

青霉 PT95 菌株固态发酵产生类胡萝卜素的研究*

韩建荣 徐 军

(山西大学生命科学系 太原 030006)

提 要 本文对青霉 *Penicillium* sp. PT95 菌株在固态发酵条件下菌核内产生类胡萝卜素进行了初步研究。结果表明,在 3 种固态发酵培养基中,玉米粉培养基(SMA)比麸皮培养基和棉籽壳培养基更适合于 PT95 菌株固态发酵产生类胡萝卜素。为了增加菌核干重和提高类胡萝卜素产率,SMA 中需要添加氮源、碳源和植物油。在所试的各种氮、碳源中,以硝酸钠和麦芽糖效果最佳。通过正交试验确定了在培养基盐溶液中添加硝酸钠 3g/L,麦芽糖 10g/L,豆油 2.5g/L 能使菌核干重由 5.36g/100g 提高到 9.70g/100g(干料);类胡萝卜素产率由 2149 μ g/100g 提高到 5260 μ g/100g(干料); β -胡萝卜素在类胡萝卜素中的含量由 61.4% 提高到 71.3%。

关键词 青霉,菌核,固态发酵,类胡萝卜素, β -胡萝卜素

分类号 Q939.5 **文献标识码** B **文章编号** 0001-6209(1999)02-0148-53

现在国内外有关丝状真菌和酵母菌产生类胡萝卜素的报道日益增多^[1-5],主要集中在少数几个菌种,例如 *Blakeslea trispora*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Phaffia rhodozyma* 等。国外也曾经有人报道某些青霉菌株菌丝体内可以产生 β -胡萝卜素^[6,7],但尚无关于青霉菌核内积累产生类胡萝卜素或 β -胡萝卜素的研究报道。我们从土壤中分离到一株菌核内富含类胡萝卜素的经鉴定属于 *Penicillium thomii* series 的 PT95 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^[8]。由于该菌株只能在固态培养基上形成菌核,所以只能选择固态发酵方法进行菌核的培养和类胡萝卜素的生产。

迄今为止,几乎所有的产类胡萝卜素的丝状真菌和酵母菌都是在液态发酵条件下得到菌丝体或菌体细胞,再从菌丝体或菌体细胞中将提取色素^[9]。这种液态发酵工艺设备复杂,能耗较大,对原料的要求也较高。与液态发酵工艺相比,固态发酵设备简单,能耗较低,各种粮食作物及其下脚料均可作为发酵原料^[10],是一条更具经济效益和生产潜力的途径。固态发酵工艺尤其适用于像 PT95 菌株这种在菌核内积累色素的菌株。由于 PT95 菌株形成的菌核呈坚硬的砂粒状^[8],这就为使其与培养基质进行分离奠定了基础。

本文报道 PT95 菌株利用自然固态基质玉米粉、麸皮、棉籽壳固态发酵产生类胡萝卜素的初步研究结果。

1 材料和方法

1.1 菌株

Penicillium sp. PT95 从山西汾阳混交林土壤中分离得到。

* 山西省教委基金资助项目

收稿日期:1998-08-07,修回日期:1998-12-07

1.2 培养基

1.2.1 菌种培养基:查氏琼脂培养基(CA)

1.2.2 固态发酵培养基:选择玉米粉培养基(SMA),麸皮培养基(SMB),棉籽壳培养基(SMC)3种固态发酵培养基。分别称取25g玉米粉、麸皮、棉籽壳,各加入20mL盐溶液,使料:水=1:0.8,pH6.0。盐溶液组成每升含: K_2HPO_4 1g, KCl 0.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, $FeSO_4$ 0.01g。

1.3 固态发酵方法

将上述固态发酵培养基分装入250mL三角瓶中,0.1MPa 30min灭菌后接入1mL由CA斜面菌种用无菌水稀释得到的孢子悬液,置25℃黑暗培养。所有试验均设三次重复。

1.4 菌核干重测定

待PT95菌株在各三角瓶中形成菌核并呈橙红色时,向瓶中加入适量自来水,用玻棒反复搅拌,使砂粒状菌核与发酵基质分离开来并沉淀到瓶底。弃去上层发酵基质与水的混合物,收集沉淀在瓶底的菌核,用水充分冲洗干净,置50℃烘干称重。

