

高产吲哚乙酸菌株的筛选、鉴定及其发酵特性

徐科玉, 赵国群*

(河北科技大学 食品与生物学院, 河北 石家庄 050018)

摘要: 微生物发酵法生产吲哚乙酸 (IAA) 具有条件温和、能耗低、不使用有毒有害物质、环境污染小等优点。从蔬菜根际土壤中筛选出一株产 IAA 能力较强的菌株 FX-02, 通过形态学、生理生化特征及分子生物学鉴定, 将该菌株鉴定为霍氏肠杆菌 (*Enterobacter hormaechei*)。对 FX-02 发酵产生 IAA 特性进行了研究。结果表明, FX-02 生物合成 IAA 的途径属于色氨酸依赖型。FX-02 合成 IAA 的适宜色氨酸质量浓度为 10.0 g/L。FX-02 产 IAA 的最佳碳、氮源及无机盐分别为甘油、蛋白胨和氯化钙。当发酵培养基为甘油质量浓度 10.0 g/L、蛋白胨质量浓度 10.0 g/L、色氨酸质量浓度 10.0 g/L、硫酸镁质量浓度 1.5 g/L、磷酸氢二钾质量浓度 1.5 g/L 时, 30 °C、180 r/min 振荡培养 72 h, FX-02 的 IAA 产量 (2349.40 mg/L) 达到较高水平。

关键词: 吲哚乙酸; 筛选; 鉴定; 霍氏肠杆菌; 发酵特性; 生物工程

中图分类号: TQ452.1

文献标识码: A

文章编号: 1003-5214 (2022) 01-0121-06 开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Screening and identification of a high-IAA-yield microbial strain and its fermentation characteristics

XU Keyu, ZHAO Guoqun*

(College of Food Science and Biology, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, Hebei, China)

Abstract: Indole-3-acetic acid (IAA) production by microbial fermentation has some advantages such as mild reaction conditions, low energy consumption, no employment of toxic and harmful substances, and low environmental pollution. A strain FX-02 with higher IAA production ability was isolated and screened from the vegetable rhizosphere soils. The strain was identified as *Enterobacter hormaechei* by morphology, physiological and biochemical characteristics, and molecular biology. The characteristics of IAA produced by fermentation of FX-02 were studied. The results showed that the IAA biosynthetic pathway of FX-02 belonged to tryptophan-dependent type. The optimal mass concentration of tryptophan for FX-02 to synthesize IAA was 10.0 g/L. The best carbon and nitrogen sources and inorganic salt for FX-02 to produce IAA were glycerol, peptone and calcium chloride, respectively. When the fermentation cultural medium (glycerol mass concentration of 10.0 g/L, peptone mass concentration of 10.0 g/L, tryptophan mass concentration of 10.0 g/L, MgSO₄ mass concentration of 1.5 g/L and K₂HPO₄ mass concentration of 1.5 g/L) was incubated at 30 °C for 72 h at 180 r/min, the IAA production of FX-02 reached a higher level (2349.40 mg/L).

Key words: indole-3-acetic acid; screening; identification; *Enterobacter hormaechei*; fermentation characteristics; biological engineering

吲哚-3-乙酸 (IAA) 是一种植物生长调节剂, 在植物细胞的分裂、伸长、分化和种子萌发、根系发育以及营养生长过程起着重要的作用^[1-2]。施用 IAA 可以促进作物生长、提高作物产量, 因而广泛

应用于农业生产^[3]。目前, IAA 的工业生产采用化学合成方法。在化学合成 IAA 的生产过程中, 不仅需要高温高压、能耗高, 而且还使用氰化钾等有毒有害物质, 环境污染严重^[4]。NUTARATAT 等^[5]使用

收稿日期: 2021-08-01; 定用日期: 2021-10-26; DOI: 10.13550/j.jxhg.20210776

基金项目: 河北省重点研发计划项目 (19226920D)

作者简介: 徐科玉 (1989—), 男, 硕士生, E-mail: xukeyu666@163.com. 联系人: 赵国群 (1963—), 男, 教授, E-mail: gqzhao18@126.com.

