

新西兰青霉(*Penicillium novae-zeelandiae*) 红色素的发酵条件优化及组分分析

闫越, 张永梅, 李平, 王海磊

(河南师范大学 生命科学院, 河南 新乡 453007)

摘要:对新西兰青霉(*Penicillium novae-zeelandiae*)红色素的发酵条件进行优化,并对其组分进行初步分析. 研究表明,新西兰青霉红色素的最佳发酵条件是:用1 mL的接种量(孢子悬液浓度为 2×10^7 mL⁻¹)接种于300 mL的初始pH为6.0的PD培养基内(葡萄糖质量浓度为18 g·L⁻¹),30℃ 150 r·min⁻¹振荡培养40 h,之后将其静置于30℃的培养箱内进行培养. 经过优化后,红色素的最高产量达到2.834 4 g·L⁻¹. 高效液相色谱和薄层析分析表明,在260 nm的检测波长下,该红色素分别在16.667 min, 18.120 min, 19.895 min, 21.022 min处出现4个显著的吸收峰.

关键词:新西兰青霉;红色素;发酵优化;组分分析

中图分类号:Q939.97

文献标志码:A

众所周知,色素在发酵、食品、酿造、化妆品等行业中应用十分广泛. 一般来讲,色素可分为人工合成色素和天然色素两大类. 人工合成色素又因其具有的价格便宜、着色力强、色泽鲜艳且性质稳定等诸多优点而在食品加工行业普遍使用. 然而,以往的研究结果表明,大多数的合成色素不但不能够向人体提供营养物质,反而对人体有致癌、致畸、致突变等不同程度的伤害作用^[1].

与合成色素相比,天然色素在具备色泽鲜亮等优点的同时,其最大的优点仍体现在其低毒性和安全性. 有的色素如类胡萝卜素,甚至还具有营养和保健等作用,因此,天然色素日益被人们所青睐. 除此之外,由于生产技术的不断提高,天然色素无论在明亮度还是产量等方面都已经接近或已达到了合成色素的水平.

天然红色素的生产方法大致分为两种^[2-3]:一是从天然动植物材料中提取,如果皮、种子、根、昆虫等. 该种方法的不足是成本高且着色力和稳定性均差;二是利用微生物法生产,这种方法不但安全性高、工艺性能好,而且生产不受场地、季节限制,设备简单,易于实现工业化大生产. 据报道,国内外已有不少通过微生物发酵的方法生产色素,其中研究最广的是红曲色素. 然而, Wong HC 等人于1981年从红曲色素中分离出桔霉素,并发现该物质对肾脏和神经系统均有不同程度的毒害作用. 此外,有学者在对红曲色素的后续研究中发现其不仅有致敏现象而且能导致哮喘,因此,人们对其使用的安全性提出质疑. 西方许多国家已不承认红曲作为食品色素的合法地位^[4]. 此外,红酵母、细菌和微藻类均可以产生很多不同种类的色素^[5-6]. 但细菌及微藻的低生产能力是限制其商业化的瓶颈;红酵母(*Rhodotorula*)也可以产生红色素如类胡萝卜素,然而其提取成本过高. 因此,如何筛选新的产色素菌种及新型色素,成为国内外本领域的一个热点研究话题. 在此背景下,子囊菌中的青霉属菌种引起了研究人员的关注.

青霉属(*Penicillium*)菌株能产生多种色素^[7-8],如 *P. persicinum* 可产生浅粉红色的色素, *P. oxalicum* var. *armeniaca* 可产生深红色色素. 但是,迄今为止,国内外有关青霉菌产生安全、稳定、水溶性红色素的报

收稿日期:2016-01-08

基金项目:国家自然科学基金(U1404301)

作者简介:张永梅(1991-),女,河南信阳人,河南师范大学硕士研究生,研究方向为应用微生物, E-mail:15236644828@163.com.

通信作者:王海磊(1978-),男,河南睢县人,河南师范大学教授,博士,主要从事应用与资源微生物方面的研究, E-mail:whl@henannu.edu.cn.

