

# 生物食品防腐剂

## 纳他霉素发酵工艺研究

(天津科技大学食品科学与生物工程学院, 天津 300222) 李东 杜连祥 路福平

**摘要** 对纳他霉素的发酵工艺,从微生物菌种选育、摇瓶扩大培养条件、发酵工艺条件等方面进行了探讨。论文建立了纳他霉素生产菌种的选育条件,包括生理生化实验和遗传稳定性实验;研究了纳他霉素产生菌的扩大培养条件,优化了纳他霉素产生菌发酵工艺,包括发酵培养基、种龄、通风量、发酵温度等条件;本论文还从微生物代谢调控的角度探讨了次级代谢产物纳他霉素的发酵产生途径,从生物化学的角度探讨了纳他霉素的合成代谢机制,为进一步提高次级代谢产物纳他霉素的发酵水平奠定了基础。通过对次级代谢产物纳他霉素的提取、分析、鉴定,通过了产品技术鉴定,该研究课题最终实现了产业化。

**关键词** 纳他霉素,生物防腐剂,发酵技术

中图分类号:TS202.3 文献标识码:A  
文章编号:1002-0306(2004)10-0111-04

由纳塔链霉菌产生的纳他霉素,能有效地抑制和杀死霉菌、酵母、丝状真菌,从而有效地降低致病性真菌毒素对人类的侵害,同时可以延长食品货架期,减少浪费。目前,全世界有三十多个国家将纳他霉素用于乳制品、肉制品、果汁饮料、葡萄酒等的生产和保藏之中<sup>[1]</sup>。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

纳他霉素生产菌 褐黄孢链霉菌(*Streptomyces gilvosporeus*)、纳塔链霉菌(*Streptomyces natalensis*)、恰塔努加链霉菌(*Streptomyces chattanoogensis*)。

试剂、培养基、仪器略。

#### 1.2 实验方法

##### 1.2.1 菌种培养、筛选方法

1.2.1.1 斜面培养法 以接种环接一环孢子于斜面培养基上,在29℃下培养5d。

1.2.1.2 平板培养法 以划线接种法接种,并于29℃

下培养5d。

##### 1.2.1.3 琼脂块初筛法

敏感菌悬浮液的制备 取新鲜的敏感菌斜面,用无菌水刮洗制成菌悬液,并稀释至 $10^7$ 个/mL,备用。

平板的制备 首先在平板( $\Phi 15\text{cm}$ )内定量加入20mL下层培养基,摆平,待其冷却凝固后,取制备好的敏感菌悬液加入到45℃左右的上层培养基中,摇匀,定量取25mL铺放于下层培养基上,摇匀,平放制成双层平板。

琼脂块抑菌圈的测定 取待测菌少许孢子,用划线法接种于分离平板上,29℃培养2d,用无菌打孔器( $\Phi 4\text{mm}$ )取单个菌落琼脂块,放在双层检测平板上,29℃培养2d,测定抑菌圈大小。

1.2.1.4 摇瓶复筛法 将初筛得到的菌株进行摇瓶实验,进一步复筛。从斜面上刮孢子接种于种子培养基上,29℃,180r/min培养48h;以5%接种量从种子瓶中接入发酵培养基中,29℃,180r/min培养4d;用管碟法测定发酵液的效价。

##### 1.2.2 发酵液效价的测定方法

1.2.2.1 管碟法 a.首先在平皿( $\Phi 15\text{cm}$ )内定量加入20mL下层培养基,摆平,待其冷却凝固后,取制备好的敏感菌悬液加入到45℃左右的上层培养基中,摇匀,定量取25mL铺放于下层培养基上,摇匀,平放,冷凝,制成双层平板;b.在无菌条件下,放入钢圈8个,用加样器取200 $\mu\text{L}$ 待测发酵液置入钢圈内,并放入冰箱冷藏4℃,保存8h,转入29℃恒温培养箱培养8h,测定各个钢圈的抑菌圈大小;c.用纳他霉素纯品分别做出几个不同浓度标准液,按照a、b步骤进行实验,结果得到不同的抑菌圈,由此即可得出测定纳他霉素生物效价的标准曲线 $\log C = aX + b$ 式中C为产物浓度,X为抑菌圈尺寸,a、b为常数;d.将b.中的抑菌圈大小代入标准曲线方程,求出发酵液中产物浓度(即效价)。

