

文章编号: 1001-7453(1999)03-0023-06

# 产蓝色素放线菌的初步鉴定和 蓝色素性质研究

张和春, 陈亮, 季文明, 吴亢, 王武

(无锡轻工大学生物工程学院, 江苏无锡 214036)

**摘要:** 对一株从土壤中筛选出来的产蓝色素的放线菌进行了初步鉴定, 命名为天蓝色链霉菌 -100 (*Streptomyces coelicolor* -100), 并对蓝色素的性质进行了研究. 结果表明此色素无臭无味, 水溶性较强. 酸性条件下, 溶解度随 pH 降低而减小. pH < 8 时为红色, pH > 8 时为蓝色, 颜色随 pH 增大而加深. 于 100℃ 短时间处理, 比较稳定. 在 pH 中性的条件下对光 (包括紫外光) 较稳定. 大多数金属离子如 Ba<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup> 等对此色素无影响, Mg<sup>2+</sup> 使色素增色. Fe<sup>3+</sup> 在 5 × 10<sup>4</sup> mol/L 时, 使色素变性, 但在 5 × 10<sup>5</sup> mol/L 时, 对色素没有多大影响. Pb<sup>2+</sup> 可以络合色素, 使之沉淀; 加入 0.2% 盐酸乙醇后, 色素再溶解. 该蓝色素可作为天然色素或天然 pH 指示剂开发.

**关键词:** 蓝色素; 性质; 放线菌; 鉴定

中图分类号: Q939.132 文献标识码: A

目前合成色素仍被广泛应用, 但合成色素终将被天然色素所替代. 天然色素按其来源可分为 3 类: 植物色素、动物色素和微生物色素. 微生物色素是从微生物中提取, 不受资源、环境和空间的限制, 具有植物色素和动物色素所不可比拟的优越性. 利用自然界中微生物发酵生产的色素种类较为丰富, 但发酵生产蓝色素却较罕见. 蓝色素作为 3 个基本色素之一, 具有很高的附加值, 它可与红、黄品系的天然色素调配成多种色调, 使天然色素更加丰富. 作者所研究的蓝色素其颜色随着 pH 的变化而变化, 具有指示剂的作用. 文献 [1~3] 所报导的放线菌产的蓝色素中, 有的具有抑菌作用 (主要是对革兰氏阳性菌), 如放线紫素 (Actinhordin) 和石蕊杀菌素 (Litmocidin); 有的具有保健功能, 如花青素 (Anthocyanidin). 因此, 天然蓝色素资源的开发利用具有重要的理论意义和广阔的应用前景.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种 天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor* -100) 作者所在实验室保藏菌种.

### 1.1.2 培养基

收稿日期: 1999-01-12; 修订日期: 1999-04-12

作者简介: 张和春 (1974 年 7 月生), 男, 江西吉安人, 硕士研究生.

1) 斜面培养基: Soybean-mannitol agar medium, 见文献 [4].

2) 菌种鉴定培养基: 见文献 [5~ 7]

3) 种子培养基 (g /dL): 可溶性淀粉 2, 牛肉膏 0. 2, NaCl 0. 05, K<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> 0. 05, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0. 05, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0. 001; pH7. 5.

4) 发酵培养基: 高氏 1号培养基.

1. 1. 3 仪器与设备 721分光光度计; U-3000 Spectrophotometer; HYG-II 型回转恒温调速摇瓶柜.

### 1. 2 方法

1. 2. 1 菌种鉴定方法 参照文献 [5~ 8]

1. 2. 2 色素发酵及提取方法 从斜面上挑 2环孢子到种子培养液中, 30℃、200 r/min 条件下培养 24 h, 再以 5% 的接种量转入摇瓶中, 30℃、200 r/min 条件下培养 190 h. 将所得发酵液 pH 调至 12, 离心, 取上清液. 将上清液 pH 调至 1~ 2, 离心, 弃上清液, 沉淀物经真空干燥, 得色素粗品, 该品为紫红色粉末.

1. 2. 3 色素测定方法 于不同的 pH 所对应的最大吸收波长下测色素溶液的光密度 (O. D.)

1. 2. 4 色素残存率计算方法

色素残存率 = 色素经处理后的 O. D. / 色素未经处理时的 O. D.

## 2 结果与讨论

### 2. 1 菌种鉴定

2. 1. 1 形态特征 该菌种的孢子丝长, 波曲, 有的形成一圈螺旋 (右旋). 孢子呈椭圆形, 不易脱落. 见图 1.

