

丝状真菌 SC-2 产 β -胡萝卜素的研究

张建法 黄为一 吴江 王世梅

(南京农业大学微生物学系, 南京 210095)

摘要 利用改良的 SMA 培养基富集培养从植物的落花上分离筛选出的产 β -胡萝卜素的菌株 SC-2。该菌株在以棉籽饼粉为主要原料的培养基上生长良好。最高生物量达 54mg 干菌体/ml 培养液。胡萝卜素含量 1.85mg/g 干菌体。HPLC 测定 β -胡萝卜素占总胡萝卜素的 90.5%。

关键词 β -胡萝卜素, 丝状真菌

近年来, 许多研究表明, β -胡萝卜素具有较强的抗氧化生理活性, 在防止细胞癌变、抑制癌细胞转移以及预防心血管疾病等均有重要作用^[1,2]。作为一种天然物质, β -胡萝卜素在医药保健、食品和化妆品行业具有广阔的应用前景。国外的微生物合成 β -胡萝卜素的研究主要集中在丝状真菌和红酵母方面^[3]。本文报道丝状真菌 β -胡萝卜素高产菌株 SC-2 的选育结果。

1 材料与方 法

1.1 植物的落花采自安徽宣城、江苏南京。

1.2 培养基

分离培养基: SMA 培养基^[4]。

鉴定培养基: PDA 培养基。

种子培养基(%): 棉籽饼粉 5, 玉米粉 2.5, 盐酸硫胺素 0.12 μ g。

摇瓶发酵培养基(%): 棉籽饼粉 6, 玉米粉 2, 棉籽油 3, 吐温-40 0.12, pH 自然。

1.3 分离方法

1.3.1 初筛: 将采集到的落花表面消毒后, 取小块组织在 SMA 培养基上三点式接种, 28 $^{\circ}$ C 培养 48h。长出的菌丝移至 PDA 培养基, 26 $^{\circ}$ C 培养 4d。选取菌丝黄色、粗壮, 产孢能力强的菌株进行单孢分离。纯化的菌株按郑儒永等的方法鉴定^[4]。

1.3.2 复筛: 将初筛得到的菌株在 PDA 液体培养基上扩大培养一次, 28 $^{\circ}$ C, 摇床 (150r/min) 培养 24h。以 10% 的接种量接种到装有 100ml PDA 液体培养基的 500ml 三角瓶中, 28 $^{\circ}$ C 摇床 (150r/min) 培养 4d; 测菌丝干重和总胡萝卜素的含量。

1995-03-27 收稿

1.4 发酵

斜面种子→PDA 平板形成孢子→种子培养基(装液量: 500ml 三角瓶装 100ml) 28℃ 摇床(220r/min) 48h→发酵培养基(接种量 10%, 培养时间 7d, 其余条件同种子培养)。

1.5 测定方法

1.5.1 菌丝干重的测定: 发酵液过滤、洗涤, 55℃ 真空干燥、称重。

1.5.2 总胡萝卜素的测定^[5]: 石油醚抽提、柱层析、分光光度计 445nm 处测定 OD 值。

1.5.3 β -胡萝卜素的定性定量分析测定^[6]: HPLC 法。 β -胡萝卜素标准品购自 Sigma 公司。色谱仪 Waters 208 型。色谱柱 Sphersorb-C18 柱。流动相: 甲醇+乙腈(90+10)。流速 1ml/min, UV-166 型检测仪, 波长 445nm。用保留时间定性, 峰面积定量。

2 结果与讨论

2.1 初筛结果

在 SMA 和 PDA 平板上分离纯化并鉴定到属的目的菌株如表 1 所示。SMA 是合成培养基, 有选择作用。PDA 培养基能促进菌体生孢, 便于鉴定。初筛到的菌株大部分是笄霉属 (*Choanephora*) 的菌株。文献报道, 笄霉属菌株产 β -胡萝卜素能力强。实验表明, 从植物的落花上较易分离到笄霉属菌株。

表 1 从植物落花上分离的产胡萝卜素菌株

菌株号	落 花						
	丝瓜	南瓜	棉	木槿	冬瓜	黄瓜	
属 名							
笄霉属	SC-1	NC-1		JC-1	DC-1	HC-1	
<i>Choanephora</i>	SC-2	NC-2		JC-2			
根霉属			MC-1				
<i>Rhizopus</i>							
毛霉属							
<i>Mucor</i>		NC-3					

2.2 复筛结果

选择 PDA 液体培养基进行复筛, 是为了

避免合成培养基营养的不平衡而影响目的菌株的选出, 也基于 PDA 使用方便的考虑。复筛结果(表 2)显示, SC-2 在菌丝生长量和色素含量两方面均较高。按照郑儒永等的方法, 参照《真菌鉴定手册》对 SC-2 作进一步鉴定。从菌丝的形态、生长特征、孢子囊和孢子囊梗的形态、以及孢囊孢子和接合孢子的形状等方面的综合比较, 认定 SC-2 属于接合菌纲、毛霉目、笄霉属的三孢笄霉 (*Choanephora trispora*)。图 1、2 显示 SC-2 菌丝的显微结构和小型孢子囊梗的形状。该菌株的主要特征见表 3。



图 1 SC-2 菌株的菌丝显微结构($\times 200$) (菌丝内充满色素颗粒)

