

左 勇,江 鹏,叶碧霞,等. 1 株产蓝色素链霉菌发酵条件的优化[J]. 江苏农业科学,2016,44(10):455-458.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.10.131

# 1 株产蓝色素链霉菌发酵条件的优化

左 勇,江 鹏,叶碧霞,王小龙,傅 彬,杨小龙,张 晶

(四川理工学院生物工程学院,四川自贡 643000)

**摘要:**研究了 1 株产蓝色素的链霉菌 D2013 的发酵条件。在单因素试验(发酵温度、发酵时间、接种量、起始 pH 值、装液量等因素)的基础上,以正交试验优化发酵条件。结果表明,链霉菌 D2013 产蓝色素的最优发酵条件为:发酵时间 8 d、发酵温度 30 ℃、接种量 8%、装液量 100 mL/250 mL、起始 pH 值为 7.6,在此条件下,蓝色素的产量可达 74.8 U/mL。

**关键词:**链霉菌;蓝色素;发酵;正交试验

**中图分类号:** TQ920.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)10-0455-03

目前,随着合成色素在食品和化妆品等领域引起的安全问题不断被报道,以及对合成色素毒性认识的不断加深,许多合成色素已被禁止用于食品、化妆品等领域,使得相关企业不得不寻求无毒或低毒的色素代替“有毒色素”的应用。

天然色素具有无毒、无害及对人体有益等优点<sup>[1]</sup>,将逐步取代合成色素的应用。现在,市场对天然色素的需求逐渐增大,如何获得大量的天然色素以满足市场需求已成为色素领域的研究热点。微生物色素作为一种天然色素,不仅具有天然色素的着色功能,大多数微生物色素还具有保健价值和药用价值<sup>[2-7]</sup>。另外,微生物色素的生产不受资源、季节等的限制,制取工艺简单,成本相对较低,必将成为天然色素的主要来源之一。目前,利用微生物生产的天然色素种类较多、色系较齐<sup>[8-10]</sup>,但通过发酵法生产的天然蓝色素却十分罕见<sup>[11-12]</sup>,因此研究微生物发酵产蓝色素有重要的研究价值和现实意义。

本试验以链霉菌 D2013 为试验菌株,通过单因素试验和正交试验对其产蓝色素的发酵条件进行研究,以期为进一步开发该菌株产蓝色素提供基础研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种与培养基

1.1.1 菌种 链霉菌 D2013,来源于四川理工学院生物工程学院实验室。

1.1.2 种子培养基和发酵培养基 均采用高氏 1 号液体培养基<sup>[13]</sup>。

### 1.2 主要仪器与设备

SKY-2102C 恒温培养振荡器(上海苏坤实业有限公司),GZ-250-HS II 恒温恒湿培养箱(韶关市广智科技设备有限公司),UV759S 紫外可见分光光度计(上海宜有电子科技有限公司)。

### 1.3 种子的制备

挑取适量链霉菌 D2013 孢子,接种于种子培养基中,30 ℃、200 r/min,培养 24 h 后,作为种子。

### 1.4 蓝色素产量的测定方法<sup>[12]</sup>

(1)蓝色素相对效价单位定义:1 mL 发酵液所提取的蓝色素,在 pH 值为 9.0 及在 576 nm 的波长下测定吸光度,将 D 值 0.1 定义为 1 个色素效价相对单位(U/mL),简称色价。

(2)蓝色素产量的测定方法:将发酵液以 8 000 r/min 离心 10 min 后取上清。调 pH 值至 9.0,再用 pH 值为 9.0 的水溶液定容至原发酵体积,测定  $D_{576\text{ nm}}$  值,计算色价。本研究所测色素为胞外蓝色素。

### 1.5 发酵条件的研究<sup>[14-17]</sup>

本试验以高氏 1 号培养基作为发酵培养基。通过单因素试验,研究发酵时间、发酵温度、装液量、接种量和发酵起始 pH 值等因素对 D2013 产蓝色素的影响,在单因素试验的基础上,采用正交试验对发酵条件进行优化。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵温度对 D2013 产蓝色素的影响

