

# 栖热菌属高温菌 RH99-02 菌株产类胡萝卜素的<sup>\*</sup>研究

林连兵<sup>1,3</sup> 陈朝银<sup>2,3</sup> 贲昆龙<sup>2</sup> 彭 谦<sup>1\*\*</sup>

(云南大学教育部微生物资源开放研究重点实验室 昆明 650091)<sup>1</sup>

(中国科学院昆明动物研究所 昆明 650223)<sup>2</sup> (昆明理工大学生物工程系 昆明 650051)<sup>3</sup>

**摘要:**从腾冲热海分离到最高生长温度达 80℃ 的一株嗜热非芽孢菌 RH99-02 菌株,经鉴定属 *Thermus* 属。对其所产类胡萝卜素进行了吸收光谱扫描及薄层层析分析。发酵研究表明振荡培养时的菌体生物量和色素产量上均高于静置培养,培养至 50h 菌体生物量和色素产量达到最大值,菌体色素产量为 762μg/g 干重。

**关键词:**高温菌, *Thermus*, 发酵条件, 类胡萝卜素

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 06-0043-04

## CAROTENOIDS PRODUCED BY THERMOPHILE *THERMUS* SP. RH99-02

LIN Lian-Bing<sup>1,3</sup> CHEN Chao-Yin<sup>2,3</sup> BEN Kun-Long<sup>2</sup> PENG Qian<sup>1</sup>

(Yunnan Institute of Microbiology, Kunming 650091)<sup>1</sup>

(Kunming Institute of Zoology, Scientific Academy of China, Kunming 650223)<sup>2</sup>

(Kunming university of science and technology, Kunming 650051)<sup>3</sup>

**Abstract:** A thermophile *Thermus* sp. with the growth temperature up to 80℃ was isolated from Rehai, Tengchong, Yunnan. The yield of its β-carotenoids was higher in shaking condition than in stationary condition. When cultivated for 50hours, the pigment and the biomass yield maximally reached 762μg per gram of dry cells and 0.568 gram of dry cells respectively. The TLC and optical absorption analysis of the carotenoids were shown.

**Key words:** Thermophile, *Thermus*, Fermentation, Carotenoids.

类胡萝卜素是一类有广泛应用价值的天然色素,具有增强机体免疫力、防病保健等功能<sup>[1]</sup>,国内已从细菌、霉菌、酵母菌中提取类胡萝卜素<sup>[2-4]</sup>,但对高温菌产类胡萝卜素的研究还未见报道。Degryse 等<sup>[5]</sup>曾对 *Thermus* 菌株产类胡萝卜素进行初步研究,本文报道分离自云南腾冲热海的一株生长温度达 80℃ 的 *Thermus* 属高温菌,及其产类胡萝卜素的发酵提取、成分分析的初步结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株的分离和鉴定

RH99-02 菌株分离自云南腾冲热海。取 100mL 温泉水样,以 0.2μm 孔径的滤膜过滤,置滤膜于 3% Agar 的 MD 固体培养基平板上,70℃ 富集培养 3d。从 MD 固体富集培养基上挑黄色单菌落,经多次划线分离纯化。根据伯杰氏细菌鉴定手册第九版<sup>[6]</sup>鉴定

\* 国家自然科学基金资助项目 (No. 3996003)

Project granted by National Science Fund of China (No. 3996003)

云南省应用基础研究基金项目 (No. 98C095M)

云南省工业微生物发酵工程重点实验室基金

\*\* 联系人

收稿日期: 2001-09-18, 修回日期: 2001-12-10

所有  
吠喃妥

到属。

## 1.2 培养基

MD 培养基<sup>[7]</sup>: 氨三醋酸 100mg,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  100mg, NaCl 8mg,  $\text{KNO}_3$  103mg,  $\text{NaNO}_3$  689mg,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  111mg,  $\text{FeCl}_3$  0.28mg,  $\text{CuSO}_4$  0.016mg,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.5 mg,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 mg,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.025mg,  $\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  60mg,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  2.2mg,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.046 mg, 酵母粉 1g, 蛋白胨 1g, 以 3N NaOH 调节 pH 值为 7.8, 用双蒸水定容至 1,000mL。

