

# 一株固态发酵烟梗产类胡萝卜素脉孢菌的分离鉴定

郭大城<sup>1</sup>,陈彦好<sup>2</sup>,梁景辉<sup>2</sup>,杨高举<sup>2</sup>,朱大恒<sup>2</sup>,席宇<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>河南省疾病预防控制中心,郑州 450016;<sup>2</sup>郑州大学生物工程系,郑州 450001

**摘要:**从霉变的废弃烟梗中分离出一株真菌 LGL, LGL 在废弃烟梗上生长迅速并产生类胡萝卜素,色素最大吸收波长为 472 nm。30 °C 固态发酵 6 d,菌丝干重,色素产量和色素含量分别为 50.50 g/Kg, 21.98 mg/kg 和 435.15 μg/g。为确定 LGL 的分类地位,PCR 扩增其 ITS 基因序列,在 GenBank 中进行同源性比较,并与一些相关真菌构建系统发育树,结合其培养和形态特征,初步鉴定为一株好食脉孢菌(*Neurospora sitophila*)。

**关键词:**烟梗;分离;鉴定;类胡萝卜素

中图分类号:Q932

文献标识码:A

## Isolation and Identification of a Waste Tobacco Stems Utilising *Neurospora* for Carotenoids Production under Solid State Fermentation

GUO Da-cheng<sup>1</sup>, CHEN Yan-hao<sup>2</sup>, LIANG Jing-hui<sup>2</sup>, YANG Gao-ju<sup>2</sup>, ZHU Da-heng<sup>2</sup>, XI Yu<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Henan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Zhengzhou, 450016, China;

<sup>2</sup>Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

**Abstract:** A strain of fungus LGL was isolated from moldy waste tobacco stems, which can grow rapidly and produce carotenoids with a maximum absorption wavelength of 472 nm on WTS. After 6 d culture at 30 °C under solid state fermentation, the dry weight of mycelia, carotenoids production and content were reached 50.50 g/Kg, 21.98 mg/kg and 435.15 μg/g, respectively. To confirm the classification of LGL, culture and morphological characterization were applied and PCR was carried out to measure the gene sequence of ITS. The ITS sequence of LGL was compared with those in GenBank and the phylogenetic tree was constructed with related fungi. Based on the above results, the strain LGL was identified as *Neurospora sitophila*.

**Key words:** tobacco stem; isolation; identification; carotenoids

类胡萝卜素作为人和动物体内一类重要生物活性物质,具有增强机体免疫力、防治肿瘤和治疗光敏性疾病等重要的作用,因此在食品、化妆品、医药和饲料添加剂等方面有广泛的应用<sup>[1]</sup>。类胡萝卜素的天然来源主要为微生物发酵生产,目前微生物发酵产类胡萝卜素底物主要为各种谷物,发酵成本较高,因此开发廉价底物降低类胡萝卜素的发酵成本是非常必要的<sup>[2]</sup>。烟梗是卷烟工业的废弃物,约占烟叶总重的 20% ~ 30%,目前废弃烟梗(waste tobacco stems, WTS)多用来提取烟碱、果胶、烟酸,茄呢醇或用于堆肥<sup>[3,4]</sup>。烟梗中含有大量的糖类、氮类和纤维素等有机物质<sup>[5,6]</sup>,因此对废弃烟梗进行资源化利用是非常重要的。脉孢菌能利用非粮原料

产生多种生物活性物质,具有很高的应用价值<sup>[7]</sup>,然而对其发酵产类胡萝卜素研究甚少<sup>[8,9]</sup>,利用 WTS 发酵产类胡萝卜素尚未见报道。本文对从霉变的 WTS 中分离到一株真菌进行了鉴定,并对其固态发酵 WTS 产类胡萝卜素进行了初步研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器试剂与材料

生化培养箱(MJX-70,上海和呈仪器制造有限公司);电热鼓风干燥箱(101,北京中兴伟业仪器有限公司);立式高压灭菌器(YXQ-LS-30SH,上海博迅实业有限公司);双人双面净化工作台(SW-CJ-2F,苏州净化设备有限公司);紫外可见分光光度计(UV-2450,日本岛津);低温高速离心机(Avanti J-25, Beckman coulter);连续流动分析仪(AA3,德国布朗卢比公司)。废弃烟梗由河南天昌烟草国际有限公司提供,直径为 0.15 ~ 0.50 cm,长度为 0.2 ~

收稿日期:2013-03-15 接受日期:2013-07-24

基金项目:河南省烟草专卖局科技攻关项目(HYKJ201021);国家级大学生创新创业训练计划资助项目(2013110459009)

\* 通讯作者 E-mail:xiy@zzu.edu.cn

5.0 cm。β-类胡萝卜素购自 Fluka 公司 (> 97.0%), 引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCCG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 由上海生物工程有限公司合成。所有供试药品和试剂均为分析纯。

## 1.2 培养基

菌株分离采用 TSE 固体培养基<sup>[3]</sup>, 琼脂含量为 1.5%, 菌种保藏采用 TSE 斜面培养基。培养基灭菌条件为 121 °C 灭菌 20 min。

