

出芽短梗霉来源黑色素的发酵生产及其 生物活性研究

黄秦娇¹, 李正龙¹, 舒琳¹, 林宇^{1,2}, 曾伟^{1,3*}

¹桂林医学院智能医学与生物技术学院; ²广西高校分子医学工程重点实验室; ³桂林医学院生物医药产业学院, 桂林 541199

摘要: 探究黑色素的微生物发酵生产工艺及其生物活性。本研究以出芽短梗霉 (*Aureobasidium melanogenum*) GLA-1 为生产菌株, 利用单因素和正交实验优化黑色素的发酵生产工艺, 采用碱溶醇沉法纯化黑色素, 通过溶解性测试以及紫外-可见光谱初步表征黑色素, 并研究黑色素的抗氧化、抗紫外辐射和抗菌活性。该菌株在优化的培养基和发酵条件下, 其黑色素产量达到 1.639 ± 0.115 g/L, 较优化前提高 4 倍。从发酵液中纯化的黑色素, 被初步确定为真黑色素; 其具有良好的抗氧化活性, 当浓度为 100 mg/L 时, 其对 ABTS⁺、DPPH、羟基和超氧离子自由基的清除率分别为 $99.32\% \pm 0.07\%$ 、 $89.71\% \pm 0.47\%$ 、 $45.95\% \pm 1.36\%$ 和 $50.85\% \pm 4.01\%$ 。此外, 该黑色素具有显著的抗紫外辐射活性; 且对大肠杆菌具有良好的抑制活性, 最适抑菌浓度为 0.4 mg/mL; 但是在所考察浓度范围内对金黄色葡萄球菌没有抑制活性。上述研究结果为出芽短梗霉来源黑色素的发酵生产及应用开发奠定了基础。

关键词: 出芽短梗霉; 黑色素; 发酵生产; 抗氧化; 抗紫外辐射; 抗菌

中图分类号: Q815 文献标识码: A

Study on fermentation production and bioactivity of melanin from *Aureobasidium melanogenum*

HUANG Qin-jiao¹, LI Zheng-long¹, SHU Lin¹, LIN Yu^{1,2}, ZENG Wei^{1,3*}

¹School of Intelligent Medicine and Biotechnology, Guilin Medical University; ²Key Laboratory of Molecular Medical Engineering, Education Department of Guangxi Zhuang Autonomous Region; ³School of Biomedical Industry, Guilin Medical University, Guilin 541199, China

Abstract: This study aims to investigate the microbial fermentation technology and bioactivity of melanin. In this study, *Aureobasidium melanogenum* GLA-1 was used as the melanin-producing strain. The fermentation process for the production of melanin was optimized using single factor and orthogonal experiments. Melanin was purified by alkali-soluble alcohol precipitation and characterized by solubility test and UV-vis spectrum, and then the antioxidant, antiultraviolet radiation and antibacterial activities of melanin were also studied. The titer of melanin was 1.639 ± 0.115 g/L under the optimal medium and fermentation conditions, which was 4 times higher than that before optimization. The melanin purified from the fermentation broth was preliminarily identified as eumelanin. When the concentration of melanin was 100 mg/L, the scavenging rate on ABTS⁺, DPPH, hydroxyl and superoxide free radicals were $99.32\% \pm 0.07\%$, $89.71\% \pm 0.47\%$, $45.95\% \pm 1.36\%$ and $50.85\% \pm 4.01\%$, respectively. The melanin has a very significant antiultraviolet radiation activity. Besides, the melanin had good inhibitory activity against *Escherichia coli*, and the optimal inhibitory concentration was 0.4 mg/mL. However, there was no inhibitory activity against *Staphylococcus aureus* in the concentration range examined. The above results provided some basic research data for the fermentation production and application of melanin from *A. melanogenum*.

Key words: *Aureobasidium melanogenum*; melanin; fermentative production; antioxidant; antiultraviolet radiation;

antibacteria

黑色素 (melanin) 是一类由酚类或吡啶类物质聚合而成的生物大分子, 包括天然黑色素和合成黑色素^[1]。其中, 天然黑色素依据其结构的不同, 分为真黑色素、褐黑色素、异黑色素、神经黑色素以及脓黑色素。天然黑色素由于其独特的理化性质和生物活性, 例如抗氧化^[2-4]、抗辐射^[5, 6]、抗菌^[7, 8]等活性, 可广泛应用于食品、医药、美妆、生物修复以及生物防治等领域^[9]。因此, 近年来天然黑色素的相关研究越来越受到重视。

天然黑色素广泛存在于动植物和微生物中, 相较于从动植物中提取或者人工合成黑色素, 利用微生物发酵生产黑色素具有周期短、分离纯化简单、生产成本低等优势, 是一种具有工业化生产潜力的生产方法^[1]。目前, 已有放线菌属 (*Actinomycetes*)、链霉菌属 (*Streptomyces*)、蜜环菌属 (*Armillaria*)、散囊菌属 (*Eurotium*) 以及短梗霉属 (*Aureobasidium*) 等微生物^[10-14]被报道可以发酵生产黑色素。其中, *S. kathirae* SC-1 菌株是从土壤中分离获得, 其以 3.3 g/L 淀粉糊精、37 g/L 酵母提取物、5 g/L NaCl、0.1 g/L CaCl₂ 和 54.4 μmol/L CuSO₄ 为培养基, 发酵 5 d 后黑色素产量达到 13.7 g/L^[10]。虽然该菌株发酵生产黑色素的效率较高, 但是培养基中添加大量的酵母提取物将大大提高原料成本。*A. cepistipes* 菌株是从腐烂水果中分离获得, 其以高浓度酪氨酸 (30 g/L) 为底物, 发酵 161 d 后黑色素产量达到 27.98 g/L^[12]。如此高的酪氨酸添加量以及如此长的发酵周期限制了该菌株的应用。出芽短梗霉 (*A. pullulans*) MF1 菌株分离自辐射污染的环境土壤, 其可在 20 kGy 剂量 ⁶⁰Co-γ 射线照射下存活, 优化该菌株的发酵工艺后其黑色素产量也仅有 0.53 g/L^[14]。在众多生产黑色素的微生物中, 尽管 *A. pullulans* 的黑色素产量较低, 但是其具有环境适应能力强、营养要求低、发酵周期较短等优点, 通过菌株选育及发酵工艺优化可进一步挖掘 *A. pullulans* 发酵生产黑色素的潜力。

基于当前微生物来源黑色素的研究现状, 本研究以实验室前期从果园土壤中分离并保存的一株出芽短梗霉 (*A. melanogenum*) GLA-1 为生产菌株, 利用单因素和正交实验优化该菌株发酵生产黑色素的培养基及发酵条件, 采用碱溶醇沉法纯化黑色素, 并通过溶解性测试以及紫外-可见光谱初步表征黑色素, 在此基础上探究该黑色素的抗氧化、抗紫外辐射和抗菌活性。研究结果预期可为出芽短梗霉黑色素的发酵生产和应用开发提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

出芽短梗霉 (*A. melanogenum*) GLA-1 由野生菌株 *A. melanogenum* GXZ-6^[15]经紫外诱变获得; 大肠杆菌 *Escherichia coli* (ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)、酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763) 均保藏于桂林医学院智能医学与生物技术学院。

