

一种放线菌发酵产天然蓝色素的研究*

陆玲** 孙延涛 唐勇 秦怀兰

(南京师范大学生命科学学院 南京 210097)

摘要: 对一种放线菌产生天然蓝色素的发酵条件作了详细探讨。单因素发酵试验表明, 碳源以2%的蔗糖最佳; 氮源以0.1%的 KNO_3 为最好。正交试验表明, 蓝色素发酵最佳配方为: 4%蔗糖+0.1% KNO_3 +0.075%盐+10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FeSO_4 。最佳培养温度为30 $^\circ\text{C}$; 最佳初始pH为7.4。并测定了罐发酵过程中的溶解氧、pH变化及碳、氮的利用情况。用HPLC法对该色素的各成分进行了分离, 结果显示, 该蓝色素至少含有以放线紫红素为代表的5种不同的成分。

关键词: 放线菌, 天然蓝色素, 发酵, HPLC, 分离

中图分类号: Q939.9 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2001) 04-0050-05

PRODUCTION OF NATURAL BLUE PIGMENT BY *STREPTOMYCES* SP.

LU Ling SUN Yan-Tao TANG Yong QIN Huai-Lan

(The College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097)

Abstract: This paper reported the suitable medium of LS-1 stain in detail, which could yield natural blue pigment. Single-factor experimental design shows that the best carbon source was 2% glucose and nitrogen was 0.1% KNO_3 . Orthogonal experimental design shows that the most suitable fermentation medium was consisted of 4% glucose, 0.1% KNO_3 , 0.075% salt and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FeSO_4 . The best cultivation temperature was 30 $^\circ\text{C}$ and pH7.4. The dissolved oxygen on the process of fermentation, as well as the variety of pH and the utilized condition of carbon and nitrogen were measured and analyzed. The separation of this blue pigment by HPLC shows that this material contains actinorhordin and at least other four ingredients.

Key words: *Streptomyces*, Natural blue pigment, Fermentation, HPLC, Separation

目前, 国内外使用的色素有化学合成和天然两种, 均已广泛应用于食品着色剂、日用化妆品及饲料添加剂等方面^[1]。随着人们对合成色素危害性认识的逐步加深, 天

* 江苏省科委应用基础项目资助课题 (No. BJ97123)

** 通讯联系人 微生物理学博士

收稿日期: 2000-01-26, 修回日期: 2001-04-10

然色素的优点越来越受到重视。在色素三原色红、黄、蓝的蓝色源中,当前研究较多的是以植物栀子果实为原料,通过微生物酶水解而产生栀子蓝色素,但此法成本大,制备工艺复杂,生产原料受栀子果实产量限制,给大规模工业化生产蓝色素带来一定的困难^[2]。随着蓝藻类螺旋藻属(*Spirulina*)的开发利用,藻蓝蛋白(phycobiliproteins)的研究^[3]也已引起人们的注意,但藻蓝蛋白的缺点是耐热、耐光性差。因此,开发和研制出能大量生产天然蓝色素的微生物菌种已显得十分的迫切。我们的前期工作已经表明链霉菌 *Streptomyces* sp. 菌株发酵产生的蓝色素无毒、无致畸变作用,有水溶性好,稳定性高等特点^[4]。因此该蓝色素是一种具有开发潜力的天然蓝色源,很有必要进一步对蓝色素的微生物发酵条件作详尽研究,以弥补利用微生物发酵产天然蓝色素这一空白。

1 材料与方 法

1.1 菌种

链霉菌属 *Streptomyces* sp. 菌株,为本实验室分离筛选保藏菌种,菌种鉴定见参考文献 [5]。

1.2 培养基和培养方法

菌种用高氏一号斜面,30℃活化24h,接种(3个摇瓶/斜面)至其液体培养基^[6],30℃,200r/min培养。正交试验设计和数据处理参见文献 [7]。

1.3 主要设备

50mL侧臂三角瓶,250mL摇瓶,LRH-250-Z自动调温调速振荡生化培养箱,3L全自动小型发酵罐(美国Vir-Tis公司),高效液相色谱仪(美国Waters公司):820色谱工作站,510泵(两台),484紫外—可见分光光度检测器,U6K手动进样器。