## 1.3 菌株的分离

霉变的烟梗发现有橘黄色干燥颗粒物产生, 接种环挑取黄色颗粒物划线于 TSE 平板, 28 °C 培养 16 h, 继续挑取菌丝划线培养, 获得一株真菌纯培养物, 标记为 LGL。

## 1.4 菌株的鉴定

### 1.4.1 培养及形态特征

将纯培养菌株 LGL 接种于 TSE 平板, 定期观察菌落特征, 同时挑取菌丝采用石碳酸棉兰染液染色, 于显微镜下观察其菌丝特征并显微照相。

### 1.4.2 ITS 序列分析

CTAB 法提取分离菌株基因组<sup>[10]</sup>, PCR 扩增 18S-28SrDNA 的 ITS 序列, PCR 产物由上海生物工程有限公司进行测序, 结果输入 NCBI 进行 BLAST 比对, 与 GenBank 数据库中的序列进行同源性分析, 选取与扩增序列同源性高的代表菌种采用 clustalx 2.0 软件进行序列比对分析, 用 MEGA 5.05 软件采用邻接法构建系统发育树<sup>[11]</sup>。

## 1.5 菌株 LGL 的固态发酵

取光照条件下培养 1 d 的 TSE 平板上的菌丝, 接种于 TSE 斜面培养基上, 30 °C 下光照培养 6 d, 用无菌生理盐水冲下孢子并计数, 制备浓度为  $1.5 \times 10^8$  个/mL 孢子悬液作为接种物。TWS 于 60 °C 干燥 2 h, 过 16 目标准筛备用, 其主要成分分析采用连续流动分析仪 (AA3, 德国)。10 g 烟梗装于 250 mL 锥形瓶中, 按烟梗与水 1:2.5 比例加入 50 °C 自来水浸泡 6 h, 121 °C 湿热灭菌 20 min。冷却后接入 1 mL 孢子悬液混匀, 30 °C 置培养箱中光照培养。

## 1.6 分析方法

### 1.6.1 生物量的测定

向含发酵物的三角瓶中加入适量的生理盐水, 玻璃棒搅拌使菌丝体孢子与烟梗分离, 单层纱布过滤获得菌丝体悬液后定容。取 30 mL 菌体悬液 12 000 rpm 离心 5 min 收集菌丝体, 自来水漂洗两次, 60 °C 烘至恒重称重, 计算生物量。

## 1.6.2 类胡萝卜素的提取与测定

类胡萝卜素的提取按文献方法进行, 湿菌体经盐酸-热处理破壁后, 用丙酮抽提类胡萝卜素<sup>[12]</sup>。用紫外可见分光光度计在 350 ~ 600 nm 波长扫描类胡萝卜素丙酮浸提液, 找出最大吸收波长。将提取液适当稀释后, 测定最大吸收波长处吸光度, 按下式计算类胡萝卜素含量:

$$\text{类胡萝卜素含量} (\mu\text{g/g}) = \frac{A_{\lambda_{\text{max}}} \times D \times V}{0.16 \times W}$$

式中,  $A_{\lambda_{\text{max}}}$  为色素最大吸收波长处的吸光度, D 为测定试样的稀释倍数, V 为提取色素所用溶剂量, W 为菌体重量 (g), 0.16 为类胡萝卜素的消光系数。

类胡萝卜素产量按下式计算: 类胡萝卜素产量 (mg/L) = 色素含量 × 细胞产量

## 2 结果与讨论

### 2.1 烟梗成分分析

TWS 中含有大量有机物质, 主要包括可溶性多糖、烟碱、酚类和氮等, 其主要特征如表 1。因此 TWS 符合真菌生长的营养要求。

表 1 废弃烟梗主要成分分析

Table 1 The major characteristics analysis of TWS

主要特征 Major characteristic	总糖 Total sugar	总氮 Total nitrogen	总钾 Total potassium	烟碱 Nicotine	总氯 Total chlorine
含量 (g/L)	20.35	1.73	2.53	0.84	2.03

### 2.2 筛选菌株的鉴定

#### 2.2.1 培养和形态特征

LGL 在 TSE 平板上生长迅速, 无典型菌落形成, 培养 16 h 菌丝呈白色絮状 (图 1a), 24 h 菌丝铺满平板, 菌丝上层产生黄色粉末 (图 1b)。

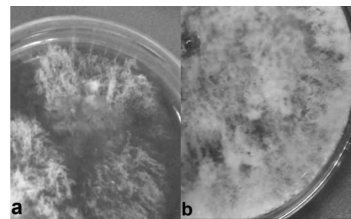


图 1 菌株 LGL 的培养特征

Fig. 1 The culture characteristics of LGL in TSE medium

LGL 菌丝蔓延生长, 为有隔菌丝 (图 2a)。在气生菌丝顶端形成分生孢子簇 (图 2b), 成熟后分生孢子弹射。显微镜检孢子为球形或者卵圆形, 橙红色 (图 2c)。

