

# 番茄红素生产菌株的筛选

姜大伟

(吉林农业科技学院食品科学系, 吉林吉林 132101)

**摘要:** 本文采用光合细菌类生产番茄红素, 对本实验室保存的光合细菌菌株产生番茄红素能力进行了比较, 得到了番茄红素产量较高的菌株 *R. azotoformans* Y6, 其番茄红素产量为  $8.02 \times 10^{-3}$  mg/L。

**关键词:** 光合细菌; 筛选; 番茄红素

**中图分类号:** TS261.1<sup>+</sup>5; **文献标识码:** A; **文章篇号:** 1673-9078(2007)08-0020-03

## Screening of *Lycopene*-produced Strains from the Photo Synthetic Bacteria

JIANG Da-wei

(Department of Food Science, Jilin Agriculture Science and Technology, Jilin 132101, China)

**Abstract:** In this study the lycopene-produced strains were screened from 20 strains of photo synthetic bacteria (PSB) and *R. azotoformans* Y6 was chosen for its yield of lycopene ( $8.02 \times 10^{-3}$  mg/L).

**Key words:** photo synthetic bacteria; filtrate; lycopene

番茄红素属于类胡萝卜素, 多存在于植物和微生物中, 它是非常强的抗氧化剂, 能有效的清除氧自由基, 动物体不能合成。由于番茄红素等类胡萝卜素的生物价较低, 仅靠食用番茄及其制品提供的番茄红素不能满足正常生理需求, 因此研究来源于光合细菌等其他种类生物的番茄红素并能实现低成本规模生产, 进而适量添加到食品中或者作为药品来使用显得非常必要。本研究针对本实验室保存的 20 株光合细菌进行筛选, 使用高效液相分析检测每一株细菌细胞中番茄红素的含量, 确定出一种最佳的菌株。

### 1 材料与方法

#### 1.1 菌种来源

菌株为我院发酵实验室保存 20 株菌, 本实验室将他们分别编号为: 7-1, 9-1, A2, IF0, J1, J3, R1, S1, S3, X, Y6, YT-1, YJ-1, YJ-3, YJ-4, YJ-5, YJ-6, YJ-7, YJ-8, 绿色。

#### 1.2 实验试剂与仪器

乙酸乙酯为色谱纯、二氯甲烷为分析纯、高效液相色谱仪(日本岛津公司 LC-VP 系列)、分析柱(Kromsail 公司 C18 反相色谱柱)、超声波细胞破碎仪(SONICS VCX 500)、高速离心机(SORVALL LEGEND, RT)。

#### 1.3 RCVBN 培养基(v/v)配方

收稿日期: 2007-06-06

作者简介: 姜大伟(1963-), 男, 副教授, 硕士, 研究方向: 食品科学

无机盐溶液 10%; 20% D.L-苹果酸溶液 2%; 微量元素溶液 0.1%; 20% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液 0.5%; 生长因子溶液 0.1%; 磷酸缓冲液 1.5%; pH 6.8, 121 °C, 灭菌 20 min。(RCVBN 半固体培养基即在此基础上加 0.5%的琼脂粉)。

#### 1.4 菌体培养

将冰箱(-20 °C)保存的菌种在 RCVBN 半固体培养基中穿刺接种, 于 30 °C 1500 lx 光照温箱中培养 48 h, 再转接至 5 mL 液体培养基的试管中, 30 °C 温箱中培养 48 h (1500 lx), 即为液体种子。穿刺培养物作为菌种封口保存于冰箱中。

按 10%接种量将活化后的液体种子接种于新鲜的 RCVBN 液体培养基中(100 mL/250 mL 三角瓶), 静置于 30 °C 温箱中(1500-2000 lx 光照强度), 培养 48 h, 为实验备用。发酵实验中, 培养方法相同, 按 10%接种量逐级放大。

#### 1.5 色素提取

##### 1.5.1 菌体收集及洗涤

将光合细菌培养液 10000 r/min 离心 10 min 获得细胞, 生理盐水洗涤两次, 得光合细菌菌体。某些光合细菌菌体分离较困难。分离时可按 菌液:工业酒精=2:1 (v:v) 的比例加入工业酒精, 摇匀后 12000 r/min 离心 10 min。

##### 1.5.2 菌体破碎及类胡萝卜素的提取

将收集的菌体加入磷酸缓冲液至 20 mL, 然后进行超声波破碎。破碎频率为破碎 5 s 间隔 5 s。一般 20

mL 菌液破 40 min, 5 mL 菌液破 20 min。破碎后的菌液加入 20 mL 的含 1% BHT (二丁基羟基甲苯) 的乙酸乙酯进行萃取, 萃取时不断震荡使之充分混合, 一段时间后萃取液 12000 r/min 离心 5 min, 使之分层, 取上清液即为萃取出的色素溶液。