道仍然较少.在前期试验中发现利用 *P. novae-zeelandiae* 发酵生产的红色素为水溶性,能溶于乙醇、丙酮等有机溶剂,对热、pH 稳定,急、慢性毒理学及 Ames 实验均表明其安全无毒性.因此,本文将对 *P. novae-zeelandiae* 红色素发酵条件进行优化,以提高红色素的产量.同时,采用薄层层析和高效液相色谱法对红色素中主要组分进行分析.本研究将为该红色素的开发、生产及在食品等领域的应用等提供技术支撑.

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种

新西兰青霉(*P. novae-zeelandiae* HSD07B)由河南师范大学生命科学学院 AEM 实验室分离保藏.

1.1.2 培养基

种子斜面培养基(PDA)^[9];液体发酵培养基:不加琼脂的 PDA;棉籽壳发酵培养基:150 g 棉籽壳加水煮沸取浸出液,葡萄糖 20 g,用水定容到 1000 mL,pH 自然.查氏培养基:NaNO₃ 2 g,K₂HPO₄ 1 g,MgSO₄·7H₂O 0.5 g,KCl 0.5 g,FeSO₄·7H₂O 0.01 g,蔗糖 30 g,水定容到 1000 mL,pH 自然.

1.1.3 主要试剂和仪器

循环水真空泵(北京生物技术公司)、LDZX-FB 立式压力蒸汽灭菌器(无锡建仪实验器材公司)、苏净 SW-CJ 超净工作台(济南博涵生物科技公司)、HY-6 调速振荡器培养箱(江苏省金坛市友联仪器有限公司)、MJP-2501 霉菌培养箱(广东省医疗器械公司)、UV-1800 紫外分光光度计(江苏生物技术仪器公司).

1.2 方法

1.2.1 色素含量的测定

将得到的红色素样品按合适的浓度梯度稀释,根据色素浓度和吸光值 OD_{494nm} 的关系绘制标准曲线.

发酵液过滤后稀释一定倍数,根据其 494 nm 处吸光值和稀释的倍数计算发酵液中红色素的含量.

1.2.2 培养方法的建立

1) 菌株活化与孢子悬液的制备

将保藏的 *P. novae-zeelandiae* HSD07B 进行斜面活化,于 29 ℃ 培养 3 d. 取经两次活化的菌株斜面,在无菌操作条件下,制备成一定浓度的孢子悬液.

2) 培养方法的确定

将 500 mL 的锥形瓶中装入 300 mL 液体(PD)发酵培养基,分别接入适量的孢子悬液(孢子悬液浓度为 2×10^7 mL⁻¹),进行 3 组不同的处理,每组 3 个重复,以筛选最佳的培养方案.

处理 1,连续静置培养,让其形成菌膜产红色素,观察并记录.处理 2,30 ℃ 150 r·min⁻¹ 恒温摇床中振荡培养一段时间后,置于 30 ℃ 恒温培养箱静置培养,观察记录其产红色素过程.处理 3,置于 30 ℃ 150 r·min⁻¹ 恒温摇床一直振荡培养,观察记录其生长过程.

1.2.3 红色素发酵条件的优化

设置发酵培养基、装液量、接种量、温度、培养基初始 pH、振荡培养时间、葡萄糖浓度等 7 个因素,以红色素的浓度为指标,对 *P. novae-zeelandiae* 产红色素的发酵条件进行优化.

1.2.4 红色素的分离提取

将培养好的菌株发酵液抽滤,去除菌体,发酵液采用低温真空浓缩处理,浓缩至原体积的 1/5 后加入 2 倍的 95% 乙醇,放置过夜后再用布氏漏斗真空抽滤去除生物大分子(多糖和蛋白).取出上清液进行浓缩脱醇,然后进行冷冻干燥处理备用.

