

外源 β -胡萝卜素、光照对青霉 PT95 菌株菌核分化和类胡萝卜素产率的影响

赵文婧 高宇英 韩建荣*

(山西大学生命科学与技术学院 太原 030006)

摘要:初步研究了外源 β -胡萝卜素和光照对青霉 PT95 菌株菌核分化和类胡萝卜素产率的影响。结果表明,在培养基中加入外源 β -胡萝卜素后,PT95 菌株渗液出现的时间、菌核出现的时间延迟了,但菌核成熟的时间没变。培养基中的外源 β -胡萝卜素浓度越大,其渗液、菌核出现的时间越迟。外源 β -胡萝卜素亦能降低 PT95 菌株的脂质过氧化水平和菌核中的类胡萝卜素含量。高氧胁迫的光照培养条件有利于 PT95 菌株的菌核分化和色素在菌核中的积累;与低氧胁迫的黑暗培养条件相比,其菌核生物量和类胡萝卜素产率分别增加了 18.7% 和 101%。以上实验结果表明,若想获得高的菌核生物量和类胡萝卜素产率,应该尽可能在高氧胁迫、无抗氧化剂存在的条件下培养 PT95 菌株。

关键词:青霉,脂质过氧化,氧胁迫,菌核, β -胡萝卜素

中图分类号:Q89 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209(2005)02-0279-04

青霉属(*Penicillium*)有许多菌株能形成菌核,PT95 菌株即是一株能在菌核内积累类胡萝卜素的青霉菌株。我们已经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],也进行了一些固态发酵方面的研究^[2,3]。但是关于 PT95 菌株菌核分化的机理、菌核分化与类胡萝卜素代谢的关系等问题还不清楚。近年来,Georgiou 等^[4,5]对立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)齐整小菌核菌(*Sclerotium rofsii*)的菌核分化进行了深入的研究,证明了这些真菌的菌核分化伴随着高度的脂质过氧化(Lipid peroxidation),活性氧自由基(Reactive oxygen species, ROS)能诱导菌核的分化。根据这些研究结果,Georgiou 认为当真菌无能力减少由不良环境条件造成的氧胁迫(Oxidative stress)的时候,就通过分化形成菌核来度过不良环境,也就是说高的氧胁迫能诱导菌核分化。

类胡萝卜素是一个大家族,是一类碳氢化合物及其氧化衍生物。PT95 菌株菌核内积累的类胡萝卜素主要是 β -胡萝卜素。研究结果表明 β -胡萝卜素具有抗氧化剂的作用,可以清除 ROS,减少氧胁迫^[6]。所以,从理论上讲,当培养基中存在外源 β -胡萝卜素时,真菌菌核的分化会受到某种程度的抑制,其脂质过氧化水平(或氧胁迫)也会受到影响,而且

也可能影响到菌核中类胡萝卜素的积累。在某些真菌中,例如布拉克须霉(*Phycomyces blakesleeanus*)粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*),类胡萝卜素的产生具有一定的光依赖性,或者说只是在光形态发生(Photomorphogenesis)期间合成类胡萝卜素^[7]。由于光是重要的 ROS(即氧胁迫)来源^[8],所以光照培养条件下的氧胁迫高于黑暗培养条件下的氧胁迫^[4]。需要解决的问题是高氧胁迫的光照培养条件对 PT95 菌株的菌核分化和类胡萝卜素合成又有什么影响?本文报道外源 β -胡萝卜素、光照对 PT95 菌株菌核分化、类胡萝卜素产率以及脂质过氧化水平的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:青霉(*Penicillium* sp.)PT95 从山西汾阳混交林土壤中分离得到,保存在查氏斜面上。

1.1.2 培养基:固态培养基采用 Georgiou^[4]的配方。含 β -胡萝卜素的液体培养基:先配制 8 mmol/L 的 β -胡萝卜素母液(溶于四氢呋喃),然后将其加到 Georgiou 液体培养基中,使培养基中的 β -胡萝卜素含量分别达到 2 μ mol/L、4 μ mol/L、6 μ mol/L、8 μ mol/L。培养基中的葡萄糖单独灭菌以防止美拉德反应。 β -胡萝卜