1.4 色素含量的测定

天然蓝色素发酵液(pH8.2)最大吸收峰约在590nm处^[4],因此将培养液离心,取上清,以同样未含菌的培养基调零,测定其 OD_{590} 值,作为发酵液色素产量指标。每次试验每个处理设3个重复,重复3次试验,计算平均值。

1.5 罐发酵试验

培养基为正交试验最佳配方,初始pH7.4,15%接种量,30℃,300r/min。将发酵液离心沉淀,HCl沉淀色素,ZnSO₄去除蛋白质,离心取上清液。用5N HCl 100℃水解上清液5min,6N NaOH回滴至中性,用3,5-二硝基水杨酸法测定糖含量^[8];用 α -萘胺氧化法测定上清液中的硝态氮^[9]。

1.6 色素提取的和色素各成分的初步分离

色素的提取参见文献 [10],所得色素上反相HPLC色谱柱,Zorbax ODS C₁₈250nm \times 4.6mm 5 μ m色谱柱,流动相:40%甲醇水溶液,流速:1mL \cdot min⁻¹,温度20℃,检测波长:590nm。

1.7 色素标准

根据我们所得到的蓝色素理化特性^[4]与文献所报道的放线紫红素(Actinorhodin)相近,因此,RP-HPLC分析用放线紫红素标准作对照。标准品由David Hopwood教授(John Innes Centre, Norwich Research Park)赠送。有关该色素标准的详细资料参见文献 [10]。

2 结果与讨论

2.1 碳源试验和氮源试验及不同 C/N 比对色素产生的影响

按高氏一号基本配方，碳源种类分别为淀粉、蔗糖及葡萄糖，浓度均为 2%；氮源为 NH_4NO_3 、 NH_4Cl 及 KNO_3 ，浓度均为 0.1%。分别进行 3 种摇瓶试验，结果发现，在高氏一号其他成分不变的情况下，碳源以蔗糖产生色素效果最好，最佳氮源为 KNO_3 。根据上述试验结果，分别以蔗糖和 KNO_3 为碳、氮源代表，设置不同 C/N 比（蔗糖、 KNO_3 在培养基中的百分含量之比）培养基，结果表明（图 1），当培养基蔗糖浓度为 2%， KNO_3 为 0.1%，C/N = 20 时发酵产生色素的效果最好。

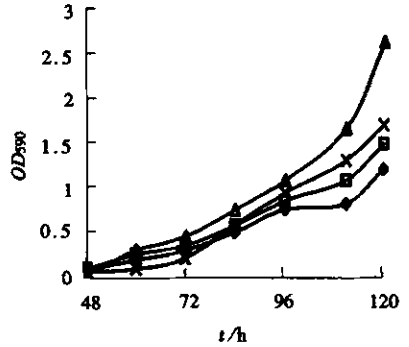


图 1 不同 C/N 比对色素产生的影响

—◇—C = 0.5%，—○—C = 1%，—△—C = 2%，
—×—C = 4%

2.2 正交试验

根据单因素试验结果，为进一步得到各成分最佳浓度配方，现拟用 4 因素 3 水平 $L_9(3^4)$ 作优化培养基试验，以期找出最佳培养基配方，正交试验配方及结果见表 1。

表 1 正交试验 $L_9(3^4)$ 配方及结果

处理序号	影响因素				* * 色素 (OD_{590}) x_i	
	蔗糖 (%)	KNO_3 (%)	无机盐 (%) *	Fe ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	$x_i' = x_i - 8.0$	$x_i'^2$
(1)	1	0.05	0.075	5	-2.86	8.18
(2)	1	0.1	0.15	10	-1.0	1
(3)	1	0.2	0.3	20	-7.29	53.14
(4)	2	0.05	0.15	20	-1.69	2.86
(5)	2	0.1	0.3	5	-1.73	3.0
(6)	2	0.2	0.075	10	0.08	0.0064
(7)	4	0.05	0.3	10	7.2	51.84
(8)	4	0.1	0.075	20	6.6	43.56
(9)	4	0.2	0.15	5	1.14	1.3
K_1	-11.15	2.65	4.0	-3.45		
K_2	-3.34	3.87	4.5	6.3		
K_3	-14.94	-6.27	-1.82	-2.4		
K_1^2	124.3	7.02	16	11.9	$\sum x_i' = -22.08$	$\sum x_i'^2 = 164.9$
K_2^2	11.2	14.98	20.25	39.7		
K_3^2	223.2	39.3	3.3	5.76		
$\sum K_i^2$	358.7	61.7	39.55	57.36	误差	总和
平方和	379.5	46.1	25.8	66.9	208.9	518.3
自由度	2	2	2	2	9	17
方差	189.7	23.1	12.9	33.4	23.2	
F	8.18	1	0.56	1.44		
显著性	显著					

