

研究论文

一株分离自北极海水红球菌 (*Rhodococcus* sp.) B7740 的生长条件及其粗类胡萝卜素提取方法的优化

张加蓉¹ 杨季芳^{2,3} 陈福生¹

(¹ 华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070; ² 宁波市微生物与环境工程重点实验室, 浙江 宁波 315100;

³ 浙江万里学院生物与环境学院, 浙江 宁波 315100)

摘要 红球菌 (*Rhodococcus* sp.) B7740 分离自北冰洋海水样品, 前期实验表明其能产生大量黄色素, 但是该菌生物量很低。本实验通过碳源、氮源、培养温度、发酵液起始 pH 值、菌种接种量等单因素和正交实验优化了该菌株的培养条件, 在此基础上, 通过对提取剂种类及 pH、提取时间、料液比等的研究, 优化了色素的提取条件。实验结果表明, 1 L 陈海水中, 添加 5 g 酵母粉, 5 g 葡萄糖, 3 g 乳糖, 7 g 牛肉膏; 起始 pH 为 7, 培养温度为 25℃, 菌种接种量 1.0%, 160 r/min 摇床培养 7 d 时, 生物量从 6.1 mg/mL 上升到 23.08 mg/mL, 提高了 278.4%。以上述培养条件下得到的干菌体为材料, 采用 pH 为 7 的无水乙醇, 当料液比为 1:30, 浸提温度为 75℃, 浸提 1 h 重复提取 2 次时, 色素含量为 1 160.625 μg/g 干菌体。对色素的分析表明, 该色素为类胡萝卜素, 实验结果为进一步研究极地微生物红球菌 (*Rhodococcus* sp.) B7740 产类胡萝卜素的提取工艺提供了基础。

关键词 红球菌 类胡萝卜素 提取方法

doi:10.3724/SP.J.1084.2012.00168

0 引言

红球菌属是 1891 年由 Zoof 建立的, 该属曾被取消, 直到 1977 年, Goodfellow 根据自己和许多学者的研究, 提出恢复红球菌属^[1]。红球菌属从建立至今, 分类地位一直不确定, 目前红球菌被归为放线菌门 (*Actinobacteria*)、放线菌纲 (*Actinobacteria*)、放线菌亚纲 (*Actinobacteridae*)、放线菌目 (*Actinomycetales*)、棒杆菌亚目 (*Corynebacterineae*)、诺卡氏菌科 (*Nocardiaceae*)、红球菌属 (*Rhodococcus*)^[2]。

红球菌分布广泛, 功能多样, 能分解石油^[3]、残留农药和苯及其衍生物, 还可产生活性物质如胍水

合酶、脂肪酶^[4]、胆固醇酶等。另外, 据 Teniola 等^[5]的报道, 利用红球菌细胞提取物还能有效的降解强烈的致癌物质黄曲霉毒素 B₁。红球菌产色素呈乳酪色、淡黄色、黄色、橙色或红色^[1]。国内外关于红球菌产类胡萝卜素的报道并不多见, 郑晓冬等^[6]对分离自土壤的一株红球菌产类胡萝卜素的发酵条件进行了研究, 得出了以大米水解糖为原料生产类胡萝卜素的最佳条件; 日本学者 TAKAICHI 等^[7]采用反相高效液相色谱法分离出了 6 种红球菌产类胡萝卜素及其所形成的酯类; Tao 等^[8]研究了红球菌形成芳烃类胡萝卜素的代谢过程。

类胡萝卜素是一类由 8 个异戊二烯基本单位连续缩合^[9]而成的烃类化合物^[10], 它包括胡萝卜素

[收稿日期] 2011 年 12 月收到来稿, 2012 年 3 月收到修改稿

[基金项目] 国家科技部国际合作重点项目 (2007DFA21300)、中德政府海洋双边合作项目 (BMBFCHN00/019) 和宁波市科技局项目 (2004C100056, 2007C11002) 资助

[作者简介] 张加蓉, 女, 1987 年生。微生物学硕士研究生, E-mail: zhangjiarong0406@yahoo.com.cn

[联系作者] 杨季芳, E-mail: jfkwq@163.com

(carotene)类及它们的含氧衍生物叶黄素(xanthophylls)类^[11]。类胡萝卜素在营养、光合作用和抗氧化方面都具有重要的生理功能^[10]。 β -胡萝卜素可作为维生素A源在人体内转化成维生素A,能有效预防夜盲症。叶黄素是人类眼睛中存在的两种色素之一,对老年性黄斑区病变有显著的预防和治疗效果。

类胡萝卜素广泛存在于自然界中,目前已发现600多种已知结构的类胡萝卜素^[10-11]。它们来自于植物、藻类、真菌、细菌^[10,12]及一些海洋鱼类和甲壳类动物^[13]。动、植物生长都受到季节和地域的严格限制,生长周期长。微生物则不受时间和空间的限制且培养周期短,微生物发酵将是天然类胡萝卜素工业化生产的必然趋势。产类胡萝卜素微生物主要包括丝状真菌、酵母菌和一些种类的细菌^[14]。

从北冰洋海水样品中筛选到一株类胡萝卜素高产菌株——红球菌(*Rhodococcus* sp.) B7740,以此为研究对象对其培养基成分和发酵条件进行了优化,对其产色素的提取方法进行了初步探讨,为其后续研究提供前期理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

菌株 *Rhodococcus* sp. B7740(以下简称 B7740)系本实验室于2008年7—9月中国第3次北极科学考察期间从北冰洋 B77(146°49.28'W, 76°58.08'N)站点用 Seabird 911 PluS CTD 系统采集的25 m 深的表层水样中分离筛选获得,保藏于宁波市微生物与环境工程重点实验室。

