维生素对竹黄菌发酵产苝醌类色素的影响

韩钱松[1,2]，沈健增[3]，蔡宇杰*[1,2]，廖祥儒[1,2]，罗军侠[3]，张大兵[3]
（1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122；3. 江苏汉邦科技有限公司，江苏 淮安 223001）

摘要：采用单因素法研究了生物素、VB_1、VB_3、VB_5、VB_6，肌醇对氨基苯甲酸（PABA）和 VC 对竹黄菌 *Shiraia sp*.SUPER-H168 生长及其次级代谢产物苝醌类色素积累的影响。结果表明，添加 VB5 和 VB1 可显著促进竹黄菌的生长和色素的积累，菌体量和色素产量分别较对照提高了 37.8%和 31%，VB_5 和 VB_1 的较适质量浓度为 0.5 mg/L 和 1.0 mg/L。添加生物素和对氨基苯甲酸可显著提高菌体生长量，但低质量浓度的添加量对色素的积累起抑制作用。添加 VB_3、肌醇和 VC 可略微提高色素的产量，较适质量浓度为 0.5、0.05、0.05 mg/L。添加 VB6 虽然可促进菌体的生长，但却抑制了色素的积累。将对色素积累有促进作用的 VB_3、VB_5、肌醇、VB_1、VC 这 5 种维生素最优质量浓度下混合添加到 5 L 发酵罐培养基中，观察了菌体生长和发酵产色素的过程，最终的菌体量和色素产量较对照分别提高了 33.7%和 75%。

关键词：维生素；竹黄菌；单因素法
中图分类号：TQ 920.1　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2013)02—0119—05

Effect of Vitamins on Perylenequinones Production of *Shiraia bambusicola*

HAN Qian-song[1,2]，*SHEN Jian-zeng*[3]，*CAI Yu-jie**[1,2]，*LIAO Xiang-ru*[1,2]，
LUO Jun-xia[3]，ZHANG Da-bing[3]
（1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology，Ministry of Education，Jiangnan University，Wuxi 214122，China；2. School of Biotechnology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China；3. Hanbon Science and Technology Co. Ltd，Huaian 223001，China）

Abstract：The effect of biotin，VB_1，VB_3，VB_5，VB_6，inositol，para aminobenzoic acid（PABA）and VC on the growth of shiraia sp.SUPER-H168 and perylenequinones production were studied with single factor experiment. The results showed that biotin and PABA strongly improved the biomass of cell，but low concentration of them could inhibit the pigment production. VB_5 and VB_1 slightly increased the production of pigment，and their optimum concentration were 0.5，0.05，0.05 mg/L. Although VB_6 could improve the growth of fungi，the synthesis of the pigments was inhibited. The mixed vitamins containing VB_1，VB_3，inositol，VB_5 and VC was added into 5L-fermentation medium with the

收稿日期：2012-05-23
基金项目：国家自然科学基金项目（21045007）；江苏省科技创新与成果转化（重大科技支撑与自主创新专项引导资金）项目（BY2010117）；中央高校基本科研业务费专项资金项目（JUSRP21120）。
* **通信作者**：蔡宇杰（1973—），男，江苏无锡人，工学博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事生物工程方面的研究。
E-mail：yu_jie_cai@yahoo.com.cn

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

optimum concentration because of their improvement of pigment yield,and their effect on the growth of shiraia sp.SUPER-H168 and pigment yield was studied. The final biomass and pigment yield were increased by 33.7% and 75% respectively compared to the experiment without vitamin.

Keywords: vitamin,*Shiraia bambusicola*,single factor experiment

竹黄菌(*Shiraia bambusicola* P.Henn)又名天竹花、竹三七、赤团子等,是分布于我国南部的一种药用真菌,属于子囊菌亚门中的核菌纲、球壳目、肉座菌科(Hypocreaceae)、竹黄属(Sharaia)。竹黄菌特异寄生于某些竹子的嫩枝上,其子实体成为竹黄。竹黄是一种民间药材,常用其泡酒,治疗坐骨神经痛、风湿性关节炎、跌打损伤、虚寒胃痛等症[1-2]。通过对竹黄的化学组分和药理作用进行研究发现竹黄具有良好的抗菌、消炎、光敏杀伤肿瘤细胞等作用,还发现在农业上可用作光诱导杀虫剂的新型农药[3]。竹红菌素等苝醌类化合物是竹黄菌的主要成分之一,医学上主要用于外阴白色病变、牛皮癣等皮肤病的治疗。近年来,竹红菌素及其衍生物的光动力学活性成为了国内外研究的热点。竹红菌素的光动力学活性主要表现在抗菌及抗炎作用、抗病毒和抗肿瘤作用上。同时竹红菌素在农业和材料科学中都有很大的应用潜力[4]。