1.2 主要试剂

黑色素标准品 M8631 (批号: BCCB2921, 纯度≥99%, 美国 Sigma 公司); 2,2-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐 (ABTS⁺) (批号: P2338120, 纯度: 98%, 中国 Titan

公司)；2,2-联苯基-1-苦基苯肼 (DPPH) (批号: P2538585, 纯度: 97%, 中国 Titan 公司)；2, 6-二叔丁基-4-甲基苯酚 (BHT) (批号: P2051319, 纯度: 99%, 中国 Titan 公司)；二甲基亚砷 (DMSO) (批号: P2468770, 纯度 \geq 99%, 中国 Titan 公司)；维生素 C (V_C) (批号: P2371284, 纯度: 99%, 中国 Titan 公司)；四环素盐酸盐 (批号: P2037082, 纯度: 97%, 中国 Titan 公司)；其他常用试剂均为分析纯 (上海泰坦科技股份有限公司)。

1.3 主要仪器与设备

FE28 pH 计 (梅特勒-托利多 (上海) 有限公司)；TS-211B 大容量全温恒温摇床 (上海晶坛仪器制造有限公司)；Thermo 1510 全波长酶标仪 (赛默飞世尔科技公司) 等。

1.4 培养基

种子培养基: 参照 Tang 等^[16]的方法, 并略作修改, 用于培养出芽短梗霉 GLA-1。发酵基础培养基: 参照 Zeng 等^[15]的方法, 并略作修改, 用于出芽短梗霉 GLA-1 生产黑色素。LB 培养基: 10 g/L 胰蛋白胨、5 g/L 酵母提取物、10 g/L NaCl, 自然 pH; 用于培养大肠杆菌和金黄色葡萄球菌。YPD 培养基: 10 g/L 酵母膏、20 g/L 蛋白胨、20 g/L 葡萄糖, 自然 pH; 用于培养酿酒酵母。上述培养基均 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min, 固体培养基添加 20 g/L 琼脂。

1.5 微生物培养

出芽短梗霉种子培养: 将出芽短梗霉接种至装有 30 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 30 °C、180 r/min 振荡培养 48 h。发酵培养: 按 6% (V/V) 接种量将出芽短梗霉种子培养液接种至装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 30 °C、150 r/min 振荡培养 10 d。大肠杆菌和金黄色葡萄球菌培养: 将大肠杆菌或金黄色葡萄球菌接种至装有 50 mL LB 培养基的 250 mL 三角瓶中, 37 °C、160 r/min 振荡培养 24 h。酿酒酵母培养: 将酿酒酵母接种至装有 50 mL YPD 培养基的 250 mL 三角瓶中, 30 °C、180 r/min 振荡培养 48 h。

1.6 发酵培养基和发酵条件优化

培养基组分的单因素优化实验: 以发酵基础培养基作为出发培养基, 分别配制不同碳源 (葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、果糖、可溶性淀粉, 浓度均为 100 g/L)、氮源 (蛋白胨、酵母膏、牛肉膏、硫酸铵, 浓度均为 0.2 g/L)、无机盐 (NaCl、MgCl₂·6H₂O、MnCl₂·4H₂O、CaCl₂·7H₂O、FeSO₄·7H₂O、CuSO₄·5H₂O, 浓度均为 1 mmol/L) 的发酵培养基进行发酵实验。培养基组分浓度的单因素优化实验: 分别配制不同浓度可溶性淀粉、(NH₄)₂SO₄、FeSO₄·7H₂O 的发酵培养基进行发酵实验。培养基正交实验优化: 在培养基组分及其浓度的单因素优化基础上, 对可溶性淀粉、酵母膏、FeSO₄·7H₂O、KCl、KH₂PO₄、MgSO₄·7H₂O 开展 6 因素 3 水平

的正交实验，实验设计如表1和表2所示。

表 1 培养基的正交实验因素和水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experimental of medium

水平 Level	因素 Factor					
	可溶性淀粉 Soluble starch (g/L)	酵母膏 Yeast extract (g/L)	FeSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	KCl (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)
1	100	0.10	0.42	0.40	0.05	0.10
2	120	0.20	0.56	0.50	0.10	0.20
3	140	0.30	0.70	0.60	0.15	0.30

表 2 培养基的正交实验设计表

Table 2 Orthogonal experimental design of medium

试验号 Test number	可溶性淀粉 Soluble starch	酵母膏 Yeast extract	FeSO ₄ ·7H ₂ O	KCl	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄ ·7H ₂ O
	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
1	100	0.10	0.42	0.40	0.05	0.10
2	100	0.20	0.56	0.50	0.10	0.20
3	100	0.30	0.70	0.60	0.15	0.30
4	120	0.10	0.42	0.50	0.10	0.30
5	120	0.20	0.56	0.60	0.15	0.10
6	120	0.30	0.70	0.40	0.05	0.20
7	140	0.10	0.56	0.40	0.15	0.20
8	140	0.20	0.70	0.50	0.05	0.30
9	140	0.30	0.42	0.60	0.10	0.10
10	100	0.10	0.70	0.60	0.10	0.20
11	100	0.20	0.42	0.40	0.15	0.30
12	100	0.30	0.56	0.50	0.05	0.10
13	120	0.10	0.56	0.60	0.05	0.30
14	120	0.20	0.70	0.40	0.10	0.10
15	120	0.30	0.42	0.50	0.15	0.20

16	140	0.10	0.70	0.50	0.15	0.10
17	140	0.20	0.42	0.60	0.05	0.20
18	140	0.30	0.56	0.40	0.10	0.30

发酵条件优化实验：以优化后的发酵培养基为基础，对种龄、接种量、装液量以及培养基 pH 进行单因素实验。在发酵条件单因素优化基础上，对种龄、接种量、装液量以及培养基 pH 开展 4 因素 3 水平的正交实验，实验设计如表 3 和表 4 所示。

表 3 发酵条件的正交实验因素和水平表

Table 3 Factors and levels of orthogonal experimental of fermentation conditions

水平 Level	因素 Factor			
	接种量 Inoculum size (% , V/V)	装液量 Liquid volumn (mL)	种龄 Seed age (h)	pH
1	6	30	36	5
2	8	40	48	6
3	10	50	60	7

表 4 发酵条件的正交实验设计表

Table 4 Orthogonal experimental design of fermentation conditions

试验号 Test number	接种量 Inoculum size (% , V/V)	装液量 Liquid volumn (mL)	种龄 Seed age (h)	pH
1	6	30	36	5
2	6	40	48	6
3	6	50	60	7
4	8	30	48	7
5	8	40	60	5
6	8	50	36	6
7	10	30	60	6
8	10	40	36	7
9	10	50	48	5

1.7 黑色素的分离纯化

利用碱溶醇沉法对发酵液中的黑色素进行分离纯化^[17]。取 25 mL 发酵液于 50 mL 离心

管, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。将胞体均匀分散于 10 mL 的 NaOH (1 mol/L) 溶液, 沸水浴 5 min 充分提取。冷却至室温后 12 000 r/min 离心 10 min, 弃沉淀。收集上清用 1/2 体积无水乙醇进行沉淀, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 沉淀的黑色素用 10 mL 去离子水反复清洗 3 次, 冷冻干燥得到黑色素。

