

研究报告



两株海洋放线菌的产色素特性

谭啟超 肖飞榕 梁佳欣 郭策 魏士平*

中国地质大学(北京)海洋学院 北京 100083

摘要:【背景】生物产生的天然色素在工业、农业和纺织工业上有潜在应用价值。【目的】通过对产色素海洋放线菌的分离与筛选,为开发细菌所产生的天然色素在纺织与食品工业中的应用奠定基础。【方法】筛选胞外产可溶性色素的放线菌,并通过 16S rRNA 基因序列测定和分析构建其系统发育树,并对影响色素产量的因素和色素稳定性进行实验。【结果】获得了一株产蓝色色素的放线菌 Q2N-42 和一株产黄绿色色素的放线菌 X4C-5, 16S rRNA 基因序列分析表明它们分别与天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)或紫红链霉菌(*Streptomyces violaceoruber*)和普拉滕斯链霉菌(*Streptomyces pratensis*)的 16S rRNA 基因序列存在较高的相似性。通过研究不同碳源和氮源对放线菌 Q2N-42 和 X4C-5 产色素的影响,发现甘油和硝酸钠能明显地增加天蓝色链霉菌(*S. coelicolor*) Q2N-42 的色素产量,而淀粉和硝酸钠能明显地增加普拉滕斯链霉菌(*S. pratensis*) X4C-5 的色素产量。这两种色素对不同浓度的氧化剂、还原剂、盐和 pH 都表现出良好的稳定性;色素的红外光谱测定表明,其结构分别包含了-OH、-CH₃和 C=C 基团。通过色素和不同媒染剂对棉线染色,发现硫酸铜是蓝色色素良好的媒染剂,毛线着色较深,洗涤不易脱色;而硫酸亚铁是绿色色素良好的媒染剂,毛线着色较深、有光泽,洗涤不易脱色。【结论】放线菌株 Q2N-42 和 X4C-5 所产生的色素为其工业应用提供了潜在天然色素资源。

关键词: 蓝色色素, 黄绿色色素, 放线菌, 色素稳定性, 媒染剂

Pigments production by two marine actinobacteria

TAN Qi-Chao XIAO Fei-Rong LIANG Jia-Xin GUO Ce WEI Shi-Ping*

School of Marine Sciences, China University of Geosciences (Beijing), Beijing 100083, China

Abstract: [Background] Biogenic natural pigments have potential applications in industry, agriculture, and textile industries. [Objective] The isolation and screening of marine pigment-producing actinobacteria is aimed to lay a foundation for the applications of bacterial pigments in the textile and food industry. [Methods] Actinobacteria, producing extracellular soluble pigment, were screened, and 16S rRNA gene phylogenetic tree was constructed based on their 16S rRNA gene sequences. Subsequently, factors affecting pigment yield and stability were investigated. [Results] A blue pigment-producing actinobacterium Q2N-42 and a yellow-green pigment-producing actinobacterium X4C-5 were obtained.

Foundation item: Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students of China University of Geosciences (Beijing) (X201911415270)

*Corresponding author: E-mail: weishiping@cugb.edu.cn

Received: 03-03-2020; Accepted: 29-06-2020; Published online: 02-07-2020

基金项目: 中国地质大学(北京)大学生创新创业训练计划项目(X201911415270)

*通信作者: E-mail: weishiping@cugb.edu.cn

收稿日期: 2020-03-03; 接受日期: 2020-06-29; 网络首发日期: 2020-07-02

Phylogenetic analyses of the 16S rRNA gene sequences of Q2N-42 and X4C-5 showed that they have high similarity with *Streptomyces coelicolor* or *Streptomyces violaceoruber* and *Streptomyces pratensis*, respectively. Comparative analyses of the effects of carbon and nitrogen sources on pigment yields showed that glycerol and sodium nitrate can significantly increase the blue pigment yield of *S. coelicolor* Q2N-42, whereas, starch and sodium nitrate can significantly increase the yellow-green pigment yield of *S. pratensis* X4C-5. Both the blue and yellow-green bacterial pigments displayed fine stability when they were treated with different concentrations of the oxidant, reductant, salinity, and pH. FTIR spectral analyses of the pigments showed that the pigment molecules contain the functional groups of $-OH$, $-CH_3$, and $C=C$. Different mordants coupled with the bacterial pigments were used to check the dyeing propriety on the cotton threads. The results demonstrated that copper sulfate combined with the bacterial blue pigment presented a excellent performance when the cotton threads were dyed with it, the cotton threads were stained in darker blue, and enough to withstand the water wash treatment. Whereas, ferrous sulfate combined with the bacterial yellow-green pigment gave a good performance for the cotton thread staining. **[Conclusion]** Those data indicate that both the blue pigment produced by Q2N-42 and the yellow-green pigment produced by X4C-5 are potential resources towards their industrial applications.

Keywords: Blue pigment, Yellow-green pigment, Actinobacteria, Pigment stability, Mordant

色素是指天然的或人工合成的赋予物质一定颜色的物质, 已广泛应用于食品和纺织工业。据统计, 仅纺织工业每年就消耗约 130 万 t 染料、色素和染色前体, 其总价值超过 230 亿美元^[1]; 在食品工业中, 色素常作为添加剂、抗氧化剂和色彩增强剂应用于食品中^[2]。但鉴于目前市场上所用的色素多为化学合成的物质, 存在着诸如难以降解、对环境有害和危害人类健康等缺点^[3], 迫切需要开发环保、安全的天然色素。

天然色素可分为动物色素、植物色素和微生物色素, 由于动植物产生的色素相对于微生物色素而言存在能耗高、生产周期较长和生产时间受限等缺点, 因此, 用微生物生产色素一直备受研究者的青睐^[2,4]。当前, 微生物所产生的天然色素已应用于染料、食品、医药工业等领域^[1-2,5-8]。Chakraborty 等从海洋红树林环境中分离得到一株费氏链霉菌(*Streptomyces fradiae*), 从其胞内提取到粉红色色素, 对棉花和羊毛棉料的染色结果表明, 染色后的棉料可以抵抗水的洗涤^[9]。Alihosseini 等从一株弧菌 *Vibrio* spp. 中分离出了亮红色的色素, 通过对羊毛、尼龙、丝绸和聚丙烯腈材料的染色, 颜色有加深的现象; 而对棉花和聚丙烯面料的染色, 着色较浅; 经细菌色素染过

