

# 微生物生产天然色素的研究进展\*

王 君 张宝善\*\*

(陕西师范大学食品工程系 西安 710062)

**摘要** 综述了天然色素在微生物的新资源、培养条件、发酵工艺及基因工程菌等方面的研究进展,展望了天然色素的开发和应用的未来发展方向。

**关键词** 微生物,天然色素,研究进展

**中图分类号** Q93 **文献标识码** A **文章编号** 0253-2654(2007)03-0580-04

## Research Progress on Natural Pigments Produced by Microorganisms\*

WANG Jun ZHANG Bao-Shan\*\*

(Department of Food Engineering, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062)

**Abstract** This article was a perspective study on natural pigment's new microbial resources, culture conditions, fermentation processes and genetic engineering strains, which provides some future direction for the development and application of natural pigment.

**Key words** Microbe, Natural pigment, Research progress

食用色素是食品工业中不可缺少的添加剂,分人工合成色素和天然色素。天然色素与人工合成色素相比有无毒、安全性高、色泽自然鲜艳、并有很高的营养价值和药理功能等优越性,日益受到重视和青睐。天然色素现在主要是从植物、动物材料和微生物细胞中获取。因动植物材料生长繁殖受季节、气候、产地等因素的影响,原料不足,从中提取的色素价格昂贵,应用受到局限,而利用微生物资源生产天然色素,克服以动植物为原料生产天然色素的诸多缺点,并且易于工业化。因此,采用微生物生产天然色素将逐渐成为天然色素来源的主流。

### 1 产天然色素的微生物新资源

现在已有许多种类的微生物被发现可以产生天然色素,如需氧光合作用的原核生物、不需氧的向光性细菌、不产孢子真菌和酵母、非致病性和植物病原体细菌、耐盐的淡水藻类等。说明产天然色素的微生物资源是非常丰富的。目前,国内外学者还进行了如下工作<sup>[1-7]</sup>:

李建波等发现奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)产黑色素能力较大,倪丽珊发现坚强芽孢杆菌(*Bacillus fumus*)BFHM2002经酪氨酸诱导可显著提高黑色素产量。郑江等从红毛藻中提取藻蓝蛋白,高天荣等从螺旋藻中提取藻蓝

色素,瞿文川等从太湖蓝藻中提取叶绿素、胡萝卜素、颤藻黄素和蓝藻叶黄素,马贵武等用螺旋藻制取叶绿素铜钠盐。赵东红等用一株链霉菌(*Streptomyces*)LS-1发酵可产生蓝色的天蓝菌素(*Coelicolorin*)。袁保红等分离出一株海洋细菌(*Pseudomonas* sp.)产灵菌红素。张亮等分离到一株黄杆菌(*Flavobacterium* spp.)<sub>CF-60</sub>所产的类胡萝卜素中虾青素的含量为90.3%。Del Campo J A等发现光合自养的绿藻(*Chlorella zofingiensis*)CCAP 211/14生长时,会大量的积累虾青素和叶黄素。

### 2 产天然色素的微生物培养条件的研究进展

用微生物规模化生产天然色素主要通过化学手段有效刺激色素的生物合成,促进生物体内天然色素的积累。许多微生物已经被报道能产生天然色素,但是只有一小部分实现工业化。目前杜氏盐藻类是 $\beta$ -胡萝卜素最闻名的微生物资源,同时雨生红球藻和法夫酵母(生产虾青素)也是目前仅有的具有大规模工业生产酮类胡萝卜素的微生物系统。三孢布拉霉已经被俄罗斯用于工业生产 $\beta$ -胡萝卜素多年<sup>[8]</sup>。改进天然色素的生物合成效率可以增加其产量。不同的培养环境和培养基添加物可以提高微藻、真菌、细菌中的细胞生物量和色素产量。

\* 陕西省自然科学基金项目(No. 2006C128)

