

一株节杆菌发酵产物中类胡萝卜素的分离及组分分析的初探

翟玉贵 张伟国* 钱和

(江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】对实验室保存的一株红色球菌进行菌株鉴定,并对色素提取液的组分进行定性分析。【方法】采取形态学观察、16S rDNA 序列同源性和生理生化分析相结合的方法确定菌株的分类地位。使用乙醇-丙酮混合液提取胞内色素,采用硅胶 G 薄板层析法对色素提取液进行初步分离纯化,并结合其光谱吸收特性、质谱结果进行定性分析。【结果】实验结果表明此菌株属于节杆菌属(*Arthrobacter* sp.)。薄板层析结果显示该菌株内主要有 4 种色素组分,且靠近溶剂前沿组分为黄色,其它组分皆为橘红色。吸收光谱特性、质谱结果显示黄色组分可能为 β -胡萝卜素,橘红色组分可能为螺菌黄质系类胡萝卜素。【结论】此株节杆菌以较为廉价的糖蜜和玉米浆作为营养物质用于满足自身生长需要,并且积累胞内类胡萝卜素,因此该菌的进一步研究有一定的价值。

关键词: 节杆菌, 类胡萝卜素, β -胡萝卜素, 螺菌黄质系

Preliminary separation and qualitative analysis of carotenoids in *Arthrobacter* sp.

ZHAI Yu-Gui ZHANG Wei-Guo* QIAN He

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] To analyse the taxonomic status of the red-coccus bacterium conserved in our laboratory, and the compositions of pigments extract were determined. [Methods] This bacterium was classified based on morphological features, 16S rRNA gene sequences and physiological tests. Total pigments were extracted from biomass using ethanol-acetone. Preliminary separation of pigments was achieved by thin layer chromatography, and UV/visible scanning spectra and mass spectra were used for the qualitative analysis of each composition. [Results] This bacterium was classified to the genus of *Arthrobacter* sp.. There were main four compositions on the silica-gel plate. Only one next to the solvent front was yellow, and others were orange. The spectroscopic data and mass spectra showed that the yellow and red components might be the β -carotene and spirilloxanthin series respectively. [Conclusion] The production of carotenoids by the strains of *Arthrobacter* sp. was observed, when cheap materials such as molasses and corn steep liquor were used as nutrient medium, and further investigations will have practical values.

Keywords: *Arthrobacter* sp., Carotenoids, β -Carotene, Spirilloxanthin series

*通讯作者: Tel: 86-510-85129312; ✉: zhangwg186@163.com

收稿日期: 2013-05-25; 接受日期: 2013-09-24; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-25

节杆菌分布广泛,适应性强,嗜冷、嗜热、耐碱、耐辐射等嗜极菌株已有发现^[1-2]。节杆菌属大多数为无害菌,只有极少数节杆菌为条件致病菌,如卡氏节杆菌、沃氏节杆菌、白色节杆菌、解肌酐节杆菌、氧化节杆菌和黄色节杆菌,可引起红疹、眼内炎、感染性心内膜炎、败血症等人类疾病^[3]。螺菌黄质系类胡萝卜素最初认为存在于红假单胞菌(*Rhodospseudomonas*)、红细菌(*Rhodobacter*)等光合细菌中^[4-5],其与细菌叶绿素相结合,发挥光保护作用并促进光合作用的进行。之后在分支杆菌(*Mycobacterium*)、棒状杆菌(*Corynebacterium*)等非光合细菌也有发现^[6-7],其通常与细胞膜相连接,保护细胞使其免受氧化损伤。关于节杆菌产类胡萝卜素也有相关报道。如 Fong N. J. 等分离得到冰川节杆菌(*Arthrobacter glacialis*),经分离和鉴定其胞内色素主要为 C50 类胡萝卜素 Bacterioruberin^[8]。Arpin N. 等分离得到一株节杆菌(*Arthrobacter* sp.),胞内色素主要为 C50 类胡萝卜素 Decaprenoxanthin 及其单、双糖苷衍生物^[9]。Fiasson J. L. 等分离得到一株节杆菌(*Arthrobacter* sp.),其类胡萝卜素组分主要为 4-Keto- γ -carotene^[10]。本实验采取薄板层析法对色素提取液进行初步分离和纯化。在参考相关文献的基础上,根据紫外波长扫描和质谱检测结果推定物质的类别,是目前比较常用的方法,具有可信性^[11]。关于节杆菌产螺菌黄质系类胡萝卜素少有报道,因此本文为进一步对其类胡萝卜素生产的研究提供一些必要依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

