

平菇转化叶黄素酯研究^{*}

彭 宏 师舞阳 李凤琦 杨 宇 陈龙胜

(中南大学资源加工与生物工程学院 湖南 长沙 410083 中南大学化学化工学院 湖南 长沙 410083)

摘要: 目前针对有关天然产物的生物转化研究较少, 首次报道了平菇转化叶黄素酯的研究。在对平菇在叶黄素酯培养基生长的观察中, 发现对于固体培养基, 菌丝体可利用叶黄素酯但不能增生, 而孢子悬液不能生长, 但在发酵液中两者生长良好, 可见只有菌丝体可分泌水解酶, 而且该酶在溶液环境下效价高。同时利用高效液相色谱测定其降解效果发现, 平菇首先将叶黄素酯转化为叶黄素, 同时也可将叶黄素转化为其它物质, 故控制发酵时间非常重要, 这为今后的工业化提供了基础。

关键词: 叶黄素酯; 平菇; 高效液相色谱; 生物转化

Research on biotransformation of lutein esters by *Pleurotus. ostreatus*

PENG Hong, SHI Wu—yang, LI Feng—qi, YANG Yu, CHENG Long—sheng

(School of Resource Processing and Biological Engineering, Central South University, Changsha 410083, Hunan, China)

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083, Hunan, China)

ABSTRACT: With regard to few reports on biotransformation of natural products this paper firstly study the biotransformation of lutein by *Pleurotus. ostreatus*(*P. ostreatus*). Mycelia can grow by use of lutein ester but not proliferate, and supernatant spores can not grow in terms of *P. ostreatus* on solid medium while both can grow well on liquid medium. So, only mycelia can secrete the extracellular enzyme which is more effective in solution. According to enzymatic hydrolysis of lutein esters by HPLC, lutein esters can be transformed to lutein, then lutein also be transformed other chemical products, so the control of fermentation time is important. These results provide research conditions for future industry application.

key words: lutein esters; *Pleurotus. ostreatus*; HPLC; biotransformation

叶黄素是一种优良的抗氧化剂, 在预防年龄相关性视黄斑退化、降低结肠癌发病率、预防心血管疾病发生等方面有着广泛应用^[1]; 同时在食品和饮料中作着色剂来调节食品和饮料的色泽^[2]; 也可作为饲料添加剂添加到家禽饲料中, 家禽食后蛋黄色泽诱人^[3]。

自然界中叶黄素主要以酯形式存在, 目前都是通过用强碱性的甲醇溶液中皂化分离得到游离态叶黄素^[2,3], 反应产率不高。同时由于大量使用毒溶剂, 造成极大的环境污染, 也使得产品难以达到食品标准。

天然产物的生物转化则利用一些可以分泌水解酶的真菌(如担子菌属)对外源化学物质解构, 具有底物选择性高, 无环境污染、反应条件温和及成本低廉等优点。J. Onken, R. G. Berger 等^[4]报道了利用紫孢侧耳(*Pleurotus. spidus*)对柠檬油的进行生物转化, 仅两天就有 97% 的底物被菌丝体富集。Holger Zom 等^[5]则系统地研究了叶黄素酯的生物转化, 作者对 26 种产水解酶微生物包括假单孢菌属、青霉、黑曲霉、假丝酵母属和担子菌属等, 发现担子菌属的紫孢侧耳(*P. spidus*)所分泌的胞外水解酶对叶黄素的降解效果明显, 但未对该酶的生化性质进行详细解释。同时也提到同属的糟皮侧耳(*Pleurotus. os-*

treatus)也可能有类似的效果, 未见后续报道。本文主要研究平菇(*P. ostreatus*)在含叶黄素酯培养基上的生长以情况和摇瓶发酵实验, 旨在初步揭示胞外水解酶的性质。

1 材料及方法

1.1 主要设备、试剂及菌种

HPLC 色谱仪: Waters 600E System controller, KNAUER K—2501 紫外可见检测器, Shimadzu C—R6A 色谱数据处理机; KNAUER Eurospher—100 C18(3.9mm×300mm, 4.6μm)色谱柱。叶黄素标准品由 sigma 公司提供; 叶黄素酯由长沙华欣科技有限公司提供。平菇(*P. ostreatus*)购自湖南师范大学生命科学学院。

1.2 培养基配方及培养条件

PDA 培养基: 马铃薯 200g, 蔗糖 20g, 水 1000mL, pH=7.0, 需要加入 2% 的琼脂配成固体培养基。

MM 培养基: NH₄NO₃ 2g, K₂HPO₄ 2g, KH₂PO₄ 1g, NaCl 0.2g, MgSO₄ 0.2g, CaCl₂·2H₂O 0.2g, 水 1000 ml, pH=7.0 121℃灭菌 20min。

叶黄素酯乳化液: 叶黄素酯 4.3g TritonX—100 162.3mL

* 基金项目: 国家创新研究群体自然科学基金项目(50321402); 湖南省自然科学基金项目(05JJ30023)

