

# 无机盐和碳氮源对青霉 PT95 类胡萝卜素产率的影响\*

徐 军 崔丽霞 韩建荣\*\*

(山西大学生命科学系 太原 030006)

**摘要:** 供试的 4 种无机盐中,  $K_2HPO_4$  的单因子效应最好;  $K_2HPO_4 + KCl + MgSO_4$  表现出最好的正协同效应。5 种碳源都能被 PT95 菌株利用, 麦芽糖和蔗糖是最适碳源。在以酵母膏为氮源的培养基上, PT95 菌株的菌核生物量最高; 而在以蛋白胨为氮源的培养基上, 类胡萝卜素产率最高; 铵盐和尿素对菌核形成不利; 硝酸钠是最好的无机氮源。培养基中的含氮量保持在 0.24 ~ 0.48 g/L, 含碳量保持在 5.26 ~ 21.05 g/L, 有利于 PT95 菌株形成菌核和积累色素; 培养基的最适 C/N 比为 25:1。

**关键词:** 青霉, 无机盐, 碳源和氮源, 类胡萝卜素产率, 菌核生物量

**中图分类号:** Q939.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 04-0077-05

## EFFECT OF VARIOUS INORGANIC SALTS, CARBON AND NITROGEN SOURCES ON CAROTENOID YIELD IN SURFACE CULTURES OF *PENICILLIUM* SP. PT95

XU Jun CUI Li-Xia HAN Jian-Rong\*

(Department of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006)

**Abstract:** Among inorganic salts tested,  $K_2HPO_4$  was more essential to the sclerotia formation and carotenogenesis of strain PT95 than  $KCl$ ,  $MgSO_4$  or  $FeSO_4$ . It was also shown that the combination of  $K_2HPO_4$ ,  $KCl$  and  $MgSO_4$  could produce the best positive cooperation and give the highest sclerotia biomass (782mg/plate) and pigment yield (328  $\mu$ g/plate). Five carbon sources, i.e. glucose sucrose, lactose, maltose and soluble starch, all could be utilized by the strain PT95, and maltose was the best. Among 8 nitrogen sources, yeast extract favoured the sclerotia formation, and peptone favoured the pigment accumulation; amine salts and urea were unfavourable to form sclerotia. The medium containing 0.24 ~ 0.48 g/L sodium nitrate-nitrogen was effective to both the sclerotia formation and the carotenoid production of strain PT95 when available maltose-carbon concentrations were at 5.26 ~ 21.05 g/L. The optimal C/N ratio was found to be 25:1.

**Key words:** *Penicillium* sp., Inorganic salts, Carbon and nitrogen sources, Carotenoid yield, Sclerotia biomass

类胡萝卜素是自然界分布非常广泛、意义非常重要的一类色素。由于微生物发酵法生产类胡萝卜素具有不受环境条件限制、便于工业化生产、提取工艺简单等优点, 所以近年来引起国内外的普遍重视。日益增多的研究报道主要集中在少数几个菌株, 例如 *Blakeslea trispora*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Phaffia rhodozyma* 等<sup>[1~3]</sup>。这些菌株无一例外都是在菌丝体或单细胞营养体内积累类胡萝卜素的。我们从土壤中分离到的汤姆青霉 PT95 菌株是迄今唯一报道过的能在菌核内积累类胡萝卜素的微生物菌株<sup>[4,5]</sup>。该菌株的另一个特点是只能在固态培养或固态发酵条件下形成菌核和积累色素, 因此只能选择固态培养或固态发酵方法进行有关的基础研究和应用开发研究。首先需要研究解决的问题是什么样的固态培养基适合于培养 PT95 菌株, 这是进行规模化发酵生产的

\* 国家自然科学基金资助项目 (No.30070021)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No.30070021)

\*\* 联系人

收稿日期: 2002-06-31, 修回日期: 2002-11-20

重要前提。在这方面我们已经做了一些工作,证明了经典的查氏琼脂培养基有利于PT95菌株菌核的大量形成和色素的积累<sup>[4]</sup>。但关于各种无机盐成分、碳源和氮源以及碳、氮源的比例关系对PT95菌株在固态培养条件下的菌核生物量和类胡萝卜素产率具有什么样的影响作用,仍是研究空白。本文报道这方面的初步研究结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