1.8 黑色素的理化表征

1.8.1 纯化后黑色素的溶解性测试

0.01g 出芽短梗霉黑色素加入 1 mL 蒸馏水、1 mol/L HCl 溶液、1 mol/L NaOH 溶液、甲醇、乙醇、DMSO、乙酸乙酯、H₂O₂、FeCl₃、乙腈, 室温下振荡 1 h, 观察溶解性。

1.8.2 纯化后黑色素的紫外-可见光谱分析

将出芽短梗霉黑色素配制成 1 mg/mL 的黑色素 NaOH 溶液, 以 1 mol/L NaOH 溶液做参比, 测定波长范围为 200~800 nm 的吸光度。

1.9 抗氧化活性测定

1.9.1 DPPH 自由基清除活性测定

参照 Ye 等^[18]的方法。对应浓度的 BHT (溶于无水乙醇) 为阳性对照。根据公式 (1) 计算 DPPH 自由基清除率 (R_1)。

$$R_1 = \left[1 - \frac{(A_1 - A_2)}{A_0} \right] \times 100\% \quad (1)$$

式中: A_0 为样品空白对照的吸光值; A_1 为样品的吸光值; A_2 为试剂空白对照的吸光值。

1.9.2 ABTS⁺自由基清除活性测定

参照 Hou 等^[19]的方法。对应浓度的 BHT (溶于无水乙醇) 为阳性对照。根据公式 (1) 计算 ABTS⁺自由基清除率。

1.9.3 羟基自由基清除活性测定

参照 Liu 等^[20]的方法。对应浓度的 BHT (溶于无水乙醇) 为阳性对照。根据公式 (1) 计算羟基自由基清除率。

1.9.4 超氧离子自由基清除活性测定

参照 Chen 等^[21]的方法。对应浓度的 V_C (溶于去离子水) 溶液作阳性对照。根据公式 (2) 计算超氧离子清除率 (R_2)。

$$R_2 = \left[1 - \frac{V_x}{V_0} \right] \times 100\% \quad (2)$$

式中, V_0 为邻苯三酚自氧化速率的斜率; V_x 为抗氧化剂抑制邻苯三酚自氧化速率的斜率。

1.10 抗紫外辐射活性测定

参照 Ye 等^[5]的方法，并稍作修改。取 1 mL 2% (W/V) 的无菌黑色素生理盐水溶液加入离心收集后的菌体中，取 1 mL 置于空白培养皿中，在 UV 光源下（光源距离 30 cm）分别照射 0、0.5、1、2、5、10 和 20 min 后，涂布平板，37 °C 培养 3 d，平板计数各菌的存活数量 CFU（菌落形成单位）。对照组为不添加黑色素的无菌生理盐水。

1.11 抗菌活性测定

参照 Wang 等^[22]的方法，并稍作修改。将 0.5 mL 测试菌悬液（ 1×10^9 CFU/L）涂布于 LB 固体培养基平板上。在每个平板的中央等距离地放置 3 个灭菌圆形滤纸片（直径 1 cm），在每个滤纸片上滴加微孔过滤灭菌的浓度为 0.25、0.5 和 1.0 mg/mL 的黑色素溶液（溶于 DMSO），37 °C 下培养 48 h，测量抑菌圈直径大小。DMSO 为空白对照，四环素（0.1 mg/mL）为阳性对照。

最适抑菌浓度的测定：取 0.5 mL 不同浓度（0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0 mg/mL）的黑色素溶液加入到盛有 10 mL LB 培养基的试管中，加入 0.2 mL 大肠杆菌悬液，37 °C 下振荡培养 48 h，在 600 nm 处测定培养液的 OD 值（ A_1 ）。LB 培养基代替菌液作为菌液空白对照（ A_2 ），LB 培养基代替黑色素作为样品空白对照（ A_0 ）。根据公式（1）计算抑菌率。

1.12 黑色素浓度、纯度及生物量检测

以 Sigma 公司的合成黑色素 M8631 为标准品，称取适量黑色素标准品于 NaOH 溶液（1 mol/L）中，制备浓度为 5~45 $\mu\text{g/mL}$ 的黑色素溶液，以 NaOH（1 mol/L）溶液作为空白对照，在 225 nm 波长下测定吸光值，制作标准曲线。以浓度为横坐标，吸光度为纵坐标制作获得黑色素的标准曲线（见图 1）。通过实验确定黑色素浓度测定的标准曲线为 $y=0.0449x+0.0002$ （ $R^2=1.0000$ ），其中 x 表示黑色素浓度（ $\mu\text{g/mL}$ ）， y 为吸光值（ $\text{OD}_{225\text{nm}}$ ）。依据待测样品的 $\text{OD}_{225\text{nm}}$ 计算黑色素浓度。称取 1 mg 黑色素样品溶解于 NaOH（1 mol/L）溶液，配成浓度为 1 000 mg/L 的黑色素溶液，稀释 n 倍，测定其在 225 nm 处吸收值，代入标准曲线，计算黑色素浓度 C_x （mg/L）， C_x 与 1 000 mg/L 的比值即为纯度。采用干重法测定出芽短梗霉菌体干重。

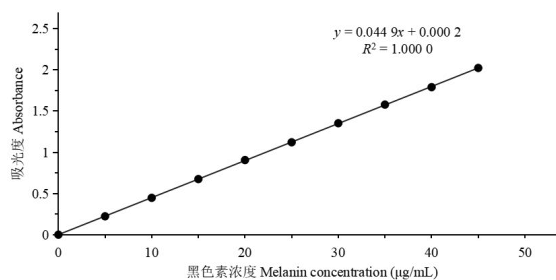


图 1 分光光度法测定黑色素的标准曲线

Fig.1 Standard curve for determining melanin by spectrophotometry

1.13 数据分析

实验数据采用SPSSAU在线软件分析处理，数据用均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间比较采用单因素方差比较， $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 出芽短梗霉 GLA-1 生产黑色素的发酵工艺优化

2.1.1 发酵培养基组分及其浓度的单因素优化

利用单因素实验对发酵培养基中的碳源、氮源以及无机盐的种类和浓度进行优化。如图 2A 所示，出芽短梗霉 GLA-1 以可溶性淀粉和果糖为碳源时，黑色素产量最高，分别为 0.559 ± 0.055 g/L 和 0.595 ± 0.021 g/L，同时生物量也较高。相较于果糖，可溶性淀粉的原料成本更低，而且以可溶性淀粉为碳源时，发酵液在更短的时间内变黑。进一步对可溶性淀粉添加量进行优化。如图 2D 所示，当可溶性淀粉浓度从 60 g/L 增加至 120 g/L 时，黑色素产量也随之增加；当可溶性淀粉浓度增加至 140 g/L 时，黑色素产量不再增加。因此，确定可溶性淀粉添加浓度为 120 g/L。

