

一株产黄色素细菌的筛选鉴定及其产黄色素培养条件优化

尤田, 严佳佳, 彭亚彬, 何湾湾, 王德培*, 高强*

(教育部工业发酵微生物重点实验室, 天津市微生物代谢与发酵过程控制技术工程中心, 生物工程国家级实验教学示范中心, 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 对一株从芦苇根部土壤中分离得到的产黄色素菌株 BX-1 进行分离鉴定并优化 BX-1 菌株产黄色素培养条件。采用形态学观察、分子生物学鉴定方法与单因素、正交试验的试验设计, 可得 BX-1 菌株为革兰氏阳性细菌, 盐生谷氨酸杆菌 (*Glutamicibacter halophytocola*); 该菌株产胞内黄色素, 易溶于甲醇, 在 411、438、467 nm 处存在吸收峰; BX-1 菌株最适固态培养条件: 20 °C 光照培养 240 h; 固态培养基组成为 3% 谷氨酸钠、3% 豆粕粉、0.5% 酵母浸出粉、1% 氯化钠、0.25% 磷酸二氢钾、0.1% 硫酸镁、初始 pH7.0。

关键词: 盐生谷氨酸杆菌; 黄色素; 菌种鉴定; 固态培养; 条件优化

Screening and Identification of A Yellow Pigment-producing Bacterium and Optimization of Its Culture Conditions

YOU Tian, YAN Jia-jia, PENG Ya-bin, HE Wan-wan, WANG De-pei*, GAO Qiang*

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology of Ministry of Education, Tianjin Microbial Metabolism and Fermentation Process Control Technology Engineering Center, National Demonstration Center for Bioengineering Experimental Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: A yellow pigment-producing strain BX-1 isolated from reed root soil was isolated and identified, and the culture conditions of yellow pigment produced by BX-1 strain were optimized. By using morphological observation, molecular biology identification method, and single factor and orthogonal experimental designs, the strain BX-1 was Gram-positive bacterium and *Glutamicibacter halophytocola*. The strain produced intra-cellular yellow pigment, which was soluble in methanol and had absorption peaks at 411, 438 nm and 467 nm. The optimum solid-state culture conditions of the strain BX-1 were as follows. The colony was cultured at 20 °C for 240 h, and the solid culture medium was composed of 3% sodium glutamate, 3% soybean meal powder, 0.5% yeast extract powder, 1% sodium chloride, 0.25% potassium dihydrogen phosphate, and 0.1% magnesium sulfate, with the initial pH7.0.

Key words: *Glutamicibacter halophytocola*; yellow pigment; strain identification; solid culture; condition optimization

引文格式:

尤田, 严佳佳, 彭亚彬, 等. 一株产黄色素细菌的筛选鉴定及其产黄色素培养条件优化[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(5): 184-193.

YOU Tian, YAN Jiajia, PENG Yabin, et al. Screening and Identification of A Yellow Pigment-producing Bacterium and Optimization of Its Culture Conditions[J]. Food Research and Development, 2023, 44(5): 184-193.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31902193); 天津自然科学基金重点项目(20JCZDJC00140)

作者简介: 尤田(1996—), 男(汉), 在读硕士研究生, 研究方向: 生物与医药。

* 通信作者: 王德培(1972—), 女(汉), 教授, 博士, 研究方向: 应用微生物和发酵工程; 高强(1965—), 男(汉), 教授, 博士, 研究方向: 生物与医药。

色素在日常生活与工业生产中有着重要的作用^[1]。天然黄色素多来源于动物、植物、矿物质和微生物^[2]；微生物黄色素则多产于细菌、酵母、丝状真菌和微藻，在来源可控、性质稳定和易于下游加工等方面优于植物和动物色素^[1-3]。近年来已报道多种产黄色素的真菌、细菌(如红曲霉菌)，已发现的其产黄色素种类有44种，其中Takahashi等^[4]研究的红曲黄色素黄单胞菌素A和黄单胞菌素B混合物，已经实现产业化；粒毛盘菌产胞外脂溶性四环三萜类衍生物黄色素对多数食品添加剂的稳定性良好^[5]；海胆共生菌鞘氨醇单胞菌产黄色素易溶于不同极性的常见有机溶剂中，对光稳定性好^[6]；藤黄微球菌产黄色素具有抗氧化、抗菌、抗辐射作用^[7]等。可见天然微生物来源黄色素具有生理活性与保健功能，如抗氧化、抗癌、抗肿瘤、抗糖尿病、抗肥胖、抗炎等作用^[8]，并广泛应用于食品、化妆品、制药等行业中^[1,9]，在国内外市场上有着广泛的应用前景^[10]。然而，除少数天然、半天然红曲黄色素可大规模生产、销售外，天然黄色素市场上多为植物提取类黄色素，未见其他种类微生物天然黄色素产品^[11]。因此，筛选新的高产优质黄色素菌株以及开发、生产安全、廉价、优质的天然微生物黄色素具有广阔的应用前景与经济潜力。

本研究从芦苇根部土壤中分离到一株产黄色素细菌，对细菌种属进行鉴定，并对其所产黄色素的性质及其合成色素的培养条件进行研究，为进一步开发利用此菌株生产黄色素提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

酵母浸出粉、胰蛋白胨：英国Oxoid公司；葡萄糖、果糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖：天津北方天医试剂公司；氯化钠、乙酸钠、柠檬酸钠、谷氨酸钠、甘油、可溶性淀粉：天津市化学试剂一厂；大豆蛋白胨、酪蛋白胨、蛋白粉、豆粕粉、黄豆饼粉、花生饼粉、牛肉膏：北京奥博星生物技术有限责任公司；氯化铵、硫酸铵、乙酸铵、尿素：天津市永大化学试剂开发中心；甲醇(色谱纯)：天津市科密欧化学试剂有限公司；DNA聚合酶：武汉金开瑞生物工程公司。除特殊标注外，其它试剂均为分析纯。

LB培养基：5 g/L 酵母浸出粉、10 g/L 胰蛋白胨、10 g/L 氯化钠。

1.2 仪器与设备

DELTA320型pH计：梅特勒-托利多仪器有限公司；TCL-12型台式高速冷冻离心机：湖南湘仪仪器有限公司；NU-T5型紫外分光光度计：天津市华伟科技有限公司；DL-820D型超声波振荡器：宏富信精密科技(北京)有限公司；BX-43型光学显微镜：日本OLYMPUS公司；伯乐T100型PCR基因扩增仪：上海皓庄仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 产黄色素细菌的筛选

取1 g芦苇根部土壤加入到50 mL灭菌的LB液体培养基中，37℃、180 r/min振荡培养12 h；取1 mL菌悬液富集培养，将富集菌液稀释10⁶倍，取100 μL稀释液涂布于LB固体培养基上^[12]，培养一段时间后出现亮黄色菌落，挑取菌落分离纯化3次。挑取单菌落至LB固体斜面培养基上，编号BX-1菌株，置于4℃冰箱备用。