*Penicillium* sp. PT95 菌株,从山西汾阳混交林土壤中分离得到,保存在查氏琼脂斜面上。

### 1.2 培养基

**1.2.1 碳源、氮源试验培养基:**将查氏琼脂培养基中的蔗糖分别用葡萄糖、乳糖、麦芽糖、可溶性淀粉代替;硝酸钠分别用硝酸铵、硫酸铵、氯化铵、尿素、蛋白胨、酪蛋白(BDH产品)、酵母膏(Labm产品)代替。

**1.2.2 碳源浓度梯度培养基:**将查氏琼脂培养基中的蔗糖按不同量加入,使培养基里的含碳量分别为5.26g/L、10.53g/L、21.05g/L、42.10g/L和84.20g/L, C/N比分别为10:1、20:1、40:1、80:1、160:1。

**1.2.3 氮源浓度梯度培养基:**将查氏琼脂培养基中硝酸钠按不同量加入,配制成氮源浓度梯度培养基,使培养基里的含氮量分别为0.16g/L、0.24g/L、0.48g/L、0.8g/L和1.6g/L, C/N比分别为75:1、50:1、25:1、15:1、7.5:1。

**1.2.4 无机盐试验培养基:**将 $K_2HPO_4$ 、 $MgSO_4$ 、KCl和 $FeSO_4$ 进行不同组合(见表1),检测它们对PT95菌株菌核生物量和类胡萝卜素产率的影响作用。

表1 无机盐对菌核生物量和类胡萝卜素产率的影响

培养基	$K_2HPO_4$ (g/L)	KCl (g/L)	$MgSO_4$ (g/L)	$FeSO_4$ (g/L)	菌核干重 (mg/平板)	类胡萝卜素含量 ( $\mu g/g$ 干菌核)	类胡萝卜素产率 ( $\mu g$ /平板)
1	1	0	0	0	324e*	226e	73.22
2	0	0.5	0	0	-	-	-
3	0	0	0.5	0	-	-	-
4	0	0	0	0.01	-	-	-
5	1	0.5	0	0	197f	138f	27.19
6	1	0	0.5	0	458c	312c	140.90
7	1	0	0	0.01	354d	246d	87.08
8	0	0.5	0.5	0	-	-	-
9	0	0.5	0	0.01	-	-	-
10	0	0	0.5	0.01	-	-	-
11	1	0.5	0.5	0	782a	420a	328.44
12	1	0.5	0	0.01	320e	222e	71.04
13	1	0	0.5	0.01	561b	392b	219.91
14	0	0.5	0.5	0.01	-	-	-
15	1	0.5	0.5	0.01	558b	388b	216.50
16	0	0	0	0	-	-	-

注:带不同字母的数据差异显著( $P < 0.01$ )

### 1.3 实验方法

以上各种培养基配制好后,分别制成平板。每个平板采用3点式接入PT95菌株,25℃黑暗培养20d。所有试验均设5次重复。

### 1.4 菌核生物量测定

将 PT95 菌株在各种平板上形成的橙红色菌核用自来水刮洗下来,充分冲洗干净,置 50℃ 烘干称重。

### 1.5 类胡萝卜素的提取及含量测定

按文献 [4] 的方法提取菌核中类胡萝卜素,并按文献 [6] 的方法计算类胡萝卜素含量。

### 1.6 类胡萝卜素组分分离

按文献 [1] 的方法,在硅胶 G 薄板(青岛海洋化工厂产品)上分别用浓缩后的类胡萝卜素氯仿浸提液和标准  $\beta$ -胡萝卜素(Merck 产品)氯仿溶液点样,以石油醚:乙酸乙酯 = 9:1 为展开剂,于暗处展开,使各组分分离。

### 1.7 $\beta$ -胡萝卜素的测定

按文献 [5] 的方法进行。

### 1.8 统计学处理

取 5 次试验数据的均值,用 Duncan 多重比较法<sup>[7]</sup>进行多个均数间两两比较的显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 无机盐对菌核生物量和类胡萝卜素产率的影响

从表 1 可以看出无机盐对 PT95 菌株的菌核生物量具有很明显的影响作用。在供试的 4 种无机盐中,  $K_2HPO_4$  的单因子效应最好,说明  $K_2HPO_4$  对于 PT95 菌株的菌核分化具有重要的作用。如果以培养基 1 作为对照,那么  $K_2HPO_4 + MgSO_4$  和  $K_2HPO_4 + FeSO_4$  分别表现为正协同效应,但  $KCl + MgSO_4$  表现为负协同效应;在 3 种无机盐的协同效应中,  $K_2HPO_4 + KCl + MgSO_4$  表现出最好的正效应,菌核生物量达到 782mg/平板,是对照组的 2.41 倍。然而,当培养基中同时含有 4 种无机盐时(培养基 15),菌核生物量却达不到最高,说明  $FeSO_4$  有一定的负效应。

