

海洋细菌 E18 菌株的生物学特性及其蓝紫色素稳定性的研究*

孙爱飞** 庄荣玉 王国良

(宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211)

摘要 从海泥中分离获得一株海洋细菌 E18 菌株,发现其具有稳定产生蓝紫色素的特性。对该菌的形态特征、培养特征及生理生化特征进行了研究。对该菌的分子鉴定结果表明,该菌为假交替单胞菌属细菌。萃取该菌的色素,并试验光、紫外线、热、pH、氧化剂及还原剂对该色素的影响,结果表明:该色素的最大吸收峰为 579nm,紫外光对其稳定性无影响,但自然光对其有一定的消色作用。60℃~80℃ 温度范围对色素有一定的增色作用,而 90℃ 以上高温可使色素消色。色素在 pH3~9 区域内稳定。色素对还原剂 Na_2SO_3 较为稳定,而高浓度的氧化剂 H_2O_2 可使色素改变颜色。

关键词 海洋细菌 生物学特性 蓝紫色素 稳定性

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)04-0691-04

Biological Characteristics of Marine Bacterium Strain E18 and the Stability of its Indigo Pigment*

SUN Ai-Fei** ZHUANG Rong-Yu WANG Guo-Liang

(Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211)

Abstract One strain of *Pseudomonas* sp. E18 was isolated from the sea mud of Ningbo, Zhejiang. It can produce indigo pigment. The morphological, cultural and biochemical characteristics of the bacterium were studied. The indigo pigment was also extracted. The results showed that the maximum absorption peak of the pigment was at 579nm. The pigment was stable to UV, Na_2SO_3 . It was also stable at pH 3~9. The pigment was unstable to the sunlight and high concentration H_2O_2 . Temperature of 60℃~80℃ could increase the hue while temperature higher than 90℃ could reduce the hue.

Key words Marine bacterium, Biological characteristic, Indigo pigment, Stability

随着经济的发展和人民生活水平的提高,绿色、健康的消费概念深入人心,天然色素不论在食品行业还是在印染、化妆品等行业都越来越受到重视。比如在食品业,据资料统计,全世界食品色素的总金额约为 13.4 亿美元,其中合成色素约 4 亿美元,天然色素约 9.4 亿美元。近年来食用天然色素年增长率约为 4%~5%,而合成色素仅为 2%^[1]。天然色素主要来自于动植物及微生物,目前的研究主要集中于植物源色素,但从经济的角度来考虑,微生物应是一种良好的天然色素源,今后必将引起更为广泛的关注。

海洋微生物因其生境的独特性:高盐、高压、低温、低照、低营养,决定了其与陆地微生物不同的代谢系统和机体防御系统,具有产生生物活性物质的巨大潜力^[2~4]。目前海洋微生物资源的研究和开发越来越受到世界各国的重视,已成为自然科学中相当活跃的研究领域之一^{—[3,5,6]}。一些海洋微生物能产生色素,有望成为天然色素的开发源之一。已有一些学者对海洋微生物所产色素做了研究,但主要集中于红色素类范围,对于产蓝紫色素的海洋微生物的研究,目前国内外文献并未发现有报道,而蓝紫色的实用的天然色素极少^[7]。因此,本文对从浙

* 宁波大学基金项目(No. 0313065)

宁波大学实验技术研究项目(No. Syjs-2006002)

** 通讯作者 Tel: 0574-87600897, E-mail: sunaifei@nbu.edu.cn

收稿日期:2006-11-10,修回日期:2007-01-10

江东部滩涂淤泥中分离到的一株产蓝紫色色素的海洋细菌 E18 菌株的生物学特性及其所产色素的稳定性进行了研究, 以期为天然色素的开发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 培养基

分离、保存菌株采用 Zobell 2216E 培养基^[8]; 产色素培养基配方: 蛋白胨 1g, NaCl 0.1g, 牛肉膏 0.5g, 可溶性淀粉 0.2g, 琼脂 1.5g ~ 2.0g, 水 50mL, 海水 50mL, pH 7.4。

