

链霉菌 G-HD-4 产黑色素发酵条件的优化

郑晨娜¹, 罗婉妹¹, 陈慧勤¹, 吴晓岚¹, 方柏山²

(1. 泉州医学高等专科学校基础医学部, 福建 泉州 362000; 2. 厦门大学化学化工学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 为提高链霉菌 G-HD-4 的黑色素产生量, 以 L-酪氨酸为底物, 对该菌种产黑色素的工艺条件进行研究, 通过单因素试验和均匀设计试验, 得到最佳产黑色素的发酵条件为: 马铃薯 15g/100mL、乳糖 2.5g/100mL、干酪素 2.07g/100mL、MgSO₄ 0.11g/100mL、KH₂PO₄ 0.25g/100mL、L-酪氨酸 0.25g/100mL、以接种量为 6%(体积分数), 培养基起始 pH 值为 6.0, 装液量为 25mL, 28℃, 150r/min 振荡培养 5d, 黑色素产量可达(13.4 ± 0.05)g/L, 比在基础培养基中的黑色素产量(5.78g/L)提高约 2.3 倍。

关键词: 链霉菌 G-HD-4; 黑色素; 发酵; 均匀设计

Optimal Fermentation Conditions for Melanin Production by *Streptomyces* G-HD-4

ZHENG Chen-na¹, LUO Wan-mei¹, CHEN Hui-qin¹, WU Xiao-lan¹, FANG Bai-shan²

(1. Department of Basic Medical Science, Quanzhou Medical College, Quanzhou 362000, China;

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361021, China)

Abstract: In order to improve melanin production by *Streptomyces* G-HD-4 fermentation, the optimal conditions for fermenting L-tyrosine by this strain were investigated by single factor and uniform design methods. The optimal medium compositions (on the basis of 100 mL medium) were 15 g potato, 2.5 g lactose, 2.07 g casein, 0.25 g KH₂PO₄, 0.11 g MgSO₄, and 0.25 g L-tyrosine. The optimal fermentation process was that 25 mL of medium was contained in a 250 mL flask for 5-day fermentation at initial pH 6.0, 28℃ and 150 r/min shaking speed. As a result, the maximum melanin yield reached up to (13.4 ± 0.05) g/L, approximately 2.3 times higher than that obtained using preoptimization fermentation medium.

Key words: *Streptomyces* G-HD-4; melanin; fermentation; uniform-design

中图分类号: TQ920.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)13-0228-05

黑色素(melanin)是一类广泛分布于动物、植物、微生物中的构造不规则的高分子化合物^[1-3],它是通过多羟基酚(通常结合着蛋白)氧化而成的类多酚聚集体^[4]。由于许多合成色素对人体有一定的危害性,有的甚至致癌,天然色素因其食用安全性越来越受到人们的青睐^[5]。从动物或者植物体内提取的黑色素,虽然对人体没有危害性,但因其生产过程繁琐,生产成本高等缺点而难以大规模生产。微生物所产黑色素一般是由体内的酪氨酸酶催化酪氨酸形成 L-多巴,再经一系列氧化过程而形成,属于氨基酸的衍生物,具有无毒、无害、产品稳定性好的特点。而且,产黑色素的微生物资源丰富,生产工艺简单,便于实现工业化生产,因此黑色素发酵技术的研究越来越得到广泛重视^[6-8]。本实验室从校园香蕉林的土壤中分离到一株高产胞外黑色素的链霉菌(*Streptomyces*)G-HD-4,为将该菌株应用于黑色素的工业化生产,本实验考察该链霉菌 G-HD-4 黑色素产生规律

和发酵条件,通过单因素试验和均匀设计试验,优化链霉菌 G-HD-4 产黑色素的工艺条件。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

