

一株产白藜芦醇真菌的分离及培养*

唐永红^{1,2}, 姚茂君², 曹庸^{2,3}, 卢成英², 黄早成²

1(吉首大学生物资源与环境科学学院, 湖南吉首, 416000) 2(湖南省林产化工工程重点实验室, 湖南张家界, 427000)

3(华南农业大学食品学院, 广东广州, 510642)

摘要 在虎杖组织培养过程中分离出1株真菌, 对其发酵液提取物进行TLC和HPLC分析证明, 该菌株能产生白藜芦醇, 并对其培养条件及白藜芦醇积累特性进行了初步研究。结果表明, 培养时间、温度、pH值、接种量对白藜芦醇积累均有较大影响。通过单因素和正交试验得到最佳培养条件为: 20 g/L 蔗糖、2 g/L NH_4NO_3 、自然pH值(6.8~7.0)、温度为28℃、培养时间7 d、接种量为培养基装液量的10%, 转速100 r/min, 其白藜芦醇含量约为39.58 $\mu\text{g/L}$ 。

关键词 白藜芦醇, 真菌, 分离, 培养条件, 积累特性

白藜芦醇(resveratrol)是一种重要的植物抗毒素, 可广泛应用于医药、食品、化妆品等行业, 对人类健康的大致肿瘤和心脏病的治疗和预防有明显的作及多种保健功效, 日益引起人们的关注。目前国内外制备白藜芦醇主要有植物提取法^[1]、生物发酵法或转基因法^[2]、化学合成法^[3]。

目前制约白藜芦醇工业化发展的关键问题在于植物体中的含量较低^[2], 且植物生长缓慢, 资源短缺, 生产成本过高。因此, 寻找白藜芦醇新资源并提高其含量尤为重要。作者在虎杖组织培养过程中分离出1株能产白藜芦醇的真菌, 并对其培养条件及白藜芦醇积累特性进行了初步研究。结果表明, 可以通过微生物发酵生产白藜芦醇, 从而彻底摆脱依赖栽培, 破坏资源的困境。

1 材料与方 法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 材 料

新鲜虎杖, 采自吉首大学张家界校区。

1.1.2 培养基

PDA培养基: 去皮马铃薯200 g, 蔗糖20 g, 蒸馏水1 000 mL, pH值6.7。

1.1.3 试 剂

乙腈, 甲醇, 乙酸乙脂, HCl, 甘氨酸, NaOH, NaCl(均为分析纯)。硅胶G(青岛海洋化工有限公司), 白藜芦醇标准对照品(Sigma公司99%)。

1.1.4 仪 器

高效液相色谱仪(日本岛津LC-90A), 紫外分光光度计(日本岛津UV-160A), 1/10 000分析天平

(AEG-220), 人工气候箱(中国广东LRH-250GS)。

1.2 产白藜芦醇真菌的分离及鉴定

1.2.1 产白藜芦醇真菌的分离及培养^[4~7]

虎杖组织培养过程偶尔会出现大量真菌生长, 可能是因为受到虎杖内生菌的污染, 将其取样, 接入固体PDA培养基平板上进行划线分离, 经反复驯化培养和划线分离, 获得纯菌种。再将纯菌种接种液体复筛PDA培养基中, 26℃, 100 r/min条件下培养10 d, 待菌丝体长好后进行白藜芦醇提取和鉴定。

1.2.2 白藜芦醇的提取

超声波处理发酵液30 min, 以破碎细胞壁, 用乙酸乙酯(1:1)提取12 h, 静置分层, 萃取液待用, 留水层第2次用乙酸乙酯(1:0.5)提取6 h, 合并萃取液, 再用旋转蒸发仪浓缩后定容至1 mL。

1.2.3 TLC层析鉴定

硅胶G板: 自制, 硅胶G加入0.2%CMC-Na调匀铺板; 展开剂: V(CHCl_3): V(丙酮): V(乙酸): V水=4:4:0.5:0.2。

1.2.4 高效液相检测鉴定

C_{18} 反向硅胶柱(Dikma 250 mm×4.6 mm)恒速洗脱, 流速1 mL/min, 流动相43.2%乙腈, 柱温30℃, 检测波长UV306 nm, 进样量10 μL 。