1.5 类胡萝卜素的提取及含量测定

按文献[8]的方法提取菌核中类胡萝卜素,并按文献[9]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[5]的方法,在0.25mm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 β -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 β -胡萝卜素的测定

从薄板上将展开的与标准 β -胡萝卜素 R_f 值相同的谱带刮下,用氯仿萃取出 β -胡萝卜素,再刮下其余谱带,并用等量氯仿萃取,经玻璃棉过滤后,滤液置756型紫外-可见分光光度计(上海第三分析仪器厂产品)上进行全波扫描,根据各色素成分的最大吸收峰的吸收光度值,按下式计算 β -胡萝卜素在类胡萝卜素中的百分含量:

$$\beta\text{-胡萝卜素}(\%) = \frac{A_{\beta}V_{\beta}}{\sum_{x=1}^n A_x V_x} \times 100$$

式中 A_{β} —— β -胡萝卜素吸收光度; V_{β} —— β -胡萝卜素氯仿萃取液mL数; A_x ——任一色素成分吸收光度; V_x ——任一色素成分氯仿萃取液mL数; n ——薄板上展开的色素谱带数。

2 结果和分析

2.1 不同培养基对菌核干重和类胡萝卜素产率的影响

从表1可以看出,3种固态发酵培养基对PT95菌株菌核干重和类胡萝卜素产率有着不同的影响。在SMA上,菌核干重和类胡萝卜素产率都很高,而在SMB上,虽然菌核干重很高,但类胡萝卜素产率却很低,SMC则更差。说明玉米粉比麸皮和棉籽壳更适合于PT95菌株固态发酵培养菌核和产生类胡萝卜素。所以确定用SMA进行以下的研究。

表 1 不同培养基对菌核干重和类胡萝卜素产率的影响

Table 1 Effect of different media on dry weight of sclerotia and carotenoid yield

培养基 Media	菌核干重 Sclerotia dry weight/ (g/100g dry substrate)	类胡萝卜素含量 Content of carotenoid/ ($\mu\text{g/g}$ dry sclerotia)	类胡萝卜素产率 Carotenoid yield/ ($\mu\text{g}/100\text{g}$ dry substrate)
SMA	5.36	401	2149
SMB	5.56	192	1068
SMC	1.75	163	285

2.2 添加氮源对菌核干重和类胡萝卜素产率的影响

玉米粉中氮素含量和组成明显不足^[11],所以添加一定量的有机氮或无机氮是必要的。在 SMA 中,通过盐溶液分别添加含氮量为 0.48g/L 的硝酸钠、硝酸铵、氯化铵、硫酸铵、尿素、蛋白胨、酵母膏(表 2)结果表明,与不加氮源的对照相比,添加氮源能显著地增加菌核干重,提高类胡萝卜素产率。无机氮源中,硝酸钠效果最好;有机氮源中,蛋白胨的效果最好。显然硝酸钠比蛋白胨效果更好。

表 2 添加氮源对菌核干重和类胡萝卜素产率的影响

Table 2 Effect of supplementary nitrogen sources on dry weight of sclerotia and carotenoid yield

氮源 Nitrogen sources	菌核干重 Sclerotia dry weight/ (g/100g dry substrate)	类胡萝卜素含量 Content of carotenoid/ ($\mu\text{g/g}$ dry sclerotia)	类胡萝卜素产率 Carotenoid yield/ ($\mu\text{g}/100\text{g}$ dry substrate)
对照 Control	5.36	401	2149
硝酸钠 NaNO_3	8.29	497	4120
硝酸铵 NH_4NO_3	8.11	374	3033
氯化铵 NH_4Cl	7.20	406	2923
硫酸铵 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5.81	413	2399
尿素 Urea	8.67	270	2341
蛋白胨 Peptone	9.51	388	3689
酵母膏 Yeast extract	8.61	374	3220

对照:在 SMA 中没有添加氮源 Control:Without supplementation of nitrogen to SMA.

