

沼泽红假单胞菌光合色素的分离、组成分析与光稳定性

程茜茹 赵春贵* 卓民权 贾雅琼 杨素萍*

(华侨大学 生物工程与技术系 福建 厦门 361021)

摘要:【目的】探求光对不产氧光合细菌类胡萝卜素(Car)和细菌叶绿素 *a* (BChl *a*)稳定性的影响规律。【方法】以沼泽红假单胞菌 CQV97 为材料,采用硅胶柱层析和 HPLC 方法进行 Car 和 BChl *a* 组分的纯化和成分分析,采用吸收光谱法研究 Car 和 BChl *a* 组分的光稳定性。【结果】在 Car 和 BChl *a* 组分分离过程中, Car 组分回收率高且稳定,而 BChl *a* 回收率波动性较大。Car 组分中含有 6 种螺菌黄质系 Car 和极少量(<0.25%)的细菌脱镁叶绿素 *a*。BChl *a* 组分中包含 BChl *a*_{GG}、BChl *a*_{DHGG}、BChl *a*_{THGG} 和 BChl *a*_p 4 种成分。Car 和 BChl *a* 组分在黑暗条件下非常稳定。2 000 lx 白炽灯、日光灯和自然光照射时, Car 在 70 min 内非常稳定,但对紫外光敏感,半衰期为 11.15 min, BChl *a* 组分对白炽灯、日光灯、自然光和紫外灯的光降解速率常数(min⁻¹)分别为 0.169 8、0.028 9、0.213 9 和 0.026 4,半衰期(min)分别为 4.47、29.68、4.20 和 26.19。【结论】一步硅胶柱层析可同时得到 Car 和 BChl *a* 纯组分。Car 对白光相对稳定,对紫外光不稳定。BChl 光稳定性很差,分离过程中短期见光是导致 BChl *a* 回收率波动性较大的原因,光降解过程中产生了相对稳定的中间产物。该研究结果为光合色素的精制、功能研究和应用提供了理论依据。

关键词: 沼泽红假单胞菌, 类胡萝卜素, 细菌叶绿素, 光稳定性, 不产氧光合细菌

Separation, characterization and light stability of photosynthetic pigments from *Rhodopseudomonas palustris*

CHENG Qian-Ru ZHAO Chun-Gui* ZHUO Min-Quan JIA Ya-Qiong YANG Su-Ping*

(Department of Bioengineering and Biotechnology, Huaqiao University, Xiamen, Fujian 361021, China)

Abstract: [Objective] To examine the effects of light on stability of carotenoids (Cars) and bacteriochlorophyll (BChl) *a* of anoxygenic phototrophic bacteria. [Methods] Using *Rhodopseudomonas palustris* CQV97 as a reference, we used silica gel column chromatography, HPLC and absorption spectrophotometry for the separation, composition analysis and light stability of Cars and BChl. [Results] The recovery of Cars was higher than that of BChl *a* whereas the recovery rate of BChl *a* showed light-dependent fluctuation. Six Cars and trace amount of bacteriopheophytin *a* (<0.25%) were detected in Car separation fraction. Four intermediates of BChl

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31070054 ,31270106) ;福建省自然科学基金项目(No. 2010J01209 ,2012J01136)

*通讯作者: Tel: 86-592-6166178

✉: 赵春贵: chungui@hqu.edu.cn; 杨素萍: yangsuping@hqu.edu.cn

收稿日期: 2013-03-04 ; 接受日期: 2013-04-08 ; 优先数字出版日期(www.cnki.net) : 2013-10-25

a including BChl *a*_{GG}, BChl *a*_{DHGG}, BChl *a*_{THGG} and BChl *a*_P were detected in BChl *a* fraction, and BChl *a*_P was predominated (76.73%). In the dark, both Cars and BChl *a* were very stable. Under different light irradiation of 2 000 lx, Cars kept stable within 70 minutes, but it was sensitive to UV radiation and its half-life was about 11.15 min. Under incandescent lamp, fluorescent lamp, natural light and UV radiation, the photodegradation rate constants (min^{-1}) of BChl *a* were 0.169 8, 0.028 9, 0.213 9 and 0.026 4, corresponding half-lives were 4.47 min, 29.68 min, 4.20 min and 26.19 min, respectively. **[Conclusion]** BChl *a* and Cars could be separated simultaneously by one-step gel column chromatography. Cars were stable toward light irradiation, but sensitive to UV radiation. BChl *a* was unstable toward light irradiation, the short-term light irradiation resulted in the fluctuation of BChl *a* recovery rate, a stable intermediate was found in the process of BChl *a* photolysis. The results will be helpful for refining and functional analyzing of the photosynthetic pigments of the anoxygenic phototrophic bacteria.

