

培养条件对毛霉胞内代谢产物稳定性的影响研究

史碧波

(西昌学院 轻化工程学院, 四川 西昌 615013)

【摘要】试验初步探讨了毛霉培养条件对其胞内代谢产物稳定性的影响。以单一菌株为研究对象,探讨了培养基、接种量、培养时间、培养温度、摇瓶速度等因素对菌株胞内代谢产物HPLC图谱的影响,分析各因素的影响大小,建立了规范化的培养流程:选用马铃薯制作马铃薯葡萄糖培养基,按每支 18×180 mm试管装载30 mL进行分装,灭菌后接种2 mL的孢子悬液,在温度设为 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的恒温摇床中以 150 r/min 摇瓶速度摇瓶培养4 d后取出。

【关键词】毛霉;培养条件;胞内代谢产物;高效液相色谱;中药色谱指纹图谱;相似度评价系统

【中图分类号】S688.4 **【文献标志码】**A **【文章编号】**1673-1891(2015)04-0025-04

0 引言

毛霉(*Mucor spp.*)是我国食品加工或化工生产中常利用的一类陆生真菌,但其中的某些种可能产生毒素,某些种是引起腐败或感染致病的微生物^[1],所以,从分类上弄清毛霉的种类,即准确的分类鉴定对更好利用毛霉或规避毛霉的危害至关重要。传统的毛霉分类鉴定方法是形态学结合生理生化特征^[2],但该方法不易掌握,很多有经验的微生物学家也有可能作出错误的分类鉴定结果。另一种目前常采用的方法是DNA分子鉴定,但目前对毛霉的分子鉴定还未找到最为合适的分类标记,目前最常用的ITS序列不能对多种毛霉进行分类鉴定^[3]。我们想探索HPLC检测毛霉菌丝提取物用于分类鉴定的可行性,为毛霉分类鉴定提供一种新的方法。高效液相色谱是现代较为成熟的一种分析检测手段,在中草药的分类及品质鉴定方面有众多报道^[4],在微生物的分类鉴定方面也有一些报道,如利用高效液相色谱检测细菌DNA的G+C含量、枝菌酸分析、醌类测定和多胺分析,从而达到对细菌进行分类鉴定的目的^[5]。我们设想将毛霉中的化学物质提取出来,进行HPLC检测,通过图谱的相似程度或者差异程度来判断是否是一种毛霉。这种方法可行的前提之一是在标准化培养过程中毛霉的代谢产物较为稳定。本文主要探讨培养条件,如不同培养基、不同接种量、不同摇瓶速度、不同培养温度、不同培养时间等条件对毛霉胞内代谢产物稳定性的影响,旨在建立规范化的培养条件,减少培养条件对检测结果的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

毛霉菌株: *Mucor circinelloides f. circinelloides*,

编号为CGMCC 3.4916,购自中国普通微生物菌种保藏中心。

1.2 试验试剂

(1)蛋白胨葡萄糖培养基:称取蛋白胨4 g/L,葡萄糖20 g/L,溶解后分装,用高压灭菌锅 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌20 min后待用。

(2)马铃薯葡萄糖培养基:称取去皮马铃薯200 g,切成小块放入1 000 mL水中煮20~30 min,用8层纱布过滤,取其滤液,加20 g葡萄糖溶解,定容至1 000 mL,分装,用高压灭菌锅 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌20 min后待用。

(3)流动相制备:检测时所用流动相为pH4.0的甲酸水溶液和色谱纯乙腈。流动相均经过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤。

(4)提取溶剂制备:提取溶剂为50%甲醇溶液。

1.3 试验仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪(配紫外检测器):美国Agilent公司;手提式高压杀菌锅:郑州杜甫仪器厂;VC-S-1040超净工作台:北京嘉创博远净化科技有限公司;SHA-CII水浴恒温培养摇床:金坛市华城开元实验仪器厂;ESJ200-4电子天平:沈阳龙腾电子有限公司;SHZ-D循环水式真空泵:台州市博奥真空设备有限公司;JP-C100型超声波振荡清洗仪:广州吉普超声波电子设备有限公司。