2.3 添加碳源对菌核干重和类胡萝卜素产率的影响

由于玉米粉中主要是大分子的淀粉为碳源,所以 PT95 菌株在 SMA 中的定殖和营养生长会受到一定的影响。添加小分子碳源将更有利于其生长发育。在分别添加 4 种不同小分子碳源的 SMA(通过盐溶液添加,添加量 5g/L)中的菌核干重与对照相比有了不同程度的增加,但只有麦芽糖使类胡萝卜素产率有了一定的提高,其余 3 种糖反而使类胡萝卜素产率有了不同程度的降低(表 3)。

表 3 添加碳源对菌核干重和类胡萝卜素产率的影响

Table 3 Effect of supplementary carbon sources on dry weight of sclerotia and carotenoid yield

碳源 Carbon sources	菌核干重 Sclerotia dry weight/ (g/100g dry substrate)	类胡萝卜素含量 Content of carotenoid/ ($\mu\text{g/g}$ dry sclerotia)	类胡萝卜素产率 Carotenoid yield/ ($\mu\text{g}/100\text{g}$ dry substrate)
对照 Control	5.36	401	2149
葡萄糖 Glucose	5.94	328	1948
蔗糖 Sucrose	7.37	235	1732
麦芽糖 Maltose	7.28	333	2424
乳糖 lactose	6.88	294	2023

对照 在 SMA 中没有添加碳源 Control :Without supplementation of carbon sources to SMA.

2.4 添加植物油对菌核干重和类胡萝卜素产率的影响

显微观察表明,PT95 菌株菌核内的类胡萝卜素是以油滴形式贮存的。那么当培养基中添加适量植物油势必会影响 PT95 菌株的脂类代谢,亦可能会影响类胡萝卜素的产率。基于这种考虑,我们在 SMA 盐溶液中添加 5g/L 的豆油,结果,与对照相比,菌核干重由 5.36g/100g 提高到 7.54g/100g(干料);类胡萝卜素产率由 2149 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 提高到 2796 $\mu\text{g}/100\text{g}$ (干料),提高幅度分别达 40% 和 30%。

2.5 氮源、碳源、植物油最适添加量的确定

前面试验表明,在 SMA 中添加硝酸钠、麦芽糖、豆油均能增加菌核干重、提高类胡萝卜素产率。为考察其协同作用并确定最适用量,以硝酸钠添加量为 A 因素,麦芽糖添加量为 B 因素,豆油添加量为 C 因素,各取 3 个水平,以菌核干重和类胡萝卜素产率为指标在 SMA 上进行了 $L_9(3^3)$ 正交试验,结果如表 4 所示。

由极差分析可知,各因素对 PT95 菌株菌核干重和类胡萝卜素产率的影响程度为:A 因素>C 因素>B 因素。其理论最佳条件为:硝酸钠添加量 3g/L,麦芽糖添加量 10g/L,豆油添加量 2.5g/L。正交试验中的第 6 试验号的组合与理论最适条件正好吻合,故菌核干重和类胡萝卜素产率最高。

2.6 固态发酵对 β -胡萝卜素在类胡萝卜素中的百分含量的影响

在 CA 平板上培养得到的菌核中积累的类胡萝卜素由两种色素成分组成,其中 β -胡萝卜素占色素总量的 64.3%^[8]。那么在 SMA 及添加不同氮源、碳源和植物油的各种固态发酵培养基中, β -胡萝卜素的含量又将如何变化呢?薄层色谱分析表明,在上述条件下形成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 β -胡萝卜素的含量有了明显的变化(表 5)。添加植物油比添加碳源、氮源更能明显提高 β -胡萝卜素的含量。在 SMA 中同时添加硝酸钠、麦芽糖和豆油,能使 β -胡萝卜素由 61.4% 提高到 71.3%。

3 讨论

PT95 菌株在玉米粉培养基(SMA)上其菌核中积累的类胡萝卜素含量较高,而在

表 4 正交试验结果的极差分析

Table 4 Extreme value analysis of orthogonal experiment

试验序号 Experimental No.	A 因素 Factor A/ (g/L)	B 因素 Factor B/ (g/L)	C 因素 Factor C/ (g/L)	菌核干重 Sclerotia dry weight/ (g/100g dry substrate)	类胡萝卜素产率 Carotenoid yield/ ($\mu\text{g}/100\text{g}$ dry substrate)
1	4	5	2.5	7.56	4100
2	4	7.5	5	7.32	3980
3	4	10	7.5	7.36	4010
4	3	5	5	8.72	4730
5	3	7.5	7.5	8.82	4750
6	3	10	2.5	9.70	5260
7	2	5	7.5	8.25	4470
8	2	7.5	2.5	8.41	4550
9	2	10	5	8.27	4500
\bar{K}_1	7.41 A030	8.18 A433	8.56 A637		
\bar{K}_2	9.08 A913	8.18 A427	8.10 A403		
\bar{K}_3	8.31 A507	8.44 A590	8.14 A410		
R	1.67 A883	0.26 A163	0.46 A234		