1.2 培养基

液体 Zobell 2216E 培养基参考李江^[15]等的配方,固体培养基加入2%琼脂。细菌基础碳源利用培养基及细菌基础氮源利用培养基参考曾胤新和陈波^[16]的配方。

1.3 种子液制备

将 B7740 菌株接种于新鲜的 Zobell2216E 固体斜面培养基,20℃ 培养 72 h 后挑一环接种于液体 Zobell2216E 培养基中,20℃,160 r/min,活化 3 d,得种子液。

1.4 实验方法

1.4.1 碳源、氮源对 B7740 菌株生长的影响

向细菌基础碳源利用培养基中分别加入 0.5% 的葡萄糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、可溶性淀粉;向细菌基础氮源利用培养基中分别加入 0.5% 的酵母粉、蛋白胨、尿素、硝酸钾、牛肉膏;不加任何碳源或氮源物质的培养基设为对照组,每个处理 3 个重复,菌种接种量为 1%,20℃,160 r/min,摇床培养 5 d 后测定 OD_{600 nm} 值。根据实验结果选取对细菌生长有较大影响的碳源与氮源物质做 L₉(3⁴) 正交实验设计,得出最佳培养方案。

1.4.2 发酵条件对 B7740 菌株生长的影响

取活化好的菌液 100 μ L 涂布于 2216E 固体平板,分别放于 4、8、15、20、25、30 和 37℃ 培养,每 24 h 观察并记录实验结果。72 h 内出现单菌落记为生长良好,144 h 内无单菌落出现记为不生长^[17]。选择 B7740 生长良好的温度进行液体发酵培养,每 24 h 取样一次,测 OD_{600 nm} 值做 B7740 生长曲线,得出 B7740 发酵培养的最佳温度。保持其他条件不变,分别探讨接种量(0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、4.0%),起始 pH 值(4、5、6、7、8、9、10)等因素对 B7740 菌株生长的影响,每个处理 3 个重复,160 r/min 摇床培养 5 d 后测定 OD_{600 nm} 值。

1.4.3 B7740 菌株产色素的提取步骤

B7740 培养液于 4℃ 下,5 000 r/min 离心 20 min,收集菌体,用蒸馏水洗两次除去多余的培养基,冷冻干燥 48 h 后得干菌体,加入无水乙醇浸提,将乙醇提取液旋转蒸发,加入少量蒸馏水使乙醇完全蒸发,得色素浓缩液,冷冻干燥 48 h 后得色素粗品^[18]。

1.4.4 色素提取条件优化

参考唐琳^[18]的方法略有改动,称取 12 等份冷冻干燥的菌体,分别加入等量的丙酮、乙醚、乙酸乙酯、石油醚、环己烷、正丁醇、无水乙醇、95% 乙醇、90% 乙醇、80% 乙醇、蒸馏水和甲醇,震荡混匀,室温静置 4 h,各溶剂的色素提取液做全波长扫描得出色素的最大吸收波长($\lambda_{\max}$),并确定色素最佳提取剂。

采用最佳提取剂,保持其他条件不变,分别探讨料液比(1:10、1:20、1:30、1:40、1:50、1:60),提取温度(40、50、55、60、65、70、75℃),提取剂 pH 值(4、5、6、7、8、9、10)和提取时间(0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 h)等因素对色素提取的影响,每种处理 3 个重复,并测定色素在最大吸收波长($\lambda_{\max}$)下的吸光度(OD_{max})值。选择提取温度,提取时间,提取剂 pH 和料液比

这 4 个因素,做 $L_9(3^4)$ 正交实验,得出色素提取的最佳条件。

1.4.5 色素提取级数

按照以上优化条件提取色素,直到 B7740 菌体基本无色,参照黄德见^[19]的计算公式及算法,确定提取级数。公式如下:

提取率(%) = $(V \times A) / \sum (V \times A) \times 100\%$
式中 A 为色素在最大吸收波长下的吸光度, V (mL) 为提取剂体积。

1.4.6 色素鉴定

与三氯化锑反应^[18]:取色素石油醚溶液 2 mL 于试管中,加入 3 mL 氯仿,使色素彻底溶解,加入 2 mL 氯仿-三氯化锑溶液,混匀,静置 10 min 观察其颜色变化。与浓硫酸反应:取 2 mL 色素乙醚溶液于试管中,加入 0.5 mL 浓硫酸,静置 10 min 观察颜色变化。

薄层层析:将色素样品与 β -胡萝卜素标品同时点样于薄层层析硅胶板 H(青岛海洋 0.25 mm $\times$ 100 mm $\times$ 100 mm),在含有展层剂石油醚:丙酮(v/v) = 50:1 的层析缸中展开,纪录各样品点的分配系数。

高效液相色谱:将经薄层层析纯化后的色素样品和 β -胡萝卜素标品进行 HPLC 分析,纪录各色素样品的保留时间并与 β -胡萝卜素进行比较。HPLC 条件参考 Marinova^[20]的方法有改动:流动相:0—10 min:乙腈:甲醇:乙酸乙酯 = 90:10:0,10—20 min 流动相逐渐变为乙腈:甲醇:乙酸乙酯 = 60:20:20,保持 10 min,30—35 min 流动相逐渐转变为乙腈:甲醇:乙酸乙酯 = 90:10:0 保持 10 min,平衡色谱柱。流动相试剂均为色谱纯,乙腈中添加 0.1% 的 BHT 和 0.05% 的三乙胺。Waters e2695 HPLC, Waters 2998 DAD 检测器,色谱柱 Symmetry C_{18} (5 μ m $\times$ 4.6 mm $\times$ 150 mm),进样量 20 μ L,柱温 30 $^{\circ}$ C,流速 1 mL/min。

