

植物激素对纳塔尔链霉菌发酵产纳他霉素的影响

魏宝东, 王利艳, 于思雯, 潘娅慧
(沈阳农业大学食品学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘要:以纳塔尔链霉菌(*Streptomyces natalensis*)为发酵菌种,在摇瓶培养基中添加植物激素,通过单因素试验初筛,获得能够有效提高纳他霉素的产量的植物激素;采用Box-Behnken试验设计建立数学模型,进行响应面分析优化确定最优组合。结果表明:吲哚乙酸、赤霉素和6-苄氨基嘌呤均能够有效提高纳他霉素的产量,在5.5 mg/L吲哚乙酸、14.8 mg/L赤霉素和20.5 mg/L 6-苄氨基嘌呤的条件下发酵120 h时,发酵液中纳他霉素的发酵产量可达到1.805 g/L,为对照组的1.63倍。

关键词:植物激素;纳塔尔链霉菌;纳他霉素;发酵;响应面分析

Influences of Plant Hormones on the Natamycin Production of *Streptomyces natalensis*

WEI Bao-dong, WANG Li-yan, YU Si-wen, PAN Ya-hui

(College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: Screening of five plant hormones was carried out to find out those that can effectively enhance natamycin production in shake-flask culture by *Streptomyces natalensis* upon addition to the medium. A mathematical model was built using Box-Behnken experimental model and used to determine the optimal concentrations of selected plant hormones in the medium. The results showed that indole-3-acetic acid, gibberellin and 6-benzyl amino purine effectively increased natamycin production. At optimized concentrations of 5.5, 14.8 and 20.5 mg/L for these plant hormones, respectively, the yield of natamycin was 1.805 g/L, which was 1.63 times higher than that of the control group.

Key words: plant hormones; *Streptomyces natalensis* natamycin; fermentation; response surface methodology

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2014)11-0185-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201411037

纳他霉素为一种多烯大环内酯类抗真菌剂,别名游链霉素、匹马菌素或海松素^[1],是一种高效、广谱的抗真菌类抗生素^[2],主要由褐黄孢链霉菌(*Streptomyces gilvosporeus*)、纳塔尔链霉菌(*Streptomyces natalensis*)、恰努加链霉菌(*Streptomyces chattanoogensis*)等发酵产生^[3]。由于它只抑制真菌且效率高、使用pH值范围宽、毒性低、无特殊颜色和气味且对产品的感官特性无任何影响等优点^[4],从而被广泛应用于食品工业、动物饲料、治疗真菌引起的疾病等方面^[5]。但由于纳他霉素发酵产量水平较低,成本太高,目前国内还无法实现大规模生产,纳他霉素产品主要依靠进口,限制了其作为新型的天然生物防腐剂的广泛应用^[6]。因此,研究纳他霉素微生物发酵的规律,从而指导和改进其发酵工艺,对提高纳他霉素的发酵水平具有重要意义^[7]。目前,对于提高纳他霉素的产量的研究仍侧重于菌种选育及培养条件的优化方面^[8-11],微生物发酵相关的报道较少。

植物激素在代谢、生长、形态建成等植物生长发育的各个方面均起着十分重要的作用,在农业生产上有着广泛的应用。但是,利用植物激素促进微生物次级代谢提高次级代谢产物产量的研究鲜有报道。仅有将植物激素应用于藻类微生物、菌体微生物转化反应、香菇的研究,结果表明植物激素能够有效地调节海藻类微生物、菌体转化微生物、香菇的生长发育以及某些代谢产物的合成^[12-16]。但其对纳他霉素的产量的影响未见报道,因此,本实验采用植物激素对微生物发酵生产纳他霉素的影响进行初步研究,为植物激素对微生物次级代谢调控提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 菌种与试剂

纳塔尔链霉菌(*Streptomyces natalensis*) 日本微生物菌种保藏中心。

收稿日期: 2013-11-01

基金项目: 辽宁省教育厅科学研究一般项目(L2012248)

作者简介: 魏宝东(1969—),男,副教授,博士,主要从事食品制造与贮藏研究。E-mail: bdweisyau@163.com

麦芽浸粉、大豆蛋白胨 北京奥博星生物技术责任有限公司；酵母浸粉、葡萄糖、可溶性淀粉、甲醇（均为分析纯） 国药集团化学试剂有限公司；纳他霉素标准品 北京东方瑞德生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

