

一株产虾青素的黄杆菌 C_{F-60} 的研究

张 亮* 朱湘民

(中科院武汉病毒研究所 武汉 430071)

摘要: 从土壤中分离到一株黄杆菌 (*Flavobacterium* spp) C_{F-60} , 该菌的生长需 Mg^{2+} 存在, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 的最适浓度为 0.2%; 蛋白胨是该菌株生长的最好氮源, 它不能利用无机氮。种龄超过 96h 的菌体不能在新鲜培养基中生长。经 54h 的 2L 恒化器发酵, 生物量达 6.8g/L, 色素产量为 10.6mg/L。该菌产生的类胡萝卜素成分简单, 主要成分的含量为 90.3%, 该成分经初步鉴定是分子结构中含有羰基和羟基的虾青素。

关键词: 黄杆菌, 类胡萝卜素, 虾青素, 发酵条件, 色谱分离

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(1999)-05-0332-04

STUDIES ON A ASTAXANTHIN-PRODUCING C_{F-60} STRAIN OF *FLAVOBACTERIUM*

ZHANG Liang, ZHU Xiangmin

(Wuhan Institute of Virology, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan, 430071)

Abstract: A carotenoid-producing strain C_{F-60} was screened from the soil source and it was tentatively classified as *Flavobacterium* spp. The optimal growth conditions were studied, discovering that the C_{F-60} strain required Mg^{2+} in the medium, and the inoculate ages played an important role in its growth. When cultivated in 2 liter fermentor for 54h, the biomass and the pigment yield maximally reached 6.8g (dry cell) / liter and 10.6mg / liter, respectively. The major component of the carotenoid was primarily identified as astaxanthin, which was possessed of a powerful function of antioxidation.

Key words: *Flavobacterium*, Carotenoid, Astaxanthin, Fermentation conditions, Chromatographic fractionation

* 清华大学生物技术系 北京 100084

收稿日期: 1998-07-03, 修回日期: 1998-11-16

类胡萝卜素是一类有很广泛应用价值的天然色素,在化学结构上是由八个异戊二烯为链状骨架组成的衍生物。迄今,来源于微生物具有应用价值的类胡萝卜素主要有 β -胡萝卜素,番茄红素,角黄质,叶黄素,虾青素等。其中虾青素是类胡萝卜素中极性最强的一种,在体内,它具有比 β -胡萝卜素和维生素E更强的生物活性和抗氧化性^[1]。我国地域辽阔,产类胡萝卜素的微生物资源丰富,各种微生物所产类胡萝卜素的种类和组成也不相同,研究和发掘菌种资源对于应用和开发天然色素具有重要的实践意义。本文研究了新分离的黄杆菌 C_{F-60} 菌株的培养条件,并对其所产色素的主要成分进行了初步鉴定。

1 材料与方法

1.1 菌株的分离和鉴定

菌种分离自山东胜利油田土壤。按细菌常规鉴定方法^[2]进行形态学特征,一般生理生化特征及DNA的G+C含量测定;按文献[3]进行磷酸酶(Phosphatase)试验;按文献^[4-6]对菌种进行鉴定到属。

1.2 培养条件

1.2.1 基础培养基:蛋白胨 10g,可溶性淀粉 10g, KH_2PO_4 1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1g, 酵母膏 2g, 定容至 1L 水中, pH7.2~7.5, 在 121℃, 1×10^5 Pa, 灭菌 30min。

1.2.2 培养方法:将在斜面上培养 24h 的菌苔洗下制成菌悬液,吸取 1mL 到基础培养基中,在 170r/min 的旋转式摇床上培养 72h,改变基础培养基的成分及培养条件,通过测定菌培养液的光密度值(OD_{660})来衡量菌生长的生物量;以 OD_{420} 减去 OD_{660} 的差值(用 OD_B 表示)来衡量菌的产色素量。

1.3 恒化器发酵试验

采用摇瓶最佳发酵条件在 BIOFLO MODEL C30 型 2L 恒化器中进行发酵试验。定时取样,用 3,5-二硝基水杨酸法测定发酵液的总糖,凯氏定氮法测定总氮,滤膜干重法测生物量。

1.4 色素的提取纯化及类胡萝卜素的定性反应

色素的提取纯化参照文献[7],按文献[8]作类胡萝卜素颜色定性反应试验。

1.5 色素含量的测定

类胡萝卜素的含量测定与计算参照文献[9]。

1.6 色素的组成分析

1.6.1 吸收光谱法:在 UV-300 型紫外-可见双光束分光光度计进行全波段扫描,用标准 β -胡萝卜素(SIGMA 产品)作对照。

1.6.2 反相高效液相色谱(HPLC)分析:在 GILSON715 型液相色谱仪上进行,色谱柱为 Synchropak₁₈ 反相柱, 460×25 mm, 流动相为甲醇:氯仿=1:1(V:V),流速为 1ml/min,检测波长为 455nm,灵敏度为 0.05AUFS,用保留时间定性,与标准 β -胡萝卜素进行比较。