Keywords: *Rhodopseudomonas palustris*, Carotenoid, Bacteriochlorophyll, Light stability, Anoxygenic phototrophic bacteria

类胡萝卜素(Car)和细菌叶绿素(BChl)是不产氧光合细菌(Anoxygenic phototrophic bacteria, APB)执行光合作用的重要功能单位,在 APB 的厌氧光合生长中发挥重要作用^[1-2]。Car 因在抗氧化、免疫调节、细胞增殖和分化、信号传导和细胞间隙连接通讯等方面具有重要的生理活性,不仅可作为重要的营养要素应用于营养食品和饲料添加剂中,同时在医药、保健和化妆、美容等方面也得以广泛应用^[3-5]。化学合成色素的毒副作用已导致多种合成 Car 被限制或禁止使用^[3-4]。虽然已发现近 1 000 种天然 Car,但目前仅有少数 Car 研究较为深入,如 β -胡萝卜素、番茄红素、虾青素、角黄素和叶黄素等,具有较高的附加值且已被商业化^[5-9]。Car 需求的日益增长,已刺激和吸引人们积极开发新的微生物源天然 Car,因此,微生物源 Car 逐渐呈现替代化学合成和植物源 Car 产品的趋势^[5,9-10]。目前已发现紫细菌能合成 100 余种 Car,除链孢红素和番茄红素外,其它化学结构不同于藻类、真菌和植物 Car,是开发新型 Car 的良好资源。BChl 作为 APB 所特有的一类色素^[2],具有独特的宽光谱吸光特性和荧光特性,在肿瘤和心血管疾病等顽症的光动力治疗等方面备受关注^[11-12],因此,深入开展 APB 光合色素研究不仅在揭示光合作用机理方面具有重要理论意义,而且在天然功能色素的开发利用方面 also 具有重要应用价值。

Car 和 BChl 分离纯化的常用方法主要包括皂化萃取、酸化萃取、超临界萃取、柱层析、薄层层析和 HPLC 等,分离纯化的原理和方法较为成熟,但由于分离对象种类和性质不同,分离工艺又有很大差异。目前采用 TLC 和 HPLC 方法,同时分离或分析 Car 和 BChl 组分的研究已有报道^[13],但由于研究者关注的对象不同,光合色素的制备主要集中在 Car 组分^[14-17]或 BChl 组分^[18-19]的单一分离,尚未见到同时制备这两类色素的系统报道。硅胶柱层析具有规模大、纯度高、费用相对低廉的特点,因此本文选用此方法实现对 APB 中 Car 与 BChl *a* 的同时制备。在制备过程中,我们发现 Car 回收率较高,而 BChl *a* 回收率相对较低且波动性较大。通过对色素的特性和分离过程因素综合分析,认为光是影响其回收率高低的重要因素。目前,关于 APB 的 Car 组分稳定性已有较多报道^[9,14],虽然已表明 Car 组分具有一定的光稳定性,但大多采用 Car 皂化萃取物或酸化萃取液直接进行研究,其组成和含量也不明确,甚至未报道所使用的菌种。关于天然 BChl 稳定性和光降解的报道相对较少^[20-23],尚未阐明不同光强或光质光照下 BChl *a* 的光稳定性规律。因此,我们选择了一株典型的紫细菌——沼泽红假单胞菌(*Rhodopseudomonas palustris*) CQV97 为材料,经过 Car 和 BChl *a* 分离纯化和组分分析,着重研究了 BChl *a* 组分对不同光质光照

的稳定性规律,并与 Car 组分进行了比较。以理解在柱层析分离纯化色素的过程中,短时开灯检测对光不稳定色素的影响,同时为光合色素的精制、功能研究和应用提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:沼泽红假单胞菌(*Rhodospirillum rubrum*) CQV97 菌株, GenBank 登录号 EU882154, 本实验室分离鉴定并保藏在海洋资源微生物菌种保藏中心, 保藏号 MCCC 1100117。

1.1.2 主要试剂和仪器:生化培养箱 SP-250A 型, 南京实验仪器厂; 台式高速离心机 5417R 型, Eppendorf 公司; 超声细胞破碎仪 JY92-II 型, 宁波新芝生物科技公司; 旋转蒸发器 RE-52C 型, 巩义予华仪器有限责任公司; 紫外可见分光光度计 UV-3200PCS 型, MAPADA 公司; 层析柱 (15 mm×300 mm)、硅胶薄板 G 型 (30 mm×100 mm), 青岛海洋化工; 硅胶 (200 目), 青岛海洋化工; 高效液相色谱仪 CTO-20A 型, Shimadzu; 甲醇、丙酮、乙腈为色谱纯试剂, 用于 HPLC 层析, 其它试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细菌的培养:细菌的培养参照文献[13]进行, 培养条件为 2 000 lx、30 °C 条件下光照厌氧培养。

1.2.2 提取、纯化和含量测定:色素抽提采用超声波辅助的改良丙酮甲醇提取法中的方法, 依次用甲醇、丙酮甲醇和丙酮作为提取剂各提取 1 次^[13]。光合色素丙酮甲醇提取液经浓缩用甲醇溶解, 采用 200 目硅胶装柱 44 mL (15 mm×250 mm) 湿柱层析, 分离纯化 Car 和 BChl *a*。石油醚浸泡硅胶, 装柱, 石油醚平衡层析柱, 上样量为 2 mL, 以石油醚、丙酮和甲醇配制不同极性的洗脱剂对色素样品进行洗脱, 依据色素的颜色收集洗脱组分, 色素样品检测用光程为 1 cm 的石英比色杯, 于分光光度计上进行全波长扫描。对收集色素样品进行低于

30 °C 真空浓缩定容, 测定纯化色素含量, 并计算其回收率。根据 Jessen 和 Beer-Lambert-Bouguer 方法分别估算 Car 和 BChl *a* 含量, 色素的提取和纯化避光进行, 短时开灯观察。