1.4.7 色素含量计算

类胡萝卜素含量计算按照王岁楼^[21]报道的方法进行,即

类胡萝卜素含量(μ g/g) = $A \times D \times V / 0.16 \times W$
式中, A 为色素在最大吸收波长下的吸光度, D 为稀释倍数, V 为溶剂体积(mL), W 为细胞质量(g)。

1.5 数据统计与分析

采用统计软件 SPSS 及 Excel 对实验数据进行

统计分析。

2 结果与分析

2.1 培养基组成的优化

B7740 生长缓慢,生物量很低,为了提高其生物量,本实验以细菌基础碳、氮源利用培养基为基础,在 20 $^{\circ}$ C,接种量 1%,160 r/min 摇床培养条件下,对其碳源、氮源利用进行了研究。单因素实验表明,最佳碳源为乳糖和葡萄糖,氮源为酵母粉和牛肉膏,在此基础上进行了碳源、氮源 $L_9(3^4)$ 正交设计,实验结果见表 1。

表 1 碳源、氮源 $L_9(3^4)$ 正交实验设计结果与分析
Table 1. Carbon and nitrogen sources $L_9(3^4)$ orthogonal experimental result and analysis

实验号	酵母粉 (A)/%	牛肉膏 (B)/%	乳糖 (C)/%	葡萄糖 (D)/%	OD _{600 nm} $\pm$ SD
1	0.3	0.3	0.3	0.3	6.456 $\pm$ 0.346
2	0.3	0.5	0.5	0.5	6.626 $\pm$ 0.199
3	0.3	0.7	0.7	0.7	6.506 $\pm$ 0.204
4	0.5	0.3	0.5	0.3	6.808 $\pm$ 0.271
5	0.5	0.5	0.7	0.3	7.051 $\pm$ 0.569
6	0.5	0.7	0.3	0.5	7.080 $\pm$ 0.369
7	0.7	0.3	0.7	0.5	6.838 $\pm$ 0.248
8	0.7	0.5	0.3	0.7	5.848 $\pm$ 0.354
9	0.7	0.7	0.5	0.3	6.781 $\pm$ 0.310
K1	12.962	20.102	19.383	20.288	
K2	20.939	19.525	20.215	20.543	
K3	19.466	20.366	20.395	19.162	
k1	4.321	6.701	6.461	6.763	
k2	6.980	6.508	6.738	6.848	
k3	6.489	6.789	6.798	6.387	
R	2.659	0.280	0.337	0.460	

对表 1 进行极差分析可知理论最优组合为 $A_2D_2C_3B_3$ 即酵母粉 0.5%,葡萄糖 0.5%,乳糖 0.7% 和牛肉膏 0.7%,正交实验中不包含该组合。验证实验,比较理论最佳组合 $A_2D_2C_3B_3$ 和正交试验中实际较优组合 $A_2D_2C_1B_3$ 的培养基对 B7740 菌株生长的影响,结果表明 B7740 菌株在两种组合培养基中均生长良好(结果未列出),为了降低培养成本节约能源,选择组合 $A_2D_2C_1B_3$ 即 0.5% 酵母浸出粉、0.5% 葡萄糖、0.3% 乳糖和 0.7% 牛肉膏为 B7740 菌株培养基最佳配比。

2.2 发酵条件优化

在优化培养基成分的基础上,本实验从培养温

度、起始 pH 值、接种量等方面探讨了 B7740 的发酵条件,以期用最经济的方式得到最大量的 B7740 菌体。

前期实验结果表明,B7740 菌株在 15—30℃ 下生长良好,37℃ 生长受到明显抑制,因此本实验选择 15、20、25℃ 对 B7740 菌株进行液体摇瓶发酵实验,每隔 24 h 测 OD_{600 nm} 值,并绘制生长曲线,结果如图 1 所示。