收稿日期:2004-06-14

作者简介:李东,在职博士生。

基金项目:北京市新星计划952870900资助项目。

## 1.2.2.2 高压液相色谱法

## 前处理工艺

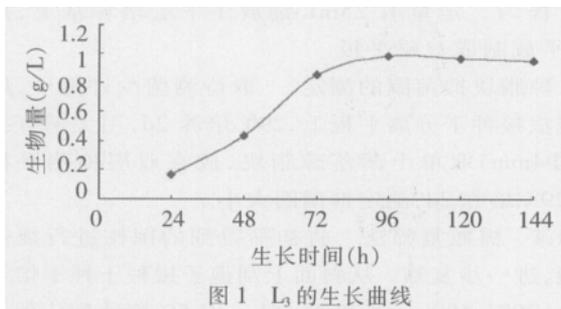
100mL 发酵液加 100mL 甲醇  
 ↓  
 调 pH2.65, 振荡 5min  
 ↓  
 高速离心(3000r/min, 20min)  
 收集上清液  
 ↓  
 调 pH6.5  
 ↓  
 高速离心(3000r/min, 20min)  
 收集沉淀, 溶解于 100mL 甲醇中  
 ↓  
 加 HCl, 调 pH2.65  
 得到检测液

HPLC 检测 检测波长( $\lambda$ ) 303nm ;柱温 30℃ ;  
 流速 :1mL/min ;进样量 :10 $\mu$ L ;压力 :10.6MPa ;色谱  
 柱  $C_{18}$  反相柱 (150 $\times$ 4.6mm) ;流动相 550mL 甲醇 ,  
 450mL 水 3.0mL 85%磷酸。

## 2 结果与分析

## 2.1 纳他霉素产生菌选育和菌种性能的研究

首先,将保存菌株经活化、平板分离,用琼脂块  
 法初筛,根据抑菌圈大小,挑选出 10 支发酵能力较  
 强的菌株,进行摇瓶实验,最终确定一株纳塔链霉  
 菌  $L_3$ ,其纳他霉素产生能力较高。经摇瓶发酵实验,  
 作生长曲线,结果如图 1 所示。



生理生化实验结果与文献报道相同,遗传稳定  
 性实验证明该菌种纳他霉素产生能力具有遗传稳  
 定性。

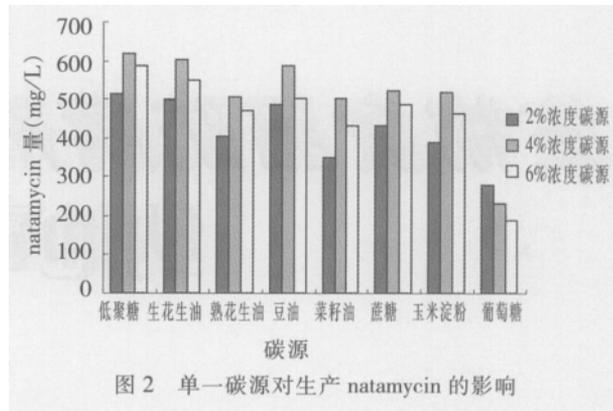
## 2.2 纳他霉素间歇和流加发酵工艺技术研究

## 2.2.1 培养基成分的确定

2.2.1.1 不同碳源的发酵研究 采用的是适量的葡  
 萄糖(快速碳源)加“迟效碳源”(如低聚糖、花生  
 油、熟花生油、豆油、菜籽油、蔗糖和玉米淀粉),实验  
 结果见图 2。

