

微生物诱导子对青霉 PT95 菌株菌核生物量和类胡萝卜素产率的影响

韩建荣* 黄登宇 刘改花

(山西大学生命科学系,太原 030006)

关键词 微生物诱导子,菌核生物量,类胡萝卜素产率,青霉

中图分类号 Q939.5 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)03-0369-04

菌核是许多丝状真菌形成的一种休眠体。我们从土壤分离到一株经鉴定属于 *Penicillium thomii* series 的 PT95 青霉菌株,该菌株能在固态培养基上形成大量坚硬的砂粒状的菌核(直径约 300 μ m)。PT95 菌株的菌核与众不同之处在于可以积累以 β -胡萝卜素为主的类胡萝卜素^[1]。菌核的形成,除了遗传因素外,还受多种因素影响,例如生长环境中的温度、水势(Water potential)、有机物成分等^[2-4]。Hawker^[5]认为对真菌的营养生长(Vegetative growth)有利的物质也对菌核生长有利。我们在以前的研究中也证实了合适的氮、碳源以及植物油的补充有利于提高 PT95 的菌核生物量^[6]。然而,菌核生物量的提高,只解决了一半问题。如果在得到大量菌核的同时,菌核中积累的类胡萝卜素含量也提高了,这样才能保证 PT95 菌株类胡萝卜素产率的提高。关于微生物类胡萝卜素代谢的生物诱导,可以找到大量的文献报道,例如三孢酸(Trisporic acid)能刺激 *Blakeslea trispora*、*Choanephora cucurbita* 等微生物的类胡萝卜素代谢。 β -芷香酮(β -Ionone)能显著提高 *Phycomyces blakesleeana* 的类胡萝卜素产量。另一方面,已见有关微生物诱导子(Elicitor)及其被用于在植物细胞悬浮培养中提高次生代谢物的产量的研究报告^[7-9]。我们在本项工作中选择和制备了 6 种微生物诱导子,并研究分析它们在固态培养条件下对青霉 PT95 菌株菌核生物量和类胡萝卜素产率的影响。

1 材料和方法

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;共选择 6 种微生物用来培养制备诱导子:粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)、紫红曲霉(*Monascus purpureus*)由山西省生物研究所提供,保存在马铃薯葡萄糖琼脂斜面上;掷孢酵母(*Sporobolomyces roseus*)、深红酵母(*Rhodotorula rubra*)由本系张肇铭教授提供,保存在麦芽汁琼脂斜面上;诺

卡氏菌(*Nocardia* sp.)N89、游动放线菌(*Actinoplanes* sp.)A05 由本实验室分离,分别保存在营养琼脂和蛋白胨查氏琼脂斜面上。

1.2 诱导子的制备

将用来制备诱导子的 6 种微生物分别接种到相应的液体培养基中进行摇床振荡培养。其中,粗糙脉孢菌、紫红曲霉在马铃薯葡萄糖液体培养基中 25 $^{\circ}$ C 培养 7d;掷孢酵母、深红酵母在麦芽汁液体培养基中 25 $^{\circ}$ C 培养 3d;N89 在营养肉汤培养基中 28 $^{\circ}$ C 培养 5d;A05 在蛋白胨查氏液体培养基中 28 $^{\circ}$ C 培养 10d。分别收集培养好的菌体细胞,按 Ayers^[10]方法来制备诱导子。取 2g(湿重)的菌体细胞,用蒸馏水、100mmol/L 和 500mmol/L (pH7.2)的 PBS 缓冲液分别洗涤 2 次,超声破碎细胞,离心(4000r/min, 5min)收集沉淀。沉淀再用 500mmol/L (pH7.2)的 PBS 缓冲液和蒸馏水分别离心(4000r/min, 5min)洗涤 8 次,并重悬于蒸馏水中,121 $^{\circ}$ C 灭菌 20min 后,置 -20 $^{\circ}$ C 下储存备用。