链霉菌(*Streptomyces*)G-HD-4 从华侨大学香蕉林的土壤中分离得到。

1.1.2 培养基

菌种保藏培养基:高氏一号培养基;种子培养基:KH₂PO₄ 2g、MgSO₄·7H₂O 0.8g、CaCl₂ 0.3g、胰蛋白胨 5.0g、酵母抽提物 3.0g、葡萄糖 10g、马铃薯 200g、用水定容至 1L, pH6.0;基础发酵培养基:培养基 A:葡萄糖 10g、马铃薯 200g、(NH₄)₂SO₄ 10g、KH₂PO₄ 3g、MgSO₄·7H₂O 1.5g、L-酪氨酸 1.0g、用

收稿日期:2009-10-12

作者简介:郑晨娜(1978—),女,助教,硕士,研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail:nanaz_0@126.com

水定容至 1L, pH5.9; 培养基 B: 葡萄糖 1.2g、(NH₄)₂SO₄ 1.3g、K₂HPO₄ 1g、CaCO₃ 3g、MgSO₄ · 7H₂O 0.56g、pH 7.0; 培养基 C: 葡萄糖 2g、(NH₄)₂SO₄ 5g、K₂HPO₄ 7g、KH₂PO₄ 3g、NaCl 5g、MgSO₄ · 7H₂O 1g、用水定容至 1L, pH7.0; 培养基 D: 葡萄糖 1.0g、蛋白胨 5.0g、NaCl 5.0g、CaCl₂ 0.1g、L-酪氨酸 1.0g、用水定容至 1L, pH7.0; 培养基 E: 马铃薯 200g、葡萄糖 20g、KH₂PO₄ 3g、MgSO₄ · 7H₂O 1.5g、胰蛋白胨 5g、L-酪氨酸 1g、琼脂粉 20g、用水定容至 1L, pH6.0; 培养基 F: 蛋白胨 10g、葡萄糖 1.0g、NaCl 5g、CaCl₂ 0.1g、干酪素 5.0g、L-酪氨酸 1.0g、琼脂粉 20g、用水定容至 1L, pH7.0。

1.2 方法

1.2.1 培养方法

取两块直径 5mm 的斜面活化菌种接入装有 50mL 种子培养基的 250mL 三角瓶中, 同时瓶内装有直径 5~6mm 的玻璃珠 20~30 粒, 30、150r/min 条件下培养 3d。在装有 50mL 基础培养基的 250mL 三角瓶内接入种子液, 30、150r/min 条件下培养, 定期测定菌体干质量及黑色素产量。

1.2.2 黑色素产量测定

将发酵液于 4000r/min 离心 20min, 去菌体, 取上清液用 6mol/L 的 HCl 溶液调至 pH2~3, 静置过夜, 于 12000r/min 离心 16min。取沉淀于 60℃ 烘箱烘干称质量。

1.2.3 菌体干质量测定

发酵液经滤布过滤, 菌体沉淀置 80℃ 烘至质量恒定, 称质量。

2 结果与分析

2.1 不同基础培养基对链霉菌 G-HD-4 产黑色素能力的影响

将菌株 G-HD-4 接种到种子培养基, 30 摇床振荡培养 3d, 按体积分数 2% 的接种量分别接种到 6 种不同的基础培养基内, 30、150r/min 振荡培养 5d 后测定黑色素产量, 结果见表 1。

表 1 不同基础培养基对链霉菌 G-HD-4 产黑色素能力的影响
Table 1 Effect of various media on melanin yield

基础培养基	菌体干质量浓度/(g/L)	黑色素产量/(g/L)	OD _{400nm}	pH
A	3.92	4.88	8.07	5.14
B	2.57	0.00	0.13	6.85
C	0.95	0.02	0.17	6.56
D	4.29	1.29	3.38	8.41
E	5.15	5.79	8.76	6.01
F	1.95	2.70	7.10	8.31

在相同培养条件下, 比较了菌株 G-HD-4 在 6 种不

同培养基上产黑色素的能力和菌丝生长情况。在这 6 种培养基中, 碳源均为葡萄糖, 这些培养基的最大差异在于氮源和底物的存在与否。培养基 D 是广泛采用的产黑色素发酵培养基。其中 B、C 培养基以无机盐作为唯一氮源, 并且没有 L-酪氨酸作为底物, 其他 4 种培养基均有 L-酪氨酸作为底物存在。

