

间型脉孢菌产类胡萝卜素研究

唐 刚^{1,2}, 陈育如^{1,2}, 刘友芬^{1,2}

(1. 南京师范大学 生命科学院, 江苏 南京 210046)

2. 江苏省生物多样性与生物技术重点实验室, 江苏 南京 210046)

[摘要] 筛选了一株产类胡萝卜素的间型脉孢菌(*Neurospora intermedia*), 研究了该菌发酵过程中培养条件、添加物和光照条件对类胡萝卜素产量的影响。实验结果表明, 间型脉孢菌产类胡萝卜素的适宜温度为 30℃; 当培养基中添加了 1.5 mg/L 没食子酸和 0.05 g/L 植酸钙后, 所培养菌丝中类胡萝卜素含量分别可达 46.44 和 54.03(μg/g 干菌体), 比对照产量分别提高了 100% 和 133% (以干菌体计); 增加光照对菌体产类胡萝卜素也有明显的促进作用, 与对照相比, 类胡萝卜素产量提高了 73.7%。间型脉孢菌孢子中类胡萝卜素含量明显高于菌丝含量, 达 145.5 μg/g 孢子。固体培养时产量大, 因此物料中类胡萝卜素产量可达 81.94 μg/g 干曲。

[关键词] 间型脉孢菌, 类胡萝卜素, 生物质, 添加物

[中图分类号] Q562 [文献标识码] A [文章编号] 1672-1292(2009)01-0073-05

Study on Carotenoids Production by *Neurospora intermedia*

Tang Gang^{1,2}, Chen Yuru^{1,2}, Liu Youfen^{1,2}

(1. School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046 China)

2. Jiangsu Key Lab for Biodiversity and Biotechnology, Nanjing 210046 China)

Abstract The work screened a strain of *Neurospora intermedia* that yield carotenoids. The effect factors on output of carotenoids such as culture conditions, species additives and the illumination for *N. intermedia* in the fermentation process were studied. The results showed that optimum temperature of producing carotenoids was 30℃, when added 1.5 mg/L gallic acid and 0.05 g/L phytin respectively into the culture medium, the carotenoids content of mycelium was up to 46.44 and 54.03 (μg/g dry cell), the carotenoids yield increased by 100% and 133% (dry cell) than the control respectively. Illumination had an obvious effect on promoting output of carotenoids compared with the control, the carotenoids production increased by 73.7%. The carotenoids content in spores of *N. intermedia* is as high as 145.5 μg/g (dry spore), significantly higher than that of mycelium content. Spore production capacity was larger in culture solid, so the carotenoids content of materials was 81.94 μg/g dry koji.

Key words *Neurospora intermedia*, carotenoids, biomass, auxiliary

类胡萝卜素广泛存在于高等植物、藻类、少数微生物和部分动物体内, 种类繁多, 目前已发现 750 多种^[1]. 其中的 β-胡萝卜素作为食品添加剂和营养增补剂, 已被 FAO 和 WHO 食品添加剂联合专家委员会推荐认定为 A 类优秀营养色素, 并在世界 52 个国家和地区获准应用. 全世界 β-胡萝卜素的年需求量在 1 000 左右, 而且仍在以每年 7% ~ 9% 的速度增长, 欧美和日本的需求量增长更大^[2].

早在 1919 年 Steenkobck 就发现了 β-胡萝卜素可能具有维生素 A 活性, 另外类胡萝卜素在抗氧化作用、增强人体的免疫能力方面具有明显的作用^[3], 成为研究热点. 类胡萝卜素来源有天然来源和全化学合成两大类. 目前市场中类胡萝卜素的主要来源是化学合成品, 由于合成品有着安全性方面的疑虑, 因此微生物来源的天然类胡萝卜素有着更大的优势^[4].

国内外微生物合成类胡萝卜素的研究主要集中在杜氏盐藻 (*Dunaliella salina*)、三孢布拉霉 (*Blakeslea*

收稿日期: 2008-11-07

基金项目: 江苏省高新技术研究计划 (BG2007049) 资助项目.

