

无机盐和碳氮源对噬夏孢欧文氏菌积累类胡萝卜素的影 响

李 丽¹, 杜桂彩², 凌树宽¹, 陈建锋¹, 李荣贵^{1,2}, 郭道森¹

(1. 青岛大学生物系, 山东 青岛 266071; 2. 山东省天然色素重点实验室, 山东 青岛 266071)

摘 要: 供试的 8 种无机盐中, $MgSO_4$ 的单因子效应最好, 可促进噬夏孢欧文氏菌(*Erwinia uredovora*)的生长和类胡萝卜素合成。在供试的 4 种碳源中, 葡萄糖是最适碳源。噬夏孢欧文氏菌不能利用无机氮源, 在供试的有机氮源中以酵母膏最有利于类胡萝卜素合成。培养基中的含碳量保持在 2.45~4.90g/L, 含氮量保持在 1.60~2.40g/L 时, 对噬夏孢欧文氏菌生长和类胡萝卜素合成均为有利, 培养基的最适 C:N 为 2.5:1。类胡萝卜素稳定性的初步实验证明, 所得到的类胡萝卜素丙酮溶液在常温下稳定性较差, 容易分解。高效液相色谱法(HPLC)测定结果表明, 从噬夏孢欧文氏菌细胞得到的天然色素成分比较复杂, 在菌体中共检测到 11 种色素成分。

关键词: 噬夏孢欧文氏菌(*Erwinia uredovora*); 无机盐类; 碳氮源; 胡萝卜素产率; 稳定性

Effects of Different Inorganic Salts, Carbon and Nitrogen Sources on Carotenoid Yield and Growth of *Erwinia uredovora*

LI Li¹, DU Gui-cai², LING Shu-kuan¹, CHEN Jian-feng¹, LI Rong-gui^{1,2}, GUO Dao-sen¹

(1. Department of Biology, Qingdao University, Qingdao 266071, China

2. Key Laboratory for Natural Pigments of Shandong Province, Qingdao 266071, China)

Abstract: For the synthesis of carotenoids bacterium *Erwinia uredovora*. $MgSO_4$ had the best positive effects among 8 inorganic salts, which can promote the growth of *Erwinia uredovora* and increase its pigments yield. All of the four carbon sources (glucose, sucrose, maltose and glycerol) could promote the cell biomass and biosynthesize the carotenoids with glucose as the best. As for the 5 nitrogen sources, yeast extract served as the best nitrogen source for the growth and pigments accumulation, followed by peptone and beef extract. *Erwinia uredovora* could not utilize urea and ammonium nitrate. The carbon and nitrogen concentrations the culture media are 2.45~4.90g/L and 1.60~2.40g/L respectively, beneficial to both the cell growth and carotenoids production. The optimal C:N ratio is 2.5:1. It showed that the stability of carotenoids the acetone extract of *Erwinia uredovora* becomes worse and degrades fast during the first 24h under the room temperature. 11 pigments are detected from *Erwinia uredovora*.

Key words *Erwinia uredovora* inorganic salts; carbon and nitrogen sources; carotenoid yield; stability

中图分类号: Q562

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)04-0183-04

类胡萝卜素(carotenoids)是一类呈黄色、橙黄色或红色的多烯类化合物, 所有的光合生物以及许多非光合细菌、古菌和真菌均可在体内合成类胡萝卜素^[1-2]。类胡萝卜素具有着色、抗氧化、抑癌、防动脉硬化、增强免疫、有利视觉保护等多种功能, 在食品、饲料、化妆品、医药等方面具有广泛的应用前景^[3-4]。目前, 类胡萝卜素已被 FAO 和 WHO 等国际组织认定为 A 级营养色素, 并在 50 多个国家和地区作为营养、着色双重

功能的食品添加剂而被广泛应用于保健食品及医药和化妆品工业^[5]。类胡萝卜素通常可通过化学合成、植物提取和微生物发酵 3 种方法生产, 但由于微生物发酵法生产类胡萝卜素具有不受环境条件限制、便于工业化生产、工艺简单、质量稳定、成本低等优点, 因此近年来引起国内外的普遍重视。对产类胡萝卜素的细菌研究国内已有多篇文献报道^[6-10], 但对噬夏孢欧文氏菌(*Erwinia uredovora*)产类胡萝卜素方面的研究未见报道。

收稿日期: 2006-05-21

基金项目: 山东省博士基金资助项目(2003); 青岛市自然科学基金项目(05-1-JC-91)