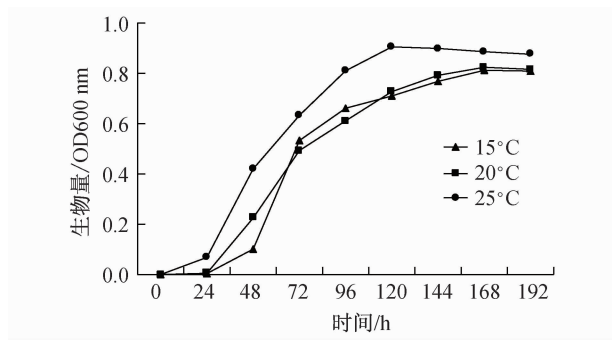


图1 温度对 B7740 生长的影响

Fig. 1. Effect of temperature on the Growth of B7740

由图 1 可以看出,B7740 菌株在 15℃ 和 20℃ 下生物量相当,均低于 25℃ 下的生物量,因此,选择 25℃ 为其最佳培养温度。

培养基起始 pH 值对 B7740 生长的影响如图 2 所示,结果表明,当培养基起始 pH 为 6—10 时,

B7740 菌体生物量较高,且培养基自然 pH 值与 7 最接近,从经济角度考虑,本实验选择 pH7 进行后续试验。

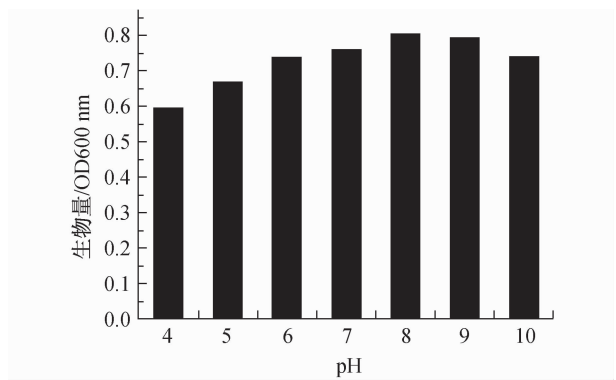


图2 起始 pH 对 B7740 生长的影响

Fig. 2. Effect of initial pH on the growth of *Rhodococcus* sp. B7740

接种量为 0.5%—4.0% 时,B7740 生长情况如表 2 所示,对实验数据进行方差分析,结果表明,各处理对 B7740 生长的影响无显著差异。其原因可能是,接种量较高时需要更多的养分和充氧量,而三角瓶有限的空间和一定的培养液无法提供足够的养料,因此接种量较高时生物量也不会有明显的提高。要解决这个问题有赖于发酵罐的使用,本实验以 1.0% 为 B7740 发酵培养的接种量。

表 2 接种量对 B7740 菌株生长的影响
Table 2. Effect of inoculation rate on the growth of B7740

接种量/%	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0
OD _{600 nm} ± SD	0.969 ± 0.024	1.034 ± 0.065	1.071 ± 0.015	1.105 ± 0.045	1.074 ± 0.038	1.079 ± 0.007	1.058 ± 0.008

以上系列实验确定了 B7740 菌株的最佳培养基成分为:陈海水 1 L,酵母粉 5 g,葡萄糖 5 g,乳糖 3 g,牛肉膏 7 g;最佳培养条件为 25℃,起始 pH 为 7.0,接种量 1.0%。在此条件下,红球菌生物量(湿菌体)从 6.1 mg/mL 提高到 23.08 mg/mL。

2.3 色素提取条件优化

2.3.1 提取剂的选择

类胡萝卜素是一类脂溶性色素,难溶于水,一般采用有机试剂浸提,本实验选择 12 种有机试剂对 B7740 产色素进行提取,并对各溶剂的色素提取液进行全波长扫描,记录最大吸收波长和吸光值,得到

色素的最佳提取剂。

结果表明,室温静置浸提 B7740 菌体 4 h 后,乙酸乙酯,正丁醇和无水乙醇对色素的提取效果较好,最大吸收波长分别位于 463、464 和 460 nm,最大吸光度分别为 0.739、0.617、0.637。从安全方面考虑,本实验选择无水乙醇为色素最佳提取剂。将无水乙醇色素提取物全波长扫描,结果如图 3,除了 460 nm 处有最大吸收峰外,在 437 nm 和 489 nm 处还有两个肩峰,这符合类胡萝卜素类物质可见光吸收光谱的规律。因此后续实验用 OD_{460 nm} 值来评判色素提取效果。

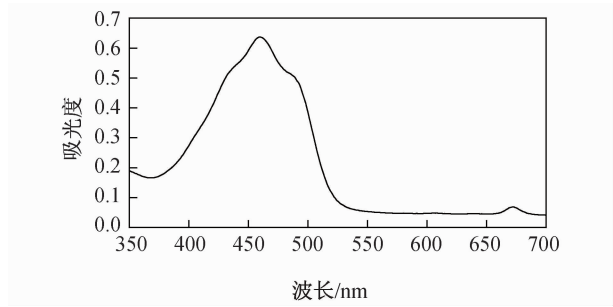


图3 色素乙醇提取液全波长扫描图谱
Fig.3. Full-wavelength scan pattern of pigment extracted by ethanol

表 3 料液比对色素提取的影响
Table 3. Effect of solid-liquid ratio on the extraction of pigments

处理	A	B	C	D	E	F
料液比	1: 10	1: 20	1: 30	1: 40	1: 50	1: 60
溶剂 (mL)	1	2	3	4	5	6
A _{460 nm}	9. 030	5. 066	3. 271	2. 407	2. 097	1. 731
V × A _{460 nm} ± SD	9. 03 ± 0. 717	10. 133 ± 0. 318	9. 812 ± 0. 626	9. 627 ± 0. 358	10. 483 ± 0. 132	10. 386 ± 0. 356

不同温度下,色素的提取效果不同,对实验结果(表4)进行方差分析可知,处理C、G、E、B、F与处理D、A之间有极显著差异($P < 0. 01$);而处理C、G、

2.3.2 色素提取各条件参数的优化

找出最佳提取剂之后,通过单因素实验探讨了料液比、提取剂 pH、提取温度和提取时间对色素提取效率的影响,并在单因素实验的基础上进行了正交实验,得出色素提取的最佳条件,试验结果如下。

料液比对色素提取的影响如表3所示,分析结果表明,处理E、F、B、C、D与处理A相比有显著差异($P < 0. 05$),即料液比的高低对色素提取效率有显著影响。为了节约试剂降低成本,选择料液比1: 30、1: 40、1: 50为正交实验的3个水平。

E、B、F之间无显著差异。说明温度差异会对色素提取效率带来极显著影响,本实验选择55、65、75℃进行下一步正交实验。

表 4 温度对色素提取的影响
Table 4. Effect of temperature on pigment extraction

处理	A	B	C	D	E	F	G
温度	40℃	50℃	55℃	60℃	65℃	70℃	75℃
A _{460 nm} ± SD	0. 584 ± 0. 178	1. 313 ± 0. 055	1. 616 ± 0. 415	1. 018 ± 0. 197	1. 449 ± 0. 160	1. 308 ± 0. 183	1. 609 ± 0. 171