通讯联系人: 陈育如, 博士, 副教授, 研究方向: 生物化工与应用微生物. E-mail: chenyrn@njjnu.edu.cn

trispota) 和红酵母 (*Rhodotorula*) 等方面. 杜氏盐藻产类胡萝卜素含量约 10%^[5], 但盐藻培养需要在高盐、少雨的近海地区, 受到地域和技术限制. 而且其周期长 (约 2 周, 冬季需适当延长), 生长密度低, 通过传统的光合自养培养体系在单位时间内难以获取高生物量^[6]. 三孢布拉霉突变株生产 β -胡萝卜素量较高, 达到 2 808 $\mu\text{g/g}$ 3 d 的产量为 352 $\mu\text{g/g}$ 干菌体, 但需以糖为原料, 且工艺较为复杂^[7]. 以红酵母产类胡萝卜素, 3 d 产量为 237.7 $\mu\text{g/g}$ ^[4], 所需原料仍为葡萄糖等来源于淀粉质水解的原料. 近年来, 对作为遗传研究的模式菌株-脉孢菌的研究表明, 该菌具有同时产纤维素酶、半纤维素酶、木糖还原酶等能力, 能直接利用生物质中的纤维素原料而良好生长, 其丰富的酶系和优异的综合性能在生物能源等方面倍受瞩目^[8]. 脉孢菌生长迅速, 能以非粮原料产类胡萝卜素, 呈现鲜亮桔黄的色彩. 在以脉孢菌产类胡萝卜素方面, 除 Manko Zalokar 研究了粗糙脉孢菌中类胡萝卜素的生物合成途径外^[9], 国内外对其产类胡萝卜素的发酵研究甚少. 本工作对筛选的一株间型脉孢菌产类胡萝卜素进行了研究.

1 材料与方 法

1.1 菌 种

间型脉孢菌 (*Neurospora intermedia*), 本实验室分离、鉴定与保藏.

1.2 培养基

1.2.1 斜面活化培养基

马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 琼脂 20 g/L, pH 值自然.

1.2.2 液体培养基

1 号培养基: 葡萄糖 15 g/L, 玉米芯粉 (60 目) 1 g/L, 豆粕粉 7.5 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, MgSO_4 0.3 g/L, CaCl_2 0.3 g/L, pH 值自然.

2 号培养基: 蔗糖 15 g/L, 玉米芯粉 (60 目) 1 g/L, 豆粕粉 7.5 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, MgSO_4 0.3 g/L, CaCl_2 0.3 g/L, pH 值自然.

3 号培养基: 糖蜜 15 g/L, 玉米芯粉 (60 目) 1 g/L, 豆粕粉 7.5 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, MgSO_4 0.3 g/L, CaCl_2 0.3 g/L, pH 值自然.

4 号培养基: 玉米芯粉 (60 目) 1 g/L, 豆粕粉 7.5 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, MgSO_4 0.3 g/L, CaCl_2 0.3 g/L.

5 号培养基: 马铃薯 200 g/L, 蔗糖 20 g/L, pH 值自然.

各培养基灭菌冷却后备用.

1.2.3 固体培养基

玉米粉固体培养基 1: 玉米粉与豆粕按 1:2 的比例, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.08 g, MgSO_4 0.02 g 加水至含水量 60% (湿基), 灭菌备用.

纤维素固体培养基 2: 蔗渣 10 g, 麸皮 5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.08 g, MgSO_4 0.02 g 加水至含水量 60% (湿基), 灭菌备用.

1.3 培养方 法

将脉孢菌斜面菌种中的孢子用无菌水洗下接种于摇瓶培养基中, 装液量 100 mL/250 mL 三角瓶, 30℃, 180 r/min 条件下培养, 分离菌丝后测定类胡萝卜素含量 (以克干菌丝计).

固体培养基经灭菌后接入用无菌水洗下的脉孢菌孢子, 装料量 30 g/250 mL 三角瓶, 30℃培养, 定时测定类胡萝卜素产量 (以每克干菌计).