1.2.3 色素组分分析:以 -80 °C 冻存的 *R. palustris* CQV97 提取色素绘制的 HPLC 指纹图谱为标准, 采用 HPLC 和 DAD 检测器的吸收光谱对纯化色素组分进行定性分析, HPLC、色谱柱和层析参照文献[13]方法进行, 以相对峰面积表示纯化色素组分中各色素成分的表现相对含量。

1.2.4 光稳定性测定:在 1 cm 石英比色杯中, 加入适量的 Car 或 BChl *a* 甲醇溶液, 以甲醇补足 3 mL。分别以日光灯、白炽灯和室内自然光为光源, 光强均为 2 000 lx。紫外光照射采用 15 W 紫外灯, 照射距离为 15 cm, 以黑暗条件为对照。测定温度范围为 20–25 °C。定时测定吸收光谱, 分别以 475 和 770 nm 处的吸光度(A)代表 Car 和 BChl *a* 的浓度, 按公式 $r(\%) = (A_t/A_0) \times 100$ 计算色素的残存率 r , 其中, A_0 和 A_t 分别代表样品初始和光照某个时间点的吸光度值。采用同样的方法观察 500、1 000 和 2 000 lx 对 BChl *a* 稳定性的影响。

2 结果与分析

2.1 色素的纯化和光谱鉴定

经反复探索, 硅胶柱层析分离得到 2 个组分, 以 1 倍柱体积的石油醚湿法装柱, 1.2 倍柱体积的丙酮:石油醚 (2:9, 体积比) 平衡硅胶柱, 按洗脱顺序编号, 以 2 倍柱体积的相同洗脱剂洗脱组分 1, 洗脱开始记为 0 mL, 从第 48 mL 开始收集得到 30 mL 的橙红色组分 (C1), 更换丙酮:甲醇 (8:2, 体积比) 洗脱剂从第 118 mL 开始收集得到 17 mL 的深绿色组分 (C2), 以 1.5 倍柱体积的甲醇再生层析柱。C1 和 C2 组分真空浓缩, 甲醇溶解, 取样品于甲醇稀释, 测定其吸收光谱, C1、C2 和色素提取液吸收光谱见图 1。C1 和 C2 分别呈现典型的螺菌黄质系 Car 和 BChl *a* 的特征吸收峰, 且未见其它的峰出现, 由此判定 C1 为 Car 组分, C2 为 BChl *a* 组分。粗提液呈

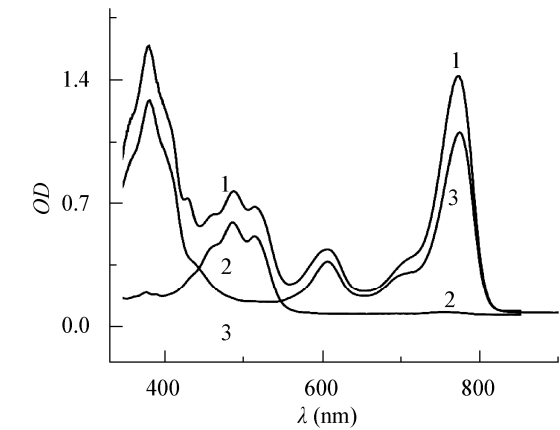


图 1 色素提取液与柱层析洗脱组分 C1 和 C2 的吸收光谱

Figure 1 Absorption spectra of pigment extracts, C1 and C2 components

注：1：丙酮甲醇色素提取液；2、3：柱层析洗脱组分 C1 和 C2。
Note: 1: Pigment extract with the mixture of acetone and methanol; 2, 3: C1 and C2 components obtained from column chromatograph, respectively.

现 Car 和 BChl *a* 的特征光谱,但约在 417 nm 处有一肩峰,纯化的 Car 和 BChl *a* 未见该峰。

2.2 回收率和含量估算

重复硅胶柱层析 5 次,经测定 Car 组分的回收率为 95.4%,相对标准偏差(RSD)为 1.6%,回收率高且波动范围很小;BChl *a* 组分的回收率为 73.2%,RSD 为 10.2%,回收率偏低且波动范围较大。将 5 次层析相应的产物混合浓缩,得到 Car 和 BChl *a* 制剂样品。

采用相同的工艺,BChl *a* 组分回收率偏低且重复性较差,主要是由于操作过程中开灯监控次数和时间有所不同,实验中也发现开灯次数少且光照时间短则回收率较高,反之则较低。在层析过程中,光对 Car 和 BChl *a* 组分的分离究竟有多大影响,为深入解释这一问题,我们对分离的色素组分进行了成分分析,并测定了 Car 和 BChl *a* 组分的光稳定性。

2.3 色素组分分析

纯化 C1 (Car)和 C2 (BChl *a*)色素组分的 HPLC 分析如图 2 所示,与 CQV97 菌体色素 HPLC 指纹图谱^[13]比较,C1 和 C2 的组成及其表观相对含量