HZQ-F全温振荡培养箱 哈尔滨东明医疗仪器厂；超净工作台 苏州安泰空气技术有限公司设备厂；手动压力蒸汽灭菌锅 上海博讯实业有限公司医疗设备厂；电热恒温培养箱 南京中器三厂；UV-1600紫外分光光度计 北京瑞利分析仪器公司；PHS-25数显pH计 上海雷磁仪器厂。

1.3 培养基

斜面培养基（g/L）：麦芽浸粉10、酵母浸粉4、葡萄糖4、琼脂20，pH 7.3；种子培养基（g/L）：葡萄糖20、大豆蛋白胨6、酵母浸粉6、氯化钠10，pH 7.0；发酵培养基（g/L）：麦芽浸粉10、大豆蛋白胨10、可溶性淀粉10、酵母浸粉4、葡萄糖（50 g/100 mL的葡萄糖进行单独灭菌）40，pH 7.3。

1.4 方法

1.4.1 提高纳他霉素产量的植物激素单因素试验

各种植物激素均加在纳他霉素发酵培养基中^[12]，将纳塔尔链霉菌接种于斜面培养基上培养5~7 d，用适量无菌水洗下新鲜孢子制备成 10^8 CFU/mL孢子悬浮液^[5]，然后取5 mL孢子悬液接种到装液量为20%的250 mL三角瓶中，在29℃、220 r/min条件下培养28~48 h，使菌体进入对数生长和稳定期，以2%接入量接种到发酵培养基中，恒温培养120 h，以发酵液中纳他霉素的产量为评价指标进行有正向调节作用的植物激素的筛选。

由于已知的植物激素主要有以下5类：生长素、赤霉素、细胞分裂素、脱落酸和乙烯。根据文献资料本实验选择生长素、赤霉素、细胞分裂素3类植物激素作为材料，它们分别是生长素中的吲哚乙酸（indoleacetic acid, IAA）、吲哚丁酸（indole butyric acid, IBA）、1-萘乙酸（1-naphthyl acetic acid, NAA）、赤霉素（3-gibberellic acid, GA3）和细胞分裂素中的6-苄氨基嘌呤（6-benzyl aminopurine, 6-BA），分别配制质量浓度为500 mg/L的溶液备用。

以发酵液中纳他霉素的含量为评价指标，在纳塔尔链霉菌发酵培养的基础上进行植物激素添加量的单因素试验设计：在纳塔尔链霉菌发酵液中分别添加IAA、IBA、NAA、GA3和6-BA，质量浓度分别为0、5、10、15、20、25 mg/L。通过单因素试验筛选获得对纳他霉素产量有正向调节作用的植物激素。

按单因素试验选出的各植物激素最佳质量浓度添加到培养基中，进行发酵时间的确定。发酵时间分别为12、24、36、48、60、72、84、96、108、120、132 h

时，取样测定纳他霉素产量，以发酵液中纳他霉素的产量为评价指标进行发酵时间的确定。

1.4.2 提高纳他霉素产量的植物激素响应面法优化试验

根据单因素试验结果，选取对纳他霉素的微生物发酵产量影响较大的植物激素进行响应面试验，以发酵液中纳他霉素的发酵产量为响应指标，利用Design-Expert 8.0软件进行回归分析，预测植物激素在纳塔尔链霉菌发酵体系中的最佳组合。

1.4.3 纳他霉素的测定

取1 mL纳他霉素发酵液添加到装有9 mL甲醇提取剂的离心管中，充分振荡后于12 000 r/min离心15 min，吸取上清液用甲醇进行适当稀释，在303 nm波长处测定其吸光度。根据吸光度和标准曲线进行定量分析^[17]。

1.4.4 还原糖的检测

采用DNS比色法^[18]。

1.4.5 菌体干质量的测定

菌体干质量（dry cell weight, DCW）的测定参考文献^[19]。

2 结果与分析

2.1 纳他霉素标准曲线的确定

采用紫外分光光度法，以发酵液中纳他霉素产量为横坐标（x），其对应的吸光度为纵坐标（y），绘制标准曲线测定发酵液中纳他霉素的产量。应用最小二乘法原理获得线性回归方程为 $y=0.1071x-0.0061$ ，由相关系数 $R^2=0.9998$ 可知本测定方法在1~9 mg/L范围内线性关系良好^[20]。