由表 1 可见, 在没有 L-酪氨酸的 B、C 培养基中虽然有菌的生长, 但是黑色素的产量极少, 说明该菌要在 L-酪氨酸的诱导下才产生黑色素, 这是由于黑色素的产生是以 L-酪氨酸作为底物, 在 L-酪氨酸酶和氧气的存在下氧化而成的。而在 A、E 培养基中, 营养因子较为丰富, 菌丝生长良好, 黑色素的产量较高。这是由于马铃薯及胰蛋白胨中含有一定量游离的 L-酪氨酸, 所以在以马铃薯和胰蛋白胨为氮源的 E 培养基中, 黑色素产量最高, 可以作为菌株 G-HD-4 产黑色素的基础培养基。

2.2 链霉菌 G-HD-4 最佳培养时间的选择

以培养基 E 为基础培养基对链霉菌进行液体培养, 每日定时取样测定黑色素产量、菌体干质量和 pH 值, 结果如图 1。

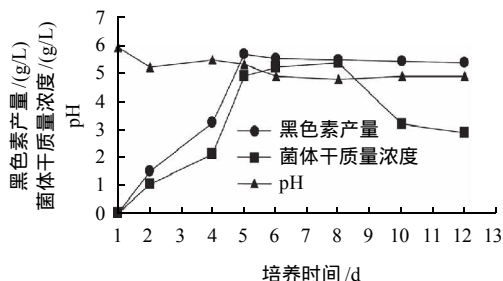


图 1 链霉菌 G-HD-4 生长曲线与黑色素的产量曲线

Fig.1 Growth curve of Streptomyces G-HD-4 and production curve of melanin

在培养过程中, 发酵效果的优劣不仅与培养基组成有关, 还与菌体自身的生理性状有关。随着培养时间的延长, 菌体生物量会逐渐增加, 但是菌体繁殖到一定程度后, 由于营养物质消耗和代谢产物积累, 菌体逐渐趋于老化。

由图 1 可见, 菌体培养的第 2 天, 便有黑色素产生; 随着菌体的生长, 黑色素的产量就越来越多。当培养到第 5 天时, 黑色素的产量达到最大, 之后到达产量增长平台期。而菌株到达第 8 天时才开始停止生长, 说明在第 5 天时培养基的 L-酪氨酸已经完全转化成了黑色素, 而培养基中的营养因子还可以促使菌体的生长, 直到营养消耗完毕, 在第 8 天之后, 由于菌体老化, 菌体干质量开始下降, 从而使得菌体的生物量与产黑色素量之间不成正比。在整个发酵过程中, 由于菌体的

快速生长,使得葡萄糖被利用而产酸,所以发酵液的pH值略呈现下降趋势。

2.3 链霉菌 G-HD-4 产黑色素的培养基条件

2.3.1 碳源对链霉菌 G-HD-4 产黑色素的影

碳源是构成菌体成分的重要元素,是细胞内贮藏物质和生成各种代谢产物(包括酶类)的骨架,也是微生物生长的主要能量来源。按 2% 的接种量分别接种到基础培养基 E 内,250mL 摇瓶装液量为 50mL,30、150r/min 振荡培养 5d 后测定黑色素产量,以不同碳源取代基础培养基 E 中的葡萄糖,考察它们对合成黑色素和菌体生长的影响。

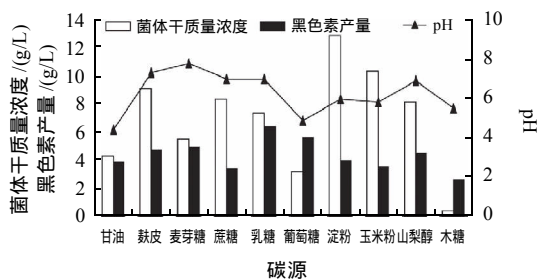


图2 不同碳源对黑色素产量和菌体生长的影响

Fig.2 Effect of carbon source type on melanin yield and mycelium growth

由图2可以看出,菌体的干质量与黑色素的产量并没有呈现正比关系。以淀粉作为碳源时,菌体生长量较大,但是黑色素的产量并不是很高;但以乳糖做为碳源时,其黑色素产量达到最高(6.3g/L),且菌体生长适中;而以蔗糖和木糖作为碳源时,黑色素的产量最低。因此,选择乳糖作为基础培养基的主要碳源。

