

# 红树林细菌发酵产灵菌红素条件研究\*

## Study on the Fermentation Conditions of Mangrove Bacteria *Flavobacterium* sp. Producing Prodigiosin

何碧娟,姜发军,许铭本,雷 富,张荣灿,庄军莲

HE Bi-juan,JIANG Fa-jun,XU Ming-ben,LEI Fu,ZHANG Rong-can,ZHUANG Jun-lian

(广西科学院,广西南宁 530007)

(Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China)

**摘要:** 采用单因素试验和  $L_9(3^4)$  正交试验研究从红树林中分离到的一株具有产灵菌红素的海洋细菌 (*Flavobacterium* sp.) 的发酵条件。结果表明,最佳培养基配方为麦芽糖 10.0 g/L, 蛋白胨 10.0 g/L, 磷酸氢二钾 0.25 g/L, 硫酸镁 0.1 g/L, 最合适 pH 值为 6.0, 最合适的盐度为 10‰, 最合适的温度为 27℃。

**关键词:** 红树林细菌 灵菌红素 发酵 培养基优化

**中图分类号:** Q815 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9164(2010)04-0373-04

**Abstract:** The fermentation of the prodigiosin by *Flavobacterium* sp. screened from mangrove was studied, and the optimal condition was studied. Meanwhile, a set of experiments designed by the orthogonal method was adopted to optimize the culture medium elements. The result showed that the optimized elements of culture are 10.0% maltose,  $K_2HPO_4$  at 0.25 g/L, 10.0% peptone,  $MgSO_4$  at 0.1 g/L. In addition, the optimal growing condition was included: 2‰ salinity, pH 6, and temperature at 27℃.

**Key words:** *Flavobacterium* sp., prodigiosin, fermentation, medium optimization

近年来,我国近海水富营养化逐渐加剧,赤潮频繁发生并已日益严重,鉴于赤潮的严重危害性,有效防治赤潮技术的研究日益受到关注。用铜制剂、除草剂等化学杀藻剂可以直接杀死藻类,但是这些化学物质的专一性差,而且容易富集,在食物链中造成二次污染,因此,迫切需要开发一种见效快、用量少、对环境友好、储存和运输方便的除藻剂来解决赤潮和水华问题。灵菌红素是一类天然红色素家族的总称,是由多种放线菌和细菌产生的一类次级代谢产物<sup>[1,2]</sup>。最近,科学家<sup>[3]</sup>发现了一种杀藻海洋细菌,命名为 *Hahella chejuensis*, 这种海洋细菌也可以产生强烈杀灭赤潮的灵菌红素代谢。文献<sup>[4]</sup>报道沙雷氏菌的天然产物灵菌红素对引起海洋赤潮和淡水水华的有害藻类有很强的杀灭效果。广西科学院东盟海洋研究中心实验室从红树林细菌 (*Flavobacterium* sp.) 中提取得到一种活性成分,它

对亚历山大藻具有较强的杀灭效果,48h 杀灭最大效果可达 81.7%, 对其进行分离纯化和分子结构鉴定,其杀藻活性物质为灵菌红素<sup>[5]</sup>。本文通过单因素试验和四因素三水平正交试验对红树林细菌培养基进行优化并对发酵条件进行研究,以期提高其发酵生产灵菌红素的量。

### 1 材料与方法

#### 1.1 菌种及培养基

红树林细菌 (*Flavobacterium* sp.) 样品采自广西北海山口红树林, 储藏于广西科学院东盟海洋研究中心。

平板和斜面培养基: 葡萄糖 10.0 g, 蛋白胨 5.0g, 陈海水 1000ml, 调 pH 值 7.4, 温度 121℃, 20min 湿热高压灭菌; 发酵基础培养基: 基本成分同斜面培养基(不加琼脂), 其中所要优化成分被代替。

