

西红花内生真菌代谢产类胡萝卜素类发酵条件的优化

杜 艳 赵 军*

(上海师范大学 生命与环境科学学院, 上海 200234)

摘 要:以西红花(*Crocus sativus* L.)球茎中分离得到的内生真菌 Q31 作为实验材料,对其产类胡萝卜素发酵条件进行了研究.对3种碳源进行优化,发现蔗糖能促进菌体的生长和类胡萝卜素产量的积累,实验组比对照组菌丝体量增加了50.83%,类胡萝卜素产量是对照组的23.15倍.对3种氮源进行了考察,发现加硫酸铵时,菌丝体比对照组增加了86.43%,类胡萝卜素产量是对照组的5.91倍.通过正交试验,得到发酵最佳条件为:蔗糖40 g/L,硫酸铵1.0 g/L,装瓶量为100 mL/250 mL,接种量为5%.Q31菌株优化发酵,得到分子量为738,最大吸收峰为414.4和438.3 nm的稳定的类胡萝卜素代谢产物.

关键词:西红花;内生真菌;发酵优化

中图分类号:Q 935 文献标识码:A 文章编号:1000-5137(2012)04-0389-06

0 引 言

西红花(*Crocus sativus* L.)又名藏红花、番红花、撒馥兰、泊夫兰,是鸢尾科番红花属,多年生球茎草本植物^[1].具有明显的抗癌活性,几乎无毒副作用.特别是对白血病、卵巢癌、结肠癌和软组织肉瘤等都具有较强的抑制作用^[2-4].而西红花主要药效成分有西红花酸、西红花素、西红花醛,这些成分均为类胡萝卜素类物质.西红花集多种用途于一身,但由于其独特的生长特性(只能靠球茎繁殖)及环境因素造成它的资源数量极为有限^[5].

内生真菌具有合成和宿主植物相同或相似活性成分的能力,能独立产生丰富次生代谢产物.本文作者对西红花中分离到的一株内生真菌 Q31 进行了次生代谢产类胡萝卜素类物质进行了发酵条件优化.真菌具有易培养、易控制、生产成本低、生长快等优点,且不受环境因素的限制,应用前景十分广阔,对于植物来源的天然药物的新生产途径的开发及濒危药用植物的保护具有十分重要的经济及生态效益.

1 实验材料

1.1 菌 种

西红花球茎中分离得到的内生真菌,编号为 Q31,由本实验室提供.

1.2 主要试剂和培养基

葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、蛋白胨、硫酸二氢钾、硫酸铵、乙酸乙酯、甲醇等,均为分析纯.

活化培养基:2% 土豆 2% 葡萄糖,1.8% 琼脂粉,自然 pH 值.

收稿日期:2012-05-16

基金项目:上海师范大学校基金项目(DYL201102)

作者简介:杜 艳(1986-),女,上海师范大学生命与环境科学学院硕士研究生;赵 军(1968-),男,上海师范大学生命与环境科学学院副教授.

* 通信作者

种子液体培养基: 硝酸钠 0.3 g, 麦芽糖 1 g, 蛋白胨 0.5 g, 磷酸二氢钾 0.5 g, 硫酸铵 0.1 g, 七水硫酸镁 0.02 g, 蒸馏水 100 mL, pH 6.0.

液体发酵培养基: 硝酸钠 3 g, 葡萄糖 30 g, 蛋白胨 5 g, 酵母粉 5 g, 磷酸二氢钾 5 g, 硫酸铵 1 g, 七水硫酸镁 0.2 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 6.0.

2 实验方法

2.1 培养方法

平板培养: 将菌株 Q31 接种于 PDA 培养基上 28℃ 恒温培养 8 d.

液体种子培养: 将平板上活化好的菌株, 挑取 0.5 cm 的菌丝块, 接种于种子培养基中, 20℃ 下 120 r/min, 避光培养 8 d.

摇瓶培养: 将种子液按 5% 的比例, 接种于发酵培养基中, 20℃ 下 120 r/min, 避光培养 10 d.