无机盐对 PT95 菌株类胡萝卜素产率影响作用类似于对菌核生物量的作用(见表 1)。 $K_2HPO_4$  同样表现出比其它无机盐更好的作用。 $K_2HPO_4$ 、 $KCl$  和  $MgSO_4$  的共同存在(培养基 11)能使 PT95 菌株的类胡萝卜素产率达到 328 $\mu g$ /平板的最高值,是对照组(培养基 1)的 4.49 倍。

### 2.2 碳源对菌核生物量和类胡萝卜素产率的影响

PT95 菌株在 5 种不同碳源的培养基上无论是菌核生物量还是类胡萝卜素产率都有较大的差异(表 2)。当以葡萄糖或麦芽糖为唯一碳源时,得到的菌核生物量明显高于其它糖( $P < 0.01$ );而当以乳糖为唯一碳源时,PT95 菌株菌核中的类胡萝卜素含量最高。若从类胡

表 2 碳源对菌核生物量和类胡萝卜素产率的影响

碳源	菌核干重 (mg/平板)	类胡萝卜素含量 ( $\mu g/g$ 干菌核)	类胡萝卜素产率 ( $\mu g$ /平板)
蔗糖	558b	338b	216.5
葡萄糖	697a	232c	161.7
麦芽糖	698a	315b	219.9
乳糖	241c	424a	102.2
可溶性淀粉	595ab	263c	156.5

萝卜素产率考虑, 麦芽糖和蔗糖是最合适的碳源。

2.3 氮源对菌核生物量和类胡萝卜素产率的影响

表 3 氮源对菌核生物量和类胡萝卜素产率的影响

氮源	菌核干重 (mg/平板)	类胡萝卜素含量 ( $\mu\text{g/g}$ 干菌核)	类胡萝卜素产率 ( $\mu\text{g}/\text{平板}$ )
硝酸钠	637ab	330b	210.2
硝酸铵	275d	337b	92.7
氯化铵	0	0	0
硫酸铵	0	0	0
尿素	281d	272bc	76.4
蛋白胨	654ab	559a	365.6
酪蛋白	491c	204c	100.2
酵母膏	748a	237c	177.3

中, 酵母膏对菌核形成最为有利, 形成的菌核量最高; 而蛋白胨对菌核中色素的积累最为有利, 色素含量最高。若从类胡萝卜素产率考虑, 蛋白胨是最为理想的有机氮源。显然有机氮源蛋白胨比无机氮源硝酸钠的效果更好; 铵盐和尿素对菌核形成不利。

2.4 碳源和氮源浓度对菌核生物量和类胡萝卜素产率的影响

表 4 培养基碳源浓度对菌核生物量和类胡萝卜素产率的影响

含碳量 (g/L)	C/N	菌核干重 (mg/平板)	类胡萝卜素含量 ( $\mu\text{g/g}$ 干菌核)	类胡萝卜素产率 ( $\mu\text{g}/\text{平板}$ )
5.26	10:1	437b	464b	202.77
10.53	20:1	651c	460b	299.46
21.05	40:1	623c	486b	302.78
42.10	80:1	281a	356a	100.04
84.20	160:1	269a	392a	78.55

表 5 培养基氮源浓度对菌核生物量和类胡萝卜素产率的影响

含氮量 (g/L)	C/N	菌核干重 (mg/平板)	类胡萝卜素含量 ( $\mu\text{g/g}$ 干菌核)	类胡萝卜素产率 ( $\mu\text{g}/\text{平板}$ )
0.16	75:1	155a	423a	65.57
0.24	50:1	510d	426a	217.26
0.48	25:1	718f	470a	337.46
0.80	15:1	0	0	0
1.60	7.5:1	0	0	0

84.20 g/L), 对菌核形成不利。同时, 较低水平的含碳量亦有利于菌核中色素的积累。

如果培养基的碳源浓度保持不变, 氮源浓度呈梯度增加, 亦能明显影响菌核的形成和色素的积累。表 5 表明, 当培养基中的含氮量较高时 (0.8 ~ 1.6g/L), PT95 菌株不能形成菌核; 含氮量较低时 (0.16g/L) 亦对菌核的形成不利; 只有当含氮量处于 0.24 ~ 0.48g/L 水平时, 才能形成大量的菌核和积累更多的色素。

综合以上, 培养基中的含碳量保持在 5.26 ~ 21.05 g/L, 含氮量保持在 0.24 ~ 0.48g/L 时, 对 PT95 菌株菌核形成和色素积累均为有利, 培养基的最适 C/N 比为 25:1。