的面料还具有抗菌特性^[10]。自然界中的细菌、真菌和藻类大都可产生不同的色素^[1,6,11], 多数细菌色素常合成于细胞壁, 但有的细菌则可以把色素分泌到培养基中^[11]。然而细菌胞壁产生的色素往往需要收获大量的细菌细胞, 然后经过复杂的提取工艺进行提取, 相比之下, 细菌产生的分泌性色素更具有工业化前景, 尤其是一些水溶性色素具有良好的稳定性^[12]。前人的研究表明: 一些放线菌通常会产各种各样的水溶性色素^[12]。韦瑶等^[13]从百合鳞茎中分离得到一株产蓝色色素的放线菌, 其色素可以分泌到培养基中, 该色素对重金属盐、氧化剂、还原剂皆表现出良好的稳定性。

本研究通过对北戴河海洋沉积物中产水溶性色素放线菌的分离与筛选, 并探究其发酵条件及色素稳定性, 对于天然色素的开发与应用具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

可溶性淀粉, 国药集团化学试剂有限公司; 琼脂, 北京奥博星生物技术有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公

司;其他试剂,北京化工厂。立式压力蒸汽灭菌锅、pH 计,上海博远实业有限公司医疗设备厂;精密电子天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;离心机,上海卢湘仪离心机仪器有限公司。

PSA 固体培养基:取去皮土豆 200 g,将其切为小块,加入 1 L 的去离子水,持续加热 30 min,使用四层医用纱布对其进行过滤,滤液补足至 1 L,待其冷却后,加入 20 g 蔗糖和 20 g 琼脂。

高氏一号固体培养基(g/L): K_2HPO_4 0.50, KCl 0.50, $FeSO_4$ 0.01, $NaNO_3$ 0.50, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.50, 可溶性淀粉 20.00, 琼脂 20.00, pH 为 7.0^[14]。

培养基在高压蒸汽灭菌锅中 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.2 方法

1.2.1 放线菌的分离与产色素细菌的筛选

取 10 g 采集于北戴河的海洋沉积物,加入到 90 mL 无菌水中,涡旋混匀,梯度稀释至 10^{-5} g/mL。然后取 50 μ L 的 10^{-5} 稀释液涂布于高氏一号固体培养基,于 30 °C 恒温培养箱中倒置培养 5–7 d,根据菌落出现的形状、大小、质地挑取放线菌,分别转接到 PSA 固体培养基上进行纯培养,然后将放线菌纯培养物悬浮在含有 20%甘油的高氏一号液体培养基里,于–70 °C 冰箱中保藏,备用。同时,将放线菌纯培养物分别接种于高氏一号固体培养基上,于 30 °C 条件下培养 5–7 d,观察及记录各菌株产色素情况。

1.2.2 产色素放线菌的 16S rRNA 基因序列测定及分析

将放线菌 Q2N-42 和 X4C-5 接种在 PSA 固体平板上,于 30 °C 条件下培养 5 d,挑取约 0.1 g 菌落加入无菌的 1.5 mL 离心管中,按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒操作步骤提取产色素放线菌的基因组 DNA,然后利用细菌 16S rRNA 基因的通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACCTTGTACGACTT-3')进行 PCR 扩增^[15]。PCR 产物经纯化送至北京康盈创新生物技术

公司进行 16S rRNA 基因测序。然后将所测得的序列在 NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) 网站上进行 BLAST 分析与比较,选取相似性较高的菌株的 16S rRNA 基因序列作参比序列,用 BioEdit 和 MEGA 4.0 等软件构建菌株系统发育进化树,以此确定产色素放线菌与其他菌株的进化关系。

1.2.3 碳源和氮源对色素产量的影响

在高氏一号培养基的基础上,用同等摩尔质量的葡萄糖、蔗糖、甘油替换淀粉,比较葡萄糖、蔗糖、甘油和淀粉 4 种碳源对色素产量的影响;同样,用同等摩尔质量的蛋白胨、氯化铵替换硝酸钠,比较硝酸钠、蛋白胨和氯化铵 3 种氮源对色素的影响。分别配制含有这 4 种碳源和 3 种氮源的液体培养基 200 mL,装入 500 mL 三角瓶中并灭菌,按 1% 的接种量分别接种产色素放线菌;于 30 °C、150 r/min 的摇床中培养 7 d,每个处理 3 个重复。待色素发酵结束后,色素发酵液于 4 000 r/min 离心 30 min,取上清液^[16],在色素最大吸收波长处测定其吸光值。

1.2.4 色素稳定性实验

基于上述最佳碳源和最佳氮源组合后的培养基进行色素发酵,将所获得的发酵液上清进行氧化剂(H_2O_2)、还原剂(Na_2SO_3)、盐度($NaCl$)和 pH 的稳定性试验。分别配制 0.1%、0.2%、0.5%、1.0% 的 H_2O_2 、 Na_2SO_3 、 $NaCl$ 溶液和 pH 分别为 3.0–12.0 的梯度 pH 溶液,然后分别取上述溶液各 5 mL 与 5 mL 的色素发酵离心上清液进行混合,在色素最大吸收波长处测定其吸光值,每个处理 3 个重复。

1.2.5 色素的红外光谱测定

取 100 mL 色素发酵上清液,然后缓慢加入 10% 的 $CuSO_4$ 溶液 20 mL,边加入边搅拌。待色素沉淀后,于 4 000 r/min 条件下离心 10 min,弃上清,沉淀用去离子水进行洗涤 3 次,然后干燥。干燥后的色素沉淀经研磨,然后进行红外光谱测试,记录 4 000–400 cm^{-1} 波数的光谱强度。