天然竹黄子座是目前竹红菌素等化合物的主要来源,但由于竹黄分布地域局限、生长季节短暂、天然产量低等限制,竹红菌素的产量还远远满足不了人类的需求,因此生物发酵法生产竹红菌素成为了人们研究的重点。利用生物发酵法生产苝醌类色素起步较晚,主要采用固态发酵的方法获得,但是固态发酵普遍存在低、不易大规模生产、较易染菌且分离纯化较为困难。所以液态深层发酵成了生产苝醌类色素的首选[5]。

目前,国内外一些研究人员通过优化培养基组分来提高竹黄菌的苝醌类色素产量。陈佳佳等经液态发酵及摇瓶正交试验得到最佳培养基配方和培养条件,每升发酵液可获得色价为52的竹红菌素8 g[6]。石贵阳等通过单因素实验确定了液态培养的最适碳氮源[5]。项小燕等从生物量和竹红菌素两方面筛选碳源、氮源和pH值,探讨了竹黄菌生长的最佳培养条件[7]。影响菌体生长和代谢产物积累的培养基组分还有很多,如维生素和一些微量元素。在培养基优化中维生素的含量虽然很低,但作用却不容忽视,因为维生素是参与微生物生长和代谢的一类微量有机物,在培养基中添加适量的维生素将会促进菌体的生长和次级代谢产物的积累。但是目前为止国内外还没有文献报道维生素对竹黄菌产苝醌类色素的影响,因此作者探讨了8种维生素在不同质量浓度下对竹黄菌生长和苝醌类化合物积累的影响,为竹黄菌液态发酵生产色素提供了研究依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

竹黄菌 *Shiraia sp.*SUPER-H168 由作者所在实验室保存。

1.2 培养基

1.2.1 保藏培养基(g/L) 马铃薯200,葡萄糖10,琼脂20;pH自然。

1.2.2 种子培养基(g/L) 葡萄糖20,$(NH_4)_2SO_4$ 6,K_2HPO_4 1,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5,KCl 0.5,$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01。

1.2.3 发酵培养基(g/L) 葡萄糖20,$(NH_4)_2SO_4$ 6,K_2HPO_4 1,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5,KCl 0.5,$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01。生物素,VB_1,VB_3,VB_5,VB_6,肌醇,对氨基苯甲酸,VC根据实验需要添加。

以上培养基均在121 ℃下灭菌20 min。

1.3 方法

1.3.1 种子制备 培养5~7 d后的斜面培养基用无菌水将竹黄菌孢子洗下,在装有玻璃珠的三角瓶中充分打碎,配置成10^6个/mL的孢子悬浮液。接入1.0 mL的孢子悬浮液于摇瓶培养基50 mL(250 mL三角瓶),30 ℃、200 r/min培养36 h。

1.3.2 摇瓶培养 种子液以体积分数8%接入发酵培养基中,摇瓶发酵装液量为50 mL/250 mL三角瓶,30 ℃、200 r/min培养72 h。

1.3.3 菌体干重的测定 取25 mL发酵液于50 mL的离心管中,8 000 r/min离心20 min,倾去上清液,去离子水冲洗3次。离心管和菌体在80 ℃下烘干至恒重,再用分析天平称量计算。

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3.4 色素总量的测定　苝醌类色素总量按文献[8]进行测定。

1.3.5 5 L发酵罐培养　装液量为3.5 L，接种体积分数8%，培养温度30 ℃，转速200 r/min，通气量3.5 L/min，初始pH自然pH。发酵过程中每隔8.0 h取一次样，测定发酵液的菌体量和色素产量。

2 结果与讨论

2.1 VB_5和VB_1对竹黄菌SUPER-H168生长和苝醌类色素产量的影响

单独添加VB_5使其在培养基中的终质量浓度为0.05、0.5、5.0、10.0 mg/L；同样单独添加VB_1，使其在发酵培养基中的浓度分别为0.01、0.05、0.5、1.0 mg/L；对照为不添加任何维生素。培养72 h后测得的竹黄菌菌体干重和色素产量见图1。