1.2.5 红色素的薄层层析和高效液相色谱分析

红色素的薄层层析(TLC)参考 Touchstone 等^[10]的方法.将上述提取的红色素用少量甲醇溶解,经微孔有机滤膜(孔径为 0.22 μm)过滤后,用高效液相色谱仪(HPLC-Agilent 1200)分析.本实验所设置的分析条件是:色谱柱 Carbohydrate Analysis Column 4.6×250 nm,流动相为甲醇:水(75:25,V/V)等度洗脱,流速为 1 mL·min⁻¹,柱温为 30 ℃,进样量 20 μL,紫外检测波长为 260 nm.

2 结果与讨论

2.1 红色素含量的测定

红色素含量与吸光度的线性关系如图 1 所示. 经统计分析后得到线性回归方程: $y = 1.355x + 0.0005$, $R^2 = 0.9985$.

2.2 培养方法的确定

3 种不同培养方式的处理效果如表 1 所示. 处理 2 中先振荡后静置的培养方法, 既能在短时间内得到足够的菌体量, 又能形成产红色素所需的界面菌膜, 最后的色素产量也相对较高. 因此, 采用先振荡后静置的培养方法有助于提高发酵产物的产量和缩短发酵时间.

表 1 不同培养方式的处理效果

组别	振荡时间/h	成膜时间/h	产红色素时间/h	最终 OD 值	观察
处理 1	—	72 h	120 h	0.401	菌膜较薄, 红色色度不高
处理 2	40 h	52 h	64 h	0.983	菌膜相对较厚, 呈亮红色
处理 3	260 h	—	—	0.082	发酵液粘稠, 呈浅黄褐色

2.3 青霉红色素发酵条件的优化

2.3.1 红色素的最适发酵培养基

分别将等量孢子悬液接种于查氏培养基、PD 培养基和棉籽壳培养基中, 锥形瓶装液量 300 mL/500 mL, 30 °C 150 r·min⁻¹ 条件下振荡活化培养, 然后转至 30 °C 恒温培养箱静置培养, 定期测定各培养基发酵液红色素浓度, 结果如图 2 所示.

由图 2 可知, 该菌株在 PD 培养基中产生红色素速率最快、产量最大, 为最适培养基. 其次为棉籽壳培养基, 而在查氏培养基中几乎不产红色素.

2.3.2 产红色素的最适装液量

采用 PD 培养基, 在 500 mL 的锥形瓶中, 装液量分别为 200 mL、250 mL、300 mL、350 mL、400 mL, 接种孢子悬液 1 mL (孢子悬液浓度为 2×10^7 mL⁻¹), 进行先振荡后静置的界面菌膜培养, 测其发酵液红色素的浓度, 结果如图 3 所示, 当装液量为 300 mL/500 mL 时, 该青霉产红色素产量最高, 达 $1.268 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 当装液量过小 (200 mL/500 mL) 时, 静置时可形成较大的菌膜, 但是产红色素菌丝层却较薄, 红色素产量也不高; 装液量过大时, 形成的菌丝球体积大但数量少, 且菌膜面积小, 红色素产量低. 界面菌膜培养产红色素, 虽然菌膜大小和色素产量有关, 但却并不是菌膜越大, 色素产量就越高, 菌膜的红色菌丝层厚度对红色素产量也有影响. 因此, 300 mL/500 mL 是最佳装液量.

2.3.3 产红色素的最适接种量

分别接种 0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL、1.2 mL、1.4 mL 的孢子悬液于装液量为 300 mL/500 mL 的 PD 培养基中, 于 30 °C 150 r·min⁻¹ 条件下振荡活化培养一段时间, 后转至 30 °C 恒温培养箱静置培养, 6 d 后测定不同接种量条件下, 该青霉发酵液中红色素的浓度, 结果见图 4.