## 1.3 菌体生物量的测定

1.3.1 取培养液 6,000r/min 离心 10min, 以双蒸水洗涤一次, 沉淀于 60℃ 下干燥至恒重后称干重。

1.3.2 以 MD 培养基为参照物, 使用分光光度计测定菌液的吸光度值, 以吸光度值表示菌体生物量。

## 1.4 类胡萝卜素的提取及含量的测定

取 30mL 培养液离心, 沉淀以蒸馏水洗涤 1 次, 加入 5mL 丙酮振荡提取 10min, 见菌体完全褪色后, 6,000r/min 离心 10min, 上清为类胡萝卜素提取液。色素含量计算方法如下<sup>[8]</sup>:

$$\text{类胡萝卜素含量} (\mu\text{g/g 干重}) = A_{\lambda_{\text{max}}} \cdot D \cdot V / 0.16W$$

$A_{\lambda_{\text{max}}}$ ——色素在 450nm 处的光吸收值。

D——测定试样的稀释倍数;

V——提取色素用溶剂量 (mL);

W——干细胞质量 (g);

0.16——类胡萝卜素的消光系数。

## 1.5 色素的鉴定

1.5.1 吸收光谱测定: 将上述类胡萝卜素提取液以丙酮为参比, 在 VU/Visual 2000 型分光光度仪上测定其 320nm ~ 600nm 的吸收光谱。

1.5.2 薄层分析: 于 0.25mm 硅胶 G 板上以 95% 乙醇和氯仿 (1:9) 为展层剂进行层析。

# 2 结果与分析

## 2.1 菌株的鉴定

RH99-02 菌株在平板上形成圆形、润滑、突起、边缘整齐的菌落, 直径为 1mm ~ 3mm, 产生橙黄色非扩散性细胞内色素, 菌丝杆状或丝状,  $0.5 \sim 0.8 \mu\text{m} \times 3.0 \sim 8 \mu\text{m}$ , 形成 *Thermus* 属菌株具有的特殊结构“鼓球体”(图 1, “鼓球体”由几个至十几个菌丝首尾通过细胞壁粘连形成的环状结构), 无芽孢, 好氧, 生长温度为 40℃ ~ 80℃, pH 值为 4.5 以下不生长。RH99-02 菌株具有 *Thermus* 属菌株的典型特征, 革兰氏染色阴性、接触酶反应、氧化酶反应及硝酸盐还原反应阳性, 能利用葡萄糖、山梨糖做唯一碳源生长, 一般不水解淀粉和液化明胶。综合以上特征, 将 RH99-02 菌株鉴定为 *Thermus* 属菌株<sup>[9]</sup>。

## 2.2 培养温度与含氧量对菌体生物量的影响

(1) 将接种 RH99-02 菌株的培养基各分装 50mL 于容量为 250mL 的盐水瓶中, 在不同的培养温度培养, 50h 后测定菌体生物量。试验表明 RH99-02 菌株的最适生长温度为

70℃, 和 *T. aquaticus* 及 *Thermus* 属多数菌株最适生长温度相似<sup>[10]</sup>, 以下实验培养温度均采用 70℃。

(2) 将接种 RH99-02 菌株的培养基分别分装 30mL、50mL、100mL 于容量为 250mL 的盐水瓶中培养 50h, 测定菌体生物量。装有 30mL 培养液的盐水瓶中菌体生长明显优于装有 100mL 培养液的盐水瓶中菌体生长。可见, 随着溶氧量增大, 菌体生物量增加, 通气能提高菌体的生物量, 但考虑到高温通气会造成培养液蒸发过快, 加大培养液中的离子浓度而影响菌体的生长。所以盐水瓶应用反口胶塞塞紧。

### 2.3 静置培养和振荡培养对菌体生物量的影响

以 RH99-02 菌株等量接种后进行静置培养和振荡培养, 在相同的培养时间下, 分别测定菌体生物量。振荡培养时, 菌株培养 50h 菌体生物量达最大值为 0.568g 干重/L。静置培养 58h 菌体生物量达最大值为 0.498g 干重/L。随着培养时间的增加, 菌体出现自溶, 振荡培养的自溶速度小于静置培养。在生长初期, 振荡培养菌体生长速率明显大于静置培养。

### 2.4 培养时间对菌体色素含量的影响

振荡培养条件下, 对不同发酵时间的培养液中色素含量进行测定, 培养至 50h, 菌体生物量达最大值, 色素含量亦达最大值 762μg/g 干重, 培养液中色素含量随菌体生物量的增加而增加, 50h 以后, 随着菌体自溶增加, 色素含量逐渐减少。色素的积累和菌体生物量的增加呈正向关系, 可以通过测定菌体生物量来估计色素的含量。