1.3 诱导培养

每种诱导子在培养基中的添加量设计为梯度系列 25 μ g/mL、50 μ g/mL、75 μ g/mL、100 μ g/mL、125 μ g/mL 和 150 μ g/mL。将制备好的诱导子作不同倍数稀释后,加入到查氏琼脂培养基中,然后制成平板。以加等量无菌水的平板为对照。每个平板采用 3 点式接入 PT95 菌株,25 $^{\circ}$ C 黑暗培养 20d。所有试验均设 5 次重复。

1.4 菌核生物量测定

将 PT95 菌株在查氏平板上形成的呈橙红色菌核用自来水刮洗下来,充分冲洗干净,置 50 $^{\circ}$ C 烘干称重。

1.5 类胡萝卜素的提取及含量测定

按文献[1]的方法提取菌核中类胡萝卜素,并按文献[11]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[12]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

按文献 6 的方法进行。

1.8 统计学处理

取 5 次试验数据的均值,用 Duncan 多重比较法^[13]进行多个均数间两两比较的显著性检验。

2 结果与分析

2.1 诱导子对 PT95 菌株菌核生物量的影响

从图 1 可以看出,供试的 6 种诱导子均可使 PT95 菌株的菌核生物量有不同程度的增加。而且菌核生物量与诱导子的添加量之间有明显的正相关性,即在查氏培养基中诱导子的添加量越高,获得的 PT95 的菌核生物量越大。不难看出 4 种真菌诱导子的效果比另外 2 种放线菌诱导子的效果更好。其中,用深红酵母制备的诱导子使菌核生物量的增加幅度最大。在不加任何诱导子的对照培养基上,菌核生物量只有 558 mg/plate;而在添加深红酵母诱导子(添加量为 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的查氏培养基上,菌核生物量可以达到 919 mg/plate,增加幅度达 64.70%。对于所有供试的 6 种诱导子来说,每毫升培养基中 100 μg 的添加量足以导致 PT95 菌株的菌核生物量有显著的增加($P < 0.01$)。

2.2 诱导子对 PT95 菌株菌核中积累的类胡萝卜素含量的影响

培养基中添加的诱导子亦可影响 PT95 菌株菌核中积累的类胡萝卜素含量(图 2)。不过,各诱导子的影响作用不同。对于粗糙脉孢菌诱导子和紫红曲霉诱导子来说,较低水平的添加量(大约 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)就足以导致类胡萝卜素含量的显著增加($P < 0.01$)而其它诱导子则需要较高水平的添加量(大约 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$)才能导致相同的效果。从图 2 中还可以发现,每一种诱导子都有一个能导致最高类胡萝卜素含量的最佳用量,例如诺卡氏菌诱导子和游动放线菌诱导子的最佳用量是 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$,深红酵母诱导子和紫红曲霉诱导子的最佳用量是 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,粗糙脉孢菌诱导子和掷孢酵母诱导子的最佳用量是 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在供试的 6 种诱导子当中,紫红曲霉诱导子(添加量为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的效果最好,可使 PT95 菌株菌核的类胡萝卜素含量比对照提高 92.52%。

2.3 诱导子对 PT95 菌株类胡萝卜素产率的影响

由于 PT95 菌株的类胡萝卜素产率(即菌核生物量与类胡萝卜素含量的乘积)同时受菌核生物量和类胡萝卜素含量的影响,诱导子既然能显著提高 PT95 的菌核生物量和类胡萝卜素含量,那么必然能提高 PT95 的类胡萝卜素产率。我们分别计算并比较了 PT95 菌株在添加不同诱导子的培养基上的类胡萝卜素产率,从中选出了对应于每种诱导子的最高类胡萝卜素产率(表 1)。不难看出,每种诱导子所需要的获得最高类胡萝卜素产率的添加量与获得最高类胡萝卜素含量的最佳用量(图 2)是一致的。供试的 6 种诱导子中,紫红曲

霉诱导子效果最好。每 mL 查氏培养基中添加 100 μg 紫红曲霉诱导子,PT95 菌株的类胡萝卜素产率为 599 $\mu\text{g}/\text{plate}$,与对照相比增加了 176.04%。其次是粗糙脉孢菌诱导子,可使类胡萝卜素产率增加 151.15%。游动放线菌诱导子效果最差。