该发酵培养基中的氮源由有机氮源和无机氮源组成，如图 2B 所示，替换基础培养基的有机氮源酵母膏为蛋白胨或牛肉膏时（无机氮源保持不变），结果显示黑色素产量和生物量都提高了，表明有机氮源对出芽短梗霉的生长和代谢起正向作用。而当替换基础培养基的无机氮源 NH_4Cl 为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 时（有机氮源保持不变），虽然结果显示黑色素产量和生物量有所提高，但是 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度优化实验结果显示（见图 2E）， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 对出芽短梗霉产黑色素没有明显促进作用，所以推测可能是有机氮源酵母膏在起作用而不是 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。此外，对照组与替换无机氮源组相比，可知 NH_4Cl 对菌体产黑色素和生物量有一定的抑制作用。所以，可以推测实验中的无机氮源 NH_4Cl 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 对出芽短梗霉产黑色素无明显促进作用甚至是起到抑制的作用，故培养基中仅添加有机氮源酵母膏即可。

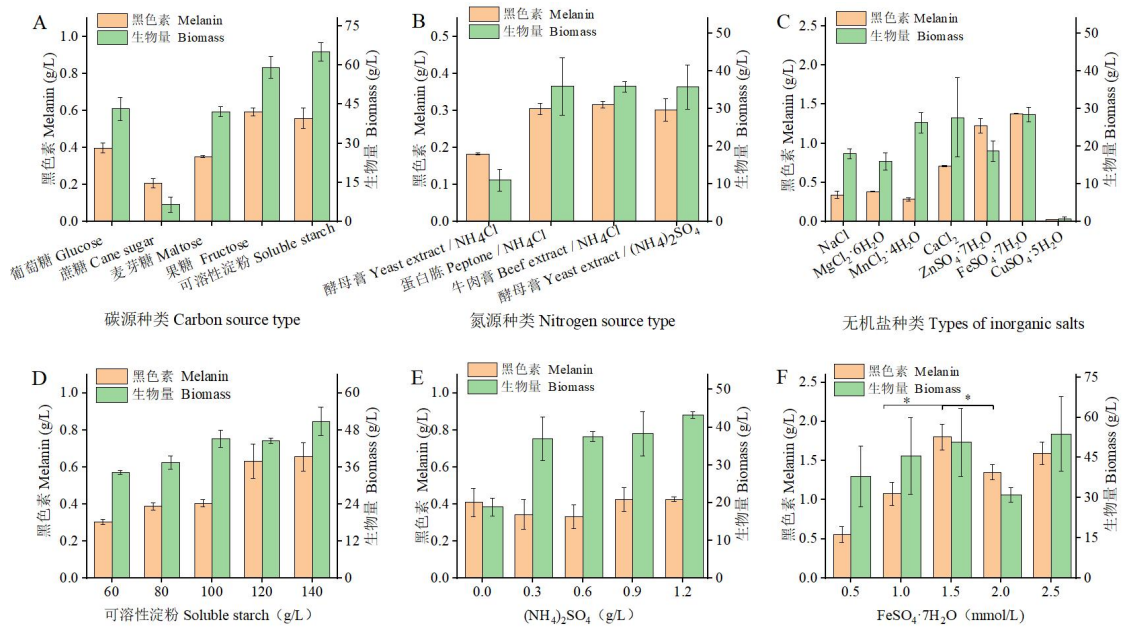


图2 发酵培养基组分及其浓度对黑色素产量和生物量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effects of fermentation medium components and their concentrations on melanin yield and biomass ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注: * $P < 0.05$, 下同。

Note: * $P < 0.05$, the same below.

金属离子对微生物代谢产物的合成有一定的影响。因此，在“1.4”发酵基础培养基的基础上额外添加不同种类的金属盐，考察其对出芽短梗霉产黑色素的影响。结果显示（见图2C），Na⁺、Mg²⁺和Mn²⁺对黑色素产量没有明显促进作用，而Fe²⁺、Ca²⁺和Zn²⁺对黑色素产量均有明显促进作用，其中以FeSO₄·7H₂O的促进作用最为明显。进一步对FeSO₄·7H₂O添加量进行优化，黑色素产量随FeSO₄·7H₂O浓度的增加先升高后降低，并在FeSO₄·7H₂O浓度为1.5 mmol/L时达到最高产量1.803±0.164 g/L（见图2F）。因此，确定FeSO₄·7H₂O添加量为1.5 mmol/L。

2.1.1.2 培养基正交实验优化

在单因素优化的基础上对培养基进行正交实验优化。极差分析显示培养基组分影响出芽短梗霉GLA-1生产黑色素的主次关系为：酵母膏>MgSO₄·7H₂O>KCl>可溶性淀粉>KH₂PO₄>FeSO₄·7H₂O，表明酵母膏是最主要影响因素（见表5）。由k值大小确定最优发酵培养基为：可溶性淀粉120 g/L、酵母膏0.1 g/L、KCl 0.5 g/L、KH₂PO₄ 0.05 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.3 g/L、FeSO₄·7H₂O 0.56 g/L。由于该最优培养基未在表5中出现，因此对该最优培养基进行验证性实验，结果显示黑色素产量为0.634±0.027 g/L，与表5中的黑色素最高产量相当。

表5 培养基的正交实验结果和极差分析

Table 5 Orthogonal experiment results and range analysis of medium

试验号	可溶性淀粉	酵母膏	FeSO ₄ ·7H ₂ O	KCl	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄ ·7H ₂ O	黑色素产量
Test	Soluble starch	Yeast extract	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	Yield of melanin
number	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
1	100	0.10	0.42	0.40	0.05	0.10	0.504
2	100	0.20	0.56	0.50	0.10	0.20	0.477
3	100	0.30	0.70	0.60	0.15	0.30	0.470
4	120	0.10	0.42	0.50	0.10	0.30	0.624
5	120	0.20	0.56	0.60	0.15	0.10	0.559
6	120	0.30	0.70	0.40	0.05	0.20	0.476
7	140	0.10	0.56	0.40	0.15	0.20	0.475
8	140	0.20	0.70	0.50	0.05	0.30	0.585
9	140	0.30	0.42	0.60	0.10	0.10	0.461
10	100	0.10	0.70	0.60	0.10	0.20	0.603
11	100	0.20	0.42	0.40	0.15	0.30	0.528
12	100	0.30	0.56	0.50	0.05	0.10	0.568
13	120	0.10	0.56	0.60	0.05	0.30	0.691
14	120	0.20	0.70	0.40	0.10	0.10	0.500
15	120	0.30	0.42	0.50	0.15	0.20	0.524
16	140	0.10	0.70	0.50	0.15	0.10	0.613
17	140	0.20	0.42	0.60	0.05	0.20	0.563
18	140	0.30	0.56	0.40	0.10	0.30	0.581
<i>k</i> ₁	0.525	0.585	0.534	0.51	0.564	0.534	-
<i>k</i> ₂	0.562	0.535	0.559	0.565	0.541	0.520	-
<i>k</i> ₃	0.546	0.513	0.541	0.558	0.528	0.580	-
极差	0.037	0.072	0.025	0.055	0.036	0.060	-
Range							

2.1.3 发酵条件的单因素优化

发酵条件对于微生物代谢产物的合成也至关重要，因此针对出芽短梗霉 GLA-1 发酵生产黑色素过程中的种龄、接种量、三角瓶装液量以及培养基 pH 进行单因素实验。如图 3A