见表 1。结果表明:CQV97 菌体细胞含有 6 种 Car,4 种 BChl *a* 和 1 种细菌脱镁叶绿素(Bacteriopheophytin *a*, Bphe *a*)。纯化 Car 组分中也含有这 6 种 Car 和 1 种 Bphe,主要含有 3,4-Didehydorhodopin、Rhodopin、Lycopene 和 Anhydorhodovibrin 4 种 Car,约占总色素总表观含量的 98.3%,而 Rhodovibrin、Bphe *a* 和 Spirilloxanthin 3 种成分约占 1.7%。纯化 BChl *a* 组分由 4 种成分组成,分别为 BChl *a*_{GG}、BChl *a*_{DHGG}、BChl *a*_{THGG} 和 BChl *a*_P,其表观相对含量为 10.42%、2.21%、10.64%和 76.73%,其中 BChl *a*_P 含量最高。色素样品 3 次测定,HPLC 分析各色素成分峰面积(Si)的 RSD 分别小于 2.0%。

2.4 色素的光稳定性

2.4.1 不同光质对 BChl *a* 稳定性的影响:在不同光质的光照下,色素的吸收光谱和色素残存率随时间变化关系见图 3,色素残存率曲线的拟合方程、降解速率常数和半衰期见表 2。黑暗条件下,

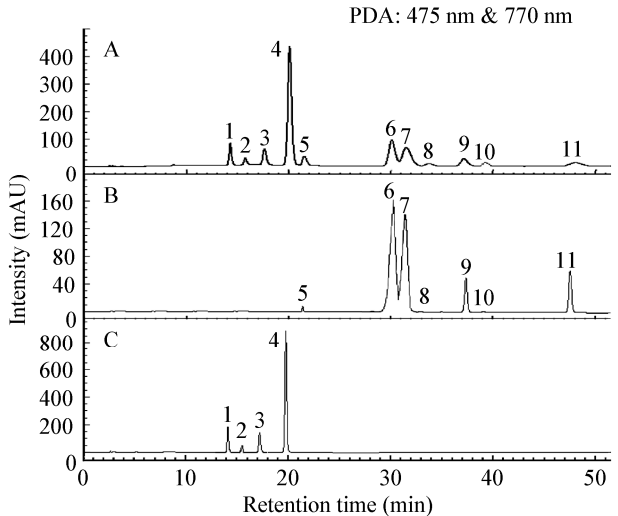


图 2 色素提取液与柱层析两个洗脱组分 C1 和 C2 的 HPLC 图谱

Figure 2 HPLC profiles of pigment extracts, C1 and C2 components

注：A：丙酮甲醇色素提取液；B、C：柱层析洗脱组分 C1 和 C2, C1 (5–11 洗脱峰)检测波长为 475 nm, C2 (1–4 洗脱峰)检测波长为 770 nm。

Note: A: Pigment extract with the mixture of acetone and methanol; B, C: C1 and C2 components obtained from column chromatograph, respectively. C1 (peak 5–11) were monitored at 475 nm; C2 (peak 1–4) were monitored at 770 nm.

表 1 C1 和 C2 组分的成分分析和表观相对含量				
Table 1 The compositions and apparent relative contents of C1 和 C2 in HPLC profiles				
洗脱峰编号 Elution peak No.	保留时间 Retention time (min)	名称 Compounds	Car 各组分表观含量 Relative content of different compositions of Car (%)	BChl a 各组分表观含量 Relative content of different compositions of BChl a (%)
1	14.3	BChl a_{GG}	—	10.42
2	15.8	BChl a_{DHGG}	—	2.21
3	17.6	BChl a_{THGG}	—	10.64
4	20.1	BChl a_P	—	76.73
5	21.5	Rhodovibrin	1.31	—
6	30.1	3,4-Didehydrorhodopin	40.07	—
7	31.5	Rhodopin	38.76	—
8	33.7	Spirilloxanthin	0.17	—
9	37.9	Anhydrorhodovibrin	8.78	—
10	39.6	Bphe	0.24	—
11	48.2	Lycopene	10.67	—