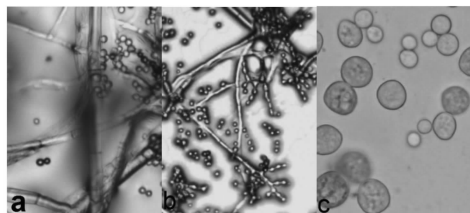


图2 菌株 LGL 的显微特征

Fig. 2 The microscopic characteristics of LGL in TSE medium

### 2.2.2 菌株 ITS 序列分析

通过提取菌株 LGL 的基因组,以基因组为模板扩增核糖体的 ITS1、ITS2 和 5.8 SrDNA 的全序列以及 18SrDNA 和 28SrDNA 的部分序列,获得 538 个碱基序列。将扩增序列在 NCBI 中进行 BLAST 同源性比对,选取同源性较高的 8 株真菌,以一株同源性较低黑曲霉为外群,构建系统发育树(图 3),从系统发育树可以看出菌株 LGL 和好食脉孢菌(*Neurospora sitophila*)在同一分支上,进化距离相同,置信度较高,结合培养与形特征分析,初步把菌株 LGL 鉴定为一株好食脉孢菌。

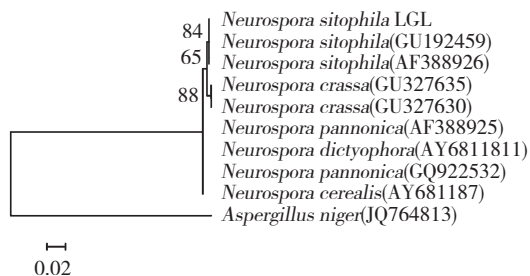


图3 基于 ITS 序列相似性的系统发育树(括号内为序列登录号)

Fig. 3 Phylogenetic tree based on the ITS sequence (accession numbers in parentheses)

### 2.3 菌株 LGL 的色素特征及含量测定

菌株 LGL 色素的丙酮抽提液与 $\beta$ -胡萝卜素标准品的光吸收扫描图谱相比,其最大吸收峰有偏离(图 4)。 $\beta$ -类胡萝卜素最大吸收波长在 450 nm,菌株 LGL 的色素最高吸收波长在 472 nm,具有类胡萝卜素的典型双肩峰特征,与报道脉孢菌所产的类胡萝卜素最大吸收波长相一致<sup>[8]</sup>。对菌株 LGL 色素含量和产量进行考察,结果如表 2。与文献相比,色素含量和产量都较高,优化发酵工艺可进一步提高色素产量<sup>[8]</sup>。

## 3 结论

从烟草废弃物中分离出一株脉孢菌 LGL,通过

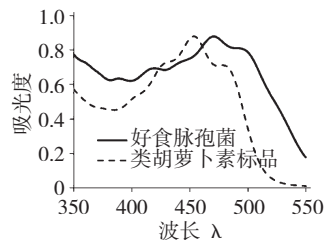
图4  $\beta$ -类胡萝卜素和菌株 LGL 色素的扫描光谱比较

Fig. 4 UV-Visible spectra of  $\beta$ -carotenoids and pigments extracted from strain LGL

表2 菌株 LGL 色素含量和产量

Table 2 Carotenoid content and yield of strain LGL

菌株 Strain	生物量 Biomass (g/Kg)	色素产量 Pigment production (mg/kg)	色素含量 Pigment content ( $\mu\text{g/g}$ )
LGL	50.5	21.98	435.15

分子鉴定初步鉴定为一株好食脉孢菌,且菌株 LGL 可以在废弃烟梗上迅速生长,30 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 6 d,菌丝干重达到 50.5 g/Kg。菌株 LGL 能够利用废弃烟梗固态发酵产类胡萝卜素,其色素最高吸收峰在 472 nm,初步实验条件下色素含量为 435.15  $\mu\text{g/g}$ ,最大色素产量为 21.98 mg/kg。因此,利用 LGL 固态发酵废弃烟梗既能获得天然类胡萝卜素,又能为废弃烟梗的资源化利用提供一种思路。

### 参考文献

- 1 Frengova GI, Beshkova DM, Beshkova. Carotenoids from Rhodotorula and Phaffia; yeasts of biotechnological importance. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2009, 36:163-180.
- 2 Frengova G, Simova E, Beshkova D. Use of whey ultrafiltrate as a substrate for production of carotenoids by the yeast *Rhodotorula rubra*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2004, 112:133-141.
- 3 Xi Y(席宇), Gao M(高明), Guo DH(郭东衡), et al. Fungal biosorbent produced by fermentation of waste tobacco stems and its decolorization effect. *Tob Sci Technol*(烟草科技), 2012, 6:72-75.
- 4 Dong ZN(董占能), Bai JC(白聚川), Zhang HD(张皓东). Comprehensive utilization of tobacco waste. *Chin Tob Sci*(中国烟草科学), 2008, 1:39-42.
- 5 Wang YX(王月侠), Ge SL(葛善礼), Jia T(贾涛), et al. The analysis of chemical constitution for tobacco stems. *Tob Sci Technol*(烟草科技), 1996(3):16-17.

(下转第 557 页)