

## 三孢布拉霉结合实验

### 实验材料：

三孢布拉霉（产 $\beta$ -胡萝卜素，+菌）*Neurospora crassa* CCTCC AF 97006

三孢布拉霉（产 $\beta$ -胡萝卜素，-菌）*Neurospora crassa* CCTCC AF 96002

### 三孢布拉霉发酵产生 $\beta$ -胡萝卜素：

三孢布拉霉正负菌混合培养会增加其 $\beta$ -胡萝卜素的产量。正、负菌混合培养时属于有性生殖，正、负菌的菌丝体互相接触，可生成有性生殖促进剂三孢酸（在 $\beta$ -胡萝卜素合成过程中存在的一种酶）。此酶主要在八氢番茄红素之后起作用。三孢酸在培养基中能促进上述酶的大量产生，使得八氢番茄红素大量转化为 $\beta$ -胡萝卜素。

### 实验步骤：

- ✳ 孢子悬液的制备。在无菌条件下，分别挑取斜面培养的三孢布拉霉正、负菌接种到 60ml PDA 固体培养基的 250ml 三角瓶中，在 30℃ 恒温培养箱中培养，待菌丝长满后，将三角瓶置于 18℃ 低温下刺激 2 天，此时可以看到三孢布拉霉正、负菌的菌丝都生成大量孢子。加入 60ml 含有玻璃珠的灭菌生理盐水，180r/min 摇床振荡处理 10min。将孢子充分打散，得到孢子悬液。然后吸取 1ml 孢子悬液到灭菌的离心管中。血球计数板计数后，调整孢子浓度至  $5 \times 10^3$  个/ml。
- ✳ 将正、负菌按 1:2 的比例接种到发酵培养基中。接种量为 10%。28℃ 培养。每天对发酵液的生物量及产生 $\beta$ -胡萝卜素进行测定。

### 实验结果：

结果表明 7d 时生物量达到最大值，培养基中的糖几乎耗尽。发酵 8d  $\beta$ -胡萝卜素产量达到最大值。

### 教学建议：

- ✳ 最佳发酵条件为，初始 pH 为 6.5，装液量为 90/250ml。摇床转速为 180r/min，发酵温度 28℃。
- ✳ 发酵培养基，葡萄糖 100g/L、酵母浸粉 12g/、磷酸二氢钾 3g/L、磷酸氢二钠

3g/L、七水硫酸镁 0.5g/L。

✿ 最佳保存条件：室温保存，可用于一周教学实验。

**参考文献：**

熊力，三孢布拉霉发酵产番茄红素的代谢调控研究，华中科技大学，硕士学位论文 2012.