2.3.2 氮源对链霉菌 G-HD-4 产黑色素的影

以乳糖为碳源的基础培养基 E 作为对照,用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4Cl 、 NH_4NO_3 、乙酸铵、蛋白胨、干酪素、尿素、酵母粉、牛肉膏替换其中的氮源,将链霉菌 G-HD-4 按 2% 接种量接种到发酵培养基中,250mL 摇瓶装液量为 50mL,在 30、150r/min 振荡培养 5d,测定黑色素产量,结果见图 3。

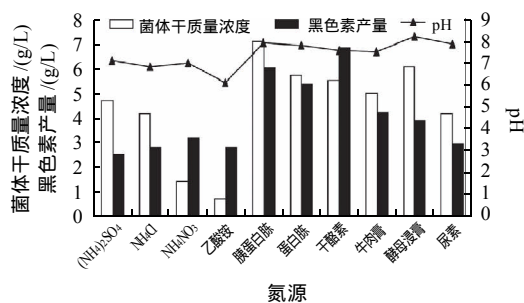


图3 不同氮源对黑色素产量和菌体生长的影响

Fig.3 Effect of nitrogen source type on melanin yield and mycelium growth

从图3可以看出,以胰蛋白胨、蛋白胨、干酪素、牛肉膏和酵母浸膏为氮源,均可促进菌体的正常生长,但黑色素的产量有所不同。有机氮源对黑色素产量的影响明显大于无机氮源。以干酪素为氮源,其黑色素的产量最高,这有可能是因为干酪素中含有大量游离的 L-酪氨酸,促进了黑色素的合成。此外,菌丝体的生长量与黑色素的产量不呈正相关,酵母浸膏能较好地促进菌丝体生长,但黑色素产量不高,这是由于酵母浸膏的存在过度地促进菌丝体生长繁殖,消耗了大量的营养物质,对黑色素的合成不利。所以,以干酪素作为该菌的最佳氮源。

2.3.3 最佳底物诱导物的选择

按照不同的初始底物,可将黑色素分为:多巴黑色素、-谷氨酰基-3,4-二羟基苯(GDHB)黑色素、儿茶酚黑色素、1,8-二羟基萘(DHN)黑色素、杂合黑色素^[9-10]。多数真菌和其他微生物的黑色素是由酪氨酸经多巴合成而来。*Basidiomycotina*(担子菌)细胞壁黑色素由 GDHB 或儿茶酚作为中间酚前体。子囊菌(*Ascomycotina*)和一些半知菌(*Deuteromycotina*)通过五酰基酮亚胺途径,以 DHN 为黑色素前体^[11]。本实验以不同的底物(质量浓度 0.1mg/100mL)替代以干酪素为氮源、乳糖为碳源的基础培养基 E 中的 L-酪氨酸。以 2% 的接种量接种于 250mL 摇瓶中,30、150r/min 培养 5d 后测定黑色素的产量以及菌体干质量,结果如图 4。

