

# 利用谷物进行类胡萝卜素固态发酵

徐 军 崔丽霞 韩建荣

(山西大学生命科学与技术学院,太原 030006)

**摘 要** 研究了 7 种谷物培养基及相关因素对青霉 PT95 菌株进行类胡萝卜素固态发酵的影响作用。结果表明,谷物培养基的组成对 PT95 菌株在固态发酵条件下的菌核生物量和菌核中的类胡萝卜素含量都有明显的影响,接种方式和接种量能明显影响谷物培养基上的菌核生物量,但对菌核中的类胡萝卜素含量没有明显的影响;在谷物培养基里添加麸皮有利于菌核的形成。在选择最佳接种方式、接种量,并在培养基里添加 20% 麸皮(干重)的固态发酵条件下,大米培养基上得到的菌核生物量最高,达到 15.00 g/100 g(干料);荞麦培养基上,菌核中的类胡萝卜素含量最高,达到 826  $\mu\text{g/g}$ (干菌核);而在谷子培养基上,类胡萝卜素产率最高,达到 11 457  $\mu\text{g}/100\text{g}$ (干料)。

**关键词** 青霉,谷物培养基,固态发酵,类胡萝卜素产率,菌核生物量

类胡萝卜素是自然界分布非常广泛、意义非常重要的一类色素。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,所以近年来引起国内外的普遍重视。日益增多的研究报道主要集中在少数几个菌株,例如 *Blakeslea trispora*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Phaffia rhodozyma* 等<sup>[1~4]</sup>。这些菌株无一例外都是在菌丝体或单细胞营养体内积累类胡萝卜素的。一株经鉴定属于 *Penicillium thomii* 的青霉 PT95 菌株是迄今唯一报道过的能在菌核内积累类胡萝卜素的微生物菌株<sup>[5,6]</sup>。该菌株只能在固态培养或固态发酵的条件下形成菌核和积累色素,因此只能选择固态培养或固态发酵方法进行有关的基础研究和应用开发研究。韩建荣等<sup>[6]</sup>已经证明了玉米培养基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。

我国谷物资源丰富,可供利用的谷物种类很多。除了玉米以外,还有哪些谷物适合于 PT95 菌株进行类胡萝卜素固态发酵生产,目前尚不清楚。研究中选择了玉米、大米、小麦、高粱、荞麦、谷子、糜子等 7 种谷物分别配制成固态培养基,分析比较了在各种培养基上 PT95

菌株的生长发育以及产生类胡萝卜素的情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌 株

青霉 PT95 菌株,从山西汾阳混交林土壤中分离得到,保存在查氏琼脂斜面上。

### 1.2 接种物的准备

从 PT95 菌株 7 d 菌龄的查氏斜面上用无菌水洗下分生孢子,并制成  $10^8$  个/mL 的孢子悬液;在 125 r/min, 25℃ 条件下摇床培养 48 h 菌株,收集菌丝体并制成 5.0 mg/mL 的悬液;从 20 d 菌龄的查氏平板上用无菌水洗下菌核,经离心处理洗掉分生孢子,再将纯化后的菌核用研钵适当研磨(无菌操作),制成 5.0 mg/mL 的菌核悬液。

将以上 3 种悬液分别作为固态发酵的接种物。

### 1.3 固态发酵培养基

共制备 7 种谷物培养基。将玉米、大米、小麦、高粱、荞麦、谷子、糜子在 60℃ 下烘干并粉碎过 20 目筛。分别称取 25 g,各加入 20 mL 盐溶液, pH6.0。盐溶液组成:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 g,  $\text{KCl}$  0.5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{FeSO}_4$  0.01 g, 定容

第一作者:硕士,讲师。(韩建荣教授为本文通讯作者)。

\* 国家自然科学基金资助项目(No. 30070021)

收稿时间 2003-04-02, 改回时间 2003-08-01

到 1 L。

1.4 固态发酵方法

将上述固态发酵培养基分别装入 250 mL 三角瓶中 0.1 MPa 30 min 灭菌后接入 2 mL 菌种悬液 25℃ 黑暗培养 20 d。所有试验均设 5 次重复。

1.5 菌核生物量测定

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 ,用玻璃棒反复搅拌 ,使沙粒状菌核与发酵基质分离并沉淀到瓶底。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。

1.6 类胡萝卜素的提取及含量测定

按参考文献 5 的方法提取菌核中类胡萝卜素 ,并按参考文献 7 的方法计算类胡萝卜素含量。

1.7 类胡萝卜素组分分离

按参考文献 1 的方法 ,在硅胶 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-CCl<sub>4</sub> 浸提液和标准 β-胡萝卜素( Merck 产品 )CCl<sub>4</sub> 溶液点样 ,以 V( 石油醚 ) : V( 乙酸乙酯 )= 9 : 1 为展开剂 ,于暗处展开 ,使各组分分离。