2.2 单因素试验结果

2.2.1 不同质量浓度的植物激素对纳他霉素产量的影响

本实验将选择的5种植物激素：吲哚乙酸（IAA）、吲哚丁酸（IBA）、1-萘乙酸（NAA）、赤霉素（GA3）、6-苄氨基嘌呤（6-BA），分别以不同质量浓度添加到发酵液中进行实验，探索它们在液体培养条件下对纳塔尔链霉菌合成纳他霉素的影响，进而筛选出对发酵液中纳他霉素的产量有促进作用的植物激素。

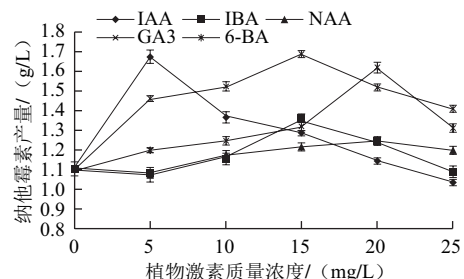


图1 不同质量浓度的植物激素对纳他霉素产量的影响

Fig.1 Effects of different concentrations of plant hormones on natamycin production

从图1可以看出,在一定质量浓度范围内,发酵液中纳他霉素的产量随着植物激素质量浓度的增加而增大, IAA 5 mg/L时产量相对较高; IBA 15 mg/L时产量相对较高; NAA 20 mg/L时产量相对较高; GA3 15 mg/L时产量相对较高; 6-BA 20 mg/L时产量相对较高。植物激素质量浓度继续增大时,反而影响了纳他霉素的合成,表明此体系中植物激素存在最适质量浓度。

5种植物激素均能有效提高发酵液中纳他霉素的产量,原因可能是植物激素能够有效的促进细胞生长和分裂,导致菌体数量增加,进而提高纳他霉素的产量;也可能在微生物生长过程中加入适量的植物激素,促进细胞新陈代谢,加速其分裂与增殖,促进菌体旺盛生长和产酶^[21]。进而促进次级代谢,使纳他霉素的产量提高。由此本实验对菌体干质量和总糖含量变化进行监测,结果显示变化不明显,具体原因需进一步实验研究。

本实验中植物激素筛选的条件虽参照张桂和等^[12]的报道,但所得筛选结果却与其有所不同。张桂和等^[12]利用2,4-二氯苯氧乙酸、6-苄基氨基嘌呤、奈乙酸、激动素、吲哚乙酸、吲哚丁酸,当质量浓度范围在0.01~2.0 mg/L时,植物激素对小球藻和异胶藻的生长均有明显的促进作用,它们能促进藻细胞的分裂,增加藻色素的含量。

生长素中的吲哚乙酸(IAA)能够显著提高发酵液中纳他霉素的产量,添加吲哚乙酸后的发酵液中纳他霉素的产量为对照组不添加激素的152.1%,因此将其与赤霉素和6-苄基氨基嘌呤作为后续响应面分析的因素。

2.2.2 发酵时间对纳他霉素产量的影响

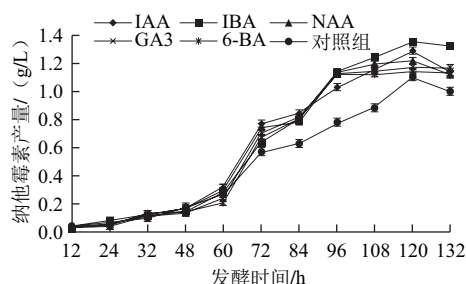


图2 发酵时间对纳他霉素产量的影响

Fig.2 Effect of fermentation time on natamycin production

由图2可知,发酵时间在72 h之前,纳他霉素的产量均缓慢增加;72~96 h纳他霉素的产量迅速增加;之后增加速度逐渐趋于平缓,发酵至120 h各自达到最高点;到132 h时只有对照中纳他霉素的产量下降,其他均无变化。因此,将最适质量浓度的植物激素添加到发酵液中,发酵时间为120 h时纳他霉素的产量达到最大,120 h以后纳他霉素的产量不再继续增加。