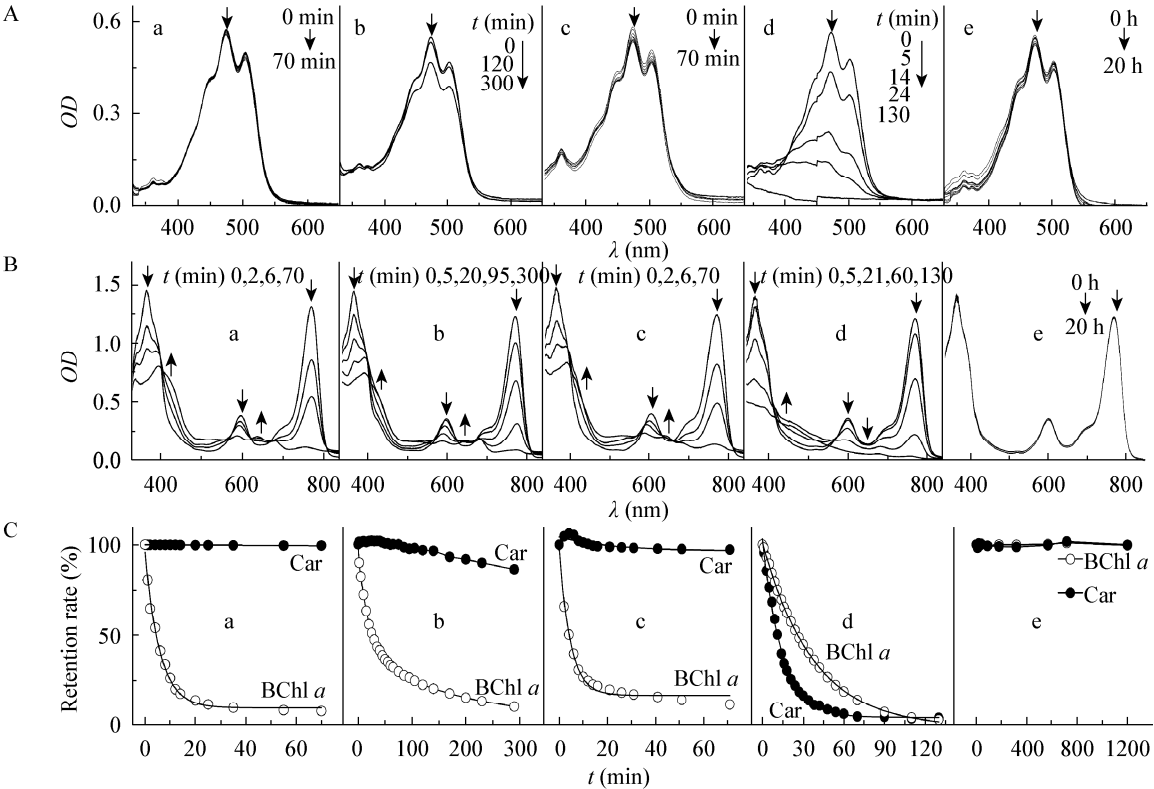


图 3 不同光质对 Car 和 BChl a 稳定性的影响和色素残存率随时间变化曲线

Figure 3 The effects of light sources on stability of Car and BChl a and the residual rate curves of Car and BChl a
注：A：Car；B：BChl a ；C：残存率。a：白炽灯；b：日光灯；c：自然光；d：紫外光；e：黑暗对照。
Note: A: Car; B: BChl a ; C: Residual ratio. a: Incandescent light; b: Fluorescent light; c: Natural light; d: Ultraviolet light; e: Dark control.

表 2 色素的残存率曲线拟合方程、降解速率常数和半衰期					
Table 2 The fitting equation of residual ratio curve, the degradation rate constant and half-lives of Cars and BChl <i>a</i>					
光质 Light sources	光合色素 Photosynthetic pigments	拟合方程 Fitting equations	关系系数 <i>R</i> ²	速率常数 <i>k</i> (min ⁻¹)	半衰期 <i>t</i> _{1/2} (min)
Fluorescent light	BChl <i>a</i>	<i>r</i> =75.42e ^{-0.028 9<i>t</i>} +18.04	0.980 2	0.028 9	29.68
Incandescent light	BChl <i>a</i>	<i>r</i> =86.09e ^{-0.169 8<i>t</i>} +9.70	0.992 7	0.169 8	4.47
Natural light	BChl <i>a</i>	<i>r</i> =80.79e ^{-0.213 9<i>t</i>} +17.08	0.989 5	0.213 9	4.20
Ultraviolet light	BChl <i>a</i>	<i>r</i> =102.38e ^{-0.026 4<i>t</i>} -1.15	0.999 7	0.026 4	26.19
	Car	<i>r</i> =98.50e ^{-0.069 4<i>t</i>} +4.59	0.997 3	0.069 4	11.15

在甲醇溶剂中 24 h 内，BChl *a* 或 Car 的颜色和吸收光谱未发生明显变化，光谱曲线几乎重叠在一起，BChl *a* 和 Car 残存率分别为 99.90%和 99.83%，表明在黑暗室温条件下，Car 或 BChl *a* 在一定时间(24 h)内相对稳定，不受溶剂中残留溶氧的影响。

2 000 lx 白炽灯、日光灯和自然光照射 70 min，Car 残存率分别为 99.41%、99.53%和 97.12%，样品的颜色(黄色)未见明显变化。在紫外光下，Car 很不稳定，随着时间延长，样品颜色由黄色转变为无色，其特征光吸收逐渐降低并消失。经过曲线拟合，色素的光降解过程良好地符合单指数模型($r=Ae^{-kt}+C$)，关系系数(*R*²)为 0.997 3，光降解半衰期为 11.15 min。结果表明：70 min 内在白炽灯、日光灯和自然光照射下，螺菌黄质系 Car 稳定，其抗紫外线辐射的能力较弱，不同光质光照对 Car 的损坏程度依次为紫外灯>自然光~日光灯~白炽灯。

2 000 lx 光照条件下，随着时间的延长，BChl *a* 的 Soret 带(368 nm)、Qx 带(600 nm)及 Qy 带(770 nm)吸收强度逐渐降低并达到平衡。但在不同光质下，BChl *a* 的吸收光谱、残存率曲线和样品颜色变化有所不同。白炽灯、日光灯和自然光照射，BChl *a* 吸收光谱随时间变化趋势较一致，分别约在 565、625 和 668 nm 呈现 3 个等吸收点；770 nm 吸收峰降低并未消失，逐渐呈现 645 nm 处的 1 个小峰，但这一小峰上升的幅度有所不同；约

