

天蓝色链霉菌产蓝色素的工业化培养基优化^①

张和春, 季文明, 王 武

(无锡轻工大学生物工程学院, 江苏无锡 214036)

摘要 :对天蓝色链霉菌-100 产蓝色素进行了培养基的优化,初步确定了促使蓝色素产率提高的适合生产用的培养基配方.经过 8 d 培养,蓝色素总色价相对单位可达 262.5 U/mL,比培养基优化前的总色价相对单位 160 U/mL 提高了 64%.2 L 罐发酵 6.5 d 蓝色素总色价相对单位为摇瓶水平的 75%,但产色素最高峰时间提前了 1.5 d.

关键词 :优化;蓝色素;工业化培养基;天蓝色链霉菌

中图分类号 :Q939.9;TS202.3 **文献标识码** :A

Optimization of the Industrial Medium for the Blue Pigment Fermentation by *Streptomyces coelicolor*

ZHANG He-chun, JI Wen-ming, WANG Wu

(School of Biotechnology of Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract :The composition of the industrial medium for *Streptomyces coelicolor* producing blue pigment was studied and optimized. After 8 days fermentation, the total blue pigment relatively yield of 265.2 U/mL was obtained. It is about 64% increasment compared with that from original conditions. After 6.5 days fermentation, the total blue pigment relatively yield from 2 L fermentor is about 75% of that from shaking flask, But the peak production of blue pigment was 1.5 days ahead of that from shaking flask.

Key words :optimization; blue pigment; industrial medium; *Streptomyces coelicolor*

微生物色素从微生物中提取,不受资源、环境和空间的限制,具有植物色素和动物色素所不可比拟的优越性.利用微生物发酵生产的色素种类丰富,但发酵生产蓝色素却较罕见.目前为数不多的报导^[1~4]所提及的蓝色素中,有的具有抑菌作用(主要抑制革兰氏阳性菌),如放线紫素和石蕊杀菌素;有的具有保健功能,如花青素.天然蓝色素资源的开发利用有着广阔的应用前景,选用比较廉价而又

来源广泛的原料已成为关键.本研究在利用经优化的合成培养基生成色价较高的蓝色素(其色素效价约是报道^[5]的天蓝菌素色价的 6 倍)的基础上,进一步进行生产用工业化培养基的优化.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 天蓝色链霉菌-100(*Streptomyces*

① 收稿日期:1999-07-08;修订日期:1999-11-23.

作者简介:张和春(1974 年 7 月生),男,江西吉安人,工学硕士,华东理工大学生物化工博士研究生.
万方数据

coelicolor) ,作者所在实验室保藏菌种 .

1.1.2 培养基

斜面培养基 :Soybean-mannitol agar medium^[6] .
种子培养基 :可溶性淀粉 20 g/L ,牛肉膏 2 g/L ,NaCl 0.5 g/L ,K₂HPO₄ 0.5 g/L ,MgSO₄ ·7H₂O 0.5 g/L ,FeSO₄ ·7H₂O 0.01 g/L pH 7.5 .
发酵培养基 :可溶性淀粉 20 g/L ,KNO₃ 1.5 g/L ,NaCl 0.5 g/L ,K₂HPO₄ 0.5 g/L ,MgSO₄ ·7H₂O 0.5 g/L ,MnSO₄ ·7H₂O 8.45 mg/L pH 7.5 .

1.2 仪器与设备

721 分光光度计 ;U-3000 Spectrophotometer ;HYG-Ⅱ 型回转式恒温调速摇瓶柜 2 L Fermentor .

1.3 方法

1.3.1 淀粉含量测定方法 3,5-二硝基水杨酸法^[7] .

1.3.2 含氮量的测定方法 凯氏定氮法^[8] .

1.3.3 色素发酵方法 从斜面上挑 2 环孢子到种子培养液中 ,250 mL 的三角瓶装液 30 mL ,30 ℃、回转式 200 r/min 培养 24 h ,然后以 8% 的接种量转入摇瓶中 ,30 ℃、回转式 200 r/min 培养 192 h .

1.3.4 色素效价相对单位定义 每毫升发酵液所提取的色素 ,在 pH 9 ,588 nm 下测吸光度 ,OD 值为 0.1 定义为 1 个色素效价相对单位(U/mL) .

1.3.5 色素测定和分析方法

胞外色素测定与分析方法 :发酵液离心 ,取上清液 ,将其 pH 调至 9 ,用 pH 9 的缓冲液定容至原发酵体积 ,然后于 588 nm 下测其 OD 值 .

胞内色素测定与分析方法 :发酵液离心 ,弃上清液 ,用 2% 的 SDS 溶液(pH 12 ,50 ℃) ,强烈搅拌 25 min ,离心 ,取上清液 ,将其 pH 调至 9 ,用 pH 9 的缓冲液定容至原发酵体积 ,然后于 588 nm 下测其 OD 值 .