1.4 方法

将编号为CGMCC 3.4916的毛霉菌株分别在不同条件下培养获得菌丝,经处理检测后用于毛霉胞内代谢产物稳定性分析。

将保藏菌株用无菌水配制成为1万个/mL的孢子悬液,然后接种到经灭菌的培养基中按各种培养条件进行培养,一定时间后取出。将培养物过滤,

收稿日期:2015-09-08

作者简介:史碧波(1977-),男,湖北天门人,副教授,硕士,研究方向:特色资源研究与开发。

用无菌水洗涤菌丝,用无菌滤纸吸干菌丝表面水分,用液氮冷冻研磨成菌丝粉末。按质量体积比 10 : 1(mg:mL)的比例称量菌丝粉末和提取溶剂到可密封的小玻璃瓶中,在 30 ℃恒温条件下超声提取 3 h 后取出,用 0.45 μ m 的滤膜过滤待测。检测时采用配备紫外检测器的高效液相色谱仪,色谱条件为:Agilent Eclipse XDB-C8 色谱柱 (4.6 × 150 mm, 5 μ m); 流动相流速 0.6 mL/min; 流动相为 pH4.0 的甲酸水溶液和乙腈进行洗脱,洗脱程序为: 0 min: 100% 水 (pH4.0); 30 min: 5% 水 (pH4.0), 95% 乙腈; 60 min: 5% 水 (pH4.0), 95% 乙腈; 色谱柱温度 35 ℃; 检测波长 215.5 nm; 进样 20 μ L。检测后的图谱用“中药指纹图谱相似度计算软件”进行匹配^[3], 计算相似度, 比较分析各培养条件对毛霉胞内代谢产物稳定性的影响。

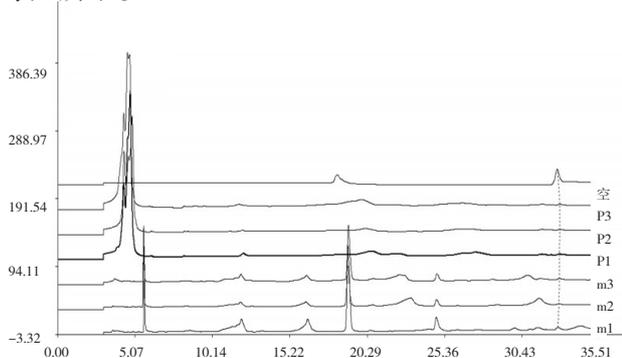
1.5 数据分析方法

在高效液相色谱配备的化学工作站软件中对所得图谱进行积分, 导出为 AIA 格式, 然后将 AIA 格式的 HPLC 图谱导入“中药指纹图谱相似度计算软件”, 该软件可以对图谱进行匹配, 得到各图谱在色谱峰的保留时间、峰面积上的匹配结果, 进一步得到各图谱的相似度^[6]。根据所得相似度进行图谱间的差异分析。

2 结果与分析

2.1 培养基对图谱的影响

选择不同地方购买或不同品种的马铃薯, 蛋白胨选择不同厂家或不同批次产品, 分别制作 3 个批次的马铃薯葡萄糖培养基和蛋白胨葡萄糖培养基, 按每支 18 × 180 mm 试管装载 30 mL 进行分装, 灭菌后接种 2 mL 的孢子悬液, 在同一摇床中 (20 ℃) 摇瓶培养 5 d 后取出, 过滤后取毛霉菌丝进行处理检测, 图谱如图 1 所示。图谱相似度结果如表 1 所示。



注: 图中 m1、m2、m3 代表 3 种不同马铃薯葡萄糖培养基; p1、p2、p3 代表 3 种不同蛋白胨葡萄糖培养基。

图 1 不同培养基的 HPLC 图谱

表 1 不同培养基的 HPLC 图谱相似度

培养基	马铃薯(1)	马铃薯(2)	马铃薯(3)	蛋白胨(1)	蛋白胨(2)	蛋白胨(3)
马铃薯(1)	1.000					
马铃薯(2)	0.720	1.000				
马铃薯(3)	0.941	0.722	1.000			
蛋白胨(1)	0.007	0.006	0.006	1.000		
蛋白胨(2)	0.005	0.016	0.010	0.168	1.000	
蛋白胨(3)	0.003	0.010	0.007	0.428	0.345	1.000

从图 1 可以很直观地看出, 马铃薯葡萄糖培养基与蛋白胨葡萄糖培养基的菌丝提取物间存在明显的差异, 表 1 的数据中二者之间的相似度在 0.003 ~ 0.016 之间, 相似度非常小, 这表明, 如果是用 2 种不同的培养基培养所得的菌丝提取物则没有可比性, 所以我们在进行 HPLC 检测菌丝提取物时一定要保证所比较的菌丝提取物都是使用一种培养基进行培养而得。

那么, 究竟选择哪一类培养基进行培养更为恰当, 这要从 2 类培养基中的组内差异来分析。不同马铃薯培养基培养物的相似度在 0.720 ~ 0.941 之间, 相似度较大, 表明用马铃薯培养基来培养的毛霉胞内代谢产物的稳定性较好; 3 种蛋白胨培养基培养物的相似度在 0.168 ~ 0.428 之间, 表明不同蛋白胨培养的毛霉胞内代谢产物的稳定性较差。所以, 相对于蛋白胨葡萄糖培养基而言, 选择马铃薯葡萄糖培养基更有利于减少培养基对毛霉胞内代谢产物的影响。这个结果也反映了标准化的培养基对微生物代谢稳定性的重要作用。