* 无机盐浓度：高氏一号培养基中 NaCl 、 K_2HPO_4 及 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1:1:1) 的总含量， $\text{Fe}_{\mu\text{g}/\text{mL}}$ ，表示 FeSO_4 的含量

** 色素生产量一般在 2-14 (发酵液的 OD_{590} 值) 之间，因此以其中间值 8 为参考指标

表 1 方差分析表明，影响色素产生的显著因素为蔗糖，其次影响较大的为 FeSO_4 。

从中得到较佳配方为：4%蔗糖+0.1%KNO₃+0.075%盐+10mg/L FeSO₄。

2.3 初始 pH 及培养温度对色素产生的影响

按高氏 1 号配方，将培养基的初始 pH 分别设 5 个梯度，相同条件下培养测定不同时间段的 OD₅₉₀，结果如图 2。可以看出，初始 pH7.4 最有利于色素的产生，而初始 pH6.8 产生色素速度最慢。

温度试验：摇瓶接种后，分别在 32℃、30℃、28℃、26℃ 恒温自动培养箱中培养，转速统一为 200r/min，结果表明：30℃ 恒温发酵对蓝色素的产生速率及最高产量均最好，26℃ 处理次之。

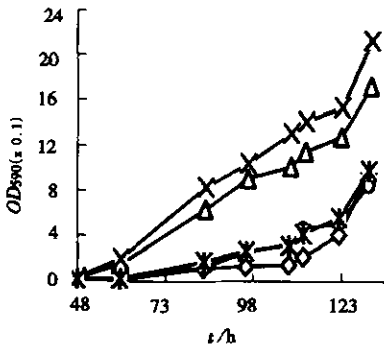


图 2 初始 pH 对色素产生的影响

○—pH6.8, □—pH7.0, △—pH7.2,
—x—pH7.4, *—pH7.6

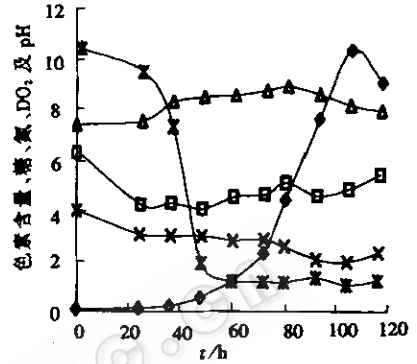


图 3 发酵过程中色素、糖、氮、溶解氧及 pH 的变化曲线

○—色素 OD₅₉₀, □—溶解氧, △—pH,
—x—糖 OD₃₂₀, *—氮 OD₃₂₀

2.4 发酵过程中溶解氧、pH 变化及糖、氮的利用情况

根据正交试验的结果，进行 3L 罐发酵试验，测定发酵过程中的色素含量、溶解氧 (DO₂)、pH 的变化及糖、氮的利用情况，结果见图 3。

由图 3 可见：发酵过程中培养液溶解氧先降低后升高这一阶段基本不产生色素；而在发酵后期，培养基中溶解氧含量增高，pH 也渐渐升高，随着色素含量达到最高值，pH 亦达到最高峰。pH 一旦下降，应立即停止发酵。发酵过程中糖、硝态氮的含量呈持续下降趋势，在发酵末期（色素含量回落），氮几乎耗尽，而糖则只下降到 50% 左右；发酵进行至 40h 氮含量迅速下降，此时，色素也开始大量积累；而培养基中糖的含量变化没有氮明显。