基金项目:国家自然科学基金(30070021);山西省自然科学基金(20041076)

* 通讯作者。Tel:86-351-7016578;E-mail:hjr@sxu.edu.cn

作者简介:赵文婧(1980-),女,山西榆次人,硕士研究生,从事应用微生物学研究。E-mail:maomaozx@126.com

收稿日期:2004-07-19,修回日期:2004-11-29

素母液用 $0.22\mu\text{m}$ 醋酸纤维素滤膜过滤除菌。

1.2 固态培养

将配制好的 Georgiou 固态培养基倒制平板,凝固后在平板表面铺玻璃纸。然后将 PT95 菌株接到平板中央,分别放置于 25°C 黑暗和光照生化培养箱(光照强度 500Lux)中进行暗培养和光照培养。在菌株的不同生长阶段收集玻璃纸上的培养物, 50°C 烘干称重并进行类胡萝卜素的提取和含量测定。

1.3 液态培养

将配制好的含 β -胡萝卜素的液体培养基分装到培养皿中,接入 PT95 菌株,然后分别放置于 25°C 光照生化培养箱(光照强度 500Lux)中进行光照培养。在菌株的不同生长阶段过滤收集菌体, 50°C 烘干称重并进行类胡萝卜素的提取和含量测定。

1.4 类胡萝卜素的提取和含量测定

按文献 [1] 的方法提取菌丝体和菌核中的类胡萝卜素,并按文献 [9] 的方法计算类胡萝卜素含量。

1.5 脂质过氧化水平的测定

以丙二醛(MDA)作为脂质过氧化的指标。在菌株培养第 4 天和第 6 天的时候,将菌丝体取出过滤,自然风干后称重,然后用 $100\mu\text{mol/L}$ EDTA 冲洗,重复 3 次后,用液氮研磨,放入 EP 管中,加入 EDTA,混匀,然后冰浴匀浆,采用改进的硫代巴比妥酸(TBA)法^[10]测量脂质过氧化产物。脂质过氧化水平用 $\mu\text{mol MDA/mg}$ 蛋白表示。

1.6 蛋白质浓度测定

以小牛血清蛋白(BSA)为标准蛋白,按改进的 CBB 法^[11]测定样品蛋白浓度。取 $82\mu\text{L}$ 匀浆液,加入 $10\mu\text{L}$ 1% 的 Triton-X-100,混匀后,再加入 $8\mu\text{L}$ 的 12mol/L HCl,然后放于 100°C 的水浴锅中水浴 10min,等到室温平衡后,再加入 0.9mL 0.033% 的 CBB-G-250,然后测 OD_{620} 。再从 BSA 标准曲线上得出蛋白质的浓度。以上试验均设 3 次重复,试验结果以平均值 \pm 标准差表示。

2 结果

2.1 PT95 菌株分化发育情况

在高氧胁迫的光照培养条件和低氧胁迫的黑暗培养条件下,PT95 菌株在 Georgiou 固态培养基上的分化发育情况是相似的。先长出白色菌丝体,并很快覆盖整个平板,这是菌丝体的未分化阶段;第 4 天,菌丝体上出现渗出液,渗出液呈无色或透明色,表明菌丝体即将开始分化;第 6 天,菌丝体相互缠绕,形成松散的菌核,进入菌核形成初期(SI);第 8

天到第 12 天,是菌核发育时期(SD);第 12 天到第 14 天,沙粒状菌核颜色发生明显改变,由淡黄色变成橙红色,这是菌核成熟时期(SM)。PT95 菌株在液态培养基上进行静置培养时,菌丝体只在表面生长,其生长分化情况与在固态培养基上相似。但在液态培养基上的生长速度略快一些,在第 2 天的时候菌丝体已经覆盖整个培养基表面。