作者简介: 李丽(1958-), 女, 实验师, 主要从事食品微生物研究。

国外虽对噬夏孢欧文氏菌产胡萝卜素开展了一些研究,但大多集中在类胡萝卜素合成相关基因和合成途径方面的研究^[11-12]。本实验以噬夏孢欧文氏菌为材料,研究了无机盐和碳氮源对该菌产生类胡萝卜素的影响,并对类胡萝卜素的稳定性进行了初探,以期对开发和利用该细菌生产天然类胡萝卜素提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

噬夏孢欧文氏菌(*Erwinia uredovora*) 20D3 菌株(ATCC 19321) 美国典型菌种保藏中心(ATCC)。

1.2 试剂

蛋白胨、酵母提取物 美国 Gibco 公司;牛肉浸膏 英国 Oxoid;其余试剂均为国产分析纯或色谱纯。

1.3 仪器

HZQ-X100 型振荡培养箱 哈尔滨东联电子技术有限公司;MP205B 型电子天平 上海精密天平公司;JYPC-II 型超声波细胞粉碎机 宁波新芝科学器材研究所;CR21G 高速冷冻离心机 日本 Hitachi;UV-1601 紫外可见分光光度计、LC-6A 高效液相色谱仪 Shimadzu;MLS-3020 型全自动高压蒸汽灭菌器 日本 SANYO。

1.4 培养基

1.4.1 无机盐实验培养基

在 LB 培养基中分别添加不同的无机盐成分。其中 KH_2PO_4 、 CaCl_2 、 MgSO_4 、 KCl 的加入量为 1g/L, ZnSO_4 为 0.2g/L, NiCl_2 、 CuSO_4 、 FeSO_4 为 0.018g/L。

1.4.2 碳源实验培养基

以 LB 培养基为基础配方,分别加入葡萄糖、麦芽糖、蔗糖和丙三醇,使培养基的添加碳量为 3.64g/L。

1.4.3 氮源实验培养基

以 LB 培养基中添加葡萄糖(10g/L)为基础培养基,分别用蛋白胨,酵母提取物,牛肉浸膏,尿素和硝酸氮取代基础培养基中的蛋白胨和酵母提取物,各培养基的总氮量为 1.76g/L。

1.4.4 碳源浓度梯度培养基

在 LB 培养基中加入不同量的葡萄糖,使培养基中的含碳量分别为 2.45、4.90、9.80、19.6、39.2g/L 和 78.4g/L, C:N 比分别为 1.25:1、2.5:1、5:1、10:1、20:1、40:1。

1.4.5 氮源浓度梯度培养基

将含有葡萄糖(10g/L)的 LB 培养基中酵母膏按不同量加入,配制成氮源浓度梯度培养基,使培养基中的含氮量分别为 0.36、0.73、1.46、1.94g/L 和 2.91g/L, C:N 比分别为 10:1、5:1、2.5:1、1.88:1、1.25:1。

1.5 方法

将菌株移接到新鲜的 LB 培养基斜面上,30℃培养 24h,挑取 1 环菌接种于装有 30ml LB 液体培养基的 100ml 三角瓶中,30℃振荡培养 12h,然后取此培养液 40μl 分别接入装有 100ml 各种供试液体培养基的 500ml 三角瓶中,30℃振荡(200r/min)培养 15h。所有实验均设 3 次重复。

1.6 生物量测定

取各三角瓶中的培养液分别以 8000r/min、4℃、离心 20min,收集并用蒸馏水洗涤菌体 2 次,60℃烘干至恒重后称重。

1.7 类胡萝卜素的提取及测定

取培养液 100ml,8000r/min、4℃、离心 20min,弃上清,用蒸馏水洗涤菌体 2 次。加入 25ml 丙酮,在冰水浴条件下,超声波破碎菌体细胞 10 次,每次 10s,每次间隔 90s。细胞裂解液 8000r/min、4℃、离心 20min,取上清液即为类胡萝卜素提取液。

将上述类胡萝卜素提取液以丙酮为参比,在分光光度计上测定其 455nm 的光吸收值,按下式计算类胡萝卜素的含量^[13]。

$$\text{类胡萝卜素含量}(\mu\text{g/g 菌体干重}) = \frac{(A_{\lambda_{\text{max}}} \times D \times V)}{0.16W}$$

式中, $A_{\lambda_{\text{max}}}$ 为类胡萝卜素最大吸收波长处的吸光度;D 为测定试样的稀释倍数;V 为提取色素所用溶剂量(ml);W 为菌体干重(g);0.16 为类胡萝卜素的消光系数。