#### 1.2 最适培养基及发酵条件优化

以发酵基础培养基为基础, 分别以不同的碳源(乳糖、麦芽糖、甘露糖、果糖、蔗糖)替代葡萄糖, 不同的氮源(豆粉、牛肉膏、胰蛋白胨、尿素、 $NH_4Cl$ 、

收稿日期: 2010-06-12

修回日期: 2010-09-12

作者简介: 何碧娟(1964-), 女, 副研究员, 主要从事海洋生物研究。

\* 广西自然科学基金项目(0832077)资助。

KNO<sub>3</sub>)替代发酵基础培养基中的蛋白胨,添加不同的无机盐进行单因素实验以确定最佳的碳源、氮源和无机盐。每种成分3个平行。根据单因素试验结果设计碳源、氮源、无机盐的四因素三水平的正交试验来选择最适培养基配方。然后再以选择出来的最适培养基进行发酵 pH 值(5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0)、盐度(5‰, 10‰, 15‰, 20‰, 25‰, 30‰, 35‰)温度、(18℃, 21℃, 24℃, 27℃, 30℃, 33℃, 36℃, 39℃)的条件优化。

### 1.3 菌体生物量测定

将发酵液于 8000 r/min 条件下离心 15 min, 弃上清液, 将得到的菌体用蒸馏水洗涤 3 次, 最后将菌体于 60℃ 烘箱中烘干至恒重后称重。

### 1.4 红色素相对含量测定

将分离纯化的色素纯品按适当浓度梯度稀释, 根据色素浓度和吸光值 OD<sub>535</sub> 的关系绘制标准曲线。取 1ml 发酵液加适量酸性甲醇(pH=3)提取, 震荡后离心, 取上清液适当稀释, 测量其在 535nm 处的吸光值。根据吸光值和稀释倍数计算发酵液中灵菌红素的含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 培养基优化试验

#### 2.1.1 碳源种类对细菌生长和产灵菌红素的影响

从表 1 可以看出, 该菌以果糖为碳源时生物量最大, 为 3.65g/L, 以麦芽糖作为碳源时灵菌红素产量最大, 达到 46.69mg/L。相对来说, 虽然以果糖为碳源时菌体生物量略大于以麦芽糖为碳源时菌体生物量, 但该菌以麦芽糖为碳源时灵菌红素产量是以果糖为碳源时灵菌红素产量的 2.13 倍, 而且从原料成本来说麦芽糖比果糖便宜, 由此确定该菌发酵生产色素的最佳碳源为麦芽糖。

表 1 碳源对菌体生长及产灵菌红素的影响

Table 1 Effect of carbon source on the yield of prodigiosin and bacterial biomass

碳源种类 Carbon sources	生物量 Biomass(g/L)	灵菌红素 Prodigiosin(mg/L)
葡萄糖 Glucose	2.37	13.07
蔗糖 Sucrose	3.26	32.57
乳糖 Lactose	1.97	7.20
麦芽糖 Maltose	3.30	46.69
果糖 Fructose	3.65	21.96
甘露糖 Mannose	2.75	29.17

#### 2.1.2 氮源种类对细菌生长和产灵菌红素的影响

由表 2 可知, 在几种无机氮源中菌体无法正常生长, 表明该菌可能还需要某种只有有机氮源才有的生长因子或微量元素。在几种有机氮源中蛋白胨能得到最高的生物量和色素含量。

表 2 氮源对菌体生长及产灵菌红素的影响

Table 2 Effect of nitrogen source on the yield of prodigiosin and bacterial biomass

氮源种类 Nitrogen sources	生物量 Biomass(g/L)	灵菌红素 Prodigiosin(mg/L)
蛋白胨 Peptone	2.42	14.17
酵母浸膏 Yeast extract	1.95	0.26
牛肉浸膏 Beef extract	1.86	1.38
胰蛋白胨 Tryptone	2.01	10.60
尿素 Urea	0	0
NH <sub>4</sub> Cl	0	0
KNO <sub>3</sub>	0	0