通过图 2 可以看出 4%碳源浓度时纳他霉素的  
 产率均高于其它浓度碳源时的产率,因此,把 4%的  
 低聚糖、花生油、豆油和蔗糖作进一步的实验,以  
 0.25%葡萄糖+4%低聚糖作为碳源,纳他霉素的得率  
 较高,为 930mg/L。

2.2.1.2 不同氮源的发酵研究 我们选择的速效氮  
 源是酵母浸粉,迟效氮源则采用花生饼粉、菜籽饼  
 粉、豆粕和鱼粉。



由实验结果可以看出,花生饼粉、菜籽饼粉、豆  
 粕和鱼粉等“慢效氮源”作为单一氮源使用时,效果  
 优于酵母浸粉,并且 4%时效果最佳。

根据实验结果可以看出,复合氮源中 0.15%的酵母  
 浸粉+4%鱼粉效果最好, natamycin 的产量为 1028mg/L。  
 因此,氮源采用 0.15%的酵母浸粉+4%鱼粉。

2.2.2 温度对发酵的影响 实验取 36、29、25℃ 三  
 种温度进行发酵,实验结果表明,本菌种在 29℃时,  
 纳他霉素的产率较高,为 1278mg/L,所以最适温度  
 为 29℃。

2.2.3 通风量对发酵的影响 在摇瓶发酵中,采用  
 改变摇瓶装液量的方法来控制溶解氧。实验取装液  
 量为 30、40、50、60、70、80、100mL 进行摇瓶发酵研  
 究,结果表明,在装液量为 50mL 时,纳他霉素的产率  
 最高,为 1253mg/L。

2.2.4 pH 对发酵的影响 本实验控制初始 pH 在  
 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0。实验结果表明,初始 pH 为 7.0、  
 8.0 时,纳他霉素的产量最高,分别为 1235mg/L 和  
 1204mg/L,因此,确定最适起始 pH 为 7.0。

2.2.5 种龄对发酵的影响 选择合适的种龄是获得  
 代谢旺盛、数量足够种子的必要条件。实验结果表  
 明,种龄在 48h 时,种子液中孢子的浓度计数数量级  
 在  $10^8$ ,这时,发酵产量最高,为 1240mg/L。所以,最  
 适种龄为 48h。

2.2.6 接种量对发酵的影响 采用较大的接种量可  
 以缩短延迟期,加快菌体生长,使产物形成期提前,  
 产物合成的速度加快。实验结果表明,接种量为 5%  
 时,纳他霉素得率最大,为 1132mg/L。高接种量产率  
 反而下降的原因是菌丝体生长过快,发酵液粘度增  
 加,造成溶解氧不足,而影响产物的形成。因此,最佳  
 接种量为 5%。

## 2.2.7 糖对发酵的影响

2.2.7.1 流加发酵补糖浓度的选择 实验采用间歇  
 补料分批发酵,以发酵液中还原糖水平为控制指标,  
 发酵液初始葡萄糖浓度均为 36g/L,平均每隔 8h 补  
 糖一次,维持葡萄糖浓度分别在 26、23、20、17、14g/L,  
 发酵周期均为 96h,实验结果如表 1 所示。

表1 补糖浓度的选择

维持葡萄糖浓度(g/L)	生物量(g/L)	纳他霉素产量(g/L)
26	13.1	1.84
23	12.5	2.32
20	9.7	2.83
17	10.1	2.64
14	9.8	2.67
不补料	9.6	2.65

由上述结果可以看出,保持糖浓度为20g/L,菌体量没有明显增加,但纳他霉素产量有了明显提高,这说明该浓度的葡萄糖流加,既可以防止菌体自溶及菌体产生抗生素能力的衰退,又不会产生分解代谢物阻遏作用,最有利于纳他霉素的生产。