红色酵母菌采用分批补料发酵的方式发酵生产 IAA, 其 IAA 产量达到了 1627.10 mg/L。与化学合成法相比, 采用微生物发酵法生产 IAA 具有过程条件温和、能耗低, 不使用有毒有害物质, 环境污染小等优点。

除植物能产生少量 IAA 外, 许多微生物也能够产生 IAA。刘璐等^[6]从大连市郊区农田的植物根际土壤中筛选出了一株芽孢杆菌, 其 IAA 产量为 106.11 mg/L。周铭典等^[7]从猪粪堆肥中筛选出一株停滞带杆菌 (*Corynebacterium stationis*), 其 IAA 产量为 138.87 mg/L。GARG 等^[8]从印度三叶草根瘤中分离出一株根瘤菌 BH14, 其 IAA 产量为 176 mg/L。GHOSH 等^[9]从大豆根系土壤中筛选出了一株肠杆菌, 其 IAA 产量为 545 mg/L。细菌具有培养基简单、生长速度快、发酵周期短、易规模化生产的特点。但目前从土壤及其他来源筛选出的产 IAA 细菌普遍产量很低, 难以满足发酵法工业化规模生产 IAA 的要求。此外, 关于发酵法生产 IAA 的研究在国内外开展得很少。

本研究从蔬菜根际土壤中筛选出一株高产 IAA 的细菌菌株, 经过鉴定, 该菌株为霍氏肠杆菌。研究了不同碳源、氮源、无机盐和色氨酸条件下该菌株产生 IAA 的发酵特性, 以期为微生物发酵法生产 IAA 提供理论及实验依据。

1 实验部分

1.1 土壤样品

土壤样品采集于河北省石家庄市藁城区杜村蔬菜种植地黄瓜、番茄等蔬菜根际土壤, 取样深度为 0~20 cm。采集土样时剔除石块等杂物, 放置无菌袋中, 置于冰箱 4 °C 保存。

1.2 试剂与仪器

吡啶乙酸标准品, LC, 北京索莱宝生物科技有限公司; 色氨酸, AR, 上海罗恩试剂有限公司; 糖蜜, BR, 南宁糖蜜糖业有限公司; 棉籽粉、豆粕粉、花生饼粉, BR, 北京鸿润宝顺科技股份有限公司; 玉米浆, BR, 河南鑫洋实业有限责任公司; 淀粉、糊精、酵母浸粉、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、蛋白胨, BR, 北京奥博星生物技术有限责任公司; NH_4Cl 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NaCl 、 NaNO_3 、 KCl 、 MgCl_2 、 CaCO_3 、 CaCl_2 、 MgSO_4 、 K_2HPO_4 、 HClO_4 、 FeCl_3 、甘油, AR, 天津市永大化学试剂有限公司。

ZWY-240 恒温摇床, 上海智城分析仪器制造有限公司; HANNA pH211 台式酸度计, 意大利哈纳仪器公司; EL204 型分析天平, 梅特勒-托利多(上海)仪器有限公司; 752 型紫外-可见分光光度计, 上海光谱仪器有限公司; SPX-250B-II 生化培养箱, 上海贺德实验设备有限公司。

1.3 培养基

LB 液体培养基 (g/L): 蛋白胨 10.0、酵母浸粉 5.0、 NaCl 10.0, pH 调至 7.0~7.2。

LB 固体培养基 (g/L): 琼脂 20.0, 其余同 LB 液体培养基。

发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 10.0、蛋白胨 10.0、色氨酸 2.0、硫酸镁 1.5、磷酸氢二钾 1.5, pH 调至 7.0~7.2。

1.4 方法

1.4.1 高产 IAA 菌株的筛选

(1) 菌株的分离: 称取土壤样品 10 g, 加入 100 mL 无菌水, 28 °C、120 r/min 振荡 30 min, 静置 10 min, 形成 0.10 kg/L 菌悬液。将此土壤菌悬液用无菌水梯度稀释成 1×10^{-3} ~ 1×10^{-9} , 然后将 1×10^{-5} ~ 1×10^{-8} 稀释度的菌悬液涂布于 LB 固体培养基上, 放置于 30 °C 生化培养箱培养 48 h。挑取不同形态的菌落, 并通过划线分离纯化得到单菌落。制成单菌落的 LB 固体培养基 (斜面), 4 °C 冰箱保存。

(2) IAA 产生菌的初筛: 将斜面保藏的菌体用 LB 固体培养基重新活化, 然后用接种环挑取 2~3 环单菌落接种到 LB 液体培养基中, 30 °C、180 r/min 摇床振荡培养 24 h。吸取 2 mL 发酵液于试管中, 加入 4 mL Salkowski 显色试剂 (1 mL 0.5 mol/L FeCl_3 溶液与 50 mL 质量分数 35% HClO_4 溶液的混合液)^[10], 在避光条件下 40 °C 水浴 30 min。颜色变红者表示该菌株具有产生 IAA 能力, 且红色越深表明 IAA 产量越高。

(3) IAA 产生菌的复筛: 将能够产生 IAA 的菌株接种到发酵培养基中, 接种体积分数 5%, 30 °C、180 r/min 摇床振荡培养 24 h。发酵结束后, 测定发酵液中 IAA 的含量。

