

## 黑葡萄穗霉菌生防细菌 LY424 产天然红色素特性的研究

李紫嫣, 杨慧慈, 李龙飞, 穆守臣, 赵志龙, 许俊杰, 钟文文\* (临沂大学药学院, 山东临沂 276000)

**摘要** [目的]研究黑葡萄穗霉菌(*Starchybotrys chartarum*)生防细菌 LY424 产天然红色素的特性。[方法]培养菌株、提取色素,测定吸收峰和色素色价,探讨不同条件对红色素稳定性的影响。[结果]红色素的紫外吸收值在波长 524 nm 处;色素色价为 66.93;易溶于极性溶剂;酸碱度和温度对色素影响较小;易被强氧化剂氧化;金属离子对色素的影响不明显;保存该色素的条件为密封避光。[结论]该红色素产量和稳定性较高,可以作为一种天然色素资源进行开发。

**关键词** 天然红色素;色价;稳定性

中图分类号 Q939.9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)05-0051-03

## Study on Characteristics of a LY424 Bacterial Strain to Produce Natural Red Pigment

LI Zi-yan, YANG Hui-ci, LI Long-fei, ZHONG Wen-wen\* et al (School of Pharmacy, Linyi University, Linyi, Shandong 276000)

**Abstract** [Objective] The basic characteristics of a LY424 bacterial strain which can prevent and control the growth of *Starchybotrys chartarum* to produce the natural red pigment were studied. [Method] To culture strain and extract pigment, determine absorption peak and color value and the influence of different conditions on the stability of red pigment. [Result] The maximum UV absorption value of the natural red pigment was at 524 nm, the color value was 66.93, the red pigment also dissolved in polar solvents very easily, its color could not be affected by pH, temperature and metal ions, easily oxidized by the strong oxidizer, at this time it was concluded that the pigment need to be kept under conditions of no light and air. [Conclusion] The red pigment has higher production and better stability, so can be used as a natural pigment resource for development.

**Key words** Natural red pigment; Color value; Stability

目前,色素已广泛应用于日常生活及科学研究的各个领域。食品着色经历了这样的一个发展过程:天然色素—人工合成色素—天然色素与人工合成色素并用—更加安全稳定的天然食用色素<sup>[1]</sup>。随着医学毒理和生物学的不断深入,发现允许使用的人工合成色素中,大多数种类对人体有不同程度的伤害,尤其是致癌<sup>[2]</sup>、致畸、致突变,已引起人们的高度重视。因此,天然色素越来越受到人们的青睐<sup>[3]</sup>。与合成色素相比,天然色素具有无毒副作用、安全性高、有一定的营养价值和保健功能、着色比较自然、更接近于天然物质的颜色等特点。天然色素不仅广泛应用于饮料、酒类、糕点、糖果等饮料和食品当中<sup>[4]</sup>,也可应用于医药和化妆品生产,这便要求有广阔的色素来源。目前,对天然色素的研究主要集中在植物与微生物领域<sup>[5]</sup>。自然界中微生物能产生色素的种类非常丰富,通过微生物发酵生产色素<sup>[6]</sup>,不受资源、环境和空间的限制,是高效、低成本获得目标色素的有效途径。笔者通过研究黑葡萄穗霉菌(*Starchybotrys chartarum*)生防细菌 LY424,探明该细菌菌株产红色素的基本特性及其稳定性,以期为进一步研究开发利用菌株资源打下良好基础。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

**1.1.1 菌株。**黑葡萄穗霉菌生防细菌 LY424 细菌菌株<sup>[7]</sup>由临沂大学微生物重点实验室从土壤中分离保藏。

**1.1.2 供试培养基。**PDA 培养基<sup>[7]</sup>。

**1.1.3 主要仪器。**TU-1810 紫外可见分光光度计,超净工作台,DS-1 型高速离心机,恒温生化培养箱,电热水浴锅,高压灭菌锅,紫光灯。

## 1.2 方法

**1.2.1 菌株的培养。**将菌种用划线法接到 PDA 培养基上,置于 30℃ 恒温生化培养箱中培养 24 h。

**1.2.2 色素的提取。**用无菌蒸馏水将菌体及其色素等从平板培养基上完全洗下,放烧杯内用 DS-1 型细胞破碎仪在 12 000 r/min 转速下破碎 10 min,然后再用离心机,在 4℃ 下以 11 000 r/min 反复离心洗涤除去菌体,留上部色素液。