600 nm 吸收峰逐渐降低并紫移至约 590 nm，368 nm 吸收峰逐渐降低并红移至 395 nm；BChl *a* 的颜色由蓝绿色转变为黄色。在紫外光下，BChl *a* 吸收光谱变化约在 420 nm 和 565 nm 呈现 2 个等吸收点，770 nm 吸收峰逐渐降低并消失，645 nm 处的吸收强度逐渐下降，并未呈现一小峰；600 nm 吸收峰逐渐降低、紫移并消失；368 nm 吸收峰逐渐降低但未消失，也未明显红移；样品颜色由蓝绿色转变为淡黄色。经过曲线拟合，BChl *a* 光降解的动力学过程良好地符合单指数方程，关系系数(*R*²)在 0.980 2~0.999 7 之间，白炽灯、日光灯、自然光和紫外灯照射，BChl *a* 光降解的速率常数(min⁻¹)分别为 0.169 8、0.028 9、0.213 9 和 0.026 4，光降解的半衰期(min)分别为 4.47、29.68、4.20 和 26.19。由此可知：BChl *a* 对不同光质的稳定性程度依次为：日光灯>紫外灯>白炽灯>自然光。

结果表明：在甲醇中，螺菌黄质系 Car 和 BChl *a* 对不同光源照射的稳定性不同。Car 对白光较稳定，而对紫外光不稳定，BChl *a* 对光照均不稳定。4 种光源相比，BChl *a* 对日光灯和紫外灯照射相对较为稳定。Car 和 BChl *a* 对紫外光照射均不稳定，相比之下 Car 的更不稳定。

2.4.2 不同光照强度对 BChl *a* 稳定性的影响：由于光照不仅导致 BChl *a* Qy 带吸收(770 nm)光谱强度降低，同时导致 Soret 带(368 nm)逐渐降低并红移，而且 4 种不同光质光照，自然光对 BChl *a* 的稳定性影响最大。因此，我们采用自然光照，在不

同光强下,同时观察了 BChl *a* Soret 带和 Qy 带的变化规律,其光降解曲线及其拟合方程见图 4 和表 3。结果表明:在较低光强下(500 lx),BChl *a* 很容易光解,随着光强的提高,降解速率提高,降解量也有所增大。经拟合,Soret 带和 Qy 带光降解曲线均符合良好地单指数模型($R^2>0.98$),在相同光强下,Qy 带和 Soret 带下降的速率常数近似相等,但达到平衡时 Qy 带降低的幅度较大,同时产生 395 nm 特征吸收峰,由此可知,BChl *a* 光降解产生了一种相对稳定的物质,该物质在紫光区(395 nm)具有强的吸光特性,在 770 nm 处的吸光度较低。这种解释与目前研究的细菌叶绿素 *c* (BChl *c*)光降解过程中产生的第一个产物相对稳定的研究结果相一致^[20,23]。究竟 BChl *a* 光解是否产生一种相对稳定的物质,还需要进一步的实验证据。

3 讨论

3.1 Car 和 BChl *a* 组分分离及检测

APB 含有丰富的 Car 和 BChl 两大类功能色素,原料来源不同,其积累的 Car 和 BChl 种类和极性有差异,分离工艺也各有差异。常规分离方法是依据两类色素性质上的差异,首先将二者分离,由于研究者研究 Car 或 BChl 对象不同,很少将二者同时纯化。层析是色素分离纯化的重要手段之一,设备简单、分辨率好而且容易实施大量制备,但原料不同,采用的工艺不尽相同,因而我们采用

硅胶柱层析法,以沼泽红假单胞菌为材料,反复探索洗脱溶剂的极性,将二者快速分离,以丙酮:石油醚(2:9,体积比)和丙酮:甲醇(8:2,体积比)洗脱,分别获得了螺菌黄质系 Car 和 BChl *a* 两个组分。成分分析表明:两组分纯度较高,获得的 Car 组分主要含有螺菌黄质系的 6 种 Car,其中含有极少量(<0.25%)的 Bphe *a*。BChl *a* 组分含有 BChl *a*_{GG}、BChl *a*_{DHGG}、BChl *a*_{THGG} 和 BChl *a*_P 4 个成分。但分离过程中,Car 回收率高且稳定,BChl *a* 则相对较低且波动性较大,为解释这一原因,进一步进行

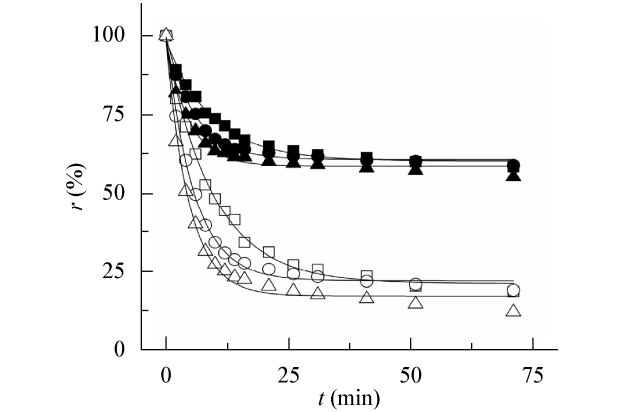


图 4 自然光强度对 BChl *a* 稳定性的影响
Figure 4 The effect of light intensities on stability of BChl *a* under natural light irradiation
注:■&□:500 lx;●&○:1 000 lx;▲&△:2 000 lx;■、●&▲:368 nm 处测定的 BChl *a* 残存率;□、○&△:770 nm 处测定的 BChl *a* 残存率。
Note: ■&□: 500 lx; ●&○: 1 000 lx; ▲&△: 2 000 lx; ■, ●&▲: The residual rates of BChl *a* were measured at 368 nm; □, ○&△: The residual rates of BChl *a* were measured at 770 nm.