### 1.6 番茄红素含量测定

#### 1.6.1 色谱分析条件

参照文献的方法确立了两套 HPLC 的分析方法。

方法 I 的流动相为 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH:CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O=32:38:29:1 (v/v/v/v), 流速为 1 mL/min, 温度为 30 °C。色素的保留时间较短, 可用以快速分析得到番茄红素的含量。

方法 II 的流动相为 CH<sub>3</sub>OH:CH<sub>3</sub>CN=40:60 (v:v), 流速为 0.7 mL/min, 温度为 30 °C。色素的保留时间较长, 利于不同色素峰的区别, 可用于色素的制备及性质分析。

色谱柱是 kromsail 公司 C18 反相色谱柱 (150 mm×4.6 mm, φ4 μm), 检测器选用紫外检测器, 检测波长为 474 nm。

#### 1.6.2 标准曲线的制备

精确称取 5 mg 番茄红素标准品, 用二氯甲烷溶解后, 定容至 25 mL, 使其质量浓度为 0.2 mg/mL, 然后用二氯甲烷依次稀释成系列浓度: 0.1 mg/mL、0.05 mg/mL、0.025 mg/mL、0.0125 mg/mL、0.00625 mg/mL, 经 HPLC 测定后绘制标准曲线。0.1 mg/mL 的番茄红素标准品分析图谱见图 1, 标准曲线见图 2。

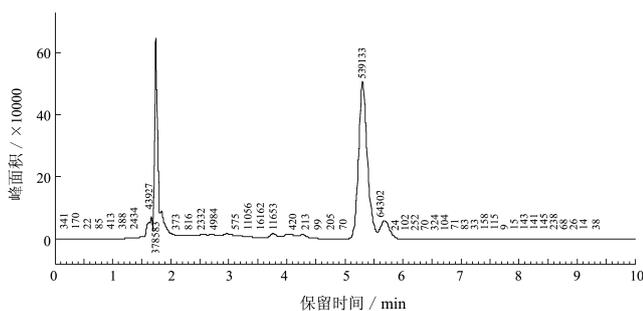


图 1 0.1 mg/mL 的番茄红素标准品分析图谱

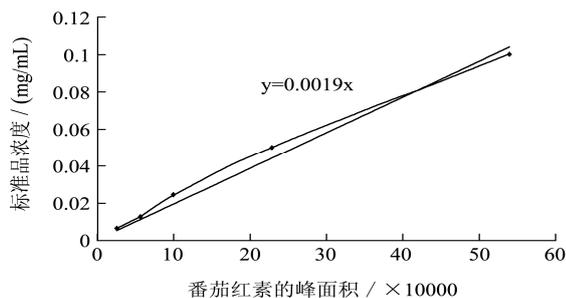


图 2 番茄红素的标准曲线图

由图 2 的标准曲线可得到番茄红素浓度与测得峰面积的对应关系为:

$$\text{番茄红素浓度 (mg/mL)} = \text{测得的峰面积} \times (1.9 \times 10^{-7})$$

#### 1.6.3 样品高效液相色谱分析

取破碎菌体萃取上清液 12000 r/min 离心 5 min, 再次取上清液, 上柱前经过 0.45 μm 孔径的无菌滤膜过滤除菌, 进样量为 10 μL, 每个样品的分析时间设为 10 min, 得到色素的 HPLC 分析图谱。

## 2 实验结果与分析

利用高效液相色谱分析色素提取液, 采用流动相 I 时, 利用标准品加入的方法确定番茄红素的出峰时间在 5.3 min 左右 (见图 3)。分析后发现, 20 株菌中, 有 11 株产番茄红素。产番茄红素菌株分别为: YJ-7, YJ-8, YJ-1, R1, YJ-5, YJ-4, YT-1, J3, J1, 绿色和 *R. azotoformans* Y6。

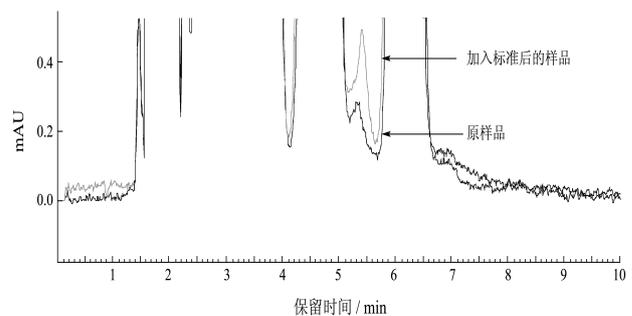


图 3 加入番茄红素标准品验证的 HPLC 分析图谱

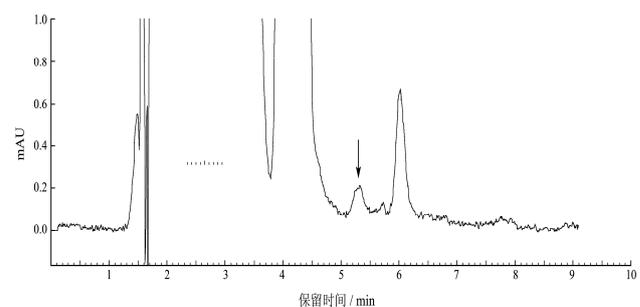


图 4 Y6 菌株的 HPLC 分析图谱, 番茄红素峰面积 2110

图 4 为 Y6 菌株提取色素的 HPLC 分析图谱, 其中番茄红素的峰面积为 2110, 由公式计算得提取的样品中番茄红素浓度为  $4.01 \times 10^{-4}$  mg/mL。实验中 1L 培养液得到 4 g 菌体, 按照 1.5.2 方法, 所以菌体的色素产量应为:

$$(4.01 \times 10^{-4} \text{ mg/mL} \times 20 \text{ mL}) \div 4 \text{ g} = 0.20 \times 10^{-2} \text{ mg/g}$$