1.3.2 菌株的鉴定

从斜面上挑取BX-1单菌落至灭菌的LB液体培养基中，30℃、180 r/min振荡培养12 h，取10 μL菌液进行革兰氏染色，在光学显微镜下观察细胞形态。

取菌液稀释并置于基因扩增仪中98℃裂解10 min，以裂解菌液为模板，以通用引物27F(5'-AGAGTTTG-ATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-GGTTACCTTGT-TACGACTT-3')对菌株16S rRNA基因进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增^[13]。PCR体系：模板1 μL、上游引物27F和下游引物1492R各1 μL、DNA聚合酶12.5 μL、ddH₂O 9.5 μL。PCR程序：95℃预变性5 min、95℃变性30 s、55℃退火30 s、72℃延伸45 s并循环30次、72℃再延伸10 min。PCR产物取2 μL进行琼脂糖凝胶电泳验证，将产物送至金唯智公司测序。测序结果通过NCBI数据库进行同源性对比分析以明确菌株的种属关系，选取同源性高的16S rRNA基因，并通过MEGA7软件以邻接法构建系统发育树^[14]。

1.3.3 黄色素提取与光谱特性分析

刮取LB固体培养基上的BX-1菌落0.1 g，加入甲醇溶液2 mL，在40℃水浴条件下超声裂解15 min，8 000 r/min离心5 min，获得黄色素提取液^[15]。以甲醇为空白对照，用紫外分光光度计对甲醇黄色素提取液进行全波段扫描。

1.3.4 固态培养条件优化

1.3.4.1 不同培养温度对BX-1菌株产黄色素的影响

取2 μL BX-1活化菌液点种于LB固态培养基上，并分别放置于37、30、28、20℃温度下培养240 h。因胞内色素产量与其菌体量呈正相关，故以菌落直径、菌落颜色变化和初步提取胞内色素OD_{438 nm}值作为试验分析依据。每隔48 h观察记录菌落形态、大小与颜色变化，每组3个平行。

1.3.4.2 不同光照条件对BX-1菌株产黄色素的影响

取2 μL BX-1活化菌液点种于LB固态培养基上，并分别放置于白炽灯光与黑暗无光条件下培养240 h，每隔48 h观察记录菌落形态、大小与颜色变化，每组3个平行。

1.3.5 固态培养基优化

1.3.5.1 不同碳源对BX-1菌株产黄色素的影响

在LB固体培养基的基础上，分别添加1%葡萄糖、

果糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖、乙酸钠、柠檬酸钠、谷氨酸钠、甘油、可溶性淀粉,共10种不同的碳源。取2 μ L BX-1 活化菌液点种于添加不同碳源的固态培养基上培养240 h,每隔48 h观察记录菌落形态、大小与颜色变化,每组3个平行。

1.3.5.2 不同氮源对 BX-1 菌株产黄色素的影响

在LB固体培养基的基础上,分别添加1%酵母浸出粉、胰蛋白胨、大豆蛋白胨、酪蛋白胨、牛肉膏、蛋白粉、豆粕粉、黄豆饼粉、花生饼粉、氯化铵、硫酸铵、乙酸铵、尿素,共13种不同的氮源。取2 μ L BX-1 活化菌液点种于添加不同氮源的固态培养基上培养240 h,每隔48 h观察记录菌落形态、大小与颜色变化,每组3个平行。

1.3.5.3 不同初始 pH 值对 BX-1 菌株产黄色素的影响

用4 mol/L 盐酸或氢氧化钠溶液分别调节培养基初始pH值为5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0。取2 μ L BX-1 活化菌液点种于不同初始pH值的固态培养基上培养240 h,每隔48 h观察记录菌落形态、大小与颜色变化,每组3个平行。

1.3.5.4 最适碳、氮源种类与磷元素浓度正交试验

根据碳、氮源单因素试验分别选取3种对BX-1菌株产黄色素影响效果最好的碳、氮源,碳源:1%可溶性淀粉、1%谷氨酸钠、1%葡萄糖。氮源:1%酵母浸出粉、1%豆粕粉、1%牛肉膏。查阅文献[16]可知磷酸二氢钾与硫酸镁对细菌产黄色素有明显的促进效果。故选取0.10%、0.15%、0.20%磷酸二氢钾与3种碳源、3种氮源,使用Minitab 18正交设计软件,设计 $L_9(3^3)$ 正交试验,以确定最佳碳、氮源种类与磷酸二氢钾浓度。分别在固态培养基上培养240 h,每隔48 h观察记录菌落形态、大小与颜色变化,每组3个平行。正交试验设计见表1, $L_9(3^3)$ 正交试验分组见表2。

表1 $L_9(3^3)$ 碳、氮源种类与磷酸二氢钾浓度正交试验设计

Table 1 $L_9(3^3)$ Orthogonal experimental design of carbon and nitrogen source types and potassium dihydrogen phosphate concentration

水平	A 碳源种类	B 氮源种类	C 磷酸二氢钾浓度/%
1	可溶性淀粉	酵母浸出粉	0.10
2	谷氨酸钠	豆粕粉	0.15
3	葡萄糖	牛肉膏	0.20

表2 $L_9(3^3)$ 碳、氮源种类与磷酸二氢钾浓度正交试验分组

Table 2 $L_9(3^3)$ Orthogonal test grouping table of carbon and nitrogen source types and potassium dihydrogen phosphate concentration

试验组	A 碳源种类	B 氮源种类	C 磷酸二氢钾浓度/%
第1组	1	1	1
第2组	1	2	2
第3组	1	3	3
第4组	2	1	2

续表2 $L_9(3^3)$ 碳、氮源种类与磷酸二氢钾浓度正交试验分组
Continue table 2 $L_9(3^3)$ Orthogonal test grouping table of carbon and nitrogen source types and potassium dihydrogen phosphate concentration

试验组	A 碳源种类	B 氮源种类	C 磷酸二氢钾浓度/%
第5组	2	2	3
第6组	2	3	1
第7组	3	1	3
第8组	3	2	1
第9组	3	3	2

注:除表2所列9组正交试验组外,另设置对照组LB培养基组。

1.3.5.5 最适碳、氮源、硫酸镁浓度与初始 pH 值正交试验

根据1.3.5.3与1.3.5.4的试验结果,选取不同浓度的谷氨酸钠、豆粕粉和硫酸镁,与不同初始pH值,使用Minitab 18正交设计软件,设计 $L_9(3^4)$ 正交试验,以确定最适谷氨酸钠、豆粕粉和硫酸镁浓度与初始pH值。分别在固态培养基上培养240 h,每隔48 h观察记录菌落形态、大小与颜色变化,每组3个平行。正交试验设计见表3, $L_9(3^4)$ 正交试验分组见表4。

表3 $L_9(3^4)$ 谷氨酸钠、豆粕粉、硫酸镁浓度与初始 pH 值正交试验设计

Table 3 $L_9(3^4)$ Orthogonal test grouping table of concentrations of sodium glutamate, soybean meal powder, magnesium sulfate, and initial pH value

水平	a 谷氨酸钠 浓度/%	b 豆粕粉 浓度/%	c 硫酸镁 浓度/%	d 初始 pH 值
1	2	3	0.10	8.0
2	3	2	0.05	7.0
3	4	1	0.15	6.0

表4 $L_9(3^4)$ 谷氨酸钠、豆粕粉、硫酸镁浓度与初始 pH 值正交试验分组

Table 4 $L_9(3^4)$ Orthogonal experimental design of concentrations of sodium glutamate, soybean meal powder, magnesium sulfate, and initial pH value

试验组	a 谷氨酸钠 浓度/%	b 豆粕粉 浓度/%	c 硫酸镁 浓度/%	d 初始 pH 值
第1组	1	1	1	1
第2组	1	2	2	2
第3组	1	3	3	3
第4组	2	1	2	3
第5组	2	2	3	1
第6组	2	3	1	2
第7组	3	1	3	2
第8组	3	2	1	3
第9组	3	3	2	1