表 3 BChl <i>a</i> 光降解动力学过程的拟合方程、光解平衡残存率和降解速率常数 Table 3 The fitting equation of the photodegradation kinetics, photolysis balance residual rate and degradation rate constant of BChl <i>a</i>					
光强 Intensity (lx)	检测波长 λ (nm)	拟合方程 Fitting equations	关系系数 R^2	残存率 r (%)	速率常数/平均值±偏差 $K/(x\pm s)$ (min^{-1})
500	368	$r=38.12e^{-0.1073t}+60.22$	0.992 1	60.2	0.107 3±0.005 8
1 000		$r=39.01e^{-0.1717t}+60.62$	0.994 8	60.6	0.171 7±0.007 1
2 000		$r=39.91e^{-0.2175t}+58.61$	0.981 6	58.6	0.217 5±0.017 1
500	770	$r=76.25e^{-0.1029t}+21.00$	0.993 8	21.0	0.102 9±0.004 9
1 000		$r=77.35e^{-0.1778t}+21.88$	0.996 3	21.9	0.177 8±0.006 2
2 000		$r=80.79e^{-0.2139t}+17.08$	0.989 5	17.0	0.213 9±0.012 7

了 BChl *a* 组分和 Car 组分光稳定性的比较。

3.2 Car 和 BChl *a* 的光稳定性

本研究表明: 在有机溶剂中, 螺菌黄质系 Car 不但在黑暗环境中稳定, 而且在白炽灯、日光灯和自然光等高光强(2 000 lx)照射下在一定时间(70 min)内稳定, 与目前文献报道的源于不同物种 Car 组分在一定时间内稳定的结论吻合。但在紫外光下, 该 Car 组分稳定性极差, 而文献报道稳定性很好^[14]。文献报道使用的 APB 菌株和 Car 组成不明确^[14], 可能会存在 Car 系类别的不同; 再者, 我们采用石英杯, 而文献使用的容器为玻璃试管^[19], 紫外光无法穿透玻璃, 因而色素并不受紫外光的影响。

相对于叶绿素, BChl *a* 稳定性和光降解的研究却很少, 现有研究表明: BChl 在黑暗环境中较为稳定, BChl 受光激发形成激发态 BChl (BChl*), 结构不稳定易被破坏, BChl* 与 O₂ 作用形成 ¹O₂, ¹O₂ 使 BChl 降解, 但尚未阐明 BChl *a* 对不同光源的光降解动力学行为和规律。针对这一问题, 我们在不同光源光照环境中, 测定了 BChl *a* 光降解动力学过程。结果表明, 在本研究的光照下, BChl *a* 特征光谱(770 nm)快速下降, 其降解过程均能良好地符合单指数模型。但光源不同, BChl *a* 降解速率、半衰期和降解程度又有差异, 不同光质对 BChl *a* 的光解速率依次为: 自然光>白炽灯>紫外灯>日光灯。在 2 000 lx 自然光和白炽灯下, BChl *a* 光解半衰期小于 4.5 min, 而日光灯对 BChl *a* 光解速率常数最低, 半衰期约达 30 min。表明在有机溶剂中, BChl *a* 组分对光稳定性很差, 但光质不同, 稳定性也有所不同。

在测定的时间范围内, 白光未能完全光解呈现 770 nm BChl *a* 的生色团, 而紫外光则能降解。由于自然光对 BChl *a* 降解速率最快, 因此, 在自然光下进一步研究了光强对色素稳定性的影响。结果表明, 随着光强降低, BChl *a* 光解速率有所降低, 但即使在较低的光强(500 lx)下, BChl *a* 光解问题也很严重。通过比较 BChl *a* 吸收光谱的变化, 相同光强下, Qy 带和 Soret 带降低的速率常数几乎

相等, 而不同光强下达到光解平衡时, Qy 带或 Soret 降低的幅度却分别相近, 结果表明: BChl *a* 光降解产生了一种相对稳定的物质, 该物质在紫光区(395 nm)具有强的吸光特性, 在 770 nm 处的吸光度较低。

综上所述: 采用一步硅胶柱层析法, 从沼泽红假单胞菌菌体中分离得到了螺菌黄质系 Car 和 BChl *a* 组分, 并分析了这两个组分的色素组成。在甲醇溶剂中, 对色素稳定性研究, 基本阐明了 BChl *a* 和 Car 组分对其不同光质光照稳定性的关系和规律。黑暗条件下 24 h 内, 螺菌黄质系 Car 和 BChl *a* 组分在有机溶剂中稳定。螺菌黄质系 Car 和 BChl *a* 对不同光源照射的稳定性不同。在短时间内, Car 对白光较稳定, 而对紫外光不稳定。BChl *a* 对光照均不稳定, 对不同光质的稳定性程度依次为日光灯>紫外灯>白炽灯>自然光, 其光解过程均良好地符合单指数模型, 随着光强的降低, 光解速率常数降低, 半衰期延长, 白光照射, BChl *a* 光降解能够产生对光相对稳定的中间产物。Car 和 BChl *a* 对紫外光照射均不稳定, 相比之下 Car 的更不稳定。通过色素稳定性研究, 解释了在避光分离纯化色素过程中短时开灯检测是导致 BChl *a* 分离纯化回收率波动, 而 Car 则基本不受影响的重要原因, 同时为 APB 光合色素的制备、功能研究和应用提供借鉴。