1.2.6 色素对棉线的染色实验

分别以 $CuSO_4$ 、 $FeSO_4$ 和 $NaCl$ 作为媒染剂,

以不加媒染剂作为对照, 观察色素对棉线的染色效果。分别配制 1 mol/L 的 CuSO_4 、 FeSO_4 和 NaCl 溶液, 将白色棉线浸于媒染剂中 30 min, 取出棉线, 晾干。然后将前媒染的棉线浸于色素溶液中进行染色, 30 min 后捞出, 晾干。将染色后的棉线裁剪成相等的两段, 其中一段用蒸馏水洗涤 30 min, 另一段作为对照。洗涤前与洗涤后的毛线分别用 Photoshop 中的拾色器测定其颜色特征值 L^* (亮度)、 a^* (红绿值)、 b^* (黄蓝值), 每一色样测试 31×31 点样, 取其平均值, 计算洗涤前与洗涤后的色差 ΔE 值, 以此评价棉线的染色和脱色效果^[17]。

2 结果与分析

2.1 放线菌的分离与产色素放线菌的筛选

从海洋沉积物中共分离得到放线菌 97 株, 将 97 株放线菌接种到高氏一号培养基上, 经过筛选, 分别获得了一株编号为 Q2N-42 的产蓝色色素的放线菌菌株(图 1A)和一株编号为 X4C-5 的产黄绿色色素的放线菌菌株(图 1B)。从图 1 中可以看出, 两种放线菌在固体平板上都可以产生分泌性色素, 在液体培养基中同样也可以产生大量色素(图 1C-D)。

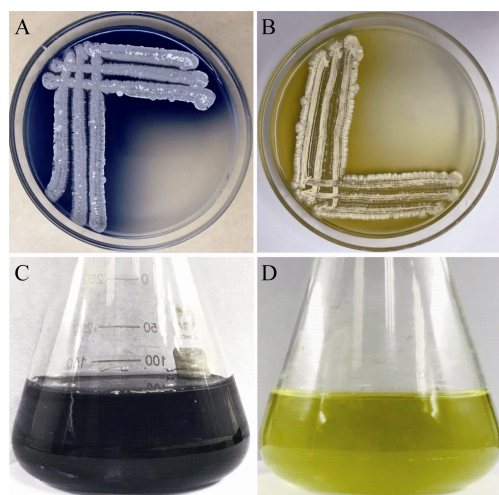


图 1 产色素放线菌的筛选

Figure 1 Screening of the pigment-producing actinobacteria

注: A 和 C: Q2N-42; B 和 D: X4C-5.

Note: A and C: Q2N-42; B and D: X4C-5.

2.2 产色素放线菌的 16S rRNA 基因序列分析

将 Q2N-42 和 X4C-5 的约 1.4 kb 的 16S rRNA 基因序列上传至 GenBank, 获得其基因序列号分别为 MT163331 和 MT163332。将 Q2N-42 和 X4C-5 的 16S rRNA 基因序列分别在 GenBank 中进行比对, 选取相似性 99% 以上的放线菌序列作为参比序列共同构建系统发育树(图 2)。由图 2 可知, Q2N-42 的 16S rRNA 基因序列与天蓝色链霉菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) 和紫红链霉菌 (*Streptomyces violaceoruber*) 的相似性都达到了 100%, 要想明确其种的归属, 还有待于借助生理生化特征及其他分子生物学证据。Bystrykh 等^[18]研究表明, 天蓝色链霉菌 *S. coelicolor* A3(2) 可产生蓝色的具有放线紫红素(actinorhodin)结构的物质。X4C-5 的 16S rRNA 基因序列与普拉滕斯链霉菌 (*Streptomyces pratensis*) 的相似性达到 99.99%。Barghouthi 等^[19]研究表明, 普拉滕斯链霉菌 *S. pratensis* QUBC97 能产生可分泌的胞外黄色色素, 但未见对其色素进一步的研究。

2.3 碳源和氮源对色素产量的影响

为了准确评价碳源和氮源对色素产量的影响, 首先对 Q2N-42 和 X4C-5 所产生的色素进行了最佳吸收波长的测定。以 10 nm 的间隔, 分别测定色素在 300–600 nm 波长范围内的吸光值, 取光吸收值最大的波长为最佳波长^[20]。结果显示, Q2N-42 所产生的蓝色色素在 440 nm 有最大吸收, 而 X4C-5 所产生的黄绿色色素在 480 nm 有最大吸收。

产蓝色色素的放线菌 Q2N-42 和产黄绿色色素的放线菌 X4C-5 对碳源的偏好明显不同(图 3A)。Q2N-42 以甘油为碳源时, 其蓝色色素产生较早, 并且其产量最高, 最大吸光度可达 0.52 ± 0.08 ; 而 X4C-5 以淀粉为碳源时, 其黄绿色色素产生较早, 并且产量最高, 最大吸光度可达 0.84 ± 0.09 。

分别用甘油和淀粉作为 Q2N-42 和 X4C-5 的碳源, 在此基础上比较不同氮源对色素产量的影响(图 3B)。由图 3 可以看出, Q2N-42 和 X4C-5 都以

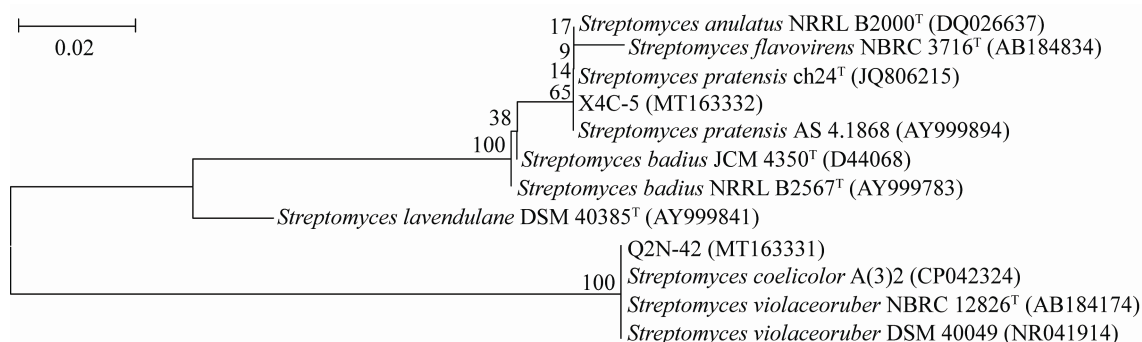


图2 基于16S rRNA基因序列构建的产色素放线菌和参比放线菌的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences of Q2N-42 and X4C-5 as well as their reference strains

注：括号中的序号为基因序列号；分支点上的数字表示1000次重复后得到的置信值；标尺表示100个核苷酸中有2个被替换；上标“T”代表标准菌株。

Note: Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; Numbers at the branch points indicate bootstrap values obtained after 1 000 replicates; The scale bar corresponds to 0.02 substitutions per nucleotide position; The superscript “T” indicates the standard strain.