在接种量为 10%、发酵起始 pH 值为 7.2、发酵时间为 9 d、装液量为 100 mL/250 mL 的条件下,发酵温度分别控制为 21、24、27、30、33、36、39 ℃,进行发酵试验,结果见图 1。

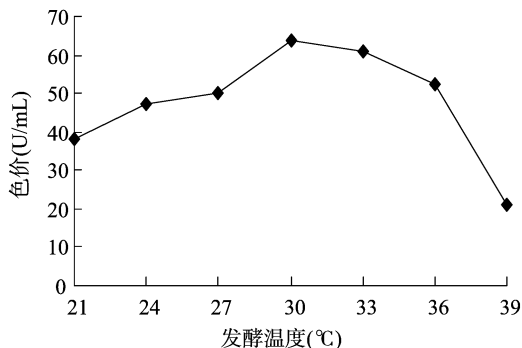


图1 发酵温度对蓝色素产量的影响

由图 1 可知,发酵温度在 21~30 ℃内,蓝色素的产量随着温度的升高而增加;当发酵温度为 30 ℃时,蓝色素的产量

收稿日期:2015-08-17

基金项目:四川省教育厅成果转化项目(编号:11ZZ016)。

作者简介:左 勇(1972—),男,重庆万州人,硕士,教授,主要从事食品工程方面的研究。E-mail:sgzuoyong@tom.com。

最高;发酵温度超过 30 ℃ 后,蓝色素的产量明显下降。原因可能是温度不但影响链霉菌的生长和代谢途径,同时还可能影响发酵培养基的理化性质(营养浓度、pH 值等)及所产蓝色素的稳定性,故发酵的最适温度为 30 ℃。

## 2.2 发酵时间对 D2013 产蓝色素的影响

在发酵温度为 30 ℃、发酵起始 pH 值为 7.2、接种量为 10%、装液量为 100 mL/250 mL 的条件下,发酵时间分别控制为 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 d,进行摇瓶发酵,结果见图 2。

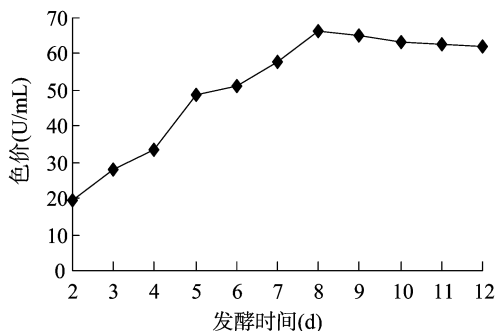


图2 发酵时间对蓝色素产量的影响

由图 2 可知,发酵时间在 2~8 d 内,蓝色素的产量随着发酵时间的增加而增加;当发酵时间为 8 d 时,蓝色素的产量最高;发酵时间超过 8 d 后,蓝色素的产量不但没有增加,反而有下降的趋势。原因在于发酵的前期,蓝色素的产量与链霉菌生长有关,随着发酵时间的增加蓝色素的产量不断增加;随着发酵时间的延长,在发酵的后期,由于营养物质的大量消耗,菌体不再产蓝色素,代谢产生的蓝色素可能在自身酶的作用下发生降解或转变为其他物质,从而使蓝色素产量减少,故最适发酵时间确定为 8 d。

## 2.3 接种量对 D2013 产蓝色素的影响

在发酵温度为 30 ℃、发酵起始 pH 值为 7.2、发酵时间为 9 d、装液量为 100 mL/250 mL 的条件下,接种量分别控制为 2%、4%、6%、8%、10%、12%、14% 进行发酵试验,结果见图 3。