色素总量为胞外色素与胞内色素之和 .

1.3.6 色素分泌率定义 色素分泌率为胞外色素占色素总量的百分率 .

2 结果与讨论

2.1 工业淀粉的淀粉含量和豆饼粉含氮量的测定

用 3,5-二硝基水杨酸法测得实验所用的木薯淀粉、马铃薯淀粉、甘薯淀粉和玉米淀粉的淀粉质量分数分别为 68.2% ,75.1% ,59.4% 和 58% ;以凯氏定氮法测得豆饼粉的含氮量(质量分数)为 49.2% .

2.2 几种工业淀粉对产蓝色素的影响

用上述几种工业淀粉代替发酵培养基中的可

溶性淀粉作为碳源进行摇瓶发酵 ,按照不同浓度添加 ,以比较它们对产色素的影响 .以前曾对发酵培养基进行过优化 ,在可溶性淀粉质量浓度为 20 g/L 时产色素最多^[9] .所以以 20 g/L 质量浓度的可溶性淀粉作对比 ,实验结果见图 1~4 和表 1 .可以看出 ,玉米淀粉在 20 g/L 质量浓度时色素产量最大 ,而木薯淀粉、甘薯淀粉、马铃薯淀粉在添加质量浓度为 30 g/L 时色素产量最大 ,此时这些工业淀粉生成的蓝色素的总色价相对单位都比可溶性淀粉生成的蓝色素的总色价相对单位高 ,这可能是因为工业淀粉中含有丰富的营养因子 ,促进了菌体的生长 ,增加了菌体量 ,使得胞内色素产量提高 ,从而总的色素产量增加 .添加甘薯淀粉和木薯淀粉时 ,蓝色素总色价相对单位相对于可溶性淀粉提高了 60 % 左右 ,而尤以甘薯淀粉为最佳 .

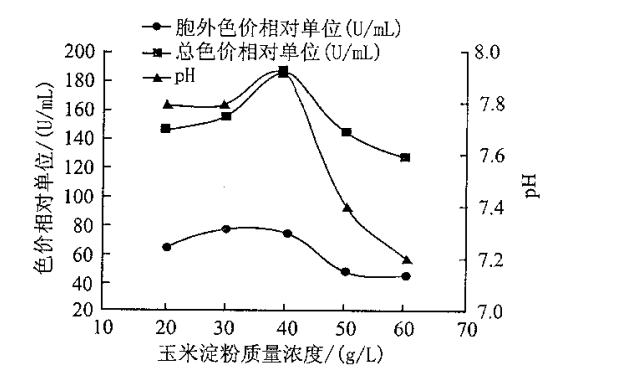


图 1 不同质量浓度的玉米淀粉对产色素的影响
Fig.1 Effect of corn starch concentration on the production of the pigment

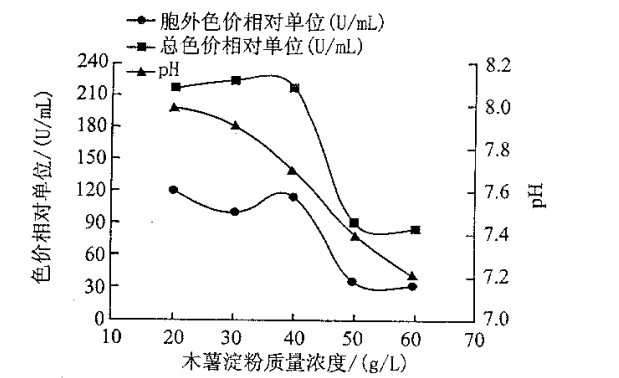


图 2 不同质量浓度的木薯淀粉对产色素的影响
Fig.2 Effect of tapioca starch concentration on the production of the pigment

2.3 工业氮源最适质量浓度的选择

以甘薯淀粉为碳源 ,添加质量浓度为 30 g/L ,然后加入不同质量浓度的豆饼粉 ,进行摇瓶优化 ,以确定豆饼粉的最适质量浓度 ,结果见图 5 .

实验结果表明 ,豆饼粉质量浓度在 7 g/L 时色

素效价达最大值 ;发酵液终了 pH 随豆饼粉添加质量浓度的增大而增大.

