

青霉 PT95 菌株菌核内产生类胡萝卜素的研究

韩建荣 王肖娟 原香娥

(山西大学生命科学系 太原 030006)

摘要 从土壤中分离到一株经鉴定属于 *Penicillium thomii* series 的菌株 PT95, 该菌株在 6 种固体培养基上都能形成大量的橙红色菌核, 其中在察氏培养基上形成的菌核量最大, 而在马铃薯葡萄糖琼脂培养基上形成的菌核的类胡萝卜素含量最高。培养基初始 pH 对菌核形成和色素含量无明显影响, 但对菌落生长速度有显著影响。光照培养对菌核形成和色素含量无明显影响。薄层色谱分析表明, PT95 菌株菌核内产生的类胡萝卜素由两种色素成分组成, 其中 β -胡萝卜素占总色素量的 64.3%。

关键词 青霉, 菌核, 类胡萝卜素, 培养条件

分类号 Q939.5

类胡萝卜素可以作为食品、饲料、药物、化妆品的着色剂, 也可作为重要的营养素来源, 具有增强机体免疫功能、防病保健的作用^[1]。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, 所以挖掘新的菌种资源对于类胡萝卜素的开发研究很有意义。国内外有关酵母和丝状真菌产生类胡萝卜素的报道日益增多^[2~5], 但关于青霉菌产生类胡萝卜素的报道不多^[6], 尚无关于青霉菌菌核内产生类胡萝卜素的研究报道。我们分离到一株菌核内富含类胡萝卜素的青霉菌株, 并对影响该菌株菌核形成和产生类胡萝卜素的培养条件进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 菌株

PT95 菌株从山西汾阳混交林土壤中分离得到, 按照青霉菌常规鉴定方法^[7]鉴定到系。

1.2 培养基

共选择 6 种固体培养基进行比较, 其中马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)、察氏琼脂(CA)、沙包氏琼脂(SA)、曲汁琼脂(LEA)、豆芽汁琼脂(BEA)按照文献[8]配制, 完全培养基琼脂(CMA)按照文献[9]配制。6 种培养基均采用 0.8×10^5 Pa 灭菌 30min。

1.3 菌核生物量测定

菌种在 PDA 斜面上活化后, 用接种针点种在上述培养基平板上, 25℃ 恒温培养 20d, 然后将平板上的菌核刮洗下来, 充分冲洗干净, 置 50℃ 烘干称重。

1.4 类胡萝卜素的提取和含量测定

称取 1g 干菌核, 在研钵中冰浴研磨, 过 100 目筛, 加入 3ml 丙酮, 室温下振荡 30min, 然后 5000r/min 离心 20min。再用氯仿萃取, 加入 10% 甲醇 KOH 溶液置于暗处冷皂化 2h 后取出, 把皂化液倾入分液漏斗中, 加入少量蒸馏水洗去甲醇和碱, 并经无水 Na_2SO_4 干燥, 倾析法除 Na_2SO_4 , 得类胡萝卜素氯仿浸提液。按文献[1]的方法计算类胡萝卜素含量。

1.5 色素鉴定

1.5.1 吸收光谱测定: 将上述类胡萝卜素浸提液和标准 β -胡萝卜素(Merck 产品)氯仿溶液在 756 型紫外-可见分光光度计上进行全波扫描。

1.5.2 薄层色谱分析: 按文献[10]的方法, 在 0.25mm 硅胶 G 薄层板上分别用浓缩后的类胡萝卜素浸提液和标准 β -胡萝卜素溶液点样。将点样后的薄层板置于石油醚—乙酸乙酯混合液(90:10, V/V)饱和的层析缸内, 于暗处展开,

观察色素斑点位置并计算各斑点的 R_f 值,并用薄层扫描仪 (CS-9000) 荧光线性扫描整条色谱带,计算各主要色素成分的相对含量。

2 结果

2.1 菌株特征及初步鉴定

PT95 菌株能在 6 种培养基上形成橙红色以菌核为主的菌落。菌核近球形,直径约 300 μ m,砂粒状,坚而脆,难于压碎。帚状枝严格单轮生,分生孢子圆形,壁光滑,直径约 2.5 μ m。

根据以上特征,将 PT95 菌株检索鉴定到青霉属汤姆青霉 (*Penicillium thomii*) 系。

2.2 培养条件对菌核生物量及类胡萝卜素含量的影响

2.2.1 不同培养基的影响:PT95 菌株能在 6 种固体培养基上良好生长,但在各种培养基上形成的菌核生物量(以干重计)却有明显的差异(表 1)。在 CA 平板上菌核密度大,簇拥成堆,

表1 6种固体培养基对菌核生物量和类胡萝卜素含量的影响

培养基	菌核干重 (g/平板)	类胡萝卜素含量 (μ g/g干菌核)
PDA	0.287	298
CA	0.647	226
SA	0.355	132
CMA	0.221	276
LEA	0.242	262
BEA	0.351	158

生物量最大,说明 CA 培养基对菌核的形成最为有利。同样,在各种培养基上形成的菌核中的类胡萝卜素含量也有明显的差异,在 PDA 培养基上形成的菌核中的类胡萝卜素含量最高。

为了证明 PT95 菌株能否在液体培养基中形成菌核,把上述 6 种培养基配制成液体培养基,进行液体摇瓶培养试验。经过 20d 的培养观察,6 种培养基中都没有菌核形成。这就说明 PT95 菌株只能在固体培养条件下形成菌核,有必要进一步探讨大量形成菌核的固体发酵方法和工艺条件。