2.5 碳源和氮源对 PT95 菌株类胡萝卜素成分的影响

我们在以前的研究中证明 PT95 菌株的菌核中积累的类胡萝卜素由 2 种色素成分组

8 种氮源对 PT95 菌株菌核生物量和类胡萝卜素产率的影响见表 3。供试的 4 种无机氮源中, 硫酸铵、氯化铵不能使菌核形成; 硝酸铵虽能使菌核形成, 但形成的菌核量很小; 只有硝酸钠是适合于菌核形成的无机氮源。4 种有机氮源

在氮源浓度保持不变, 碳源浓度呈梯度增加的培养基中, PT95 菌株的菌核生物量和类胡萝卜素产率受到明显的影响。从表 4 可以看出, C/N 比为 10:1 ~ 40:1 的较低水平的蔗糖含量对 PT95 菌株的菌核形成较为有利, 即当培养基中的含碳量为 5.26 ~ 21.05g/L 时, 均能形成较多的菌核。而当 C/N 比为 80:1 和 160:1 时 (培养基的含碳量为 42.10 ~

成,其中 $\beta$ -胡萝卜素占色素总量的64.3%<sup>[4]</sup>。薄层色谱分析表明,在本实验条件下从不同碳、氮源培养基上培养得到的菌核中积累的类胡萝卜素同样是由两种色素成分组成,不过各色素样品中的 $\beta$ -胡萝卜素的百分含量略有差异。在以酵母膏为氮源的培养基上培养得到的菌核中的 $\beta$ -胡萝卜素的百分含量最高,达到71.3%。

### 3 讨论

大多数青霉菌株都具有极强的产孢能力。PT95菌株在多种固态培养基上,尤其在天然培养基或半合成培养基上,在形成大量菌核的同时,亦能形成大量的分生孢子<sup>[4]</sup>。我们所希望的是能在最大量形成菌核的同时,尽可能少地产生分生孢子,这对在固态培养或固态发酵条件下菌核的分离及色素的提取是非常有利的。PT95菌株在本实验中的各种合成培养基上表现出了理想的选择培养特性,即在菌落表面几乎没有青灰色的分生孢子区域出现。由于大多数天然培养基或半合成培养基一般不专门补充无机盐,而像查氏培养基这样的合成培养基却有着相对丰富的和搭配合理的无机盐,看来合成培养基里的无机盐离子和微量元素组成对PT95菌株这种选择培养特性有着一定的影响作用,这方面有待进一步探讨。

前面的实验结果表明, $K_2HPO_4$ 对于PT95菌株的菌核分化和类胡萝卜素代谢具有很重要的作用。一般来说,无机磷酸盐含量高的培养基对各种次生代谢产物的合成具有抑制作用,而适量的无机磷酸盐则有一定的促进作用<sup>[8,9]</sup>。关于无机磷酸盐对类胡萝卜素代谢的调节作用,Dholakia和Modi<sup>[10]</sup>曾报道当培养基里的无机磷酸盐浓度从0.01%增加到1%时,可以使*B. trispora*的类胡萝卜素产量增加4.5倍。所以,有必要就培养基里不同浓度的 $K_2HPO_4$ 对PT95菌株菌核生物量和类胡萝卜素产率的影响作用进行深入的研究。

### 参考文献

- [1] An G H, Schuman D B, Johnson E A. *Appl Environ Microbiol*, 1989, **55**: 116 ~ 124.
- [2] Mehta B J, Salgado L M, Bejarano E R, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 3657 ~ 3661.
- [3] Vandamme E J. *J Chem Technol Biotechnol*, 1992, **53**: 313 ~ 327.
- [4] 韩建荣, 王肖娟, 原香娥. *微生物学通报*, 1998, **25** (6): 319 ~ 321.
- [5] 韩建荣, 徐 军. *微生物学报*, 1999, **39** (2): 148 ~ 153.
- [6] 王业勤, 李勤生. *天然类胡萝卜素研究进展、生产、应用*. 北京: 中国医药科技出版社, 1997.
- [7] 杜荣寿. *生物统计学*. 北京: 高等教育出版社, 1985.
- [8] Demain A L. *J Appl Chem Biotechnol*, 1972, **22**: 345 ~ 362.
- [9] Weinberg E D. *Dev Ind Microbiol*, 1974, **15**: 70 ~ 81.
- [10] Dholakia J N, Modi V V. *J Gen Microbiol*, 1984, **130**: 2043 ~ 2049.