2.2 提取方法

将培养好的发酵液倒烧杯中放冰上, 用超声细胞破碎仪破壁 30 min, 将破碎后的发酵液 3000 r/min 离心 1 min, 取上清, 菌体用蒸馏水冲洗两次, 合并上清, 即为提取液. 提取液经滤纸过滤后, 用等体积乙酸乙酯萃取 3 遍, 用旋转蒸发仪浓缩至干, 最后用 1 mL 甲醇洗脱, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, -20℃ 保存待用.

2.3 测定方法

生物量测定: 生物量以菌体干重计, 将破碎后的发酵液离心后所得的菌丝体, 50℃ 烘至恒重, 称重.

产物测定: 高效液相色谱(HPLC) 配合 DAD 检测器, WR C18 型分析柱(250 mm × 4.6 mm, 填料粒径 5 μm) 进行梯度洗脱, 条件如下: 0 min, 乙腈:水 = 90:10; 0 ~ 25 min, 乙腈 + 水(90:10):乙酸乙酯 = 0:100 保持 15 min; 40 ~ 45 min, 乙腈 + 水(90:10):乙酸乙酯 = 100:0. 检测波长: 443 nm, 流速: 1 mL/min, 进样量: 20 μL, 柱温: 30℃.

高效液相色谱/质谱联用(LC/MS) 仪, 分析柱为: Platisil ODS C18 (250 mm × 4.6 mm, 填料粒径 5 μm). 检测条件: 0 ~ 10 min, 甲酸 + 水:乙腈 = 1%:100%; 10 ~ 20 min, 甲酸 + 水:乙腈 = 1%:100%; 20 ~ 25 min, 1% 甲酸. 检测波长: 443 nm, 流速: 1 mL/min, 进样量: 20 μL, 柱温: 30℃.

3 结果与分析

3.1 碳源的选择

分别取 3% 葡萄糖、蔗糖、麦芽糖, 其他培养基成分和培养条件不变, 以不加碳源作为空白对照. 菌株 Q31 的生物量和类胡萝卜素产量见图 1. 葡萄糖和麦芽糖对菌体生长影响较小, 而蔗糖的影响相对要大些. 几种碳源对类胡萝卜素积累均有不同程度的促进作用. 其中蔗糖和葡萄糖对菌体产类胡萝卜素影响均比较明显. 综合考虑, 选取蔗糖作为最优碳源.

3.2 氮源的选择

分别取 5% 的蛋白胨、5% 酵母粉、1% 硫酸铵, 其他培养基成分和培养条件不变, 以不加氮源作为空白对照, 菌株 Q31 的生物量和类胡萝卜素产量见图 2. 如图 2 所示, 蛋白胨和硫酸铵对菌株 Q31 生长的影响较为显著, 蛋白胨、硫酸铵及酵母粉 + 硫酸铵均对菌株 Q31 产类胡萝卜素有明显促进作用, 前两者即蛋白胨和硫酸铵单独存在时, 对产类胡萝卜素的影响尤为显著, 但当两者同时存在时, 却表现出了明显的抑制作用. 综合考虑, 选取硫酸铵作为最优氮源.

3.3 正交试验

在碳源、氮源作为单一考察因素的基础上, 通过选定效果最佳的碳源和氮源, 如表 1 所示, 考察碳源、氮源、接种量、装瓶量(溶氧量) 综合对菌株产类胡萝卜素的影响.