1.4 数据处理

所有试验均设置3组平行,结果取平均值,并使用Origin 9.0 版软件对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 产黄色素菌株的筛选结果

对从土壤中分离获得的亮黄色菌株以三区划线法分离转接纯化3次,在LB培养基上筛选出分离纯化后的亮黄色菌株,结果见图1。



图1 BX-1 菌株
Fig.1 BX-1 strain

由图1可知,菌株编号为BX-1。在LB培养基上,BX-1菌落呈圆形凸起、表明光滑、边缘整齐。BX-1菌株所产黄色素为胞内色素,无向培养基渗透现象。

2.2 BX-1 菌株的鉴定结果

对BX-1菌株进行革兰氏染色,BX-1菌株革兰氏染色镜检显微放大图见图2。

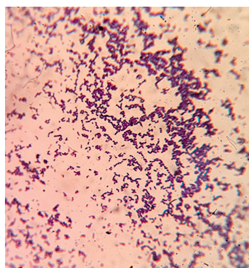


图2 BX-1 菌株革兰氏染色镜检显微放大图
Fig.2 Microscopic magnification of Gram staining of BX-1 strain

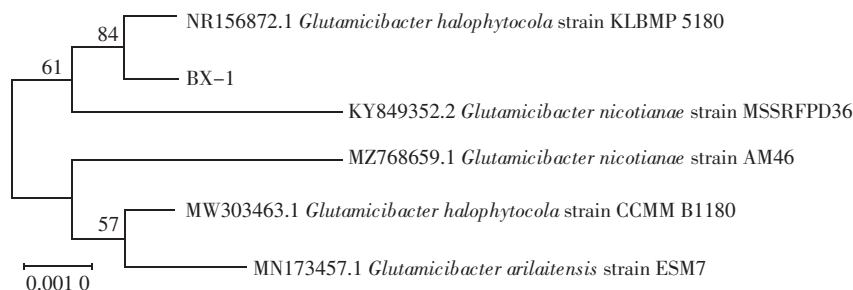


图4 基于16S rRNA序列BX-1菌株的系统发育树
Fig.4 Phylogenetic tree of BX-1 strain based on 16S rRNA sequence

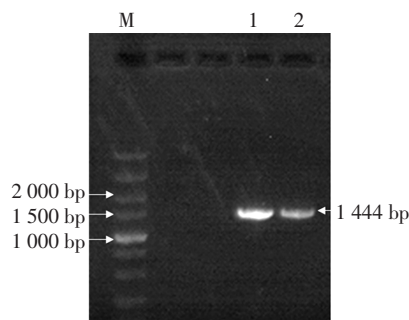
峰最高。

叶黄素标品的紫外吸收光谱见图6。

紫外吸收光谱有助于确定色素的结构^[18],由图6可知,叶黄素标品的紫外吸收光谱与BX-1菌株胞内黄色素的光谱特性相似。推测BX-1菌株产胞内黄色素可能为接近叶黄素的类胡萝卜素。

由图2可知,在1000倍显微镜下观察,BX-1菌株呈短杆状、密集堆叠排列、无芽孢,为革兰氏阳性细菌。

对BX-1菌株16S rRNA基因进行PCR扩增,结果见图3。



M.电泳 Marker 条带;1,2.PCR 扩增产物条带。

图3 BX-1 菌株16S rRNA 基因PCR电泳图
Fig.3 PCR electrophoresis of 16S rRNA gene of BX-1 strain

由图3可知,扩增产物条带于1500 bp处明亮清晰。将PCR扩增序列送至金唯智公司测序。扩增产物测序结果经NCBI数据库进行同源性比对,选取同源性较高的16S rRNA基因序列,构建系统发育树,结果如图4所示。

由图4可知,BX-1菌株与盐生谷氨酸杆菌(*Glutamicibacter halophytocola*)的亲缘关系最近^[17],处于系统发育树的同一分枝,确定BX-1菌株为*G. halophytocola*,即盐生谷氨酸杆菌。

2.3 黄色素提取与光谱分析结果

BX-1菌体经超声波破碎,甲醇提取胞内黄色素,全波段扫描提取液结果见图5。

由图5可知,BX-1菌株胞内黄色素共有3个吸收峰,分别处于411、438、467 nm,其中438 nm处吸收

2.4 BX-1 菌株产黄色素最适固态培养条件优化结果

2.4.1 不同培养温度对BX-1产黄色素的影响

按1.3.4.1中的方法在不同温度下培养BX-1菌株,菌落直径测量结果见图7。

由图7可知,在20℃与37℃培养条件下,菌株生长均较为缓慢;在30℃与28℃培养条件下生长较快、

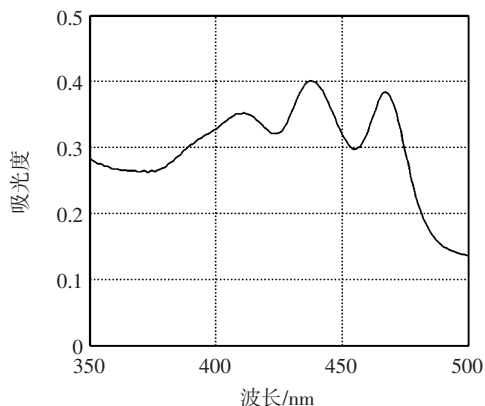


图5 BX-1菌株胞内黄色素紫外吸收光谱

Fig.5 Ultraviolet absorption spectra of intracellular yellow pigment of BX-1 strain

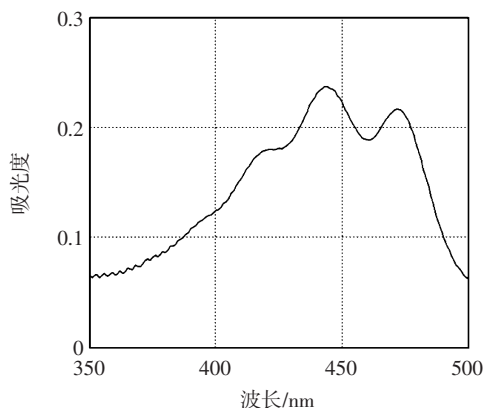


图6 叶黄素标准品紫外吸收光谱

Fig.6 Ultraviolet absorption spectrum of lutein standard

菌苔厚实。肉眼观察菌落颜色,可知培养至240 h时,只有20℃培养条件下菌落呈现亮黄色。其它温度下,菌体生长呈现出部分浅黄色或乳白色。在相同条件下提取不同菌落的黄色素,可见20℃条件下培养的BX-1菌株产黄色素在438 nm处OD值最高,明显高于其它温度条件。故推测,BX-1菌株为温敏型黄色素产生

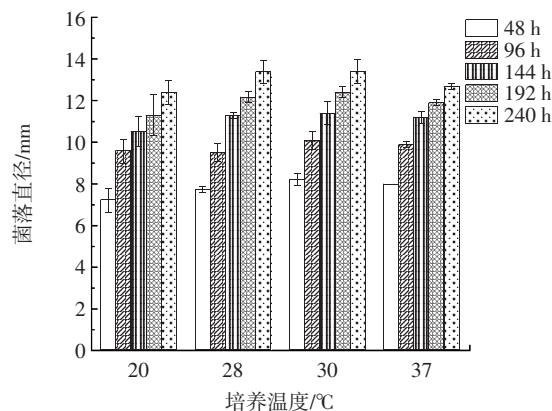


图7 BX-1菌株在不同培养温度下的菌落直径与产黄色素OD值

Fig.7 Colony diameter of BX-1 strain at different culture temperatures and OD value of yellow pigment