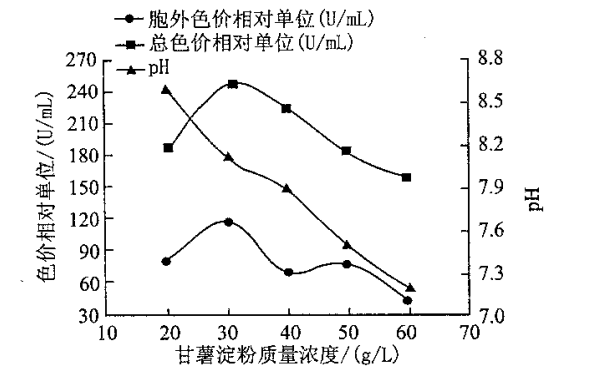


图 3 不同质量浓度的甘薯淀粉对产色素的影响
Fig.3 Effect of sweet potato starch concentration on the production of the pigment

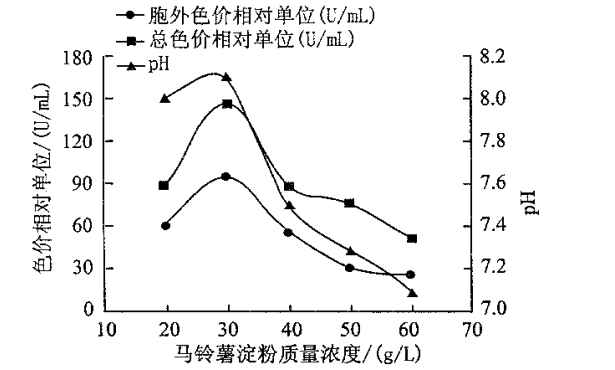


图 4 不同质量浓度的马铃薯淀粉对产色素的影响
Fig.4 Effect of potato starch concentration on the production of the pigment

表 1 可溶性淀粉摇瓶结果

Tab.1 Effect of soluble starch

序号	胞外色阶相对 单位/(U/mL)	总色价相对 单位/(U/mL)	分泌率 /%	终了 pH
1	85.2	153.2	55.6	8.0
2	85.4	160.1	53.2	8.0
3	82.4	153.8	53.7	8.0

2.4 无机盐添加的必要性

使用天然培养基时 ,其中无机盐和微量元素的含量已能满足微生物生长的需要 ,一般不需要添加^[10~12] .以 30 g/L 甘薯淀粉、7 g/L 豆饼粉为基础 ,加入不同的无机盐 ,添加质量浓度为 0.5 g/L ,以确定无机盐是否需要添加 .结果见表 2 .

从表 2 可以看出 ,无机盐的添加对产蓝色素没有影响 ,这可能是因为培养基中已含有足够的无机盐 .钾盐对色素的产率无促进作用 ,但可使色素分泌率有所提高 ,这可能是因为 K⁺ 与细胞的通透性

有关 ,K⁺ 浓度提高 ,增加了细胞的通透性 ,从而使得色素分泌率提高 .

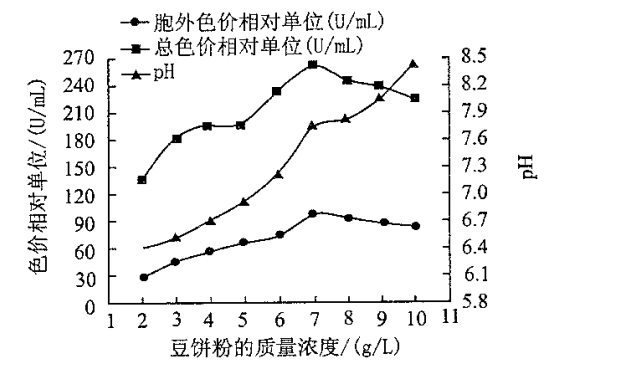


图 5 不同质量浓度的豆饼粉对产色素的影响
Fig.5 Effect of bean cake concentration on the production of the pigment

表 2 无机盐添加的必要性的确定

Tab.2 Effect of inorganic salt

无机盐	胞外色阶相对 单位/(U/mL)	总色价相对 单位/(U/mL)	分泌率 /%	终了 pH
K ₂ HPO ₄	108.2	256.2	42.2	7.9
KCl	102.1	253.5	40.3	7.8
Na ₂ HPO ₄	79.4	258.4	30.7	7.4
NaCl	75.4	252.4	30	7.2
MgSO ₄	78.8	254.3	31	7.4
不加	80.5	255.7	31.5	7.7

2.5 蓝色素产生的时间曲线

考察在上述最适条件下摇瓶发酵过程中色素的产生情况 .在不同的发酵时间取样 ,分别测其色价和发酵液 pH ,测定结果见图 6 .