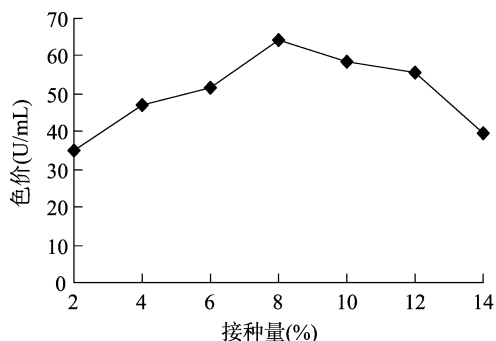


图3 接种量对蓝色素产量的影响

由图 3 可知,接种量在 2%~8% 内,蓝色素的产量随着接种量的增大而增加;当接种量为 8% 时,蓝色素的产量最高;接种量超过 8% 后蓝色素的产量显著下降。原因在于,接种量的大小将决定微生物的生长繁殖速度,会影响代谢产物的生成<sup>[15]</sup>;接种量过小,菌体的调整期长,发酵周期延长,影响发酵效率;接种量过大,营养物质消耗快,培养液的理化因

子变化快,不利于蓝色素产生,故最适接种量应为 8%。

## 2.4 装液量对 D2013 产蓝色素的影响

在 250 mL 的摇瓶中,装液量分别为 20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120 mL 的条件下,接种量控制为 10%、发酵温度为 30 ℃、发酵起始 pH 值为 7.2、发酵时间 9 d,进行摇瓶发酵试验,结果见图 4。

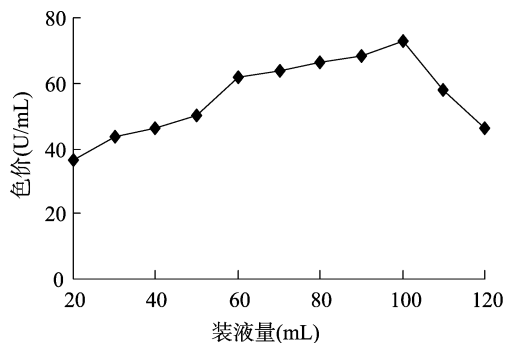


图4 装液量对蓝色素产量的影响

由图 4 可知,装液量在 20~100 mL 内,蓝色素的产量随着装液量的增加而增加;当摇瓶装液量为 100 mL 时,蓝色素的产量最高;装液量超过 100 mL 后,蓝色素的产量有下降的趋势。这是由于装液量少,营养物质含量少、发酵容积小,影响了蓝色素的产量;然而随着装液量的增加,溶氧量减小,不利于蓝色素的产生;故在 250 mL 的摇瓶中,发酵的最佳装液量为 100 mL。

## 2.5 发酵起始 pH 值对 D2013 产蓝色素的影响

在接种量为 10%、发酵温度为 30 ℃、发酵时间为 9 d、装液量为 100 mL/250 mL 的条件下,将发酵起始 pH 值分别调至 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8、8.0、8.2 进行发酵试验,结果见图 5。

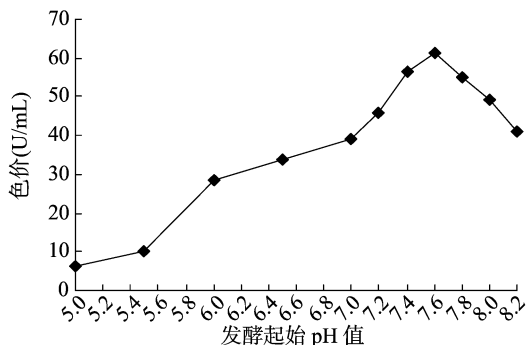


图5 发酵起始 pH 值对蓝色素产量的影响

由图 5 可知,发酵起始 pH 值在 5.0~7.6 内,蓝色素产量随 pH 值增大而增加;当 pH 值为 7.6 时,蓝色素的产量最高;pH 值超过 7.6 后,蓝色素的产量明显下降。这是由于 pH 值不仅可以影响链霉菌的生长,还可能影响蓝色素的稳定性;pH 值会影响菌株代谢所需酶的活性,pH 值过低或过高都不利于菌体生长,从而影响蓝色素的产量,故发酵的最适起始 pH 值为 7.6。