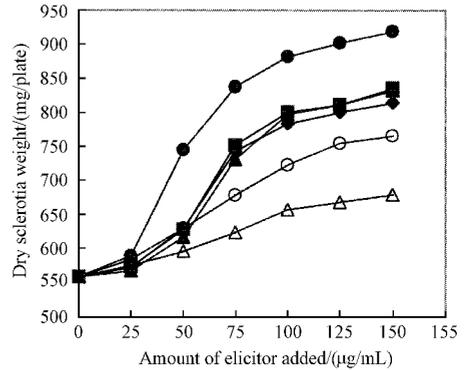


图 1 诱导子对 PT95 菌株在查氏培养基上的菌核生物量的影响

Fig.1 Sclerotia biomass of strain PT95 in the Czapek's media supplemented with various amounts of elicitors prepared respectively from *Neurospora crassa* (◆), *Monascus purpureus* (■), *Sporobolomyces roseus* (▲), *Rhodotorula rubra* (●), *Nocardia sp. N89* (△) and *Actinoplanes sp. A05* (○)

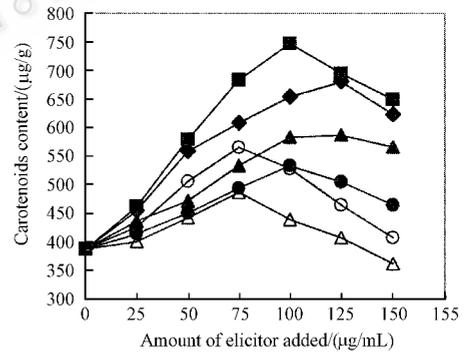


图 2 诱导子对 PT95 菌株菌核中的类胡萝卜素含量的影响

Fig.2 Carotenoids content accumulated in sclerotia of strain PT95 in the Czapek's media supplemented with various amounts of elicitors prepared respectively from *Neurospora crassa* (◆), *Monascus purpureus* (■), *Sporobolomyces roseus* (▲), *Rhodotorula rubra* (●), *Nocardia sp. N89* (△) and *Actinoplanes sp. A05* (○)

2.4 诱导子对 β -胡萝卜素在类胡萝卜素中的百分含量的影响

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 β -胡萝卜素占色素总量的 64.3%^[11]。我们希望能进一步提高 β -胡萝卜素在总色素中的百分含量,从而提高 PT95 菌株类胡萝卜素的经济价值。那么在添加不同诱导子后, β -胡萝卜素的百分含量又将如何变化呢?薄层色谱分析表明,在表 1 所有试验处理组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 -胡萝卜素的百分含量有了变化(表 2)。与对照相比,紫红曲霉诱导子对 β -胡萝卜素的百

分含量没有明显影响,其余 5 种诱导子均能显著提高 β -胡萝卜素在总色素中的百分含量 ($P < 0.01$)。虽然如此,在添加

紫红曲霉诱导子的查氏培养基上的 β -胡萝卜素产量还是要比其他处理组的高(表 2)。

表 1 PT95 菌株对应于每种诱导子的最高类胡萝卜素产率的比较

Table 1 Comparison of the highest carotenoids yield of PT95 strain among the elicitors

Origin of elicitors	Amount of elicitor added($\mu\text{g/mL}$)	Carotenoids yield($\mu\text{g/plate}$)	Increase rate of pigment yield/%
<i>Neurospora crassa</i>	125	545e*	151.15
<i>Monascus purpureus</i>	100	599f	176.04
<i>Sporobolomyces roseus</i>	125	477d	119.82
<i>Rhodotorula rubra</i>	100	470d	116.59
<i>Nocardia</i> sp. N89	75	384c	76.96
<i>Actinoplanes</i> sp. A05	75	304b	40.09
Control	0	217a	0

* Means in the same column followed by the same letter are not significantly different at the $P < 0.01$ level according to Duncan's multiple range test