\*\* 通讯作者 E-mail: baoshan2@snnu.edu.cn

收稿日期 2006-07-11,修回日期:2006-08-11

## 2.1 培养基成分对微生物生产天然色素的影响

培养基为微生物的生长和积累代谢产物提供了碳源和氮源等营养物质,它们是色素物质的结构构成成分,培养基成分还影响色素的合成方向的不同。目前国内外很多学者在这方面做了大量的工作,尤其是对产类胡萝卜素的微生物的研究。如<sup>[9-12]</sup> Buzzini P 以精馏浓缩的葡萄液作为唯一碳源对粘红酵母 DBVPG 3853 生产类胡萝卜素,最佳条件下可获得类胡萝卜素 6.9mg/L,  $\beta$ -胡萝卜素 1100 $\mu$ g/L。陈建军等发现培养基中加入番茄汁有利于红酵母细胞生物量和番茄红素产量的提高,培养基起始 pH 中性偏碱有利于番茄红素的积累。曾强松等采用正负菌孢子混合培养生产  $\beta$ -胡萝卜素,优化发酵工艺,  $\beta$ -胡萝卜素的最大产量为 1.39g/L。张雪霞等从三孢布拉霉菌提取番茄红素中发现,物料比(菌丝和丙酮的质量体积比, g/mL)1:3,温度 35 $^{\circ}$ C,时间为 2h,丙酮作为溶剂时提取效果最好。

此外,胡爱红等<sup>[13]</sup>发现丝状真菌 *Mucor-2.7* 发酵产红色素的液体培养基最佳质量配比为:淀粉 3%、蛋白陈 1.0%、诱导物 1%、起始 pH7.5。Unagul P 等<sup>[14]</sup>研究了(*Cordyceps unilateralis*) BCC 1869 产红色素的最佳培养条件:在 pH7, 28 $^{\circ}$ C, 200r/min 搅拌通分的马铃薯葡萄糖培养基下培养 28 天可获得红色素 3g/L。Crespo P V 等<sup>[15]</sup>发现在培养基中加入 5% 的大豆粉和 1% 的葡萄糖的混合物可得丝状细菌(*Gordonia jacobaea*) MV-26 最大产斑蝥黄质产量为 13000 $\mu$ g/mL。

## 2.2 物理因素对微生物生产天然色素的影响

### 2.2.1 光照

关于光照时间对微生物色素产量的影响。有两种光照诱导理论。一种通过光照刺激微生物生长来提高色素的产量,另一种是通过增加色素生物合成酶的酶活力,增加色素细胞积累量来提高色素的产量。如产  $\beta$ -类胡萝卜素的杜氏盐藻类,就需要高强度的光照以及盐抑制剂和营养抑制剂合成类胡萝卜素。在盐生杜氏藻的生长中,结合化学刺激剂用 50 $\mu$ mol/( $m^2 \cdot s$ ) ~ 1250 $\mu$ mol/( $m^2 \cdot s$ )不同的光照对  $\beta$ -胡萝卜素积累量的增加有重要的影响<sup>[16]</sup>。Salguero A 等<sup>[17]</sup>研究发现紫外光(320nm ~ 400nm)照射(70 $\mu$ mol/( $m^2 \cdot s$ ))对生长期的杜氏盐藻产色素的光合成有效辐射(PAR, 400nm ~ 700nm)照射 84h 后,细胞增长加快,类胡萝卜素产量增加,另外光照后,叶黄素和玉米黄质也分别增加了 30% 和 50%。此外, Fbregas J 等<sup>[18]</sup>研究了强弱光照对雨生红球藻的不动孢子的萌芽和产虾青素的影响。发现强光使氮源的消耗更快并为虾青素的生物合成提供更多的能量,这可以使微生物更早的进入不动孢子期去积累虾青素。

### 2.2.2 温度

温度可以改变色素的生物合成途径,会影响色素生产的酶浓度。有关温度对类胡萝卜素生物合成的影响的研究多集中于杜氏藻属巴德威藻、粘红酵母、法夫酵母绿色丝状菌、鲁氏毛霉、蓝藻等微生物<sup>[16]</sup>。

### 2.2.3 通风

研究发现红曲霉生长,增强通气对色素的形成

是有利的。Simova E D 等<sup>[19]</sup>发现在奶酪乳清超滤液中共生培养的深红酵母 GED2 和干酪乳杆菌干酪亚种,在强力通风 1.3L/( $L \cdot min$ )下可有效地最大获得类胡萝卜素 12.4mg/L。重要的是在这个共生培养中,通风强度刺激了  $\beta$ -胡萝卜素的合成,可达类胡萝卜素总数的 60%。