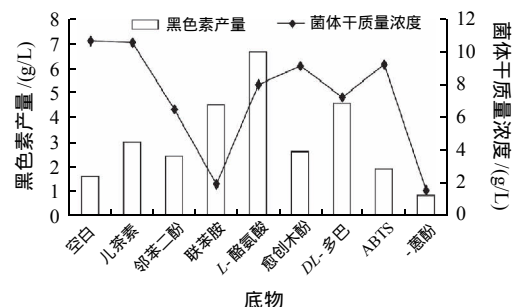


图4 不同诱导物对黑色素的产量和菌体生长的影响

Fig.4 Effect of inducer type on melanin yield and mycelium growth

广义上的多酚氧化酶包括酪氨酸酶、儿茶酚酶和漆酶。漆酶作用的底物较为广泛,能氧化邻苯二酚、间苯二酚、对苯二酚、单酚和氨基酚等;酪氨酸酶能催化单酚邻位羟基为邻苯二酚,催化邻苯二酚为酮;儿茶酚酶主要催化酚形成酮。从图4可以看出,未加底物的基础培养基 E 中其菌体生长量适中,但是其黑色素产量很低,在加入 -萘酚的培养基中不适合菌株的生长且黑色素的产量最少。以 L-酪氨酸和 DL-多巴为底物的培养基中,黑色素的产量较高并且适合菌体的生长。考

考虑到成本问题，选择以 *L*-酪氨酸作为黑色素合成的底物。

2.4 链霉菌 G-HD-4 产黑色素的发酵条件

2.4.1 发酵培养基的 pH 值选择

采用优化的碳源、氮源以及底物，基础培养基 E 的其他成分不变，按 2% 接种量接种到发酵培养基中，250mL 摇瓶装液量为 50mL，在 30、150r/min 振荡培养 5d，考察不同起始 pH 值对菌株产黑色素的影响。分别测黑色素的产量以及菌体生长情况，结果如图 5 所示。

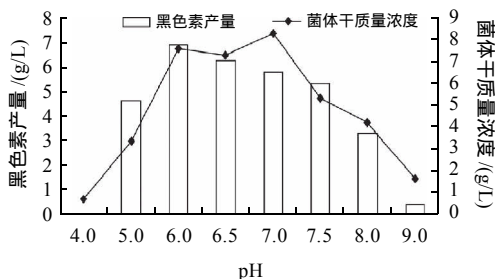


图 5 pH 值对黑色素的产量以及菌体生长的影响

Fig.5 Effect of initial pH on melanin yield and mycelium growth

由图 5 可见，pH 值为 4 和 9 时，菌体几乎不能生长，发酵液澄清且少量菌丝体出现；当 pH 值为 6 时，菌体生长适中，黑色素的产量达到最高(6.89g/L)；pH7 时，菌体生长量达到最大，但黑色素的产量明显下降。

2.4.2 最佳培养基通氧量的选择

不同微生物对氧的需要量不同。供氧过少，达不到临界氧浓度，抑制微生物的正常生长代谢；供氧过多不仅造成浪费，而且还可能会改变代谢途径。基础培养基 E 的其他成分不变，考察不同装液量对菌株产黑色素的影响。以 2% 的接种量，在 30、150r/min 振荡培养 5d 后，测定黑色素产量，结果见图 6。黑色素的产生是底物 *L*-酪氨酸经酪氨酸酶氧化而来，整个反应过程需要大量的氧参与。由图 6 可见，通氧量越大则黑色素的产量越高，所以选择 25mL 为最佳的摇瓶装液量。