以上结果说明不同氧胁迫的培养条件对 PT95 菌株的分化发育规律没有明显影响。

2.2 光照对 PT95 菌株在固态培养基上的菌核生物量和色素产率的影响

PT95 菌株在菌核分化的各个阶段,其菌核生物量和类胡萝卜素含量差异很大。从表 1 可以看出,在光照培养条件下,随着菌核的发育成熟,PT95 的菌核生物量明显增加,SM 期的菌核生物量最高,而菌核中的类胡萝卜素含量反而降低了。类胡萝卜素产率也是随着菌核的发育成熟明显增加的,SM 期的产率最高。

表 1 光照培养条件下 PT95 菌株各个分化阶段的色素产率

Developmental stages	Sclerotia biomass/mg	Content of carotenoid($\mu\text{g/g}$)	Carotenoid yield/ μg
SI	8.8 ± 0.7	188 ± 15.0	1.65 ± 0.10
SD	17.6 ± 1.5	226 ± 18.2	3.98 ± 0.27
SM	141.2 ± 12.0	71 ± 5.6	10.03 ± 0.65

从表 2 可以看出,在黑暗培养条件下,随着菌核的发育成熟,PT95 的菌核生物量也有明显的增加,但增加的幅度较小;菌核中的类胡萝卜素含量降低的幅度较小,相应地,类胡萝卜素产率增加的幅度也较小,SM 期的产率最高。

表 2 黑暗培养条件下 PT95 菌株各个分化阶段的色素产率

Developmental stages	Sclerotia biomass/mg	Content of carotenoid($\mu\text{g/g}$)	Carotenoid yield/ μg
SI	30.7 ± 2.5	58 ± 4.6	1.78 ± 0.14
SD	70.3 ± 5.6	61 ± 4.8	4.29 ± 0.34
SM	119 ± 10.0	42 ± 3.4	4.99 ± 0.39

表 1、表 2 的比较结果说明,PT95 菌株在 SD 阶段菌核中的色素含量最高,光照条件有利于 PT95 菌株在 SM 阶段菌核生物量的迅速增加,也有利于色素在菌核中的积累。与低氧胁迫的黑暗培养条件相比,光照培养条件下 PT95 菌株的菌核生物量和类胡萝卜素含量分别增加了 18.7% 和 69.0%,类胡萝卜素产率增加了 101%。

2.3 外源 β -胡萝卜素对 PT95 菌株菌核分化的影响

在培养基中加入外源 β -胡萝卜素后,PT95 菌株分化情况发生了明显的改变(表 3)。与不加 β -胡萝卜素的对照培养基相比,渗出液出现的时间、菌核出现的时间延迟了,但菌核成熟的时间没变,菌核生物量亦无明显改变。培养基中外源 β -胡萝卜素的浓度越大,其渗出液、菌核出现的时间越晚。

表 3 外源 β -胡萝卜素对 PT95 菌株菌核分化的影响

Table 3 Effect of exogenous β -carotene on sclerotial differentiation of PT95 strain

Concentrations of exogenous β -carotene ($\mu\text{mol/L}$)	Time of exudate initial/d	Time of sclerotial initial/d	Time of sclerotial maturation/d
2	5	6	14
4	6	6	14
6	7	7	14
8	8	8	14
Control	4	5	14

2.4 外源 β -胡萝卜素对 PT95 菌株菌核中色素含量的影响

在液体培养基中添加 β -胡萝卜素后,PT95 菌株在 SD 阶段菌核中积累的类胡萝卜素发生了明显改变(图 1)。与不加 β -胡萝卜素的对照相比,色素含量有了明显的下降;培养基中外源 β -胡萝卜素的浓度越高,色素含量越低。说明外源 β -胡萝卜素对 PT95 菌株的类胡萝卜素代谢有抑制作用;浓度越大,抑制作用越强。

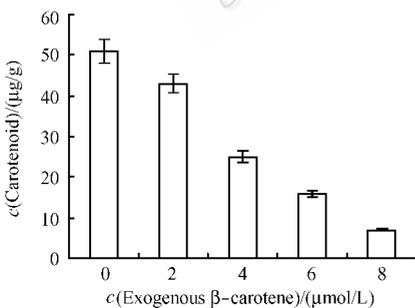


图 1 外源 β -胡萝卜素对 PT95 菌株菌核中色素含量的影响

Fig. 1 Effect of exogenous β -carotene on content of carotenoid accumulated in sclerotia of PT95