2.3 响应面法优化试验结果

2.3.1 Box-Behnken试验设计及结果

在单因素试验基础上,根据Box-Behnken设计原理^[22],

选择IAA(A)、GA3(B)、6-BA(C)作为响应面优化的考察因素,每个因素取3种水平,以(-1、0、1)编码,以发酵液中纳他霉素的发酵产量为响应值,设计三因素三水平试验。

应用Design-Expert 8.0软件进行Box-Behnken试验设计,依次进行添加IAA、GA3、6-BA(每组3个平行)^[23],以发酵液中纳他霉素产量为响应值(Y)进行响应面试验,试验设计及结果如表1所示。

表1 Box-Behnken试验设计及结果
Table 1 Box-Behnken design and results

试验号	A IAA质量浓度/(mg/L)	B GA3质量浓度/(mg/L)	C 6-BA质量浓度/(mg/L)	Y纳他霉素产量/(g/L)
1	1 (8)	0 (15)	1 (23)	1.683
2	0 (5)	0	0 (20)	1.811
3	0	1 (18)	1	1.622
4	0	0	0	1.812
5	-1 (2)	1	0	1.743
6	0	0	0	1.812
7	-1	0	-1 (17)	1.747
8	-1	0	1	1.736
9	-1	-1 (12)	0	1.735
10	0	-1	1	1.612
11	1	0	-1	1.676
12	0	0	0	1.812
13	0	0	0	1.798
14	1	-1	0	1.686
15	0	-1	-1	1.483
16	0	1	-1	1.611
17	1	1	0	1.768

2.3.2 回归模型的建立及统计分析

根据表1的结果,通过Design-Expert 8.0软件处理确定回归方程,该试验的回归方程为: $Y=1.81+0.019A+0.037B+8.25C+0.019AB+5.51AC+0.047BC-0.022A^2-0.098B^2-0.11C^2$ 。回归模型进行方差分析及可信度分析结果见表2。

表2 回归方程的统计分析
Table 2 Statistical analysis of the fitted regression equation

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	Pro>F	显著性
A	2.735	1	2.735	5.01	0.063 0	
B	0.011	1	0.011	20.30	0.002 8	**
C	5.441	1	5.441	1.00	0.351 5	
AB	1.363	1	1.366	2.50	0.157 6	
AC	1.206	1	1.206	0.22	0.652 3	
BC	8.838	1	8.836	16.16	0.005 1	**
A ²	2.129	1	2.129	3.90	0.088 9	
B ²	0.041	1	0.041	74.72	<0.000 1	**
C ²	0.052	1	0.052	94.89	<0.000 1	**
模型	0.120	9	0.014	25.01	0.000 2	**
误差项	3.790	7	5.463			
失拟项	3.670	3	1.222	32.24	0.209 0	
纯误差	1.520	4	3.795			
所有项	0.130	16				
R ²	0.969 8					
R _{Adj} ²	0.931 1					
变异系数	1.360					

注:*.差异显著($P<0.05$);**.差异极显著($P<0.01$)。

B 、 BC 、 B^2 和 C^2 的二次项对发酵液中纳他霉素的发酵产量影响均具显著性 ($P < 0.01$)，其他变量影响均不显著 ($P > 0.05$)，无统计学差异。简化后的回归方程为： $Y = 1.809\,00 - 0.018\,500A + 0.037\,250B + 0.082\,500C + 0.018\,500AB - 5.500\,00AC - 0.047\,000BC + 0.022\,500A^2 - 0.098\,500B^2 - 0.111\,00C^2$ 。模型极显著 ($P < 0.01$)，因变量与自变量之间的线性关系显著 ($R^2 = 0.969\,8$)，模型调整复相关系数 $R_{Adj}^2 = 0.931\,1$ ，说明该模型能解释 93.11% 响应值的变化，拟合程度较好。失拟项不显著 ($P > 0.05$)，说明本实验所得二次回归方程能很好地对响应值进行预测。