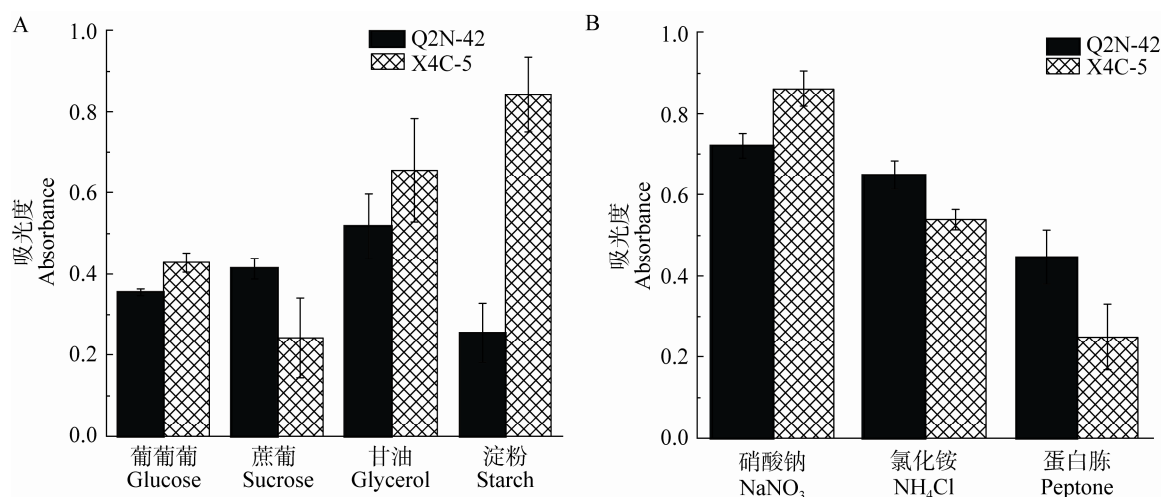


图3 碳源和氮源对Q2N-42和X4C-5色素产量的影响

Figure 3 Effects of carbon sources and nitrogen sources on pigment production by Q2N-42 and X4C-5

注：A：碳源；B：氮源。

Note: A: Carbon source; B: Nitrogen source.

硝酸钠作为氮源时，其色素产量高于用氯化铵和蛋白胨作为氮源时。Q2N-42以甘油和硝酸钠分别作为碳源和氮源时，其蓝色色素产量进一步提高，色素吸光度可达 0.72 ± 0.03 ；而X4C-5以淀粉和硝酸钠分别作为碳源和氮源时，其黄绿色色素的产量也明显增高，色素吸光度可达 0.86 ± 0.04 。

2.4 色素稳定性结果

当Q2N-42所产生的蓝色色素溶液和X4C-5所产生的黄绿色色素溶液分别与不同浓度的氧化剂

双氧水、还原剂亚硫酸钠和不同盐度的氯化钠以等体积混合后，随着 H_2O_2 、 Na_2SO_3 和 $NaCl$ 浓度的提高，两种色素的吸光值与对照相比未见有明显的变化(图4A-C)，说明这两种色素对氧化剂、还原剂和盐度都具有较好的稳定性。pH值对Q2N-42所产生的蓝色色素没有影响，色素在广泛的pH范围内均表现出良好的稳定性；但X4C-5所产生的黄绿色色素在低pH下表现不稳定，在pH大于5.0时，该色素表现出良好的稳定性(图4D)。