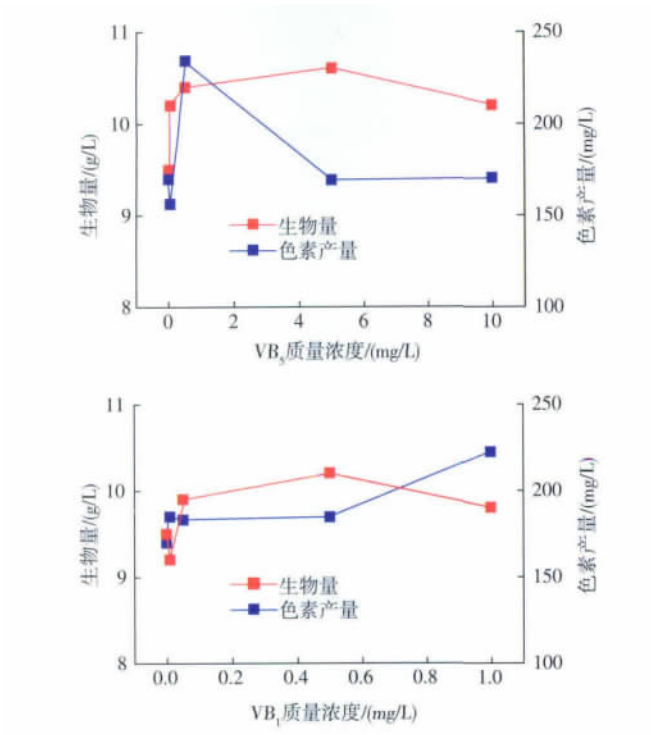


图1　VB_5和VB_1对竹黄菌SUPER-H168生长和苝醌类色素产量的影响

Fig. 1　Effect of VB_5 and VB_1 on the growth of *Shiraia sp.* SUPER-H168 and pigment production

从图1可知，添加VB_5对竹黄菌生长和色素的积累都有明显的促进作用。当VB_5质量浓度为0.5 mg/L时，色素产量达到最大，比对照提高了37.8%，随着质量浓度的增加，色素产量却降低到对照水平，这说明高浓度的VB_5反而不利于色素的积累。菌体的生物量在不同浓度的VB_5下没有明显变化，较对照提高了9%左右。不同的VB_1质量浓度下，菌体生物量较对照略微提高，但色素产量随着VB_1质量浓度的增加而提高，在VB_1质量浓度为1.0 mg/L时达到最大，较对照提高了31%。

2.2 生物素和对氨基苯甲酸（PABA）对竹黄菌SUPER-H168生长和苝醌类色素产量的影响

从图2可知，添加生物素和PABA可显著促进竹黄菌的生长，且随着维生素质量浓度的提高菌体生物量变化，但是低质量浓度(0.01、0.05 mg/L)的生物素和PABA对色素的积累有明显的抑制作用。当PABA质量浓度为0.05 mg/L时，色素产量较对照降低了38%。之后随着生物素和PABA质量浓度的进一步增加，色素产量提高到对照水平。