## 2.3 不同添加物对微生物生产天然色素的影响

目前许多学者已研究证实,在微生物培养体系中添加有机物质可以影响色素的合成,如<sup>[16]</sup>乙醇、甲醇、异丙醇、乙烯、乙二醇、砒烯、 $\beta$ -紫罗酮、异烟胍、胺盐、生物碱、抗菌素、甲基庚烯酮、嘧啶、咪唑、脱落酸、青霉素、氯霉素以及 span-20 等表面活性剂。Squina F M 等<sup>[20]</sup>发现当二苯胺的含量为 10 $\mu$ mol 时,可提高深红酵母和粘红酵母中类胡萝卜素量。Kim B K 等<sup>[21]</sup>发现添加 0.05% 的苯酚到葡萄糖培养液中,粘红酵母 K-501 中的类胡萝卜素种类分别为红酵母红素、圆酵母素和  $\beta$ -胡萝卜素,  $\beta$ -胡萝卜素增加到 35%。Orosa M 等<sup>[22]</sup>发现加入 0.25% 的丙二酸和 0.25% 的醋酸盐可使雨生红球藻获得最佳虾青素产量。

无机盐和金属离子对微生物的色素生物合成也有影响,特别是金属阳离子。如:钾、镁、钠、钙、铁、钴、铜、钼、锰等,甚至重金属:镉、铈、铟<sup>[16]</sup>。此外, Bhosale P 等<sup>[23]</sup>发现氯化钙、氯化铵、氯化锂、碳酸钠可以使多食黄杆菌(*Flavobacterium multivorum*)产类胡萝卜素的产量提高 15% ~ 20%。尤其是尿素和碳酸钠对菌株产玉米黄质,并转为产  $\beta$ -胡萝卜素有显著的影响。Silva C 等<sup>[24]</sup>通过丙三醇和酵母精诱导鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas* sp)的细胞,  $\beta$ -胡萝卜素可提高到 5.7mg/g。Kang C D 等<sup>[25]</sup>发现雨生红球藻合成虾青素中对光自养的诱导比非自养的诱导更有效。在缺少氮源的情况下,添加  $HCO_3^-$  或  $CO_2$  比醋酸盐非自养诱导生物合成的虾青素量更高,持续供给  $CO_2$  会获得更多的虾青素量。

## 3 产天然色素的微生物发酵工艺的研究进展

### 3.1 固定化细胞技术

采用固定化培养后,色素的生成量高于游离细胞液态发酵时的生成量。王克明等<sup>[26]</sup>研究表明,以聚乙烯醇(PVA)为载体固定化的细胞颗粒机械强度高,红曲色素产量高,尤其是通过添加活性碳解除产物抑制作用后,固定化细胞发酵时色素产量比游离细胞提高 90.4%。张子儒等<sup>[27]</sup>用纤维素硫酸钠-聚二甲基二烯丙基氯化铵(NaCS-PDMAAC)包埋红曲霉进行微胶化培养,与游离培养细胞相比,微胶化培养在提高红曲色素浓度的同时缩短了红曲霉生长的糖耗时间。

### 3.2 菌种联合培养

Shin C S 和 Suh J H 等<sup>[28, 29]</sup>研究红曲霉分别与酿酒酵母、米曲霉等菌种进行联合固态培养,红曲霉细胞数量增加了 2 倍,色素产量提高了 30 ~ 40 倍。还报道了红曲霉、H10h

与酿酒酵母的新型联合培养方式—过滤培养。这两种培养方式都发现红曲霉的细胞形态发生了改变,同时显著提高了红曲色素中红色素的产量。他们认为酿酒酵母和米曲霉增加红曲霉细胞壁的透性,解除细胞内的产物抑制,从而提高色素产量,此外贮存色素的液泡体积的增大和液泡数量的增多也提高色素产量。由于酿酒酵母产生的淀粉酶和几丁质酶比米曲霉的效果更好,因而酿酒酵母与红曲霉联合培养更能提高红曲色素的产量。Frengova G I等<sup>[30]</sup>将深红酵母 GED2 和同型发酵的干酪乳杆菌干酪亚种 Hal 在奶酪乳清超滤液中共生培养,发现当培养物达到生长尾声,酵母在固定阶段时细胞中类胡萝卜素含量最大。最大类胡萝卜素量为 12.1mg/L。其中  $\beta$ -胡萝卜素占类胡萝卜素总数高达 46.6%,圆酵母素为 10.7%,红酵母红素为 36.9%。

