



引用格式:杨雪鹏,孙建宏,汪芳芳,等. 腊状芽孢杆菌 L16 降解番茄红素生成香味物质的研究[J]. 轻工学报,2018,33(1):1-6.

中图分类号:TS41 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2018.01.001

文章编号:2096-1553(2018)01-0001-06

腊状芽孢杆菌 L16 降解番茄红素 生成香味物质的研究

Study on the generation of aromatic compounds from lycopene degradation by
Bacillus cereus strain L16

杨雪鹏¹,孙建宏^{1,2},汪芳芳¹,金宝义¹,郑坚强¹
YANG Xuepeng¹,SUN Jianhong^{1,2},WANG Fangfang¹,JIN Baoyi¹,
ZHENG Jianqiang¹

1. 郑州轻工业学院 食品与生物工程学院,河南 郑州 450001;
2. 山东中烟工业有限责任公司,山东 济南 250014

1. College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;
2. China Tobacco Shandong Industrial Co., Ltd., Ji'nan 250014, China

关键词:

番茄红素;腊状芽孢杆菌 L16;降解产物

Key words:

lycopene;
Bacillus cereus strain
L16;
degradation product

摘要:烟叶来源的腊状芽孢杆菌 L16 在番茄红素底物浓度为 300 mg/L 的培养基中,35 °C,150 r/min,pH=7.0 培养至 72 h 时,番茄红素降解量达到最大值 224.4 mg/L. 经 GC-MS 分析,番茄红素经腊状芽孢杆菌 L16 降解得到两种产物,分别为 6-甲基-5-庚烯-2-酮和异辛二烯酮,这两种物质均为烟草特征香气成分.

收稿日期:2017-12-04

基金项目:国家自然科学基金项目(31571778)

作者简介:杨雪鹏(1973—),男,河南省睢县人,郑州轻工业学院教授,博士,主要研究方向为生物催化与转化.

Abstract: Under the culture temperature 35 °C, shaking frequency 150 r/min, culture pH value 7.0 and culture time 72 h, the quantity of lycopene-degrading reached 224.4 mg/L by *Bacillus cereus strain* L16 with 300 mg/L lycopene in the medium. The degradation products analyzed by GC-MS were 6-methyl-5-hepten-2-one and isopropyl ketone, which were the characteristic aromatic components for tobacco.

0 引言

番茄红素(lycopene)又称 ψ -胡萝卜素,属于异戊二烯类化合物,是类胡萝卜素的一种.其化学结构式中含有11个碳碳双键的非环状平面共轭多不饱和脂肪烃,易受光、热和氧影响发生降解^[1-3].在食品体系中,番茄红素的降解方式主要有热氧化降解、化学氧化降解、光氧化降解等.其降解产物也因降解方式不同而各异.番茄红素在食品中形成风味物质主要是通过降解途径.生物法降解是利用酶和微生物来降解番茄红素,与化学法降解相比,生物法降解利用了酶催化的专一性,得到成分相对单一的香味物质,故生物法降解得到的香味物质被认定为天然成分^[4-5].

已有文献报道,与番茄红素结构类似的胡萝卜素和叶黄素可降解生成烟草特征风味物质,如,氧化异佛尔酮、二羟基月桂烯醇、3-羟基- β -紫罗兰酮^[6-7].然而,有关番茄红素的生物降解研究仍鲜见报道.本研究室从烟叶中筛选得到的腊状芽孢杆菌 L16,经培养后能降解番茄红素产生香味物质.鉴于此,本研究拟对腊状芽孢杆菌 L16 降解番茄红素的动力学过程进行研究,并对其降解产物进行分析鉴定,以期获得天然的烟草特征香味物质提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

材料:番茄红素,购自上海哈灵生物科技有限公司;无水 Na_2SO_4 (AR),购自天津市凯通化学试剂有限公司;腊状芽孢杆菌(*Bacillus cereus strain*) L16,为本研究室筛选所得;二氯甲烷

(AR),甲醇(GR),均购自天津市凯通化学试剂有限公司.