2.2.7.2 开始补糖最佳时间的确定 从不同发酵时间开始补糖,每隔8h补糖一次,维持葡萄糖浓度为20g/L,以确定开始补糖的最佳时间,结果如表2所示。

表2 开始补糖时间对纳他霉素发酵的影响

开始补糖时间(h)	纳他霉素产量(g/L)
29	2.84
37	2.83
45	2.94
53	2.79
61	2.77

由表2可以看出,开始补糖的最适时间为第45h。

2.2.8 控制pH下的5L自动罐间歇补料分批发酵 结合上述实验结果,在5L机械搅拌发酵罐中进行间歇流加培养,发酵液初始葡萄糖浓度均为36g/L,从第45h开始,每8h补糖一次,维持葡萄糖浓度20g/L。培养过程中开始时控制溶氧40%,进入抗生素生成期后,维持溶氧水平在20%~30%。培养过程的发酵代谢曲线如图3所示。

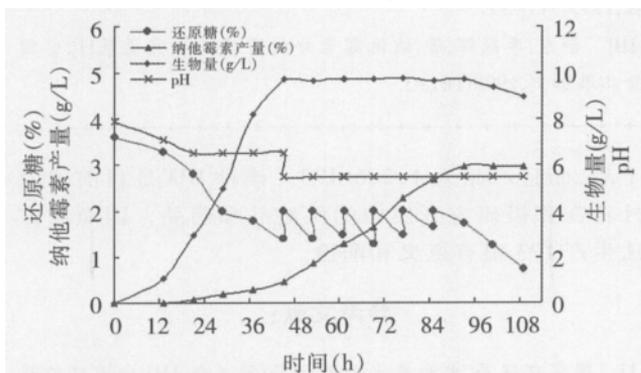


图3 5L自动罐间歇补料分批发酵代谢曲线

从图3可以看出,流加葡萄糖有效地延长了菌株生产纳他霉素的时间,提高了纳他霉素的产量,纳他霉素产量在第93h达到最大值,此时纳他霉素的产量为2.97g/L。

### 2.3 纳他霉素合成前体物及代谢调节物对发酵的影响

在抗生素生物合成中,前体物起着重要的作用,一

定条件下可以控制菌体合成次级代谢产物的方向并增加其产量。纳他霉素内酯环是由多个乙酸单位和丙酸单位通过与脂肪酸合成相似的聚酮体(polyketide)途径缩合而成的<sup>[7]</sup>,这说明其重要前体物是短链脂肪酸。

2.3.1 初级代谢对次级代谢的调节 在纳他霉素的生物合成中,是以乙酰CoA和丙二酸单酰CoA为前体。丙二酸单酰CoA的合成有两条途径:一条是由磷酸烯醇丙酮酸经丙酮酸生成乙酰CoA,再在乙酰CoA羧化酶催化下,生成丙二酸单酰CoA;另一条途径是在磷酸烯醇丙酮酸羧化酶催化下,生成丙二酸单酰CoA。由于草酰乙酸是三羧酸循环的中间产物,因此,三羧酸循环的运转状况调节着纳他霉素的合成。当三羧酸循环酶系活性高时,葡萄糖被完全氧化产生大量的ATP,过量的ATP对磷酸烯醇丙酮酸羧化酶有反馈抑制作用,使草酰乙酸生成量减少;另外,过量的ATP对柠檬酸合成酶有反馈抑制作用,柠檬酸和异柠檬酸的合成减少,而柠檬酸、异柠檬酸对草酰乙酸脱羧酶有激活作用,过量的ATP抑制了纳他霉素的产生<sup>[8]</sup>。

在纳他霉素的生产中,降低三羧酸循环酶的活性可以提高纳他霉素的产量,本实验采用在培养基中加入不同浓度( $10^{-5}$ mol/L)的亚铁氰化钾。实验结果显示,亚铁氰化钾的加入确实可以提高纳他霉素的产量,而且 $5 \times 10^{-5}$ mol/L的亚铁氰化钾的加入提高最大,为1298mg/L。由于氰化物与含铁卟啉的酶中的 $Fe^{2+}$ 结合,使酶失活,抑制呼吸链的电子传递过程,使ATP减少,解除了ATP的反馈抑制。