表 2 诱导子对 β -胡萝卜素在类胡萝卜素中的百分含量的影响

Table 2 Effect of elisitors on the proportion of β -carotene in total pigment

Origin of elicitors	Amount of elicitor added($\mu\text{g/mL}$)	β -Carotene fraction of total pigment/%	β -Carotene yield($\mu\text{g/plate}$)
<i>Neurospora crassa</i>	125	69.5b*	379a
<i>Monascus purpureus</i>	100	64.7a	388a
<i>Sporobolomyces roseus</i>	125	70.3b	335b
<i>Rhodotorula rubra</i>	100	69.8b	328b
<i>Nocardia</i> sp. N89	75	71.0b	273d
<i>Actinoplanes</i> sp. A05	75	70.8b	215c
Control	0	64.3a	140e

* Means in the same column followed by the same letter are not significantly different at the $P < 0.01$ level according to Duncan's multiple range test

2.5 诱导子对 PT95 菌株菌落发生扇形变异的影响

许多霉菌和酵母菌的菌落都容易发生扇形变异(Sectoring)^[14],PT95 菌株也不例外。对于 PT95 这样的在菌核中积累色素的菌株来说,扇形变异的发生,特别是分生孢子扇形变异的发生,一方面降低了菌核生物量,另一方面对菌核的分离及色素的提取也是不利的。所以,诱导子对 PT95 菌株菌落发生扇形变异的影响作用必须予以考虑。通过观察,发现在添加了游动放线菌诱导子的查氏琼脂平板上分生孢子扇变区最大,而添加了紫红曲霉诱导子的查氏琼脂平板上分生孢子扇变区最小,其它平板(包括对照)上也均有扇变区出现。扇变区分生孢子的颜色没有明显差异,都是青灰色。这一方面说明紫红曲霉诱导子在减少 PT95 菌株发生扇形变异方面优于其它诱导子;另一方面亦可作为紫红曲霉诱导子为什么能导致最高的类胡萝卜素产率的原因之一。

3 讨论

由各种微生物细胞壁制成的诱导子,其成分是复杂多样的,蛋白质、糖蛋白、肽、低聚糖、类脂都可能^[15],它们都可能对 PT95 菌株菌核的生长发育和类胡萝卜素代谢有促进作用。本试验中选择的 6 种微生物包括了丝状真菌、酵母菌和放线菌,尽管各自的细胞壁成分有所不同,但有一点是清楚

的:丝状真菌和酵母菌的细胞壁中含有甲壳质葡聚糖(Chitin-glucan),放线菌的细胞壁中含有肽葡聚糖(Peptidoglycan)。图 1 表明,具有甲壳质葡聚糖的 4 种真菌诱导子的效果明显好于具有肽葡聚糖的 2 种放线菌诱导子的效果。甲壳质葡聚糖是否更有利于 PT95 菌株菌核的生长发育,尚待深入研究。

另一个问题是,为什么紫红曲霉诱导子能使 PT95 菌株获得最高的类胡萝卜素产率,却不能显著提高 β -胡萝卜素在色素中的百分含量?对此,我们还不能作出满意的解释。供试的 6 种微生物中,除紫红曲霉能够合成大量的红曲色素(Monascollavin)外,其余 5 种都具有一定的合成类胡萝卜素的能力^[16]。巧合的是,除紫红曲霉诱导子以外的 5 种诱导子均能显著提高 β -胡萝卜素在色素中的百分含量($P < 0.01$)。或许这 5 种诱导子中都含有 β -胡萝卜素合成途径中所需要的前体物质,因而导致了 β -胡萝卜素百分含量的提高。

REFERENCES(参考文献)

- [1] HAN J R(韩建荣), WANG X J(王肖娟), YUAN X E(原香娥). Studies on the production of carotenoids in sclerotia of PT95 strain of *Penicillium*. *Microbiology*(微生物学通报), 1998, 25(6): 319 ~ 321