1.8 类胡萝卜素成分分析

对从噬夏孢欧文氏菌细胞中抽提到的类胡萝卜素样品,采用高效液相色谱(HPLC)法进行了组分分析。经过多次测试,确定色谱条件为:

色谱柱:岛津 VP-ODSC₁₈ 柱(150 × 4.6mm, Φ 4μm);柱温:25℃。检测波长:454nm。进样量:10μl。流速:0.5ml/min。流动相:二氯甲烷:乙腈:甲醇=32:29:38:1 (V/V)。

2 结果与分析

2.1 不同无机盐对菌体生物量及类胡萝卜素产率的影响

从表 1 可看出,不同的无机盐对噬夏孢欧文氏菌生长和类胡萝卜素产生的影响不同。如果以 LB 培养基作为对照,在供试的 8 种无机盐中,除 FeSO_4 外其余 7 种对生长都有一定的促进作用,其中以 MgSO_4 效应最好,该无机盐不仅可促进噬夏孢欧文氏菌的生长,而且也有利于类胡萝卜素合成。

2.2 添加不同碳源物质对菌体生物量及类胡萝卜素产率的影响

从表 2 可以看出,在 LB 培养基中添加葡萄糖、蔗糖、麦芽糖或甘油均能提高噬夏孢欧文氏菌的细胞生物

表1 无机盐对菌体生物量及类胡萝卜素产率的影响

Table 1 Effects of inorganic salts on biomass and carotenoids yield of *Erwinia uredovora*

无机盐	菌体干重 W (μg)	类胡萝卜素含量 ($\mu\text{g/g}$)	类胡萝卜素产量 ($\mu\text{g/ml}$)
KH_2PO_4	391	132	0.52
NiCl_2	382	131	0.50
FeSO_4	295	126	0.37
CuSO_4	410	130	0.53
CaCl_2	420	128	0.54
MgSO_4	495	158	0.78
KCl	381	128	0.49
ZnSO_4	410	118	0.48
LB 培养基	329	130	0.43

表2 添加不同碳源物质对菌体生物量及类胡萝卜素产率的影响

Table 2 Effects of carbon sources on biomass and carotenoids yield of *Erwinia uredovora*

添加碳源	菌体干重 W (μg)	类胡萝卜素含量 ($\mu\text{g/g}$)	类胡萝卜素产量 ($\mu\text{g/ml}$)
葡萄糖	525	182	0.96
蔗糖	433	133	0.58
麦芽糖	583	111	0.65
丙三醇	562	143	0.80
LB 培养基	390	133	0.52

量和类胡萝卜素产量,但对类胡萝卜素含量的影响不尽一致。与 LB 培养基相比,添加蔗糖或麦芽糖虽能提高菌体生物量,但并没有使类胡萝卜素含量增加,只有添加葡萄糖或甘油可使类胡萝卜素含量明显增加。如添加葡萄糖时,类胡萝卜素含量和产量比未添加碳源的 LB 培养基的分别提高了 36.84% 和 84.62%。因此,若从类胡萝卜素产量考虑,葡萄糖是最合适的添加碳源。

2.3 不同氮源物质对菌体生物量及类胡萝卜素产率的影响

表3 不同氮源物质对菌体生物量及类胡萝卜素产率的影响

Table 3 Effects of nitrogen sources on biomass and carotenoids yield of *Erwinia uredovora*

氮源	菌体干重 W (μg)	类胡萝卜素含量 ($\mu\text{g/g}$)	类胡萝卜素产量 ($\mu\text{g/ml}$)
蛋白胨	298	104	0.31
酵母膏	428	201	0.86
牛肉膏	98	50	0.05
尿素	0	0	0
硝酸铵	0	0	0
蛋白胨+酵母膏(LB)	486	178	0.87

表3 结果显示,噬夏孢欧文氏菌在含有硝酸铵或尿素为唯一氮源的培养基中不能生长。以牛肉膏为氮源时,对该菌的生长和类胡萝卜素积累也不利。就菌体生物量、类胡萝卜素含量及产量而言,在使用的 5 种氮源中,酵母膏是最为理想的有机氮源。与 LB 培养基相比,单独使用酵母膏就可达到与 LB 培养基中混合使用