1.3 菌株生物量与白藜芦醇物质积累特征的测定

将PDA液体培养基100 mL装在250 mL三角瓶中, 接种孢子悬液于培养瓶中, 从培养时间(0、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8 d)、温度(15、20、25、30℃)、pH值(5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)、接种量(5%、10%、15%、20%)进行研究, 转速100 r/min下培养, 再测定生物量和白藜芦醇的含量。生物量的测定采用定量滤纸抽滤后称重的方法。白藜芦醇的含量用高效液相色谱法检测, 采用面积归一法计算样品的含量。

第一作者: 硕士研究生(曹庸教授为通讯作者)。

* 湖南省科技厅资助项目(03JZY3020)

收稿日期: 2006-10-12, 改回日期: 2006-11-24

1.4 温度、碳源与氮源的正交试验优化

以 PDA 培养基为基础,采用 $L_9(3^4)$ 正交表设计正交实验,因素水平安排见表 1。培养基 pH 值为 7.0,培养转速 100 r/min,7 d 后通过测定菌体生物量及白藜芦醇的含量,经方差分析得最佳培养条件。

2 结果及分析

2.1 产白藜芦真菌筛选及鉴定

2.1.1 采用 TLC 和 HPLC 进行分析筛选

按照“培养-分离单菌落-初筛-复筛”的方法,在虎杖组织培养过程中分离出大量真菌。TLC 初步分析结果显示,编号 B-39 发酵提取物出现了与对照品迁移率($R_f=0.45$) 相同、荧光颜色一致的斑点,初步判断可能产白藜芦醇。为进一步证实真菌 B-39 能产白藜芦醇,采用 HPLC 对该菌发酵提取物进行分析检测。在上述设定条件下,标准品白藜芦醇 $R_t=4.908$ min,样品峰白藜芦醇 $R_t=4.910$ min,而标准品+样品的白藜芦醇的吸收峰 $R_t=4.911$ min,样品峰与对照品峰的保留时间一致,进一步可判断真菌 B-39 能产白藜芦醇。

2.1.2 真菌 B-39 的形态特征

菌落为规则的圆形,有白边,蓝绿色,绒状,有的略显絮状,有明显的放射状沟纹;有渗出液,无特殊气味;反面亮黄至暗黄色。菌丝交织分布,有菌隔,分生孢子椭圆形,(2~4)×(2.8~2.5)μm,常有孢子粘附在菌丝上;分生孢子梗(150~350)×(3~3.5)μm,光滑;帚状枝非对称,有的很复杂,自主轴作 2~3 次分枝,副枝长短不等;梗基(10~12)×(2~3)μm,小梗 4~6 个轮生。依据《常见与常用真菌》及《真菌鉴定手册》将其初步鉴定为真菌青霉属产黄青霉(*P. chrysogenum*)。

2.2 菌株生物量与白藜芦醇物质积累的特征

2.2.1 时间对菌株生长代谢的影响

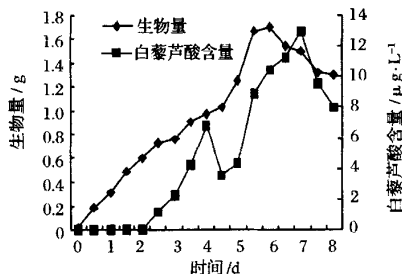


图 1 真菌 B-39 生物量及白藜芦醇累积情况

由图 1 可知,培养 5.5 d 后其生物量即可达最

大,6.5 d 后开始下降,可能随着培养时间的延长菌体出现自溶所致。2.5 d 后培养液中开始有白藜芦醇物质的积累。7 d 达到最大,因此将振荡培养时间定为 7 d。

2.2.2 温度对菌株生长代谢的影响

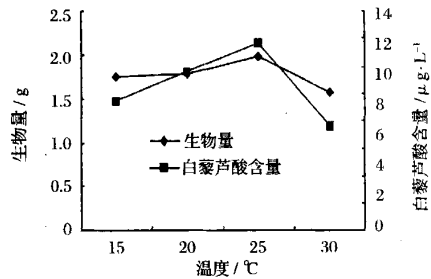


图 2 温度对真菌 B-39 生长与白藜芦醇累积的影响

由图 2 可知,真菌 B-39 在试验所选取的温度下都能正常生长,但温度对菌株白藜芦醇积累的影响非常显著。在 15~25 °C,温度越高越适合白藜芦醇的积累,25 °C 时达到最适积累温度,菌体湿重也最大;随后,温度的升高白藜芦醇的积累明显减小。低温或高温对菌体生长及次生代谢产物的积累均有一定的抑制作用。