1.4 生物量测定

菌丝过滤, 用水洗涤后, 60℃烘干至恒重.

1.5 类胡萝卜素的提取和测定

采用丙酮超声提取的方法^[10]并加以改进: 每克菌体加 3 mL 丙酮, 室温下超声波提取 30 min 于 10 000 r/min 离心 5 min 上清液即为胡萝卜素提取液. 将提取液适当稀释后, 以丙酮为空白对照, 在 475 nm 处测定吸光度, 按下式计算胡萝卜素含量: 类胡萝卜素含量 ($\mu\text{g/g}$ 菌体) = $A \times D \times V / 0.16 \times W$. 式中, A 为 475 nm 波长处的吸光度; V 为丙酮用量 / mL; D 为测定试样时的稀释倍数; W 为脉孢菌体重量 / g. 0.16 为胡萝卜素的摩尔消光系数.

2 仪器与设备

HD-930型组合式全温摇床 (太仓市博莱特实验仪器厂); KQ-100E 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 2802S UV /VIS Spectrophotometer (尤尼柯-上海仪器有限公司); PYX-DHS-50X 65-S 型隔水式电热恒温培养箱 (上海跃进医疗器械厂); FA1004型电子分析天平 (上海天平仪器厂); CA-1390-1 超净工作台 (上海上净净化设备有限公司). 丙酮等试剂和药品均为国产分析纯试剂.

3 结果与讨论

3.1 温度对菌体生长及产类胡萝卜素量的影响

实验设计了不同温度对菌体产类胡萝卜素的影响, 用液体马铃薯葡萄糖培养基培养 6 d 测定菌丝中类胡萝卜素的含量, 结果如表 1 所示.

表 1 温度对类胡萝卜素产量的影响
Table 1 Effect on carotenoids output of *N. intermedia* by temperature

Temperature/℃	25	28	30	33
Content of carotenoids (μg/g wet mycelium)	3.64	8.51	15.5	10.1

由表 1 可见, 所用间型脉孢菌产类胡萝卜素的适宜温度为 30℃.

3.2 培养基成份对类胡萝卜素产量的影响

3.2.1 液体培养基对类胡萝卜素产量的影响

使用不同成份的 1 号~5 号液体培养基接种脉孢菌, 在 30℃, 180 r/min 条件下分别培养 3 d 和 6 d 测定菌量和类胡萝卜素含量, 结果如图 1 所示.

从图 1 可见, 随着培养时间从 3 d 延长至 6 d 类胡萝卜素的产量大幅度提高. 其中 1 号与 5 号培养基产量较高, 分别为 13.06 μg/g 湿菌体和 12.95 μg/g 湿菌体. 蔗糖成本低于葡萄糖, 从降低原料成本的角度, 可优先使用 5 号的蔗糖培养基.

3.2.2 固体培养基对类胡萝卜素产量的影响

用固体玉米粉培养基 1 培养脉孢菌 6 d 后, 物料中的类胡萝卜素含量为 75.01 μg/g 干曲. 为进一步降低物料成本, 改用固体纤维素培养基 2 培养 6 d 后, 物料的类胡萝卜素含量为 81.94 μg/g 干曲. 因为脉孢菌是好氧菌, 培养基中纤维素原料的加入增加了物料的供氧条件, 因此类胡萝卜素产量更高, 纤维素物料来源丰富、价格低廉, 以其为主要原料优势明显.

3.3 添加物对类胡萝卜素产量的影响

在培养基中添加植酸钠等促进剂, 有利于提高其他生物产类胡萝卜素的量^[11]. 本工作考察了植酸钙、植酸钠、维生素 C 等在液体培养基 (1 号) 中对间型脉孢菌产类胡萝卜素的影响.

在 30℃, 180 r/min 培养 5 d 的条件下, 在液体培养基中加入植酸钙、植酸钠等添加物, 测量其对产类胡萝卜素的影响, 结果如图 2 所示.