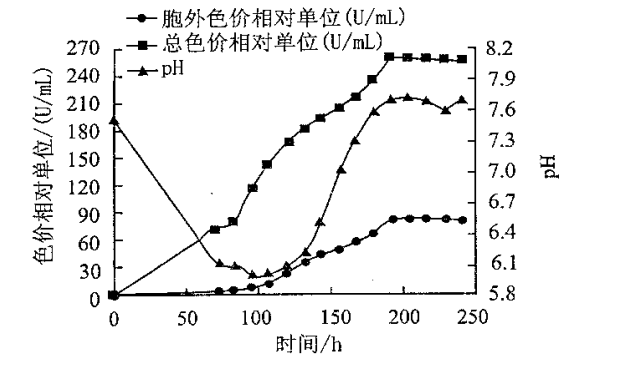


图 6 蓝色素生成的时间曲线
Fig.6 Course of the production of the blue pigment
研究表明 ,在培养到 192 h 时 ,色素总色价相对单位可达最大值 ,为 262.5 U/mL ,然后随培养时间

的延长,色价稍有下降,此时发酵液的 pH 基本趋于平衡.

2.6 蓝色素的 2 升罐发酵实验

在上述摇瓶实验的基础上,在 2 L 的台式发酵罐进行扩大发酵,验证并摸索条件,为蓝色素生产打基础.在 2 L 的罐中装 1.5 L 培养基,以接种量 8%,通风量 100 L/h,搅拌转度 300 r/min,温度 30℃进行发酵,在不同时间取样,测定色价和发酵液 pH,结果见图 7.

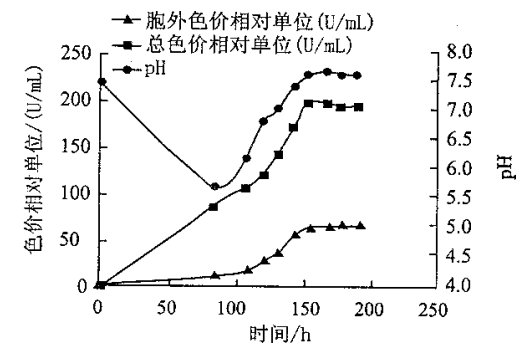


图 7 2L 罐的产蓝色素曲线

Fig.7 Curve of the bule pigment in 2 L fermentor

实验结果表明,在发酵到 156 h 时,色素总色价相对单位达最大值,为 196.7 U/mL,为摇瓶水平的 75%.此色素产量比摇瓶水平低的原因可能是搅拌桨易切断放线菌的菌丝而损伤细胞,从而造成色素产量下降,但是产色素最高峰的时间提前了 36 h,这可能是由于罐中传质好,菌体生长速度加快,从而使得产色素时间提前.色素效价到达最大值后,随着培养时间的延长,稍有下降,此时发酵液的 pH 基本趋于平衡.

3 结 论

通过优化天蓝色链霉菌产蓝色素的生产用培养基,确定了促使蓝色素产率提高的合适的培养基配方,其中甘薯淀粉 30 g/L,豆饼粉 7 g/L.不同产地的原料对蓝色素发酵产率的影响有待进一步研究.经过 8 d 发酵后,蓝色素总色价相对单位可达 262.5 U/mL,比培养基优化前的总色价相对单位 160 U/mL 提高了 64%.2 L 罐发酵 6.5 d 蓝色素总色价相对单位为摇瓶水平的 75%,但产色素最高峰时间提前了 1.5 d.

参考文献

[1] GAUSE G F. Litmocidin a new antibiotic substance produced by Proctinomycete cyaneus[J]. J Bacteriol , 1946 ,51 :649~653
[2] FRAMPTON V T , TAYLOR C F. Isolation and identification of pigment present in cultures of Actinomyces violaceus - ruber [J]. Phytopathology , 1938 28 :7
[3] BROCKMANN H , PINI H. Actinorhodin einroter Farbstoff aus Actinomyceter[J]. Naturwissenschaften , 1947 ,34 :190
[4] KRISS A E. On the pigments of actinomycetes[J]. Mikrobiologiya , 1936 ,5 :607~622
[5] 赵东红, 陆玲, 秦怀兰. 一种微生物发酵产蓝色素的稳定性及毒性研究[J]. 食品与发酵 , 1998 ,24(5) :21~24
[6] HOBBS G , FRAZER C M. Dispersed growth of Streptomyces in liquid culture[J]. Appl Microbiol Biotechnol , 1989 ,31 :272~277
[7] 张龙翔. 生化实验方法与技术[M]. 北京 :高等教育出版社 , 1987.
[8] 刘粤梅, 朱怀荣. 生物化学实验教程[M]. 北京 :人民卫生出版社 , 1997.
[9] 张和春, 王武. 天蓝色链霉菌产蓝色素的摇瓶发酵优化[J]. 食品与发酵工业 , 1999 ,25(5) :23~27
[10] 章克昌. 酒精与蒸馏酒工艺学[M]. 北京 :中国轻工业出版社 , 1995.
[11] 俞俊堂, 唐孝宣. 生物工艺学(上册)[M]. 上海 :华东理工大学出版社 , 1997.
[12] (日)山根恒夫 著. 生化反应工程[M]. 周斌 编译. 西安 :西北大学出版社 , 1992.

(责任编辑 秦和平)