表 1 接种物对 PT95 菌株菌核生物量的影响

| 接种物  | 菌核干重 / g · 100 g <sup>-1</sup> ( 干料 ) |                         |                        |                        |                        |                         |                         |
|------|---------------------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
|      | 玉 米                                   | 大 米                     | 小 麦                    | 高 粱                    | 荞 麦                    | 谷 子                     | 糜 子                     |
| 菌 核  | 11.52±0.92 <sup>c1)</sup>             | 11.30±0.90 <sup>c</sup> | 6.05±0.42 <sup>c</sup> | 9.43±0.67 <sup>c</sup> | 8.50±0.68 <sup>c</sup> | 11.24±0.90 <sup>c</sup> | 10.30±0.93 <sup>c</sup> |
| 分生孢子 | 9.70±0.78 <sup>b</sup>                | 9.75±0.71 <sup>b</sup>  | 4.97±0.39 <sup>b</sup> | 7.92±0.71 <sup>b</sup> | 6.62±0.56 <sup>b</sup> | 9.05±0.71 <sup>ab</sup> | 8.19±0.65 <sup>ab</sup> |
| 菌丝体  | 8.20±0.66 <sup>a</sup>                | 7.95±0.64 <sup>a</sup>  | 3.54±0.28 <sup>a</sup> | 6.50±0.45 <sup>a</sup> | 5.20±0.37 <sup>a</sup> | 8.00±0.64 <sup>a</sup>  | 7.05±0.56 <sup>a</sup>  |

注 : 在同一列中带不同字母的数据差异显著 ( P < 0.01 )

表 2 接种量对 PT95 菌株菌核生物量的影响

| 接种量 / mg | 菌核干重 / g · 100 g <sup>-1</sup> ( 干料 ) |                          |                         |                          |                         |                          |                          |
|----------|---------------------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
|          | 玉 米                                   | 大 米                      | 小 麦                     | 高 粱                      | 荞 麦                     | 谷 子                      | 糜 子                      |
| 5        | 11.03±0.88 <sup>a</sup>               | 10.60±0.84 <sup>a</sup>  | 5.30±0.37 <sup>a</sup>  | 8.85±0.63 <sup>a</sup>   | 7.90±0.63 <sup>a</sup>  | 10.70±0.85 <sup>a</sup>  | 9.60±0.86 <sup>a</sup>   |
| 10       | 11.52±0.92 <sup>a</sup>               | 11.30±0.90 <sup>a</sup>  | 6.05±0.42 <sup>a</sup>  | 9.43±0.67 <sup>a</sup>   | 8.50±0.68 <sup>a</sup>  | 11.24±0.90 <sup>a</sup>  | 10.30±0.93 <sup>a</sup>  |
| 15       | 11.87±0.95 <sup>a</sup>               | 11.73±0.84 <sup>ab</sup> | 6.62±0.52 <sup>ab</sup> | 10.05±0.90 <sup>ab</sup> | 8.95±0.75 <sup>ab</sup> | 11.85±0.93 <sup>ab</sup> | 10.95±0.86 <sup>ab</sup> |
| 20       | 12.27±0.98 <sup>ab</sup>              | 12.20±0.97 <sup>ab</sup> | 6.95±0.55 <sup>ab</sup> | 10.76±0.75 <sup>b</sup>  | 9.40±0.66 <sup>b</sup>  | 12.30±0.98 <sup>b</sup>  | 11.45±0.91 <sup>b</sup>  |

根据以上结果 ,在下面的研究中选择菌核为接种物 ,接种量确定为每瓶 20 mg。

2.2 谷物培养基对 PT95 菌株菌核生物量和类胡萝卜素产率的影响

1.8 β-胡萝卜素的测定

按参考文献 6 的方法进行。

1.9 统计学处理

实验结果表达为平均值 ± 标准差 ,用 Duncan 多重比较法<sup>[8]</sup>进行多个均数间两两比较的显著性检验。

2 实验结果

2.1 接种方式和接种量对 PT95 菌株菌核生物量和类胡萝卜素含量的影响

从表 1 可以看出 ,无论在哪一种培养基上 , 3 种接种物对 PT95 菌株的菌核生物量有着不同的影响。用菌核作为接种物比用分生孢子或菌丝体作为接种物具有更好的效果 ,菌丝体的效果最差。然而 ,接种物对菌核中的类胡萝卜素含量没有明显的影响。为了检查接种量的影响作用 ,分别配制不同浓度的菌核悬液 ,接入三角瓶中 ,使每瓶中的接种量达到 5 mg、10 mg、15 mg 和 20 mg。结果表明 ,接种量能显著影响 PT95 菌株的菌核生物量 ,不论在哪一种培养基上都是这样。随着接种量的增加 ,菌核生物量也在增加 ,接种量为 20 mg 的三角瓶中收获的菌核生物量最高( 见表 2 )。同样 ,接种量对菌核中的类胡萝卜素含量没有明显的影响。