**1.2.3 紫外光谱扫描。**将“1.2.2”所得色素液用 TU-1810 紫外可见分光光度计扫描,并以灵菌红素纯品(由中国海洋大学医药学院提供)为对照,找出最大吸收波长<sup>[8]</sup>。

**1.2.4 红色素色价的测定。**取 2 g 的菌体及其代谢物混合体,加无菌蒸馏水以离心的方法反复洗脱胞外色素,得上部色素液后定容到 50 mL,然后称菌体湿重,从 2 g 混合物中减去菌体重量后可得红色代谢产物的质量。以蒸馏水为参照测色素液在最大吸收峰处的吸光度,用公式计算色价<sup>[9]</sup>:

$$\text{色素色价} = \text{吸光度} \times \text{稀释倍数} / \text{质量}$$

**1.2.5 色素稳定性的研究。**色素与有机溶剂的相溶性检测:取 12 支试管,在室温下分别加入 3 mL 的甲醇、乙醇、甲醛、丙酮、甲酸、水、二甲苯、乙酸乙酯、四氯化碳、四氯甲烷、液体石蜡、甘油,然后给每支试管加入 3 mL 色素液,同时观察相溶性和颜色变化,以后隔不同的时间段测可溶溶液的吸光度,分析其色变情况。

不同 pH 溶液处理色素:取等量的色素液,分别用 HCl 和 NaOH 调节 pH 为 2、4、6、8、10、12、14,观察色素色调变化,并分别测其吸光度。

不同温度下处理色素:取等量的色素液装入试管中,放室温以及 40、60、80、100℃ 下在不同的时段观察色素的色调变化,并分别测其吸光度。

色素在不同金属盐离子溶液中的变化:取相同体积的色

基金项目 国家级大学生创新项目(201510452017,201610452041)。  
作者简介 李紫嫣(1996—),女,山东东营人,本科生,专业:制药工程。  
\* 通讯作者,讲师,从事微生物分离鉴定及生物农药研究。  
收稿日期 2016-12-19

素液装入试管中,分别加入0.2 g的不同盐,观察当时溶液的变化,并分别测其吸光度,24 h后再测其吸光度,对比分析金属离子对色素的影响情况。

**氧化还原剂对色素的影响:**取80 mL色素液等量分装在8支试管中,依次编号为1、2、3、4、5、6、7和8,1~4号分别加入0.1、0.3、0.6、1.0 mL  $H_2O_2$ ,5~8号分别加入0.05、0.10、0.20、0.40 g的 $Na_2SO_3$ ,观察颜色变化,并分别测其吸光度。

**可见光和紫外光对色素的影响:**将装有色素液的试管放在可见光和紫外光下,分别在不同的时段观察其变化结果。

**自然光下2种保存色素方法比较:**取等量50 mL色素液分装在磨口瓶里,一只用紧塞不透气的橡胶塞,一只用可透过空气但可隔离细菌的透膜封口,在不同的时段测定吸光度。

## 2 结果与分析

**2.1 紫外-可见光谱扫描分析** 色素的紫外可见光扫描图谱见图1。由图1可知,该色素在波长524 nm处有最大吸收峰,说明该色素的分子结构具有很大的共轭体系,可能有很多共轭双键、苯环或类似苯环的共轭结构,或含杂原子的一些杂环,故在生态条件的研究中可测定色素溶液在波长524 nm处的吸收值来研究色素的产量,同时为下一步色素的鉴定提供一定的依据。

出现分层现象,均表现不溶性。由此推知,色素化学结构中含有双键、羰基和醛基等极性基团。

表1 不同溶剂与色素的相容性

Table 1 Compatibility of different solvents and pigments

试剂 Reagent	相容性 Compatibility	现象 Phenomenon
甲醇 Methanol	可溶	鲜红
乙醇 Ethanol	可溶	鲜红
甲醛 Methanal	可溶	鲜红
丙酮 Acetone	可溶	鲜红
甲酸 Methane acid	易溶	略紫红
水 Water	可溶	深红
二甲苯 Xylene	不溶	分层
乙酸乙酯 Ethyl acetate	不溶	分层
四氯化碳 Carbon tetrachloride	不溶	分层
三氯甲烷 Chloroform	不溶	分层

**2.4 不同pH对色素的影响** 从表2看出,该菌红色素在pH 2~6的酸性环境均表现紫红色,且颜色和最大吸光度基本一致;在碱性环境中颜色明显不同,pH 8~12时呈现桃红色,pH 14时呈现橘红色。由此可知,pH对该菌红色素的稳定性有一定影响。