所示, 随着种龄的延长黑色素产量逐渐上升, 因此确定最适种龄为 60 h。如图 3B 所示, 黑色素产量随接种量的增加先升高后下降, 当接种量为 8%时, 黑色素产量最高, 因此确定最适接种量为 8%。如图 3C 所示, 黑色素产量随着装液量的增加呈直线下降。当装液量为 30 mL 时, 黑色素产量达到最高 1.397 ± 0.096 g/L, 因此确定最适装液量为 30 mL。如图 3D 所示, 培养基 pH 为 5 和 6 时, 黑色素产量没有显著差异。但是, 当 pH 值大于 6 时, 黑色素产量随着 pH 值的升高而下降。因此选择 pH 6 作为发酵培养基的最适 pH 值。

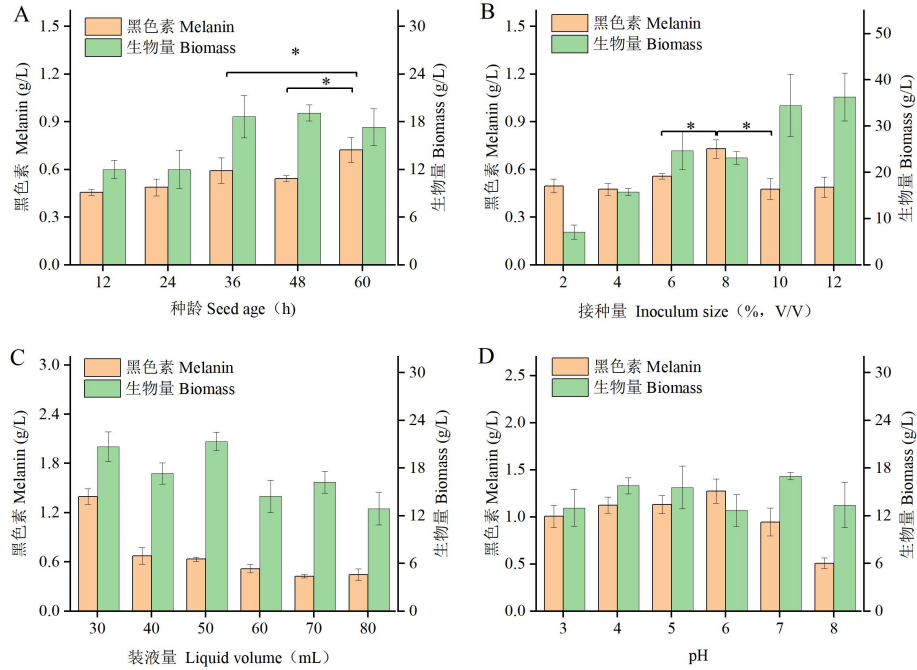


图3 发酵条件对黑色素产量和生物量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Effects of fermentation conditions on melanin yield and biomass ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.1.4 发酵条件的正交优化

在发酵条件单因素优化的基础上, 对种龄、接种量、装液量及培养基 pH 进行正交实验优化。极差分析显示发酵条件影响出芽短梗霉 GLA-1 生产黑色素的主次关系为: pH>接种量>种龄>装液量, 表明 pH 是最主要影响因素 (见表 6)。由 k 值大小确定最适发酵条件为: 种龄 60 h、接种量 8%、装液量 40 mL (250 mL 三角瓶)、培养基 pH 5。此外, 在优化的培养基和发酵条件下, 通过测定发酵过程中黑色素产量和细胞干重来跟踪黑色素生成的时间进程, 同时, 同步记录发酵过程中发酵液的颜色变化。如图 4 所示, 在发酵的前 5 d (见图 4B~4F), 发酵液呈黄色, 黑色素的产量和细胞干重逐渐增加, 但是幅度较缓。与黑色素的产量相对应, 发酵液的颜色在发酵第 6 d (见图 4G~4K) 开始变黑, 之后随着发酵的进行不断加深直至黑色。黑色素的产量随着细胞的生长直线上升, 发酵 10 d 后, 黑色素产量达到 1.639 ± 0.115 g/L,

较优化前的 0.399 ± 0.027 g/L 提高 4 倍。

表 6 发酵条件的正交实验结果和极差分析

Table 6 Orthogonal experiment results and range analysis of fermentation conditions

试验号	接种量	装液量	种龄	黑色素产量	
Test	Inoculum size	Liquid volumn	Seed age	pH	Yield of melanin
number	(%, V/V)	(mL)	(h)		(g/L)
1	6	30	36	5	1.467
2	6	40	48	6	1.050
3	6	50	60	7	0.960
4	8	30	48	7	0.872
5	8	40	60	5	1.625
6	8	50	36	6	1.146
7	10	30	60	6	0.781
8	10	40	36	7	0.827
9	10	50	48	5	1.026
k_1	1.159	1.040	48	1.373	-
k_2	1.214	1.167	0.983	0.992	-
k_3	0.878	1.044	1.122	0.886	-
极差	0.336	0.127	0.164	0.487	-
Range					

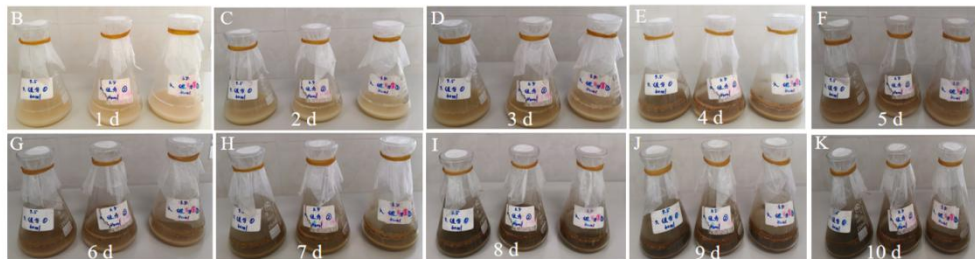
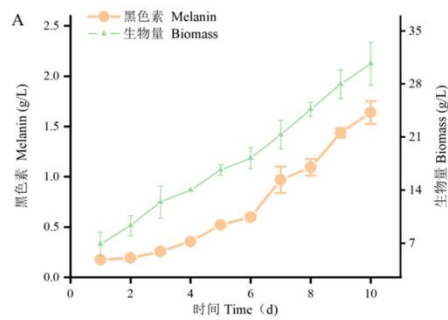


图4 黑色素生成过程中黑色素产量和细胞干重的时间进程以及黑色素产生过程中发酵液颜色的变化 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 The time course of melanin yield and cell dry weight during melanin production and the change of fermentation broth color during melanin production ($\bar{x} \pm s, n=3$)

尽管通过优化发酵工艺，黑色素产量相较于优化前已经提高了四倍，然而产量偏低的问题依然存在。这可能归因于摇瓶发酵培养固有的局限性，如传质传热效率低、营养物质分配不均，以及环境影响，如温度、氧气浓度等仍未能达到菌株的最佳生长需求。在发酵生产黑色素的过程中，不同菌株的培养条件存在显著差异，例如培养温度范围从 22 °C 至 50 °C^[12]，pH 值从 6.0 到 8.5，发酵周期有的甚至长达 161 d，而且某些菌株在培养时还需额外添加酪氨酸作为黑色素合成的前体^[23-24]。这些条件的多样性不仅凸显了发酵工艺的复杂性和灵活性，也揭示了实现黑色素高效工业化生产所面临的挑战。因此，未来的研究应当更加聚焦于菌株的遗传改造、代谢调控机制的深入探索，以及发酵工艺控制的进一步细化和优化，以期在工业化生产中大幅提升黑色素的产量和效率。