1.4.2 IAA 产生菌的鉴定

(1) 产生菌的形态学及生理生化鉴定: 参照《常见细菌系统鉴定手册》, 观察菌种在 LB 固体培养基培养 24 h 后的形态特征, 包括形态、颜色、边缘、表面、透明度等; 对菌株进行革兰氏染色并用油镜进行观察以确定菌种类型。对其进行氧化酶实验、吡啶利用、柠檬酸盐利用、丙二酸盐利用、麦芽糖利用、D-山梨醇利用、MR (甲基红) 实验和 VP (乙酰甲基甲醇) 实验。

(2) 产生菌的分子生物学鉴定: 分离纯化的菌株采用 SDS-CTAB (十二烷基磺酸钠-十六烷基三甲基溴化铵) 法提取基因组, 使用细菌通用引物 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492r (5'-CTACGCTACCTTGTTACGA-3') 对菌株序列进行扩增^[6], 委托上海派森诺生物科技股份有限公司进行 16S rDNA 鉴定。

1.4.3 IAA 产生菌发酵产 IAA 特性研究

(1) 碳源对 FX-02 菌体生长及产 IAA 的影响实验

将发酵培养基中碳源分别调整为葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、淀粉、糖蜜、糊精和甘油, 其质量浓度均为 10.0 g/L。培养基灭菌后, 接入体积分数 5% FX-02 种子液, 30 °C、180 r/min 摇床振荡培养 72 h。

(2) 氮源对 FX-02 菌体生长及产 IAA 的影响实验

将发酵培养基中碳源调整为甘油, 氮源分别调整为氯化铵、硫酸铵、花生饼粉、豆粕粉、棉籽粉、酵母浸粉、玉米浆和蛋白胨, 其质量浓度均为 10.0 g/L。培养基灭菌后, 接入体积分数 5% FX-02 种子液, 30 °C、180 r/min 摇床振荡培养 72 h。

(3) 无机盐对 FX-02 菌体生长及产 IAA 的影响实验

将发酵培养基中无机盐分别调整为氯化钙、碳酸钙、氯化钠、硝酸钠、氯化钾、氯化镁和硫酸镁, 其质量浓度均为 1.5 g/L, 并将硫酸镁设为对照。培养基灭菌后, 接入体积分数 5% FX-02 种子液, 30 °C、180 r/min 摇床振荡培养 72 h。

(4) 色氨酸对 FX-02 菌体生长及产 IAA 的影响实验

将发酵培养基中色氨酸质量浓度分别调整为 0.1、0.3、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 和 12.0 g/L, 其他成分及质量浓度保持不变, 不添加色氨酸的培养基作为对照。培养基灭菌后, 接入体积分数 5% FX-02 种子液, 30 °C、180 r/min 摇床振荡培养 72 h。

1.4.4 分析方法

(1) 菌体生长的检测: 将发酵液直接或做适当稀释后, 使用紫外-可见分光光度计测定发酵液在 600 nm 处的光密度值 (OD_{600})。

(2) IAA 浓度的检测: 参考 DEFEZ 等^[11]的 IAA 浓度检测方法。发酵液 5000 r/min 离心 10 min, 吸取 2.0 mL 上清液与 2.0 mL 的 Salkowski 显色试剂混合, 40 °C 避光水浴 30 min, 使用紫外-可见分光光度计于波长 530 nm 处测定其吸光度。对照标准关系曲线计算单位体积发酵液中 IAA 产量。标准关系曲线通过梯度稀释 IAA 标准品绘制。

2 结果与讨论

2.1 高产 IAA 菌株的筛选与鉴定

2.1.1 菌株筛选

从蔬菜根际土壤中共分离出 135 株细菌。利用 IAA 与 Salkowski 试剂的显色反应, 初步筛选出具有明显颜色变化的菌株 5 株, 其编号分别为 FX-02、FX-04、FX-18、FX-39、FX-72。对上述菌株进行复筛, 定量测定其 IAA 产量, 结果见表 1。如表 1 所示, 菌株 FX-02 的产 IAA 能力最高, 其 IAA 产量达

到 274.32 mg/L; 其次是菌株 FX-39, 而菌株 FX-04 产 IAA 能力最低, 其 IAA 产量仅为 25.35 mg/L。因此, 将菌株 FX-02 作为后续研究的对象。

表 1 筛选出的产 IAA 菌株的 IAA 产量
Table 1 IAA production of screened producing IAA strains