### 3.3 产天然色素高产突变株的诱变选育

目前,国内外许多学者通过遗传育种筛选出一些色价高、产量大和抗毒素的优良菌种。如:激光诱变、紫外诱变与化学诱变复合处理、超声波诱变等。刘海丽等<sup>[31]</sup>还发现洛伐他汀(lovastatin)和 OP 乳化剂或脱氧胆酸钠(SDC)可提高三孢布拉霉产  $\beta$ -胡萝卜素的产量。

## 4 产天然色素的基因工程菌的构建

通过重组 DNA 技术改变微生物的新陈代谢可以实现在不产生色素的微生物中产生天然色素。比如埃希氏大肠杆菌、产阮假丝酵母、酿酒酵母和运动发酵单孢菌已经被用于研究产类胡萝卜素<sup>[6]</sup>。在微藻、细菌、植物、真菌中,大约 27 种类胡萝卜素酶的 150 个基因被克隆。除少数外,大部分类胡萝卜素基因都可以在不同的寄主生物体中表达,并且远源种的多酶聚集可使类胡萝卜素生物合成<sup>[32]</sup>。

Minra Y<sup>[33]</sup>等将欧氏杆菌中控制番茄红素合成的基因转入产蛋白假丝酵母,得到 758  $\mu\text{g/g}$  干重的番茄红素和 407  $\mu\text{g/g}$  干重的八氢番茄红素。Yoon S H 等<sup>[34]</sup>把质粒 pBAD-LYCm4 上的 *crtE*, *crtB*, *crtI* 和 *ipiHP1* 这 4 种操纵基因重组到具有高复制的 pTc99A 质粒中,转变成质粒 pT-LYCm4。把(*S. pneumoniae*)上的 *mvaK1*, *mvaK2* 和 *mvaD* 基因与大肠杆菌 *idi* 基因结合到质粒 pSTV28 形成质粒 pSSN12Didi。发现含有 pT-LYCm4 和 pSSN12Didi 的整合大肠杆菌比只含 pT-LYCm4 的大肠杆菌的番茄红素产量提高很多。Lee P C 等<sup>[35]</sup>发现,体外加入番茄红素环化酶基因 *crtY2* 的剂量显著的影响整合大肠杆菌中生产单循环圆酵母素, *dxs*, *dxr*, *idi* 和 *ispA* 的表达可提高 33% 的圆酵母素产生。Schmidt A D 等<sup>[36]</sup>发现在三孢布拉霉生产  $\beta$ -胡萝卜素时,  $\beta$ -胡萝卜素的产量大小取决于生物合成基因 *carB* 和 *carRA* 的转录的增加。Steiger S 等<sup>[37]</sup>把类胡萝卜素酮酶基因 *crtW38* 和 *crtW148* 从点形念珠藻(*Nostoc punctiforme*) PCC 73102 转移到大肠杆菌中表达,这些基因中止了  $\beta$ -胡萝卜素转变成斑蝥黄质。然而在大肠杆菌产玉米黄质时,只有 *crtW148* 基因可以诱导玉米黄质的合

成途径向虾青素的合成途径转变。沈萍等<sup>[38]</sup>将嗜麦芽假单胞菌中产黑色素 *mel* 基因克隆到穿梭载体 pHT3101 中,并将它处于表达系统 *cry3A* 控制下,构建得到重组质粒 pHTAM。将此重组质粒转入苏云金芽胞杆菌受体菌株 BMB171 中,得到重组菌株 RSA, *mel* 基因在 BMB171 菌株中得到成功表达。

从当前发展趋势看,如能解决色素合成中单个酶活性的决定和表达、合成途径中不同酶之间的相互作用和细胞位点的控制及生理学上和外界环境中的影响等问题,工业化大规模生产有望实现。