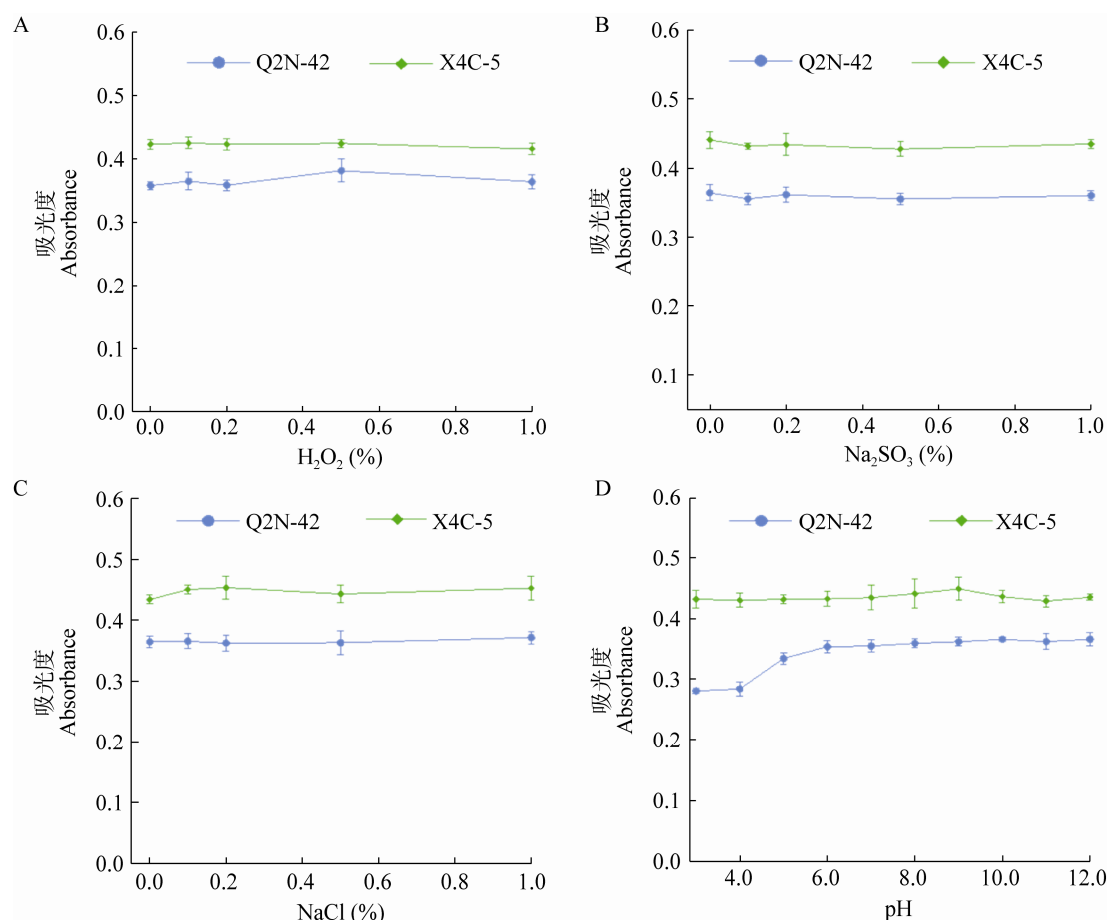


图4 H₂O₂ (A)、Na₂SO₃ (B)、NaCl (C)和pH (D)对色素稳定性的影响

Figure 4 Effects of H₂O₂ (A), Na₂SO₃ (B), NaCl (C) and pH (D) on the pigment stability

2.5 色素的红外光谱分析

对蓝色色素和黄绿色色素的分子结构及化学键进行红外光谱表征(图 5), 结果显示: 两种色素在红外光谱的特征区相似, 吸收峰 $3\ 379\ \text{cm}^{-1}$ 为 $-\text{OH}$ 伸缩振动, 吸收峰 $2\ 934\ \text{cm}^{-1}$ 为 $-\text{CH}_3$ 伸缩振动, 吸收峰 $1\ 632\ \text{cm}^{-1}$ 为 $\text{C}=\text{C}$ 伸缩振动; 两种色素在红外光谱的指纹区明显不同, 吸收峰 $1\ 373\ \text{cm}^{-1}$ 为 $-\text{CH}_3$ 弯曲振动, 吸收峰 $1\ 023\ \text{cm}^{-1}$ 为 $\text{C}-\text{O}$ 伸缩振动, 蓝色色素在吸收峰 $617\ \text{cm}^{-1}$ 出现 $=\text{CH}$ 弯曲振动, 而黄绿色色素在 $476\ \text{cm}^{-1}$ 出现 $\text{S}-\text{S}$ 伸缩振动。

2.6 色素对棉线的染色效果

分别用 CuSO_4 、 NaCl 和 FeSO_4 和溶液作为媒染剂对棉线进行前媒染, 然后加色素着色, 以不

加媒染剂作为对照, 对棉线洗涤前后的洗涤效果(图 6)和毛线颜色的色坐标(表 1)进行评价, 结果表明, Q2N-42 产生的蓝色色素用 CuSO_4 作为媒染剂时棉线着色较深(图 6A), 洗涤后与洗涤前相比棉线的色差值变化较小($\Delta E=2.45$, 表 1), 表明棉线经过洗涤后不易脱色(图 6B); 当用 NaCl 和 FeSO_4 作为媒染剂时, 棉线在洗涤前后其色差值变化较大($\Delta E=10.05-12.21$, 表 1), 表明棉线经过洗涤后比较容易脱色(图 6B)。X4C-5 产生的黄绿色色素用 CuSO_4 做媒染剂时, 洗涤前后棉线的色差值变化较小($\Delta E=7.07$, 表 1), 虽然经洗涤后棉线不易脱色, 但其着色较浅(图 6C、D); 当用 NaCl 和 FeSO_4 作媒染剂时, 两者在洗涤前后的色差值相当(ΔE 分别为 12.04 和 12.53), 但用 FeSO_4 作为媒染剂时棉线

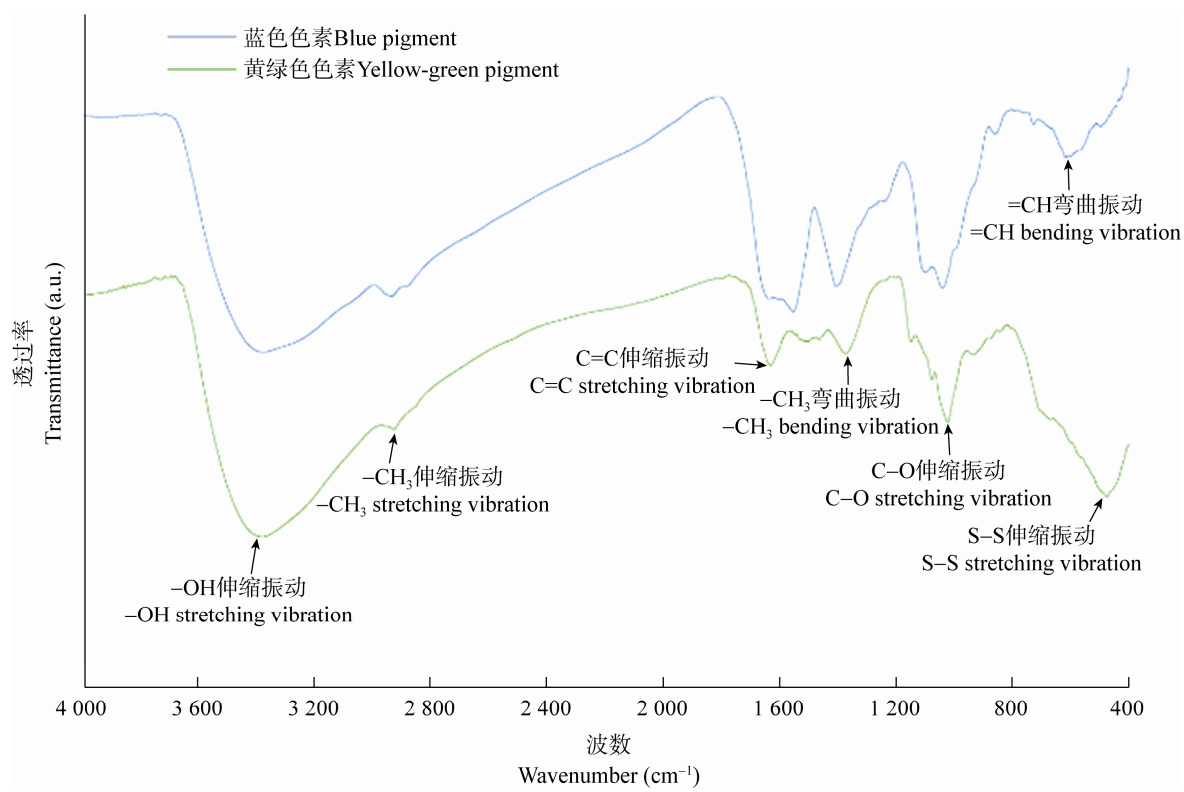


图 5 细菌色素的红外光谱分析
Figure 5 FT-IR spectral analysis of functional groups present in the bacterial pigments