2.2 出芽短梗霉 GLA-1 来源黑色素的理化表征

利用碱溶醇沉法从发酵液中分离纯化得到纯度达 95% 的黑色素，黑色素纯度采用“1.12”中的方法进行计算。该黑色素呈黑色粉末状。

2.2.1 纯化后黑色素的溶解性

如表 7 所示，黑色素在水中部分溶解，可完全溶解于碱性溶液，但不溶于酸性溶液以及大多数常见的有机溶剂。此外，黑色素在过氧化氢溶液中脱色溶解，而在 FeCl₃ 溶液中出现棕色絮状物。

表 7 出芽短梗霉黑色素在不同溶剂中的溶解性测试

Table 7 Solubility test of melanin from *A. melanogenum* in different solvents

溶剂 Solvent	溶解性 Solubility		
	出芽短梗霉 GLA-1 黑色素 Melanin of <i>A. melanogenum</i> GLA-1	浅黄褐色嗜热菌 SP1 黑色素 ^[25] Melanin of <i>Thermothelomyces</i> <i>hinnuleus</i> SP1 ^[25]	纳什维尔链霉菌黑色素 ^[26] Melanin of <i>Streptomyces</i> <i>nashvillensis</i> ^[26]
水 Water	部分溶解 Partly soluble	不溶 Insoluble	部分溶解 Partly soluble
1 mol/L HCl	不溶 Insoluble	—	不溶 Insoluble

1 mol/L NaOH	溶解 Soluble	溶解 Soluble	溶解 Soluble
甲醇 Methyl alcohol、乙醇 Ethyl alcohol、DMSO、乙酸乙酯 Ethyl acetate、乙腈 Acetonitrile	不溶 Insoluble	不溶（部分溶解于 DMSO） Insoluble (Partly soluble in DMSO)	不溶（部分溶解于 DMSO） Insoluble (Partly soluble in DMSO)
H ₂ O ₂	溶解 Soluble	溶解 Soluble	—
FeCl ₃	不溶 Insoluble	不溶 Insoluble	—

2.2.2 纯化后黑色素的紫外-可见光谱分析

该黑色素在 200~800 nm 内进行紫外吸收光谱扫描，结果见图 5。在波长 260 nm 和 280 nm 处没有明显的吸收峰，这表明纯化后黑色素的核酸、蛋白质等杂质的含量较少，黑色素的纯度较高。该黑色素在 220 nm 处具有最大吸光度值，与大多数种类黑色素在 190~300 nm 处具有相似的最大吸光度值，且向长波方向吸光度不断降低，并从最大吸收峰位置逐渐减小，这与其他黑色素的紫外可见吸收光谱基本一致。同时，在 400~800 nm 范围内，黑色素的吸光度值随波长的增加而减少，几乎呈线性关系（见图 5A）。此外，吸光度与波长的对数呈线性关系，负斜率为 -0.0022 ($y = -0.0022x + 0.2235$, $R^2 = 0.9897$)，这与已报道的多巴型黑色素的负斜率 (-0.0031) 基本一致^[27]，这是黑色素的另一典型特征（见图 5B）。

通过对纯化后黑色素的颜色状态、溶解性及紫外-可见光谱进行分析，我们推测出芽短梗霉 GLA-1 产生的黑色素为多巴型黑色素中的真黑色素。

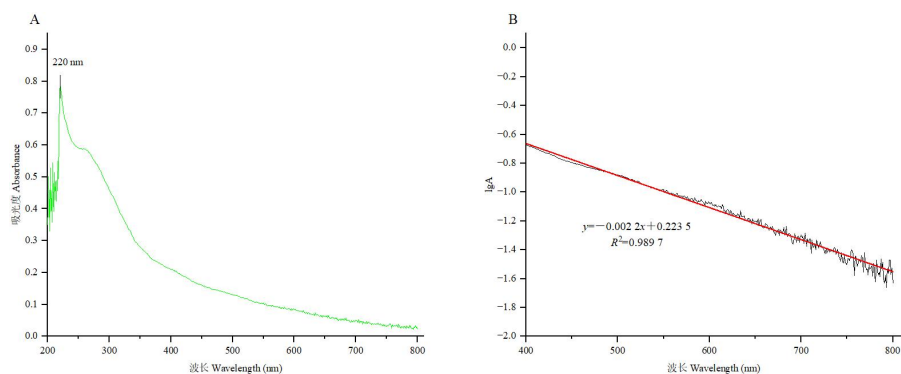


图 5 出芽短梗霉黑色素的紫外-可见光谱及波长与 lgA 的线性拟合图

Fig.5 UV-vis spectra of melanin from *A. melanogenum* and linear fitting of wavelength and lgA

2.3 出芽短梗霉 GLA-1 来源黑色素的生物活性研究

2.3.1 抗氧化活性

以 BHT 作为阳性对照，考察该黑色素的 ABTS⁺、DPPH 以及羟基自由基清除活性。当浓度为 60~100 mg/L 时，黑色素相当或略高于 BHT 的 ABTS⁺ 自由基清除活性（见图 6A）；在所考察的浓度范围内，黑色素均高于 BHT 的 DPPH 自由基清除活性（见图 6B）；但是，黑色素和 BHT 的羟基自由基清除活性没有显著性差异（见图 6C）。以 V_C 作为阳性对照，考察该黑色素的超氧离子自由基清除活性。在所考察的浓度范围内，黑色素均高于 V_C 的超氧离子自由基清除活性（见图 6D）。当黑色素浓度为 100 mg/L 时，其 ABTS⁺、DPPH、羟基和超氧离子自由基清除活性分别为 99.32%±0.07%、89.71%±0.47%、45.95%±1.36% 和 50.85%±4.01%。

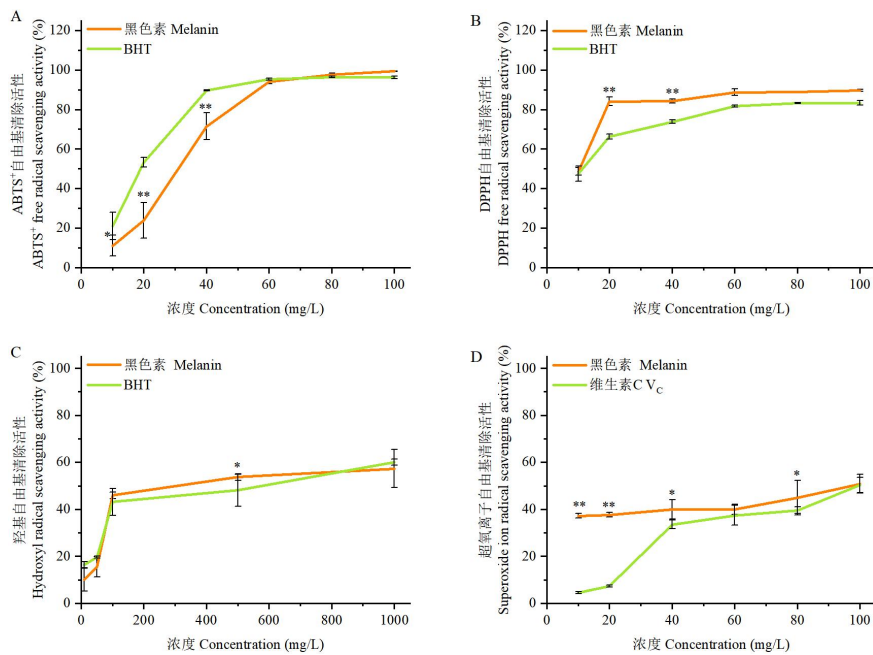


图6 黑色素的抗氧化活性 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.6 Antioxidant activity of melanin ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注：与 BHT 比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。Note: Compared with BHT, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.3.2 抗紫外辐射活性