## 参考文献

- [1] 李建波, 宋欣, 曲音波. 微生物学通报, 2004, 31(1): 50~54.
- [2] 倪丽娜. 微生物学通报, 2004, 31(1): 55~59.
- [3] 杨桂枝, 孙之南. 海湖盐与化工, 2005, 34(3): 30~34.
- [4] 赵东红, 陆玲, 秦怀兰. 食品与发酵工业, 1998, 24(5): 21~24.
- [5] 袁保红, 杜青平, 蔡创华. 海洋通报, 2005, 24(6): 92~96.
- [6] 张亮, 朱湘民. 微生物学通报, 1999, 26(5): 332~335.
- [7] Del Campo J A, Rodríguez H, Moreno J, et al. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 64: 848~854.
- [8] Margalith P Z. Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 51: 431~438.
- [9] Buzzini P. J Ind Microbiol Biotechnol, 2000, 24: 41~45.
- [10] 陈建军, 杨济龙. 云南农业大学学报, 2005, 20(3): 381~383.
- [11] 曾强松, 董海宝, 徐静安. 工业微生物, 2002, 32(4): 7~9.
- [12] 张雪霞, 刘刚叁, 李宁. 中国新药杂志, 2005, 14(7): 880~881.
- [13] 胡爱红, 方尚玲, 马丽. 湖北工学院学报, 2003, 18(4): 7~9.
- [14] Unagul P, Wongsa P, Kittakoop P, et al. J Ind Microbiol Biotechnol, 2005, 32: 135~140.
- [15] Veiga-Crespo P, Blasco L, Santos F R, et al. International Microbiology, 2005, 8: 55~58.
- [16] Bhosale P. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 63: 351~361.
- [17] Salguero A, León R, Mariotti A, et al. Appl Microbiol Biotechnol, 2005, 66: 506~511.
- [18] Fbregas J, Domínguez A, Maseda A, et al. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 61: 545~551.
- [19] Simova E D, Frengova G I, Besh D M. Zeitschrift für Naturforschung C. A Journal of Biosciences, 2003, 58: 225~229.
- [20] Squina F M, Mercadante A Z. Journal of Food Biochemistry, 2005, 29(6): 638~652.
- [21] Kim B K, Park P K, Chae H J, et al. Korean J Chem Eng, 2004, 21(3): 689~692.
- [22] Orosa M, Franqueira D, Cid A, et al. Bioresource Technology, 2005, 96: 373~378.
- [23] Bhosale P, Bernstein P S. J Ind Microbiol Biotechnol, 2004, 31: 565~571.
- [24] Silva C, Cabral J M S, Keulen F V. Biotechnology Letters, 2004, 26: 257~262.

- 68 237 ~ 241.
- [ 26 ] 王克明 , 庄树宏 . 烟台大学学报( 自然科学与工程版 ) , 1998 , 11 ( 4 ) 293 ~ 296.
- [ 27 ] 张子儒 , 郑巧东 , 姚善泾 . 食品发酵与工业 , 2003 , 29 ( 11 ) : 1 ~ 4.
- [ 28 ] Shin C S , Kim H J , Kim M J , *et al.* . Biotechnology and Bioengineering , 1998 , 59 : 576 ~ 581.
- [ 29 ] Suh J H , Shin C S . FEMS Microbiology Letters , 2000 , 190 : 241 ~ 245.
- [ 30 ] Frengova G I , Emilina S D , Beshkova D M . Zeitschrift für Naturforschung . C . A Journal of Biosciences , 2003 , 58 : 562 ~ 567.
- [ 31 ] 刘海丽 , 王 蓓 , 余晓斌 . 食品与机械 , 2005 , 21 ( 5 ) : 10 ~ 11.
- [ 32 ] Lee P C , Dannert C S . Appl Microbiol Biotechnol , 2002 , 60 : 1 ~ 11.
- [ 33 ] Minura Y . Biotechnology and Bioengineering , 1998 , 58 ( 2/3 ) : 306 ~ 08.
- [ 34 ] Yoon S H , Lee Y M , Kim J E , *et al.* . Biotechnology and Bioengineering . Published Online : 17 Mar 2006
- [ 35 ] Lee P C , Mijts B N , Dannert C S . Appl Microbiol Biotechnol , 2004 , 65 : 538 ~ 546.
- [ 36 ] Schmidt A D , Heinekamp T , Matuschek M , *et al.* . Appl Microbiol Biotechnol , 2005 , 67 : 549 ~ 555.
- [ 37 ] Steiger S , Sandmann G . Biotechnology Letters , 2004 , 26 : 813 ~ 817.
- [ 38 ] 阮丽芳 , 王玉洁 , 沈 萍 . 武汉大学学报( 理学版 ) , 2003 , 49 ( 2 ) : 257 ~ 260.