## 2.6 正交试验

在单因素研究结果基础上,按表 1 安排 5 因素 4 水平的正交试验<sup>[18]</sup>,优化发酵条件。

由表 2 可知,5 个因素对 D2013 产蓝色素的影响的主次

表 1 链霉菌 D2013 产蓝色素发酵条件正交试验因素水平

水平	因素				
	A:发酵时间(d)	B:发酵温度(℃)	C:接种量(%)	D:装液量(mL)	E:起始 pH 值
1	7	27	6	80	7.4
2	8	30	8	90	7.6
3	9	33	10	100	7.8
4	10	36	12	110	8.0

为  $D > C > B > A > E$ , 即装液量的影响最大, 接种量和发酵温度的影响次之, 发酵时间和起始 pH 值的影响较小。由表 3 可知, 因素 C 和 D 在统计学上有显著影响, 而因素 A、B 和 E 没有显著影响。综合直观分析和方差分析的结果可知, 发酵条件的最佳组合为  $A_3B_2C_2D_3E_2$ , 即控制摇床转速为 200 r/min 时, 最优发酵条件为: 发酵时间 8 d、发酵温度 30 ℃、接种量 8%、装液量 100 mL/250 mL 以及发酵起始 pH 值为 7.6, 此条件下蓝色素的产量最高。

### 2.7 验证试验

由正交优化试验结果得知最优发酵条件的组合不在 16 个试验内, 该发酵条件是否是真正最优, 还需做实际验证试验。按最优组合进行验证试验, 结果见表 4。

由表 4 可知, 正交优化后蓝色素最低产量为 74.4 U/mL, 蓝色素最高产量为 75.1 U/mL; 蓝色素的平均产量为 74.8 U/mL, 与正交试验结果中的最高产量 73.1 U/mL 在统计学上没有差异, 由此可知正交优化的试验结果可以作为链霉菌 D2013 产蓝色素的最佳发酵条件, 与优化前 (56.1 U/mL) 比较, 蓝色素的产量提高了 33.3%。

表 2 链霉菌 D2013 产蓝色素发酵条件正交试验结果

序号	发酵时间	发酵温度	接种量	装液量	起始 pH 值	色价 (U/mL)
1	1	1	1	1	1	62.1
2	1	2	2	2	2	57.3
3	1	3	3	3	3	59.7
4	1	4	4	4	4	27.1
5	2	1	2	3	4	73.1
6	2	2	1	4	3	49.7
7	2	3	4	1	2	53.9
8	2	4	3	2	1	31.6
9	3	1	3	4	2	29.2
10	3	2	4	3	1	60.9
11	3	3	1	2	4	25.7
12	3	4	2	1	3	55.3
13	4	1	4	2	3	37.4
14	4	2	3	1	4	58.3
15	4	3	2	4	1	43.1
16	4	4	1	3	2	67.2
$K_1$	206.2	201.8	204.7	229.6	197.7	
$K_2$	208.3	226.2	228.8	152.0	207.6	
$K_3$	171.1	182.4	178.8	260.9	202.1	
$K_4$	206.0	181.2	179.3	149.1	184.2	
$k_1$	51.6	50.5	51.2	57.4	49.4	
$k_2$	52.1	56.6	57.2	38.0	51.9	
$k_3$	42.8	45.6	44.7	65.2	50.5	
$k_4$	51.5	45.3	44.8	37.3	46.1	
极差 R	9.3	11.3	12.5	27.9	5.8	
因素主次	$D > C > B > A > E$					
优化方案	$A_3B_2C_2D_3E_2$					

表 3 链霉菌 D2013 产蓝色素发酵条件正交试验方差分析

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	临界值	显著性
发酵时间	240.225	3	80.075	3.209	$F_{0.05}(3,3) = 9.28$	
发酵温度	333.810	3	111.270	4.459	$F_{0.1}(3,3) = 5.39$	
接种量	427.955	3	142.652	5.716	$F_{0.01}(3,3) = 29.46$	*
装液量	2 365.535	3	788.512	31.597		**
起始 pH 值	74.865	3	24.955			