2.2.3 pH 值对菌株生长代谢的影响

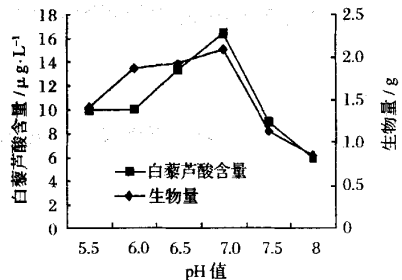


图 3 pH 值对真菌 B-39 生长与白藜芦醇累积的影响

由图 3 可知,pH 值对真菌 B-39 菌株的生长速度与目的产物的积累有明显影响。pH 值 7.0 菌株的生物量与白藜芦醇的积累都达最大值,略偏酸性的培养条件比略偏碱性的培养条件更利于真菌 B-39 的生长与目的产物的积累,因此在培养过程中选择自然的 pH 值(6.8~7.0)。

2.2.4 接种量对菌株生长代谢的影响

由图 4 可知,接种量为 10 % 时,菌体生长快速,生物量最大,同时白藜芦醇的积累量也最大,15 % 的接种量其次,5 % 和 20 % 的接种量最低。接种量的大小决定于产生菌种在锥形瓶中生长繁殖的速度。采用较大的接种量可以缩短锥形瓶中菌丝繁殖到最

大高峰的时间,使产物形成提前到来。但是,如果接种量过多,往往会使菌体生长过快、培养液粘度增加,造成溶氧不足,而影响产物的合成。

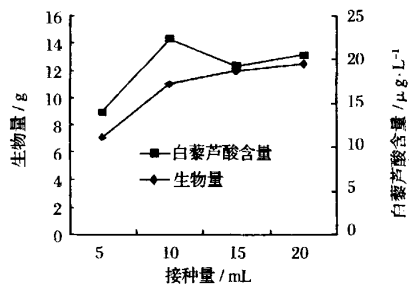


图4 接种量对真菌 B-39 生长与产白藜芦醇累积的影响

2.3 温度、碳源与氮源优化结果

由表 1 可知,以生物量为指标,各因素的影响大小次序是 $R_B > R_A > R_C$,最佳条件为 $A_3B_3C_3$ 。以白藜芦醇含量为指标,各因素的影响大小次序是 $R_{A'} > R_{B'} > R_{C'}$,最佳条件为 $A_3B_3C_3$ 。通过进一步的方差分析(表 2、表 3)可知,影响生物量的显著性因素是因素 B,影响白藜芦醇含量的显著性因素是因素 A、因素 B,而因素 C 在 2 种指标中均不显著。虽然在直观分析中,生物量与白藜芦醇含量的最佳条件均为 $A_3B_3C_3$,且均为在 9 次实验中,但氮源在 2 种指标均为非显著性因素,影响较小。因此,依照 2 种指标同时提高的原则下,确定 $A_3B_3C_2$ 为最佳培养条件。

表 1 正交试验结果直观分析表

试验号	因素			生物量 /g	白藜芦醇含量 / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
	温度 A / $^{\circ}\text{C}$	碳源 B / $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	氮源 C / $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$		
1	1 (20)	1 (淀粉)	1 (硫酸铵)	3.181	25.06
2	1 (20)	2 (蔗糖)	2 (硝酸铵)	2.698	23.58
3	1 (20)	3 (葡萄糖)	3 (蛋白胨)	4.048	30.67
4	2 (24)	1 (淀粉)	2 (硝酸铵)	2.745	29.88
5	2 (24)	2 (蔗糖)	3 (蛋白胨)	2.863	27.59
6	2 (24)	3 (葡萄糖)	1 (硫酸铵)	3.990	30.31
7	3 (28)	1 (淀粉)	3 (蛋白胨)	3.243	35.27
8	3 (28)	2 (蔗糖)	1 (硫酸铵)	2.954	27.85
9	3 (28)	3 (葡萄糖)	2 (硝酸铵)	4.554	39.58
k_1	3.309	3.056	3.375	$R_B > R_A > R_C^{[1]}$	
k_2	3.199	2.838	3.332		
k_3	3.584	4.197	3.385		
R	0.385	1.359	0.053		
k_1'	2.644	3.007	2.774	$R_{A'} > R_{B'} > R_{C'}^{[2]}$	
k_2'	2.926	2.634	3.101		
k_3'	3.423	3.352	3.118		
R'	0.779	0.718	0.344		