2. 1. 2 培养特征 菌种在特征培养基上的培养特征列入表 1. 可知, 该菌种的气生菌丝体呈灰白色或浅灰色或芦穗灰或深玛瑙灰. 基内菌丝体呈龙胆紫或暗红色或蓝色, 产生与基丝相同的可溶性色素.

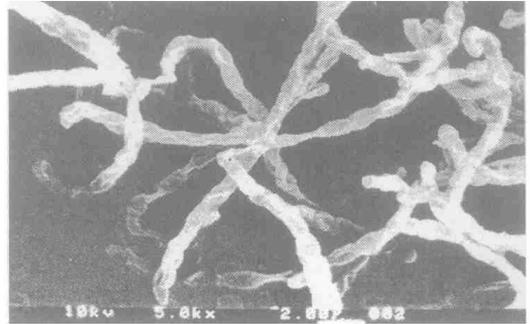


图 1 电子显微镜下的孢子 (7500×)

表 1 天蓝色链霉菌-100在 7种特征培养基上的培养特征

特征培养基	特 征		
	气生菌丝体	基内菌丝体	可溶性色素
高氏 1号琼脂	芦穗灰或深玛瑙灰, 生长良好	初龙胆紫, 后暗红或蓝色	与基丝色相同
克氏 1号琼脂	浅灰, 生长中度	初火泥棕, 后蓝色	与基丝色相同
葡萄糖天门冬素琼脂	灰白色, 生长中度	初龙胆紫, 后暗红或蓝色	与基丝色相同
察氏 1号琼脂	灰白色, 生长中度	初龙胆紫, 后暗红或蓝色	与基丝色相同
马铃薯浸汁琼脂	灰白色, 生长良好	红色或蓝色	与基丝色相同
黄豆饼粉琼脂	灰白色, 生长良好	暗红色或蓝色	与基丝色相同
马铃薯块	浅灰, 生长良好	深蓝色	与基丝色相同

2. 1. 3 生理生化特性 此菌种在 25~ 30℃ 时不凝固牛奶, 但能使之酪化; 在 37℃ 时能凝固牛奶继而酪化, 形成红色的表面生长环. 水解淀粉力弱. 能在纤维素上生长, 菌落呈蓝色.

不液化明胶,不形成酪氨酸,不产生 H<sub>2</sub>S,硝酸盐还原为阳性.从表 2 可以看出,该菌能利用葡萄糖、乳糖、半乳糖、蔗糖、麦芽糖、甘露糖、阿拉伯糖、木糖、棉籽糖、鼠李糖、肌醇、甘露醇,但不利用菊糖、山梨醇、草酸钠、柠檬酸钠.

表 2 天蓝色链霉菌 -100 利用碳源情况

碳源	利用情况	碳源	利用情况	碳源	利用情况
葡萄糖	+	阿拉伯糖	+	菊糖	-
乳糖	+	木糖	+	山梨醇	-
半乳糖	+	棉籽糖	+	草酸钠	-
蔗糖	+	鼠李糖	+	柠檬酸钠	-
麦芽糖	+	肌醇	+	对照	-
甘露糖	+	甘露醇	+		

注:“-”为不利用;“+”为利用;“对照”为不加碳源.

2.1.4 拮抗性 此菌种对金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、短杆菌 DGC-007 枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌 (*E. coli*)、啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 都无抑制作用.

2.1.5 菌种鉴别 根据菌种的形态特征、培养特征、生理生化特性和拮抗性,又据文献 [5~8] 对天蓝色链霉菌的描述,可以初步确定此菌种属天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*),命名为天蓝色链霉菌 -100.

## 2.2 蓝色素的色价

将发酵液 pH 调至 9,再用 pH 为 9 的缓冲液将其稀释 25 倍.在 588 nm 下测得色素 O.D. 为 0.5,即发酵液色价为 12.5.该蓝色素的色价是国内近期报导的天蓝菌素 (*Coelicolorin*) 蓝色素色价的 3 倍<sup>[9]</sup>.另外,经过菌种选育、培养基和发酵工艺条件的优化,该色素的色价还可进一步提高.

## 2.3 蓝色素的溶解性

该色素易溶于碱性溶液,可溶于酸性溶液(酸性越强则溶解度越低)和甲醇、乙醇、吡啶等极性大的有机溶剂,不溶于丙酮、乙醚、环己烷等极性小的有机溶剂.

## 2.4 蓝色素的呈色变化

### 2.4.1 蓝色素变色的 pH 范围

色素变色范围大致为: pH1——7——8——14  
 红色 红紫色 蓝色 深蓝色

蓝色素颜色随着 pH 的变化而变化的这种性质,使之可作为一种天然指示剂开发.

