144 h。

方差分析得出环化酶阻断剂添加时间和发酵时间对菌体生物量和番茄红素产量有显著影响 ( $P < 0.05$ )。验证试验实现菌体生物量 38.85 g/L, 番茄红素产量 498.59 mg/L。

利用微生物发酵法提高番茄红素的产量和选用合适的环化酶阻断剂仍是 *B. trispora* 工业化生产的关键问题,在工艺优化和生产成本控制等方面依然有提升的空间和研究的必要。因此,希望本研究为工业化生产番茄红素提供技术支撑。

#### 参考文献:

[1] CHOUDHARI S M, ANANTHANARAYAN

- L, SINGHAL R S. Purification of lycopene by reverse phase chromatography [J]. Food and bioprocess technology, 2009, 2(4): 391-399.
- [2] SAINI R K, NILE S H, PARK S W. Carotenoids from fruits and vegetables: chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities [J]. Food research international, 2015, 76: 735-750.
- [3] FAROUK S M, GAD F A, ALMEER R, et al. Exploring the possible neuroprotective and antioxidant potency of lycopene against acrylamide-induced neurotoxicity in rats' brain [J]. Biomedicine & pharmacotherapy, 2021, 138(5): 111458.
- [4] XIE C N, MA Z F, LI F, et al. Storage quality of walnut oil containing lycopene during accelerated oxidation [J]. Journal of food science and technology, 2018, 55(4): 1387-1395.
- [5] HAN H, LIM J W, KIM H. Lycopene inhibits activation of epidermal growth factor receptor and expression of cyclooxygenase-2 in gastric cancer cells [J]. Nutrients, 2019, 11(9): 2113.
- [6] NIRANJANA R, GAYATHRI R, NIMISH MOL S, et al. Carotenoids modulate the hallmarks of cancer cells [J]. Journal of functional foods, 2015, 18: 968-985.
- [7] WOODSIDE J V, MCGRATH A J, LYNER N, et al. Carotenoids and health in older people [J]. Maturitas, 2015, 80(1): 63-68.
- [8] PRIYADARSANI S, PATEL A S, KAR A, et al. Process optimization for the supercritical carbon dioxide extraction of lycopene from ripe grapefruit (*Citrus paradisi*) endocarp [J]. Scientific reports, 2021, 11: 10273.
- [9] LADO J, ZACARÍAS L, GURREA A, et al. Exploring the diversity in *Citrus* fruit colouration to decipher the relationship between plastid ultrastructure and carotenoid composition [J]. Planta, 2015, 242(3): 645-661.
- [10] RODRIGUEZ-AMAYA D B, KIMURA M, GODOY H T, et al. Updated Brazilian data-base on food carotenoids: factors affecting carotenoid composition [J]. Journal of food composition and analysis, 2008, 21(6): 445-463.
- [11] 阮丽,曾庆肖,周润芝,等. 番茄红素生物活性及提取研究进展 [J]. 食品安全导刊, 2021, (20): 171-172.
- [12] CÁMARA M, DE CORTES SÁNCHEZ-MATA M, FERNÁNDEZ-RUIZ V, et al. Lycopene [M]//Studies in Natural Products Chemistry. Amsterdam: Elsevier, 2013: 383-426.
- [13] PEGKLIDOU K, MANTZOURIDOU F, TSIMIDOU M Z. Lycopene production using *Blakeslea trispora* in the presence of 2-methylimidazole: yield, selectivity, and safety aspects [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2008, 56(12): 4482-4490.
- [14] NINET L, RENAUT J, TISSIER R. Activation of the biosynthesis of carotenoids by *Blakeslea trispora* [J]. Biotechnology and bioengineering, 1969, 11(6): 1195-1210.
- [15] VERESHCHAGINA O A, MEMORSKAYA A S, TERESHINA V M. Trisporoids under the stimulation of carotenogenesis in *Blakeslea trispora* [J]. Microbiology, 2012, 81(5): 526-533.
- [16] 王婧,余慧琳,陈鹏,等. 红酵母生产番茄红素发酵条件的研究 [J]. 食品科技, 2009, 34(5): 32-36.
- [17] WANG H B, HE F, LU M B, et al. High-quality lycopene overaccumulation via inhibition of  $\gamma$ -carotene and ergosterol biosyntheses in *Blakeslea trispora* [J]. Journal of functional foods, 2014, 7: 435-442.
- [18] 马晓晶. *Blakeslea trispora* 发酵制备番茄红素的研究 [D]. 北京: 北京化工大学, 2013.
- [19] LIU Y, LI X Y, LU S H, et al. Comparative metabolic responses induced by pyridine and imidazole in *Blakeslea trispora* [J]. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 2019, 7: 347.

- gus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers [J]. The journal of biological chemistry, 2002, 277(40): 37663-37669.
- [27] SCHNEIDER W D H, COSTA P C, FONTANA R C, et al. Upscale and characterization of lignin-modifying enzymes from *Marasmiellus palmivorus* VE111 in a bioreactor under parameter optimization and the effect of inducers [J]. Journal of biotechnology, 2019, 295: 1-8.
- [28] ZHU C W, BAO G W, HUANG S. Optimization of laccase production in the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* (ACCC 52857) induced through yeast extract and copper [J]. Biotechnology & biotechnological equipment, 2016, 30(2): 270-276.
- [29] LIANG S T, LUO Q, HUANG Q G. Degradation of sulfadimethoxine catalyzed by laccase with soybean meal extract as natural mediator; mechanism and reaction pathway [J]. Chemosphere, 2017, 181: 320-327.
- [30] 窦欣. 灵芝漆酶的性质、应用及其基因在毕赤酵母中的表达 [D]. 无锡: 江南大学, 2019.
- [31] COLLA I M, DE O FILHO O B Q, BERTÉLI M B D, et al. Carbon-to-nitrogen ratios on laccase and mushroom production of *Lentinus crinitus* [J]. International journal of environmental science and technology, 2023, 20(4): 3941-3952.

(责任编辑 周凤航)

(上接第73页)

- [20] HERNÁNDEZ-ALMANZA A, MONTAÑEZ J, MARTÍNEZ G, et al. Lycopene: progress in microbial production [J]. Trends in food science & technology, 2016, 56: 142-148.
- [21] SEVGILI A, ERKMEN O. Improved lycopene production from different substrates by mated fermentation of *Blakeslea trispora* [J]. Foods, 2019, 8(4): 120.
- [22] TERESHINA V M, MEMORSKAYA A S, FEOFILOVA E P. Zygote formation in *Blakeslea trispora*: morphological peculiarities and relationship with carotenoid synthesis [J]. Microbiology, 2003, 72(4): 448-454.
- [23] 王常玲. 产番茄红素菌株的选育及代谢调控的初步研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2009.
- [24] 裴敏. 高产番茄红素三孢布拉霉菌的选育及其发酵工艺的优化 [D]. 无锡: 江南大学, 2016.

(责任编辑 周凤航)