#### 2.1.3 无机盐对细菌生长和产灵菌红素的影响

由表 3 可以看出, 与不加入无机盐作生长因子的空白样相比, KCl 和 CaCl<sub>2</sub> 对菌体生长和产灵菌红素无明显影响, MgCl<sub>2</sub> 对菌体生长和产灵菌红素有抑制作用, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 MgSO<sub>4</sub> 对菌体的生长和产灵菌红素有较好的促进作用。

表 3 无机盐对菌体生长及产灵菌红素的影响

Table 3 Effect of inorganic ion on the yield of prodigiosin and bacterial biomass

氮源种类 Inorganic ion type	生物量 Biomass(g/L)	灵菌红素 Prodigiosin(mg/L)
KCl	2.60	13.87
CaCl <sub>2</sub>	2.76	13.57
MgCl <sub>2</sub>	1.97	7.20
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.30	19.69
MgSO <sub>4</sub>	3.65	21.96
空白 Blank	2.65	14.17

#### 2.1.4 培养基优化正交试验

根据上述单因素试验结果确定: 以麦芽糖(A)为最适碳源, 蛋白胨(B)为最适氮源, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(C)和 MgSO<sub>4</sub>(D)为最适无机盐, 进行四因素三水平的正交试验来选择最优发酵液配方, 其因素水平见表 4。

采用无交互作用的 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)L 正交试验法进行液体发酵培养基的优化试验, 以菌体生物量和灵菌红素产量为指标, 其试验的结果见表 5。

表 4 培养基优化正交试验因素水平

Table 4 Optimization of orthogonal factors in culture

水平 Level	A(g/L)	B(g/L)	C(g/L)	D(g/L)
1	5.0	5.0	0.25	0.1
2	10.0	10.0	0.50	0.2
3	15.0	15.0	0.75	0.3

表 5 优化培养基 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)L 正交试验结果

Table 5 Orthogonal result of optimizing culture

试验号 No.	A	B	C	D	菌体干重 Dry cell weight (g/L)	灵菌红素含量 Prodigiosin content (mg/L)
1	1	1	1	1	1.80	36.00
2	1	2	2	2	1.82	36.40
3	1	3	3	3	1.66	32.80
4	2	1	2	3	3.70	54.20
5	2	2	3	1	3.85	57.20
6	2	3	1	2	3.30	55.00
7	3	1	3	2	2.80	36.00
8	3	2	1	3	2.05	42.00
9	3	3	2	1	2.00	40.00
k <sub>1</sub>	1.760	2.767	2.383	2.550		
k <sub>2</sub>	3.617	2.573	2.507	2.640		
k <sub>3</sub>	2.283	2.320	2.770	2.470		
R	1.857	0.447	0.387	0.170		
k <sub>1</sub> '	35.067	42.067	44.333	44.400		
k <sub>2</sub> '	55.467	45.200	43.533	42.467		
k <sub>3</sub> '	39.333	42.600	42.000	43.000		
R'	20.400	3.133	2.333	1.933		

从正交试验结果和极差分析可以得出,各因素对菌体干重和灵菌红素的影响次序为 A>B>C>D, A 因素碳源是影响菌体生物量和灵菌红素的主要因素。由 k 值可以确定因素的水平影响,适合细菌生长的培养基浓度水平是麦芽糖 10.0 g/L,蛋白胨 5.0g/L,磷酸氢二钾 0.755g/L,硫酸镁 0.2g/L。适合细菌产灵菌红素的培养基浓度水平是麦芽糖 10.0 g/L,蛋白胨 10.0g/L,磷酸氢二钾 0.25g/L,硫酸镁 0.1g/L。综合两个指标考虑,从而优化出最佳的培养基浓度组合麦芽糖 10.0 g/L,蛋白胨 10.0g/L,磷酸氢二钾 0.25g/L,硫酸镁 0.1g/L。