种子液培养基的配制:蛋白胨 10.0 g,酵母 5.0 g, NaCl 1.0 g,蒸馏水 1 L; pH = 7.0.

液体培养基的配制:酵母膏 3 g,蛋白胨 10 g, NaCl 10 g,葡萄糖 1 g,蒸馏水 1 L; pH 值为 6.5~7.5.

仪器:1260infinity 液相色谱仪,HP6890/5976 气质联用仪,美国安捷伦科技公司产;Hicen FR 高速冷冻离心机,德国英雄仪器公司产;UV-2300 分光光度计,尤尼克(上海)有限公司产;RE-52AA 旋转蒸发仪,郑州凯鹏实验仪器有限公司产;BSD-YF3200 恒温振荡器,上海福玛实验设备有限公司产.

1.2 实验方法

1.2.1 番茄红素标准曲线的绘制方法 以甲醇为溶剂,分别配制 50 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L, 400 mg/L, 500 mg/L, 600 mg/L 番茄红素标准溶液,经 HPLC 分析后,以峰面积为纵坐标(Y),底物浓度为横坐标(X),绘制标准曲线.

1.2.2 番茄红素降解动力学实验 腊状芽孢杆菌(*Bacillus cereus strain*) L16 能够降解番茄红素生成香味物质.降解动力学实验有助于研究番茄红素底物浓度对降解效率的影响,配制底物浓度分别为 100 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L, 400 mg/L, 500 mg/L, 600 mg/L,在优化后的培养条件下(35 °C, pH = 7.0, 接种量 1.0%, 150 r/min)培养 72 h,然后将 L16 菌株的斜面保存菌株接种到 5 mL 种子液培养基中, 150 r/min, 35 °C 恒温培养发酵至种子培养液 OD_{600} 值为 2~2.5,得到种子液,置于 4 °C 冰箱

备用.按照表 1 所示,将种子液接种到相应的液体培养基中,150 r/min,35 ℃ 发酵培养.对实验组和对照组分别定时取样,并对样品中番茄红素底物浓度进行检测,对照组一培养基中不含番茄红素,对照组二培养基中不接入种子液.

表 1 番茄红素降解动力学实验设计

Table 1 The design of lycopene degradation kinetics

编号	番茄红素底物浓度/(mg·L ⁻¹)	种子液接种量/%
实验组	300	1.0
对照组一	0	1.0
对照组二	300	0.0

1.2.3 番茄红素的提取与分析^[8-10] 在避光条件下,将发酵液在 4 ℃ 和 6500 r/min 条件下离心 15 min,取上清液加入等体积二氯甲烷,萃取 3 次,合并得番茄红素提取物.在提取物中加入无水 Na₂SO₄ 干燥过夜,真空浓缩,蒸干溶剂后,将固形物溶于 2 mL 甲醇,用滤膜(0.45 μm)过滤,滤液用于 HPLC 分析,并用等体积不接菌培养基作为实验对照.

HPLC 分析条件:色谱柱为 C18 柱(4.6 mm × 250 mm,粒径为 5 μm),柱温为 30 ℃,流动相为 V(甲醇):V(水) = 1:99,流速为 0.6 mL/min,检测波长为 460 nm,进样量为 5 μL.

1.2.4 番茄红素降解产物 GC-MS 分析 番茄红素降解产物提取如 1.2.3 所述.在提取物中加入无水 Na₂SO₄ 干燥过夜,真空浓缩至 1 mL,用于 GC-MS 分析^[11-13].

GC-MS 分析条件:色谱柱为 HP-5(30 m × 0.25 mm;0.25 μm);升温程序为初始温度 45 ℃(保持 5 min) $\xrightarrow{\text{升温速率 } 5 \text{ } ^\circ\text{C}/\text{min}}$ 120 ℃(保持 5 min) $\xrightarrow{\text{升温速率 } 4 \text{ } ^\circ\text{C}/\text{min}}$ 180 ℃(保持 5 min) $\xrightarrow{\text{升温速率 } 3 \text{ } ^\circ\text{C}/\text{min}}$ 230 ℃ $\xrightarrow{\text{升温速率 } 5 \text{ } ^\circ\text{C}/\text{min}}$ 280 ℃(保持 5 min);进样口温度 270 ℃;传输线温度 270 ℃;分流比 1:1;载气 He;流速 1 mL/min.