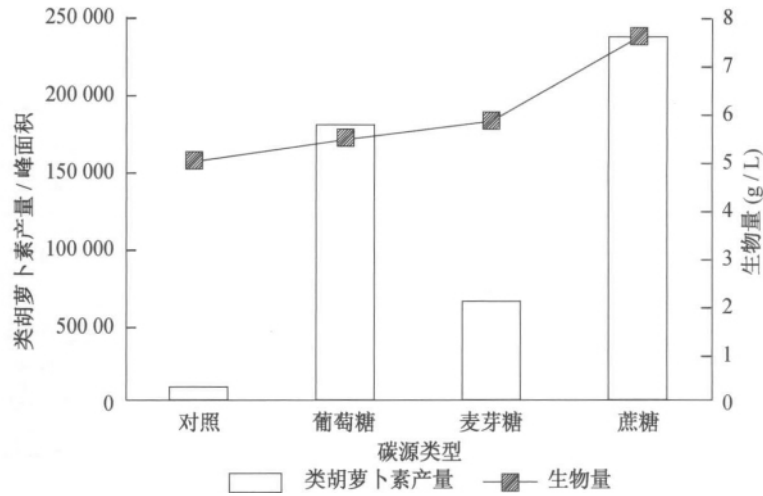


图1 碳源单因素对类胡萝卜素产量和生物量的影响

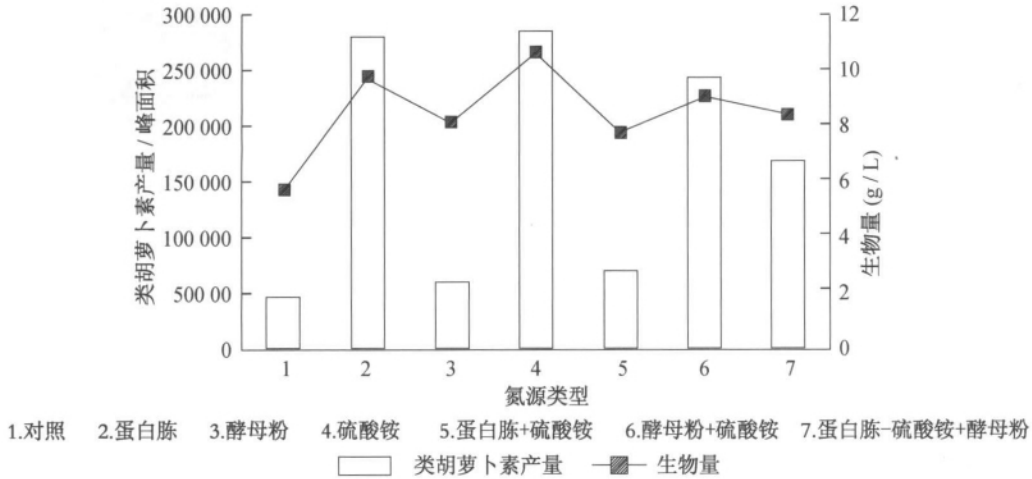


图2 碳源单因素对类胡萝卜素产量和生物量的影响

表1 $L_9(3^4)$ 正交实验因素和水平

因素	水平		
	1	2	3
A 蔗糖 ($g \cdot L^{-1}$)	20	30	40
B 硫酸铵 ($g \cdot L^{-1}$)	0.5	1	1.5
C 装瓶量 ($mL \cdot 250 mL^{-1}$)	80	100	120
D 接种量 (%)	5	10	15

对正交试验结果进行方差分析和 F 检验, 分析结果见表 2、3, 方差分析表明, 在实验选择的因素水平取值范围内, 因素 C (装瓶量) 对菌株 Q31 产类胡萝卜素均有显著影响 ($P < 0.05$). 根据类胡萝卜素产量, 由极差分析得知菌株 Q31 液态发酵产类胡萝卜素的最佳培养基配方和培养条件为: $A_3B_2C_2D_1$, 即蔗糖 $40 g/L$, 硫酸铵 $1.0 g/L$, 装瓶量为 $100 mL/250 mL$, 接种量为 5% .

表2 L18(37) Q31 产类胡萝卜素的正交试验结果

实验号 No.	实验条件				生物量($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	类胡萝卜素产量
	A	B	C	D		
1	1	1	1	1	11.78	99.80
2	1	2	2	2	13.62	140.04
3	1	3	3	3	15.21	113.08
4	2	1	2	3	14.876	125.58
5	2	2	3	1	20.77	119.67
6	2	3	1	2	8.77	93.00
7	3	1	3	2	21.49	124.40
8	3	2	1	3	9.35	116.60
9	3	3	2	1	20.26	161.42
K_1	13.537	16.050	9.967	17.603		
K_2	14.807	14.580	16.253	14.627		
K_3	17.033	14.747	19.157	13.147		
R_1	3.496	1.470	9.190	4.456		
K_1	117.640	116.593	103.133	126.963		
K_2	112.750	125.437	142.347	119.147		
K_3	134.140	122.500	119.050	118.420		
R_2	21.390	8.844	39.214	8.543		

表3 类胡萝卜素产量正交试验方差分析

因素	平均和	自由度	F	$F_{0.05}$
A	753.694	2	6.192	19.000
B	121.717	2	1.000	19.000
C	2333.760	2	19.174	19.000
D	134.617	2	1.106	19.000
误差	121.717	2		

3.4 代谢产物结果分析

菌株 Q31 代谢产物的液相图谱(图 3)显示, 22.447 min 时有明显的吸收峰, 据其紫外特征图谱(图 4)可知为明显的类胡萝卜素类物质, 最大的两个吸收峰为 414.4 和 438.3 nm 根据质谱图(图 5)可知, $Q31 [M + \text{NH}_4^{+}] = 756$, $[M + \text{Na}^{+}] = 761$, K 可求得该物质的分子量 $M = 738$.