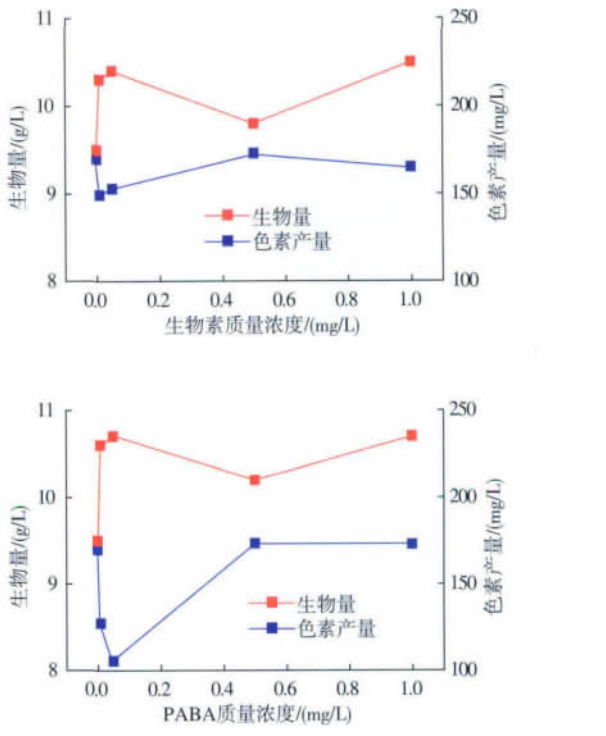


图2　生物素和PABA对竹黄菌SUPER-H168生长和苝醌类色素产量的影响

Fig. 2　Effect of Biotin and PABA on the growth of *Shiraia sp.*SUPER-H168 and pigment production

2.3 肌醇、VC和VB_3对竹黄菌SUPER-H168生长和苝醌类色素产量的影响

在发酵培养基中单独添加肌醇使其终质量浓度为0.05、0.5、5.0、10.0 mg/L，培养72 h后测得的竹黄菌菌体干重和色素产量见图3。当肌醇质量浓度为0.5 mg/L时，菌体生物量和色素产量同时达到最

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

大，分别为 10.6 g/L 和 198.2 mg/L，比对照提高了 11.6%和 17%。随着肌醇质量浓度的进一步增加，菌体生物量和色素产量均出现明显的降低。这说明低质量浓度的肌醇对竹黄菌的生长和色素产量是有促进作用的。同样单独添加低质量浓度的 VC 和 VB_3 也促进了色素的积累。VC 和 VB_3 的添加量分别为 0.01、0.05、0.5、1.0 mg/L，当 VC 质量浓度为 0.05 mg/L 时，色素产量比对照提高了 15%；VB_3 质量浓度为 0.01 mg/L 时，色素产量为 184.9 mg/L，较对照提高了 9%。菌体生物量在 VB_3 质量浓度为 0.5 mg/L 时达到最大以后，随着 VB_3 质量浓度的增加而降低。不同质量浓度的 VC 对菌体量影响不大。

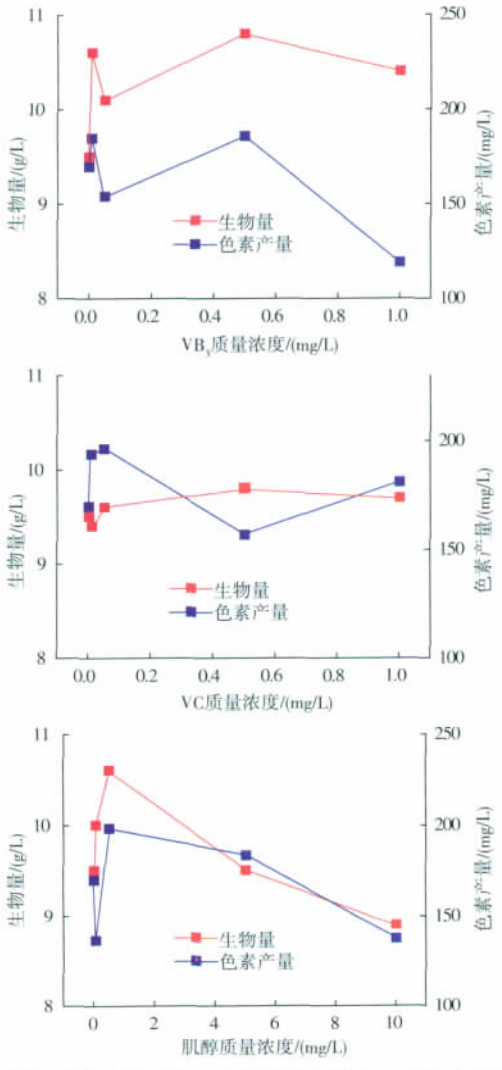


图 3 肌醇、VC 和 PABA 对竹黄菌 SUPER-H168 生长和苝醌类色素产量的影响

Fig. 3 Effect of inositol, VC and PABA on the growth of *Shiraia sp.*SUPER-H168 and pigment production

2.4 VB_6 对竹黄菌 SUPER-H168 生长和苝醌类色素产量的影响

在发酵培养基中单独添加 VB_6，使其在培养基中的质量浓度为 0.01，0.05，0.5，1.0 mg/L，培养 72 h 后测得的竹黄菌菌体干重和色素产量见图 4。VB_6 可显著促进竹黄菌的生长，但色素产量总体呈下降趋势，这说明 VB_6 对色素的积累有抑制作用。