1.2 菌株分离

浙东象山滩涂采集海泥, 用 Zobell 2216E 培养基平板稀释分离纯化, 获得一株稳定产生蓝紫色色素的菌株, 标记为 E18, 用斜面试管培养基保存。

1.3 菌株生物学特性研究

根据常见细菌鉴定方法对分离细菌进行形态大小、革兰氏染色、鞭毛染色、细菌生长条件及生理生化特性研究^[9]。

1.4 菌株的分子鉴定

菌株采用 Zobell 2216E 培养基斜面接种 25℃ 培养 24h, 收集菌体, 提取 DNA, 用通用引物扩增细菌 16S rDNA, PCR 产物经克隆后, 送往上海生工公司进行测序, 通过 BLAST 对测序结果进行分析。

1.5 菌体培养及色素提取

从保存的菌种斜面上挑取菌落平板划线接种于产色素培养基上, 25℃ 培养 48h, 用无菌不锈钢角匙刮洗紫色菌苔至盛有无水乙醇的磨口瓶中, 充分振荡抽提色素, 放置 24h, 离心, 弃菌泥, 得蓝紫色色素醇溶液。取 1000mL 培养基所产色素的醇溶液, 进行旋转蒸发蒸干, 得粗提物, 称重。

1.6 色素吸收光谱测定

用岛津 UV-160A 型紫外可见分光光度计于 360nm ~ 800nm 处对色素醇溶液进行光谱扫描, 测定色素最大吸收峰值。

1.7 色素红外性质测定

将所得紫色溶液在载玻片上涂抹数次, 刮取少量粉末, 在尼高力 460 型红外光谱仪上, 用 KBr 压片法测定其红外光谱 (400cm⁻¹ ~ 4000cm⁻¹)。

1.8 色素稳定性测定

1.8.1 光照处理: 置色素溶液于自然光下, 每隔 1d 测吸光度, 连续测 5d; 置色素溶液于 30w 紫外灯下,

距离灯管 20cm 处用紫外线照射, 每隔 30min 测一次吸光度, 连测 4 次。

1.8.2 温度处理: 置色素溶液分别于 40℃、60℃、80℃、97℃ 水浴锅中恒温 2h, 冷却后测吸光度。

1.8.3 pH 处理: 配制 pH 分别为 1、3、4、5、7、9、11、13 的缓冲溶液, 取色素液 1mL 加于 4mL 不同 pH 的缓冲溶液中, 放置 30min 后测其吸光度。

1.8.4 氧化剂处理: 配制 H₂O₂ 含量分别为 0%、0.03%、0.3%、1.5%、3% 的 H₂O₂ 色素溶液, 放置 30min 后测其吸光度。

1.8.5 还原剂处理: 配制终浓度分别为 0、2 × 10⁻⁴ mol/L、5 × 10⁻⁴ mol/L、2 × 10⁻³ mol/L、5 × 10⁻³ mol/L 的 Na₂SO₃ 色素溶液, 放置 30min 后测其吸光度。

2 结果

2.1 E18 菌株的生物学特性

2.1.1 形态特征: 该菌株大小为 0.3um × (1 ~ 2) um, 杆状或弧杆状, 单个, 革兰氏阴性细菌, 端生单鞭毛, 运动。

2.1.2 培养特征: 菌落呈规则状, 圆形稍凸, 边缘整齐, 表面光滑湿润, 蓝紫色。0℃ ~ 30℃ 均能生长, 15℃ ~ 25℃ 生长良好, 35℃ 不生长, 表 1 的耐盐性表明, 该菌在盐浓度 1% ~ 5% 的培养基中均可生长, 最适生长盐浓度为 2%, 在该浓度下有最大吸光度。

表 1 盐浓度对菌株生长的影响

培养基含 NaCl 浓度 (%)	0	1	2	3	4	5	6	7
OD ₅₇₉	0.024	0.954	0.974	0.804	0.485	0.154	0.032	0.025