2.5 外源 β -胡萝卜素对 PT95 菌株脂质过氧化水平的影响

在液体培养基中添加 β -胡萝卜素后,PT95 菌株的脂质过氧化水平发生了明显改变(图 2)。在培养基中不加 β -胡萝卜素时,PT95 菌株在第 4 天和第 6 天的脂质过氧化水平分别是 $0.748\mu\text{mol MDA/mg}$ 蛋白和 $0.356\mu\text{mol MDA/mg}$ 蛋白,而在外源 β -胡萝卜

素浓度为 $6\mu\text{mol/L}$ 的培养基上 PT95 菌株在第 4 天和第 6 天的脂质过氧化水平有了明显的降低,分别为 $0.373\mu\text{mol MDA/mg}$ 蛋白和 $0.148\mu\text{mol MDA/mg}$ 蛋白。随着添加的 β -胡萝卜素的量的增加,其脂质过氧化水平降低的幅度增大。

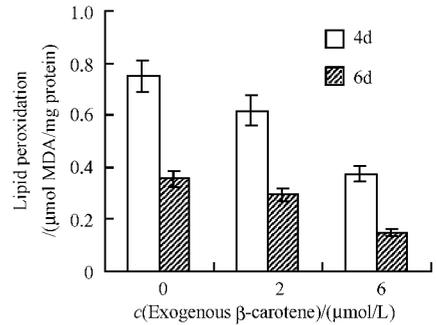


图 2 外源 β -胡萝卜素对 PT95 菌株脂质过氧化水平的影响

Fig. 2 Effect of exogenous β -carotene on lipid peroxidation of 4-day-old and 6-day-old colonies of PT95 strain

3 讨论

按照 Georgiou 的理论,抗氧化剂可以通过降低氧胁迫来影响菌核分化,本试验也证实了这一假设,作为抗氧化剂的外源 β -胡萝卜素也表现出同样的作用。这里有一个问题需要说明 β -胡萝卜素(或其它抗氧化剂)的这种作用应该是在高氧胁迫培养条件下完成的。也就是说,如果培养条件本身不至于引起 ROS 的产生 β -胡萝卜素也就失去了作用的对象,就不会表现出相应的作用。引起 ROS 产生的条件有很多,本试验中采用了光照作为高氧胁迫的培养条件,因为光照可以通过与黄素(Flavins)或蛋白结合黄素(Protein-bound flavins)发生光敏化反应来产生 ROS^[8]。外源 β -胡萝卜素清除或部分清除 ROS 的能力直接表现在对菌核分化的抑制作用上,PT95 菌株渗出液出现的时间、菌核出现的时间延迟了,但菌核成熟的时间没变。培养基中的外源 β -胡萝卜素浓度越大,其渗出液、菌核出现的时间越迟。那么,当外源 β -胡萝卜素浓度更大的时候($>8\mu\text{mol/L}$),又会出现什么样的情况?PT95 菌株是否还能分化形成菌核,菌核成熟的时间是否仍然不变?尚待深入研究。

本试验证明外源 β -胡萝卜素能降低脂质过氧化作用。一般来说,脂质过氧化作用和蛋白过氧化作用(Protein peroxidation)都能作为氧胁迫的指标,单线态氧能导致蛋白过氧化^[12],而单线态氧是能被 β -胡萝卜素清除的主要的 ROS 成分。所以也应该研究蛋白过氧化作用对 PT95 菌株的菌核分化的影响。已经有报道表明蛋白过氧化作用能引起 *Neurospora*

crassa 的分化^[13]。

菌核的形成,是真菌度过不良环境条件的一种适应性反应。当真菌耗完它的碳源的时候,也就失去了对其抗氧化保护机制的有效管理能力,所以分化形成菌核以图长期生存^[10]。通过对本试验结果的分析,我们发现 PT95 菌株一方面通过形成菌核来度过不良环境;另一方面,又合成积累大量的类胡萝卜素来弥补其抗氧化保护机制的不足,来清除 ROS 的伤害。这时候,如果供给适量的外源 β -胡萝卜素,则它自身的合成类胡萝卜素的能力就会有所下降,本试验的结果正是这种情况。本研究结果给了我们一种启示:如果想获得高的菌核生物量和类胡萝卜素产率,应该尽可能在高氧胁迫、无抗氧化剂存在的条件下培养 PT95 菌株。