### 2.5 色素成分初步分析

**2.5.1** RH99-02 菌株色素的光谱吸收曲线: 见图 2。RH99-02 菌株色素和 β-胡萝卜素的色素光谱吸收曲线相似, 最大吸收峰均处于 450nm, 有较明显的肩峰。

**2.5.2** RH99-02 菌株色素薄层层析图谱: 见图 3。薄层层析显示, 此色素有 5 个不同的组分, 其中含量最大的组分与 β-胡萝卜素有相同  $R_f$  值 (0.79), RH99-02 菌株可能含有和 β-胡萝卜素相似的组成成分, 从色素的薄层层析可分离得出 5 条带形, 说明组成成分较为复杂。

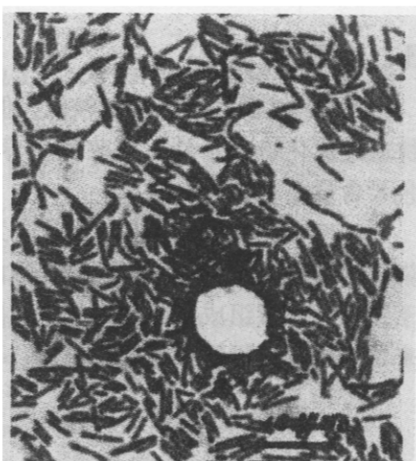


图1 RH99-02 菌株菌体形态及“鼓球体”结构 (bar 10μm)

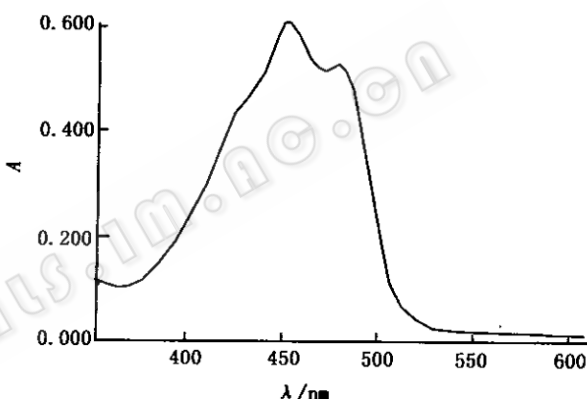


图2 RH99-02 菌株色素的光谱吸收

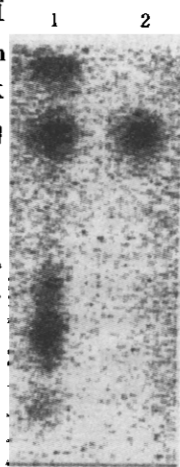


图3 色素薄层层析图  
1 RH99-02 菌株色素,  
2 β-胡萝卜素

### 3 结果与讨论

RH99-02 菌株的生物量较低,但色素含量较高,达  $762\mu\text{g/g}$  干重。据报道,多数菌株通过优化培养条件,如改变培养基的碳源,增加通气量,加入特定的稀土元素等,色素含量会有明显提高。

RH99-02 菌株的最佳生长温度为  $70^{\circ}\text{C}$ ,生长周期短,在高温培养条件下不易被污染,利于菌体的培养。以丙酮提取湿菌体色素,振荡 8min 菌体即褪色成白色,色素易于提取。色素组成成分较为复杂, $\beta$ -胡萝卜素可能为其中重要组成成分。鉴于此类色素来源于生活在极端环境的高温菌,有必要对其色素成分及生理功能作进一步的探讨。

### 参考文献

- [1] 王业勤,李勤生.天然类胡萝卜素——研究进展、生产、应用.北京:中国医药科技出版社,1996.264~273.
- [2] 张亮,朱湘民.微生物学通报,1999,26(5):332~335.
- [3] 韩建荣,王肖娟,厚香鹤.微生物学通报,1998,25(6):319~321.
- [4] 刘月英,潘丽婷,何国荣,等.微生物学通报,1999,26(3):194~197.
- [5] Degryse E, Glanscloff N, Pierard A. Arch. Microbiol, 1978, 117, 189~196.
- [6] Holt J, Krieg N, Sneath P, *et al.* Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1994, .98.
- [7] Brock T D. Thermophilic Microorganisms and Life at High Temperature. New York: Springer-Verlag, 1978, 72~73.
- [8] 扬文,刘炯,吴晨曦,等.食品与发酵工业,1993,(4):24~28.
- [9] Lin L, Chen C, Peng Q, *et al.* Thermus rehail sp. nov., isolated from Rehail of Tengchong, Yunnan Province, China. J Basic Microbiol 2002, 42(5):337~344.
- [10] 和致中,彭谦,陈俊英.高温菌生物学.北京:科学出版社,2000.156~162.