- relationship to sclerotium formation in *Sclerotium rolfsii*. *J Gen Microbiol*, 1976, **95**: 78 ~ 86
- [3] Rawn C D. Induction of sclerotia in *Sclerotium rolfsii* by short low-temperature treatment. *J Gen Microbiol*, 1991, **137**: 1063 ~ 1066
- [4] Olaya G, Abawi G S. Effect of water potential on mycelial growth and on production and germination of sclerotia of *Macrophomina phaseolina*. *Plant Disease*, 1996, **80**(12): 1347 ~ 1350
- [5] Hawker L E. *The physiology of reproduction in fungi*, Cambridge: Cambridge University Press, 1956
- [6] HAN J R (韩建荣), XU J (徐军). Solid-state fermentation with *Penicillium* sp. PT95 for carotenoid production. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 1999, **39**(2): 148 ~ 153
- [7] Kombrink E, Hanlbrock K. Responses of cultured parsley cells to elicitors from phytopathogenic fungi. *Plant Physiol*, 1986, **81**: 216 ~ 221
- [8] CHEN Y Q (陈永勤), ZHU W H (朱蔚华), WU Y Q (吴蕴祺) et al. Effects of fungus elicitors on taxol production in suspension cells of *Taxus yunnanensis*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1999, **15**(4): 522 ~ 524
- [9] ZHANG C P (张长平), LI C (李春), YUAN Y J (元英进) et al. Effects of fungal elicitor on cell status and taxol production in cells suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairii*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2001, **17**(4): 436 ~ 440
- [10] Ayers A R, Ebel J, Valent B et al. Host-pathogen interactions. X. Fractionation and biological activity of elicitor isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Physiol*, 1976, **57**: 760 ~ 765
- [11] WANG Y Q (王业勤), LI Q S (李勤生). *Advances in natural carotenoids* (天然类胡萝卜素研究进展), Beijing: Chinese Medicinal Science and Technology Press (中国医药科技出版社), 1997
- [12] An G H, Schuman D B, Johnson E A. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Appl Environ Microbiol*, 1989, **55**: 116 ~ 124
- [13] DU R J (杜荣善). *Biological Statistics* (生物统计学). Beijing: Higher Education Press, 1985
- [14] Abdalla M H. Sectoring of fungal colonies induced by low concentration of farnesin. *Mycopathologia*, 1975, **56**: 39 ~ 40
- [15] Ebel J, Scheel D. Genes involved in plant defense, In: Boller T, Meins F (ed.). *Plant gene research*. Vienna, Austria: Springer-Verlag Wien, 1992, pp. 183 ~ 205
- [16] Goodwin T W. Carotenoids in fungi and non-photosynthetic bacteria. *Progress in Industrial Microbiology*, 1972, **11**: 31 ~ 88

Effect of Microbial Elicitors on Sclerotia Biomass and Carotenoid Yield in Surface Cultures of *Penicillium* sp. PT95

HAN Jian-Rong* HUANG Deng-Yu LIU Gai-Hua

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

Abstract Six kinds of elicitors were prepared respectively from *Neurospora crassa*, *Monascus purpureus*, *Sporobolomyces roseus*, *Rhodotorula rubra*, *Nocardia* sp. N89 and *Actinoplanes* sp. A05. When *Penicillium* sp. PT95 was incubated in Czapek's agar plates containing appropriate amounts of elicitors, both its sclerotia biomass and carotenoid content accumulated in sclerotia were enhanced significantly ($P < 0.01$). Among tested elicitors, the elicitors from the fungi *N. crassa*, *M. purpureus*, *S. roseus* and *R. rubra* were more effective than those from the actinomycetes *Nocardia* sp. N89 and *Actinoplanes* sp. A05; the elicitor from *M. purpureus* gave the highest carotenoid yield of 599 μg /plate, 2.76 times higher than that of control. Every one of elicitors except that from *M. purpureus* could increase significantly the proportion of β -carotene in total carotenoids ($P < 0.01$).

Key words microbial elicitors, sclerotia biomass, carotenoid yield, *Penicillium* sp.

Received: 11-22-2001

This work was supported by Grants from the National Natural Sciences Foundation of China (No. 30070021) and the Shanxi Province Science Foundation (No. 20001082).

* Corresponding author. Tel: 86-351-7010599; Fax: 86-351-7011981; E-mail: hanjr@swu.ict.ac.cn <http://journals.im.ac.cn>