玉米浆、糖蜜购自山东阜丰发酵有限公司,乙醚、乙醇、乙酸乙酯、石油醚、丙酮、己烷、甲醇、硅胶 G 薄板(2.5 cm×7.5 cm)购自国药集团化学试剂有限公司。上海精科 721 分光光度计, TaKaRa Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver. 3.0, TaKaRa Kit Ver. 4.0 试剂盒,大连宝生物工程有限公司。

1.2 菌株培养基及培养条件

菌株:本实验室保存的一株红色球菌,暂时命

名为 RC-1。活化培养基(g/L):玉米浆 30,糖蜜 30,琼脂 20, pH 7.5, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。种子培养基(g/L):玉米浆 30,糖蜜 30, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25, KH_2PO_4 1.0, pH 7.5, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min, 30 °C、100 r/min 发酵 16 h。发酵培养基(g/L):玉米浆 50,糖蜜 30, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25, KH_2PO_4 1.0, pH 7.5, 7×10^4 Pa 灭菌 10 min, 30 °C、100 r/min 发酵 60 h。

1.3 菌株鉴定

采取形态学分析、系统发育树分析及生理生化特征对该菌株进行分类学鉴定。将平板置于 30 °C 培养箱中连续观察 7 d,生理生化特性鉴定参照文献[12]所述。根据 Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver. 3.0 所述方法提取细菌基因组 DNA。以提取的基因组 DNA 为模板, 5'-GAGAGTTTGATCCTGG CTCAG-3'为上游引物, 5'-CTACGGCTACCTTGTTC ACGA-3'为下游引物,扩增 16S rDNA。PCR 反应条件参照文献[13]所述。PCR 产物用 TaKaRa Kit Ver. 4.0 纯化后,连接到 pMDTM-18-T vector,筛选出阳性克隆后,由上海生工生物工程有限公司测序。将测序所得序列提交至 GenBank 数据库,通过 BLAST 在基因库中进行同源性比对分析,采用 MEGA 3.0 软件构建系统发育树^[9,14]。

1.4 色素组分分析方法

使用乙醇-丙酮(2:1,体积比)混合液对胞内色素进行提取^[11]。采用 TLC 法对色素混合液进行初步分离纯化,展层剂为石油醚:乙酸乙酯:丙酮=1:1:1(体积比)。刮取薄板上每一色素组分,分别溶于甲醇与乙醚,之后进行光谱扫描,扫描波长范围为 300-600 nm,扫描间隔 1 nm。质谱条件:色谱仪:WATERS ACQUITY UPLC,检测器:WATERS ACQUITY PDA,分析柱:BEH C₁₈ 2.1 mm×100 mm, 1.7 μ m,流动相:甲醇,柱温:30 °C,检测波长:300-600 nm,流速:1 mL/min,进样量:10 μ L,离子方式:ESI⁺,毛细管电压:3.5 kV,锥孔电压:20 V,离子源温度:100 °C,脱溶剂气温度:250 °C,脱溶剂气流速:500 L/h,锥孔气体流量:50 L/h,碰撞能:15 V,质量范围:100-1 400 *m/z*,检测器电压:1 600 V。