2 结果与分析

2.1 番茄红素标准曲线的绘制

不同底物浓度的番茄红素标准溶液经 HPLC 的检测结果如图 1 所示.由图 1 可知,番茄红素底物浓度(X)与峰面积(Y)的回归方程为 $Y = 43.135X + 57.84$,相关系数 $R^2 = 0.9976$,表明在 0 ~ 500 mg/L 浓度范围内,番茄红素质量浓度与峰面积线性关系良好.

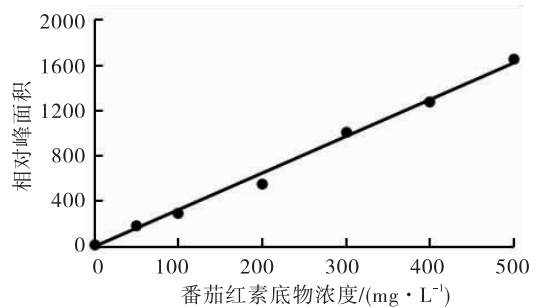


图 1 番茄红素的标准曲线

Fig. 1 The standard curve of lycopene

2.2 番茄红素降解动力学实验结果分析

2.2.1 番茄红素底物浓度对降解效果的影响

番茄红素底物浓度分别为 100 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L, 400 mg/L, 500 mg/L, 600 mg/L,在 35 ℃,pH 为 7.0,接种量 1.0%,150 r/min 条件下培养 72 h 后,测定培养基中番茄红素底物浓度和菌体浓度,考察底物浓度对番茄红素降解效果的影响.如图 2 所示,当培养基中番茄红素底物浓度低于 500 mg/L 时,番茄红素底物浓度对菌体生长几乎没有影响,而当发酵培养基中番茄红素底物浓度大于 500 mg/L 时,发酵液的细胞浓度显著下降;当发酵培养基中番茄红素底物浓度为 100 ~ 300 mg/L,腊状芽孢杆菌 L16 降解番茄红素的量随着番茄红素底物浓度的增加而增加,而当番茄红素底物浓度为 300 mg/L 时,其降解量达到最大值 224.4 mg/L;当番茄红素底物浓度为 300 ~ 500 mg/L 时,随着番茄红素底物浓度增

加,番茄红素降解量基本不变;当番茄红素底物浓度大于 500 mg/L 时,番茄红素降解量则明显下降.其原因可能是高浓度的番茄红素会对微生物具有毒害作用,从而影响细胞生长和番茄红素降解效果.因此,发酵培养基中番茄红素底物浓度以 300 mg/L 为宜.

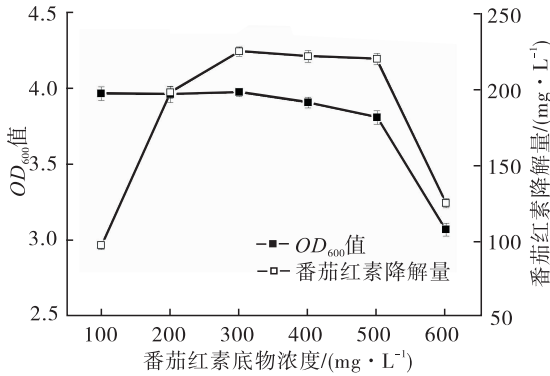


图2 番茄红素底物浓度对菌体细胞生长和番茄红素降解的影响

Fig. 2 Effect of lycopene concentration on the cell growth and lycopene degradation

2.2.2 培养时间对腊状芽孢杆菌 L16 生长的影响 为进一步了解腊状芽孢杆菌 L16 降解番茄红素的情况和底物浓度对菌体细胞生长的影响,将腊状芽孢杆菌 L16 在 35 °C, pH = 7.0, 150 r/min, 接种量 1.0%, 番茄红素底物浓度 300 mg/L 的培养条件下,每隔 12 h 取样测定培养基中的菌体浓度,实验结果见图 3. 由图 3 可知,在上述培养条件下,腊状芽孢杆菌 L16 在 0 ~ 12 h 为延滞期,12 ~ 72 h 为对数生长期,72 h 后为生长平衡期.