蛋白胨和酵母膏相似的作用,这说明酵母膏中不仅含有可供生长的氮源,可能还含有某些促进噬夏孢欧文氏菌生长或类胡萝卜素形成的因子。

2.4 碳源和氮源浓度对菌体生物量及类胡萝卜素产率的影响

根据对不同碳氮源种类对噬夏孢欧文氏菌生物量及类胡萝卜素产率影响的研究结果可知,酵母膏和葡萄糖分别是该菌的理想氮源和碳源。因此,本实验是在固定酵母膏含量(20g/L)或固定葡萄糖含量(10g/L)的基础上,改变葡萄糖或酵母膏含量,以研究不同碳氮源浓度(C:N 比)对菌体生物量及类胡萝卜素产率的影响。实验结果见表 4、5。

表4 碳源浓度对细胞生物量和类胡萝卜素产率的影响

Table 4 Effects of concentration of carbon sources on biomass and carotenoids yield of *Erwinia uredovora*

含碳量 (g/L)	C:N	菌体干重 W (μg)	类胡萝卜素含量 ($\mu\text{g/g}$)	类胡萝卜素产量 ($\mu\text{g/ml}$)
2.45	1.25:1	435	189	0.82
4.90	2.5:1	520	190	0.99
9.80	5:1	319	105	0.34
19.6	10:1	243	92	0.22
39.2	20:1	162	76	0.12
78.4	40:1	0	0	0

表5 氮源浓度对细胞生物量和类胡萝卜素产率的影响

Table 5 Effects of concentration of nitrogen sources on biomass and carotenoids yield of *Erwinia uredovora*

含氮量 (g/L)	氮源	菌体干重 W (μg)	类胡萝卜素含量 ($\mu\text{g/g}$)	类胡萝卜素产量 ($\mu\text{g/ml}$)
0.36	10:1	181	86	0.16
0.73	5:1	293	138	0.40
1.46	2.5:1	399	188	0.75
1.94	1.88:1	458	190	0.87
2.91	1.25:1	348	177	0.62

从表 4 可看出,在氮源浓度保持不变,碳源浓度呈梯度增加的培养基中,噬夏孢欧文氏菌的细胞生物量和类胡萝卜素产率受到明显的影响。C:N 比为 1.25:1~2.5:1 的较低水平的葡萄糖含量对噬夏孢欧文氏菌生长和类胡萝卜素合成较为有利,即当培养基的添加碳量为 2.45~4.90g/L 时(未包括酵母膏中的碳),均能增加细胞生物量和类胡萝卜素产率。当 C:N 比为 5:1~20:1 时(培养基的含碳量为 9.80~39.20g/L),细胞生物量、类胡萝卜素含量及产量依次降低。当 C:N 比升高到 40:1 时,没有菌体细胞和类胡萝卜素产生。由此可见,在固定氮源含量而改变碳源含量的情况下,最适碳氮比应为 1.25:1~2.5:1。

如果培养基的碳源浓度保持不变,氮源浓度呈梯度增加,也能影响细胞生物量和类胡萝卜素的积累。表 5 表明,当培养基中的含氮量较低时(0.36~0.73g/L),不

利于菌体的生长和类胡萝卜素的合成,当含氮量处于1.46~1.94g/L时,细胞生物量和类胡萝卜素产率最高。

综合以上实验结果,培养基中的含碳量保持在2.45~4.90g/L,含氮量保持在1.46~1.94g/L时,对噬夏孢欧文氏菌生长和类胡萝卜素合成均为有利,培养基的最适C:N约为2.5:1。

2.5 类胡萝卜素的稳定性研究

将抽提的类胡萝卜素的丙酮溶液置于室温(25℃)下,每隔24h测定其最大吸收波长($\lambda=455\text{nm}$)处的光吸收值,观察其变化。如图1可以看出类胡萝卜素在开始的24h内分解的速度较快,72h后类胡萝卜素的分解速度趋于稳定。由此可知,类胡萝卜素在室温条件下很不稳定。