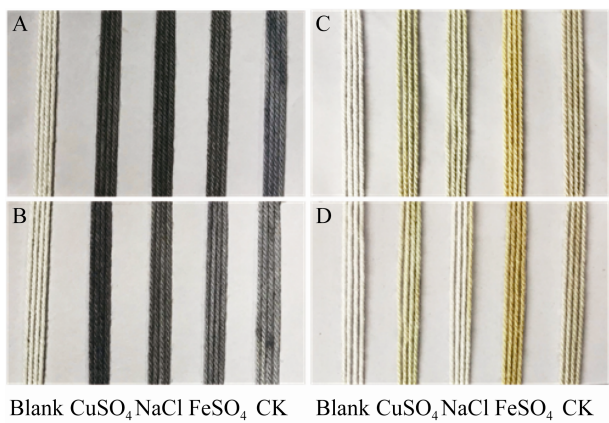


图 6 媒染剂和细菌色素对棉线的染色
Figure 6 Dyeing of cotton threads with mordants and the bacterial pigments
注：A、B：蓝色色素；C、D：黄绿色色素；A、C：洗涤前；B、D：洗涤后。
Note: A, B: Blue pigment; C, D: Yellow-green pigment; A, C: Before washed; B, D: After washed.

着色较深，并且洗涤后棉线的颜色有加深的现象(图 6C、D)。此外，结果还表明，当棉线不用媒染剂处理、只加两种色素进行染色后(CK, 图 6A-D)，棉线着色不但较浅而且经洗涤后容易脱色，表明此两种色素要想取得较好的染色效果，加入媒染剂至关重要。

3 讨论

自然界中的微生物包括细菌、真菌和藻类等在内都可以产生各种各样的色素^[1,5,11]。研究表明，色素在微生物细胞内不仅担负着重要的生理功能，对于微生物的生存至关重要^[21-22]，而且为人类提供了丰富的天然色素资源，可用于纺织、食品、医药等工业^[1-2,5-6]。微生物产生的色素分两类，一类色素与微生物细胞壁结合，另一类则可分泌到胞外的

表 1 洗涤前后棉线的色坐标

Table 1 The color coordinates of cotton threads before and after washed with water

菌株 Strains	色素 Pigments	媒染剂 Mordants	棉线洗涤前 Cotton threads before washed			棉线洗涤后 Cotton threads after washed			色差 Color difference ΔE
			L^*	a^*	b^*	L^*	a^*	b^*	
Q2N-42	Blue	CuSO ₄	22	-1	4	21	0	2	2.45
		NaCl	20	-2	3	32	-1	5	12.21
		FeSO ₄	32	-1	4	42	-1	3	10.05
		CK	42	-2	1	54	-1	5	12.69
X4C-5	Yellow-green	CuSO ₄	73	-2	26	80	-2	25	7.07
		NaCl	77	-3	22	83	0	12	12.04
		FeSO ₄	75	3	44	63	6	42	12.53
		CK	66	2	26	69	2	25	3.16

注: L^* : 亮度; a^* : 红绿值; b^* : 黄蓝值; ΔE : 色差.

Notes: L^* : Lightness; a^* : Red/green values; b^* : Blue/yellow values; ΔE : Color difference.

培养基中^[4], 后者又可分为脂溶性色素和水溶性色素两类^[12], 脂溶性色素往往具有较低的稳定性、易受潮、常具有异味, 限制了其在工业中的应用^[12]。本研究中所获得的两株放线菌 Q2N-42 和 X4C-5 都明显地产生胞外水溶性色素(图 1A-D), 具有更广泛的应用价值。

细菌色素根据其结构的亲和性可分为类胡萝卜素(黄色)、黄色素(橙黄色)、灵菌红素(红色)、藻青素(蓝色)、核黄素(黄色)、紫色杆菌素(紫色)等几大类^[4,11], 结构上多包含碳、氢、氧和氮元素, 其生物合成明显受到碳和氮的影响。我们分别对比了 4 种碳源(葡萄糖、蔗糖、甘油和淀粉)和 3 种氮源(硝酸钠、氯化铵、蛋白胨)对放线菌 Q2N-42 和 X4C-5 产生色素的影响, 结果显示: 甘油对产蓝色 Q2N-42 的色素产量影响较大; 而淀粉明显地促进 X4C-5 合成黄绿色色素; 氮源都以硝酸钠为最佳。陆玲等^[23]通过比较碳源和氮源对一株放线菌 *Streptomyces* sp.产生蓝色色素的影响, 结果发现碳源以蔗糖、氮源以硝酸钾最佳。全桂静等^[24]通过对比蔗糖、葡萄糖、甘油、淀粉和柠檬酸钠对一株产蓝色放线菌 Cya-5 的影响, 结果发现甘油对色素产量影响最大, 与本实验得出的结果较为相似。