作者简介: 彭宏(1981—), 男, 硕士, 研究方向: 微生物生态学; E—mail: lvlv311@gmail.com

通讯作者: 杨宇, E—mail: csyangyu@126.com

(收稿日期: 2006—04—09 接受日期: 2006—04—28)

叶黄素酯培养基: 叶黄素酯乳化液 1.5ml (约含叶黄素酯 40mg), MM 培养基 98.5ml, 需要时加入 2% 的琼脂配成固体培养基。

培养条件: 取 100ml 培养基于 250ml 锥形瓶中, 取一定量菌体接种到培养基中, 后置于生化培养箱中静置培养或恒温振荡器中震荡培养, 转速为 150rpm, 培养温度均设定为 24℃。

1.3 转化效果的测定

每次以直径 1cm 的取样塞取在 PDA 培养基且处于成熟期的平菇试验或者是 1ml 的孢子悬液 ($1.0 \times 10^8/\text{ml}$)。每次取 1ml 经离心去除杂质的发酵液用于 HPLC 测定。

2 结果及分析

2.1 平菇在叶黄素酯培养基培养特征

试验中, 分别将平菇的菌丝体和孢子悬液接入培养基, 一般在培养 48h 后, 菌体明显开始生长呈白色絮状, 大量的孢子在菌液中生成, 取样进行显微形态观察, 主要呈带状或球状。菌液由原来的桔黄色逐渐变浅, 最终澄清。平菇在叶黄素酯液体培养基中生长情况见 Fig. 1, 说明平菇可以利用叶黄素酯做为碳源生长。

为了考察其它碳源对平菇利用叶黄素酯的影响, 另一组样品加入一定量的 (1:1) 的葡萄糖作为对照组, 经 24h 培养后观察, 未加葡萄糖的培养液颜色明显比对照组要浅, 表明菌体优先利用葡萄糖, 叶黄素酯不是其常规碳源, 需要特殊的代谢途径或分泌特殊的酶来利用叶黄素酯。

在考察平菇菌丝体在叶黄素酯固体培养基上的生长情况时, 发现与 PDA 培养基上的生长情况存在明显差异, 培养基的颜色以菌丝体为中心由浅入深 (见 Fig. 2), 特别是中心地带, 几乎呈透明色说明叶黄素酯已被利用殆尽, 但是菌丝体在培养 10 天后仍没有明显生长, 也未分生孢子, 而在 PDA 培养基上一般 3 天即布满整个平板。随后, 我们又将孢子悬液涂布道平板上 (见 Fig. 3), 在观察的 20 天间未见有平菇长出, 培养基的颜色也无变化。由上述现象可以推论, 平菇孢子不能直接利用叶黄素酯, 而菌丝体虽然可以利用, 但在非溶液环境下效率不高, 无法提供其用于生长和孢子增生的足够能源。

2.2 降解效果

为了考察平菇对叶黄素酯的降解效果, 进行平菇对叶黄素酯的摇瓶发酵试验。试验中, 分别取第 1、3、5、7 天的发酵液, 利用 HPLC 测定谱线图 (见 Fig. 4), 其中曲线 a、b、c、d 分别

表示第 1、3、5、7 天的发酵液的 HPLC 图。从图中可以发现, 第一天发酵液基本没有变化, 谱线 a 与叶黄素酯的标准 HPLC 色谱图比对一致; 而第 3 天, 谱线 b 中位置 1 的峰面积有明显提高, 而位置 2~9 的峰面积变小, 说明已有部分叶黄素酯转化为叶黄素; 从曲线 c 来看, 位置 1 的峰明显变大, 而位置 2~9 的峰消失, 但是在位置 1 前面出现其它杂质峰, 说明在此处平菇将叶黄素酯已完全分解, 而且大部分转化为叶黄素; 而对于曲线 d 位置 1 的峰面积变小, 而前面的杂质峰显著变大, 说明平菇将叶黄素也降解为其它物质。因此在这几处中效果最好的是 c 处即第五天, 可见在发酵过程中, 发酵效果与时间不成简单的线性增长关系, 而是而有一个峰值即最优点, 可见在发酵过程中时间控制非常重要。

3 结论

目前国内在天然产物的生物转化中方面所研究工作甚少。叶黄素生产工艺研究也集中在化学转化^[1], 尚未见国内关于叶黄素酯生物降解法制备叶黄素的报道。本文对平菇在叶黄素酯培养基的生长进行了描述, 揭示其孢子可能不分泌水解酶, 而菌丝体虽然可以利用, 但在非溶液环境下效率不高, 而采用液体培养可以提高水解酶对叶黄素酯的降解效率; 研究还表明: 平菇不仅可以利用叶黄素酯, 而且随着时间的延长, 也存在进一步降解叶黄素的负面效应, 因此必须合理地控制发酵时间。我们相信, 上述研究成果为今后的工业化生产具有一定的参考价值和指导意义。

