

# 阳宗海中高产类胡萝卜素光合细菌的研究

郭 秒 周 佳 慕跃林 黄遵锡

(云南师范大学生命科学学院,昆明 650092)

**摘 要** 从高原湖泊阳宗海深层中分离到一株红细菌属色素高产菌 Y11,其生成的类胡萝卜素在光、酸碱和热的条件下,稳定性好。添加 10 mg/L  $Mg^{2+}$  时,类胡萝卜素生成量最大,添加  $Fe^{3+}$  和  $Mn^{2+}$  会降低其产量。用 12<sup>#</sup> 正交优化培养基,光照 1000~2000 lux, pH7.0, 30℃ 下培养 5 d 后,类胡萝卜素产量可以达到 51.5 mg/g,约 360.5 mg/L。

**关键词** 光合细菌,类胡萝卜素,稳定性

类胡萝卜素是一种重要的天然色素<sup>[1]</sup>,主要从植物、藻类和微生物中提取,近年来从酵母、霉菌和细菌中提取类胡萝卜素已经成为热点,国内投入试生产的主要是红酵母、红曲霉和光合细菌 3 类<sup>[2,3]</sup>。光合细菌中的紫色非硫细菌科由于具有分布广泛,易培养且无有害等优点,被大量用来开发天然色素。但到目前为止,选取产色素的光合细菌几乎都是从土壤或污水中分离得到,湖泊中的尤其是深水湖泊中的报道很少。

阳宗海是云南省第 3 深水湖泊,湖区常年光照充足,温度适宜。据文献报道<sup>[4]</sup>,深水湖泊中 10 m 深度以下生活的光合细菌由于依靠类胡萝卜素吸收到达水层的 450~550 nm 的蓝绿光,所以优先在体内合成大量类胡萝卜素,往往比浅水和土壤中的光合细菌所含类胡萝卜素多,非常适合进行产类胡萝卜素的研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌 种

红细菌 (*Rhodabacter* sp.) Y11:本实验室从高原湖泊阳宗海 13 m 水层分离,为类胡萝卜素高产菌。

### 1.2 培养基

乙酸钠 2 g、 $NH_4Cl$  2 g、 $KH_2PO_4$  0.15 g、 $Na_2CO_3$  0.2 g、酵母膏 0.5 g,用蒸馏水溶解并定容至 1000 mL,调 pH7.0,于 121℃ 高压灭菌 30

min。

### 1.3 类胡萝卜素的提取和含量测定

在言世贤等<sup>[5]</sup>的方法的基础上稍加改进。将菌液于 4000 r/min 离心 30 min,用生理盐水洗涤菌体 2~3 次,再于 12000 r/min 离心 3 min,弃上清液,菌体用酸-热处理法破壁<sup>[6]</sup>,用丙酮抽提类胡萝卜素。粗提液在 475 nm 测定吸光度,表示类胡萝卜素的相对含量。将抽提液在 60℃ 左右蒸干,将残余物溶于少量的乙醚中,加入等体积 10% KOH 的甲醇溶液,室温静置 1 h 以上。然后用 5% NaCl 水溶液萃取分层,上层醚层用 5% NaCl 水溶液反复洗涤 2 次以洗净甲醇。在 40℃ 下减压蒸馏得类胡萝卜素粗制品,称重。

### 1.4 色素的鉴定

分别用显色反应和分光光度计扫描 2 种方法,依照参考文献<sup>[7]</sup>进行。

### 1.5 类胡萝卜素提取率计算<sup>[8]</sup>

### 1.6 类胡萝卜素稳定性分析<sup>[9]</sup>

### 1.7 影响类胡萝卜素生成的因素

依照常规方法<sup>[10]</sup>,分析了金属离子、光照、温度和 pH 等对类胡萝卜素生成的影响。

## 2 结果与讨论

### 2.1 类胡萝卜素制品的物理性质

由 Y11 菌株所提取的类胡萝卜素为橙红色颗粒状,不溶于水,易溶于丙酮、乙醚。溶于

第一作者 硕士研究生(黄遵锡教授为本文通讯作者)。  
收稿时间 2003-07-02,改回时间 2003-09-02

乙醇后呈橘黄色 ,加入浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$  后 ,下层呈青蓝色 ;加入浓  $\text{HCl}$  后呈浅蓝色 ,与类胡萝卜素的 一般反应一致。

