

产氢红杆菌类胡萝卜素含量和组分分析*

张晓蓉 赵春贵 杨素萍**

(山西大学生命科学与技术学院 化学生物学与分子工程教育部重点实验室 太原 030006)

摘要 类胡萝卜素在调节光合细菌产氢中具有重要作用。采用丙酮-甲醇有机溶剂法和 KOH 甲醇皂化法对产氢红杆菌(*Rhodobacter* sp.)R7 菌株类胡萝卜素进行了提取纯化,并进一步采用硅胶 G 薄板层析法对提取的类胡萝卜素进行了分离,并结合光谱法对分离的类胡萝卜素进行了定性和定量分析。结果表明,丙酮-甲醇(7:2, V/V)提取 3 次可将色素提取完全,最佳提取时间为 2h,超声波处理与否对提取率影响不明显,该工艺提取类胡萝卜素产率为 2.81mg/g 湿菌体。硅胶 G 薄板层析表明该菌株类胡萝卜素有 4 个主要组分:黄色、红色、浅红色和浅黄色,黄色和红色为主要成分,光谱学数据显示黄色组分为球形烯,红色组分为螺菌黄质系类胡萝卜素,表明产氢红杆菌类胡萝卜素代谢途径独特。

关键词 产氢红杆菌,类胡萝卜素

中图分类号:Q946 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)05-0863-04

Extraction and Separation of Carotenoids of Hydrogen-Producing *Rhodobacter* sp.*

ZHANG Xiao-Rong ZHAO Chun-Gui YANG Su-Ping**

(School of Life Science and Technology, Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan 030006)

Abstract Carotenoids play an important role in regulating the hydrogen production of hydrogen-producing *Rhodobacter* sp. The carotenoids of hydrogen-producing *Rhodobacter* sp. grown in acetate medium were extracted by using acetone-methanol (7:2, V/V) solvent and were separated by using thin-layer chromatography on silica-gel plate. The qualitative and quantitative of the carotenoids were analyzed by spectrometry. The results showed that the carotenoids were completely extracted three times with acetone-methanol (7:2, V/V) in two hours. The ultrasonication had little effect on yield of carotenoids. The yield of carotenoids was 2.81mg/g wet cell. There were 4 spots on the silica-gel plate in the order of yellow, red, light red and light yellow. Yellow spot and red spot were the dominant composition of carotenoid in *Rhodobacter* sp. The spectrometry data showed that the yellow and red component might be the spheroidene and spirilloanthin respectively.

Key words Hydrogen-producing *Rhodobacter* sp., Carotenoid

类胡萝卜素(Carotenoids)作为光合细菌第二大色素系统,不仅可捕获 400nm~550nm 波长范围的光能,并将捕获的光能传递给光反应中心细菌叶绿素以推动 ATP 的合成,而且还能淬灭叶绿素所产生的荧光,参与非辐射能量的耗散,即非化学淬灭过程,此外它可与自由基反应或通过自由基链反应而清除自由基,保护光敏性的细菌叶绿素,因而类胡萝卜素在能量传递以及光保护中有重要作用。此外,类胡萝卜素对光合细菌色素蛋白复合体大分子的组装、稳定性以及在膜定位中也有非常重要的

作用^[1,2,3]。近年来,对类胡萝卜素突变株的研究结果进一步揭示了类胡萝卜素在光合作用中的调控机制,由球形烯突变为链孢红素的混球红杆菌(*Rhodobacter sphaeroides*)GM309 菌株 LH2 能量传递效率只有野生菌株的 58%^[4]。产氢研究中还发现类胡萝卜素组成和含量与光合放氢活性有关^[5],这可能是类胡萝卜素通过影响能量传递效率和 ATP 活性来影响产氢效率,因为光合细菌产氢所需要的能量来自光合作用产生的 ATP^[6]。在对产氢红杆菌(*Rhodobacter* sp.)类胡萝卜素代谢有重要影响作用

* 国家自然科学基金(No.30470044),山西省自然科学基金(No.20041077)

** 通讯作者 E-mail: yangsuping@sxu.edu.cn, yangsuping220@hotmail.com

收稿日期:2006-11-17,修回日期:2007-02-23

因子(碳源、氢供体及生长因子)研究基础上^[3]本文利用乙酸钠作为供氢体,对产氢红杆菌 R7 菌株类胡萝卜素进行了提取、分离、纯化及定性和定量分析,以期对色素蛋白复合体中类胡萝卜素的作用机制以及为光合色素与产氢关系的阐明提供理论参考。相关研究未见报道。

1 材料与方法

1.1 菌株

产氢红杆菌(*Rhodobacter* sp.) R7 菌株来自山西大学生命科学与技术学院。

1.2 培养基及培养条件

采用改良的 Ormerod 培养基^[3,7],用 2.46g/L 乙酸钠取代其中的 6.0g/L 苹果酸钠。活化至对数期的产氢红杆菌接种于 500mL 培养基中,起始 OD_{660} 为 0.201, $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 和 2000 lx ~ 3000 lx 条件下光照厌氧培养。