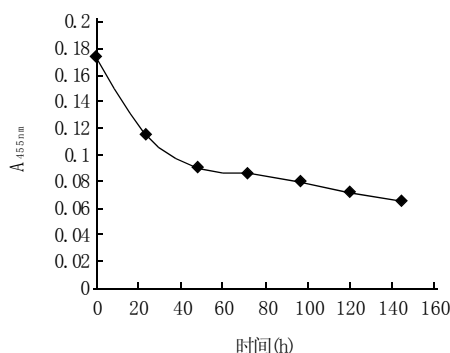


图1 类胡萝卜素在室温下的稳定性变化

Fig.1 Change of stability of carotenoids extracted from *Erwinia uredovora*

2.6 噬夏孢欧文氏菌中类胡萝卜素种类的初步测定

对噬夏孢欧文氏菌中的色素种类采用了高效液相色谱法(HPLC)进行测定,检测结果表明,该菌中含有多种天然色素。如图2所示,采用HPLC法共检测到11种。

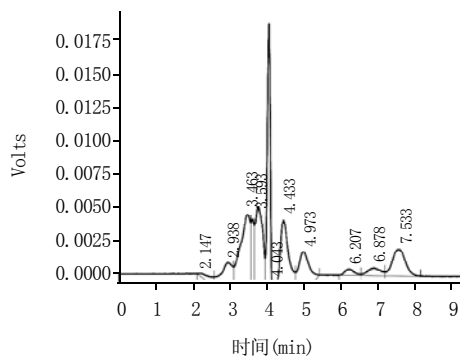


图2 噬夏孢欧文氏菌产生的类胡萝卜素色谱图

Fig.2 Chromatogram of carotenoids extracted from *Erwinia uredovora*

3 结论

本结果表明,供试的无机盐中大多数对噬夏孢欧文

氏菌(*Erwinia uredovora*)发酵生产类胡萝卜素产率的正效应影响有限,但 MgSO_4 可明显提高菌体生物量和类胡萝卜素产率。在供试的4种碳源中,葡萄糖是最适碳源,即在LB培养基中添加适量葡萄糖(10g/L)既有利于噬夏孢欧文氏菌的生长,也有利于该菌的类胡萝卜素合成。对噬夏孢欧文氏菌的氮源物质的筛选中,发现噬夏孢欧文氏菌不能利用无机氮源,在供试的有机氮源中酵母膏最有利于类胡萝卜素合成。培养基中的含碳量保持在2.45~4.90g/L,含氮量保持在1.46~1.94g/L时,对噬夏孢欧文氏菌生长和类胡萝卜素合成均为有利,培养基的最适C:N为2.5:1。稳定性的初步试验证明,所得到的类胡萝卜素丙酮溶液在常温条件下稳定性很差,容易分解。高效液相色谱法(HPLC)测定结果表明,噬夏孢欧文氏菌所含天然色素种类较多,已有文献报道噬夏孢欧文氏菌中至少含有番茄红素、 β -胡萝卜素、玉米黄素以及玉米黄素葡萄糖苷^[11-12]。

参考文献:

- [1] SANDMANN G. Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants [J]. Eur J Biochem, 1994, 223(1): 7-24.
- [2] PHADWAL K. Carotenoid biosynthetic pathway: molecular phylogenies and evolutionary behavior of crt genes in eubacteria [J]. Gene, 2005, 345(1): 35-43.
- [3] 王业勤, 李勤生. 天然类胡萝卜素—研究进展、生产、应用 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1997: 284-287.
- [4] PALOZZA P, MUZZALUPO R, TROMBINO S, et al. Solubilization and stabilization of β -carotene in liposomes: delivery to cultured cells [J]. Chemistry and Physics of Lipids, 2006, 139(1): 32-42.
- [5] NELIS H J, DE LEENHEER A P. Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds [J]. J Appl Bacteriol, 1991, 70: 181-191.
- [6] 张勇, 吴刚, 杨宝玉, 等. 一株产类胡萝卜素细菌的分离与鉴定 [J]. 水生生物学报, 2005, 29(2): 206-209.
- [7] 陆建联, 徐莺, 唐琳, 等. 产类胡萝卜素菌株的筛选及其培养条件初探 [J]. 应用与环境生物学报, 2004, 10(2): 202-205.
- [8] 周佳, 郭秒, 黄遵锡. 一株高产类胡萝卜素光合细菌Z1的研究 [J]. 中国食品添加剂, 2003(6): 46-49, 118.
- [9] 林连兵, 陈朝银, 贲昆龙, 等. 栖热菌属高温菌RH99-02菌株产类胡萝卜素的研究 [J]. 微生物学通报, 2002, 29(6): 43-46.
- [10] 崔战利, 汤晖, 张鸿雁, 等. 环境条件对光合细菌B.6菌株产生类胡萝卜素的影响 [J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2000, 12(1): 24-28.
- [11] MISAWA N, NAKAGAWA M, KOBAYASHI K, et al. Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli* [J]. J Bacteriol, 1990, 172(12): 6704-6712.
- [12] SCHNURR G, MISAWA N, SANDMANN G. Expression, purification and properties of lycopene cyclase from *Erwinia uredovora* [J]. Biochem J, 1996, 315: 869-874.
- [13] 叶辉, 李元光, 詹文毅, 等. 诺卡氏菌属5205菌株产生类胡萝卜素研究 [J]. 生物技术, 2001, 11(5): 12-15.