表2 不同pH对色素的影响

Table 2 Effects of different pH on pigment

pH	OD <sub>524</sub>	颜色 Color
原液 Crude liquid	2.694	鲜红
2	3.029	紫红
4	3.070	紫红
6	3.011	紫红
8	2.963	桃红
10	2.755	桃红
12	2.449	桃红
14	2.363	橘红

**2.5 不同温度对色素的影响** 从表3看出,该菌红色素在室温下,随着加热时间延长其OD<sub>524</sub>和残存率均有所变化,但变化幅度较小,说明红色素在室温下较为稳定;在40~60℃下处理时,其OD<sub>524</sub>和残存率变化不大,说明在该温度范围内色素保持良好的稳定性;在80℃下OD<sub>524</sub>和残存率变化幅度均较大,可知该温度下色素有部分降解现象,高温影响色素的稳定性;温度达到100℃时,OD<sub>524</sub>和残存率变化幅度进一步扩大,OD<sub>524</sub>小到1.572,残存率降低到55.24%。由此可知,该色素稳定性随温度的升高而降低。

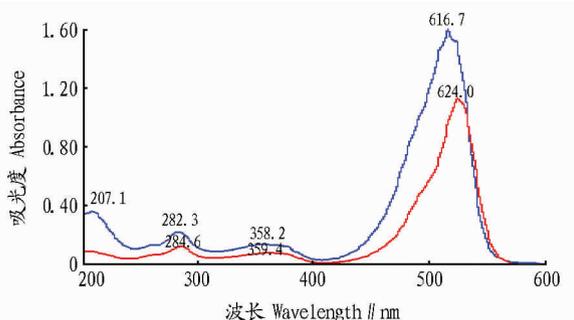


图1 色素的紫外光谱分析

Fig. 1 UV spectrophotometry analysis of pigment

**2.2 色素的色价测定** 通过称量计算得红色代谢物湿重为1.1542 g,其稀释50倍后在最大吸收波长524 nm处的吸光度为1.545,带入公式计算得色素色价为66.93。

**2.3 与有机溶剂的相容性** 从表1看出,用甲醇、乙醇、甲醛、丙酮、甲酸和水几类极性溶剂洗脱菌体后,溶液不分层,均表现可溶性或者易溶性,说明色素结构中含有极性基团。用二甲苯、乙酸乙酯、四氯化碳和三氯甲烷洗脱菌体后,溶液

表3 不同温度对红色素的影响

Table 3 Effects of different temperature on red pigment

加热时间 Heating time h	室温 Room temperature		40℃		60℃		80℃		100℃	
	OD <sub>524</sub>	残存率 Residual rate//%	OD <sub>524</sub>	残存率 Residual rate//%	OD <sub>524</sub>	残存率 Residual rate//%	OD <sub>524</sub>	残存率 Residual rate//%	OD <sub>524</sub>	残存率 Residual rate//%
0	2.865	100	2.769	100	2.850	100	2.794	100	2.846	100
1	2.863	99.93	2.767	99.93	2.844	99.79	2.701	96.67	2.735	96.11
3	2.859	99.79	2.762	99.75	2.814	98.74	2.602	93.13	2.602	91.92
5	2.858	99.75	2.758	99.60	2.742	96.21	2.485	88.94	2.469	86.75
7	2.851	99.51	2.716	98.09	2.697	94.63	2.314	82.82	2.015	70.80
10	2.803	97.84	2.685	96.97	2.650	92.98	2.103	75.27	1.572	55.24

**2.6 金属离子的影响** 从表 4 看出,不加金属离子时原液均呈桃红色,加入金属离子 24 h 后原液颜色发生不同变化,Na<sup>+</sup> 溶液颜色不变,Fe<sup>3+</sup> 溶液逐渐变成灰色,Mn<sup>2+</sup> 溶液由桃红色变成紫红色,Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> 两溶液由桃红色变成红色。由此可知,金属离子 Fe<sup>3+</sup> 和 Mn<sup>2+</sup> 加入原液后颜色变化较大,原因是它们具有较强的氧化性,而其他金属离子则无此特性,原因是它们均无氧化性。