## 2.2 发酵条件的优化

### 2.2.1 不同 pH 值对细菌生长的影响

由图 1 知生长最适 pH 值在 6.0 左右, pH 值太高或太低均不利于该菌生长,这是由于:一方面 pH 值过低或过高都会引起微生物表面电荷的改变,从而不利于细胞对营养物质的吸收;另一方面 pH 值的改变会让有机化合物离子化,不利于有机化合物渗入细胞<sup>[6]</sup>。从产物来讲过高的 pH 值不利于灵菌红素的稳定。

### 2.2.2 不同盐度对细菌生长的影响

由图 2 知该菌体生长及产灵菌红素的最适盐度在 10%~15%左右,考虑到该菌体从红树林分离出的,而红树林生长区域盐度主要在 10%~15%左右,

这可能是细菌对自然环境的一种适应。

### 2.2.3 不同温度对细菌生长的影响

温度改变酶反应速率从而影响菌体的生长。一般地培养基温度升高,酶反应速率增大,生长代谢加快,但是酶本身很容易因过热而失去活性,表现为菌体容易衰老,所以选择最适温度对缩短发酵周期和提高色素产量有一定的作用。由图 3 知该菌体

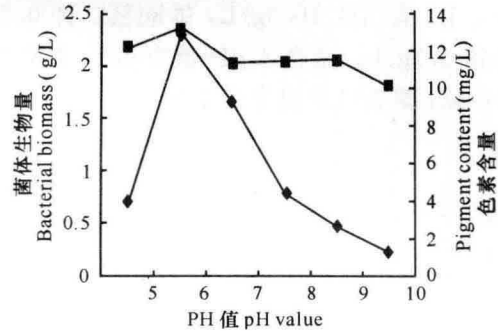


图 1 pH 值对菌体生长和色素产量的影响

Fig. 1 Effect of initial pH on the yield of prodigiosin and bacterial biomass

■: 生物量; ◆: 灵菌红素。 ■: Biomass; ◆: Prodigiosin.

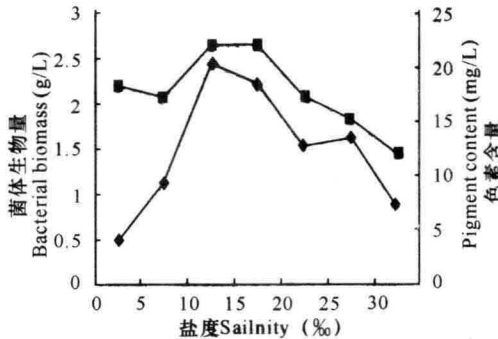


图 2 盐度对菌体生长和色素产量的影响

Fig. 2 Effect of salinity on the yield of prodigiosin and bacterial biomass

■: 生物量; ◆: 灵菌红素。 ■: Biomass; ◆: Prodigiosin.

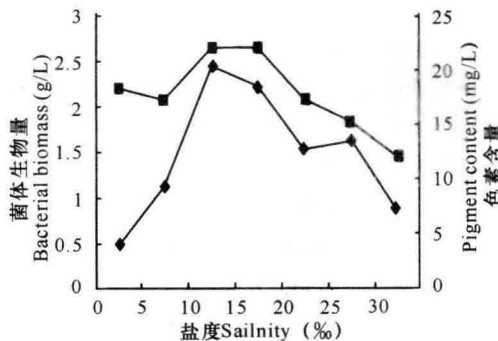


图 3 温度对菌体生长和色素产量的影响

Fig. 3 Effect of temperature on the yield of prodigiosin and biomass

■: 生物量; ◆: 灵菌红素。 ■: Biomass; ◆: Prodigiosin.