注:[1]为各因素对生物量的影响,[2]为各因素对白藜芦醇量的影响。

表 2 生物量方差分析表

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	临界值	显著性
SV	SS	DF	MS			
A	0.235	2	0.118	1.754	$F_{0.01}(2,2)=99.000$	
B	3.196	2	1.598	23.851	$F_{0.05}(2,2)=19.000$	*
C	0.005	2	0.003	0.037		
误差	0.13	2	0.065			
总和	3.566	8				

表 3 白藜芦醇含量方差分析表

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	临界值	显著性
SV	SS	DF	MS			
A	0.935	2	0.467	34.630	$F_{0.01}(2,2)=99.000$	*
B	0.774	2	0.387	28.667	$F_{0.05}(2,2)=19.000$	*
C	0.226	2	0.113	8.370		
误差	0.03	2	0.015			
总和	1.965	8				

3 讨论

从真菌的分离和筛选过程来看,真菌具有一定的多样性,利用真菌来生产与植物所产相同或相似的生理活性物质具有可能性,只是目前所分离到的真菌合成天然活性物质的量很少,有待于利用现代生物技术手段改造菌种,优化发酵条件及在培养物中添加前体物质等方法来提高其有效成分的产量。

综合研究结果,作者认为优化后真菌 B-39 的最佳培养条件为 20 g/L 葡萄糖、2 g/L NH_4NO_3 、28 $^{\circ}\text{C}$ 、自然 pH 值(6.8~7.0),接种量为 10%,转速为 100 r/min。虽然优化后的白藜芦醇含量 39.58 $\mu\text{g}/\text{L}$ 有些偏低,还需进一步提高其含量。但真菌 B-39 生长速度快,培养条件宽松,成本低,为药用保健品、食品添加剂等行业开辟了一条生产白藜芦醇的新途径,提供了更为广阔的廉价资源,并为进一步扩大生产奠定了基础。

参 考 文 献

1 江 曙,朱蓉蓉,张 芳,等.虎杖中白藜芦醇提取方法及工艺的优化[J].南京中医药大学学报,2006,22(3):197~199

2 谭 琳,康由发,马兵刚,等.芪合酶基因转化番茄产生白藜芦醇的研究[J].生命科学研究,2003,7(3):262~266

3 郑乾刚,方志杰,高军峰,等.白藜芦醇的药理活性及制备方法[J].化学试剂,2006,28(2):75~78

4 杨显志,张玲琪,郭 波,等.一株产长春新碱内生真菌的初步研究[J].中草药,2004,35(1):79~81

5 邵爱娟,林淑芳,张思巨,等.一种能产生紫杉醇类化合物内生真菌的分离[J].中国医学科学院学报,2001,23(6):

642~644

(2);61~64

6 曹 庸,于华忠,张 敏,等. HPLC 法测定虎杖白藜芦醇的含量及其稳定性研究[J]. 林产化学与工业,2004,24

7 张亚妮,董兆麟. 一株产紫杉醇真菌发酵条件的研究[J]. 西北大学学报(自然科学版),2002,32(3):310~312

Study on the Isolation and Culture of a Resveratrol -producing Fungus

Tang Yonghong^{1,2}, Yao Maojun², Cao Yong^{2,3}, Lu Chengying², Huang Zaocheng²

1(College of Biological Resources and Environmental Sciences, Jishou University, Jishou, Hunan 416000, China)

2(Key Laboratory for Forest Products and Chemical Industry Engineering of Hunan, Zhangjiajie, Hunan 427000, China)