2.2.3 培养时间对腊状芽孢杆菌 L16 降解番茄红素的影响 将腊状芽孢杆菌 L16 在接种量 1.0%, 35 °C, pH = 7.0, 150 r/min, 番茄红素底物浓度 300 mg/L 的培养条件下,每隔 12 h 取样测定培养基中的番茄红素含量,考察培养时间对腊状芽孢杆菌 L16 降解番茄红素的影响,实验结果见图 4. 由图 4 可知,培养基中番茄红素底物浓度随着培养时间延长而降低,其降解

率则随着培养时间延长而增大.当培养时间为 72 h 时,番茄红素降解率达到 74.8%,即番茄红素降解量为 224.4 mg/L;当培养时间大于 72 h 时,番茄红素降解量基本维持不变.

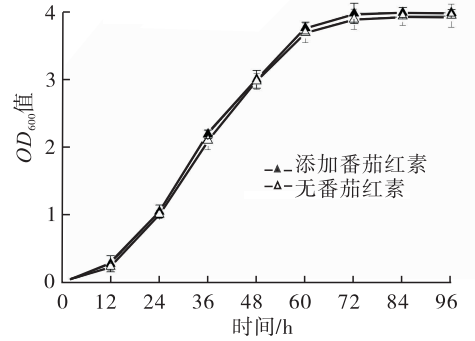


图3 番茄红素底物浓度为 300 mg/L 时腊状芽孢杆菌 L16 的生长曲线

Fig. 3 The growth curve of *Bacillus cereus* strain L16 with 300 mg/L of lycopene in the medium

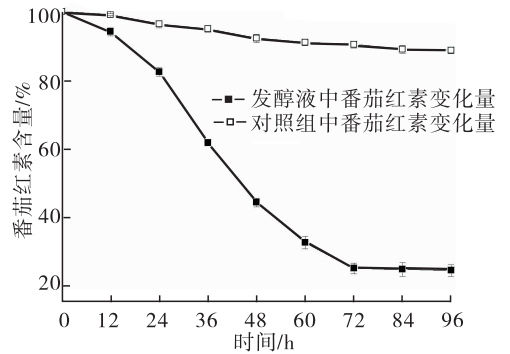
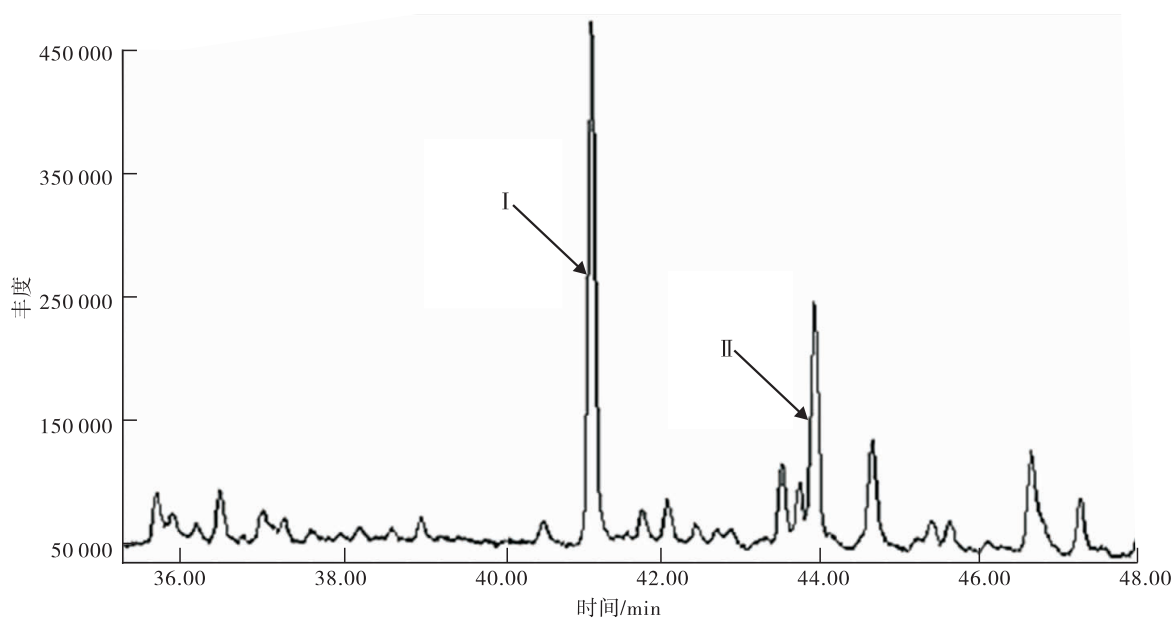