一个发酵体系内接种量会直接影响菌株的生长曲线, 过少或过多都不适宜^[11]. 接种量过小 (0.6 mL) 时, 发酵初期菌丝增殖缓慢, 继而影响菌膜的质地, 造成红色素产量低; 接种量过大 (1.4 mL), 初始的菌丝增殖较快, 对发酵体系内的营养消耗也较多, 造成菌丝密集, 发酵液内氧气不足, 而且极易得到老化的菌丝球, 这

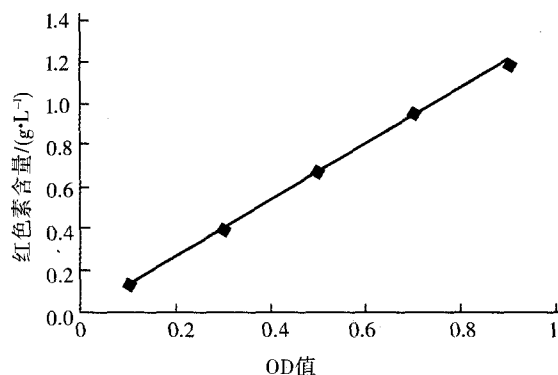


图1 红色素含量与吸光度的线性关系

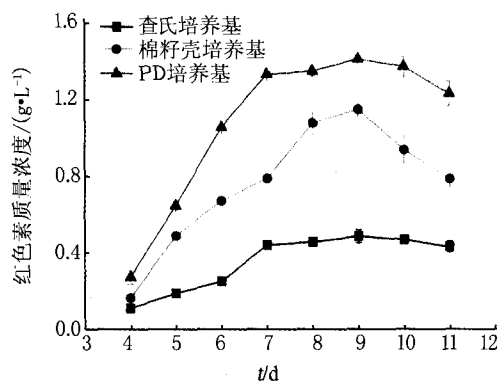


图2 不同培养基对红色素产生的影响

样形成的菌膜活力不高,也不利于红色素的产生.因此,在 300 mL/500 mL 装液量的条件下,*P. novae-zeelandiae* 产红色素的最佳接种量为 1.0 mL(孢子悬液浓度为 2×10^7 mL⁻¹).

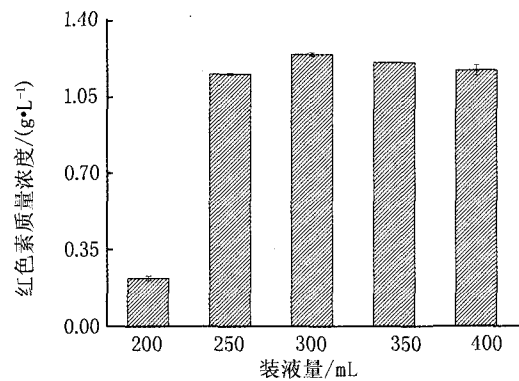


图3 装液量对红色素产生的影响

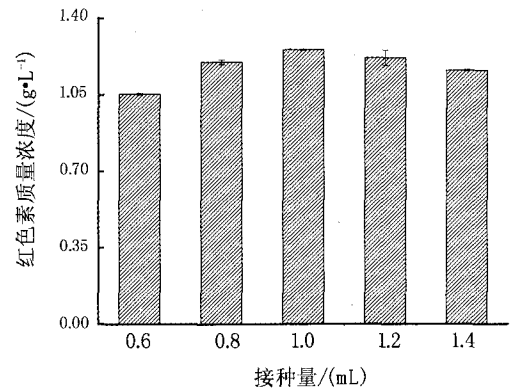


图4 接种量对红色素产生的影响

2.3.4 产红色素的最适温度

向装液量为 300 mL/500 mL 的 PD 培养基中接种 1.0 mL 孢子悬液,分别于 27 ℃、28 ℃、29 ℃、30 ℃、31 ℃、32 ℃条件下,150 r·min⁻¹ 振荡活化培养 3 d 后在相同温度下转至恒温培养箱中静置培养,7 d 后测定各温度条件下发酵液中红色素的浓度,结果见图 5.