2 结果与讨论

2.1 菌株鉴定

形态学分析：固体平板培养 2 d 即可见红色圆形、中间凸起、表面光滑、无皱褶菌落。光学显微镜观察发现，细胞形态发生显著变化，在 1–2 d，细胞多呈杆状，在 3–7 d 细胞呈卵形到圆形。革兰氏染色呈阳性，无鞭毛，不运动，不产芽孢，严格好氧。在 10 °C 可生长，20–30 °C 生长良好，37 °C 无生长现象。在 0–50 g/L NaCl 浓度下生长良好，在 110 g/L 浓度下可以存活。

生理生化特性：不抗酸、细胞壁不含内消旋二氨基庚二酸和阿拉伯糖，含有半乳糖；在含蛋白胨培养基中，氧化葡萄糖不产酸、不产气，不破坏纤维素，在 5% 的脱脂牛奶中 63 °C 加热 30 min 不存活，在中性或者稍碱性的条件下生长最佳。接触酶阳性，V. P. 试验、甲基红试验、吲哚试验和硫化氢试验均呈阴性，可液化明胶、水解淀粉和还原 NO_3^- ；在土壤浸汁、酵母提取物的培养基中都能生长。生长必需生物素，硫酸素、泛酸为非必需，菌株可利用甘氨酸、肌氨酸、精氨酸、丙氨酸、脯

氨酸、尿酸、肌酸和甜菜碱，不能利用赖氨酸、缬氨酸和丝氨酸。其碳源利用情况见表 1。

16S rDNA 测序结果显示其长度为 1 598 bp (GenBank 登录号：SYBW35Z401R)。系统进化树(图 1)结果表明，菌株 RC-1 与节杆菌属、放线菌属和南极细菌有较高的同源性(99%)。结合其形态

表 1 RC-1 菌株碳源利用情况

Table 1 Analysis of utilization of carbon sources by the strain RC-1

实验 Test	结果 Results	实验 Test	结果 Results
Glucose	+	Trehalose	+
Xylose	+	Raffinose	-
Ribose	+	Melezitose	+
L-arabinose	+	Citrate	+
Cellobiose	+	Maltose	+
Melibiose	+	Stachyose	-
Surcose	+	D-tagatose	-
Sorbitol	-	Gentiobiose	+
Rhamnose	+	Maltotriose	+
Fructose	+	Allulose	+
Lactose	+	Succinic acid	-

注：+：阳性；-：阴性。

Note: +: Positive; -: Negative.

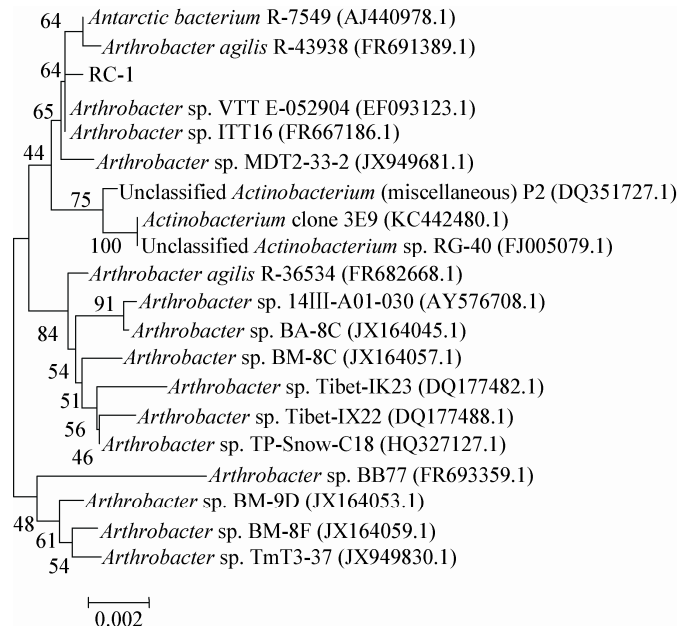


图 1 RC-1 菌株系统发育树的构建

Figure 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of RC-1 and its relatives

注：节点的数字为 Bootstrap 值，自举数据集为 1 000 次；标尺表示分支长度。括号内序列号为 GenBank 登录号。

Note: Branch points were supported by parsimony bootstrap valued (1 000 replicates). The scale bar defines branch length. Sequence numbers in parentheses are the GenBank accession numbers.