提取剂 pH 对色素提取的影响如表5所示,处理F、C、E、D与处理A、B、G、H之间有极显著差异($P < 0. 01$)。即无水乙醇 pH 为5—8时,色素的提取效率极显著高于其他 pH。而无水乙醇本身的 pH 值与5最接近,因此,本实验选择 pH 值5、6、7进行下一步正交实验。

表 5 不同 pH 对色素提取的影响
Table 5. Effect of different pH value of solvent on the pigment extraction

处理	PH 值	A _{460 nm} ± SD	处理	PH 值	A _{460 nm} ± SD
A	3	2. 118 ± 0. 057	E	7	2. 548 ± 0. 101
B	4	2. 294 ± 0. 035	F	8	2. 640 ± 0. 105
C	5	2. 561 ± 0. 079	G	9	2. 192 ± 0. 112
D	6	2. 516 ± 0. 123	H	10	2. 128 ± 0. 115

提取时间对色素提取的影响极大,对实验结果(表6)进行方差分析表明,处理A与处理B、C、D、E之间有极显著差异($P < 0. 01$),即当色素提取1、2、

3、4 h时,提取效率极显著高于提取0.5 h时。为节约时间,降低成本,选择处理A、B、C为正交实验的3个水平。

2.3.3 色素提取的 $L_9(3^4)$ 正交试验

单因素试验是在控制其他条件相同的情况下,考察单一因素对实验产生的影响,并不能全面反应色素提取效果,只能为多因素试验提供参考。根据单因素实验结果,选取提取温度(A)、料液比(B)、提取剂 pH(C)和提取时间(D)这4个因素做 $L_9(3^4)$ 的正交实验。实验设计及结果与分析如表7所示。

对正交试验结果(表7)极差分析可知,色素提取效率影响因素的主次顺序为 $C > A > D > B$,即提取剂 pH 为主要因素,其次是提取温度和提取时间,料液比为不重要因素,因此,色素提取理论最优组合为 $C_3A_3D_3B_3$ 。对实验结果的方差分析表明,处理3、7与处理1、2、4、5、6、8、9之间差异极显著($P <$

表 6 提取时间对色素提取的影响
Table 6. Effect of extraction time on extraction of pigment

处理	A	B	C	D	E
时间/h	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0
A _{460 nm} ± SD	1.775 ± 0.190	2.223 ± 0.218	2.410 ± 0.223	2.561 ± 0.253	2.615 ± 0.242

表 7 提取条件 L₉ (3⁴) 正交试验设计结果与分析
Table 7. Extraction conditions L₉ (3⁴) orthogonal experimental results and analysis

实验号	温度(A)/℃	料液比(B)	提取剂 pH(C)	时间(D)/ h	色素产量/(μg · g ⁻¹)
1	55	1:30	5	0.5	424.063
2	55	1:40	6	1.0	501.667
3	55	1:50	7	2.0	614.583
4	65	1:30	6	2.0	525.000
5	65	1:40	7	0.5	497.500
6	65	1:50	5	1.0	413.542
7	75	1:30	7	1.0	600.625
8	75	1:40	5	2.0	537.292
9	75	1:50	6	0.5	529.688
K1	1 540.313	1 549.688	1 374.897	1 451.251	
K2	1 436.042	1 536.459	1 556.355	1 515.834	
K3	1 667.605	1 557.813	1 712.708	1 676.875	
k1	513.438	516.563	458.299	483.750	
k2	478.681	512.153	518.785	505.278	
k3	555.868	519.271	570.903	558.958	
R	77.187	7.118	112.604	75.208	

0.01),处理 3、7 之间无显著差异,即当提取条件为处理 3 或 7 时,色素的提取效率极显著高于其他提取条件。因此,处理 3(A₁B₃C₃D₃)、7(A₃B₁C₃D₂)与理论最优组合 C₃A₃D₃B₃ 一起做验证试验。结果表明,在相同条件下,处理 7 色素得率最高,可达 1 160.625 μg/g(干菌体),理论较优条件和处理 3 的色素得率分别为 1 006.25 μg/g 和 903.125 μg/g(根据 1.4.7 中的计算方法)。可知,色素提取的最

佳条件为: pH 为 7 的无水乙醇按 1:30 的液料比在 75℃下提取时间 1 h。

2.3.4 色素提取级数

两次提取后色素提取率达到 85% 以上(参考 1.4.5 中提取率计算方法),第三次提取时色素提取率只有 12.11%(表 8),为了节能省时,本实验对色素进行 2 次提取。

表 8 色素提取次数
Table 8. Extractin time of Pigment

	吸光度(OD _{460 nm})					平均值	提取率/%
	重复一	重复二	重复三	重复四	重复五		
1 次提取	2.184	2.223	2.154	2.490	2.040	2.218	57.91
2 次提取	1.220	1.050	0.980	1.432	1.060	1.148	29.97
3 次提取	0.450	0.531	0.470	0.502	0.368	0.464	12.11

2.4 色素鉴定结果

色素乙醚溶液与浓硫酸反应,两相交界处有蓝绿色,震荡混匀,溶液呈暗蓝色;色素石油醚溶液与三氯化锑反应,呈蓝色。以上两项实验都是多烯烃类胡萝卜素的特征反应^[11]。色素的全波长扫描图