放线菌所产生的色素分子, 其波谱范围覆盖了可见光区域^[25]。本研究中, Q2N-42 所产生的蓝色色素和 X4C-5 所产生的黄绿色色素经波长测

定, 其最大吸收波长分别位于可见光的 440 nm 和 480 nm 处。据报道, 由放线菌所产生的天然色素往往具有菌株特有的颜色, 但其稳定性各不相同^[25]。天蓝色放线菌(*S. coelicolor*)和紫红链霉菌(*S. violaceoruber*)都可以产生蓝色的放线紫红素(actinorhodin)或其结构类似的同系物^[18], 但这类物质往往随着 pH 的改变其颜色会发生一定的变化。据 Zhang 等^[26]报道, 天蓝色放线菌(*S. coelicolor*)产生的放线紫红素, 在 pH 9.0-12.0 时呈现蓝色, 当 pH 为 7.0 时其颜色转变为紫红色, 继而在 pH 3.0-5.0 时转变为红色。然而 Wright 等^[27]的研究结果表明, 当 pH 低于 8.5 时, *Streptomyces coelicolor* A3(2)产生的蓝色色素会由蓝色逐渐变为红色, 可作为 pH 的一种指示剂。然而本研究中 Q2N-42 所产生的蓝色色素在 pH 3.0-12.0 的范围内其颜色未发生明显的变化, 表明该色素在广泛的 pH 范围内皆表现出良好的稳定性。产黄绿色色素的放线菌 X4C-5 在 16S rRNA 基因序列上与普拉腾斯链霉菌(*Streptomyces pratensis*)有较高的相似性。据文献报道, 普拉腾斯链霉菌(*Streptomyces pratensis*)可分泌活性抗菌物质, 可作为生防制剂应用于植物病害的防治^[28-29], 而对于其是否能产生黄绿色色素未见报道。本研究中对 X4C-5 所产生的黄绿色色素进行了初步研究, 结果表明, 该色素在 pH 3.0-12.0 范围内颜色未发生变化, 色素在广泛的 pH 范围内都表现出稳定的特征。除此之外, 色

素抗氧化剂、还原剂和盐度等特性也是限制其工业应用的一些重要指标, 本研究中, Q2N-42 产生的蓝色色素和 X4C-5 所产生的黄绿色色素对双氧水、亚硫酸钠和氯化钠都具有良好的稳定性(图 4A-D), 具有广泛的潜在应用价值。牛世全等^[30]筛选到一株产蓝色色素的灰红链霉菌 *Streptomyces griseoruber* DA04417, 当在该蓝色色素中加入双氧水时, 色素的吸光值明显降低, 表明该色素对氧化剂不稳定; 张爱梅等^[31]研究绿色链霉菌(*Streptomyces viridis*)所产生的绿色色素稳定性时发现, 该色素对双氧水不稳定, 而亚硫酸钠对其色素有增色作用。本研究中, Q2N-42 和 X4C-5 所产生的蓝色色素和黄绿色色素在氧化剂、还原剂和中碱性 pH 作用下皆表现出稳定性, 暗示此两种色素与前人发现的色素可能具有不同的结构和性质。初步对两种色素的分子结构和化学键进行了红外光谱表征, 根据红外光谱特征区的吸收峰, 初步判断两种色素分子中皆含有-OH、-CH₃ 和 C=C 等功能性基团。前人研究表明, 由细菌合成的黄色、红色、蓝色等色素常具有苯环结构^[25], 本研究所获得的色素在红外光谱的 1 632 cm⁻¹ 处为 C=C 伸缩振动, 为苯环的特征峰。要想明确该两种色素的结构, 尚需要结合质谱和核磁共振等进一步分析。

Chakraborty 等^[9]从海洋红树林分离到一株放线菌, 可产生粉色色素, 当对棉布、毛线染色时, 经 3 次洗涤不脱色, 着色稳定。然而本研究中所获得的蓝色和黄绿色色素对棉线染色时洗涤易脱色, 但加入合适的媒染剂时色素着色较深, 洗涤不易褪色。以上结果说明, 这两种色素可用于媒染工业, 至于能否应用于食品工业, 尚需要进一步明确其化学结构并进行安全性试验。

4 结论

从北戴河海洋沉积物中分离出一株产蓝色色素放线菌 Q2N-42 和一株产黄绿色色素放线菌 X4C-5, 经 16S rRNA 基因序列分析, 分别与天蓝色放线菌(*Streptomyces coelicolor*)或紫红链霉菌

(*Streptomyces violaceoruber*) 和 普拉滕斯链霉菌(*Streptomyces pratensis*)有较高的相似性; 两种放线菌的色素产量明显受碳源和氮源的影响, 它们所产生的色素对氧化剂、还原剂、盐度和中碱性 pH 都表现出良好的稳定性; 两种色素的化学结构均包含了-OH、-CH₃ 和 C=C 活性基团; 蓝色色素和黄绿色色素对毛线的着色效果也明显受媒染剂的影响。

REFERENCES

- [1] Usman HM, Abdulkadir N, Gani M, et al. Bacterial pigments and its significance[J]. MOJ Bioequivalence & Bioavailability, 2017, 4(3): 285-288
- [2] Venil CK, Zakaria ZA, Ahmad WA. Bacterial pigments and their applications[J]. Process Biochemistry, 2013, 48(7): 1065-1079
- [3] Liao ZL, Xu LH, Cai SJ, et al. Study on extraction and stability of pigment from a new marine actinobacteria[J]. Food Science and Technology, 2018(10): 170-172,177 (in Chinese)
廖振林, 徐丽华, 蔡淑娇, 等. 一株新的海洋放线菌黄色素的提取与稳定性研究[J]. 食品科技, 2008(10): 170-172,177
- [4] Venil CK, Aruldass CA, Dufossé L, et al. Current perspective on bacterial pigments: emerging sustainable compounds with coloring and biological properties for the industry-an incisive evaluation[J]. RSC Advances, 2014, 4(74): 39523-39529
- [5] Tuli HS, Chaudhary P, Beniwal V, et al. Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives[J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(8): 4669-4678
- [6] Nigam PS, Luke JS. Food additives: production of microbial pigments and their antioxidant properties[J]. Current Opinion in Food Science, 2016, 7: 93-100
- [7] Zhou DY, Wang GH, Dai SK, et al. Characterization of purple pigment produced by sponge associated actinomycete strain transformed by ribosome engineering[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2013, 52(12): 2900-2906 (in Chinese)
周丹燕, 王广华, 戴世鲲, 等. 核糖体工程改造海绵共附生放线菌紫色素的特性[J]. 湖北农业科学, 2013, 52(12): 2900-2906
- [8] Dufossé L. Microbial pigments from bacteria, yeasts, fungi, and microalgae for the food and feed industries[A]// Grumezescu AM, Holban AM. Natural and Artificial Flavoring Agents and Food Dyes[M]. New York: Academic Press, 2018: 113-132
- [9] Chakraborty I, Redkar P, Munjal M, et al. Isolation and characterization of pigment producing marine actinobacteria from mangrove soil and applications of bio-pigments[J]. Der