2.2 类胡萝卜素吸收光谱

Y11 菌株所产色素的乙醇溶液经分光光度计扫描 ,在 475 nm 有最大吸收波长 ,这与类胡萝卜素标准样品最大吸收峰一致 ,说明该菌所产色素中含有  $\beta$ -类胡萝卜素。

2.3 类胡萝卜素稳定性分析

表 1 光照对 Y11 菌株产类胡萝卜素的影响

光照时间/h	0	2	4	6	8	10	12	24
$OD_{475\text{ nm}}$	0.690	0.674	0.664	0.643	0.618	0.582	0.554	0.529
损失率/%	—	2.3	3.8	6.8	10.4	15.6	19.7	23.3
颜色	橘黄	橘黄	橘黄	橘黄	橘黄	淡黄	淡黄	淡黄

2.3.2 酸碱稳定性

将类胡萝卜素溶液调节成一定 pH 的溶液后 ,吸光度的测量结果及类胡萝卜素损失率见表 2。在 pH 为 4 以上的弱酸及 pH10 的碱性条件下 ,色素溶液较稳定 ,吸光度变化的程度不大。但在 pH 为 4 以下的强酸条件下色素相对不稳定 ,色素损失率近 4.8% ,色素溶液的颜色也由深变浅。酸碱对色素作用 10 min 与作用 30 min 后所测得的吸光度之间差异不大 ,说明酸碱对 Y11 菌株的类胡萝卜素稳定性的影响与时间关系不大。

表 2 酸碱度对 Y11 菌株产类胡萝卜素的影响

pH 值	作用时间/min	$OD_{475\text{ nm}}$	色泽变化
2.0	10	0.642	淡橘黄
	30	0.615	淡橘黄
4.0	10	0.675	淡橘黄
	30	0.670	淡橘黄
6.0	10	0.678	橘 黄
	30	0.672	橘 黄
8.0	10	0.700	橘 黄
	30	0.698	橘 黄
10.0	10	0.689	橘 黄
	30	0.683	橘 黄

2.3.3 热稳定性

色素溶液经不同温度处理后测得的吸光度及色素损失率如表 3 所示。从表 3 可以看出 ,Y11 菌株的类胡萝卜素对热有较好的稳定性。在较低的温度条件下 ,经 30℃ 处理 5 h 后 ,色素仅损失 4.8%。随着温度的升高和加热时间

2.3.1 光稳定性

在日光的连续照射下 ,类胡萝卜素溶液的吸光度逐渐下降 ,而其损失率逐渐升高。Y11 菌株所产类胡萝卜素对光的稳定性比较好 ,24 h 光照后还有高于 75% 的残留(大部分菌株如红酵母和红假单胞菌所产类胡萝卜素只有 50% 左右的残留<sup>[9]</sup> ) ,且类胡萝卜素颜色随光照变化不大。结果如表 1 所示。

的延长 ,色素的破坏程度略有增大 ,在 70℃ 处理 5 h 后 ,色素损失了约 11%。同时 ,伴随色素损失率的升高 ,色素溶液的颜色也略有变化。

表 3 温度对 Y11 菌株类胡萝卜素的影响

温度 /℃	加热时间 /h	吸光度 (A)	色素损失率 /%	色泽变化
30	0	0.545	—	橘 黄
	1	0.539	1.1	橘 黄
	3	0.531	2.6	橘 黄
	5	0.519	4.8	淡橘黄
50	0	0.510	—	橘 黄
	1	0.504	1.2	橘 黄
	3	0.480	5.9	淡橘黄
	5	0.476	6.7	淡橘黄
70	0	0.537	—	橘 黄
	1	0.524	2.4	橘 黄
	3	0.485	9.7	淡橘黄
	5	0.478	11	淡橘黄

2.4 影响类胡萝卜素生成的因素

由于使用的培养基是已经正交优化的最佳培养基 ,且光合细菌菌液在 660 nm 的 OD 值与破壁的丙酮抽提液在 475 nm 的 OD 值有一定的线性关系 ,所以在此只考虑金属离子和环境因素的影响。

2.4.1 金属离子的影响

据文献报道<sup>[4]</sup> ,对光合细菌类胡萝卜素生成有明显影响的主要有  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  和  $\text{Mn}^{2+}$  ,因此只考虑这 3 种金属离子。

在培养基中添加 10 mg/L 的  $\text{Mg}^{2+}$ (表 4) 时类胡萝卜素生成量最大 ,高于或低于 10 mg/

L 类胡萝卜素生成量都会下降; $\text{Fe}^{3+}$  和  $\text{Mn}^{2+}$  的添加会随浓度的增加而使类胡萝卜素生成降低,这与很多文献报道的此 2 种离子可以促进类胡萝卜素的合成有所不同,这不但可以简化培养基配方,还可以免去培养基可能出现的铁盐沉淀问题,适合工业化生产。