参 考 文 献

- [1] Takaichi S. Distribution and biosynthesis of carotenoids[J]. The Purple Phototrophic Bacteria, 2008, 28(2): 97-117.
- [2] Willows RD, Kriegel AM. Biosynthesis of bacteriochlorophylls in purple bacteria[A]//The purple phototrophic bacteria[M]. Heidelberg Springer Netherlands, 2008: 57-79.
- [3] Elsanhoty RM, Al-Turkib IA, Ramadanc MF. Screening of medium components by Plackett-Burman design for carotenoid production using date (*Phoenix dactylifera*) wastes[J]. Industrial Crops and Products, 2012, 36: 313-320.
- [4] Chandi GK, Gill BS. Production and characterization of microbial carotenoids as an alternative to synthetic colors: a review[J]. International Journal of Food Properties, 2011, 14(3): 503-513.
- [5] 赵婷, 林孔亮, 惠伯棣. 微生物源类胡萝卜素研究进展

- [J]. 食品科学, 2010, 31(23): 461-465.
- [6] Choudhari SM, Ananthanarayan L, Singhal RS. Use of metabolic stimulators and inhibitors for enhanced production of β -carotene and lycopene by *Blakeslea trispora* NRRL 2895 and 2896[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(8): 3166-3173.
- [7] Xu F, Yuan QP, Zhu Y. Improved production of lycopene and β -carotene by *Blakeslea trispora* with oxygen-vectors[J]. Process Biochemistry, 2007, 42(2): 289-293.
- [8] Frengova GI, Beshkova DM. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2009, 36(2): 163-180.
- [9] 牟春琳, 郝晓华, 刘鑫, 等. 类胡萝卜素细胞工厂—杜氏藻养殖研究进展[J]. 海洋科学进展, 2010, 28(4): 554-562.
- [10] 许明双, 生吉萍, 申琳. 不产氧光合细菌抗氧化作用研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(3): 267-270.
- [11] Goldshaid L, Rubinstein E, Brandis A, et al. Novel design principles enable specific targeting of imaging and therapeutic agents to necrotic domains in breast tumors[J]. Breast Cancer Research, 2010, 12(3): R29.
- [12] Rosenbach-Belkin V, Chen L, Fiedor L, et al. Chlorophyll and bacteriochlorophyll derivatives as photodynamic agents[A]//Moser JG. Photodynamic Tumor Therapy: 2nd and 3rd generation photosensitizers[M]. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1998: 117-125.
- [13] 卓民权, 赵春贵, 程茜茹, 等. 紫细菌光合色素指纹图谱的建立与色素分析[J]. 微生物学报, 2012, 52(6): 760-768.
- [14] 韩永斌, 刘桂玲, 陈德明, 等. 光合细菌类胡萝卜素的稳定性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(3): 43-46.
- [15] Takaichi S, Sasikala C, Ramana CV, et al. Carotenoids in *Rhodoplanes* species: variation of compositions and substrate specificity of predicted crotenogenesis enzymes[J]. Current Microbiology, 2012, 65: 150-155.
- [16] 张梁, 袁婀娜, 陶冠军, 等. 新型类胡萝卜素的分离提纯及结构鉴定[J]. 天然产物研究与开发, 2006(5): 737-740.
- [17] Cheng Q. Structural diversity and functional novelty of new carotenoid biosynthesis genes[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2006, 33(7): 552-559.
- [18] Michalski WP, Nicholas DJ. Inhibition of bacteriochlorophyll synthesis in *Rhodobacter sphaeroides* subsp. denitrificans grown in light under denitrifying conditions[J]. Journal of Bacteriology, 1987, 169(10): 4651-4659.
- [19] Omata T, Murata N. Preparation of chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and bacteriochlorophyll *a* by column chromatography with DEAE-Sepharose CL-6B and Sepharose CL-6B[J]. Plant and Cell Physiology, 1983, 24(6): 1093-1100.
- [20] Granzhan A, Penzkofer A, Hauska G. Photo-degradation of bacteriochlorophyll *c* in intact cells and extracts from *Chlorobium tepidum*[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2004, 165(1): 75-89.
- [21] Kim WS. Complete fractionation of bacteriochlorophyll and its degradation products[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biophysics including Photosynthesis, 1966, 112(3): 392-402.
- [22] Heidl H, Knödlmayer K, Rüdiger W, et al. Degradation of bacteriochlorophyll *a* in *Rhodopseudomonas sphaeroides* R26[J]. Zeitschrift für Naturforschung C, 1985, 40c: 685-692.
- [23] Brown SB, Smith KM, Bisset GM, et al. Mechanism of photooxidation of bacteriochlorophyll *c* derivatives. A possible model for natural chlorophyll breakdown[J]. Journal of Biological Chemistry, 1980, 255(17): 8063-8068.

编辑部公告

《微生物学通报》英文刊名

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名,造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱,这大大影响了本刊在国际上的传播,也不利于对我刊引用数据的统计。经本届编委会讨论,以及主办单位批准,本刊英文刊名自2010年起变更为“Microbiology China”,缩写为“Microbiol. China”,请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。