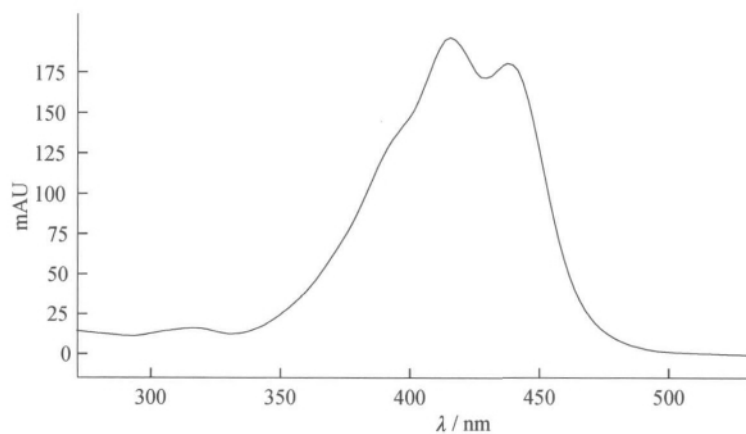


图3 Q31 代谢产物液相图谱

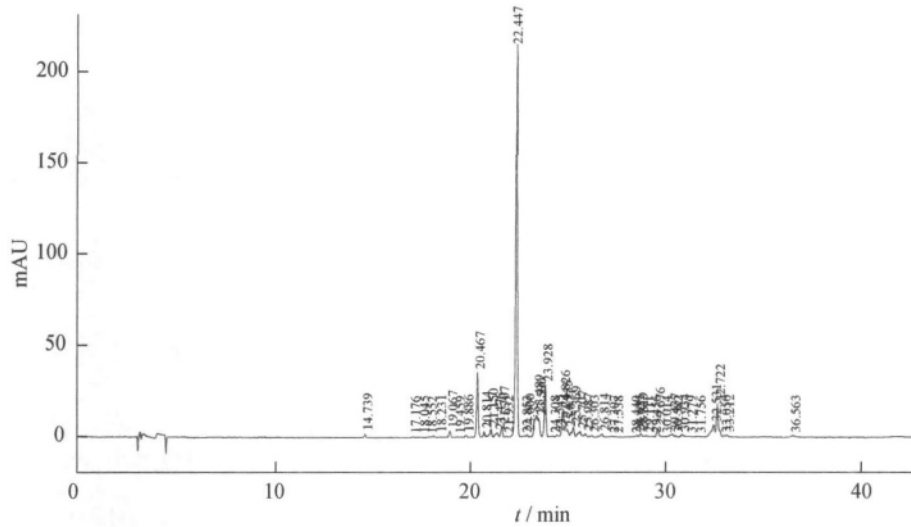


图4 Q31 代谢产物紫外特征吸收图谱

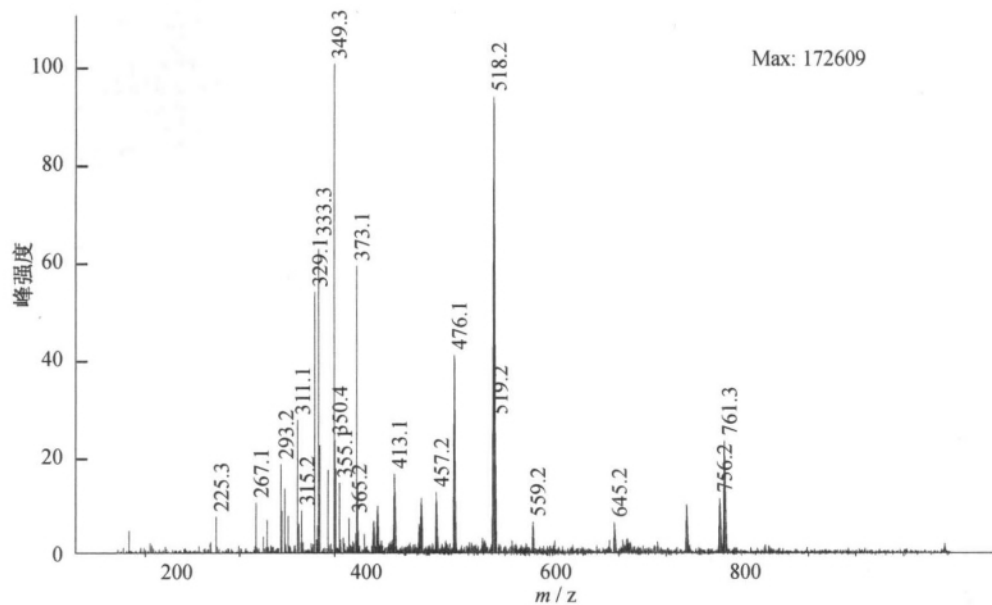


图5 Q31 代谢产物质谱图

4 结论

试验分别通过考察碳源氮源对菌株 Q31 发酵产类胡萝卜素的影响, 选择最适培养基成分, 进行正交实验, 确定出最优培养成分和条件. 并对代谢产物进行分析, 根据其分子量和紫外特征吸收图谱, 结合西红花类胡萝卜素代谢途径, 推测该物质可能是西红花有效成分代谢途径中某种药用成分的前体物, 可通过对发酵产物进一步的分离纯化, 分析确定其结构, 很有可能是代谢途径中的某一物质, 也可能是一种新型的化合物.

通过微生物发酵的方法来寻找重要药用成分, 可以说是一种不会枯竭的药物来源. 无论从生态还是经济的观点看, 微生物来源将代替对药用植物的依赖. 而近年基因工程与遗传、发酵相结合的方法也越来越多地应用到微生物改造中, 因此通过微生物发酵来提高寄主活性成分或得到寄主活性成分类似物, 来满足日益增长的临床需要, 具有很好的应用价值和广阔的应用前景.

参考文献:

- [1] 成都中医学院. 中药鉴定学[M]. 上海: 上海人民出版社, 1997.
- [2] 陈琼, 顾仁樾, 周端. 西红花对冠心病心绞痛患者血流变学的作用[J]. 辽宁中医杂志, 1997, 24(8): 372-373.
- [3] NAIR S C, KURUMBOOR S K, HASEGAWA J H. Saffron chemoprevention in biology and medicine: a review[J]. Cancer Biotherapy, 1995, 10(4): 257-264.
- [4] WANG C J, CHENG T C. Inhibition of protein kinase C and proto-oncogene expression of crocetin in NIH/3T3 cells [J]. Molecular Carcinogen, 1996, 17(4): 235-240.
- [5] 黄守印. 番红花组织培养简报[J]. 植物生理学通讯, 1987(6): 17-19.

Fermentation conditions optimization of secondary metabolites of *crocus sativus* L in endophytic fungi

DU Yan, ZHAO Jun*

(College of Life and Environment Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

Abstract: In this paper, endophytic fungi isolated from corm of saffron were selected. Strains Q31 fermentation conditions on production of carotenoids were studied. Three kinds of carbon sources were selected. Study found that sucrose could promote cell growth and carotenoid accumulation and amount of mycelium had an increase of 50.83% in the experimental group than the control group. Carotenoid yield was 23.15 times of the control group. Select three kinds of nitrogen and cross-combinations between them, found that add ammonium sulfate, mycelium of experimental group had an increased of 86.43% than the control group and carotenoid yield was 5.91 times of the control group. The optimal conditions was found by orthogonal test: sucrose 40 g/L, ammonium sulfate 1.0 g/L, bottling amount 100 mL/250 mL, inoculum size 5%. By using LC-MS to analyze secondary metabolites of endophytic fungi Q31 from saffron, we found it could steady metabolize one kind of carotenoid, its peak time was 22.447 min, maximum absorption peaks were 414.4 and 438.3 nm, MW was 738.

Key words: *Crocus sativus* L; endophytic fungi; fermentation optimization

(责任编辑: 顾浩然)