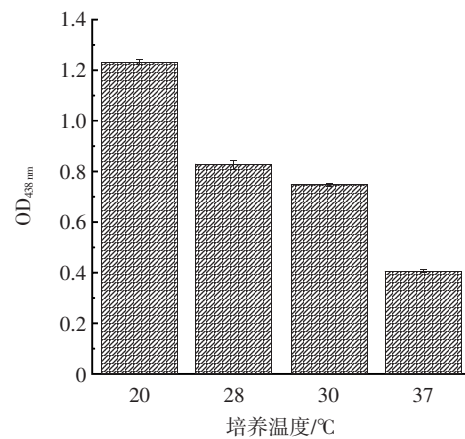


图7 BX-1菌株在不同培养温度下的菌落直径与产黄色素OD值

Fig.7 Colony diameter of BX-1 strain at different culture temperatures and OD value of yellow pigment

菌^[19],可能存在黄色素合成温度调控元件,低温环境下启动相关基因的表达转录^[20]。考虑试验条件与资源能耗的合理利用,选择20℃作为BX-1菌株产黄色素的培养温度。

2.4.2 不同光照条件对BX-1产黄色素的影响

BX-1菌株经不同光照条件培养的菌落直径与产黄色素OD值见图8。

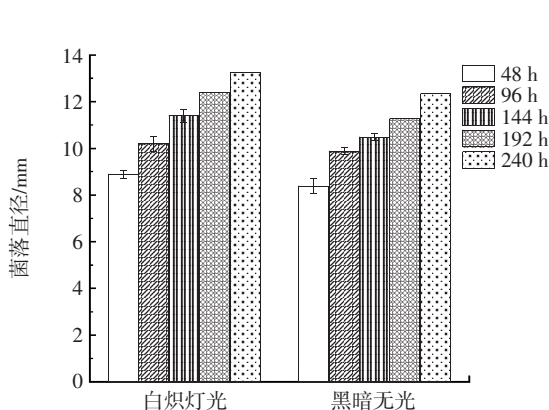
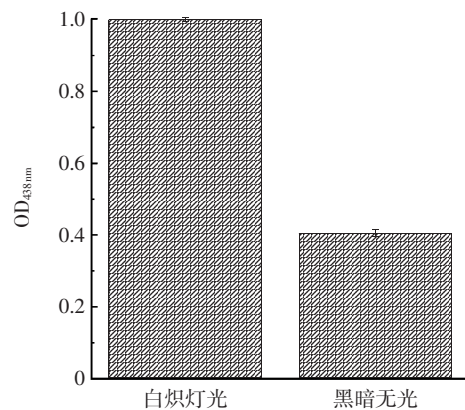


图8 BX-1菌株经不同光照条件培养的菌落直径与产黄色素OD值

Fig.8 Moss diameter of BX-1 strain cultured under different light conditions and OD value of yellow pigment



由图8可知,白炽灯光与黑暗无光条件下 BX-1 菌株培养至 240 h 均可快速生长,白炽灯光照培养生长较快,黑暗条件生长较慢。肉眼观察菌落颜色,可见白炽灯光照条件下, BX-1 菌株培养至 48 h 即产生黄色素,至 240 h 菌落呈亮黄色且菌苔厚实;黑暗条件下培养至 144 h 时菌落才呈现黄色。在相同条件下提取不同菌落的黄色素,白炽灯光照培养的 BX-1 菌株产黄色素在 438 nm 处 OD 值最高,明显高于黑暗组。

由图8可知,光照的刺激会诱导 BX-1 菌株大量合成黄色素。光是自然界的能量来源,也是调节生命活动的重要信号,光能影响细菌的生长发育、生理周期及次生代谢产物的产生^[21]。Mohana 等^[22]研究表明生存在高辐射环境下的藤黄微球菌所产黄色素可吸收紫外线来保护自身。故 BX-1 菌株受可见光光照刺激时,合成黄色素相关代谢途径可能会更加活跃,产生大量黄色素以对抗外部环境变化。

根据培养 BX-1 菌株时的菌落形态变化发现,菌株培养超过 240 h 后,菌落呈现老化现象,故统一培养观察至 240 h,以保证试验的稳定性与准确性。综上, BX-1 菌株产黄色素最适固态培养条件优化结果为 BX-1 菌株放置于 20 °C 光照培养 240 h。

2.5 BX-1 菌株产黄色素最适固态培养基优化结果

2.5.1 碳源对 BX-1 产黄色素的影响

不同碳源培养 240 h 的 BX-1 菌株的菌落直径测量结果见图 9。

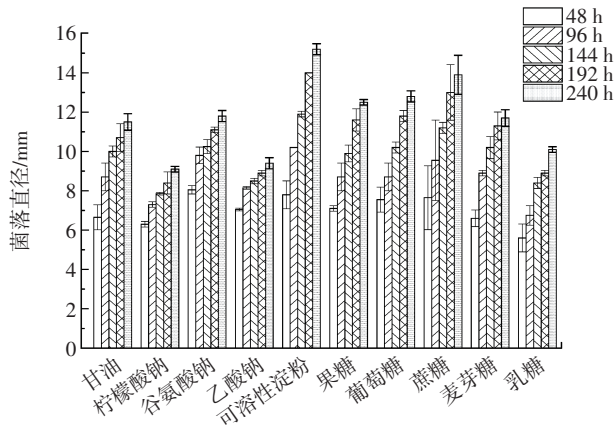


图9 BX-1 菌株在不同碳源培养基上的菌落直径

Fig.9 Bacterial moss photos of BX-1 strain cultured on different carbon sources

由图9可知, BX-1 菌株具有多种碳源适应性,培养至 240 h 均可快速生长。其中,以可溶性淀粉作为碳源的 BX-1 菌株生长最快,菌落直径最大;其次为蔗糖、葡萄糖、果糖、谷氨酸钠;以柠檬酸钠、乙酸钠为碳源的 BX-1 菌株生长缓慢。肉眼观察菌落颜色,可见培养至 240 h,在谷氨酸钠、柠檬酸钠、可溶性淀粉作为碳源的培养基上 BX-1 菌落均呈现亮黄色且菌苔厚实; BX-1 在

其他 7 类碳源上菌落颜色较浅,呈白色或浅黄色。

因此, BX-1 菌株最适产黄色素碳源为可溶性淀粉。 BX-1 菌株可产生淀粉酶来分解利用可溶性淀粉以促使菌落快速生长,同时在分解淀粉的代谢过程中可促使菌株积累次生代谢产物黄色素^[23]。