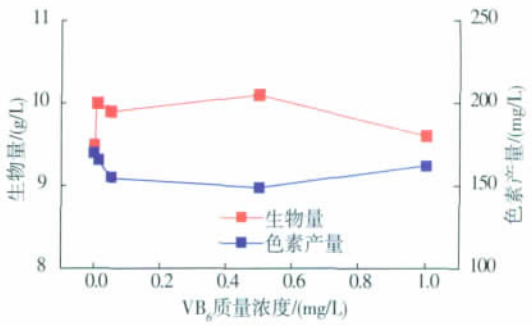


图 4 VB_6 对竹黄菌 SUPER-H168 生长和苝醌类色素产量的影响

Fig. 4 Effect of VB_6 on the growth of *Shiraia sp.* SUPER-H168 and pigment production

2.5 添加维生素混合对竹黄菌 SUPER-H168 发酵过程的影响

基于以上实验结果，在 5 L 发酵罐中同时添加 VB_3，VB_5，肌醇，VB_1，VC 5 种维生素混合液，使其质量浓度为最优水平（VB_3 0.01 mg/L，VB_5 0.05 mg/L，肌醇 0.5 mg/L，VB_1 1.0 mg/L，VC 0.05 mg/L）。对照不添加维生素，菌体生长和发酵产色素过程曲线见图 5。添加维生素的培养基中，菌体从 16 h 开始迅速生长，细胞增殖明显快于对照，菌体量在 72 h 达到最大，为 12.7 g/L，较对照提高了 33.7%，比单独添加任一维生素的菌体量都高。48 h 后菌体进入稳定期，对照的色素积累的速度迅速下降，而添加维生素培养基中的色素积累速度依然保持对数期的水平，在 72 h 色素产量达到 297.7 mg/L，较对照提高了 75%。

3 结 语

作者采用单因素法研究了生物素，VB_1、VB_3、VB_5、VB_6、肌醇，对氨基苯甲酸，VC 对竹黄菌 *Shiraia sp.*SUPER-H168 生长及其次级代谢产物苝醌类色素积累的影响。由于有机氮源中成分复杂，可能含有了一些维生素等营养成分，所以作者选用了酒石酸铵作为培养基的氮源。研究结果显示：VB_5 和 VB_1 可显著促进菌体生长，菌体大量积累导致色素产量

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

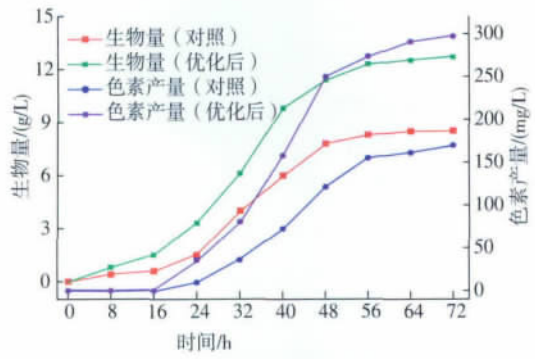


图 5　添加维生素混合对竹黄菌 SUPER-H168 发酵过程的影响

Fig. 5　Effect of mixed vitamins on fermentation course of *Shiraia sp*.SUPER-H168

提高。VB_3、肌醇、VC 和 VB6 虽然促进了菌体的生长，但随着维生素质量浓度的提高，色素产量呈下降趋势，这可能是这些维生素促进了色素的降解。某些维生素作为辅因子不仅参与了代谢产物的合成过程，还参与了代谢产物的降解过程。例如：张晓娟等通过研究 L-丝氨酸的代谢过程，发现了添加生物素、VB_1 和 VB_6 会促进 L-丝氨酸的降解，但由于生物量的大量积累，总产量却提高了[9]。王宝贝等通过单因素法考察了维生素对红法夫酵母产虾青素的影响，发现 VB_6、烟酸和叶酸 3 种维生素虽然促进了细胞的生长，但虾青素的产量却降低了[10]。