而培养液的色素产量为:

$$(4.01 \times 10^{-4} \text{ mg/mL} \times 20 \text{ mL}) \div 1 \text{ L} = 8.02 \times 10^{-3} \text{ mg/L}$$

按照同样的方法, 计算得到了另外 10 株的色素含量, 见表 1。

表 1 各菌株液相分析及色素含量数据表

菌株	色素浓度/ $\times 10^{-4}$ mg/mL	样品量/mL	每升培养液的菌重/g	菌体色素产量/ $\times 10^{-2}$ mg/g	培养液色素产量/ $\times 10^{-3}$ mg/L
7-1	2.340	20	1.000	0.230	2.340
YJ-7	0.840	20	0.038	0.440	0.150
YJ-1	0.420	20	0.020	0.320	0.060
R1	1.220	20	0.040	0.640	0.230
YJ-5	0.390	20	0.010	0.320	0.050
YJ-4	3.610	20	0.04	1.900	0.690
YT-1	0.100	20	0.006	0.120	0.008
J3	0.130	20	0.012	0.120	0.014
J1	0.210	20	0.036	0.110	0.039
绿色	1.80	20	0.640	0.220	1.400
Y6	4.010	20	3.970	0.200	8.020

分析结果发现, YJ-4 的菌体色素含量非常高, 可是这株细菌与其它一些细菌面临同一个问题, 即它们的生长情况太差。表中每升培养液的菌是在培养 48 h 后得到的, 此时 Y6 已经达到了将近 4 g, 而除 7-1 和绿色菌以外的其他细菌产量都不及它的 1/10, 7-1 和绿色菌也只有 1 g 和 0.64 g, 因此对于每升培养液的色素产量来讲, Y6 的产量是最高的, 达到了  $8.02 \times 10^{-3}$  mg/L。而选取生长条件最好的 Y6 菌株做进一步的优化实验是比较合适的。

### 3 结论

由试验可知, 在本实验室保存的 20 株光合细菌中, 有 11 株产番茄红素。产番茄红素菌株分别为: YJ-7、YJ-8、YJ-1、R1、YJ-5、YJ-4、YT-1、J3、J1、绿色和 *R. azotofomans* Y6。分析表明, 对于每升培养

液的色素产量来讲, Y6 的产量是最高的, 达到了  $8.02 \times 10^{-3}$  mg/L。而选取生长条件最好的 Y6 菌株做进一步的优化实验是比较合适的。

### 参考文献

- [1] 杜桂彩,滕大为,李荣贵,等.金盏菊中叶黄素的分离纯化及高效液相色谱的测定方法[J].精细化工, 2001.18(8):467-469
- [2] 范永仙,许尧兴.微生物产类胡萝卜素的研究进展[J].食品与发酵工业,2003,7:69-74
- [3] 黄象艳,钱新民.光对光合细菌生长及色素合成的影响[J].山东大学学报(自然科学版),1996 31(3):347-350
- [4] 刘春朝,钱新民,高登文,等.光合细菌饲料添加剂的生产及其对肉鸡生长性能的影响[J].中国饲料,1995,9:14-15

### 消暑喝冰啤温度不能太低

夏季天气闷热,朋友们一起小聚难免要喝几杯冰啤酒,爽口又爽心。可是你知道吗,畅饮冰啤酒对身体并不好,在饮用冰啤酒的时候,一定要注意酒的温度不能过低。

存放在冰箱里的啤酒应控制在 5~10 摄氏度,因为啤酒所含二氧化碳的溶解度是随温度高低而变化的,啤酒各种成分在这一温度区间协调平衡,能形成最佳口味。温度过低的啤酒不仅不好喝,而且会使酒液中的蛋白质发生分解、游离,营养成分受到破坏。

很多人喜欢畅饮冰啤酒,接连喝下四五瓶不在话下。如果这样的话,喝进去的大量水分会很快排出,但酒精会迅速被吸收,使血液中的血铅量增高。如果连续如此作战,那就会抑制、影响细胞的正常活力,也可能导致脂肪堆积从而阻断核糖核酸的合成,造成“啤酒心”、“将军肚”,影响心脏的正常功能。大瓶啤酒容量一般为 640 毫升,建议每天饮用量不超过 1000 毫升。