2.5 色素的各组分的分离

将胞外色素全样上 HPLC，测定 590nm 处吸收峰；用放线紫红素 (Actinorhodin) 标准品作对照，结果见图 4、图 5。

由图 5 可以发现，放线紫红素标准样品有两个峰。主峰保留时间是 4.46s，为放线紫红素。另有一小峰在 5.34s，经分析该峰可能是放线紫红素的降解产物。同样检测条件下，胞外色素全样上 RP-HPLC，该色素含 5 种迁移率不同的成分，保留时间分别为 1.73s、2.31s、3.42s、4.51s、5.35s，其中 3.42s 和 5.35s 处虽有保留时间，但峰型不明显，增大检测器的灵敏度，峰值可加大。该蓝色素的硅胶 TLC 也显示有 5 条谱带。分析认为保留时间为 4.51s 的这一主峰为放线紫红素，因为与标准放线紫红素 4.46s 处成分行为基本一致。在 1.73s 处出现一个强峰，根据硅胶 TLC 中结果放线紫红素和 γ-放线紫

色素的 R_f 值分别为 0.52 和 0.28^[7], 这说明两者之中放线紫红素的极性较大, γ -放线紫红素的极性较小, 上 RP-HPLC 时, 极性较小者吸收峰先出现, 这说明 1.73s 处极有可能是 γ -放线紫红素。另一个 5.34s 处的小峰与标准放线紫红素样品 5.34s 有相同保留时间, 可能也是放线紫红素的降解产物, 有关色素成分的鉴定还有待进一步作深入研究。

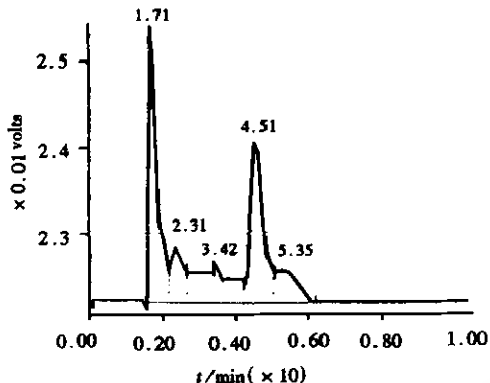


图4 胞外色素 HPLC 图谱(590nm)

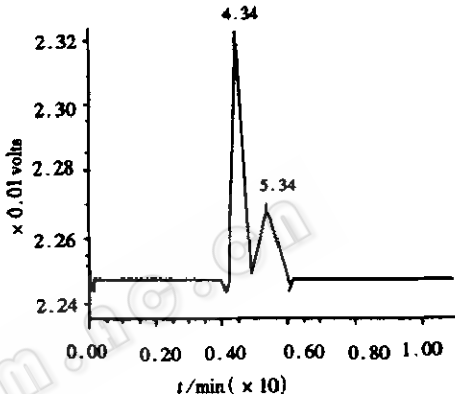


图5 标准放线紫红素的 HPLC 图谱(590nm)

3 结论

通过发酵条件的研究, 证实菌株 *Streptomyces* sp. 能在合适的温度和 pH 条件下, 利用经过优化的合成培养基发酵生产天然蓝色素, 这是一种制备天然蓝色素的新途径, 可为进行大规模化工生产提供依据。

参考文献

- [1] 马自超, 庞业珍. 天然食用色素化学及生产工艺学. 北京: 中国林业出版社, 1994, 10~114.
- [2] 刘成伦, 徐龙君. 天然产物研究与开发, 1996, 8(2): 69~72.
- [3] Padgett M P, Krogmann D W. *Photosynthesis Research*, 1987, 11: 225~235.
- [4] 赵东红, 陆玲, 秦怀兰. 食品与发酵工业, 1998, 24(5), 21~24.
- [5] 孙延涛, 陆玲, 崔恒林, 等. 微生物学杂志, 2000, 20(1): 49~51.
- [6] 李永泉, 贺筱菁, 赵小立, 等. 微生物学通报, 1995, 22(5): 263~266.
- [7] 葛葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册. 北京: 中国轻工业出版社, 1994, 110~111.
- [8] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生物化学实验技术. 北京: 高等教育出版社, 1981, 11~16.
- [9] 华东师大植物生理教研组编著. 植物生理学实验指导. 北京: 人民教育出版社, 1980, 38~40, 155.
- [10] Bystriky L V, Fernandez-Moreno M A, Herrera J K, et al. *J Bacteriology*, 1996, 178(8): 2238~2244.