由图 5 可知,最佳的培养温度为 30 ℃.一般真菌的生长温度为 28 ℃,但 *P. novae-zeelandiae* HSD07B 在 28 ℃的条件下,红色素产量并不高,而在 30 ℃时,红色素的产量和红色菌丝量都达到最大,这可能是由于不同微生物产生次级代谢产物时的温度不同造成的^[12].

2.3.5 产红色素的最适初始 pH

将 PD 培养基初始 pH 分别调节为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0,500 mL 锥形瓶装液量 300 mL,孢子悬液的接种量 1.0 mL(孢子悬液浓度为 2×10^7 mL⁻¹),先于 30 ℃ 150 r·min⁻¹ 恒温摇床中振荡培养一段时间,然后于 30 ℃ 恒温培养箱静置培养,测其发酵液红色素的浓度,结果见图 6.

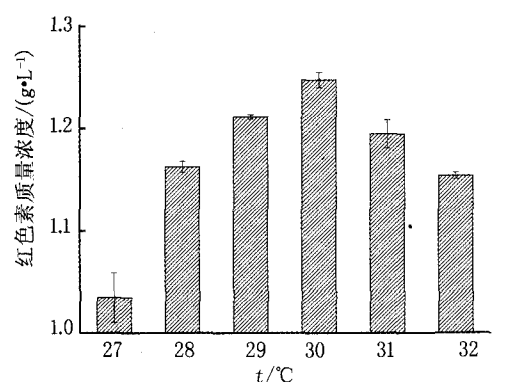


图5 温度对红色素产生的影响

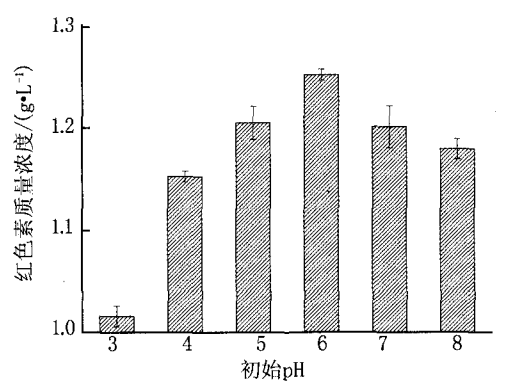


图6 初始pH对红色素产生的影响

由图 6 可知,红色素的产量略受培养基 pH 的影响.在初始 pH 为 6.0 时,红色素产量最高,产量次之是 pH 为 5.0 和 pH 为 7.0 时.红色素产生的适宜 pH 为近中性环境,pH 过高或过低都不利于红色素的产生.

2.3.6 产红色素的最适振荡培养时间

向装液量为 300 mL/500 mL 的 PD 培养基中接种 1.0 mL 孢子悬液(孢子悬液浓度为 2×10^7 mL⁻¹),于 30 ℃ 150 r·min⁻¹ 振荡活化培养,振荡时间分别为 34 h、36 h、38 h、40 h、42 h 和 44 h,然后于 30 ℃ 恒温培养箱静置培养,7 d 后测定各温度条件下发酵液中红色素的浓度,结果见表 2.

振荡培养时间不仅影响菌体的生长,而且对成膜时间和产红色素时间都有影响.由表 2 可以看出,振荡时间为 40 h 时,开始形成菌膜与产红色素的时间最短;振荡时间小于 40 h 时,由于菌丝球量少,菌膜形成时间均大于 12 h;振荡时间大于 40 h,虽然也能在 12 h 时开始形成菌膜,但开始产红色素时间相对延长.由于

产红色素部位是菌膜,理论上菌膜越厚产红色素越多,但随着振荡时间的增加,发酵体系内的菌体也会老化^[13,14].因此,振荡时间过长,形成的菌膜虽然较厚,但红色素的产量不高.综合振荡时间对成膜时间、产红色素时间、菌膜质地、红色素产量的影响,确定 40 h 为最佳的振荡培养时间.