添加了最优浓度的维生素混合液对竹黄菌的生长和色素的产量有极大的促进作用，这种促进作用是单独添加任何一种维生素都不能达到的。同样的现象也出现在螺旋霉素的研究中。叶蕊芳等研究了单独添加和组合添加 VB_1、VB_{12} 和硫辛酸对发酵合成螺旋霉素的影响，结果显示，组合添加 VB_1 和硫辛酸时，螺旋霉素产量提高了 30%[11]。因此有必要进一步研究维生素之间的相互组合对色素积累的影响，通过数据分析得到维生素的最佳组合。

参考文献：

[1] 钟树荣，赵海，李安明，等. 一种尚待开发的中药——竹黄[J].中草药，2002，33(4)：372-374.
ZHONG Shu-rong，ZHAO Hai，LI An-ming，et al. Potential TCM——*Shiraia bambusicola* [J]. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**，2002，33(4)：372-374.(in Chinese)

[2] 梁晓辉，蔡宇杰，廖祥儒，等. 药用真菌竹黄的研究进展[J]. 食品与生物技术学报，2008，27(5)：22-26.
LIANG Xiao-hui，CAI Yu-jie，LIAO Xiang-ru，et al. The progress of research on medicinal fungus *Shiraia bambusicola*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**，2008，27(5)：22-26. (in Chinese)

[3] 肖仔君，陈惠音，杨汝德. 竹红菌素[J].食品添加剂，2003(4)：74-76.
XIAO Zi-jun，CHEN Hui-yin，YANG Ru-de. Hypocrellin[J]. **China Food Additives**，2003(4)：74-76.(in Chinese)

[4] 石贵阳，张大兵，楼志华，等. 竹黄菌液态培养条件下生成竹红菌素的研究[J]. 药用生物技术，2004，11(5)：299-301.
SHI Gui-yang，ZHANG Da-bing，LOU Zhi-hua，et al. Study on fermentation hypocrellin pigments by *Shiraia bambusicola Henn* under liquid condition[J]. **Pharmaceutical Biotechnology**，2004，11(5)：299-301.(in Chinese)

[5] 陈佳佳，李兆兰，焦庆才. 竹黄无性株的液态发酵工艺研究[J]. 中药材，2005，28(12)：1049-1051.
CHEN Jia-jia，LI Zhao-lan，JIAO Qing-cai. Study on liquid fermentation of anamorph of *Shiraia bambusicola* [J]. **Journal of Chinese Medicinal Materials**，2005，28(12)：1049-1051.(in Chinese)

[6] 项小燕. 竹黄菌液态发酵条件的优化[J]. 生物技术，2010，20(4)：73-75.
XIANG Xiao-yan. Optimization of *Shiraia bambusicola P.Henn* under liquid fermentation [J]. **Biotechnology**，2010，20 (4)：73-75.(in Chinese)

[7] 刘伟忠，李聪，陈远腾，等. 苝醌类化合物总量的测定[J]. 云南化工，2000，27(2)：35-37.
LIU Wei-zhong，LI Cong，CHEN Yuan-teng，et al. Determination of total quantity of perylene quinonoids [J]. **Yunnan Chemical Technology**，2000，27(2)：35-37.(in Chinese)

[8] 张晓娟，窦文芳，许泓瑜，等. 维生素对谷氨酸棒杆菌 SYPS-062 直接发酵合成 L-丝氨酸的影响 [J]. 中国生物工程杂志，2007，27(5)：50-55.
ZHANG Xiao-juan，DOU Wen-fang，XU Hong-yu，et al. Effects of vitamins on the direct fermentative production of L-serine *Corynebacterium glutamicum* SYPS-062[J]. **China Biotechnology**，2007，27(5)：50-55.(in Chinese)

[9] 王宝贝，凌雪萍，郑宗宇，等. 维生素对红法夫酵母产虾青素的影响[J]. 厦门大学学报，2011，50(1)：111-115.
WANG Bao-bei，LING Xue-ping，ZHENG Zong-yu，et al. Effect of vitamins on astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma*[J]. **Journal of Xiamen University**，2011，50(1)：111-115.(in Chinese)

[10] 叶蕊芳，史婷婷，张燕，等. 维生素对螺旋霉素发酵的影响[J]. 化学与生物工程，2008，25(10)：64-67.
YE Rui -fang，SHI Ting -ting，ZHANG Yan，et al. Effect of vitamins on spiramycin fermentation [J]. **Chemistry &Bioengineering**，2008，25(10)：64-67.(in Chinese)

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net