谱(图 3)也具有类胡萝卜素的特征。以β-胡萝卜素为标品,采用薄层层析(TLC)和高效液相色谱(HPLC)分析了 B7740 菌株产色素,该色素中分配系数和保留时间均有和β-胡萝卜素相同的色素组分。薄层层析图谱中 B7740 色素组分 A₄ 和β-胡萝

卜素标准品的分配系数分别是 0. 811 和 0. 808 (图 4),组分 A₄ 高效液相色谱图中主峰保留时间为 28. 631 2 min和β-胡萝卜素标准品的保留时间一致(图 5 和图 6)。试验结果再次确认 B7740 菌株产色素中确实含有β-胡萝卜素。

3 讨论

极地微生物由于它们的特殊性、原始性和多样性,引起了世界各国科研工作者的广泛关注对此展开积极的研究,并且已取得一定成果。中国科研工作者也从大量极地微生物中检测到了产蛋白酶^[22]、淀粉酶^[23]、脂肪酶^[23]、海藻糖合成酶^[24]等不同酶类的

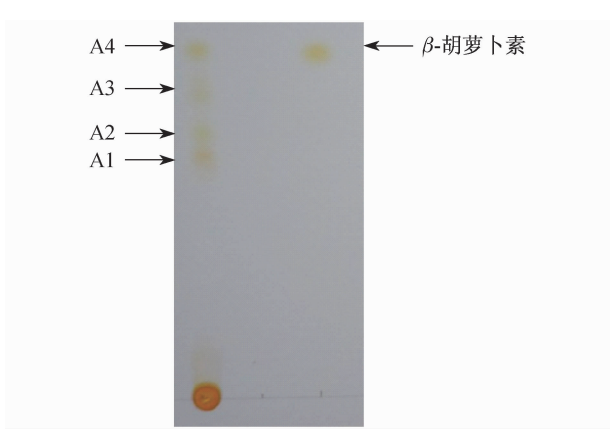


图 4 B7740 色素薄层层析图谱
Fig. 4. Thin-layer chromatogram of the pigment produced by B7740

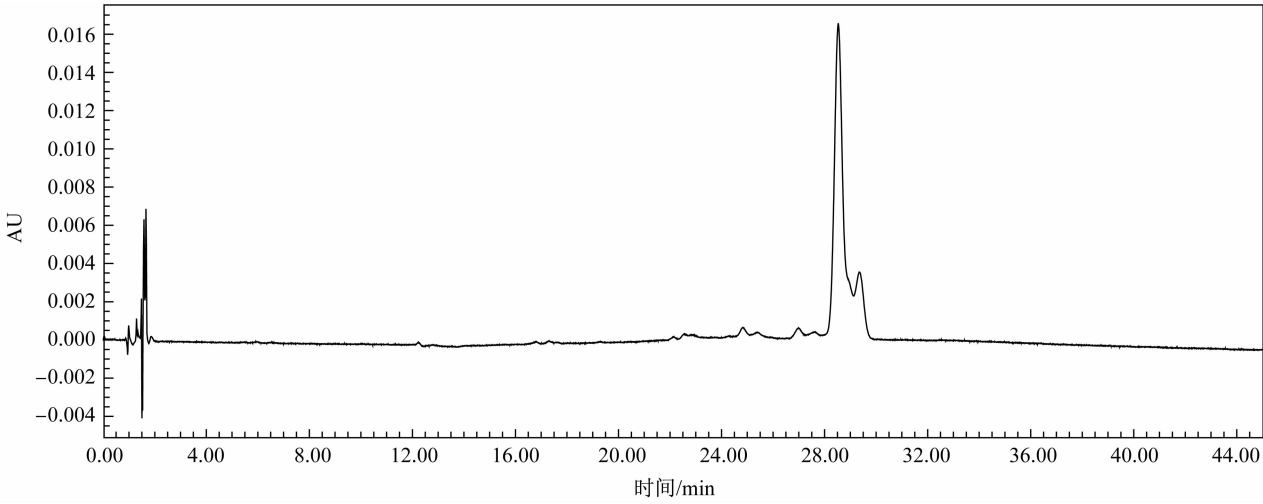


图 5 B7740 产色素组分 A₄ 的高效液相色谱图
Fig. 5. High-performance liquid chromatogram of pigment A₄ produced by B7740

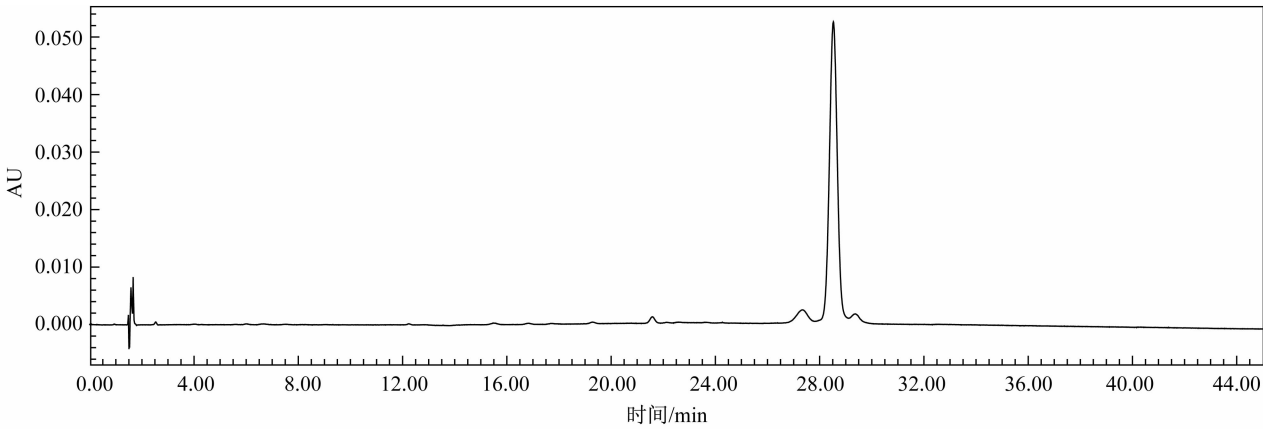


图 6 β-胡萝卜素标准品液相色谱图
Fig. 6. High-performance liquid chromatogram of β-Carotene standard