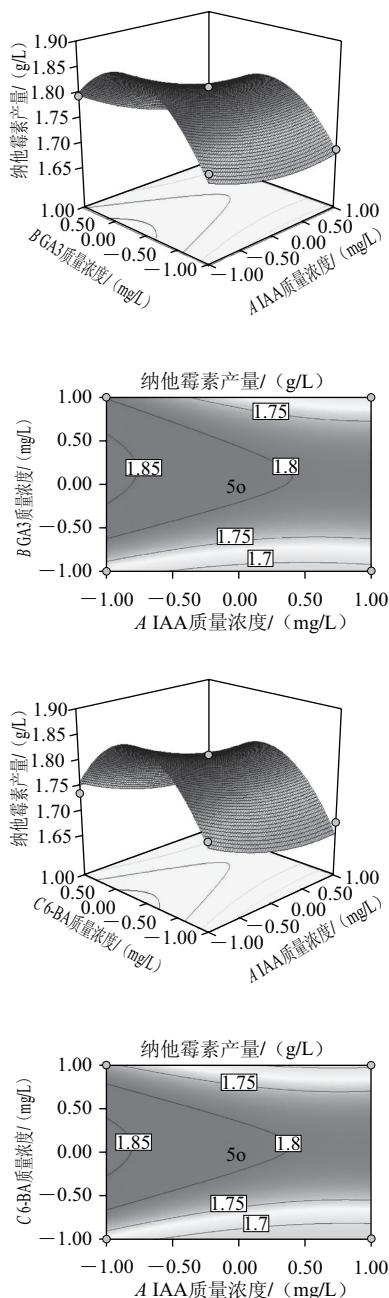


图3 各因素及其相互作用对纳他霉素产量影响的响应面和等高线图

Fig.3 Response surface and contour plots showing the effects of different concentrations of IAA, GA3 and 6-BA on natamycin production

由图3可知，在固定其他发酵参数条件下，IAA的质量浓度设定于某值时，随着GA3质量浓度逐渐增大，纳他霉素发酵产量出现先增加后减少的现象，且两因素交互作用出现最高点即稳定点，说明此过程中发酵体系存在最适质量浓度，结合等高线图说明两自变量间交互作用显著。在固定其他发酵参数条件下，IAA的质量浓度设定于某值时，随着6-BA质量浓度逐渐增大，纳他霉素发酵产量出现先增加后减少的现象，且两因素交互作用出现最高点即稳定点，说明此过程中发酵体系存在最适质量浓度，结合等高线图说明两自变量间交互效应明显，在固定其他发酵参数条件下，GA3的质量浓度设定于某值时，随着6-BA质量浓度逐渐增大，纳他霉素发酵产量出现先增加后减少的现象，且两因素交互作用出现最高点即稳定点，说明此过程中发酵体系存在最适质量浓度。

响应面图形是响应值对各试验因子 A 、 B 、 C 所构成的三维空间的曲面图，从响应面分析图上可形象地看出最佳参数及各参数之间的相互作用。根据回归方程绘制响应面分析图及相应的等高线图，运用Design Expert 8.0 软件对模型进行分析。由图3可较直观的看出各因素交互作用对纳他霉素的产量的影响，相应的值为0.411、-0.189、0.372时，响应达到最高点^[24]，此时IAA、GA3、6-BA质量浓度分别为5.411、14.811、20.372 mg/L。考虑可操作性，将各诱导工艺参数修正为：IAA、GA3、6-BA质量浓度分别为5.5、14.8、20.5 mg/L，此时发酵液中纳他霉素的发酵产量最高，预测值为1.812 g/L。为了检验回归模型预测的准确性，在所得最佳诱导条件下进

行3组平行实验进行验证,发酵液中纳他霉素的实际产量分别为1.805 g/L,与预测值十分接近,可见该模型能较好地预测实际诱导情况。

3 结 论

通过对5种不同植物激素进行筛选,得知IAA、GA3和6-BA能够有效促进纳塔尔链霉菌合成纳他霉素。通过单因素试验和Box-Behnken设计试验,采用响应面分析法优化这3种激素的最佳组合,得出优化配比为:IAA的质量浓度为5.5 mg/L、GA3的质量浓度为14.8 mg/L、6-BA的质量浓度为20.5 mg/L,此条件下发酵液中纳他霉素的发酵产量可达到1.805 g/L,比对照(1.105 g/L)高出63.3%。

参考文献:

- [1] 芮弦,欧阳五庆,吴敬超,等.纳他霉素纳米乳的制备及其体外抑菌效果研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2012,40(3):23-28.
- [2] 史强,陶文沂.真菌代谢产物中促进纳他霉素合成的诱导子的研究[J].食品与发酵工业,2010,36(10):15-18.
- [3] 乔春明,刘坤,葛菁萍,等.发酵液中纳他霉素的生物检测法[J].食品科学,2009,30(7):159-161.
- [4] LIANG Jingle, XU Zhinan, LIU Tongfeng, et al. Effects of cultivation conditions on the production of natamycin with *Streptomyces gilvosporeus* LK-196[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2008, 42(2): 145-150.
- [5] 高玉荣,王雪平.天然抗真菌食品生物防腐剂:纳他霉素的性质及在食品中的应用[J].农产品加工:学刊,2009,172(5):7-9.
- [6] 魏宝东,潘娅慧,王亚男,等.促进纳他霉素合成的真菌诱导子筛选及诱导条件优化[J].食品科学,2013,34(7):196-200.
- [7] 骆健美,金志华,岑沛霖.褐黄孢链霉菌纳他霉素发酵条件优化[J].高校化学工程学报,2006,20(1):68-73.
- [8] 杨东靖,陈冠群,王敏,等.纳他霉素高产菌株的链霉菌抗性选育及其发酵工艺的优化[J].药物生物技术,2003,10(2):84-87.
- [9] 郝晓兵,卢英华,凌雪萍,等.褐黄孢链霉菌生产纳他霉素工艺条件研究[J].厦门大学学报,2009,48(6):866-870.
- [10] FARID M A, EI-ENSHASY H A, EI-DIWANY A L, et al. Optimization of the cultivation medium for natamycin production by *Streptomyces natalensis*[J]. Journal of Basic Microbiology, 2000, 40(3): 157-166.
- [11] EI-ENSHASY H A, FARID M A, EI-SAYED E A. Influence of inoculums type and cultivation conditions on natamycin production by *Streptomyces natalensis*[J]. Journal of Basic Microbiology, 2000, 40(5/6): 333-342.
- [12] 张桂和,王珺.植物激素促进海洋微藻生长的效应[C]//中国科协2004年学术年会海南论文集.北京:中国科学技术协会学会工作部,2004:4.
- [13] 徐仰仓,施定基.液体培养下植物激素对发状念珠藻体内黄酮含量的影响[C]//中国海洋湖沼学会藻类学分会第七届会员大会暨第十四次学术讨论会论文摘要集.上海:中国海洋湖沼学会藻类学分会,2007:1.
- [14] 李晓静,郭建喜,阳葵.生长调节剂对微生物生长及菌体微生物转化的影响[J].海军工程大学学报,2009(1):26-31.
- [15] DEBATA A, MURTY K S. Translation & senescence in rice[J]. Indian Journal of Experimental Biology, 1981, 19(10): 986-987.
- [16] 朱铁群,姚占芳.生长调节剂在香菇生长发育过程中的作用[J].食用菌学报,1998,5(2):25-30.
- [17] 魏宝东,王亚男,宋晓娣,等.纳他霉素高产菌株的选育[J].食品科技,2012,37(2):20-23.
- [18] 史强.真菌代谢产物中促进纳他霉素合成的诱导子的研究[D].无锡:江南大学,2010.
- [19] 朱惠,金志华,岑沛霖.纳他霉素产生菌基因组重排育种[J].中国抗生素杂志,2006,31(12):739-742.
- [20] 骆健美,金志华,岑沛霖.褐黄孢链霉菌纳他霉素发酵条件优化[J].高校化学工程学报,2006,20(1):68-73.
- [21] 聂延富.植物激素与生理活性物质诱发根瘤的机制、理论探讨[J].自然杂志,1988,11(12):889-893.
- [22] JOSHI S, YADAV S, DESAI A J. Application of response-surfacemethodology to evaluate the optimum medium components for the enhanced production of lichenysin by *Bacillus licheniformis* R2[J]. Biochemical Engineering Journal, 2008, 41(2): 122-127.
- [23] 郑优,郭婷,陈厚荣,等.响应面法优化超声波处理纳米SiO₂/蛋清蛋白复合膜液的制备[J].食品科学,2013,34(14):73-79.
- [24] 田志斌,董超,史延茂,等.纳豆激酶固态发酵工艺参数的两种不同设计方法优化[J].食品与发酵工业,2013,39(1):134-141.