3(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

ABSTRACT A fungus was separated from the tissue cultural processes of *Polygonum cuspidatum* and the zymotic extracts were analyzed by TLC and HPLC. We found that the fungus which is B-39 can produce resveratrol. The cultural optimum conditions and the resveratrol-accumulating characteristics were studied and the results showed that the cultural time, temperature, pH and inoculums had more influence among other factors. The optimization of cultural substrates and conditions were suggested by one- factor and orthogonal tests that the optimum cultural substrates were: saccharine 20 g/L, NH_4NO_3 2 g/L, the optimum cultural conditions were: pH 6.8~7.0, 28 °C, 7 d, initial inoculums 10 %, rotational speed 100 r/min and the content of resveratrol in the fungus was determined as 39.58 $\mu\text{g/L}$ by HPLC.

Key words resveratrol, fungi, isolation, cultural conditions, accumulating characteristics

政
策
法
规
标
准

葡萄酒新标准由推荐性改强制性

经过修订的葡萄酒国家标准将于2008年1月1日起在生产领域实施,并由推荐性国家标准改为强制性国家标准。本次修订新增加了按含糖量对葡萄酒进行的分类。

根据行业的普遍要求,修订后的标准由推荐性标准改为强制性标准,以规范葡萄酒产品市场,提高此类产品质量水平。对于业界普遍关注的年份葡萄酒、品种葡萄酒和产地葡萄酒,新标准即《葡萄酒》(GB15037—2006)给出了定义,并按色泽将葡萄酒分为白葡萄酒、桃红葡萄酒和红葡萄酒;按含糖量将葡萄酒分为干葡萄酒、半干葡萄酒、半甜葡萄酒和甜葡萄酒;按 CO_2 含量将葡萄酒分为平静葡萄酒和起泡葡萄酒。

根据标准,干葡萄酒是指含糖(以葡萄糖计) $\leq 4\text{g/L}$,或者当总糖与总酸(以酒石酸计)的差值 $\leq 2\text{g/L}$ 时含糖最高为 9g/L 的葡萄酒;半干葡萄酒是指含糖大于干葡萄酒,最高为 12g/L ,或者当总糖与总酸的差值 $\leq 2\text{g/L}$ 时含糖最高为 18g/L 的葡萄酒。半甜葡萄酒是指含糖量 $>$ 半干葡萄酒,最高为 45g/L 的葡萄酒;甜葡萄酒是指含糖 $>45\text{g/L}$ 的葡萄酒。平静葡萄酒是指在 20°C 时 CO_2 压力 $<0.05\text{MPa}$ 的葡萄酒;起泡葡萄酒是指在 20°C 时 $\text{CO}_2 \geq 0.05\text{MPa}$ 的葡萄酒。新标准还将特种葡萄酒纳入规范之列,特种葡萄酒是用鲜葡萄或葡萄汁在采摘或酿造工艺中使用特定方法酿制而成的葡萄酒,包括利口葡萄酒、葡萄酒、冰葡萄酒、贵腐葡萄酒、产膜葡萄酒、加香葡萄酒、低醇葡萄酒、脱醇葡萄酒和山葡萄酒9种。值得注意的是,新标准的“术语和定义”属强制性条款,其含义如年份葡萄酒的年份必须是指葡萄采摘的年份,甜葡萄酒必须是含糖量 $>45\text{g/L}$ 的葡萄酒等。

原葡萄酒标准为1994年发布的推荐性国家标准。新标准改为强制性标准并增加了根据含糖量进行的分类和感官分级评价的描述。卫生指标按强制性国家标准《发酵酒卫生标准》执行,总酸以实测值表示,还增加了柠檬酸、铜、甲醇、防腐剂限量指标以及净含量的要求。新标准要求,所有产品中均不得添加合成的着色剂、甜味剂、香精、增稠剂。理化指标属强制性条款,共有酒精度、总糖、干浸出物、挥发酸、柠檬酸、 CO_2 、铁、铜、甲醇、苯甲酸或苯甲酸钠、山梨酸或山梨酸钾11项指标。

新标准将葡萄酒分为优、优良、合格、不合格和劣质品5个等级,分级的要求在资料性附录中,不属于强制性条款。有关人士表示,2008年1月1日后,凡在保质期以内的葡萄酒,允许在市场上销售。