2.4.2 物理、化学处理对色素颜色的影响 作为天然色素,往往有些重要的颜色反应<sup>[10]</sup>.将色素进行不同的物理或化学处理,观察其颜色变化,结果见表 3.可以看出,该色素经不同的物理或化学处理后,其颜色会发生变化.在光下显红色是其色素本色;经氨薰蒸后,或在浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 介质、FeCl<sub>3</sub> 溶液、有 Mg<sup>2+</sup> 的盐酸溶液、Na-Hg 的盐酸溶液中变色,是由于溶液的 pH 所致;铅离子可能是因为会络合色素,从而形成沉淀.

表 3 物理、化学处理对色素颜色的影响

处理条件	颜色反应
可见光下	紫红色
紫外光下	暗红色
氨薰蒸后可见光下	蓝色
浓 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 介质中	红色
FeCl <sub>3</sub> 溶液中	红色
中性醋酸铅溶液中	蓝色沉淀
有 Mg <sup>2+</sup> 的盐酸溶液中	红色
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 溶液中	蓝色
Na-Hg 的盐酸溶液中	红色

**2.4.3 不同的 pH 介质对色素颜色和色素  $\lambda_{max}$  的影响** 将色素溶解于不同 pH 的缓冲液 1 mol/L KOH 及不同的有机溶剂中, 观察其颜色变化, 然后进行光谱扫描, 测其最大吸收波长, 结果见表 4。可以看出, 在不同 pH 的缓冲液中或不同的介质中, 色素的最大吸收波长会发生变化。正是因为这种变化才使得色素颜色会随着 pH 介质、处理方式的不同而变化。

表 4 不同 pH 介质对色素颜色和色素  $\lambda_{max}$  的影响

pH 或 介质	颜色	$\lambda_{max}$ /nm
pH3	红色	484
pH5	红色	498
pH7	红色	519
pH9	蓝色	588
pH14	深蓝色	640
甲醇	红色	526
乙醇	红色	526
吡啶	蓝色	541

**2.5 蓝色素的稳定性**

**2.5.1 pH 对色素稳定性的影响** 将色素分别溶解在 pH 为 3, 5, 7, 9 的缓冲液和 1 mol/L KOH 中, 并每隔 3 d 测其残存率, 结果见图 2。可以看出, 蓝色素在 pH7 左右时稳定性较好, 在 pH 处于两个极端时则色素损失比较大。

**2.5.2 紫外光对色素稳定性的影响** 将色素分别溶解于 pH 为 3, 5, 7, 9 的缓冲液和 1 mol/L KOH 中, 然后置于紫外灯下照射, 每隔 10 min 测其残存率, 结果见图 3。可以看出, 色素在紫外光下稳定性仍较强, 特别是在 pH7 时, 色素经紫外光照射 1 h 后, 残存率还有 90.8%。

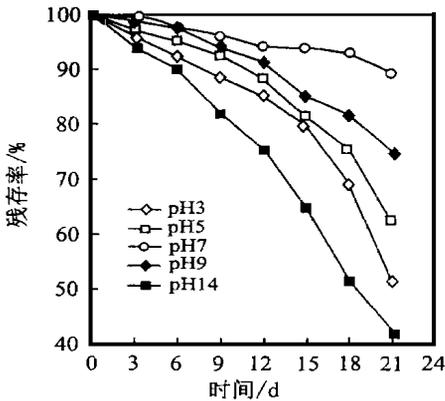


图 2 pH 对色素稳定性的影响

**2.5.3 温度对色素稳定性的影响** 将色素溶解于 pH7 的巴比妥钠 盐酸缓冲液中, 分别在 20, 40, 60, 80, 100 °C 的恒温水浴中放置 1 h, 每隔 10 min 取样, 冷却至室温后测残存率, 结果见图 4。可以看出色素在 80 °C 以下时, 没有多大的损失, 在 100 °C 时残存率也是比较高的, 说明该色素的热稳定性相当好, 有可能应用于热加工的食品中。