菌株;另外,还有产天然黑色素、黄色素及具有抗肿瘤活性的菌株^[25]。不难看出,极地微生物蕴含着宝贵的资源,无论是它们携带的特殊的基因,还是它们产生的特殊的生理活性物质都能为我们所用,因此积极开发极地微生物资源对我们的生产和生活都具有重要意义。

本实验所采用的菌株 B7740 来源于北冰洋,实验证明它能大量产生重要的生理活性物质——类胡萝卜素。该菌株最适生长温度较低,15—30℃ 生长良好,37℃ 生长受到明显抑制。这一特点与普通微生物存在较大差异,如贾小明^[26]等报道的产类胡萝卜素的红球菌在 15—40℃ 下生长良好,45℃ 不生长。本实验采用培养温度为 25℃,而普通环境中的微生物最适生长温度为 35℃ 左右,从而降低了 B7740 菌株培养过程中被其他菌株污染的风险。

用于 B7740 菌株培养的培养基,以葡萄糖和乳糖为碳源,酵母粉与牛肉膏为氮源,这一结果与郑晓冬和王友永^[27]的研究有较大出入,该研究中的红球菌在大米水解糖培养基上以尿素和蔗糖分别作为氮、碳源时能提高色素产量。其原因可能是上述菌株的生长环境不同,导致了营养需求不同,因此对于不同来源的菌株,有必要对其培养基进行优化。

B7740 所产色素是胞内色素,易于收集,可采用无水乙醇直接浸提,比起以往使用丙酮、氯仿等有机溶剂更安全,把对环境和人的危害降到了最低,并且无水乙醇可重复利用,大大降低了生产成本。无需使用超声波、酸解、微波^[28]等特殊的破壁法,这些破

壁法不但会使提取步骤更加繁琐,还会破坏类胡萝卜素结构。

pH 值的高低代表溶剂中 H^+ 和 OH^- 的浓度,试验结果发现太高或太低的 pH 值都不利于色素的提取。类胡萝卜素是由 8 个异戊二烯单位聚合而成,含有多个不饱和碳碳双键多烯烃,过高浓度的 H^+ 和 OH^- 可能会不同程度的破坏不饱和双键从而破坏色素结构,从而降低色素的提取效率。目前对产类胡萝卜素微生物研究较多的是红酵母,而 B7740 色素得率达 1 160. 625 $\mu\text{g/g}$ 干菌体,远高于王岁楼^[29]等和杨洲平^[30]等报道的红酵母产类胡萝卜素的量。

根据色素的全波长扫描图谱和显色反应,以及薄层层析和高效液相色谱结果,笔者推断红球菌 B7740 菌株产类胡萝卜素,该色素的吸收光谱(图 3)与 β -胡萝卜素($\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$)相比发生了红移,这可能是由于该色素中含有胡萝卜素的含氧衍生物^[27]。

B7740 菌株产色素成分复杂,多达 20 余种,后续研究有必要对其进行分离纯化和结构分析,并采用液质联用(LC-MS)及红外光谱等分析手段对各色素组分进行定性和定量分析;明确极地微生物产类胡萝卜素的代谢途径;研究出适合于工业化生产的绿色、高效、简单易行的提取分离工艺,以期类胡萝卜素的微生物发酵生产提供新的物种资源和方法,同时也为极地微生物资源利用提供理论依据。

参考文献

- 1 华荷根,郭坚华. 红球菌属的分类及应用研究进展. 微生物学通报, 2003, 30(4):107—109.
- 2 陈军伟,唐欣昀,花日茂. 红球菌在环保领域的应用研究进展. 环境科学与技术, 2009, 32(12):162—165.
- 3 张璐,赵硕伟,李凤玲,等. 石油降解菌 *Rhodococcus* sp. 15-3 的分离鉴定及特性研究. 农业环境科学学报, 2008, 27(5):1737—1741.
- 4 董磊,李姜维,杨彩云,等. 红树林土壤中脂肪酶产生菌的筛选及酶学性质. 厦门大学学报(自然科学版), 2010, 49(4):570—573.
- 5 Teniola O D, Addo P A, Brost I M, et al. Degradation of aflatoxin B₁ by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenivorans* sp. nov. DSM44556^T. International Journal of Food Microbiology, 2005, 105(2):111—117.
- 6 郑晓冬,吴平谷,王友永. 以大米水解糖为原料生产类胡萝卜素的研究. 中国粮油学报, 1999, 14(1):26—30.
- 7 Takaichi S, Tamura Y, Azegami K, et al. Carotenoid glucoside mycolic acid esters from the nocardioform actinomycetes, *Rhodococcus rhodochrous*. Phytochemistry, 1997, 45(3):505—508.
- 8 Tao L, Wagner L W, Rouvière P E, et al. Metabolic engineering for synthesis of aryl carotenoids in *Rhodococcus*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 70(2):222—228.
- 9 Phadwal K. Carotenoid biosynthetic pathway: molecular phylogenies and evolutionary behavior of *crt* genes in eubacteria. Gene, 2005, 345(1):35—43.