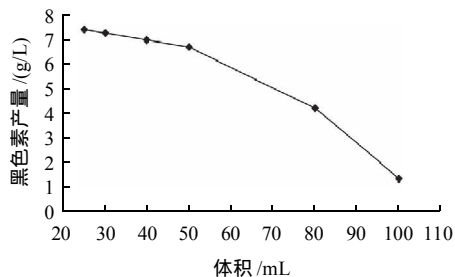


图 6 通氧量对黑色素产量的影响

Fig.6 Effect of oxygen amount on melanin yield

2.4.3 最佳培养温度的选择

在上述基础培养基 E 优化的基础上，分别选择 25、28、30、35、37、40 为培养温度，考察温度对菌株 G-HD-4 产黑色素的影响，结果见图 7。

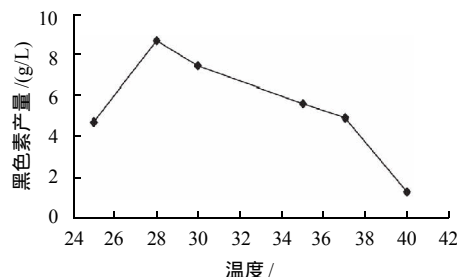


图 7 培养温度对黑色素产量的影响

Fig.7 Effect of cultivation temperature on melanin yield

由图 7 可见，在 28 时，黑色素的产量最高，为 8.67g/L。当温度升高到 40 时，菌体不再生长，发酵液澄清，几乎不产生黑色素。

2.4.4 最佳接种量的选择

接种量太低，会延长繁殖时间，增加染菌的几率，且在液体振荡培养时容易形成大的紧密压缩的菌丝体，使氧的传递和营养物质的吸收受阻，对黑色素的合成不利。接种量过大，菌体生长过快，发酵液非常黏稠，造成基质营养传递受阻，溶氧不足，从而抑制黑色素的形成。将链霉菌 G-HD-4 以 2%、4%、6%、8%、10%、12% 的接种量接种到最佳氮源、最佳碳源、pH6.0 的发酵培养基中，在 28、150r/min 振荡培养 5d 后测定黑色素产量，结果如图 8。

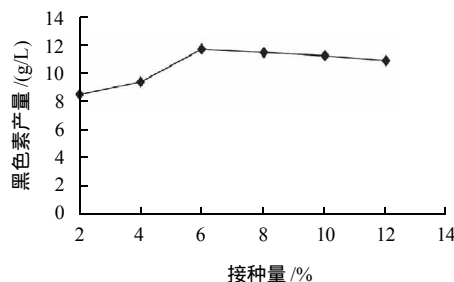


图 8 接种量对黑色素产量的影响

Fig.8 Effect of inoculum amount on melanin yield

由图 8 可知，当接种量为 6% 时黑色素产量最高，为 11.7g/L，接种量超过 6% 时黑色素的产量基本不变。

2.5 链霉菌 G-HD-4 最适产黑色素发酵培养基的均匀设计法优化

2.5.1 均匀设计法优化培养基配方结果

综合考虑制约链霉菌 G-HD-4 产黑色素发酵的各种影

响因子,以乳糖、干酪素、土豆、 KH_2PO_4 、 MgSO_4 、 L -酪氨酸的质量浓度为重点考察对象,培养基初始 pH 值为 6.0,以 6% 的接种量在 250mL 摇瓶装液量为 50mL, 28、150r/min 的培养条件下,应用 DPS 统计软件的试验设计功能,以中心化偏差为均匀性度量指标,经过计算机多次运行寻优获得 6 因素 12 水平处理的均匀设计方案,试验设计及结果如表 2。

表 2 发酵产黑色素培养基配方的均匀设计 $U^{*12}(6^{12})$ 试验结果
Table 2 Uniform design for optimizing fermentation medium and experimental results

试验号	因素						黑色素产量/(g/L)
	X_1 马铃薯/(g/100mL)	X_2 乳糖/(g/100mL)	X_3 干酪素/(g/100mL)	X_4 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /(g/100mL)	X_5 KH_2PO_4 /(g/100mL)	X_6 L -酪氨酸/(g/100mL)	
N1	25	1.7	2.5	0.05	0.15	0.15	5.33
N2	17	2.2	1.2	0.01	0.07	0.08	7.95
N3	20	1.9	1	0.13	0.35	0.02	3.43
N4	13	1.5	0.1	0.23	0.13	0.06	1.53
N5	5	0.4	1.6	0.07	0.17	0.04	7
N6	9	2.4	2	0.19	0.21	0.1	11.33
N7	22	0.2	0.7	0.15	0.09	0.12	4.8
N8	11	1	1.8	0.11	0.05	0.25	9.88
N9	15	2.5	0.3	0.09	0.19	0.2	3.7
N10	7	0.8	0.5	0.03	0.3	0.14	2.73
N11	19	0.6	1.4	0.21	0.25	0.19	8.46
N12	0	2	0.9	0.17	0.11	0.17	3.23