学特点和生理生化特征分析,确定此菌株属于节杆菌属。

2.2 色素提取液薄板层析结果及各组分吸收光谱

色素提取液 TLC 结果如图 2 所示。其主要含有 4 种组分,4 种组分 R_f 值依次为:0.96、0.66、0.11、0.05。其中靠近溶剂前沿部分组分 1 为黄色,其余 3 种全为橘红色。刮取 4 种组分分别溶于甲醇与乙醚,进行波长扫描测定。除黄色组分溶解效果较差之外,其余组分在甲醇和乙醚中溶解效果均较好,且在两种溶剂中其吸收峰也基本相同,吸收光谱结果如图 3 所示。组分 1 吸收峰为 420–421 nm、450–452 nm、480–482 nm;组分 2 吸收峰为 455–457 nm、482–483 nm、515–517 nm;组分 3 吸收峰为 462–464 nm、490–492 nm、525–527 nm;组分 4 吸收峰为 460–463 nm、490–492 nm、524–526 nm。

2.3 各色素组分的质谱分析鉴定

各色素组分的甲醇溶液用 0.22 μm 有机滤膜过滤后装于棕色小瓶,用于质谱实验。在质谱检测过程中,类胡萝卜素会因失去不同的末端基团而产生不同的碎片峰,这是类胡萝卜素质谱图的典型特

征^[14]。因此可以根据不同的 m/z 值用于进一步证明类胡萝卜素的种类。

2.3.1 组分 1 的分析鉴定:组分 1 为黄色,在甲醇、乙醚中的溶解度较低,但易溶于己烷等低极性有机溶剂。图 4 显示组分 1 的分子量为 536,还含有特征性[M-92]峰(m/z 444)和[M+31]峰(m/z 567)。其最大吸收峰 420–421 nm、450–452 nm、480–482 nm 也与 β -胡萝卜素相似,且分子量也为 536,因此推测组分 1 可能是 β -胡萝卜素^[11]。