以无菌生理盐水为对照，考察该黑色素的抗紫外辐射活性。结果显示（见图 7），紫外线照射 2 min 内，无菌生理盐水处理的三种微生物（大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和酿酒酵母）的存活率快速降低至 0；黑色素处理的三种微生物，只有大肠杆菌存活率有一定降低，而金黄色葡萄球菌和酿酒酵母的存活率没有显著变化。当延长紫外线照射时间至 20 min，黑色素处理的三种微生物的活菌数基本稳定。上述结果表明黑色素对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和酿酒酵母均有显著的抗紫外辐射保护活性。

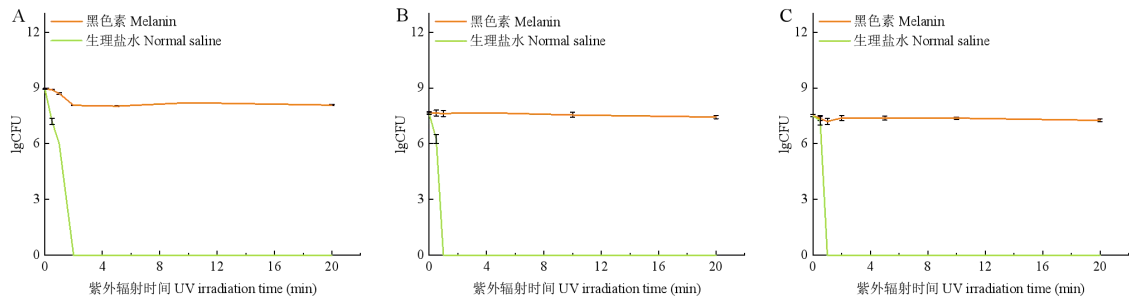


图7 不同紫外线照射时间下黑色素和生理盐水处理的大肠杆菌 (A)、金黄色葡萄球菌 (B) 和酿酒酵母 (C) 的存活率
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Survival rate of *E. coli* (A), *S. aureus* (B) and *S. cerevisiae* (C) treated with melanin and normal saline under different UV irradiation time ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.3.3 抗菌活性

以四环素为阳性对照，考察该黑色素的抗菌活性。结果显示，黑色素浓度为 0.25-1.00 mg/mL 时，其对大肠杆菌表现出良好的抗菌活性（见图 8A）；其最适抑菌浓度为 0.4 mg/mL，对应的抑菌率为 46.08%±0.36%（见图 8B）。在所考察的浓度范围内，黑色素对金黄色葡萄球菌没有抗菌活性。

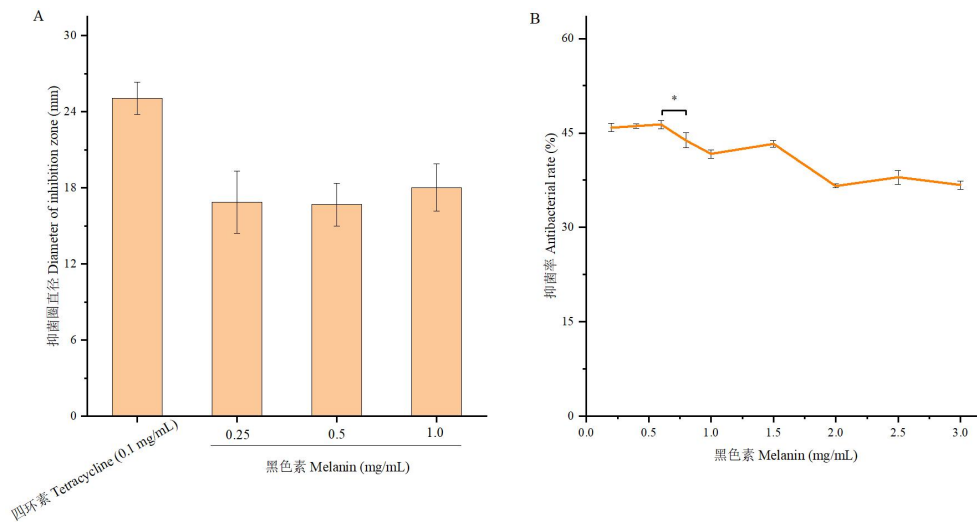


图8 黑色素对大肠杆菌的抗菌活性 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 Antibacterial activity of melanin against *E. coli* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨论与结论

本研究以实验室保存的一株出芽短梗霉 (*A. melanogenum*) GLA-1 为生产菌株，采用单因素和正交实验优化得到该菌株发酵生产黑色素的最优培养基：可溶性淀粉 120 g/L、酵母膏 0.1 g/L、KCl 0.5 g/L、KH₂PO₄ 0.05 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.3 g/L、FeSO₄·7H₂O 0.56 g/L，优

化后的培养基以可溶性淀粉作为主要碳源，辅以微量的酵母膏、无机盐（如KCl、KH₂PO₄、MgSO₄·7H₂O、FeSO₄·7H₂O）等，既保证了菌株的生长需求，又有效控制了成本。此外，获得该菌株发酵生产黑色素的最优发酵条件：最适种龄 60 h、接种量 8%、装液量 40 mL、培养基pH 5、培养温度 30 °C、摇床转速 150 r/min。在上述条件下，黑色素产量达到 1.639±0.115 g/L，较优化前的 0.399±0.027 g/L提高 4 倍。这一结果不仅展示了该菌株在黑色素生产中的潜力，也体现了优化策略的有效性。特别值得注意的是，出芽短梗霉GLA-1 在无需额外添加酪氨酸作为前体的情况下，即可利用简单且成本较低的培养基在短时间内高效合成黑色素。这一特性不仅降低了生产成本，还简化了生产工艺流程，为黑色素生产的工业化应用提供了更为经济可行的方案。尽管当前黑色素产量仍然较低，但本实验为进一步提高产量提供了宝贵的实验数据和理论基础。

溶解性测试以及紫外-可见光谱研究结果显示，纯化后黑色素的颜色状态、溶解性及紫外-可见光谱与多巴型黑色素中真黑色素的典型特征基本一致^[27]。因此，我们推测该黑色素为多巴型黑色素中的真黑色素。抗氧化活性研究结果显示，黑色素对 ABTS⁺自由基、DPPH 自由基、羟基自由基及超氧离子自由基具有良好的清除活性。有研究表明，经过修饰后的黑色素，其抗氧化活性有所提高^[3,28]。抗紫外辐射活性研究结果显示，黑色素对处在紫外线照射下的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和酿酒酵母具有显著的保护效果。这一结果明显优于 Ye 等^[5]报道的 *Lachnum* YM404 的抗紫外辐射研究结果。此外，Li 等^[6]报道以中波长紫外线诱导损伤小鼠背部皮肤组织，其会产生严重的氧化应激反应。利用粒毛盘菌 YM156 所产黑色素处理小鼠，其清除自由基的相关酶活性的降低被抑制；而精氨酸修饰的黑色素处理组的酶活性接近未经紫外辐射处理组。抗菌活性研究结果显示，黑色素对大肠杆菌具有一定的抑制活性。在所考察浓度范围内，对金黄色葡萄球菌没有抑制活性。有趣的是，与 Xu 等^[7]报道的 *Lachnum* YM30 来源的黑色素相比，出芽短梗霉 GLA-1 产生的黑色素对大肠杆菌的最低抑菌浓度并不是表现为一定区间的浓度依赖方式，而是表现为具有一个最适的抑菌浓度。