从图 2 可见, 适量的植酸钙对提高类胡萝卜素产量效果明显 (类胡萝卜素产量增加到 54.03 μg/g 干菌体, 比对照增产了 133%). 植酸钠的增产效果也比较明显 (类胡萝卜素含量为 50.86 μg/g 干菌体), 豆油和柠檬酸钠的添加对类胡萝卜素产量的影响不明显. 植酸钙镁等可从谷糠等农副产品中得到, 在应用中具有优势.

类胡萝卜素本身是一种抗氧化剂, 如果在培养基中加入其他成本更低的抗氧化剂, 有可能减少类胡萝卜素在培养过程中的氧化损失. 本工作考察了添加几种抗氧化剂对间型脉孢菌产类胡萝卜素的影响, 结果如表 2 所示.

由表 2 可见, 在菌体开始培养时即添加没食子酸, 对类胡萝卜素产量的影响最明显 (46.44 μg/g 干菌体, 比对照增加了 100%). 但在培养 2 d 后再加入, 提高效果有限. 这说明其抗氧化性最好在培养全程发挥作用. 加入绿原酸提取液也有一定的效果 (36.76 μg/g 干菌体), 绿原酸可从量多易得的烟草中提取, 是一种很有发展潜力的抗氧化剂和添加剂.

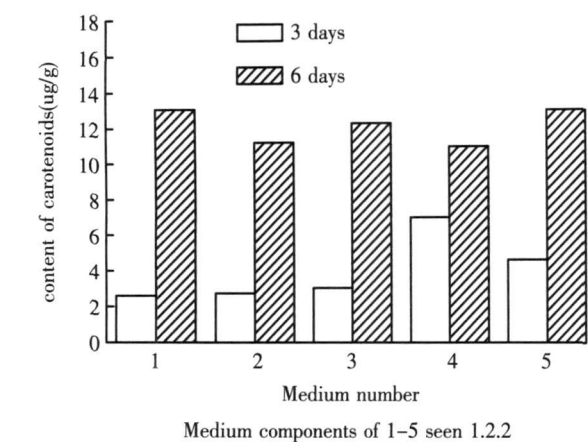


图 1 液体培养基种类对间型脉孢菌产类胡萝卜素的影

Fig.1 Effect on carotenoids output of *N. intermediaby* different liquid media

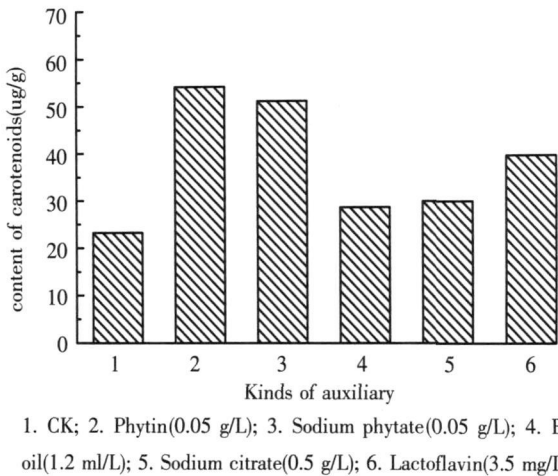


图 2 添加物种对类胡萝卜素产量的影响

Fig.2 Effect on carotenoids output of *N. intermedia* by auxiliary

表 2 添加不同抗氧化剂对菌体生物量及类胡萝卜素产量的影响

Table 2 Effect on biomass and carotenoids output by additional antioxidant

Auxiliary	Addition quantity (mg/L)	Bim ass (g/wet weight)	Content of carotenoids (μg/g wet mycelium)	Content of carotenoids (μg/g dry mycelium)
Control	0	4.19	3.56	23.20
Gallic acid	1.5	4.47	7.13	46.44
Gallic acid (after 2 days added)	1.5	5.06	4.26	27.74
Pyrogallic acid	1.5	4.45	4.90	31.91
Solution of chlorogenic acid	1.5	4.55	5.65	36.76
VC	1.5	4.26	4.74	30.85
VE	2.0	4.69	4.20	27.33