- 10 Tao L, Yao H, Cheng Q. Genes from a *Dietzia* sp. for synthesis of C₄₀ and C₅₀ β -cyclic carotenoids. *Gene*, 2007, 386(1-2):90—97.
- 11 Sandmann G, Albrecht M, Schnurr G, et al. The biotechnological potential and design of novel carotenoids by gene combination in *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*, 1999, 17(6):233—237.
- 12 Albrecht M, Takaichi S, Misawa N, et al. Synthesis of atypical cyclic and acyclic hydroxy carotenoids in *Escherichia coli* transformants. *Journal of Biotechnology*, 1997, 58(3):177—185.
- 13 Tao L, Rouvière P E, Cheng Q. A carotenoid synthesis gene cluster from a non-marine *Brevundimonas* that synthesizes hydroxylated astaxanthin. *Gene*, 2006, 379:101—108.
- 14 Aksu Z, Eren A T. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochemistry*, 2005, 40(9):2985—2991.
- 15 李江, 陈靠山, 林学政, 等. 南极菌 *Pseudoalteromonas* sp. S-15-13 产胞外多糖的研究及其分子鉴定. *极地研究*, 2006, 18(2):130—136.
- 16 曾胤新, 陈波. 极区低温海洋细菌及其产酶情况的初步研究. *生物技术*, 2002, 12(1):10—12.
- 17 段作营. 极地细菌 *Pseudomonas putida* S1 海藻糖合成酶的研究. 无锡: 江南大学博士论文, 2008.
- 18 唐琳. 迎春花黄色素的提取及抗氧化作用的研究. 济南: 山东师范大学硕士学位论文, 2006.
- 19 黄德见. 一株双梭隔梭孢产黄色素的培养条件优化及黄色素性质研究. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2009.
- 20 Marinova D, Ribarova F. HPLC determination of carotenoids in Bulgarian berries. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2007, 20(5):370—374.
- 21 王岁楼. 红酵母类胡萝卜素提取方法研究. *山西食品工业*, 2001, (1):14—16.
- 22 曾胤新, 俞勇, 李会荣, 等. 北极海洋细菌 BSw20353 的胞外蛋白酶性质. *极地研究*, 2006, 18(3):206—214.
- 23 崔硕硕. 极地适冷菌 *Psychrobacter* sp. G 低温脂肪酶基因克隆与异源表达. 青岛: 国家海洋局第一海洋研究所, 硕士学位论文, 2011.
- 24 段作营, 徐骥, 毛忠贵, 等. 一株产海藻糖合成酶极地细菌的鉴定. *工业微生物*, 2004, 34(4):19—22.
- 25 朱天骄, 顾谦群, 朱伟明, 等. 南极微生物的分离及抗肿瘤活性筛选. *中国海洋药物杂志*, 2006, 25(1):25—27.
- 26 贾小明, 郑晓冬. 一株产类胡萝卜素菌株的分离与鉴定. *生物技术*, 1995, 5(6):26—28.
- 27 郑晓冬, 王友永. 用红球菌生产类胡萝卜素的研究. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2000, 26(5):516—520.
- 28 Choi S K, Kim J H, Park Y S, et al. An Efficient Method for the Extraction of Astaxanthin from the Red Yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 17(5):847—852.
- 29 王岁楼, 张鑫, 卫军, 等. 高产类胡萝卜素红酵母的筛选及其发酵条件. *无锡轻工大学学报*, 2001, 20(3):252—256.
- 30 杨洲平, 黄乾明, 任君, 等. 高产类胡萝卜素红酵母的筛选及发酵条件的优化. *四川农业大学学报*, 2009, 27(3):327—332.

OPTIMIZATION OF GROWING CONDITIONS AND A METHOD FOR THE EXTRACTION OF CRUDE CAROTENOIDS PRODUCED BY *RHODOCOCOCCUS* SP. (STRAIN B7740) ISOLATED FROM THE ARCTIC SEA

Zhang Jiarong¹, Yang Jifang^{2,3}, Chen Fusheng¹

¹College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

²Key Laboratory of Microbiology and Environmental Engineering, Ningbo 315100, China;

³College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China)

Abstract

Rhodococcus sp. (strain B7740) isolated from the Arctic Ocean can accumulate large numbers of yellow pigments, but the biomass of these bacteria is very low. In this study, an optimal growing medium was developed using single factor and orthogonal experiments on carbon and nitrogen sources, temperature, initial pH and inoculum

concentration. On this same basis, extraction conditions were optimized for the type of extraction solvent, pH, extraction time and solid to liquid ratio. Five grams of yeast extract, 5 g of glucose, 3 g of lactose and 7 g of beef extract were added to 1 L of old sea water. With an initial pH of 7, a temperature of 25°C and an inoculum concentration of 1.0%, the sea water was cultured for 7 days on a shaker at a speed of 160 r/min and the biomass of B7740 increased from 6.1 mg/mL to 23.08 mg/mL, an increase of 278.4%. Dry cells were used for the experiment and anhydrous ethanol at pH7 was used as the extracting reagent with a ratio of sample to solution of 1:30, temperature was set at 75°C and the extraction time was 1 h, repeated twice. Using this method, the output of the pigment reached 1 160.625 $\mu\text{g/g}$ dry cells. Analysis showed that the pigment was carotenoid. The results of this experiment provide the foundation for the further study of extraction methods for carotenoids produced by the polar microbe, *Rhodococcus* sp. (strain B7740).

Key words *Rhodococcus* sp. , carotenoids, extraction methods