2.5.2 不同氮源对 BX-1 产黄色素的影响

不同氮源培养的 BX-1 菌株,菌落直径测量结果见图 10。

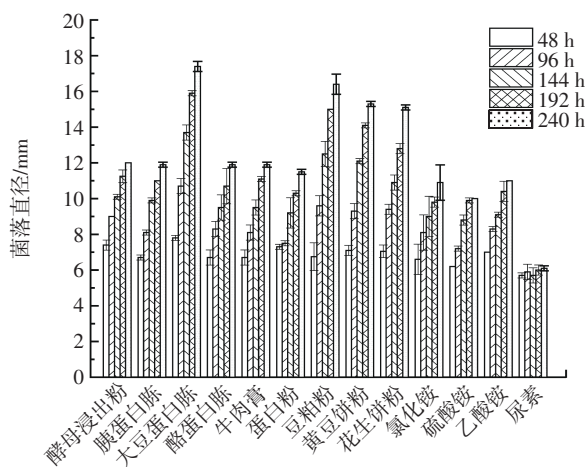


图10 BX-1 菌株在不同氮源培养基上的菌落直径

Fig.10 BX-1 bacterial moss diameter on different nitrogen source medium

由图10可知, BX-1 菌株对多种有机氮源均可很好利用,其中以大豆蛋白胨为氮源时, BX-1 菌株长势最快,菌落直径最大;豆粕粉、黄豆饼粉、花生饼粉等有机氮源也可促使菌株快速生长; BX-1 菌株在无机氮源尿素、乙酸铵、硫酸铵、氯化铵中生长最缓慢。肉眼观察菌落颜色,可见培养至 240 h 时,以牛肉膏、酵母浸出粉、胰蛋白胨、酪蛋白胨、豆粕粉、黄豆饼粉为氮源时, BX-1 菌落呈现亮黄色且菌苔厚实;在其他氮源上, BX-1 菌落则呈现白色、乳白色或浅黄色。

BX-1 菌株利用天然有机蛋白质作为氮源可积累大量黄色素,能够利用无机氮源生长但产黄色素量较低。可见其黄色素积累可能受天然有机蛋白质中某些氨基酸分子或小肽的诱导,促使胞内黄色素的快速代谢合成^[24]。大豆蛋白胨可以促使菌株快速生长但不诱导菌株产黄色素,所以初步选择豆粕粉作为氮源。

2.5.3 初始 pH 值对 BX-1 产黄色素的影响

不同初始 pH 值培养基上培养的 BX-1 菌落直径测量结果见图 11。

由图11可知, BX-1 菌株在 pH6.0~11.0 范围内均可快速生长。在初始 pH 值为 6.0 时, BX-1 菌株生长最快,菌落直径最大;在初始 pH 值为 6.5~8.5 时,菌落直径相近无明显差异。在初始 pH 值大于 10.0 或小于 6.0 时, BX-1 菌株生长缓慢,菌落直径较小。肉眼观察菌

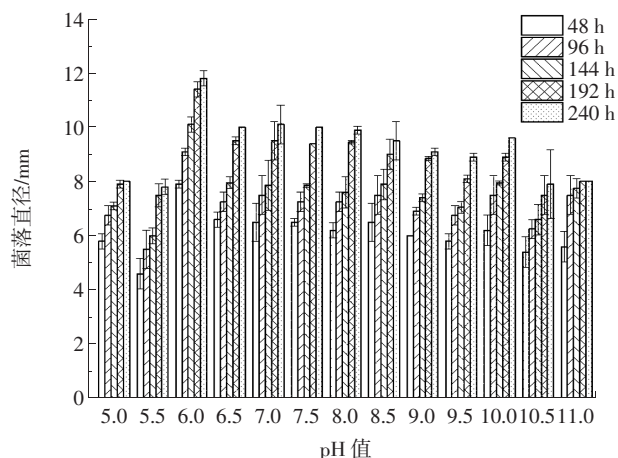


图11 BX-1菌株在不同初始pH值培养条件下的菌落直径

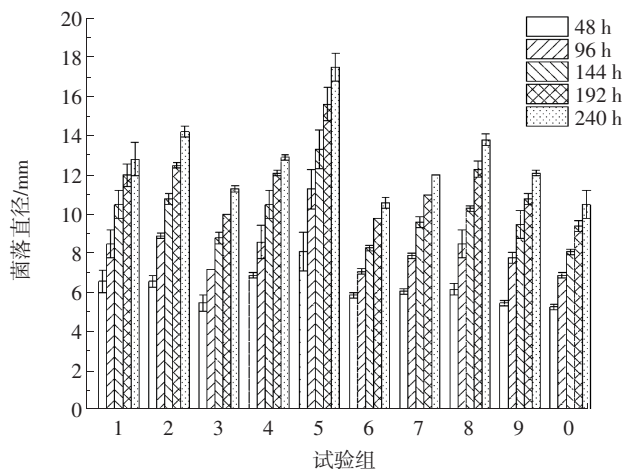
Fig.11 BX-1 bacterial moss diameter under different initial pH conditions

落颜色,可见培养至240 h时,在不同初始pH值下BX-1菌落均呈现不同程度的黄色。初始pH值为6.0~8.5与10.0时菌落呈亮黄色,其他初始pH值下菌落颜色较浅。

由此可知,BX-1菌株在pH6.0~10.0范围内均可产黄色素。说明BX-1菌株有着极广泛的酸碱适应性,在偏酸环境下更有利于菌株的生长,但在中性偏碱环境下更有利于菌株合成积累黄色素。综合菌株生长与产黄色素两个因素,初步选择pH6.0作为最适初始pH值。

2.5.4 最适碳、氮源种类与磷元素浓度正交试验结果

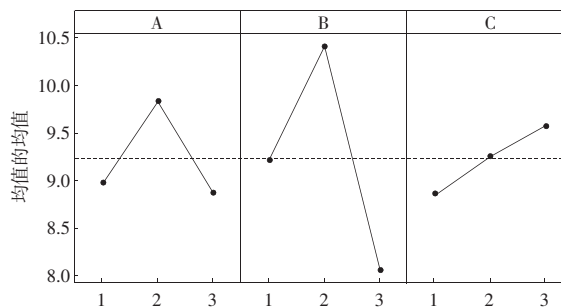
为研究不同碳、氮源交互作用对BX-1菌株产黄色素的影响,分别选择对BX-1菌株产黄色素较好的3种不同碳源、氮源,并与不同浓度磷酸二氢钾进行正交试验。BX-1菌落直径测量结果见图12。

图12 BX-1菌株 $L_9(3^3)$ 正交试验菌落直径Fig.12 Colony diameter of BX-1 strain $L_9(3^3)$ in orthogonal experiment

由图12可知,9组正交试验BX-1菌株菌落直径均高于对照组(0组,LB培养基),说明正交试验添加

的碳、氮源与磷酸二氢钾可以有效促使BX-1菌株积累黄色素。其中,以第5组最佳,即1%谷氨酸钠、1%豆粕粉、0.2%磷酸二氢钾,菌落直径明显高于其他组。肉眼观察菌落颜色,可见培养至240 h,1~6组试验组与对照组BX-1菌落均呈亮黄色,菌苔厚实致密。7、8、9组中BX-1菌落则呈现部分浅黄色。

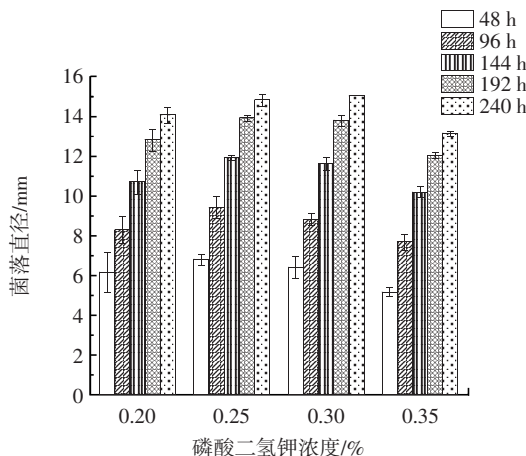
正交试验分析结果见图13。

图13 BX-1菌株 $L_9(3^3)$ 正交试验分析结果Fig.13 Results of orthogonal experiment of BX-1 strain $L_9(3^3)$