菌株	IAA 产量/(mg/L)
FX-02	274.32±3.20
FX-04	25.35±0.30
FX-18	64.72±0.41
FX-39	194.74±1.70
FX-72	100.15±1.20

2.1.2 菌株鉴定

(1) 形态学及生理生化特征鉴定: 菌株 FX-02 在 LB 固体培养基形成的菌落为圆形, 呈乳白色, 表面光滑、湿润、较透明 (见图 1a)。在显微镜下观察, 菌株 FX-02 菌体呈短杆状 (图 1b)。菌株 FX-02 的部分生理生化指标见表 2。

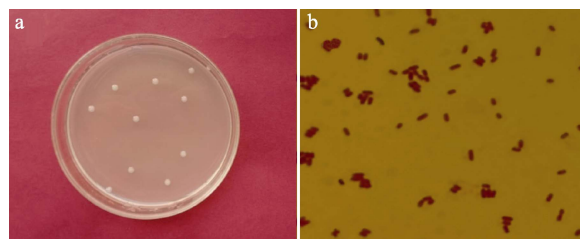


图 1 菌株 FX-02 的菌落形态 (a) 和菌体形态 (b)
Fig. 1 Colony morphology (a) and morphological feature (b) of strain FX-02

表 2 菌株 FX-02 生理生化指标
Table 2 Physiological and biochemical properties of strain FX-02

鉴定指标	结果
革兰氏染色	-
吲哚	+
氧化酶	-
丙二酸盐	+
柠檬酸盐	+
麦芽糖	+
D-山梨醇	-
MR 实验	-
VP 实验	+

注: “+”表示阳性反应, “-”表示阴性反应。

(2) 分子生物学鉴定: 以菌株 FX-02 的 DNA 为模板获得 1.4 kb (即千碱基对) 的特异性 DNA 片段。经 16S rDNA 测序获得菌株 FX-02 的 16S rDNA 序列, 并进行 NCBI 数据库 BLAST 序列比对, 发现 FX-02 与霍氏肠杆菌 10-17 (*Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis* 10-17) 的一致性达到 99.65%。根据比对结果, 对 FX-02 与参比菌株构建系统发育树 (图 2)。如图 2 所示, 在进化树上菌株 FX-02

与霍氏肠杆菌 10-17 位于同一支。模式菌株霍氏肠杆菌 10-17 的特征是革兰氏阴性菌，氧化酶实验阴性，不产生吲哚，能够分解利用丙二酸盐、柠檬酸盐、麦芽糖，不能分解利用 D-山梨醇，MR 实验阴性，VP 实验阳性。

FX-02 生理生化特征(表 2)除吲哚反应外均与

模式菌株一致，其可能原因为该菌具有转化色氨酸产生吲哚的能力，与该菌能够产生 IAA 的特征相符合。结合以上信息，将 FX-02 菌株鉴定为霍氏肠杆菌 (*Enterobacter hormaechei*)。该菌种于 2021 年 4 月 26 日保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏号 CCTCC No. M2021409。

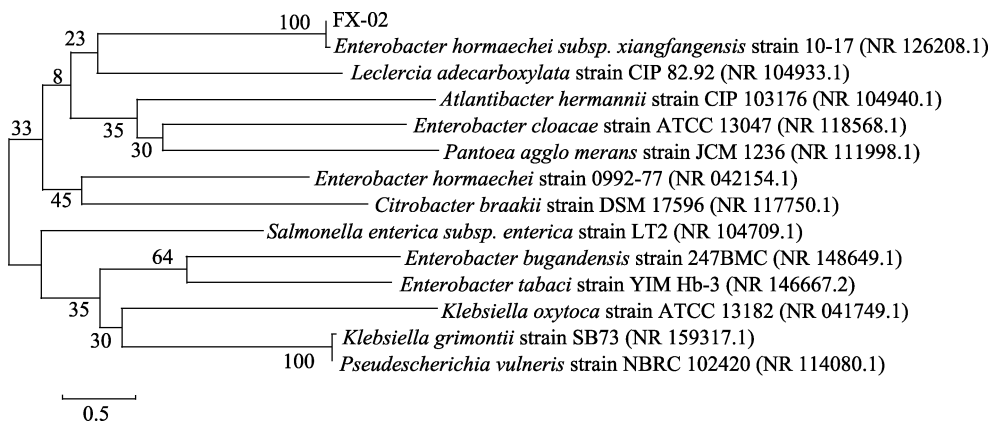


图 2 菌株 FX-02 基于 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain FX-02 based on 16S rDNA sequences