表 2 振荡时间对发酵过程的影响

振荡时间/h	成膜时间/h	产红色素时间/h	色素产量/(g·L ⁻¹)
34	54	72	1.070
36	54	70	1.152
38	54	68	1.205
40	52	64	1.250
42	54	66	1.225
44	56	70	1.170

2.3.7 产红色素的最适葡萄糖浓度

采用 PD 培养基,葡萄糖质量浓度分别设置为 16 g·L⁻¹、17 g·L⁻¹、18 g·L⁻¹、19 g·L⁻¹ 和 20 g·L⁻¹,装液量为 300 mL/500 mL,接种 1.0 mL 孢子悬液,于 30 ℃ 150 r·min⁻¹ 振荡活化培养 3 d 后在相同温度下转至恒温培养箱中静置培养,7 d 后测定各葡萄糖浓度条件下发酵液中红色素的浓度,结果见图 7.

葡萄糖质量浓度在 18 g·L⁻¹ 时色素产量最高,为 1.449 g·L⁻¹,过高或过低均不利于色素的产生.葡萄糖浓度过高将会抑制色素的产生,真菌中普遍存在这一现象^[15].同时,葡萄糖浓度过低时,可能会导致菌体生长所需的营养缺乏,从而导致色素的产量也随之降低.

2.4 红色素薄层层析和高效液相色谱分析

如图 8A 所示,260 nm 检测波长条件下,红色素的 HPLC 图谱有 4 个显著的吸收峰,分别在 16.667 min,18.120 min,19.895 min 及 21.022 min.这与 TLC 板上红色素显示的 4 个特征谱带(图 8(B))相吻合.

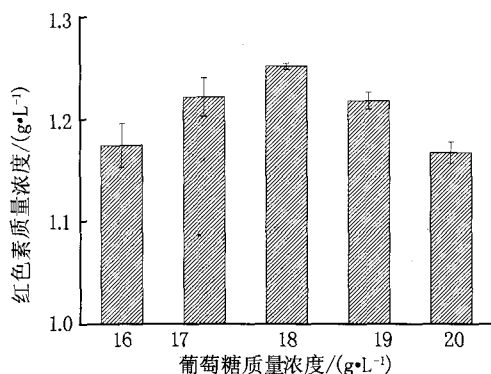


图7 葡萄糖浓度对红色素产生的影响

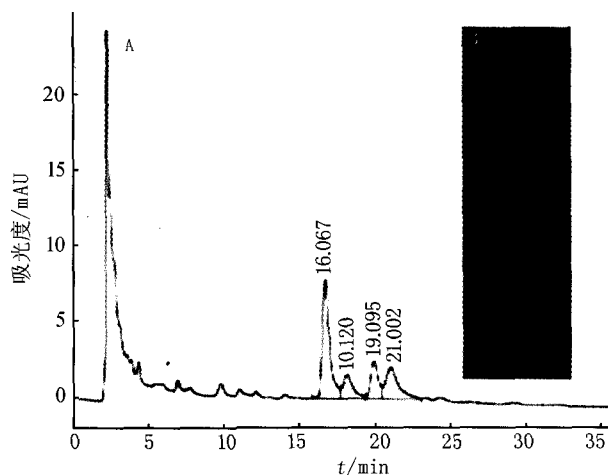


图8 红色素的HPLC(A)及TLC分析(B)

3 结 论

本文对影响新西兰青霉红色素产生的发酵培养基、装液量、温度、培养基初始 pH、振荡培养时间、葡萄糖浓度等发酵条件进行优化,在最优的培养条件下,红色素的产量可高达 2.834 g·L⁻¹.通过高效液相色谱和薄层层析对该色素进行初步分析,结果发现红色素有 4 个主要成分.

Gunasekaran S^[16]等利用 *Penicillium sp.* 在可溶性淀粉为碳源和蛋白胨为氮源的优化培养条件下得到红色素 1.55 g·L⁻¹. 相比而言,本实验利用马铃薯液体培养基在最优的培养条件下,所得红色素的产量提高显著,且发酵周期较短.