2.2 培养温度对图谱的影响

配制马铃薯葡萄糖培养基, 灭菌后接种 2 mL 的孢子悬液, 分别放在 10、20、30 ℃ 的摇床中, 摇瓶培养 5 d, 取出后分离出菌丝, 处理提取后上 HPLC 检测, 比较图谱, 分析培养温度对毛霉胞内代谢产物稳定性影响。经分析软件得相应图谱的相似度, 见表 2。

表 2 不同温度的 HPLC 图谱相似度

温度/℃	10	10	20	20	30	30
10	1.000					
10	0.980	1.000				
20	0.735	0.753	1.000			
20	0.746	0.724	0.983	1.000		
30	0.254	0.245	0.333	0.327	1.000	
30	0.243	0.240	0.342	0.320	0.897	1.000

由表 2 可以看出相同温度条件下毛霉胞内代谢产物较为稳定, 相似度在 0.897 ~ 0.983 之间, 其中以 20 ℃ 条件下最大。不同培养温度条件下毛霉胞内代谢产物变化较大, 相似度在 0.240 ~ 0.753 之间, 表明培养温度对图谱的影响较大。其中, 培养温度为

10 ℃与20 ℃的相似度为0.724~0.753,图谱相似度较大,表明在10~20 ℃之间培养的毛霉代谢物较稳定;20 ℃与30 ℃的相似度为0.320~0.342,表明在20 ℃~30 ℃之间培养的毛霉代谢物不稳定,这可能是因为毛霉多属于低温品种,其适宜生长温度一般在25 ℃以下,温度过高其生长和代谢出现异常所致。所以,我们选择培养温度在20 ℃进行规范操作,以尽量减小培养温度对图谱的影响。

2.3 接种量对图谱的影响

配制马铃薯葡萄糖培养基,灭菌后分别接入1、2、3、4、5 mL的同批次毛霉孢子悬液,在同一个摇床内(20 ℃)摇瓶培养5 d后取出,过滤后取毛霉菌丝进行处理检测,分析接种量对毛霉胞内代谢产物稳定性影响。经分析软件得相应图谱的相似度,见表3。

表3 不同接种量的HPLC图谱相似度

接种量/mL	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5
1	1.000									
1	0.965	1.000								
2	0.843	0.841	1.000							
2	0.834	0.839	0.986	1.000						
3	0.609	0.612	0.728	0.739	1.000					
3	0.611	0.603	0.736	0.742	0.981	1.000				
4	0.389	0.403	0.412	0.431	0.590	0.601	1.000			
4	0.387	0.394	0.429	0.436	0.599	0.596	0.968	1.000		
5	0.347	0.342	0.378	0.368	0.411	0.424	0.357	0.373	1.000	
5	0.338	0.349	0.371	0.373	0.420	0.419	0.368	0.367	0.962	1.000

由表3看出相同接种量条件下毛霉胞内代谢产物较为稳定,相似度在0.962~0.986之间,其中以2%接种量条件下最大。不同的接种量之间的相似度在0.338~0.843之间,说明接种量对毛霉胞内代谢产物的影响较大。表中2 mL接种量与1 mL接种量、3 mL接种量的图谱相似度都较大,所以我们选择接种2 mL进行规范操作,以便在接种量略有偏差时对图谱影响可以降到最低。

2.4 培养时间对图谱的影响

配制蛋白胨葡萄糖培养基,灭菌后接入2 mL的毛霉孢子悬液,在同一个摇床内分别摇瓶培养3、4、5、6、7 d后取出分离出菌丝,经HPLC检测,比较图谱,分析培养时间对毛霉胞内代谢产物稳定性影响。经分析软件得相应图谱的相似度,见表4。

由表4可以看出相同培养时间的毛霉胞内代谢产物较为稳定,相似度在0.965~0.993之间,其中以培养4 d条件下最大。不同的培养时间相似度在0.218~0.917之间,相似度差距较大,表明培养时间对图谱的影响较大,说明培养时间对毛霉胞内代谢产物的稳定性影响较大。其中,培养3~5 d的图谱

相似度在0.824~0.917之间,这说明培养3~5 d的菌丝代谢物较为稳定;而培养6 d、7 d的图谱相似度降低很多,可能是由于菌丝老化,其代谢物发生较大变化所致。所以,我们选择培养4 d进行规范操作,以尽量减小培养时间对图谱的影响。

表4 培养时间的HPLC图谱相似度

时间/d	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7
3	1.000									
3	0.989	1.000								
4	0.841	0.845	1.000							
4	0.849	0.847	0.993	1.000						
5	0.825	0.826	0.910	0.915	1.000					
5	0.828	0.824	0.913	0.917	0.984	1.000				
6	0.485	0.497	0.351	0.358	0.345	0.349	1.000			
6	0.489	0.493	0.363	0.355	0.341	0.347	0.967	1.000		
7	0.352	0.345	0.320	0.321	0.225	0.223	0.236	0.225	1.000	
7	0.356	0.349	0.325	0.324	0.220	0.218	0.235	0.229	0.965	1.000