由图13可知,均值主效应图中纵坐标均值的均值数据分析显示,B氮源最高点 B_2 与最低点 B_3 差值最大,C磷酸二氢钾最高点 C_3 与最低点 C_1 差值最小,所以氮源对BX-1菌株的生长影响最为明显,碳源次之,磷酸二氢钾影响最小;图13分析预测可促使BX-1菌株生长产黄色素的最佳点分别是 A_2 谷氨酸钠、 B_2 豆粕粉、 C_3 0.20%磷酸二氢钾,所以正交试验结果分析的最适组合为碳源谷氨酸钠、氮源豆粕粉、0.20%磷酸二氢钾,与正交试验组中的最佳组合(第5组)一致。由图13可知,磷酸二氢钾浓度增加对BX-1菌株产黄色素呈正向促进作用,且图中没有出现拐点,需增设磷酸二氢钾浓度单因素试验以找出最适值。

增设磷酸二氢钾0.20%~0.35%浓度,观察其对BX-1菌株生长和产黄色素的影响,结果见图14。

由图14可知,磷酸二氢钾浓度为0.25%~0.30%时,BX-1菌落直径大小相近,均大于另外2组。肉眼



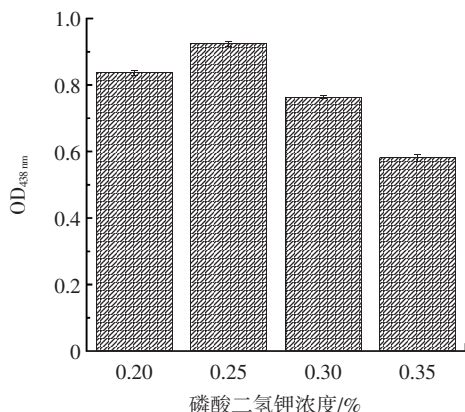


图14 BX-1菌株在不同磷酸二氢钾浓度下培养的菌落直径与产黄色素量OD值

Fig.14 Moss diameter of BX-1 strain cultured under different potassium dihydrogen phosphate concentrations and OD values of yellow pigment

观察菌落颜色,可见0.20%~0.35%浓度的磷酸二氢钾培养至240 h的BX-1菌落均厚实且呈亮黄色。在相同条件下提取不同菌落的黄色素,可见0.25%磷酸二氢钾浓度组的BX-1菌株所产黄色素在438 nm处OD值最高,明显高于其他组。

由此得出,BX-1菌株最适培养基组成为1%谷氨酸钠、1%豆粕粉、0.25%磷酸二氢钾。相比于可溶性淀粉与葡萄糖,谷氨酸钠可以直接进入三羧酸循环,更有利于被BX-1菌株吸收利用,为菌株生长与合成黄色素提供能量;豆粕粉来源广泛、价格便宜且富含各类营养物质,尤其含有多种氨基酸与小分子多肽类物质,易于吸收利用,可以使菌株快速合成并积累黄色素;磷是辅酶、辅基、腺嘌呤核苷三磷酸等物质的组成成分,能调节代谢流向与次级代谢产物的合成,在合适的浓度下能促使BX-1菌株高产黄色素^[25]。

2.5.5 最适碳、氮源、硫酸镁浓度与初始pH值正交试验结果

在不同谷氨酸钠、豆粕粉、硫酸镁浓度和不同初始pH值正交组合下培养的BX-1菌落直径测量结果见图15。

由图15可知,第4组 $a_2b_1c_2d_3$ 组合,即谷氨酸钠3%、豆粕粉3%、硫酸镁0.05%、初始pH值6.0条件下所培养的BX-1菌落直径最大,明显高于其他组合。肉眼观察菌落颜色,可见9组BX-1菌株培养至240 h均呈现亮黄色。

正交试验分析结果见图16。

由图16可知,均值主效应图中纵坐标均值的均值数据分析显示,a谷氨酸钠浓度最高点 a_2 与最低点 a_1 差值最大,c硫酸镁浓度最高点 c_1 与最低点 c_3 差值最小,所以谷氨酸钠浓度对BX-1菌株的生长影响最大,

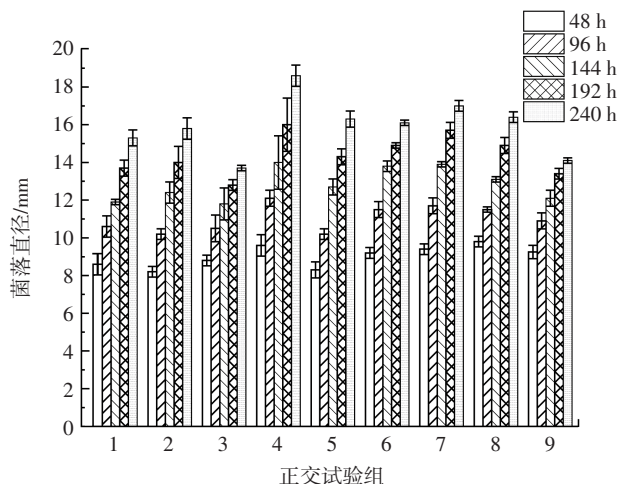


图15 BX-1菌株 $L_9(3^4)$ 正交试验菌落直径

Fig.15 Coat diameter of BX-1 strain $L_9(3^4)$ in orthogonal experiments

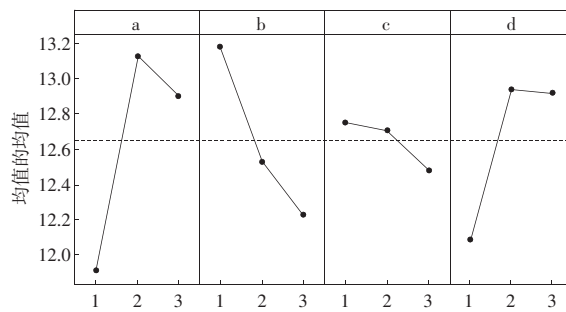


图16 BX-1菌株 $L_9(3^4)$ 正交试验分析结果

Fig.16 BX-1 strain $L_9(3^4)$ orthogonal experimental analysis results

豆粕粉浓度与初始pH值次之,硫酸镁浓度对BX-1菌株生长影响程度最小;图16分析预测可促使BX-1菌株生长产黄色素最佳点分别是 a_2 谷氨酸钠3%、 b_1 豆粕粉3%、 c_1 硫酸镁0.1%、 d_2 初始pH值7.0,所以正交试验分析结果最佳组合为3%谷氨酸钠、3%豆粕粉、0.1%硫酸镁、初始pH7.0,即 $a_2b_1c_1d_2$ 组合。与正交试验中的最佳组第4组 $a_2b_1c_2d_3$ 组合存在差异,需试验验证以筛选最优组合。均值主效应图中未出现豆粕粉浓度的拐点,无法确定最适豆粕粉浓度,需补做试验加以确定。