1.6.3 红外光谱分析:通过 HPLC 方法收集保留时间 3.85~4.50min 的色素洗脱部分,将此纯化的色素真空干燥后,取 1mg 用 KBr 压片,在 NICO-LET FI-IR 红外仪上进行红外吸收光谱测试。

1.6.4 色素分子中基团数目的测定:参照文献[10],先取等体积 95% 的甲醇和正己烷混合相互平衡,将纯化的色素溶于经平衡的甲醇中,测甲醇色素液的 OD_{450} 值 A_1 ;取 5mL 甲醇色素液加 5mL 经平衡的正己烷,充分振荡混匀,平衡后,取下层甲醇色素液测 OD_{450} 值 A_2 ,计算 $A_2 / A_1 \times 100\%$ 的值。

2 结果与讨论

2.1 C_{F-60} 菌株的鉴定

C_{F-60} 菌株在平板上形成圆形,滑润,边缘整齐的菌落,直径 1~2mm,可产生橙红色非扩散性细胞内色素;革兰氏阴性,氧化酶阴性,接触酶阳性但较弱;好氧,不能在以 NH_4Cl 为氮源,葡萄糖为碳源的培养基中生长;磷酸酶反应阴性;G+C% 的含量为 68.3%,初步鉴定为黄杆菌属(*Flavobacterium* spp.)。

2.2 C_{F-60} 菌株生长及产色素的最佳条件

2.2.1 试验证明: C_{F-60} 菌株能较好地利用淀粉,而

很难利用对淀粉以外的其它碳源(图1);同时发现 C_{F-60} 菌的最好氮源是蛋白胨(图2),它不能利用无机氮和尿素;培养基中加入0.1%的 KH_2PO_4 对 C_{F-60} 菌生长是有利的,当 KH_2PO_4 浓度超过0.2%时,菌的生长受到抑制;进一步研究表明, C_{F-60} 菌的生长需要有 Mg^{2+} 的存在,当培养基中不添加 Mg^{2+} 时,菌几乎不见生长, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 的最适浓度在0.2%左右。

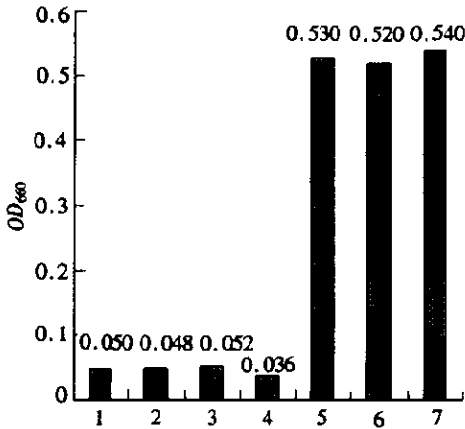


图1 C_{F-60} 菌对不同碳源的利用
1 葡萄糖, 2 蔗糖, 3 糊精, 4 麦芽糖, 5 可溶性淀粉, 6 马铃薯淀粉, 7 玉米淀粉

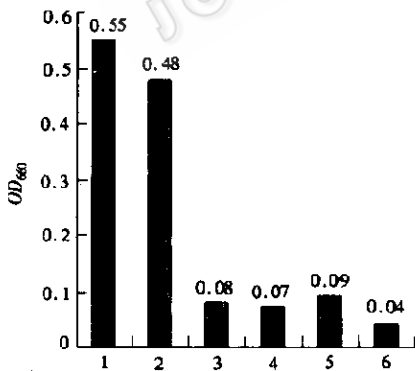


图2 不同氮源对 C_{F-60} 菌生长的影响
1 蛋白胨, 2 胰蛋白胨, 3 玉米浆, 4 棉籽饼粉, 5 黄豆饼粉, 6 鱼粉

2.2.2 种龄及发酵时间对菌生长的影响: 将在斜面上培养不同的时间制成菌悬液, 等量接种。表1表明, C_{F-60} 菌株的生长需要合适的种龄; 种

表1 种龄及发酵时间对菌生长的影响

发酵时间(h)	种龄(h)	OD ₆₆₀
24	24	0.375
	48	0.310
	72	0.180
	96	未见生长
48	24	0.530
	48	0.524
	72	0.450
	96	未见生长
72	24	0.521
	48	0.526
	72	0.460
	96	未见生长

龄以24~48h为佳, 种龄超过96h时, 该菌株的细胞活力下降, 不能在新鲜培养基中生长。

通过摇瓶发酵试验, 发现 C_{F-60} 菌株生长的最佳培养基成分为: 淀粉10g, 蛋白胨20g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2g, KH_2PO_4 1g, 酵母膏1g, pH7.2~7.5, 定容至1L水中; 种龄在24~48h, 接种量1.0%, 培养温度24~28℃。