表 4 不同金属离子对色素的影响

Table 4 Effects of different metal ions on pigment

盐离子 Salt ions	OD <sub>524</sub>		颜色 Color	
	原液	24 h 后	原液	24 h 后
	Crude liquid	After 24 h	Crude liquid	After 24 h
Na <sup>+</sup>	2.141	2.128	桃红色	桃红色
Fe <sup>3+</sup>	2.157	0.125	桃红色	灰色
Mn <sup>2+</sup>	2.197	2.519	桃红色	紫红色
Ca <sup>2+</sup>	2.139	2.424	桃红色	红色
Mg <sup>2+</sup>	2.121	2.059	桃红色	红色

**2.7 氧化还原剂对色素的影响** 从表 5 吸光度及残存率看出,在原液中加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>,1~4 号的吸光度均有所减小而且变化幅度较大,颜色由鲜红色逐步变成浅红色;加入 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 的 5~8 号的吸光度亦有所减小且变化幅度较小,颜色由鲜红色变为桃红色,说明氧化剂对色素具有一定的降解作用。

表 5 不同氧化还原剂对色素的影响

Table 5 Effects of different oxidant and reducer on pigment

编号 No.	OD <sub>524</sub>	残存率 Residual rate//%	颜色 Color
原液 Crude liquid	2.132	100	鲜红色
1	1.896	88.92	桃红色
2	1.625	76.22	浅红色
3	1.569	73.59	浅红色
4	1.006	47.18	淡红色
5	2.103	98.64	鲜红色
6	1.969	92.35	鲜红色
7	1.899	89.07	桃红色
8	1.856	87.05	桃红色

**2.8 光照对色素的影响** 从表 6 看出,可见光下随着时间的延长,色素的吸光度和残存率均逐渐减小,说明该色素在可见光下容易发生降解,其对光稳定性较差;在紫外光下,随着时间的延长色素吸光度和残存率均减小,说明紫外光对该色素亦有降解作用。

表 6 光照对色素的影响

Table 6 Effects of different lights on pigment

时间 Time//h	可见光 Visible light		紫外光 Ultraviolet	
	OD <sub>524</sub>	残存率 Residual rate//%	OD <sub>524</sub>	残存率 Residual rate//%
0	2.365	100	2.331	100
0.5	2.347	99.24	2.310	99.14
1.5	2.327	98.39	2.302	98.80
2.0	2.326	98.35	2.304	98.88
5.0	2.308	97.59	2.281	97.90
24.0	1.856	78.48	1.876	80.51
72.0	0.565	23.89	1.562	67.04

**2.9 色素的保存方法** 从表 7 看出,色素的吸光度和残存率随时间延长均逐渐减小,且减小幅度较大,说明暴露空气的情况下,色素因氧气存在而降解;在封闭条件下,残存率和 OD<sub>524</sub> 均减小,但减小幅度不大,说明封闭条件下有利于色素的稳定。

表 7 保存方式对色素的影响

Table 7 Effects of preservation methods on pigment

时间 Time//h	通气 In air		封闭 No air	
	OD <sub>524</sub>	残存率 Residual rate//%	OD <sub>524</sub>	残存率 Residual rate//%
0	2.223	100	2.017	100
1	2.113	94.64	1.973	97.75
3	1.751	78.91	1.725	85.67
5	1.217	54.74	1.668	82.55
9	1.058	47.56	1.576	78.09
15	0.528	23.66	1.553	76.97

### 3 结论与讨论

该色素在波长 524 nm 处有最大吸收峰,袁保红等<sup>[10]</sup>报道的色素最大吸收峰为 534 nm,由此推测该色素的分子结构存在共轭体系,可能有很多共轭双键、苯环或类似苯环的共轭结构,或含杂原子的一些杂环。至于该色素的具体结构和影响结构稳定的基因有待于进一步测定。

参照国家色素测定标准<sup>[11]</sup>,经测定该菌株所产红色色素色价为 66.93,说明该色素产量较高,可以作为一种天然色素资源进行开发,前景较为广阔。

细菌 LY424 产生的红色素可以有效抑制黑葡萄穗霉菌的生长,因此该菌株还可以作为生防菌来研究开发,具有良好的应用前景。

pH 对该菌红色素的稳定性有一定影响,在 pH 2~6 时颜色逐渐变成紫色,在 pH 8~12 时色素颜色逐渐变成淡红色。用甲醇、乙醇、甲醛、丙酮、甲酸和水几类极性溶剂洗脱菌体后,均表现可溶性;用二甲苯、乙酸乙酯、四氯化碳和三氯甲烷洗脱菌体后,均表现不溶性。该菌红色素在室温下较为稳定;在 40~60 °C 下处理时,色素保持良好稳定性;在 80 °C 下色素有部分降解现象;温度达到 100 °C 时色素稳定性较差。不加金属离子时原液均呈桃红色,加入金属离子 Fe<sup>3+</sup> 和 Mn<sup>2+</sup> 后颜色变化较大,原因是它们具有较强的氧化性,而其他金属离子对色素颜色影响不大。加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 后,色素颜色逐渐变为无色;加入 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 后,色素颜色无变化。该色素长期暴露空气时降解速度加快,因此在储藏时应密封保存。