2.2.2 培养基初始 pH 的影响:将 CA 培养基的初始 pH 调整为 5.5、6.5、7.5,接种培养 20d 后,PT95 菌株的生长情况见表 2。说明培养基初始 pH 对菌落生长速度有明显的影响,而对菌核生物量和类胡萝卜素含量无明显影响。

表2 培养基初始pH对菌核生物量和类胡萝卜素含量的影响

pH	菌落生长速度 (mm/d)	菌核干重 (g)	类胡萝卜素含量 (μ g/g干菌核)
5.5	5.2	0.635	230
6.5	4.3	0.602	217
7.5	3.6	0.608	223

2.2.3 光照的影响:将接种后的 CA 平板分为 2 组,1 组置于黑暗培养箱中培养,另 1 组置于光照培养箱 (500lx) 中培养。结果表明光照对 PT95 菌株菌核的形成无明显影响,两种培养条件下的平板均在 14d 左右出现橙红色菌核,20d 时菌核颜色最深。

2.3 类胡萝卜素的光谱和薄层色谱分析

2.3.1 紫外-可见吸收光谱分析:分别从 6 种固体培养基上培养得到的菌核的类胡萝卜素浸提液进行全波扫描,发现 PT95 菌株菌核所产生的类胡萝卜素具有典型的 β -胡萝卜素特征吸收峰。通过与标准 β -胡萝卜素的吸收光谱比较,

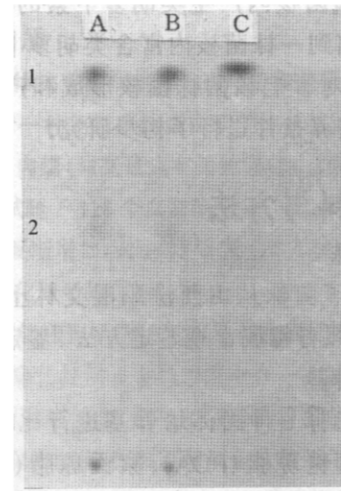


图1 标准 β -胡萝卜素与PT95菌株菌核所产色素薄层层析图

A. PDA培养基色素浸提液; B. CA培养基色素浸提液;
C. 标准 β -胡萝卜素

PT95 菌株的吸收光谱有红移现象,说明其类胡萝卜素中可能含有别的色素成分。

2.3.2 类胡萝卜素的薄层分析:在硅胶 G 板上以石油醚和乙酸乙酯混合液为展开剂对色素提取液进行薄层分离,得到了两个清晰的色斑(图 1)。色斑 1 呈桔黄色, R_f 值为 0.76,正好与标准 β -胡萝卜素的 R_f 值相吻合,说明色斑 1 色素成分为 β -胡萝卜素;色斑 2 呈桔红色, R_f 值为 0.47,很可能是 β -胡萝卜素的异构体。通过用薄层扫描仪扫描计算,色素 1 占总色素的 64.3%,色素 2 占总色素的 35.7%。

3 讨论

青霉是自然界里一类营养要求简单,生存能力较强的微生物,具有其它产类胡萝卜素微生物所没有的许多优点。PT95 菌株在各种固体培养基上都能形成大量的橙红色菌核,而且菌核中所含色素成分简单,易于分离提取。如果采用固体发酵工艺,筛选出适于大规模培养菌核的生产原料,将会大大降低发酵法生产 β -胡萝卜素的成本,这方面应做更深入的研究。

现在市场上有许多 β -胡萝卜素制品是以颗粒状或小珠状出现的^[1],这是经过复杂的加工过

程得到的。而 PT95 菌株菌核本身从颜色、质地、形状、大小等方面都具有很好的商品性状,如能直接以商品形式出现,可以省去许多中间加工环节,更能保证色素的天然性,所以有必要对 PT95 菌株的菌核做全面的营养分析和评价。

参 考 文 献

- [1] 王业勤,李勤生编著. 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.
- [2] 王武,方光瑾,唐蕾等. 生物工程学报,1994,10(4): 369~373.
- [3] 张素琴,朱湘民,马国华等. 食品与发酵工业,1989,5: 1~5.
- [4] 张建法,黄为一,吴江等. 微生物学通报,1996,23(1): 12~14.
- [5] 张博润,寇运同,刘玉方. 微生物学通报,1995,22(4): 212~214.
- [6] Chebotarev L N. Mikrobiologiya, 1978, 47(4):624~628.
- [7] 中国科学院微生物研究所编著. 常见与常用真菌,北京:科学出版社,1973.
- [8] 张纪忠主编. 微生物分类学. 上海:复旦大学出版社,1990.
- [9] Raper J R, Miles P G. Genetics, 1958, 43:530~546.
- [10] Goodwin T W, Jamikom M, Willmer J S. Biochem J, 1953, 53(4):531~538.

STUDIES ON THE PRODUCTION OF CAROTENOIDS IN SCLEROTIA OF PT95 STRAIN OF *PENICILLIUM*

Han Jianrong Wang Xiaojuan Yuan Xiang

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

Abstract A strain of *Penicillium thomii* series PT95 was isolated from a soil sample. In 6 kinds of solid media, a great quantity of orange sclerotia of PT95 could were formed. Among 6 kinds of solid media, the highest yields of sclerotia were obtained in Czapeks agar medium; the highest content of carotenoids were achieved in the sclerotia cultured in potato dextrose agar meidum. The initial pH of media had no remarkable influence on either the formation of sclerotia or pigment content. So were the light. Thin layer chromatography revealed 2 major pigments including β -carotene in the carotenoids of PT95, and the β -carotene amounted to 64.3% of the total carotenoids content.

Key words *Penicillium*, Sclerotia, Carotenoids, Culture condition