2.3 恒化器发酵试验

用在摇瓶发酵过程中获得的最佳培养基, 在2L恒化器中进行发酵试验。恒化器的通气量为0.5L/min, 搅拌速度500r/min, 发酵温度为25℃。定时取样, 分析发酵过程参数。试验表明, 在培养8h后菌的生长即进入对数期, 碳、氮的消耗急剧上升, 细胞色素产量与生物量同步增长; 菌生长到54h, 细胞生物量与色素量已趋于恒定, 达到最大值, 此时生物量为6.8g(干重)/L, 色素量为10.6mg/L; 同时碳的消耗几乎殆尽, 而氮只有40%被利用。发酵过程中, pH值略微上升, 最终达到8.40左右。

2.4 色素的组成分析

2.4.1 吸收光谱法: 图3是菌株色素的吸收曲线, 与标准β-胡萝卜素相比, 只有一个较宽的吸收峰, 没有肩峰存在, 最大吸收峰在462nm处。光谱吸收曲线缺少精细的肩吸收峰, 表明该类

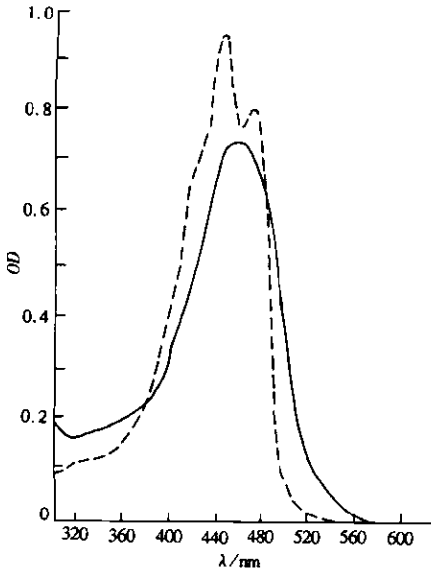


图3 色素在正己烷中的光谱吸收曲线
 C_{F-60} 菌株色素—— β -胡萝卜素——

胡萝卜素的多烯链骨架的两个末端上至少有一个羰基。菌株色素的吸收光谱曲线与虾青素类似。

2.4.2 反相高效液相色谱分析:图4是 C_{F-60} 菌株色素的高效液相色谱图,该色素的主峰保留时间为4.112min。在同样色谱条件下,标准 β -胡萝卜素保留时间为30.41min。根据反相色谱

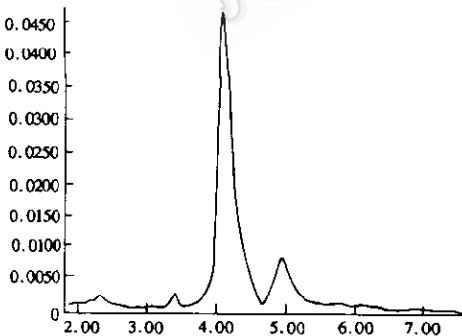


图4 C_{F-60} 菌株色素的反相高效液相色谱图

极性大的成分先洗脱的原理,可知 C_{F-60} 菌色素极性大于 β -胡萝卜素。按归一化面积计算, C_{F-60} 菌色素的主要成分占90.3%。

2.4.3 红外光谱分析:红外吸收光谱图在光波振动频率为 $3350 \sim 3400 \text{cm}^{-1}$ 处及 $1040 \sim 1123 \text{cm}^{-1}$ 处有强吸收峰,表明 C_{F-60} 菌色素分子结构中含有羟基和羰基。

2.4.4 色素分子结构中基团数目的测定:根据色素在不同溶剂中的分配比, $A_1 = 1.168$, $A_2 = 1.140$, $A_2 / A_1 \times 100\% = 97.6\%$,可以计算 C_{F-60} 菌色素分子结构中含有两个羰基,两个羟基。

综合上述结果,可以初步断定 C_{F-60} 菌色素的主要成分是虾青素。

致谢 中科院武汉病毒研究所郑大胜同志在采样过程给予帮助,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Wataru Miki, Pure & Appl Chem. 1991, 63:144~146.
- [2] 卢振祖. 细菌分类学. 武汉:武汉大学出版社,1993.
- [3] 郝士海. 现代细菌学培养基和生化试验手册. 北京:科学出版社,1991.469.
- [4] Weeks, O B. J Appl Bacteriol, 1969, 32:13~18.
- [5] Mcmeekin T A, Shewan J M. J Appl Bacteriol, 1978,45:321~332.
- [6] Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: Willions & Wilkins Co 1986.
- [7] 张素琴,朱湘民,颜金莲等. 食品与发酵工业, 1989, 5: 1~5.
- [8] 林寿启编. 中草药成分化学. 北京:科学出版社,1977, 572.
- [9] Pietro A S. Photosynthesis, 1971, 23:586.
- [10] Petreck F J, Zechmeister. Anal Chem, 1956, 28: 1484~1485.