表 5 β -胡萝卜素在类胡萝卜素中的百分含量Table 5 The proportion of β -carotene in carotenoids

培养基 Media	NaNO ₃				
	SMA + NaNO ₃	SMA + Maltose	SMA + Soybean oil	SMA + Maltose Soybean oil	SMA
β -胡萝卜素含量 β -Carotene in carotenoids/%	64.8	65.7	69.4	71.3	61.4

SMB 和 SMC 上类胡萝卜素含量较低(表 1),这可能与玉米粉中含有一定量的类胡萝卜素如玉米黄质(Zeaxanthin)有关。由于各种类胡萝卜素在结构上的相似性,玉米黄质很可能被 PT95 菌株在类胡萝卜素合成过程中加以吸收利用。在 SMA 中添加植物油一方面可以影响菌株的脂类代谢,另一方面也有利于使更多的玉米黄质被溶解出来(脂溶)参与到类胡萝卜素的合成代谢当中,所以添加植物油既能提高类胡萝卜素的产率,也能大幅度提高 β -胡萝卜素在类胡萝卜素中的百分含量。以上推测还有待进一步试验证实。

大多数青霉菌株都具有极强的产孢能力。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,这对在固态发酵条件下菌核的分离及色素的提取都是非常有利的。PT95 菌株在 SMA 和 SMC 上都表现出了理想的选择培养特性,即在发酵基质里分生孢子形成量很少,而在 SMB 上却有大量的分生孢子产生。究竟是什么因素决定着 PT95 菌株选择性地形成菌核或分生孢子,尚需进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] 汪武,方光瑾,唐蕾等.生物工程学报,1994,10:369~373.
- [2] 张素琴,朱湘民,马国华.食品与发酵工业,1989,5:1~5.
- [3] 张建法,黄为一,吴江.微生物学通报,1996,23(1):12~14.
- [4] Kim S W, Seo W T, Park Y H. *Biotechnol Lett*, 1996, 18:1287~1290.
- [5] An G H, Schuman D B, Johnson E A. *Appl Environ Microbiol*, 1989, 55:116~124.
- [6] Chebotarev L N. *Microbiologiya*, 1978, 47:624~628.
- [7] Nakamura R. Japan Patent 10999, 1960.
- [8] 韩建荣,王肖娟,原香娥.微生物学通报,1998,25(6):319~321.
- [9] 汪业勤,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] Chahal D S. *Mycologia*, 1983, 75:597~603.
- [11] 藤卷正生,李家瑞译.食品化学.北京:轻工业出版社,1987:297.

SOLID-STATE FERMENTATION WITH *PENICILLIUM* SP. PT95 FOR CAROTENOID PRODUCTION

Han Jianrong Xu Jun

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

Abstract A preliminary study on solid-state fermentation (SSF) with *Penicillium* sp PT95 for carotenoid production was performed. The results showed that the production of carotenoid in sclerotia of PT95 was more efficient in corn meal medium than in either wheat bran medium or cottonseed hull medium. Addition of nitrogen and carbon sources as well as vegetable oil to media was required for increasing the dry weight of sclerotia and carotenoid yield. Among several tested compounds for nitrogen and carbon sources, sodium nitrate and maltose were the best. Through orthogonal experiments, the optimum culture medium was obtained by supplement of NaNO₃ 3g, maltose 10g, soybean oil 2.5g to per liter of salt solution. Under the optimum culture conditions, the sclerotia dry weight increased from 5.36g to 9.70g per 100g dry substrate, the carotenoid yield from 2149 μg to 5260 μg per 100g dry substrate, the proportion of β-carotene in carotenoids from 61.4% to 71.3%.

Key words *Penicillium* sp, Sclerotia, Solid-state fermentation, Carotenoid, β-carotene