2.5 摇瓶速度对图谱的影响

配制蛋白胨葡萄糖培养基,灭菌后接入2 mL毛霉孢子悬液,在20 ℃恒温器中分别在静置状态、100、150、200 r/min摇瓶培养4 d后取出,过滤后取毛霉菌丝进行处理检测,分析摇瓶速度对毛霉胞内代谢产物稳定性影响。经分析软件得相应图谱的相似度,见表5。

表5 不同摇瓶速度的HPLC图谱相似度

转速/(r·min ⁻¹)	静置	静置	100	100	150	150	200	200
静置	1.000							
静置	0.991	1.000						
100	0.909	0.908	1.000					
100	0.911	0.906	0.992	1.000				
150	0.916	0.918	0.970	0.965	1.000			
150	0.915	0.913	0.972	0.962	0.994	1.000		
200	0.914	0.912	0.966	0.967	0.970	0.969	1.000	
200	0.916	0.910	0.964	0.968	0.968	0.974	0.993	1.000

由表5可以看出,在其它培养条件相同而摇床转速不同的情况下,图谱相似度在0.906~0.974之间,说明摇床转速对毛霉胞内代谢产物的影响不大,在培养过程中不用特别在意摇床转速。虽然静止培养的图谱与其它相似度也不错,但相差略大,而且静止培养会使毛霉只在表面生长,所以我们的规范化操作还是确定在摇床中进行,控制转速在150r/min左右即可。

3 结论和讨论

试验探讨了培养过程中不同培养基、接种量、培养时间、培养温度、摇瓶速度等因素对毛霉胞内代谢产物HPLC图谱的影响,根据图谱的相似度差

异确定应该采取的规范化培养操作如下:可选用马铃薯制作马铃薯葡萄糖培养基,按每支 18×180 mm试管装载30 mL进行分装,灭菌后接种2 mL的孢子悬液,在温度设为 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的摇床中以 150 r/min 摇瓶速度摇瓶培养4 d后取出,过滤后取毛霉菌丝进行处理检测。

在对菌株进行规范化培养中,可明确看出选用

哪种培养基是最为重要的,虽然在试验比较中显示了马铃薯葡萄糖培养基培养的毛霉菌丝比蛋白胨葡萄糖培养基培养的毛霉菌丝有更稳定的代谢产物,但是马铃薯毕竟有很多不同的品种,其成分也有较大差异,可能在各地制备的马铃薯葡萄糖培养基就会体现出较大差异,这对保证代谢产物稳定不利。所以,标准化的培养基研制是必要的工作。

注释及参考文献:

- [1]罗晓妙,高玉强.高产胞外蛋白酶毛霉的筛选及酶学性质研究[J].西昌学院学报(自然科学版),2014(12):2.
- [2]廖永红,任文雅,伍松陵,等.两株酒曲毛霉的分离及Biolog微生物系统分析鉴定[J].食品工业科技,2010(1):191-193.
- [3]Walther G., Pawlowska J, Alastruey-Izquierdo A, et al. DNA barcoding in Mucorales: an inventory of biodiversity. *Persoonia*, 2013(30): 11-47.
- [4]中药指纹图谱研究技术[M].北京:化学工业出版社,2002.
- [5]姜远良.化学分类法在细菌和真菌系统分类学中的应用和发展[J].辽宁师范大学学报(自然科学版),1995(2):152-155.
- [6]谢培山.中药色谱指纹图谱[M].北京:人民卫生出版社,2005.

Effect of Culture Conditions on the Stability of Mucor Intracellular Metabolites

SHI Bi-bo

(School of Applied and Chemical Engineering, Xichang College, Xichang, Sichuan 615013)

Abstract: The influence of culture conditions on Mucor intracellular metabolites stability was investigated in this paper. A Mucor strain was cultured in different medium, by different inoculation volume, for different culture time, at different culture temperature and different shaking speed, and then the cultures were detected on HPLC after extracting by 50% methanol solution. Through analysis of HPLC fingerprints, the standardized training process was established: potato dextrose was chose to be the medium, and the medium was packed to 18×180 mm test tube (30mL/ tube). 2 mL of the spore suspension was inoculated in the medium after sterilization, and then the tube was placed in thermostatic shaker to culture for 4 d at $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 150 r/min .

Key words: Mucor; intracellular metabolites; High performance liquid chromatography (HPLC); Traditional Chinese Medicine (TCM); chromatographic fingerprint similarity evaluation system

DOI:10.16104/j.cnki.xccxb.2015.04.008