表 2 丝状真菌 β -胡萝卜素高产菌株的选育结果

菌株编号	菌丝干重 (mg/ml)	胡萝卜素含量 ($\mu\text{g/g}$)	总胡萝卜素产量 ($\mu\text{g/ml}$)
SC-1	15	1020	15.30
SC-2	25	1310	32.75
NC-1	13	162	2.10
NC-2	5	158	0.79
NC-3	8	120	0.96
MC-1	24	285	6.84
JC-1	18	755	13.59
JC-2	23	526	12.09
DC-1	5	180	0.9
HC-1	12	320	3.84

增长较快,后期色素产量增长较快。

2.4 HPLC 对色素的定性定量分析

在实验条件下,保留时间 24.1min 时,出现 β -胡萝卜素特征峰。其它出现的小峰可能是菌株合成 β -胡萝卜素过程中的一些中间产物,或是提取色素过程中 β -胡萝卜素的氧化异构化产物(图 4)。

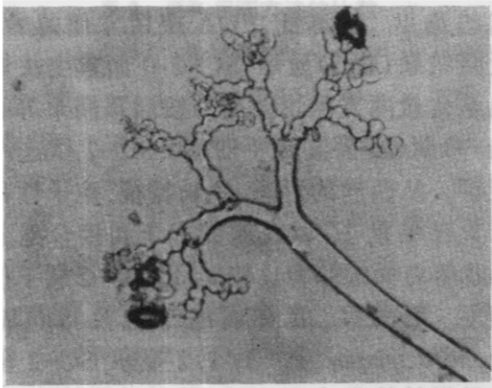


图2 SC-2 菌株的小型孢子囊梗的显微结构 ($\times 1200$)

表3 SC-2 菌株的主要特征

菌株形态	小型孢子囊梗	孢囊孢子	有性生殖方式
无隔膜,黄色	双叉状分 支数次	有条纹,两端有 成束的细丝	异宗配合

2.3 SC-2 生长量与色素产量的关系

选择来源广泛、廉价的棉籽饼粉为主要原料进行发酵。孢子接种液体培养基,24h 后就可见大量的小菌丝团,即可作为液体种子接种于发酵培养基。添加植物油有利于胡萝卜素的合成^[7]。

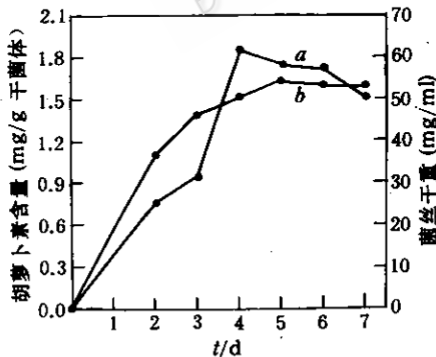


图3 SC-2 的生长量和色素产量的变化过程
a. 胡萝卜素含量, b. 菌丝干重

图3显示,SC-2 在棉籽饼粉为主要原料的培养基上生长良好。发酵 4d 后,胡萝卜素含量达到 1.85mg/g 干菌体。生物量在第五天达到最大值 54mg/ml 培养液。前期生物量

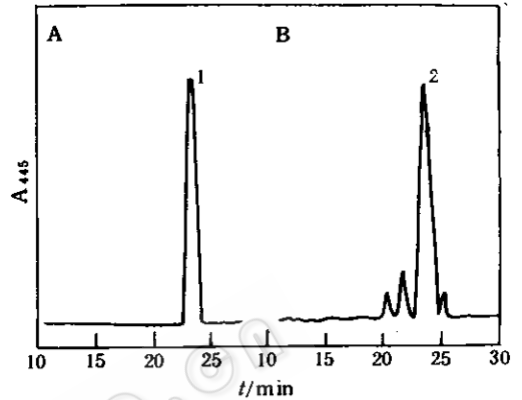


图4 标准 β -胡萝卜素(A)及 SC-2 所产色素(B)色谱图

实验表明 SC-2 产生的色素大部分是 β -胡萝卜素。通过对峰面积的积分分析,得出 β -胡萝卜素占总色素的 90.5%。

初步的实验表明,从植物的落花上较易获得产 β -胡萝卜素的丝状真菌。SC-2 培养条件简单、生长迅速、生物量大、产色素均一,作为出发菌株研究发酵特征是合适的。关于 SC-2 的生化生理特征以及发酵条件的优化等,有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Bedich A. Proc Nutr Soc. 1991, 50: 263~274.
- [2] Louisd M, Gerster M. Exp Biol Med, 1992, 200, 260~265.
- [3] Oholakia J N, Mood V L. J Appl Micro-Biotechnol, 1982, 15: 33.
- [4] 郑儒永, 胡馥娟. 植物分类学报 1964, 9: 13~27.
- [5] Anderson R F. J Agr Food Chem, 1958, 6: 543~545.
- [6] 杨祖英, 李良学. 食品与发酵工业, 1994, 6: 57~61.
- [7] Ciegie A, Arnold M. Appl Micro, 1959, 7: 95~97.

(下转第 55 页)

STUDIES ON β -CAROTENE PRODUCED BY MYCELIAL FUNGUS SC-2

Zhang Jianfa Huang Weiyi Wu jiang Wang Shimei

(Department of Microbiology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract Carotene high-producing mycelial fungus SC-2 were obtained from faded flowers on SMA medium. 5.4g dry mycelium / 100ml medium and 1.85mg carotene / g dry mycelium was produced by SC-2 breded in medium with cottonseed cake meal etc. β -Carotene amounts to 90.5% of the total carotene by HPLC detection.

Key words β -carotene, Mycelial fungus