图4 培养时间对腊状芽孢杆菌 L16 降解番茄红素的影响

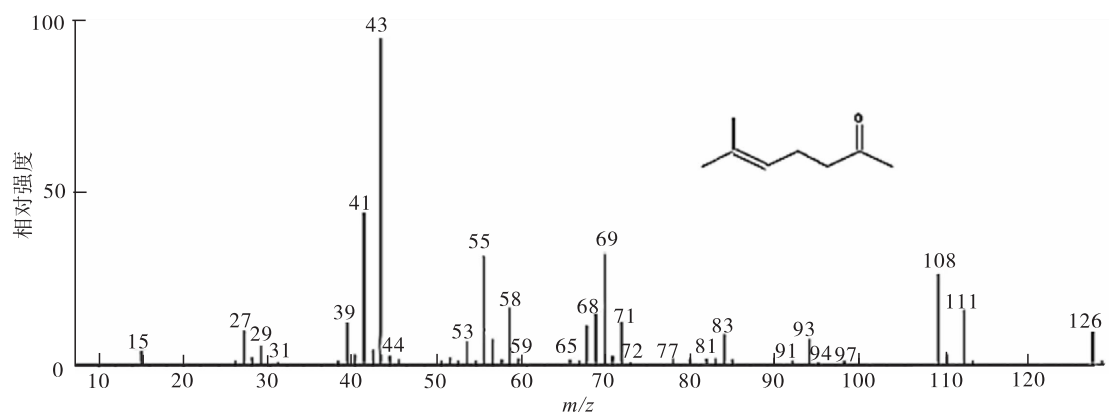
Fig. 4 Effect of culture time of *Bacillus cereus* strain L16 on lycopene degradation

2.3 番茄红素降解产物 GC-MS 分析结果

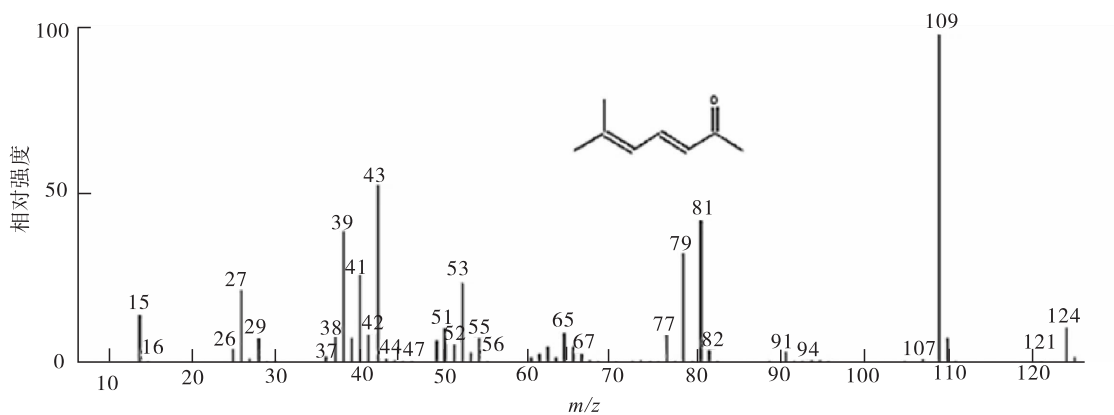
为了确定番茄红素的降解产物,对在 35 °C, pH = 7.0, 150 r/min 发酵 72 h 后所提取的发酵液样品进行 GC-MS 分析,结果见图 5. 由图 5a) 可知,番茄红素经腊状芽孢杆菌 L16 降解后的主要降解产物有两种,选择这两种降解产物,结合图 5b) 和图 5c) 显示的降解产物的离子流信息与质谱数据库提供的质谱图信息,可以