2.2 FX-02 菌发酵产 IAA 特性研究

2.2.1 碳源对 FX-02 菌体生长及产 IAA 的影响

碳源是微生物生长及代谢产物合成所必需的基础营养成分之一。如表 3 所示，在所实验的 7 种碳源中，甘油作碳源时菌体生长最好，其次是淀粉，而糖蜜表现最差。从 IAA 产量来看，仍然是甘油作碳源时 IAA 产量最高，糖蜜的 IAA 产量最低；其他 5 种碳源的菌体生长有显著差异，但其 IAA 产量差异并不显著。吴翔等^[12]研究报道弯曲芽胞杆菌 MY07 产 IAA 的最佳碳源为甘露醇；当碳源为葡萄糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖时，菌株几乎不分泌 IAA，并认为其原因是葡萄糖和 IAA 反应形成糖基酯-IAA 复合物，使 IAA 以一种无活性状态存在，最终使得游离态 IAA 产量下降。然而，余水静等^[13]报道 *Pantoea* sp. IAA-6 产 IAA 的最佳碳源为淀粉。徐婧等^[14]报道产酸克雷伯菌 (*Klebsiella oxytoca*) 产 IAA 的最佳碳源为蔗糖。造成这种实验结果差异的原因应该与微生物菌种、培养基成分及培养条件的不同有关。

表 3 碳源对 FX-02 菌体生长及产 IAA 的影响

Table 3 Effect of carbon source on the growth and IAA production of strain FX-02

碳源	OD 值	IAA 产量/(mg/L)
糖蜜	4.15±0.05 ^f	839.62±9.4 ^e
葡萄糖	6.69±0.06 ^d	982.03±7.8 ^{bc}
蔗糖	5.61±0.07 ^c	968.75±8.3 ^c
麦芽糖	8.27±0.10 ^b	984.83±7.6 ^{bc}
糊精	8.48±0.08 ^b	979.32±5.9 ^c
淀粉	8.70±0.11 ^a	994.74±8.4 ^b
甘油	8.78±0.08 ^a	1019.05±11.6 ^a

注：同列不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。下同。

2.2.2 氮源对 FX-02 菌体生长及产 IAA 的影响

氮源也是影响微生物生长及代谢产物合成的基础营养成分。如表 4 所示，氮源的种类对 FX-02 菌体生长及产 IAA 有很大的影响。所实验的氮源可分为有机氮源和无机氮源。与有机氮源相比，当使用无机氮源时，FX-02 菌体生长很差，IAA 产量也很低。当使用有机氮源时，FX-02 菌体生长要明显好于无机氮源，其 IAA 产量也远高于无机氮源。但菌体生长与 IAA 产量并非完全正相关。例如，当花生饼粉为氮源时，FX-02 菌体生长远好于玉米浆，但其 IAA 产量(164.71 mg/L)却大大低于玉米浆(638.14 mg/L)。这是由于 IAA 属于微生物的次级代谢产物^[15]，而次级代谢产物通常是在菌体停止生长进入稳定期后才开始大量合成的，在同样的培养条件下，过高的菌体生长反而不利于 IAA 的合成。根据 IAA 产量，FX-02 产 IAA 的最佳氮源为蛋白胨，其次是酵母浸粉和玉米浆。吴翔等^[12]研究报道弯曲芽胞杆菌 MY07 产 IAA 的最佳氮源为 KNO_3 。余水静等^[13]报道 *Pantoea* sp. IAA-6 产 IAA 的最佳氮源为蛋白胨。赵柏霞等^[16]报道阿氏芽胞杆菌 (*Bacillus aryabhattai*) 产 IAA 的最佳氮源为酵母粉。造成这种实验结果差异的原因主要与微生物菌种有关。

2.2.3 无机盐对 FX-02 菌体生长及产 IAA 的影响

无机盐主要为微生物提供除碳、氮源以外的各种重要元素。如表 5 所示，从菌体生长的角度来看，在所实验的 7 种无机盐中，氯化钙的菌体生长最好，其 OD 值显著高于对照(硫酸镁)；其他无机盐的 OD 值均不高于或低于对照。从 IAA 产量来看，当

培养基中无机盐为氯化钠、硝酸钠和氯化钾时, IAA 产量均显著低于硫酸镁 ($p < 0.05$)。

表 4 氮源对 FX-02 菌体生长及产 IAA 的影响

Table 4 Effect of nitrogen source on the growth and IAA production of strain FX-02