2.1.3 生理生化特性: 该菌株过氧化氢酶反应为阳性, 氧化酶反应为阴性, 能分解淀粉, 液化明胶。而产 H₂S 试验、柠檬酸试验及吲哚试验结果均为阴性。另外, 该菌株对葡萄糖、乳糖、蔗糖、甘露醇糖发酵试验均为阴性, 见表 2。

2.1.4 菌株的分子鉴定结果: 将序列数据, 通过网上 NCBI 与 GenBank 中已存在的细菌 16S rRNA 基因序列进行同源性比较, E18 菌株与假交替单胞菌属细菌同源性高达 99%, 因此该菌株为假交替单胞菌属细菌, 记为 *Pseudoalteromonas* sp. E18。

表 2 菌株 E18 的生理生化反应

生理生化反应	结果	生理生化反应	结果
接触酶	+	吡唑试验	-
氧化酶	-	葡萄糖发酵试验	-
明胶液化	+	乳糖发酵试验	-
淀粉水解	+	蔗糖发酵试验	-
产 H ₂ S 试验	-	甘露醇发酵试验	-
柠檬酸试验	-		

2.2 色素的提取结果

色素经无水乙醇提取蒸干后称重 ,每 1000mL 产色素培养基可得色素粗品 1.201g。

2.3 色素性质

2.3.1 E18 菌株产蓝紫色素的吸收光谱 :经紫外分光光度计的扫描 ,可见 E18 菌株在 579nm 波长处具有最大吸收峰值 ,见图 1。

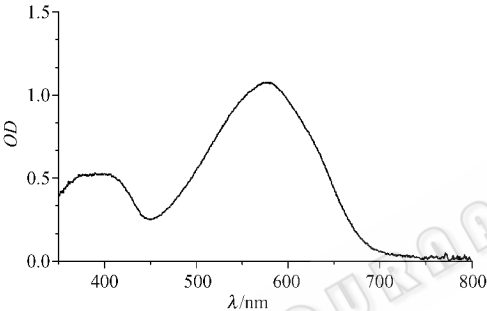


图 1 E18 菌株产蓝紫色素的吸收光谱

2.3.2 色素的红外图谱 :位于 3428cm⁻¹ 处的强吸收峰为 O—H 键的伸缩振动 ;2921cm⁻¹、2854cm⁻¹ 的吸收峰可能来自产物甲基上的 C—H 伸缩振动峰 ;1652cm⁻¹ 处的强吸收峰可能为产物所含羰基共轭基团的振动峰(该基团可能导致产物显紫色) ,见图 2。

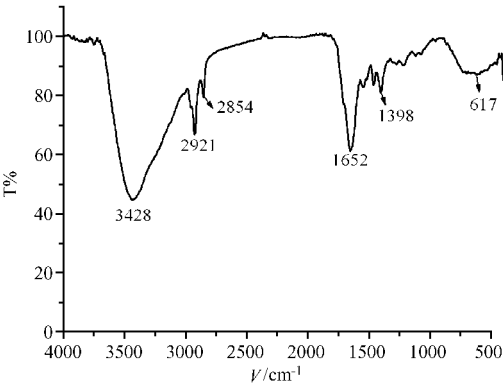


图 2 E18 菌株产蓝紫色素的的红外图谱

2.3.3 色素对光的稳定性 :自然光对色素有一定的消色作用 ,但色素在紫外光下较为稳定 ,见表 3。

表 3 光处理对紫色素稳定性的影响

自然光(d)					紫外光(min)				
0	1	2	4	5	0	30	60	90	
OD ₅₇₉	0.380	0.361	0.347	0.316	0.309	0.489	0.488	0.509	0.532

2.3.4 色素对热的稳定性 :高温使色素消色 ,但在 60℃ ~ 80℃ 温度范围内却对色素有一定的增色作用 ,可能是因为乙醇的蒸发而致色素溶液浓度提高所致 ,见表 4。