1.3 类胡萝卜素提取皂化

采用丙酮-甲醇(7:2, V/V)有机溶剂法提取稳定期细胞色素,然后用 KOH-甲醇皂化法初步纯化类胡萝卜素。

1.4 色素吸收光谱测定和定量

取提取液进行类胡萝卜素吸收光谱测定,测定体系为 3mL。按文献[8]进行计算: $C = 10D/Vf \times 10/2500$ 。其中 C 为胡萝卜素总量, V 为抽提液总体积, f 为稀释倍数, D 为提取类胡萝卜素最大吸收峰的光密度, 2500 为类胡萝卜素的平均消光系数。

1.5 类胡萝卜素组分薄层分析

采用硅胶 G 板(青岛海洋化工厂产品)薄层层析的方法分离类胡萝卜素。展层剂为石油醚:异丙醇:丙酮:甲醇 = 80:2:8:3 (V/V/V/V)。

2 结果与分析

2.1 类胡萝卜素提取工艺流程

离心洗涤收集菌体→丙酮-甲醇提取→超声处理→分相→皂化→上层减压蒸馏→类胡萝卜素

2.2 提取次数的确定

按细胞菌体:丙酮-甲醇(7:2, V/V)为 1:7 (mg/mL, W/V)比例提取产氢红杆菌光合色素。提取后色素吸收光谱表明(图 1),丙酮-甲醇提取 3 次后已没有色素吸收峰,表明色素提取完全,因此,

丙酮-甲醇提取次数以 3 次为宜。

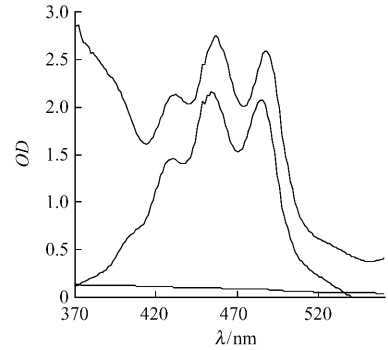


图 1 产氢红杆菌丙酮-甲醇提取色素吸收光谱

1 丙-甲提取 1 次 2 丙-甲提取 2 次 3 丙-甲提取 3 次

2.3 提取时间的确定

对产氢红杆菌细胞菌体用丙酮-甲醇(7:2, V/V)进行不同时间的提取处理,结果如图 2 所示, 2h 之前随着提取时间的增加提取率不断增加, 2h 之后提取率变化不大而趋于一定值,因此, 2h 为该菌种色素最佳提取时间。

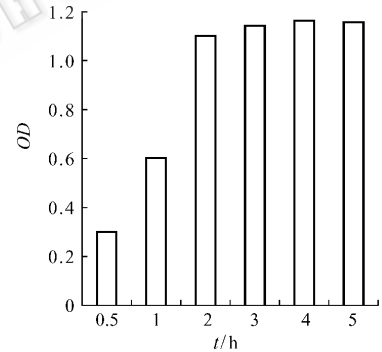


图 2 不同提取时间对类胡萝卜素提取率的影响

2.4 超声波破碎对提取率的影响

采用超声波破碎仪对菌体进行破碎(冰浴,处理 10min,工作 30s,间歇 5s),另取相同体积的发酵液菌体作对照,平行处理 2 组。图 3 结果可知,细胞破碎前后对类胡萝卜素的提取率并没有多大影响,为简化提取工艺,提取过程不再破碎细胞。

2.5 皂化

60°C 减压蒸馏抽干色素提取液,然后溶解在乙醚中,充分振荡后加入等体积的 10% 的 KOH 甲醇溶液和 5% NaCl,反复萃取 3 次,合并萃取液,测定其吸收光谱。由图 4 扫描光谱结果可知,乙醚液含有 432nm、456nm、487nm 的类胡萝卜素组分。减压蒸馏抽干乙醚得红色类胡萝卜素纯品。暗处保存

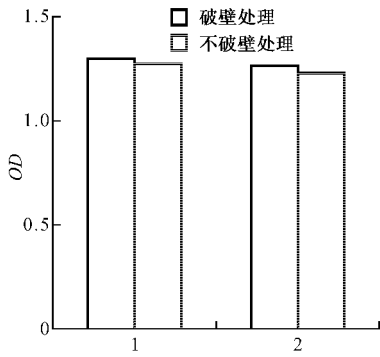


图 3 细胞破碎前后对色素提取率的影响
1 2 为两个平行处理组

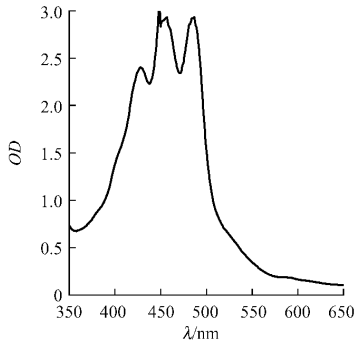


图 4 纯化的类胡萝卜素吸收光谱

2.6 类胡萝卜素提取率的计算

取 3.578g 菌体提取色素并计算类胡萝卜素的提取得率,根据文献公式计算:

$$C = 10DVf/2500 = 10 \times 2.923 \times 4 \times 215/2500 = 10.054\text{mg}$$

该工艺提取类胡萝卜素得率为: $10.054/3.578 = 2.81\text{mg/g}$ 湿菌体

2.7 类胡萝卜素薄层层析

取纯化的类胡萝卜素样品平行 2 组点样于硅胶 G 板进行薄层层析,结果表明(图 5)类胡萝卜素组分在层析板上从前沿依次为黄色、红色、淡红色、淡黄色,其中黄色为主要组分,红色次之。4 种组分的 Rf 值分别为 0.801、0.782、0.482 和 0.401。刮取 4 个色素斑分别溶解在苯和乙醚中进行吸收光谱测定,结果表明(图 6),黄色类胡萝卜素组分在苯和乙醚中都具有较好的溶解性,吸收峰(427nm、455nm 和 485nm)一样。而红色组分仅溶解在苯中,在 455nm 处有较明显的特征性吸收峰,在 485 nm 和 530nm 有一小的肩峰。与文献 [9,10] 比较,黄色组分可能为球形烯(spheroidene),红色组分可能为螺菌黄质系类胡萝卜素(spirilloxanthin)。浅红色和浅黄色因浓

度太低而没有明显的类胡萝卜素吸收峰,有待进一步研究。

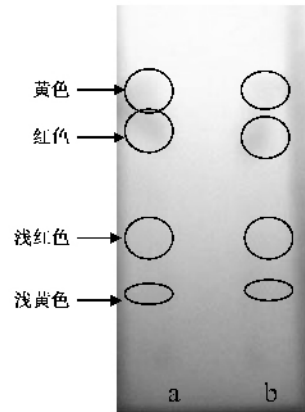


图 5 类胡萝卜素薄层层析分析
a, b 纯化的类胡萝卜素样品

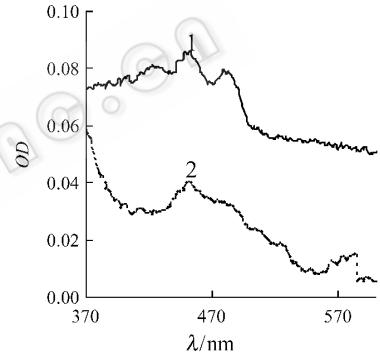


图 6 类胡萝卜素组分薄层层析后吸收光谱
1 黄色斑 2 红色斑

3 讨论

产氢红杆菌类胡萝卜素提取结果表明,溶剂丙酮-甲醇(7:2, V/V)通过 3 次提取能很好的将菌体类胡萝卜素提取出来,提取时间 2h 较为合理。超声波处理对色素提取率影响不明显。经 KOH-甲醇皂化纯化后的类胡萝卜素光谱分析和硅胶 G 薄层层析分离结果进一步表明,产氢红杆菌在生长培养基中类胡萝卜素成分主要为球形烯成分,其次还有螺菌黄质系类胡萝卜素成分,这表明该菌株具有独特的类胡萝卜素合成代谢途径,与其它光合细菌类胡萝卜素合成代谢途径有明显差异[1,11]。对该菌株进一步的深入研究不仅可丰富光合细菌类胡萝卜素合成代谢途径研究内容,而且有望在类胡萝卜素代谢调控机制的阐明方面取得重要突破,同时对于类胡萝卜素调控光合细菌产氢机制的阐明也具有重

参考文献

- [1] Guillermo GA , Helen PL , Richard JC , *et al.* Trends in Plant Science , 1998 , **3**(11) : 445 ~ 448.
- [2] Roszak AW , Howard TD , Southall J , *et al.* Science , 2003 , **302** (5652) : 1969 ~ 72.
- [3] 张晓蓉 , 马文丽 , 杨素萍 . 山西大学学报(自科版) , 2006 , **29** (2) : 201 ~ 204
- [4] 刘 源 , 张 伟 , 吴永强 . 中国科学(C 辑) , 2003 , **33**(5) : 385 ~ 340.
- [5] 杨素萍 , 赵春贵 , 曲音波 , 等 . 微生物学报 , 2003 , **43**(2) : 257 ~ 263.
- [6] 吴永强 , 陈秉俭 , 仇 哲 . 微生物学通报 , 1991 , **18**(2) : 71 ~ 74.
- [7] Ormerod JG , Ormerod KS , Gest H , *et al.* Arch Biochem Biophys , 1961 , **94** : 449.
- [8] 王业勤 , 李勤生编著 . 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 , 1997 . pp. 158.
- [9] Fiedor L , Akahane J , Koyama Y . Biochemistry , 2004 , **43**(51) : 16487 ~ 16496.
- [10] Akahane J , Rondonuwu FS , Fiedor L , *et al.* Chem Phys Lett , 2004 , **393** : 184 ~ 191.
- [11] 冯 娟 , 艾希成 , 张建平 , 等 . 中国科学(B 辑) , 2003 , **33**(5) : 385 ~ 397.