氮源	OD 值	IAA 产量/(mg/L)
氯化铵	1.90±0.02 ^f	6.75±0.08 ^f
硫酸铵	1.64±0.02 ^e	21.23±0.18 ^f
花生饼粉	16.55±0.19 ^a	164.71±2.6 ^c
豆粕粉	12.32±0.14 ^c	167.36±2.4 ^c
棉籽粉	9.78±0.09 ^d	428.73±5.5 ^d
酵母浸粉	15.54±0.20 ^b	963.65±12.3 ^b
玉米浆	8.52±0.08 ^e	638.14±9.2 ^c
蛋白胨	12.21±0.11 ^c	1020.75±12.1 ^a

表 5 无机盐对菌体生长及产 IAA 的影响

Table 5 Effect of inorganic salts on the growth and IAA production of strain FX-02

无机盐	OD 值	IAA 产量/(mg/L)
硫酸镁	8.95±0.11 ^b	1018.7±13.2 ^b
氯化钠	8.60±0.09 ^d	924.6±13.2 ^d
硝酸钠	8.87±0.10 ^b	946.4±15.4 ^d
氯化钾	8.63±0.09 ^{cd}	941.9±14.7 ^d
氯化镁	8.62±0.07 ^d	989.4±10.2 ^c
碳酸钙	8.80±0.06 ^{bc}	926.6±14.8 ^d
氯化钙	9.13±0.09 ^a	1186.7±17.8 ^a

尽管均为镁盐, 氯化镁的 IAA 产量却稍低于硫酸镁。从表 5 还发现, 与硫酸镁相比, 氯化钙可促进 FX-02 合成 IAA, 其 IAA 产量增加了 16.49%。李冠杰等^[17]也发现钙离子对衣芽孢杆菌 YDY 产 IAA 有显著促进作用。然而, 刘璐等^[6]和贾西贝等^[18]报道产 IAA 的最适金属离子为镁离子。造成这种实验结果差异的原因主要是所使用的微生物菌种的不同。与氯化钙的促进作用不同, 碳酸钙呈现出抑制作用, 其原因尚不清楚, 有待进一步研究。

2.2.4 色氨酸对 FX-02 产 IAA 的影响

图 3 是色氨酸对菌株 FX-02 产 IAA 的影响。

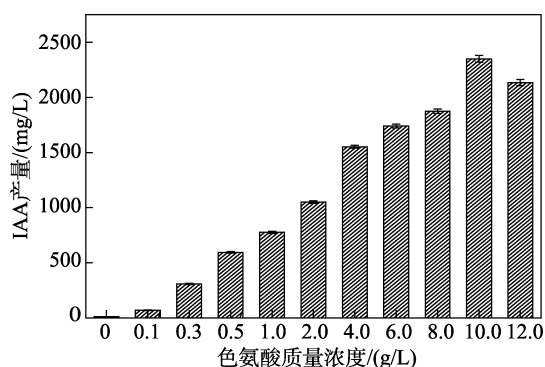


图 3 色氨酸对菌株 FX-02 产 IAA 的影响

Fig. 3 Effect of tryptophan on IAA production of strain FX-02

如图 3 所示, 当发酵培养基不含色氨酸时, FX-02 产 IAA 很少, 其 IAA 产量仅为 12.20 mg/L。当培养基添加色氨酸后, IAA 产量明显增加, 而且在色氨酸质量浓度为 0.1~10.0 g/L 时, 随着色氨酸质量浓度的增加, FX-02 分泌 IAA 量也随之增加, 其 IAA 产量几乎呈线性升高。当色氨酸质量浓度为 10.0 g/L 时, FX-02 的 IAA 产量达到最大值, 为 2349.40 mg/L, 该产量是国内外一些相关研究报道的 IAA 产量的 4~22 倍^[6-9]。IAA 属于微生物的次级代谢产物。研究表明, 细菌的 IAA 生物合成途径分为色氨酸依赖型和非色氨酸依赖型, 以依赖色氨酸途径为主^[19]。在依赖色氨酸途径中, 细菌产 IAA 路径主要包括吲哚丙酮酸路径 (Indole-3-pyruvic acid, IPyA) 和吲哚-3-乙酰胺 (Indole-3-acetamide, IAM) 路径^[20]。作为 IAA 合成途径中的一种重要的前体物质, 色氨酸对 IAA 生物合成具有促进作用, 而且色氨酸浓度越高越有利于 IAA 的合成, IAA 产量也越高。然而, 与其他次级代谢产物的前体物质一样, 色氨酸浓度较高时会产生毒性, 从而抑制 IAA 生物合成。IAA 产生菌对色氨酸的耐受性 (或最适色氨酸浓度) 与微生物菌种有关。李雅华等^[21]研究了一株从烟草根际土壤分离得到的根际促生菌 F23 的产 IAA 特性, 发现 F23 产 IAA 的最适色氨酸质量浓度为 0.5 g/L。ABD-ALLA 等^[22]研究发现, 放线菌 ASU14 产 IAA 的最适色氨酸质量浓度为 5.0 g/L。根据本实验结果可知, FX-02 生物合成 IAA 的途径属于色氨酸依赖型。FX-02 产 IAA 的最适色氨酸质量浓度为 10.0 g/L, 远高于一些相关报道, 其主要原因是 FX-02 产 IAA 的最适色氨酸质量浓度高, 培养基中高浓度色氨酸对 IAA 生物合成起到了很大促进作用, 从而使 FX-02 高产 IAA。SUDHA 等^[15]报道使用鹰嘴豆下脚料发酵培养根瘤菌 (*Rhizobium*), 经过工艺优化 IAA 产量达到了 6100 mg/L, 其高产 IAA 的原因应该与菌种、培养基成分及工艺优化均有关系。