适宜的生长温度在 21℃~30℃ 之间,而对于发酵产灵菌红素而言最适的温度为 27℃。

### 3 结论

碳源、氮源以及无机盐对红树林细菌 (*Flavobacterium* sp.) 生物量及产灵菌红素都有不同程度的影响。优化组合最佳的培养基组合为麦芽糖 10.0 g/L, 蛋白胨 10.0g/L, 磷酸氢二钾 0.25g/L, 硫酸镁 0.1g/L。最合适 pH 值为 6.0, 最合适的盐度为 10‰, 最合适的温度为 27℃。

#### 参考文献:

[1] 盛磊, 王勇. 灵菌红素的制备与抗菌效果观察[J]. 农垦医学, 1998, 20(4): 203-204.  
[2] Melvin M S, Tomlinson J T, Saluta G R, et al. Double

-Strand DNA cleavage by copper-prodigiosin[J]. Am Chem Soc, 2000, 122(26):6333-6334.

[3] Jeong H, Yim J H. Genomic blueprint of *Hahella chejuensis*, a marine microbe producing an algicidal agent[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33(22):7066-7073.  
[4] 刘伯雅, 魏东芝, 鲁思然, 等. 灵菌红素对有害藻类的除藻活性研究[J]. 中国环境科学, 2010, 30(4): 477-482.  
[5] 王以斌, 何碧娟, 郑洲, 等. 红树林细菌 *Flavobacterium* sp. 的抑藻活性物质鉴定及其对亚历山大藻抑制作用的初步研究[J]. 中国海洋药物杂志 2008, 27(6):1-4.  
[6] 郑怀礼. 生物絮凝剂与絮凝技术[M]. 北京: 化学工业出版社环境科学与工程出版中心, 2004:147-148.

(责任编辑:尹 闯)

(上接第 372 页 Continue from page 372)

#### 参考文献:

[1] 熊子书. 甘蔗糖蜜酒精酵母菌的筛选与应用[J]. 酿酒科技, 1996, 73(1), 11-13.  
[2] 熊子书. 中国酿酒酵母菌的研究——不同酒类酵母筛选与应用纪实(上)[J]. 酿酒科技, 2002, 112(4), 23-27.  
[3] 成官文, 章非娟, 穆军, 等. 糖蜜酒精废液厌氧生物处理研究进展[J]. 环境科学与技术, 2003, 26(1), 50-53.  
[4] 周桂, 邓光辉, 何子平. 糖蜜酒精废液综合利用进展[J]. 广西民族学院学报: 自然科学版, 2000, 6(2): 111-114.  
[5] 侯保朝, 杜风光, 郭永豪, 等. 高浓度酒精发酵[J]. 酿酒科技, 2005, 130(4): 93-96.  
[6] Gu Yansong, Qiao Min, Zhou Quan, et al. Hyperproduction of alcohol using yeast fermentation in highly concentrated molasses medium[J]. Tsinghua Science and Technology, 2001, 6(3): 225-230.  
[7] 谢丽源, 张勇, 邓科君, 等. 基于 rDNA ITS 序列分析的桑黄真菌菌株分子鉴定[J]. 食品科学, 2010, 31(09): 182-186.  
[8] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]//Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, et al. PCR Protocols, a Guide to Methods and Applica-

tions. San Diego, CA: Academic Press, 1990:315-322.

[9] 杜连祥, 路福平. 微生物学实验技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005:166.  
[10] National Renewable Energy Laboratory (NREL). Measurement of cellulose activities[M]// Laboratory analytical procedure, Lap - 006, NREL Golden Co, 1996.  
[11] Nisiotou A A, Gibson G R. Isolation of culturable yeasts from market wines and evaluation of the 5.8S-ITS rDNA sequence analysis for identification purposes [J]. Letters in Applied Microbiology, 2005, 41: 454-463.  
[12] Granchi L, Bosco M, Messini A, et al. Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region[J]. Journal of Applied Microbiology, 1999, 87:949-956.  
[13] 白逢彦, 王启明, 陆惠中, 等. 酵母菌种内和种间 rDNA 序列保守性和变异性分析[J]. 新疆大学学报: 自然科学版, 2004, 21(Supp):157.

(责任编辑:邓大玉)