表 4 链霉菌 D2013 产蓝色素发酵条件验证试验结果

试验号	优化前的蓝色素产量(U/mL)	优化后的蓝色素产量(U/mL)
1	55.9	75.1
2	56.2	74.8
3	56.3	74.4
$\bar{x} \pm s$	$56.1 \pm 0.21$	$74.8 \pm 0.35$

## 3 结论

本试验通过单因素试验确定了发酵温度、发酵时间、装液量、接种量、发酵起始 pH 值对链霉菌 D2013 产蓝色素的影响, 在单因素试验的基础上, 以正交试验优化了链霉菌 D2013 的发酵条件。链霉菌 D2013 在固定的摇床转速 (200 r/min) 下最优发酵条件为: 发酵时间 8 d、发酵温度 30 ℃、接种量 8%、装液量 100 mL/250 mL、发酵起始 pH 值 7.6, 蓝色素的平均产量达到 74.8 U/mL。

## 参考文献:

- [1] 毛得奖, 朱亚玲. 我国天然蓝色素研究现状[J]. 中国调味品, 2011, 36(10): 109-114.
- [2] Lu L, Cui H L, Chen Y N, et al. Isolation and identification of *Streptomyces* sp. and assay of its exocellular water-soluble blue pigments[J]. Folia Microbiologica, 2002, 47(5): 493-498.
- [3] Zhu H H, Guo J, Yao Q, et al. *Streptomyces vietnamensis* sp. nov., a streptomycete with violet blue diffusible pigment isolated from soil in Vietnam[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(8): 1770-1774.
- [4] Lu Y, Wang L Y, Xue Y, et al. Production of violet pigment by a newly isolated psychrotrophic bacterium from a glacier in Xinjiang, China[J]. Biochemical Engineering Journal, 2009, 43(2): 135-141.
- [5] Zhang H C, Zhan J X, Su K M, et al. A kind of potential food additive produced by *Streptomyces coelicolor*; Characteristics of blue pigment and identification of a novel compound,  $\lambda$ -actinorhodin[J]. Food Chemistry, 2006, 95(2): 186-192.

邢芳芳,高明夫,胡兆平,等. 1株高产 IAA 菌株的筛选、鉴定及对白菜的促生作用[J]. 江苏农业科学,2016,44(10):458-460.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.10.132

# 1 株高产 IAA 菌株的筛选、鉴定及对白菜的促生作用

邢芳芳,高明夫,胡兆平,李新柱

(金正大生态工程集团股份有限公司/农业部植物营养与新型肥料创制重点实验室,山东临沂 276700)

**摘要:**从番茄根际采集的土壤中分离筛选得到 12 株产 IAA 的菌株,经复筛获得 1 株具有较好 IAA 生产能力的细菌,其发酵 24 h 产 IAA 水平达到 48 mg/L 以上,将其命名为 HB-1。通过对菌株 HB-1 的 16S rDNA 序列分析对该菌进行鉴定,并将菌株 HB-1 进行液体发酵扩繁,将得到的发酵液冲施白菜,试验其促生作用。结果表明,该高产 IAA 菌株为枯草芽孢杆菌。盆栽试验结果表明,菌株 HB-1 对白菜生长具有明显的促生作用,施加 HB-1 发酵液处理的叶绿素含量、叶片数均高于对照(CK);HB-1 发酵液处理的鲜质量、干质量与冲施清水的 CK 相比都增加,鲜质量增加 1.54~17.98 g,增幅达 1.16%~13.55%,差异达到显著水平,干质量增加 0.26~1.32 g,增幅达到 2.97%~14.92%。其中添加发酵液 1.0 mL/盆的处理组效果较好,叶绿素含量比 CK 高 5.02%,叶片数比 CK 高 15.78%,鲜质量较空白处理增加 17.98 g,增幅达 13.55%,差异达极显著水平,干质量平均增加 1.32 g,增幅达到 14.92%。