BX-1菌株 $L_9(3^4)$ 正交验证试验菌落直径与产黄色素量OD值见图17。

由图17可知,不同组合验证试验所培养的BX-1菌落直径相近。肉眼观察菌落颜色无差别,两组菌株培养至240 h均呈现亮黄色。在相同条件下提取不同菌落的黄色素,可见正交试验分析所得 $a_2b_1c_1d_2$ 组合产黄色素在438 nm处OD值明显高于正交试验组中的第4组 $a_2b_1c_2d_3$ 组合。 $a_2b_1c_1d_2$ 组合相较于 $a_2b_1c_2d_3$ 组合硫酸镁浓度更高,初始pH值7.0为中性。研究表明中

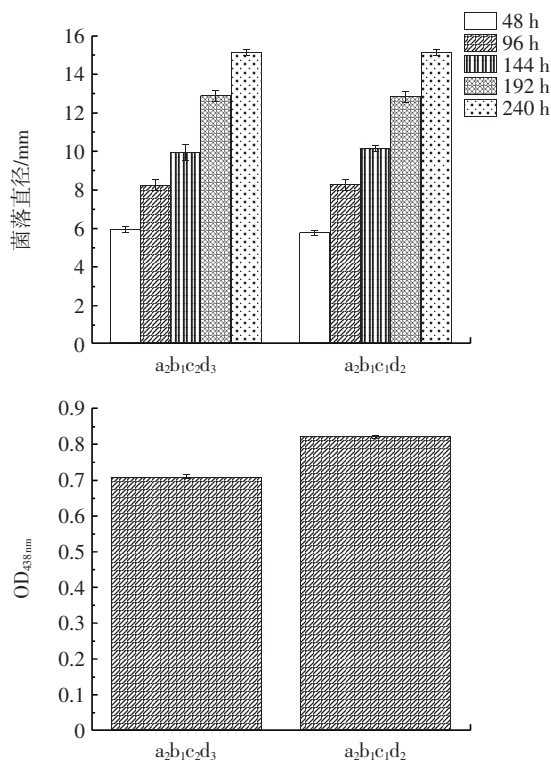


图 17 BX-1 菌株 L₉(3⁴)正交验证试验菌落直径与产黄色素量 OD 值

Fig.17 BX-1 strain L₉(3⁴)orthogonal validation test moss diameter and OD value of yellow pigment

性偏碱环境更适于多数细菌的生长代谢,偏酸环境会对细菌生长有抑制作用;镁离子能调控信号传递、参与蛋白质的合成,是细菌新陈代谢过程中必不可少的微量元素^[7]。上述试验结果表明,0.1%硫酸镁与中性初始 pH 值组合更能促使 BX-1 菌株大量合成黄色素。

BX-1 菌株在不同豆粕粉浓度下培养的菌落直径与菌株产黄色素量 OD 值见图 18。

由图 18 可知,在 1%~3%浓度范围内,豆粕粉浓度增加对 BX-1 菌株产黄色素呈正向促进作用,推测最适豆粕粉浓度应大于等于 3%,故分别以 2%、3%、4%、5%浓度豆粕粉培养 BX-1 菌株。如图 18 所示,当豆粕粉浓度为 3%时,BX-1 菌落直径最大,明显高于其它

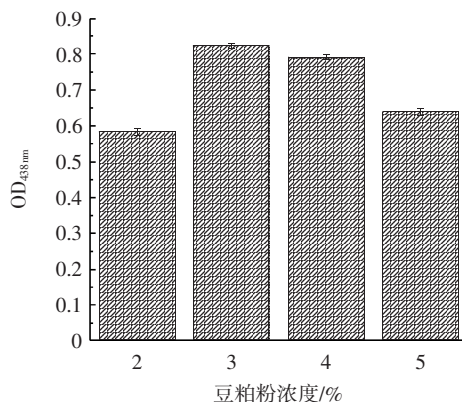


图 18 BX-1 菌株在不同豆粕粉浓度下培养的菌落直径与菌株产黄色素量 OD 值

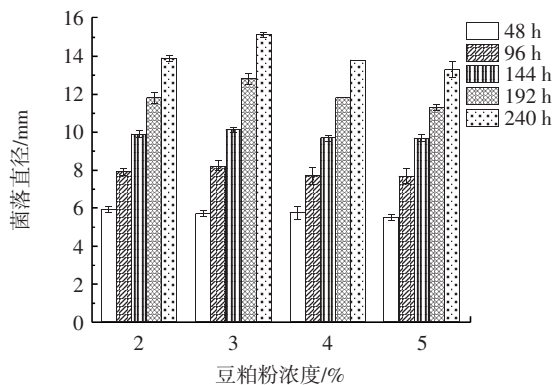
Fig.18 Moss diameter of BX-1 strain cultured in different soybean meal concentrations and OD value of yellow pigment

组。肉眼观察菌落颜色,菌苔均呈现亮黄色无明显差别。在相同条件下提取不同菌落的黄色素,可见 3%豆粕粉浓度的 BX-1 菌株所产黄色素在 438 nm 处 OD 值最高,明显高于其它浓度。

由此可见,最适碳氮、源、硫酸镁浓度与最适初始 pH 值正交试验的最优结果为 3%谷氨酸钠、3%豆粕粉、0.1%硫酸镁、最适初始 pH7.0。

3 结论

本研究以一株从芦苇根部盐碱地土壤中分离筛选出的产黄色素菌株 BX-1 为研究对象,以 LB 培养基为基础优化培养基,通过形态学观察发现 BX-1 菌落呈圆形凸起、表明光滑、边缘整齐、亮黄色、产胞内黄色素。经由革兰氏染色镜检与分子生物学方法鉴定出 BX-1 菌株为不产芽孢的短杆状革兰氏阳性细菌,盐生谷氨酸杆菌(*Glutamicibacter halophytocola*)。对 BX-1 菌株胞内黄色素进行提取,可知该黄色素易溶于甲醇,为脂溶性色素,紫外光谱扫描显示其在 411、438、467 nm 3 处有吸收峰,438 nm 处吸收峰最高,与叶黄素光谱特性相似,推测 BX-1 黄色素可能为接近叶黄素的类胡萝卜素,其提取纯化产物及分子结构还需大量试验分析验证。培养温度与光照条件的单因素试验表明,BX-1 菌株最适生长温度为 30 ℃,合适产黄色素温度为 20 ℃,即 BX-1 菌株为温敏型黄色素产生菌,产黄色素需低温诱导以开启相关调控元件,同时也需要外部光照刺激菌株大量合成黄色素,故 BX-1 菌株最适固态培养条件为 20 ℃光照培养 240 h。设计碳、氮源、初始 pH 值、无机盐的单因素与正交试验,通过记录分析菌株在不同条件下的菌落生长直径、肉眼观察菌落颜色变化以及测量比较不同条件生长 BX-1 菌株产黄色素在 438 nm 处 OD 值,得出最适 BX-1 菌株



生长与合成黄色素的固态培养基组成为3%谷氨酸钠、3%豆粕粉、0.5%酵母浸出粉、1%氯化钠、0.25%磷酸二氢钾、0.1%硫酸镁、初始pH7.0。上述研究结果鉴定了BX-1菌株的种属,初步确定了促使BX-1菌株产黄色素的培养条件与培养基组成以及BX-1黄色素的部分性质,为BX-1菌株产黄色素的进一步开发利用以及BX-1黄色素结构的研究分析提供参考。