3. 4 溶氧与光照对类胡萝卜素产量的影响

本工作在进行预实验时发现,光照和溶氧是影响类胡萝卜素产量的重要因素.有文献对产氢红杆菌 (*Rhodobacter* sp.) 中类胡萝卜素进行代谢研究,结果表明其中的叶绿素和类胡萝卜素的合成具有交替性和时序性^[12],这种交替性和时序性与光照有关.因此本工作对光照和溶氧条件对产类胡萝卜素的影响进行了探讨,结果如图 3 所示.

由图 3 可见,光照对类胡萝卜素的产量有明显的提高作用(对生物量的影响不大).与对照相比,使用日光灯提供光照(11W,距离 30 cm)的样本类胡萝卜素的产量提高了 73.7% (干菌体).阳光对产量也有增加的作用,但在阳光照明的条件下是用静态培养,因通气量不足故效果有限;如果大规模生产时使用阳光照明的动态培养,效果可能更好.

间型脉孢菌的孢子呈鲜艳的桔黄色.对其孢子中类胡萝卜素的含量进行测定的结果表明,孢子中类胡萝卜素含量高达 145.5 μg/g 干孢子. Marko Zaloka 的研究结果也表明,光照和氧气等对粗糙脉孢菌类胡萝卜素产量的提高有促进作用,孢子中类胡萝卜素含量明显高于菌丝^[9]. 本工作结果与此一致,说明间型脉孢菌与粗糙脉孢菌在这一点上基本一致.如果培养脉孢菌时孢子产量提高,其类胡萝卜素产量也将提高.固体培养时产孢量大,因此以脉孢菌产类胡萝卜素最好采用固体培养.

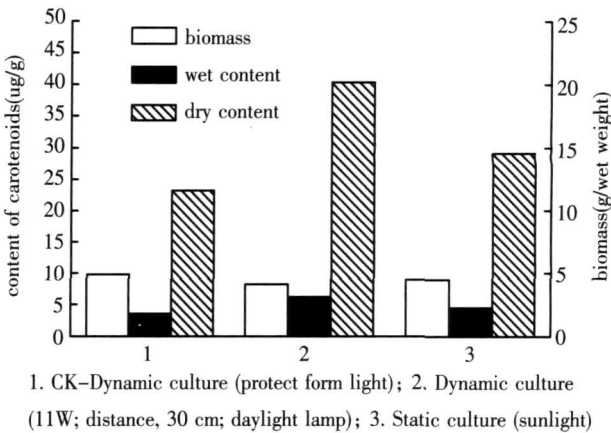


图 3 溶氧与光照对类胡萝卜素产量的影响

Fig.3 Effect on carotenoids output of dissolvedoxygen and illumination

微生物来源的天然类胡萝卜素在安全性方面有着优势. 生物来源的类胡萝卜素的产业化瓶颈主要是原料与成本问题. 用间型脉孢菌生产类胡萝卜素, 可直接利用生物质中的植物纤维素为原料, 这是其他微生物所不具备的优势条件. 虽然目前所用间型脉孢菌的原始菌株在发酵水平与三孢布拉霉和盐藻、红酵母等有一定差距, 但如果能在菌种诱变等方面使产量有所突破, 则适应性强、营养要求简单的脉孢菌在类胡萝卜素产业开发方面将有着巨大的潜力.

4 结 论

(1) 所用间型脉孢菌产类胡萝卜素的适宜温度为 30℃. 该菌营养要求简单, 能直接利用纤维素物料, 因此在原料来源方面有望降低生产成本.

(2) 添加物对脉孢菌的类胡萝卜素产量有较大影响, 其中以加入植酸钙的效果最好, 在添加量为 0.05 g/L 时, 类胡萝卜素含量为 54.03 ($\mu\text{g/g}$ 干菌体), 比对照产量提高了 133%. 添加 1.5 mg/L 的没食子酸后, 类胡萝卜素含量为 46.44 ($\mu\text{g/g}$ 干菌体), 产量比对照提高了 100%.