参考文献

- [1] 苟劲. 叶黄素及其应用研究[J]. 重庆师范学院学报(自然科学版), 2002, 19(2): 56—59
- [2] 杜桂彩, 滕大为, 李荣贵, 等. 金盏菊中叶黄素的分离纯化及高效液相色谱的测定方法[J]. 精细化工, 2001, 18(8): 467—469
- [3] 李晓双. 叶黄素及其在鸡饲料中的应用研究[J]. 饲料研究, 2000, 5: 14—15
- [4] J. Onken, R. G. Berger. Effects of R-(+)-limonene on submerged cultures of the terpene transforming basidiomycete *Pleurotus sapidus*[J]. Journal of Biotechnology, 1999, 69: 163—168
- [5] Holger Zorn, Dietmar E. Breithaupt, Meike Takenberg etl. Enzymatic hydrolysis of carotenoid esters of marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) and red paprika (*Capsicum annum* L.) by commercial lipases and *Pleurotus sapidus* extracellular lipase[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 23: 623—628

(图 1—4 请见封 3)

(正文请见第 8 页)

平菇转化叶黄素酯研究

彭 宏 师舞阳 李凤琦 杨 宇 陈龙胜

(中南大学资源加工与生物工程学院 湖南 长沙 410083 中南大学化学化工学院 湖南 长沙 410083)

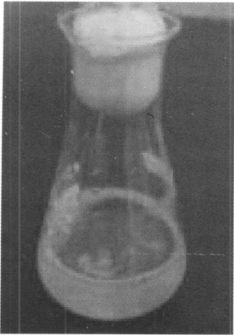


Fig.1 平菇在叶黄素酯液体培养基生长情况
Fig.1 Growth of *Pleurotus* in liquid lutein medium

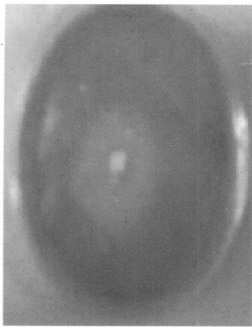


Fig.2 平菇菌丝体在叶黄素酯固体培养基生长情况
Fig.2 Growth of mycelium in solid lutein medium

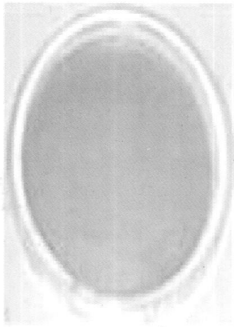


Fig.3 平菇孢子悬液在叶黄素酯固体培养基生长情况
Fig.3 Growth of spores in solid lutein medium

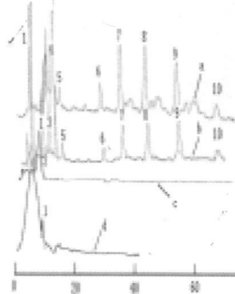


图 4 1-叶黄素,2~9 -叶黄素酯,曲线 a,b,c,d 分别表示发酵第 1、3、5、7 天的 HPLC 色谱图
Fig4 1-lutein, 2~9 -lutein esters, curves a,b,c,d represent Chromatogram of the 1、3、5、7day

(正文请见第 35 页)

分离与培养人脂肪组织间充质干细胞的研究

王乐禹 姜 平 高建华

(广东省广州市南方医科大学附属南方医院整形外科 广州 510515)

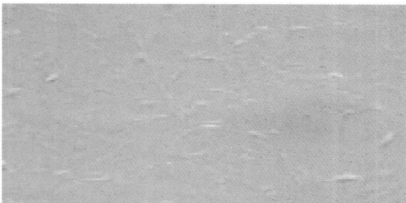


图 1 接种后 1 周, 细胞呈成纤维样贴壁生长 (光镜, $\times 10$)
Figure 1 The forms of ASCs 1 week after being culture are mainly fibroblast-like cells.($\times 10$)

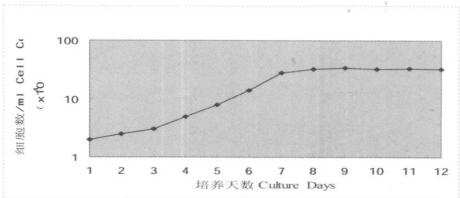


图 2 人 ASCs 生长曲线
Figure 2 Growth curves of human ASCs

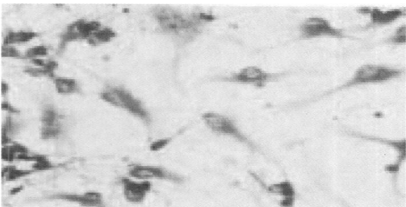


图 3 CD44 阳性细胞 (DAB, $\times 200$)
Figure 3 CD44 Positive cells($\times 200$)

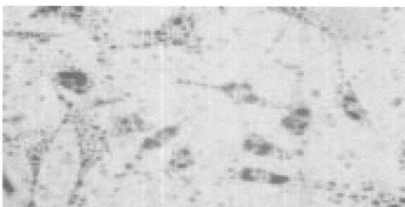


图 4 成脂诱导培养一周后油红“O”染色脂肪细胞 (相差显微镜, $\times 40$)
Figure 4 The lipocytes using red oil“O”staining after being adipogenic-inducing cultured for 1 week ($\times 40$)