参 考 文 献

- [1] Mapari S A S, Ulf T, Meyer A S. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants[J]. Trends Biotechnol, 2010, 28(6):300-307.
- [2] Ortensen A. Carotenoids and other pigments as natural colorants; Pure and Applied Chemistry[J]. Pure Appl Chem, 2009, 78(8):1477-1491.
- [3] Kirti K, Amita S, Priti S, et al. Colorful world of microbes: carotenoids and their Applications[J]. Advances in Biology, 2014, 30(3): 140-220.
- [4] Samsudin N I P, Abdullah N. A preliminary survey on the occurrence of mycotoxigenic fungi and mycotoxins contaminating red rice at consumer level in Selangor, Malaysia[J]. Mycotoxin Research, 2013, 29(2):89-96.
- [5] Barufi J B, Figueroa F L, Plastino E M. Effects of light quality on reproduction, growth and pigment content of *Gracilaria birdiae* (Rhodophyta: Gracilariales)[J]. Scientia Marina, 2015, 79(1):15-24.
- [6] Tkáčová J. Screening of carotenoid-producing *Rhodotorula* strains isolated from natural sources[J]. Acta Chimica Slovaca, 2015, 8(1):34-38.
- [7] Shah S G, Shier W T, Jamaluddin, et al. *Penicillium verruculosum* SG: a source of polyketide and bioactive compounds with varying cytotoxic activities against normal and cancer lines[J]. Archives of Microbiology, 2014, 196(4):267-278.
- [8] Valéria C S E, Ines C R, Maria F S T, et al. Improving of red colorants production by a new *Penicillium purpurogenum* strain in submerged culture and the effect of different parameters in their stability[J]. Biotechnol Prog, 2013, 29(3):778-785.
- [9] 刘国生. 微生物学实验技术[M]. 北京:科学出版社, 2011.
- [10] Touchstone, Joseph C. Thin layer chromatography[J]. Methods in Enzymology, 2013, 533(4):303-324.
- [11] Hongyan R. Effect of inoculum size on biogas production process via anaerobic fermentation of *Cyanobacteria* from Taihu Lake[J]. Shanghai Environmental Sciences, 2011, 30(4):158-162.
- [12] Yoon V, Nodwell J R. Activating secondary metabolism with stress and chemicals[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2014, 41(2):415-424.
- [13] 周元良. 血红素和维生素 K2 对有氧培养干酪乳杆菌生长和代谢的影响[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2011.
- [14] 沈伟, 胡玲玲, 李赫宇, 等. 两段培养冬虫夏草菌丝体中腺苷积累动态研究[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(14):53-56.
- [15] Lertwattanasakul N, Rodrussamee N, Suprayogi, et al. Utilization capability of sucrose, raffinose and inulin and its less-sensitiveness to glucose repression in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042[J]. Amb Express, 2011, 23(1):1-11.
- [16] Gunasekaran S, Poorniammal R. Optimization of fermentation conditions for red pigment production from *Penicillium* sp. under submerged cultivation[J]. African Journal of Biotechnology, 2008, 7(12):1894-1898.

Optimization of Fermentation Conditions and Components Analysis for Red Pigments Produced by *Penicillium novae-zeelandiae*

YAN Yue, ZHANG Yongmei, LI Ping, WANG Hailei

(College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: In this paper, the fermentation process was designed according to the yield of red pigments produced by *Penicillium novae-zeelandiae* HSD07B. The components of red pigment were also analyzed. The results showed that the optimal parameters are: PD medium, 500 mL flask containing 300 mL medium, the inoculum volume 1 mL (Spore concentration $2 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$), initial pH 6.0, rotary speed of $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, temperature 30°C , oscillating time 40 h. Under the optimal conditions, the maximum concentration of red pigment is $2.28344 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. All components of red pigments were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) and thin-layer chromatography (TLC), and the retention time of four major components were 16.667 min, 18.120 min, 19.895 min, 21.022 min, respectively.

Keywords: *Penicillium novae-zeelandiae*; fermentation optimization; red pigment; components analysis