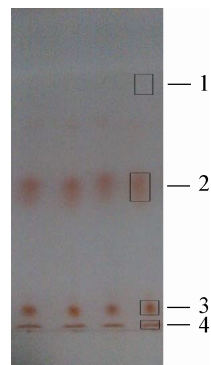


图 2 色素提取液薄板层析结果

Figure 2 Result of the TLC analysis of the pigments extract

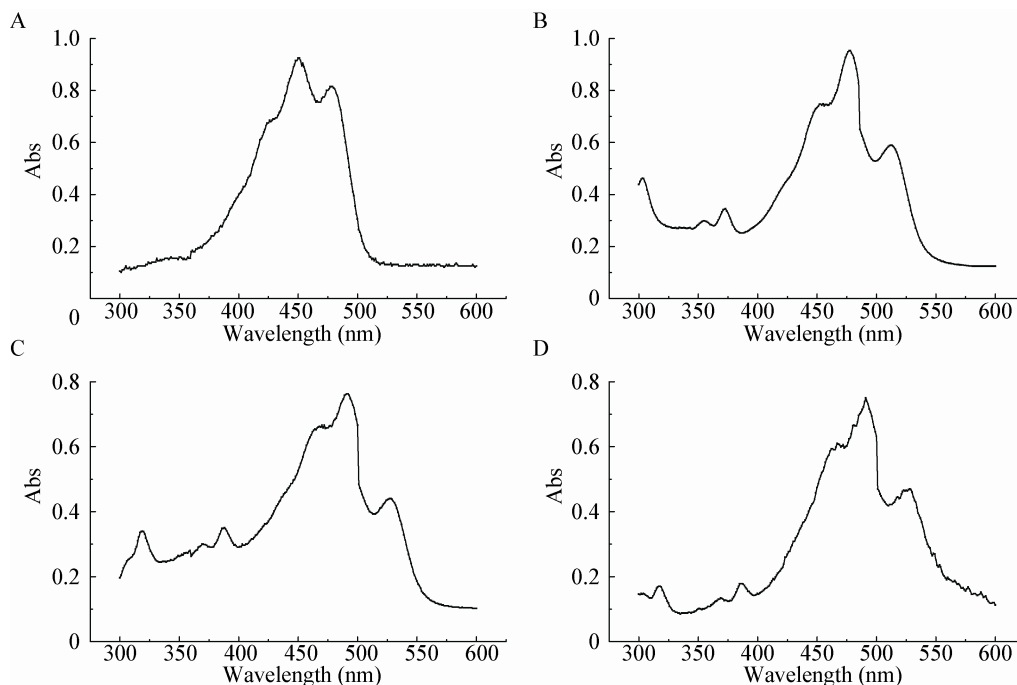


图 3 各组分吸收光谱

Figure 3 UV/visible scanning spectra of composition 1–4

Note: A: Composition 1; B: Composition 2; C: Composition 3; D: Composition 4.

2.3.2 组分 2 的分析鉴定: 组分 2 为橘红色, 易溶于甲醇等强极性有机溶剂, 在高浓度时呈深红色。质谱结果如图 5 所示, 色素 2 的分子量为 566, 有 m/z 460 和 m/z 474 峰, 即特征性[M-106]和[M-92]峰。在 482–483 nm 有最大吸收峰, 与文献报道的脱水紫菌红素最大吸收值相符, 并且脱水紫菌红素的分子量也是 566, 因此推测组分 2 可能是脱水紫菌红素^[15]。

2.3.3 组分 3 的分析鉴定: 组分 3 呈橘红色, 易溶于甲醇等强极性有机溶剂。在 490–492 nm 有最大吸收峰, 在 462–464 nm 和 525–527 nm 有两肩峰。崔战利等报道全反式螺菌黄质最大吸收峰在 464、492 和 527 nm, 色素 3 与螺菌黄质有比较接近的紫外吸收值, 其微小的差别可能是由于顺反异构的不同造成的^[16]。质谱结果显示该色素分子量为 596 (图 6), 此外质谱检测还存在特征性[M-73]峰(m/z 523)和[M-92]峰(m/z 504), 说明色素 3 为类胡萝卜素类物质。综上所述, 推测组分 3 可能是螺菌黄质^[15]。

2.3.4 组分 4 的分析鉴定: 组分 4 为橘红色, 易溶于甲醇等强极性有机溶剂。质谱结果如图 7 所示, 分子量为 582, 其最大吸收值与螺菌黄质相似, 质谱结果显示含有[M-73]峰(m/z 509)和[M-106]峰(m/z 476), TLC 结果显示其极性要强于螺菌黄质, 依据文献报道推测组分 4 可能为单甲基螺菌黄质^[15-16]。