3 结论

从蔬菜根际土壤中筛选获得一株产 IAA 能力较强的微生物菌株 FX-02, 并将该菌株鉴定为霍氏肠杆菌 (*Enterobacter hormaechei*)。对菌株 FX-02 发酵产生 IAA 的特性进行了研究, 结果发现: (1) FX-02 菌体生长和产 IAA 最佳碳源均为甘油; FX-02 菌体生长的最佳氮源为花生饼粉, 而产 IAA 的最佳氮源则为蛋白胨; (2) FX-02 菌体生长和产 IAA 的最适宜无机盐为氯化钙; (3) FX-02 生物合成 IAA 的途径为色氨酸依赖型; (4) 合成 IAA 的适宜色氨酸质

量浓度为 10.0 g/L, 这表明 FX-02 具有很强的转化色氨酸能力; (5) 当发酵培养基为甘油 10.0 g/L、蛋白胨 10.0 g/L、色氨酸 10.0 g/L、硫酸镁 1.5 g/L、磷酸氢二钾 1.5 g/L 时, 30 °C、180 r/min 摇床振荡培养 72 h, 菌株 FX-02 的 IAA 产量高达 2349.40 mg/L。如何进一步提高 IAA 产量, 从而满足发酵法工业化生产 IAA 的要求, 还有待深入研究。

参考文献:

- [1] LI P G (李培根), YAO Y Q (要雅倩), SONG J X (宋吉祥), *et al.* Isolation and identification of IAA-producing *Bacillus* sp. on potato rhizosphere and its growth-promoting effect[J]. *Biotechnology Bulletin* (生物技术通报), 2020, 36(9): 109-116.
- [2] MANO Y, NEMOTO K. The pathway of auxin biosynthesis in plants [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(8): 2853-2872.
- [3] ZHANG D Y (张东艳), LIU Y (刘晔), WU Y (吴越), *et al.* Isolation and identification of IAA-producing strains from peanut rhizosphere and its promoting effects on peanut growth[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences* (中国油料作物学报), 2016, 38(1): 104-110.
- [4] SONG X P (宋小平), HAN C R (韩长日). *Production process and technology of agrochemicals* [M]. Beijing: Scientific and Technical Documentation Press (科学技术文献出版社), 2019.
- [5] NUTARATAT P, SRISUK N, ARUNRATTIYAKORN P, *et al.* Fed-batch fermentation of indole-3-acetic acid production in stirred tank fermenter by red yeast *Rhodospiridium paludigenum*[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2016, 21(3): 414-421.
- [6] LIU L (刘璐), TANG W Z (唐文竹), LI X Z (李宪臻). Screening, identification and optimization of IAA producing bacteria[J]. *Journal of Dalian Polytechnic University* (大连工业大学学报), 2019, 38(4): 239-243.
- [7] ZHOU M D (周铭典), CAI G J (蔡冠竟), NING J (宁静), *et al.* Screening, identification and culture condition optimization of an indole-3-acetic acid producing bacterial strain[J]. *Journal of Biology* (生物学杂志), 2021, 38(2): 65-69.
- [8] GARG V, KUKREJA K, GERA R, *et al.* Production of indole-3-acetic acid by berseem (*Trifolium alexandrinum* L.) rhizobia isolated from Haryana, India[J]. *Agricultural Science Digest-A Research Journal*, 2015, 35(3): 229-232.
- [9] GHOSH P K, SEN S K, MAITI T K. Production and metabolism of IAA by *Enterobacter* spp. (Gammaproteobacteria) isolated from root nodules of a legume *Abrus precatorius* L.[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2015, 4(3): 296-303.
- [10] GLICKMANN E, DESSAUX Y. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(2): 793-796.
- [11] DEFEZ R, ANDREZZI A, BIANCO C. The overproduction of indole-3-acetic acid (IAA) in endophytes upregulates nitrogen fixation in both bacterial cultures and inoculated rice plants[J]. *Microbial Ecology*, 2017, 74(2): 441-452.
- [12] WU X (吴翔), GAN B C (甘炳成), XIE L Y (谢丽源), *et al.* Application of response surface methodology for optimization of liquid fermentation medium for IAA secretion by MY07[J]. *Biotechnology* (生物技术), 2015, 25(2): 201-204.
- [13] YU S J (余水静), LEI Q (雷强), QIAN J L (钱佳琳), *et al.* Screening and fermentation characteristics of one IAA-producing strain in rhizosphere of Gannan navel orange[J]. *Journal of Jiangxi University of Science and Technology* (江西理工大学学报), 2019, 40(2): 30-34.
- [14] XU J (徐婧), SHAO K (邵锴), LI D F (李东芳), *et al.* Selection, identification of an IAA biosynthesis strain and the optimization of its culture medium[J]. *Journal of Suzhou University of Science and Technology: Natural Science* (苏州科技大学学报:自然科学版), 2018, 35(2): 45-54.
- [15] SUDHA M, GOWRI R S, PRABHAVATHI P, *et al.* Production and optimization of indole acetic acid by indigenous micro flora using agro waste as substrate[J]. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2012, 15(1): 39-43.
- [16] ZHAO B X (赵柏霞), LIU H Q (刘浩强), SUN L X (孙丽娜), *et al.* Screening and identification of IAA production microbes in rhizosphere of cheery and optimization of its culture conditions[J]. *South China Fruits* (中国南方果树), 2017, 46(3): 23-28.
- [17] LI G J (李冠杰), WANG W L (王文丽), YUE D D (岳丹丹), *et al.* Optimization of high-yield indole acetic acid and fermentation conditions of *Bacillus licheniformis* YDY[J]. *Henan Science* (河南科学), 2018, 36(1): 70-76.
- [18] JIA X B (贾西贝), WANG Q Q (王琦琦), LI Y (李杨), *et al.* Isolation, identification and fermentation conditions optimization of a salt-tolerant growth-promoting and indoleacetic acid-producing bacterium[J]. *China Brewing* (中国酿造), 2019, 38(11): 37-42.
- [19] MCCLERKLIN S A, LEE S G, HARPER C P, *et al.* Indole-3-acetaldehyde dehydrogenase-dependent auxin synthesis contributes to virulence of *Pseudomonas syringae* strain DC3000[J]. *Plos Pathogens*, 2018, 14(1): 1-24.
- [20] DI D W, ZHANG C G, LUO P, *et al.* The biosynthesis of auxin: How many paths truly lead to IAA?[J]. *Plant Growth Regulation*, 2016, 78(3): 275-285.
- [21] LI Y H (李雅华), ZHANG Q H (张启航), WANG J (王姣), *et al.* Screening of IAA-producing strains by UV and DES mutagenesis and optimization of culture conditions[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences* (核农学报), 2020, 34(9): 1873-1880.
- [22] ABD-ALLA M H, EI-SAYED E A, RASMEY A M. Indole-3-acetic acid (IAA) production by *Streptomyces atrovirens* isolated from rhizospheric soil in Egypt [J]. *Journal of Biology and Earth Sciences*, 2013, 3(2): 182-193.
- [23] TOKUNAGA T, KOGE S, MIZUMO T, *et al.* Facile preparation of a soluble polymer containing polyhedral oligomeric silsesquioxane units in its main chain[J]. *Polymer Chemistry*, 2015, 6(16): 3039-3045.
- [24] SUN B (孙斌). Effects of UV and O₃ on aging behavior of polyurethane [D]. Qinhuangdao: Yanshan University (燕山大学), 2012.
- [25] SHI W H, HE G H, LIU H J, *et al.* Fabrication of polyetherimide microporous membrane using supercritical CO₂ technology and its application for affinity membrane matrix[J]. *Journal of Supercritical Fluids*, 2014, 85: 151-158.
- [26] GARCRA M, PINOTTI A, MARTINO M, *et al.* Characterization of composite hydrocolloid films[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2004, 56(3): 339-345.
- [27] METZ S, VANDEVEN W, POTRECK J, *et al.* Transport of water vapor and inert gas mixtures through highly selective and highly permeable polymer membranes[J]. *Journal of Membrane Science*, 2005, 251(1/2): 29-41.
- [28] ZHANG C, ZHANG C, DING R M, *et al.* New water vapor barrier film based on lamellar aliphatic-monoamine-bridged polysilsesquioxane [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, 8(23): 14766-14775.

(上接第 107 页)