参考文献:

- [1] ARULDASS C A, DUFOSSÉ L, AHMAD W A. Current perspective of yellowish-orange pigments from microorganisms—A review[J]. Journal of Cleaner Production, 2018, 180: 168–182.
- [2] 汤丽琴, 刘昊澄, 温靖, 等. 栀子黄色素提取、精制及药理活性的研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(15): 428–435.
TANG Liqin, LIU Haocheng, WEN Jing, et al. Research progress on extraction, purification and pharmacological activity of *Gardenia* yellow pigment[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(15): 428–435.
- [3] WU J, WANG X N, HE Y, et al. Stability evaluation of *Gardenia* yellow pigment in presence of different phenolic compounds[J]. Food Chemistry, 2022, 373: 131441.
- [4] TAKAHASHI M, NISHIZAKI Y, SUGIMOTO N, et al. Single reference quantitative analysis of xanthomonas A and B in *Monascus* yellow colorant using high-performance liquid chromatography with relative molar sensitivity based on high-speed countercurrent chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2018, 1555: 45–52.
- [5] 王青青. 粒毛盘菌 DP5 胞外黄色素的发酵条件、性质及体外活性研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2018.
WANG Qingqing. Studies on fermentation conditions, properties and *in vitro* activities of extracellular yellow pigment by *Lachnum* DP5[D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2018.
- [6] 周庆新, 杨鲁, 王昕岑, 等. 一株海胆共附菌及其发酵产物黄色素的理化性质分析[J]. 中国食品学报, 2016, 16(12): 240–246.
ZHOU Qingxin, YANG Lu, WANG Xincen, et al. Physicochemical properties analysis of a yellow pigment isolated from fermentation products of bacteria attached urchin[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(12): 240–246.
- [7] CHOWDHURY R H M, SULTANA N, SHUMI W et al. Optimization of environmental conditions for biofilm formation of bacterial strains *Salmonella aerizonae*, *Micrococcus luteus* and *Aerococcus viridans*[J]. Journal of Pure & Applied Microbiology, 2015, 9(1): 391–398.
- [8] DEORUKHKAR A A, CHANDER R, GHOSH S B, et al. Identification of a red-pigmented bacterium producing a potent anti-tumor N-alkylated prodigiosin as *Serratia marcescens*[J]. Research in Microbiology, 2007, 158(5): 399–404.
- [9] 徐春明, 王晓丹, 焦志亮. 食用微生物色素的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2015(2): 162–168.
XU Chunming, WANG Xiaodan, JIAO Zhiliang. Research progress of edible pigments by microorganisms[J]. China Food Additives, 2015(2): 162–168.
- [10] AMARAL DE FARIA SILVA L, FERREIRA ALVES M, FLORÉ-NCIO FILHO D, et al. Pigment produced from *Arcopilus aureus* isolated from grapevines: Promising natural yellow colorants for the food industry[J]. Food Chemistry, 2022, 389: 132967.
- [11] HUANG D, WANG Y H, ZHANG J, et al. Integrative metabolomic and transcriptomic analyses uncover metabolic alterations and pigment diversity in *Monascus* in response to different nitrogen sources[J]. mSystems, 2021, 6(5): e0080721.
- [12] 张盼, 王伟楠, 樊永红. 盐穗木根际土壤产 ACC 脱氢酶细菌的筛选与鉴定[J]. 新疆农业科学, 2018, 55(11): 2112–2121.
ZHANG Pan, WANG Weinan, FAN Yonghong. Isolation and identification of ACC deaminase producing bacteria in the soil of *Halostachys caspica*[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2018, 55(11): 2112–2121.
- [13] TSUCHIDA S, UMEMURA H, MURATA S, et al. Effect of humidity during sample preparation on bacterial identification using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, 2021, 1176: 122780.
- [14] JEONG S W, YANG J E, CHOI Y J. Isolation and characterization of a yellow xanthophyll pigment-producing marine bacterium, *Erythrobacter* sp. SDW2 strain, in coastal seawater[J]. Marine Drugs, 2022, 20(1): 73.
- [15] 徐菲菲, 徐海笑, 梁蓉, 等. 液态发酵红曲黄色素粗提物色素组分的分离纯化与鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(1): 91–98.
XU Feifei, XU Haixiao, LIANG Rong, et al. Isolation, purification and evaluation of *Monascus* yellow pigments from fermentation broth[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(1): 91–98.
- [16] 孙菁兰. 大肠杆菌异源表达与制备 indigoidine 蓝色素的研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2020.
SUN Jinglan. Study on the preparation of heterologous expressed blue pigment—indigoidine by *Escherichia coli*[D]. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology, 2020.
- [17] FENG W W, WANG T T, BAI J L, et al. *Glutamicibacter halophytocola* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the roots of a coastal halophyte, *Limonium sinense*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2017, 67(5): 1120–1125.
- [18] BENJSMIN S, SUREKHA Y, SARATH JOSH M K, et al. *Micrococcus luteus* strain BAA2, A Novel Isolate Produces Carotenoid Pigment[J]. Electronic Journal of Biology, 2016, 12(1): 83–89.
- [19] 吴琦, 代剑波, 容杰, 等. 一株温敏型产红色素粘质沙雷氏菌的分离及其培养条件研究[J]. 中国酿造, 2009, 28(9): 51–54.
WU Qi, DAI Jianbo, RONG Jie, et al. Isolation and culture condition of thermo-sensitive *Serratia marcescens* strain producing red pigments[J]. China Brewing, 2009, 28(9): 51–54.
- [20] 包永明, 王庆玲, 吴宪. 温度响应的细菌生理生化特性调控研究进展[J]. 微生物学杂志, 2018, 38(6): 1–14.
BAO Yongming, WANG Qingling, WU Xian. Research progress in the regulation of physiological and biochemical characteristics of bacteria in response to temperature changes[J]. Journal of Microbiology, 2018, 38(6): 1–14.
- [21] 李可峰, 陈海涛, 吴龙飞, 等. 细菌的光响应及其机制研究进展[J]. 微生物学通报, 2018, 45(7): 1574–1587.
LI Kefeng, CHEN Haitao, WU Longfei, et al. Behavior and mechanism of bacterial response to light illumination[J]. Microbiology China, 2018, 45(7): 1574–1587.
- [22] MOHANA D, THIPPESWAMY S, ABHISHEK R. Antioxidant, antibacterial, and ultraviolet-protective properties of carotenoids isolated from *Micrococcus* spp[J]. Radiation Protection and Environment, 2013, 36(4): 168.
- [23] INDRIATI G, MEGAHATI R R P, ROSBA E. Potency of amylase-producing bacteria and optimization amylase activities[J]. IOP Conference Series Materials Science and Engineering, 2018, 335(1): 12–23.
- [24] 陈晓园, 陈福生. 不同豆类对丛毛红曲菌 MS-1 发酵产物的影响[J]. 中国粮油学报, 2016, 31(9): 26–30, 37.
CHEN Xiaoyuan, CHEN Fusheng. The effects of different edible bean varieties on fermented products of *Monascus pilosus* MS-1[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2016, 31(9): 26–30, 37.
- [25] ZHANG L, LIU L S, WANG K F, et al. Phosphate limitation increases coenzyme Q10 production in industrial *Rhodobacter sphaeroides* HY01[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2019, 4(4): 212–219.