**关键词:**IAA;筛选;鉴定;枯草芽孢杆菌;促生作用

**中图分类号:**S144 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)09-0458-03

植物根际促生菌(plant growth promoting rhizobacteria,简称 PGPR)是指能够通过分泌有益物质直接或间接促进植物生长的细菌<sup>[1]</sup>。产生植物激素是根际促生细菌与植物相互作用的主要机制之一。吲哚乙酸(indole 3 acetic acid,简称 IAA)是产生调节植物生长素的信号物质,是在植物体内普遍存在的生长素物质<sup>[2]</sup>。自 1977 年科学家发现巴西固氮螺菌能合成 IAA 后,更多研究发现,土壤中约 50% 以上的细菌可

以产生 IAA<sup>[3]</sup>。筛选具有产生 IAA 的微生物可为促生生物肥料的研发等提供出发菌株。

本研究对番茄根际产 IAA 菌株进行分离、鉴定及盆栽促生效果研究,以期对开发高效根际促生菌剂、生物肥料资源提供生物学支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 土壤样品

在山东省寿光市采集同一区域内生长情况良好的番茄根际范围的土壤。采样过程中,首先剥离土壤表面覆盖的凋落物,然后剔除石块等杂物,最后使用灭菌采样铲采集 10~20 cm 深的土壤样品装于灭菌袋中,带回实验室后置于 4℃ 冰箱保存,及时分离。

### 1.2 培养基

牛肉膏蛋白胨培养基:5.0 g 牛肉膏,10.0 g 蛋白胨,

收稿日期:2015-09-14

基金项目:山东省科技重大专项(新兴产业)(编号:2015ZDX0502B02)。

作者简介:邢芳芳(1982—),女,山东临沂人,硕士研究生,工程师,主要从事新型肥料研发及其施肥研究。Tel:(0539)7198803;E-mail:xingfangfang@kingenta.com。

通信作者:李新柱,博士研究生,工程师,主要从事新型肥料研发及其施肥研究。Tel:(0539)7198803;E-mail:lixinzu@kingenta.com。

[6] Venil C K, Zakaria Z A, Ahmad W A. Bacterial pigments and their applications[J]. Process Biochemistry, 2013, 48(7):1065-1079.

[7] Bae J, Moon H, Oh K K, et al. A novel bioreactor with an internal adsorbent for integrated fermentation and recovery of prodigiosin-like pigment produced from *Serratia* sp. KH-95[J]. Biotechnology Letters, 2001, 23(16):1315-1319.

[8] 张爱梅,牛世全,达文燕,等. 一株产绿色素放线菌的初步鉴定及其色素稳定性的检测[J]. 西北师范大学学报:自然科学版, 2010, 46(3):89-93.

[9] Velmurugan P, Kamala-Kannan S, Balachandrar V, et al. Natural pigment extraction from five filamentous fungi for industrial applications and dyeing of leather[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 79(2):262-268.

[10] Moselio S. Encyclopedia of microbiology[M]. Third edition. San Diego California: Academic Press, 2009:457.

[11] 张和春,季文明,王武. 天蓝色链霉菌产蓝色素的工业化培养基优化[J]. 无锡轻工大学学报, 2000, 19(2):138-141.

[12] 李一苇. 产蓝色素链霉菌的鉴定和蓝色素发酵条件及性质的研究[D]. 合肥:安徽农业大学, 2008.

[13] 沈萍,陈向东. 微生物学实验[M]. 4版. 北京:科学出版社, 2007:15-20.

[14] 全桂静,孙海娟. 蓝色素的发酵条件和特性的研究[J]. 中国食品添加剂, 2012(6):128-133.

[15] 姚汝华,周世水. 微生物工程工艺原理[M]. 2版. 广州:华南理工大学出版社, 2005:204-206.

[16] 范维,韦默池,徐建静,等. 产蓝色素细菌发酵条件的优化[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(11):346-348.

[17] 陆玲,孙延涛,唐勇,等. 一种放线菌发酵产天然蓝色素的研究[J]. 微生物学通报, 2001, 28(4):149-155.

[18] 李云雁,胡传荣. 试验设计与数据处理[M]. 2版. 北京:化学工业出版社, 2008:124-159.