2.3.2 次级代谢中副产物的抑制作用 脂肪酸作为纳他霉素生产的副产物,它们有共同的前体乙酰CoA和丙二酰CoA,可能对纳他霉素的生产有竞争性抑制作用,若在培养基中添加油脂,就可以解除脂肪酸对纳他霉素生产的竞争性抑制作用。本实验在优化培养基中添加了0.5%、1%、2%、4%的花生油,研究油脂是否可以解除脂肪酸对纳他霉素生产的竞争性抑制作用。

由实验结果可以看出,花生油对纳他霉素的生产有明显的促进作用,这证实了脂肪酸确实对纳他霉素的生产有竞争性抑制作用。另外,油脂促进纳他霉素的生产还和脂肪酸的代谢过程有关,脂肪酸的代谢主要是通过 $\beta$ -氧化。偶数碳链( $C_{2n}$ )脂肪酸经过 $\beta$ -氧化产生n个乙酰CoA,奇数碳链( $C_{2n+1}$ )脂肪酸经过 $\beta$ -氧化产生(n-1)个乙酰CoA和一个丙酰CoA,并且还生成大量的合成纳他霉素必需的NADPH,大量的乙酰CoA可进一步生成丙二酰CoA,为纳他霉素的生产提供了大量的前体物质,从而导致纳他霉素的产量提高<sup>[9]</sup>。

2.3.3 脂肪酸作为底物的运输机制 脂肪酸的 $\beta$ -氧化在细胞器内的线粒体内进行,游离的脂肪酸不能穿透线粒体内膜,而肉毒碱是将脂肪酸以脂酰基形式从线粒体膜外转运到膜内的载体,脂肪酸首先由脂酰辅酶A合成酶活化形成脂酰辅酶A,脂酰辅酶A再

借线粒体内膜两侧转移酶的作用,进入线粒体内:

肉毒碱脂酰辅酶

脂酰 CoA+肉毒碱  $\rightleftharpoons$  脂酰肉毒碱+HS-CoA

肉毒碱起携带脂肪酸酰基通过细胞器内膜的作用。

我们在培养基中将4%的生花生油替代4%的低聚糖,再添加不同浓度的L-肉碱。

由实验结果可以看出,肉碱的添加确实对纳他霉素的生产有促进作用,说明肉碱对脂肪酸的运输催化作用确实存在,0.4%的肉碱添加效果明显,纳他霉素的产量为1391mg/L。

#### 2.4 纳他霉素的提取、分析、结构鉴定

本研究还建立了纳他霉素 HPLC 测定标准曲线,结果表明,纳他霉素在质量浓度为 0.005~0.06g/L 时具有良好的线性,回收率实验结果表明平均回收率为 99% 以上。用此方法对不同工艺条件下的 5 批发酵液进行测定,测定结果表明高效液相色谱法可以准确地检测发酵液中纳他霉素的含量<sup>[10]</sup>。

纳他霉素易溶于甲醇,通过调整甲醇提取液的 pH 得到高纯度的纳他霉素。这种工艺基于纳他霉素在溶液中的溶解度随 pH 的下降而增大这一特殊性。沉淀获得的纳他霉素可以用离心法分离,经水洗后低温真空干燥,可得纯度大于 85% 的纳他霉素。

对经过提取和精制的纳他霉素进行红外、紫外、液质连用、核磁质谱鉴定,达到同类产品国外标准,获得了很好的社会效益和经济效益。

### 3 结论

通过琼脂块法和管碟法对三株生产纳他霉素的原始菌株进行了筛选,并建立了纳他霉素产生菌株的生长曲线,通过对发酵碳源、氮源和其他发酵条件,如温度、接种量、种龄、通风量、pH 的研究,基本确定了一整套发酵工艺;通过对间歇补料分批发酵中流加糖量和流加时间的研究,完成了控制 pH 下的 5L 自动罐间