参 考 文 献

- [1] 韩建荣,王肖娟,原香娥.青霉 PT95 菌株菌核内产生类胡萝卜素的研究.微生物学通报,1998,25(6):319-321.
- [2] 韩建荣,徐军.青霉 PT95 菌株固态发酵产生类胡萝卜素的研究.微生物学报,1999,39(2):148-153.
- [3] Han J R, Yuan J M. Influence of inocula and grains on sclerotia biomass and carotenoid yield of *Penicillium* sp. PT95 during solid-state fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2003, 30: 589-592.
- [4] Georgiou C D, Zervoudakis G, Tairis N, et al. β -Carotene production and its role in sclerotial differentiation of *Sclerotium rolfsii*. *Fungal Gen Biol*, 2001, 34: 11-20.
- [5] Georgiou C D, Petropoulou K P. Effect of the antioxidant ascorbic acid on sclerotial differentiation in *Rhizoctonia solani*. *Plant Pathol*, 2001, 50: 594-600.
- [6] Stratton P S, Liebler C D. Determination of singlet oxygen-specific versus radical-mediated lipid peroxidation in photosensitized oxidation of lipid bilayers: Effect of β -Carotene and α -tocopherol. *Biochemistry*, 1997, 36: 12911-12920.
- [7] Moore D. *Fungal Morphogenesis*. Cambridge: Cambridge Univ Press, 1998.
- [8] Martin P J, Burch P. Production of oxygen radicals by photosensitization. In: Abelson N J, Simon I M. ed. *Methods in Enzymology* (Vol. 186). New York: Academic Press, 1990.
- [9] 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.
- [10] Georgiou C D. Lipid peroxidation in *Sclerotium rolfsii*: a new look into the mechanism of sclerotial biogenesis in fungi. *Mycol Res*, 1997, 101: 460-464.
- [11] Sedmak J J, Grossberg E S. A rapid sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G250. *Anal Biochem*, 1977, 79: 544-552.
- [12] Grune T, Klotz L O, Gieche J, et al. Protein oxidation and proteolysis by nonradical oxidants singlet oxygen and peroxynitrite. *Free Rad Biol Med*, 2001, 30: 1243-1253.
- [13] Toledo I, Hansberg W. Protein oxidation related to morphogenesis in *Neurospora crassa*. *Exp Mycol*, 1990, 14: 184-189.

Effect of exogenous β -carotene and illumination on sclerotial differentiation and carotenoid yield of *Penicillium* sp. PT95

ZHAO Wen-jing GAO Yu-ying HAN Jian-rong*

(School of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: The influence of exogenous β -carotene and illumination on sclerotial differentiation and carotenoid yield of *Penicillium* sp. PT95 was studied. The results showed that in the medium supplemented with exogenous β -carotene, the time of both exudates and sclerotial initials of PT95 strain were delayed. The higher the concentration of exogenous β -carotene was, the longer the time of delay. But the time of sclerotial maturation was not changed. On the other hand, the exogenous β -carotene also caused a concentration-dependent reduction of both lipid peroxidation and content of carotenoid in sclerotia. The growth condition at high (light) oxidative stress favored the sclerotial differentiation and pigment accumulation of PT95. The sclerotia biomass and carotenoid yield was 1.18 and 2.01 fold higher respectively at high than at low (dark) oxidative stress. These data revealed that in order to attain higher sclerotia biomass and pigment yield, the strain PT95 should be grown under high oxidative stress and in the absence of antioxidants.

Key words: *Penicillium* sp., Lipid peroxidation, Oxidative stress, Sclerotium β -carotene

Foundation item: Chinese National Natural Sciences Fund (30070021); Shanxi Province Science Foundation (20041076)

* Corresponding author. Tel: 86-351-7016578; E-mail: hjr@sxu.edu.cn

Received date: 07-19-2004