### 参考文献

- [1] 于华忠,李国章,唐克华,等.一株细菌红色素的基本特性研究[J].现代食品科技,2005,21(1):66-68.
- [2] 阎炳宗.我国天然色素的现状及其发展方针[J].中国食品添加剂,1999(2):49-51.
- [3] 乔华.天然食用色素色泽稳定性的研究及应用[D].太原:山西大学,2006:1-58.
- [4] 杨志娟.我国天然色素的现状与发展方针[J].食品研究与开发,2003,24(2):3-5.
- [5] 唐克华,杨金龙,陈建华,等.一株 G-短杆菌红色素的特性研究[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2004,30(6):522-525.
- [6] 王君,张宝善.微生物生产天然色素的研究进展[J].微生物学通报,2007,34(3):580-583.

醇 4000 质量分数为 30% 时,蛋白质的回收率达到最佳值。从分配理论上解释,随着聚乙二醇 4000 量增加,黏度增大,阻止相间分子转移的能力增加,相界面张力亦增加。当聚乙二醇 4000 用量较低时,硫酸铵的盐析作用起主要作用,使蛋白质大部分分布在下相中<sup>[9]</sup>。

**2.3 苦瓜子衣色素蛋白的纯化** 苦瓜子衣色素粗蛋白样品上 DEAE 阴离子交换柱,共得到 2 个洗脱峰。进一步纯化目的蛋白,将洗脱液继续上 Sephadex G-100 凝胶柱,共得到 1 个吸收峰(图 1)。进行 SDS-PAGE 检测,如图 2 所示,电泳结果示仅为 1 条带,说明其已经达到电泳纯,分子量为 74.10 kD。

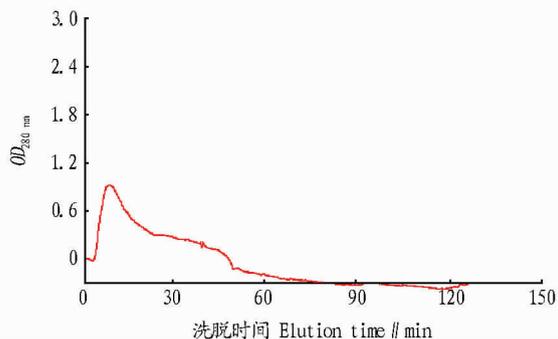
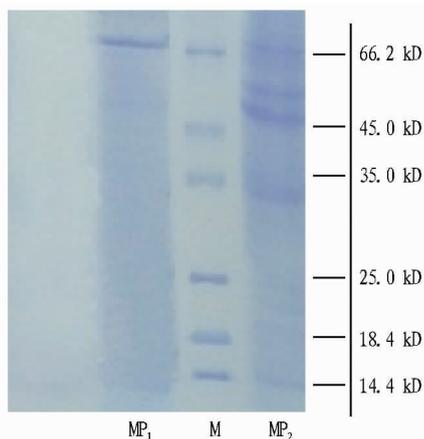


图 1 苦瓜子衣色素蛋白过 Sephadex G-100 柱层析图谱

Fig. 1 Sephadex G-100 column chromatogram of *Momordica charantia* sub-skin pigment protein



注:MP<sub>1</sub>. 纯化苦瓜子衣色素蛋白;MP<sub>2</sub>. 粗提苦瓜子色素蛋白;M. 标准蛋白

Note:MP<sub>1</sub>. Purified *M. charantia* sub-skin pigment protein;MP<sub>2</sub>. Crude extracted *M. charantia* pigment protein;M. Standard protein