- Pharmacia Lettre, 2015, 7(4): 93-100
- [10] Alihosseini F, Ju KS, Lango J, et al. Antibacterial colorants: characterization of prodiginines and their applications on textile materials[J]. Biotechnology Progress, 2008, 24(3): 742-747
- [11] Malik M, Tokas J, Goyal S. Microbial pigments: a review[J]. International Journal of Microbial Resource Technology, 2012, 1(4): 361-365
- [12] Joshi VK, Attri D, Bala A, et al. Microbial pigments[J]. Indian Journal of Biotechnology, 2003, 2(3): 362-369
- [13] Wei Y, Li ZZ, Liang YP, et al. The related research on extraction of blue pigment from a strain of actinomycetes[J]. China Food Safety Magazine, 2017(6): 154-156 (in Chinese)
韦瑶, 李增政, 梁亚平, 等. 一株放线菌蓝色素的提取及相关研究[J]. 食品安全导刊, 2017(6): 154-156
- [14] Cui HL, Lu L, Chen YN, et al. Cell chemical characteristics and 16S rDNA sequence analysis of a blue-pigment-producing strain[J]. Microbiology China, 2001, 28(6): 25-29 (in Chinese)
崔恒林, 陆玲, 陈一楠, 等. 产蓝色素放线菌细胞化学组分及 16S rDNA 序列分析[J]. 微生物学通报, 2001, 28(6): 25-29
- [15] Wei SP, Cui HP, Jiang ZL, et al. Biomineralization processes of calcite induced by bacteria isolated from marine sediments[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2015, 46(2): 455-464
- [16] Lu CL, Wang J, Wang LG, et al. Identification of an actinomycetes producing natural blue pigment and optimization of fermentation conditions[J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2014, 21(6): 550-553 (in Chinese)
路春玲, 王杰, 王立刚, 等. 产蓝色素放线菌的分离鉴定及发酵工艺条件优化[J]. 药物生物技术, 2014, 21(6): 550-553
- [17] Kanelli M, Mandic M, Kalakona M, et al. Microbial production of violacein and process optimization for dyeing polyamide fabrics with acquired antimicrobial properties[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1495
- [18] Bystrykh LV, Fernández-Moreno MA, Herrema JK, et al. Production of actinorhodin-related “blue pigments” by *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(8): 2238-2244
- [19] Barghouthi S, Ayyad IF, Ayesh M, et al. Isolation, identification, and characterization of the novel antibacterial agent methoxyphenyl-oxime from *Streptomyces pratensis* QUBC97 isolate[J]. Journal of Antibiotics Research, 2017, 1(1): 105
- [20] Zhang M, Guo SY, Li J, et al. Studies on physi-chemical characteristics of persicinus pigment from a strain of marine actinomycetes H-109[J]. Journal of Biology, 2012, 29(2): 31-33,54 (in Chinese)
张敏, 郭素英, 李娟, 等. 产色素海洋放线菌 H-109 理化性质研究[J]. 生物学杂志, 2012, 29(2): 31-33,54
- [21] Rajagopal L, Sundari CS, Balasubramanian D, et al. The bacterial pigment xanthomonadin offers protection against photodamage[J]. FEBS Letters, 1997, 415(2): 125-128
- [22] Soliev AB, Hosokawa K, Enomoto K. Bioactive pigments from marine bacteria: applications and physiological roles[J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2011, 2011: 670349
- [23] Lu L, Sun YT, Tang Y, et al. Production of natural blue pigment by *Streptomyces* sp.[J]. Microbiology China, 2001, 28(4): 50-54 (in Chinese)
陆玲, 孙延涛, 唐勇, 等. 一种放线菌发酵产天然蓝色素的研究[J]. 微生物学通报, 2001, 28(4): 50-54
- [24] Quan GJ, Xing JS. Screening of an actinomycetes producing cranine and fermentational conditions[J]. Journal of Shenyang University of Chemical Technology, 2012, 26(3): 215-218,274 (in Chinese)
全桂静, 邢继双. 一株产蓝色素放线菌的筛选及发酵研究[J]. 沈阳化工大学学报, 2012, 26(3): 215-218,274
- [25] Charkoudian LK, Fitzgerald JT, Khosla C, et al. In living color: bacterial pigments as an untapped resource in the classroom and beyond[J]. PLoS Biology, 2010, 8(10): e1000510
- [26] Zhang HC, Zhan JX, Su KM, et al. A kind of potential food additive produced by *Streptomyces coelicolor*: characteristics of blue pigment and identification of a novel compound, λ -actinorhodin[J]. Food Chemistry, 2006, 95(2): 186-192
- [27] Wright LF, Hopwood DA. Actinorhodin is a chromosomally-determined antibiotic in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Journal of General Microbiology, 1976, 96(2): 289-297
- [28] Lian QG, Zhang J, Gan L, et al. The biocontrol efficacy of *Streptomyces pratensis* LMM15 on *Botrytis cinerea* in tomato[J]. BioMed Research International, 2017, 2017: 9486794
- [29] Akhter N, Liu YQ, Auckloo BN, et al. Stress-driven discovery of new angucycline-type antibiotics from a marine *Streptomyces pratensis* NA-ZhouS1[J]. Marine Drugs, 2018, 16(9): 331
- [30] Niu SQ, Han CH, Hu JL, et al. Preliminary study on the isolation, identification and pigment stability of a blue pigment producing actinomycete strain[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(1): 134-138 (in Chinese)
牛世全, 韩彩虹, 胡蛟龙, 等. 一株产蓝色素放线菌的分离、鉴定及其色素稳定性初步研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(1): 134-138
- [31] Zhang AM, Niu SQ, Da WY, et al. Identification of an actinomycetes producing green pigment and detection of pigment stability[J]. Journal of Northwest Normal University (Natural Science), 2010, 46(3): 89-93 (in Chinese)
张爱梅, 牛世全, 达文燕, 等. 一株产绿色素放线菌的初步鉴定及其色素稳定性的检测[J]. 西北师范大学学报: 自然科学版, 2010, 46(3): 89-93