歇补料分批发酵实验,得到了较满意的纳他霉素产生量,探索性地从代谢调控的角度研究发酵工艺,实验结果表明,亚铁氰化钾可以抑制 ATP 的产生,解除 ATP 的抑制,油脂可以解除脂肪酸对纳他霉素生产的抑制,并提供大量的前体物质;肉碱的添加可以解决脂肪酸的运输问题,提高脂肪酸的利用率,油酸的加入可以改变细胞膜的通透性,解除产物抑制,这些工作为今后进一步提高纳他霉素产率打下了基础;建立了发酵液中纳他霉素的 HPLC 分析方法,并用于实际检测,指导生产,纳他霉素经过提取和精制,进行红外、紫外、液质连用、核磁质谱鉴定,达到同类产品国外标准。

#### 参考文献:

- [1] 李东,孙健,等.生物食品抗真菌剂纳他霉素[J].中国食品添加剂,1995(4):26~27.
- [2] Harry Brik. Natamycin [J]. Analytical Profiles of Drug Substances,1994(10):514~557.
- [3] P Michael Davidson, Craig H Doan. Natamycin [J]. University of Idaho,1993(7):395~407.
- [4] J G Oostendorp. Natamycin [J]. Antonie van Leeuwenhoek,1981(47):170~171.
- [5] Lueck-E, Jager-M. Antimicrobial food additives: characteristics, uses, effects[J]. 214~218.
- [6] 李东,路福平,等.生物食品添加剂纳他霉素的研究[M].《微生物学-环境-健康》科技论坛论文集,2001.122~124.
- [7] 邬行彦,雄宗贵,等主编.抗生素生产工艺学[M].北京:化学工业出版社,1987.352~365.
- [8] 沈同,王镜岩主编.生物化学[M].北京:高等教育出版社,2000.142~216.
- [9] 李季伦等编.微生物生理学[M].北京:北京农业大学出版社,1993.311~337.
- [10] 李东,李颖辉,等.纳他霉素分析方法的研究进展[J].中国食品添加剂,1999(1):1~3.

(上接第 110 页)

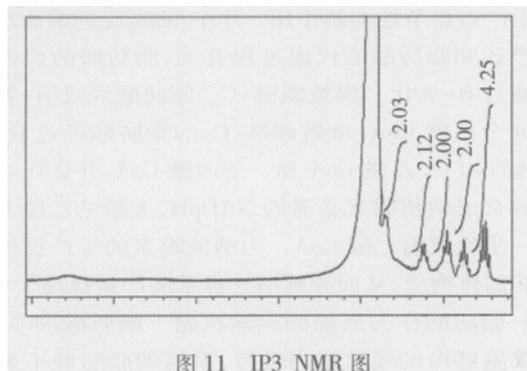


图 11 IP3 NMR 图

同。因而可以肯定,该种 IP3 为 1,2,6-IP3。

### 3 结论

用该法生产 IP3 成本低,该酶酶活高达 10<sup>5</sup>U/g

干品,而且产品为 1,2,6-IP3。该种 IP3 是目前国内外正在积极研究开发中的保健品和药品,因而用该法生产 IP3 很有意义和前途。

#### 参考文献:

- [1] 国家环保局.水和废水监测方法(第三版)[M].中国环境科学出版社,1989.280~284.
- [2] Sandberg A S, Anderinne R. HPLC method for determination of inositol tri-, tetra-, penta- and hexaphosphates [J]. Food Science, 1986, 51(3):547~550.
- [3] Brian Q Philliy. Identification by two-dimensional NMR of myo-inositol tris- and tetra- phosphates formed from phytic acid by wheat phytase[J]. J Agric Food Chem, 1989, 37:1261~1265.