图 2 纯化苦瓜子衣色素蛋白的 SDS-PAGE

Fig. 2 SDS-PAGE of purified *Momordica charantia* pigment protein

**2.4 苦瓜子衣色素纯化蛋白的抗氧化作用** 由表 5 可知,苦瓜子衣纯化蛋白和粗蛋白均具有抗氧化能力,其清除羟自

由基的能力随着质量浓度的增加抗氧化性增强,但苦瓜子衣纯化蛋白在同等质量浓度下均稍弱于粗蛋白,原因可能是粗蛋白中含多种具抗氧化活性的蛋白共同产生作用。

表 5 样品浓度对羟自由基清除率的影响

Table 5 Effects of sample concentration on scavenging rate of hydroxy radical

样品浓度 Sample//mg/mL	清除率 Scavenging rate//%	
	纯化蛋白 Purified protein	粗蛋白 Crude protein
0.5	4.9	8.7
1.0	11.2	20.3
1.5	23.6	27.2
2.0	31.1	36.0
3.0	50.1	51.2
4.0	54.7	60.3

### 3 结论与讨论

该试验采用传统的乙酸乙酯法提取苦瓜子衣色素,确定苦瓜子衣色素提取的最佳条件。采用新兴的双水相法提取苦瓜子衣色素蛋白,为苦瓜子衣色素蛋白的提取开创新的途径。双水相法分离不同物质,系统中的聚乙二醇、硫酸铵的质量分数、pH、盐离子浓度等均不相同<sup>[10]</sup>,此法减少了蛋白的流失,且特异性强,有机试剂用量少,不必进行脱盐处理,简化了试验操作。

该试验发现,苦瓜子衣色素粗蛋白和纯化蛋白具有不同程度的抗氧化能力,苦瓜子衣色素蛋白粗提液中成分复杂,可能含有多种抗氧化能力的蛋白,因此苦瓜子衣色素粗蛋白的抗氧化活性大于纯化蛋白。苦瓜子衣色素蛋白是一种良好的、无毒害、纯天然的抗氧化物质,对其进行深入研究将为大规模生产抗氧化制剂奠定坚实基础。

### 参考文献

- [1] 彭子模,李进,孟冬丽.植物源天然色素的开发与应用研究现状与展望[J].新疆师范大学学报(自然科学版),2000,19(4):44-45.
- [2] 刘璇,时祥柱,叶秀云.苦瓜子中一种抗胰蛋白肽的分离及抗真菌作用观察[J].福州大学学报,2008,36(1):148-151.
- [3] 王先远,蒋与刚,金宏,等.苦瓜子皂甙的抗氧化作用初探[J].解放军预防医学杂志,2001,19(5):317-332.
- [4] 傅明辉.苦瓜子蛋白的分离、纯化及其抗氧化作用的研究[J].药物生物技术,2001,8(5):248-250.
- [5] 黄淑霞,吴晓莉,尹卓容. PEG/(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 双水相体系提取和纯化糖化酶[J].酿酒科技,2003(2):24-25.
- [6] QIN G F. Effects of *Momordica charantia* extract on fertility of male rats[J]. Journal of guiyang medical college,1995,10(3):167-169.
- [7] WEI M H, WEI M X, LIU Z, et al. Research in the comparison of ribosome-inactivating protein between luffa cylindrica and *Momordica charantia* Linn [J]. Journal of henan university(Natural science),2002,30(1):115-118.
- [8] 周红航,王维香.聚乙二醇/硫酸铵双水相体系萃取猪胰蛋白酶[J].化工进展,2009,28(2):305-308.
- [9] 郑楠,刘杰.双水相萃取技术分离纯化蛋白质的研究[J].化学与生物工程,2006,23(10):7-9.
- [10] MOKHTARANI B, KARIMZADEH R, AMINI M H, et al. Partitioning of ciprofloxacin in aqueous two-phase system of poly(ethylene glycol) and sodium sulphate[J]. Biochemical engineering journal, 2008, 38(2): 241-247.

(上接第 53 页)

- [7] 许俊杰,钟文文. LY424 细菌菌株产红色素条件的优化[J].山东农业大学学报(自然科学版),2010,41(1):39-44.
- [8] 袁保红,杜青平,蔡创华,等.海洋细菌 *Pseudomonas* sp. 色素的提取及稳定性的研究[J].海洋通报,2005,24(6):92-96.
- [9] 杨涛,林亲录,马美湖.高价位低粘霉素红曲色素的提取研究[J].食品

科技,2005,21(3):51-66.

- [10] 袁保红,杜青平,蔡创华,等.一株新海洋细菌生物学特性及其色素性质的研究[J].广州药学院学报,2005,21(2):183-186.
- [11] 郝名慧,楼志华,张梁,等.一株新粘质沙雷氏菌发酵产红色素及其结构的研究[J].天然产物研究与开发,2007(19):439-442.