在 7 种谷物培养基上 ,PT95 菌株的菌核生物量和菌核中的类胡萝卜素含量都有较大的差异( 表 3 )。谷子培养基上菌核生物量最高 ,依次是玉米、大米、糜子、高粱、荞麦和小麦。荞麦

培养基上菌核中的类胡萝卜素含量最高 ,依次是谷子、小麦、高粱、糜子、玉米和大米。由于固态发酵的类胡萝卜素产率同时受菌核生物量和菌核中的类胡萝卜素含量的影响 ,谷物培养基既然对 PT95 菌株的菌核生物量和类胡萝卜素含量都有明显的影响 ,那么必然对类胡萝卜素产率也有明显的影响。为此 ,分别计算并比较了各种培养基上的类胡萝卜素产率 ,结果表明 ,小麦培养基上的类胡萝卜素产率最低 ,只有 4 928  $\mu\text{g}/100\text{g}$  (干料) ;谷子培养基上的类胡萝卜素产率最高 ,达到 9 877  $\mu\text{g}/100\text{g}$  (干料)。

2.3 添加麸皮对 PT95 菌株菌核生物量和类胡萝卜素产率的影响

用 5 g 麸皮代替培养基中的 5 g 谷粒 ,使培养基中的麸皮与谷粒的干重比达到 1 : 4 ,即在培养基中添加 20 % 的麸皮 ,结果导致了菌株菌核生物量的显著增加 ,但对菌核中的类胡萝卜素含量没有明显的影响(表 4) 。添加麸皮以

后 ,大米培养基上的菌核生物量最高 ,达到 15.10 g/100 g (干料) ,依次是玉米、谷子、糜子、高粱、荞麦和小麦 ,荞麦培养基上菌核中的类胡萝卜素含量最高 ,达到 826  $\mu\text{g}/\text{g}$  (干菌核) ;谷子培养基上的类胡萝卜素产率最高 ,达到 11 457  $\mu\text{g}/100\text{g}$  (干料)。

2.4 谷物培养基对 PT95 菌株类胡萝卜素成分的影响

韩建荣等<sup>[6]</sup>在以前的研究中证明 ,PT95 菌株的菌核中积累的类胡萝卜素由 2 种色素成分组成 ,其中  $\beta$ -胡萝卜素占色素总量的 71 %。薄层色谱分析表明 ,在本实验条件下 ,从不同谷物培养基上培养得到的菌核中积累的类胡萝卜素同样是由 2 种色素成分组成 ,不过各色素样品中的  $\beta$ -胡萝卜素的百分含量略有差异(表 3) 。培养基里添加麸皮对菌核中的  $\beta$ -胡萝卜素的百分含量亦无明显影响(表 4)。

表 3 谷物培养基对 PT95 菌株菌核生物量和类胡萝卜素产率的影响

| 培养基 | 菌核干重                                     | 类胡萝卜素含量                                   | $\beta$ -胡萝卜素含量 | 类胡萝卜素产率                                     |
|-----|--|---|-----------------|---|
|     | / $\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ (干料) | / $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (干菌核) | / %             | / $\mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ (干料) |
| 玉 米 | 12.27 c                                  | 542 a                                     | 71 a            | 6650 b                                      |
| 大 米 | 12.20 c                                  | 540 a                                     | 70 a            | 6588 b                                      |
| 小 麦 | 6.95 a                                   | 709 b                                     | 69 a            | 4928 a                                      |
| 高 粱 | 10.76 b                                  | 687 b                                     | 69 a            | 7392 c                                      |
| 荞 麦 | 9.40 b                                   | 818 c                                     | 68 a            | 7689 d                                      |
| 谷 子 | 12.30 c                                  | 803 c                                     | 70 a            | 9877 e                                      |
| 糜 子 | 11.45 bc                                 | 585 a                                     | 70 a            | 6698 b                                      |

表 4 添加麸皮对 PT95 菌株菌核生物量和类胡萝卜素产率的影响

| 培养基 | 菌核干重                                     | 类胡萝卜素含量                                   | $\beta$ -胡萝卜素含量 | 类胡萝卜素产率                                     |
|-----|--|---|-----------------|---|
|     | / $\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ (干料) | / $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (干菌核) | / %             | / $\mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ (干料) |
| 玉 米 | 15.02 c                                  | 518a                                      | 71 a            | 7780b                                       |
| 大 米 | 15.10c                                   | 547 a                                     | 70 a            | 8260 bc                                     |
| 小 麦 | 9.12a                                    | 694 b                                     | 69 a            | 6329 a                                      |
| 高 粱 | 13.15bc                                  | 644 b                                     | 69 a            | 8469bc                                      |
| 荞 麦 | 11.02b                                   | 826 c                                     | 68 a            | 9103 c                                      |
| 谷 子 | 14.86c                                   | 771 c                                     | 70 a            | 11457 d                                     |
| 糜 子 | 13.32bc                                  | 570 a                                     | 70 a            | 7592 b                                      |