表 4 热处理对紫色素稳定性的影响

温度(℃)	30	40	60	80	97
OD ₅₇₉	0.154	0.142	0.167	0.163	0.123
颜色	紫色	紫色	紫色	紫色	无色

2.3.5 色素对酸碱的稳定性 :色素在 pH 3 ~ 9 区域内较为稳定 ,见表 5。

表 5 pH 对紫色素稳定性的影响

pH 值	1	3	4	5	7	9	11	13
OD ₅₇₉	0.096	0.149	0.212	0.231	0.155	0.149	0.101	0.071
颜色	浅绿	紫色	紫色	紫色	紫色	紫色	不稳定	不稳定

2.3.6 色素对氧化剂的稳定性 :高浓度的氧化剂 H₂O₂ 可使色素改变颜色 ,见表 6。

表 6 氧化剂对紫色素稳定性的影响

H ₂ O ₂ 浓度(%)	0	0.03	0.3	1.5	3.0
OD ₅₇₉	0.293	0.291	0.242	0.277	0.260
颜色	紫色	紫色	紫色	浅灰绿色	浅灰绿色

2.3.7 色素对还原剂的稳定性 :还原剂对蓝紫色素较为稳定 ,从以下数据可见一斑 ,见表 7。

表 7 还原剂对紫色素稳定性的影响

Na ₂ SO ₃ 浓度(mol/L)	0	2 × 10 ⁻⁴	5 × 10 ⁻⁴	2 × 10 ⁻³	5 × 10 ⁻³
OD ₅₇₉	0.301	0.304	0.311	0.297	0.282
颜色	紫色	紫色	紫色	紫色	紫色

3 讨论

3.1 分离菌株特性

从海泥中分离得到的 E18 菌株最适生长温度 20℃ ~ 25℃ ,最适生长盐浓度为 2% ,应该是一株典

型的海洋细菌。分子鉴定确定其为假交替单胞菌。假交替单胞菌是一个新建立的海洋细菌属,能够产生多种活性物质,国内对其研究较少^[10~11]。

3.2 产色素条件

E18菌株经多次传代仍具有稳定的产蓝紫色素的特性;产色素培养基来源广泛且廉价,培养条件不苛刻,有望在最适的条件下大量培养细菌生产出廉价的色素。

3.3 色素特性及应用展望

E18菌株所产色素为胞内色素,用无水乙醇萃取速度快,出色素率高又无毒性,因此无水乙醇应是一种较为理想的萃取剂。自然光对其有一定的消色作用,故须避光保存放置。色素醇溶液常温避光放置2年余,色素颜色未见明显变化。除高温97℃对色素有消色作用外,80℃以下温度对其稳定性几乎没有影响,利于色素干物质的制取;该色素在pH3~9较广的范围内具有稳定性;耐还原性较好,但不耐高浓度的氧化剂。综合以上因素,该色素总体稳定性较理想,具有一定的开发利用价值。曾用蒸馏浓缩后的色素对毛料制品进行染色,上色

好,吸附度高,水中不掉色,自然条件下放置色泽稳定,因此亦有望成为一种真丝、毛料产品的天然着色剂。今后的开拓,我们将对该色素的毒理性及色素的分子结构等做进一步的研究。

参考文献

- [1] 丁家兴. 甘肃科技, 2003, 19(5): 48~49.
- [2] 周世宁, 林永成, 姜广策. 海洋科学, 1997, 3: 27~29.
- [3] 刘志鸿, 程力, 牟海津. 中国水产科学, 1999, 16(4): 99~103.
- [4] Carte B K. Bioscience, 1996, 46(4): 271~286.
- [5] 徐怀恕, 张晓华. 青岛海洋大学学报, 1998, 28(4): 573~581.
- [6] 李利君, 蔡慧农, 苏文金. 集美大学学报(自然科学版), 2000, 5(2): 80~86.
- [7] 周宏湘译. 四川丝绸, 1998, 1: 38~39.
- [8] Zobel C E. Marine Microbiology. Massachusetts: Chronica Botanica Company, 1946. pp. 240.
- [9] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001. pp. 349~398.
- [10] 曾润颖, 赵晶. 微生物学通报, 2002, 25(6): 12~16.
- [11] 席宇, 朱大恒, 刘红涛, 等. 微生物学通报, 2005, 32(3): 108~112.