(3) 光照对类胡萝卜素的产生有明显的促进作用, 使用日光灯照明 (11 W, 距离 30 cm) 的类胡萝卜素产量比对照组提高了 73.7% (干菌体).

(4) 该间型脉孢菌孢子中的类胡萝卜素含量 (145.5 $\mu\text{g/g}$ 干菌体) 明显高于菌丝中的含量 (23.20 $\mu\text{g/g}$ 干菌体), 因此产孢量大的固体培养在用该菌产类胡萝卜素方面更具优势.

(5) 培养间型脉孢菌时, 用玉米粉固体培养基培养的类胡萝卜素产量为 75.01 $\mu\text{g/g}$ 干曲, 用纤维素固体培养基培养的类胡萝卜素产量为 81.94 $\mu\text{g/g}$ 干曲. 因此, 以纤维素为原料的类胡萝卜素生产在原料成本方面有着更大的潜力.

[参考文献] (References)

- [1] Britton G, Liaen-Jensen S, Pfander H. Carotenoids Handbook (V II) [M]. Basel: Boston: Birkhauser Verlag, 2004.
- [2] Marta M C, Guillermo S M. Effect of illumination and chlorophylls on stability of tomato carotenoids [J]. Food Chemistry, 2008, 107(4): 1365-1370.
- [3] Steenbock H, White com V S. Yellow com and a probable relation between the fat-soluble vitamin and yellow plant pigments [J]. Science, 1919, 50: 352-353.
- [4] Park P K, Kim E Y, Chu K H. Chemical disruption of yeast cells for the isolation of carotenoid pigments [J]. Separation and Purification Technology, 2007, 53(2): 148-152.
- [5] Packo P L, Marcel J, Ric C H, De Vos, et al. Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications [J]. Trends in Biotechnology, 2008, 26(11): 631-638.
- [6] Hu C C, Lin J T, Lu F J, et al. Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract [J]. Food Chemistry, 2008, 109(2): 439-446.
- [7] Mara D Q R, Rosa M R V, Santiago T M, et al. Light induction of the carotenoid biosynthesis pathway in *Blastospora trispora* [J]. Fungal Genetics and Biology, 2005, 42(2): 141-153.
- [8] 杨先泉, 赵勤, 傅体华. 脉孢霉两对基因顺序四分子分析 [J]. 遗传, 2008, 30(6): 801-806.
Yang Xianquan, Zhao Qin, Fu Tihua. Ordered tetrad analysis of two genes in *Neurospora* [J]. Hereditas, 2008, 30(6): 801-806 (in Chinese).
- [9] Marko Zabkar. Studies on biosynthesis of carotenoids in *Neurospora crassa* [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1954, 50(1): 71-80.
- [10] 王岁楼. 红酵母产生类胡萝卜素的研究 [J]. 中国粮油学报, 2001, 16(5): 43-46.
Wang S L. Study on the conditions of carotenoid fermentation by *Rhodotoula* [J]. Chinese Cereals and Oils Association, 2001, 16(5): 43-46 (in Chinese).
- [11] 左亚军. 环境因素和培养条件对类胡萝卜素表达的影响 [J]. 上海化工, 2007, 32(2): 22-26.
Zuo Y J. Effect of different environmental and cultural stimulants on the production of carotenoids [J]. Shanghai Chemical Industry, 2007, 32(2): 22-26 (in Chinese).
- [12] 张晓蓉, 马文丽, 杨素萍. 产氢杆杆菌类胡萝卜素代谢研究 [J]. 山西大学学报: 自然科学版, 2006, 29(2): 201-204.
Zhang X R, Ma W L, Yang S P. Carotenoid metabolism of hydrogen-producing *Rhodobacter* sp [J]. Journal of Shanxi University: Natural Science Edition, 2006, 29(2): 201-204 (in Chinese).

[责任编辑: 严海琳]