2.5.2 试验数据的回归分析及回归方程的验证

试验结果用 DPS 软件经二次多项式逐步回归得到回归方程如下:

$$Y = 0.0366 - 0.0021X_1 - 0.4142X_4 + 0.00003X_1^2 + 0.7894X_4^2 + 0.01311X_1X_4 + 0.0378X_2X_6 + 0.0674X_3X_4 - 0.0064X_3X_5 - 0.3482X_5X_6$$

线性相关系数 $R=0.9995$, $F=232.7145$, $P=0.0043$, 剩余标准差(s)=0.0005。由该模型得到的链霉菌 G-HD-4 最适产黑色素的培养基组成为:马铃薯 15g/100mL、乳糖 2.5g/100mL、干酪素 2.07g/100mL、 MgSO_4 0.11g/100mL、 KH_2PO_4 0.25g/100mL、 L -酪氨酸 0.25g/100mL 时,黑色素产量最大为 13.7g/L。

根据以上配方配制培养基,进行 3 次重复发酵实验,结果黑色素产量达 (13.4 ± 0.05) g/L。实测值与预测值之间无显著差异,比基础培养基的产黑色素产

量(5.78g/L)提高约 2.3 倍,说明该培养基配方较佳。

3 结 论

本实验确定基础培养基 E 作为链霉菌 G-HD-4 产黑色素培养基,通过单因素试验和均匀设计试验,最后确定链霉菌 G-HD-4 产黑色素的最佳工艺条件为:马铃薯 15g/100mL、乳糖 2.5g/100mL、干酪素 2.07g/100mL、 MgSO_4 0.11g/100mL、 KH_2PO_4 0.25g/100mL、 L -酪氨酸 0.25g/100mL、接种量 6%、pH6.0、装液量 25mL, 28、150r/min 培养 5d,黑色素产量可达 (13.4 ± 0.05) g/L,较在基础培养基 E 的黑色素产量(5.78g/L)提高约 2.3 倍。

参 考 文 献 :

- [1] FOGARTY R V, TOBIN J M. Fungal melanins and their interactions with metals[J]. *Enzyme Microb Technol*, 1996, 19(4): 311-317.
- [2] HALAOULI S, ASTHER M, SIGOILLOT J C, et al. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 100: 219-232.
- [3] NOSANCHUK J D, CASADEVALL A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis[J]. *Cell Microbiol*, 2003, 5(4): 203-223.
- [4] BABITSKAYA V G, SHCHERBA V V. The nature of melanin pigments of several micro- and Macromycetes[J]. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 2002, 38(3): 286-291.
- [5] WANG Hengshan, PAN Yingming, TANG Xujie, et al. Isolation and characterization of melanin from osmanthus fragrans seeds[J]. *LWT*, 2006, 39: 496-502.
- [6] AGODI A. Study of a melanic pigment of proteus mirabilis[J]. *Res Microbiol*, 1996, 147: 167-174.
- [7] MACKINTOSH J A. The antimicrobial properties of melanocytes, melanosomes and melanin and the evolution of black skin[J]. *J Theor Biol*, 2001, 21(1): 101-113.
- [8] SIMPSON T J, WEERASOORIYA M K B. NMR studies of tautomerism in the fungal melanin biosynthesis intermediate 1,3,8-trihydroxynaphthalene[J]. *J Chem Soc Perkin Trans*, 2000(1): 2771-2775.
- [9] LEWIS F, GIBSON A M G. Melanin and novel melanin precursors from *Aeromonas media*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 169: 261-268.
- [10] NOSANCHUK J D, CASADEVALL A. The Contribution of melanin to microbial pathogenesis[J]. *Cellular Microbiology*, 2003, 5(4): 203-223.
- [11] ROSAS A L, NOSANCHUK J D, FELDMESSER M, et al. Synthesis of polymerized melanin by *Cryptococcus neoformans* in infected rodents [J]. *Infection and Immunity*, 2000, 68(5): 2845-2853.