a) 总离子流图



b) 产物 I 离子流图



c) 产物 II 离子流图

图 5 番茄红素降解产物 GC-MS 分析图

Fig. 5 The GC-MS chromatograms of the degradation products for lycopene

初步定性判断产物 I 为 6-甲基-5-庚烯-2-酮,产物 II 为异辛二烯酮。

3 结论

本文在从烟叶中筛选到能够降解番茄红素的腊状芽孢杆菌 L16 的基础上,研究其对番茄红素生物降解的动力学过程并对其降解产物作初步鉴定。结果表明,腊状芽孢杆菌 L16 在番茄红素底物浓度为 300 mg/L 的培养基中,经 35 ℃,pH = 7.0,150 r/min 发酵 72 h 时,番茄红素的降解量达到最大值 224.4 mg/L。经 GC-MS 分析初步判定其降解产物为 6-甲基-5-庚烯-2-酮和异辛二烯酮,这两种物质均为烟草香味物质成分,且风味阈值较低。本研究为通过天然产物生物转化途径获得天然的烟草香味物质提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 侯纯明,张天罡,庞常健. 番茄红素降解研究[J]. 沈阳化工大学学报,2011,25(1):18.
- [2] NGUYEN M L, SCHWARTZ S J. Lycopene: Chemical and biological properties [J]. Food Technology,1999,53(2):38.
- [3] 邱建生,张彦雄,刘铁柱. 国内外番茄红素的研究与生产现状[J]. 中国食品添加剂,2000(2):12.
- [4] RONEN G, COHEN M, ZAMIR D, et al. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: Expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant delta [J]. The Plant Journal,1999,17(4):341.
- [5] G ROSS M D, SNOWDON D A. Plasma antioxidant concentrations in a population of elderly women: Findings from the nun study [J]. Nutrition Research,1996,16(11):1818.
- [6] 古昆,陈静波,刘攻,等. 叶黄素的几类降解反应研究[J]. 化学研究与应用,1999,11(5):543.
- [7] 刘维涓. β -胡萝卜素降解反应研究进展[J]. 林产化学与工业,2008(3):122.
- [8] 李兵,赵海燕,刘伟,等. 超高效液相色谱/二极管阵列检测器测定螺旋藻保健食品中的类胡萝卜素[J]. 分析测试学报,2015,34(7):813.
- [9] 杨虹琦,岳骞,黎娟,等. 高效液相色谱法测定烤烟类胡萝卜素[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版),2006,32(6):616.
- [10] 陈冬东,郗存显,彭涛,等. 高效液相色谱-串联质谱法测定保健食品中的番茄红素[J]. 食品科学,2012,33(20):206.
- [11] 楼小华,高川川,朱文静. GC-MS-MS 法同时测定烟草中 113 种有机磷、有机氯及拟除虫菊酯类农药残留[J]. 中国烟草科学,2012(5):23.
- [12] 刘维涓. 叶黄素催化氧化降解产物的 GC-MS 分析鉴定[J]. 林产化学与工业,2009(2):85.
- [13] 刘金霞,李元实,姬小明,等. 叶黄素氧化降解产物 GC-MS 分析及在卷烟加香中的应用[J]. 郑州轻工业学院学报,2011,26(2):24.