3 讨 论

一般来说 ,氧气供应是固态发酵过程中必须解决的问题<sup>[9]</sup>。本实验中添加麸皮可以适当增加谷粒之间的空隙 ,因而也就增加了氧气在培养基中的渗透。至于应该添加多大比例的

麸皮才能使固态发酵的效果最佳 ,或者说才能获得最高的菌核生物量 ,还需做进一步的研究。培养基底物颗粒的大小直接影响到单位体积反应表面积 ,也会影响颗粒间菌体的生长、氧的供应等<sup>[10]</sup> ,所以对于固态发酵过程 ,选择合适大小的基质颗粒是十分必要的。研究中 ,尽管对

各种谷粒做了粉碎处理,但只选择了一种筛分进行固态发酵实验,今后似有必要对其他筛分也进行同样的比较实验,以选择最佳的颗粒大小。

大多数青霉菌株都具有极强的产孢子能力。PT95 菌株在多种固态培养基上,尤其在天然培养基或半合成培养基上,在形成大量菌核的同时,亦能形成大量的分生孢子<sup>[5,6]</sup>。理想的情况是,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是非常有利的。也就是说应该尽可能创造满足菌核分化需要,抑制分生孢子产生的固态发酵条件。实验中以菌核作为接种物比分生孢子或菌丝体作为接种物具有更好的效果,这与在固态培养基里几乎没有分生孢子的形成有很大关系。至于为什么菌核接种物在各种谷粒培养基上能抑制分生孢子的产生而有利于菌核分化,有待进一步探讨。

#### 参 考 文 献

1 An G H, Schuman D B, Johnson E A. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxan-

thrin [J]. Appl Environ Microbiol, 1989, 55: 116 ~ 124  
 2 Mehta B J, Salgado L M, Bejarano E R et al. New mutants of *Phycomyces blakesleeanus* for  $\beta$ -carotene production [J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63: 3657 ~ 3661  
 3 Vandamme E J. Production of vitamins, coenzymes and related biochemicals by biotechnological processes [J]. J Chem Technol Biotechnol, 1992, 53: 313 ~ 327  
 4 张素琴, 朱湘民, 马国华. 一株胡萝卜素高产菌 Cr-1 的研究 [J]. 食品与发酵工业, 1989(5): 1 ~ 5  
 5 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 [J]. 微生物学通报, 1998, 25(6): 319 ~ 321  
 6 韩建荣, 徐 军. 青霉 PT95 菌株固态发酵产生类胡萝卜素的研 究 [J]. 微生物学报, 1999, 39(2): 148 ~ 153  
 7 王业勤, 李勤生. 天然类胡萝卜素研究进展、生产、应用 [M]. 北京: 医药科技出版社, 1997  
 8 杜荣寿. 生物统计学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1985  
 9 Abdullah A L, Tengerdy R P, Murphy V G. Optimization of solid substrate fermentation of wheat straw [J]. Biotechnol Bioeng, 1985, 27: 20 ~ 27  
 10 Auria R, Morales M, Villegas E et al. Influence of mold growth on the pressure drop in aerated solid state fermento [J]. Biotechnol Bioeng, 1993, 41: 1007 ~ 1013

## Solid-state Fermentation of Grains for Carotenoid Production

Xu Jun Cui Lixia Han Jianrong

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

**ABSTRACT** Various grains and inocula were investigated for carotenoid production by solid-state fermentation using *Penicillium* sp. PT95. The millet medium was more effective to the sclerotia growth of strain PT 95 and carotenoid production than other grain media. An inoculum in the form of sclerotium may obtain higher sclerotia biomass than either a spore inoculum or a mycelial pellet inoculum. Supplementing wheat bran to grain medium favored the formation of sclerotia. However, neither the inoculum type nor the supplementing of wheat bran resulted in a significant change in content of carotenoid in sclerotia. The effect of wheat brain in grain media with the ratio of wheat bran to grain 1:4 (w/w, dry basis) was investigated. It is indicated that the medium consisting of rice and wheat bran gave the highest sclerotia biomass (15.10 g/100 g grain); the medium consisting of buckwheat and wheat bran gave the highest content of carotenoid in sclerotia (826  $\mu$ g/g dry sclerotia) and the medium consisting of millet and wheat bran gave the highest carotenoid yield (11457  $\mu$ g/100g grain).

**Key words** *Penicillium* sp., grain medium, solid-state fermentation, carotenoid yield, sclerotia biomass