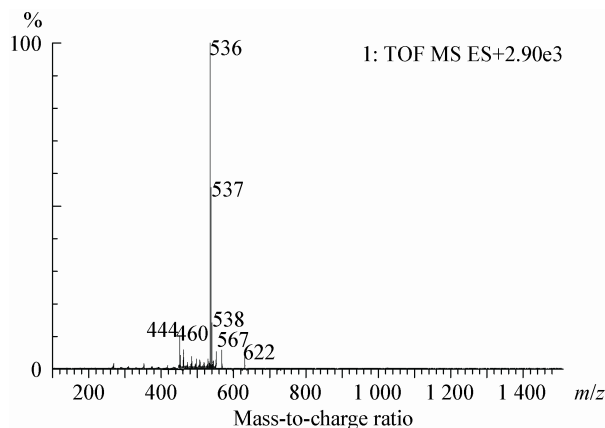


图 4 组分 1 质谱图

Figure 4 Mass spectrum of composition 1

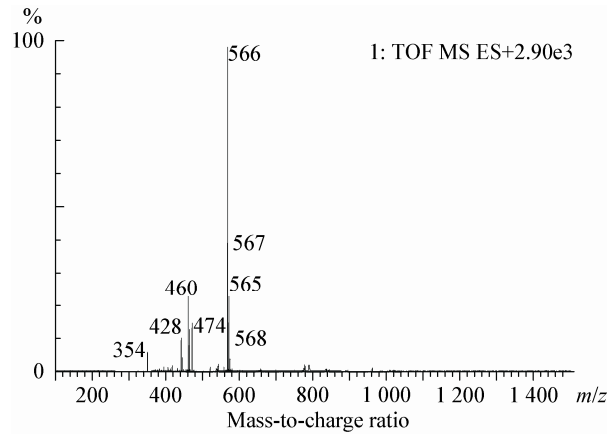


图 5 组分 2 质谱图

Figure 5 Mass spectrum of composition 2

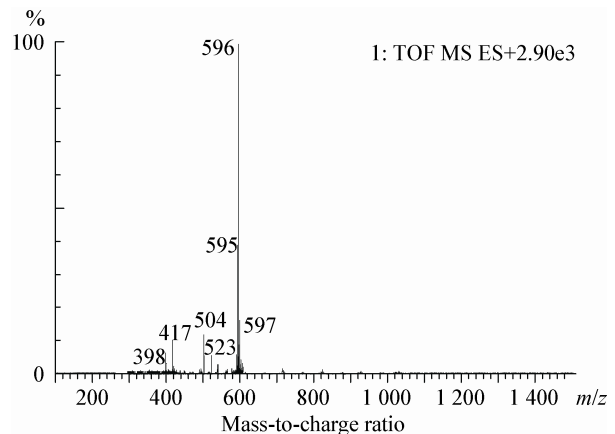


图 6 组分 3 质谱图

Figure 6 Mass spectrum of composition 3

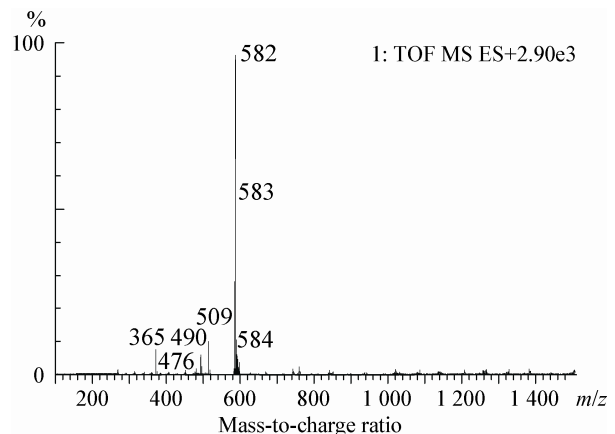


图 7 组分 4 质谱图

Figure 7 Mass spectrum of composition 4

3 结论

本实验确定此株节杆菌可积累胞内类胡萝卜素,通过 TLC、紫外吸收特征、 R_f 值和质谱结果,推定 β -胡萝卜素、脱水紫菌红素、螺菌黄质和单甲基螺菌黄质可能是其产物。糖蜜是制糖工业的副产品,其中可发酵糖主要为蔗糖,还含有粗蛋白质、氨基酸、矿物质等物质,糖蜜除可用于某些食品的原料和动物饲料,其还可用于味精、有机酸等发酵的底物或者基料^[17]。玉米浆是玉米淀粉的副产物,其不仅含丰富的可溶性蛋白、生长素等物质,其本身含有的玉米黄素就是类胡萝卜素之一,其可以转化为类胡萝卜素的前体物质,从而促进胞内类胡萝卜素的合成^[18]。实验表明此株节杆菌可以将糖蜜和玉米浆作为营养物质用于自身类胡萝卜素的合成并在胞内积累,这种方法不仅可以降低生产成本,还可提高副产品的再利用价值、降低对环境的污染。因此,在分离和鉴定类胡萝卜素组分基础上,对此菌株发酵条件的优化、类胡萝卜素代谢途径的定向改造等具有一定的实际利用价值。