表 4  $\text{Mg}^{2+}$  对类胡萝卜素生成的影响

$\text{Mg}^{2+}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0	5	10	15	20	25	30
$OD_{475\text{ nm}}$	0.629	0.735	1.110	0.907	0.740	0.708	0.698

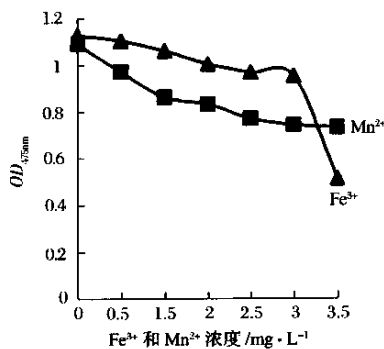


图 1  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  对类胡萝卜素合成的影响

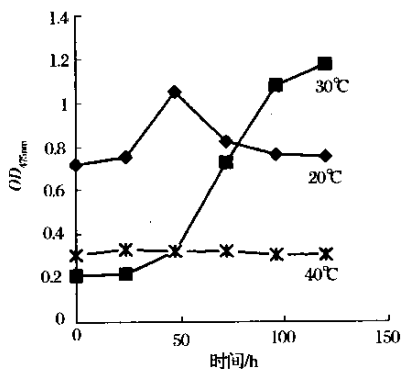


图 2 温度对类胡萝卜素合成的影响

## 2.4.2 温度的影响

温度的影响涉及到菌体的生长量和类胡萝卜素的生成。从图 2 可以看出,对 Y11 菌株而言,20~30℃ 是菌体生长的最适温度,30℃ 培养 3d 以后,类胡萝卜素的产量就有超过 20℃ 条件下产量的趋势,此后的 2d 内产量也始终处于上升的状态。而在 40℃ 时,生成量始终比较低,由此可见,高温并不利于 Y11 菌株的类胡

萝卜素的生成。

## 2.4.3 光照的影响

从表 5 看出,太强或太弱的光照都不利于类胡萝卜素的大量合成,在 1 000~20 000 lux 光照范围内,菌体生物量和类胡萝卜素生成量都比较高。

表 5 光照对类胡萝卜素生成的影响

光照强度/lux	500	1000	1500	2000	2500	3000
$OD_{475\text{ nm}}$	0.893	1.234	0.997	0.951	0.796	0.583
$OD_{660\text{ nm}}$	0.715	1.039	1.002	0.928	0.612	0.397

## 2.4.4 pH 的影响

由于 Y11 菌株的最适生长 pH 范围为 6.0~8.5,低于 6.0 或高于 8.5 的 660 nm 处的 OD 值都低于 0.1,所以这里只考虑 6.0~8.5 的 pH 范围。由表 6 可以看出,Y11 菌株产类胡萝卜素的最适 pH 为 7.0,在 6.5~7.5 范围内都有较高的产量。

表 6 pH 对类胡萝卜素生成的影响

pH	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5
$OD_{475\text{ nm}}$	0.468	0.997	1.276	0.981	0.736	0.583
$OD_{660\text{ nm}}$	0.315	0.899	1.091	0.826	0.663	0.476

## 2.5 Y11 菌株类胡萝卜素的得率

在最适培养基 12<sup>#</sup>(另添加 0.01% 的  $\text{Mg}^{2+}$ )和最适培养条件下培养 Y11 菌株,并提取类胡萝卜素。根据计算,Y11 菌株类胡萝卜素粗制品的提取率为 51.5 mg/g,大约为 360.5 mg/L,高于国内外报道的产量(一般在 0.5~45 mg/g)属于类胡萝卜素高产菌株。

## 3 小 结

(1)首次从高原深水湖泊中分离大量生长在深水区的光合细菌,并从中挑选出了一株类胡萝卜素高产菌 Y11,提取率可以达到 51.5 mg/g,大约为 360.5 mg/L。高于目前国内刘春朝<sup>[1]</sup>报道的 312 mg/L,并远远高于红酵母的产量(10~200 mg/L)及基因工程菌产类胡萝卜素菌的产量(0.5~1.5 mg/g)<sup>[12]</sup>。从 Y11 中提取的类胡萝卜素对光、酸碱以及热的稳定性都比较好,且培养基中不需要添加可能会造成培养基浑浊的铁离子,因此十分适合工业化生产。