参考文献

- 1 Singh S, Nimse SB, Mathew DE, et al. Microbial melanin: recent advances in biosynthesis, extraction, characterization, and applications[J]. *Biotechnol Adv*, 2021, 53: 107773.
- 2 Liu X, Yuan Y, Hou RL et al. Optimization of extraction conditions of melanin from *Auricularia polytricha* and its antioxidant activities *in vitro*[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2019, 31: 1688-1696.
- 3 Xu L, Li J, Chang M, et al. Comparison of physicochemical and biochemical properties natural and arginine-modified melanin from medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*[J]. *J Basic*

- Microbiol,2020,60:1014-1028.
- 4 Wibowo JT,Kellermann MY,Petersen LE,et al.Characterization of an insoluble and soluble form of melanin produced by *Streptomyces cavourensis* SV 21,a sea cucumber associated bacterium[J].Mar Drugs,2022,20:54.
 - 5 Ye M,Guo GY,Lu Y,et al.Purification,structure and anti-radiation activity of melanin from *Lachnum* YM404[J].Int J Biol Macromol,2014,63:170-176.
 - 6 Li S,Yang L,Li J,et al.Structure,molecular modification,and anti-radiation activity of melanin from *Lachnum* YM156 on ultraviolet B-induced injury in mice[J].Appl Biochem Biotechnol,2019,188:555-567.
 - 7 Xu C,Li JL,Yang LQ,et al.Antibacterial activity and a membrane damage mechanism of *Lachnum* YM30 melanin against *Vibrio parahaemolyticus* and *Staphylococcus aureus*[J].Food Control,2017,73:1445-1451.
 - 8 Wang L,Li Y,Li Y.Metal ions driven production,characterization and bioactivity of extracellular melanin from *Streptomyces* sp.ZL-24[J].Int J Biol Macromol,2019,123:521-530.
 - 9 Roy S,Rhim JW.New insight into melanin for food packaging and biotechnology applications[J].Crit Rev Food Sci Nutr,2022,62:4629-4655.
 - 10 Guo J,Rao Z,Yang T,et al.High-level production of melanin by a novel isolate of *Streptomyces kathirae*[J].FEMS Microbiol Lett,2014,357:85-91.
 - 11 Zhu J,Fang SJ,Wang W,et al.Study on optimization of fermentation conditions and stability of radiation-tolerant melanin from *Aureobasidium*[J].Xinjiang Agric Sci(新疆农业科学),2016,53:1692-1699.
 - 12 Ribera J,Panzarasa G,Stobbe A,et al.Scalable biosynthesis of melanin by the basidiomycete *Armillaria cepistipes*[J].J Agric Food Chem,2019,67:132-139.
 - 13 Yang YG,Huang JX,Wang J,et al.Study on response surface optimization,stability and antioxidant activity of HM3 melanin fermentation of *Streptomyces cassicae*[J].Chinese Food Addit(中国食品添加剂),2023,34:1-11.
 - 14 Zhu J,Gu MY,Wang W,et al.Study on identification of a radiation-resistant black yeast-like fungus and isolation of mealnin[J].Xinjiang Agric Sci(新疆农业科学),2013,50:1858-1864.
 - 15 Zeng W,Zhang B,Chen G,Li M,Liang Z.Efficient production of polymalic acid by a novel isolated *Aureobasidium pullulans* using metabolic intermediates and inhibitors[J].Appl Biochem Biotechnol,2019,187:612-627.
 - 16 Tang RR,Chi Z,Jiang H,et al.Overexpression of a pyruvate carboxylase gene enhances extracellular liamocin and intracellular lipid biosynthesis by *Aureobasidium melanogenum* M39[J].Process

- Biochem,2018,69:64-74.
- 17 Fogarty RV,Tobin JM.Fungal melanins and their interactions with metals[J].Enzyme Microb Technol,1996,19:311-317.
 - 18 Ye M,Wang Y,Guo GY,et al.Physicochemical characteristics and antioxidant activity of arginine-modified melanin from *Lachnum* YM-346[J].Food Chem,2012,135:2490-2497.
 - 19 Hou R,Liu X,Xiang K,et al.Characterization of the physicochemical properties and extraction optimization of natural melanin from *Inonotus hispidus* mushroom[J].Food Chem,2019,277:533-542.
 - 20 Liu X,Hou R,Wang D,et al.Comprehensive utilization of edible mushroom *Auricularia auricula* waste residue-extraction,physicochemical properties of melanin and its antioxidant activity[J].Food Sci Nutr,2019,7:3774-3783.
 - 21 Chen SX,Yao YY,Lu ZY,et al.Pyrogallol autoxidation and its application to tea polyphenols activity assay[J].Food Res Dev(食品研究与开发),2020,41:29-36.
 - 22 Wang Y.The structure,aminoacids modification and biological activity of melanin from *Lachnum* YM-346[D].Hefei:Hefei University of Technology(合肥工业大学),2012.
 - 23 Madhusudhan DN,Mazhari BBZ,Dastager SG,et al.Production and cytotoxicity of extracellular insoluble and droplets of soluble melanin by *Streptomyces lusitanus* DMZ-3[J].Biomed Res Int,2014,2014:306895.
 - 24 Li XM,Yuan Y,Xue FZ,et al.Optimization of fermentation conditions for extracellular melanin production from *Inonotus hispidus* and its antioxidant activity[J].J Nucl Agr Sci(核农学报),2023,34:1-11.
 - 25 Pandey S,Meshram V,Yehia HM,et al.Efficient production and characterization of melanin from *Thermothelomyces hinnuleus* SP1,isolated from the coal mines of Chhattisgarh,India[J].Front Microbiol,2024,14:1320116.
 - 26 Restaino OF,Manini P,Kordjazi T,et al.Biotechnological production and characterization of extracellular melanin by *Streptomyces nashvillensis*[J].Microorganisms,2024,12:297.
 - 27 Tong C,Luo J,Xie C,et al.Characterization and biological activities of melanin from the medicinal fungi *Ophiocordyceps sinensis*[J].Int J Mol Sci.2023,24:10282.
 - 28 Li L,Yuan HB,Li SL,et al.Molecular modifications of melanin from *Lachnum* and their antioxidative activities[J].J Hefei Univer Technol:Nat Sci(合肥工业大学学报:自科版),2016,39:404-409.

收稿日期: 2024-07-15 接受日期: xxxx-xx-xx

基金项目: 国家自然科学基金项目(32160546); 广西壮族自治区2023年国家级大学生创新创业训练计划项目(202310601046)

*通信作者 E-mail: zengwei2022@glmc.edu.cn