参考文献

- [1] Aislabie JM, Broady PA, Saul DJ. Culture aerobic heterotrophic bacteria from high altitude, high latitude soil of La Gorce Mountains (86°30'S, 147°W)[J]. *Antarctica Science*, 2006, 18(3): 313-321.
- [2] Shweta T, Pratibha S, Rameshwar T, et al. Salt-tolerant *Rhizobacteria*-mediated induced tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) and chemical diversity in rhizosphere enhance plant growth[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2011, 47(8): 907-916.
- [3] 尤敏, 管福来, 赵乃昕, 等. 一种条件致病节杆菌的分离与鉴定[J]. *潍坊医学院学报*, 2003, 25(2): 96-98.
- [4] Satoshi S, Shimada K, Nishimura Y, et al. Identification and subcellular distribution of carotenoids in the aerobic photosynthetic bacterium, *Pseudomonas radiora* strain MD-1[J]. *Plant and Cell Physiology*, 1995, 36(5): 819-823.
- [5] 张晓蓉, 赵春贵, 杨素萍. 产氢红杆菌类胡萝卜素含量

- 和组分分析[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(5): 863-866.
- [6] Schlegel HG. Conversion of carotenoids to oxycarotenoids by *Mycobacterium phlei*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1959, 77(3): 310-316.
- [7] Jensen SL. On fungal carotenoids and the natural distribution of spirilloxanthin[J]. *Phytochemistry*, 1965, 4(6): 925-931.
- [8] Fong NJ, Burgess ML, Barrow KD, et al. Carotenoid accumulation in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter agilis* in response to thermal and salt stress[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 56(5/6): 750-756.
- [9] Arpin N, Fiasson JL, Norgard S, et al. Bacterial carotenoids, XLVI. C50-carotenoids, 14. C50-carotenoids from *Arthrobacter glacialis*[J]. *Acta Chemical Scandinavica. Series B: Organic Chemistry and Biochemistry*, 1975, 29(9): 921-926.
- [10] Fiasson JL, Arpin N, Perrier J. 4-Keto- γ -carotene (β , ψ -caroten-4-one), the major pigment of an *Arthrobacter* sp.[J]. *Canadian Journal of Biochemistry*, 1976, 54(11): 1016-1017.
- [11] 李晓芹, 钱和, 张伟国, 等. *Sporidiobolus pararoseus* 发酵产物中类胡萝卜素的分离与鉴定[J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37(9): 25-30.
- [12] 东秀珠, 蔡妙瑛. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 370-398.
- [13] Foght J, Aislabie J, Turner S, et al. Culture bacteria in sub glacial sediments and ice from two southern hemisphere glaciers[J]. *Microbial Ecology*, 2004, 47(4): 329-340.
- [14] Kumar S, Tamura K, Nei M. Mega 3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5(2): 150-163.
- [15] Enzell CR, Francis GW, Liaaen-Jesnen S. Mass spectrometric studies of carotenoids. 2. A survey of fragmentation reactions[J]. *Acta Chemical Scandinavica*, 1969, 23(3): 727-750.
- [16] 崔战利, 汤辉, 张鸿雁, 等. 沼泽红假单胞菌 B.9菌株类胡萝卜素的组分及稳定性研究[J]. *襄樊学院学报*, 2000, 21(2): 71-74.
- [17] Buzzini P, Martini A. Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw material of agro-industrial origin[J]. *Bioresource Technology*, 2000, 71(1): 41-44.
- [18] Valduga E, Valerio A, Treichel H, et al. Pretreatment of sugarcane molasses and corn steep liquor for the production of carotenoids[J]. *Quimica Nova*, 2007, 30(8): 1860-1866.