(2)光合细菌中类胡萝卜素的提取中,要通过皂化去除细菌叶绿素。红细菌属的光合细菌所含的细菌叶绿素<sub>a</sub>与植物叶绿素<sub>a</sub>结构很相似,而由叶绿素制成的叶绿素铜钠是我国食品工业中唯一允许使用的绿色色素<sup>[13]</sup>,因此在今后的研究中,可以考虑提取类胡萝卜素的同时,分离出细菌叶绿素<sub>a</sub>,使菌体得到更充分的利用。

致谢:在实验水样采集过程中,得到了昆明环境监测中心和宜良环境监测站的大力协助,特此表示感谢。

参 考 文 献

1 王业勤,李勤生.天然类胡萝卜素[M].北京:中国医药科技出版社,1997  
 2 韩雅珊.类胡萝卜素的功能研究进展[J].中国农业大学学报,1999,4(1):5~9  
 3 Takaichi Schinichi. Carotenoid pigments from *Rhodococcus rhodochrous* RNMS[J]. Agri Bio Chem,

1990,54(8):1934~1937  
 4 刘如林.光合细菌及其应用[M].北京:中国农业科技出版社,1991  
 5 言世贤.光合细菌红色类胡萝卜素的提取和研究[J].上海交通大学学报,1991,25(5):73~78  
 6 杨文,吉春明.一种简单的胞壁破碎方法[J].微生物学通报,1995,22(1):58~59  
 7 顾青.光合细菌R1发酵产类胡萝卜素的研究[J].食品与发酵工业,2001,27(10):24~28  
 8 赫常明.光合细菌中类胡萝卜素的提取及性质的研究[J].天津轻工业学报,1999(3):5~11  
 9 李东风.沼泽红假单胞菌类胡萝卜素稳定性的研究[J].浙江农业学报,1998,10(2):90~93  
 10 王宇新,钱新民.光合细菌类胡萝卜素的研究[J].海洋湖沼通报,1998(4):32~37  
 11 刘春朝,欧阳藩.一株类胡萝卜素高产菌S2的研究[J].生物技术,1995,5(3):22~25  
 12 陶俊.类胡萝卜素合成的相关基因及其基因工程[J].生物工程学报,2002,18(3):276~281  
 13 罗庆锋.叶绿素的研究进展及叶绿素的开发利用[J].林产化工通讯,1995(1):32~33

# Photosynthetic Bacteria for High Yield Production of Carotenoid Pigment in Yangzonghai Lake

Guo Miao Zhou Jia Mu Yuelin Huang Zunxi

(Department of Life Science, Yunnan Normal University, Kunming 650092)

**ABSTRACT** A strain of *Rhodabacter* Y11, which contains high content of carotenoids, was isolated from deep level of Yangzonghai lake in Yunnan province. It is indicated that the pigment is not susceptible to heat, acid/alkali or sunlight. The yield of carotenoid was improved by 10 mg/L  $Mg^{2+}$  added to the culture medium but was reduced by  $Fe^{3+}$  and  $Mn^{2+}$ . The Y11 strain was cultivated for 5 days in the interactive optimum medium 12<sup>#</sup> under the following conditions: 1000~2000 lux, pH7.0, 30℃. And the yield of carotenoid reached 57.5 mg/g or about 432 mg/L.

**Key words** Photosynthetic bacteria, carotenoid pigment, stability, synthesis of carotenoid

行业动态

## 丹尼斯克与河南天冠合资生产黄原胶

2003年10月14日,丹麦丹尼斯克集团与中国河南天冠集团有限公司签署合资协议,生产黄原胶。丹尼斯克占80%股份,由丹尼斯克添加剂分部负责管理。合资企业名称为丹尼斯克天冠(南阳)有限公司,年生产黄原胶能力为2000t。据了解,世界黄原胶需求量为4~5万t/a,其中60%用于食品和制药领域,目前正以5%的年增长速度增长。丹尼斯克集团在中国已建立多种食品添加剂工厂,此次合资项目强化了集团在中国的业务。集团希望借助此次合资项目巩固其在全球食品添加剂市场上的地位,丹尼斯克天冠(南阳)有限公司可以受益于丹尼斯克集团强大的全球销售网络、创新中心和技术服务设施。在合资之前,工厂生产的黄原胶主要供应中国市场,而现在的目标是国际食品市场,主要是欧洲和美国市场。