**2.5.4 金属离子对色素稳定性的影响** 将色素溶解于 pH7 的巴比妥钠 盐酸缓冲液中, 然后加入各种金属离子, 使金属离子浓度为 5 mmol/L, 1 h 后测色素残存率, 结果见表 5。

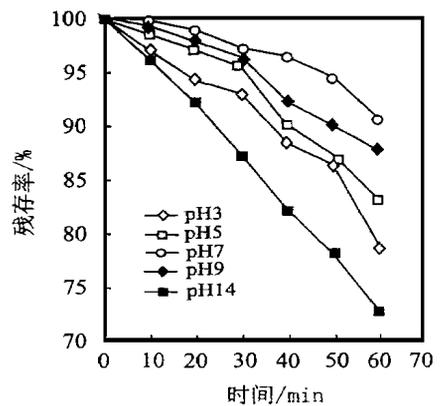


图 3 紫外光对色素稳定性的影响

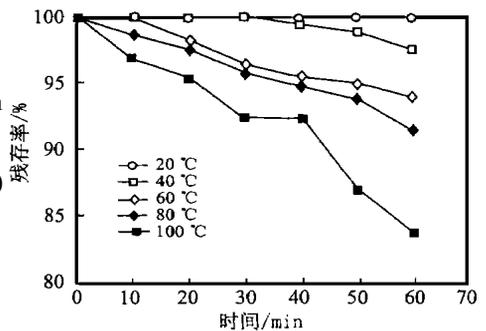


图 4 温度对色素稳定性的影响

Fe<sup>2+</sup> 浓度在 5 mmol/L 时使色素变性,这可能是 Fe<sup>2+</sup> 浓度太大所致,于是进一步考察 Fe<sup>2+</sup> 浓度对色素的影响,结果见表 6

表 5 金属离子对色素稳定性的影响

金属离子	浓度 / (mmol/L)	残存率 %	金属离子	浓度 / (mmol/L)	残存率 %
K <sup>+</sup>	5	97	Mg <sup>2+</sup>	5	112.3
Ca <sup>2+</sup>	5	102	Ba <sup>2+</sup>	5	94.8
Mn <sup>2+</sup>	5	98	Al <sup>3+</sup>	5	87.6
Fe <sup>2+</sup>	5	0	Zn <sup>2+</sup>	5	97.5
Pb <sup>2+</sup>	5	将色素络合沉淀			

表 6 Fe<sup>2+</sup> 浓度对色素的影响

金属离子	浓度 / (mmol/L)	残存率 %
Fe <sup>2+</sup>	0.5	0
	0.05	81.1
	0.005	83.3
	0.0005	88.9

从表 5 和表 6 可以看出,大部分金属离子对色素稳定性没有大的影响. Mg<sup>2+</sup> 对该色素有增色作用; Al<sup>3+</sup> 对该色素有一定的破坏作用; Fe<sup>2+</sup> 在 0.5 mmol/L 时使色素变性,但当 Fe<sup>2+</sup> 浓度小于或等于 0.05 mmol/L 时则对色素的影响不大; Pb<sup>2+</sup> 可以络

合色素,使之沉淀,加入 0.25% 的盐酸乙醇后,色素再溶解.所以可以通过用 Pb<sup>2+</sup> 来使色素沉淀,之后离心,弃上清液,色素沉淀物加入 0.25% 的盐酸乙醇后使色素溶解出来,这就是植物水溶性色素最古老的提取方法——醋酸铅盐沉淀法<sup>[11]</sup>.但这种方法将造成铅污染,所以作者未采用这种方法提取色素.

### 3 结 论

通过对该蓝色素产生菌的鉴定和蓝色素的性质研究,鉴定出该蓝色素产生菌为天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*),该菌未经诱变就能产生较多的蓝色素.研究发现该色素易溶于碱性溶液,可溶于酸性溶液和极性大的有机溶剂,不溶于非极性溶剂.其颜色随着 pH 的变化而变化,在 pH7 左右时光稳定性好,有较强的热稳定性,大部分金属离子对色素没有大的影响.拟进一步进行菌种诱变选育,以及培养基的优化和发酵工艺条件的优化,以提高色素的色价;对色素进一步分离纯化,以鉴定出色素成分;对蓝色素进行毒理学评价,以便使该蓝色素能应用于食品行业.

### 参考文献:

- [1] GAUSE G F. Litmocidin, a new antibiotic substance produced by *Proctiomyces cyaneus* [J]. J Bacteriol, 1946, 51: 649- 653
- [2] FRAMPTON V T, TAYLOR C F. Isolation and identification of pigment present in cultures of *Actinomyces violaceus - ruber* [J] Phytopathology, 1938, 28: 7
- [3] BROCKMANN H, PINI H. Actinorhodin, einroter Farbstoff aus *Actinomyces* [J]. Naturwissenschaften, 1947, 34: 190
- [4] HOBBS G, FRAZER C M. Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1989, 31: 272- 277.
- [5] [美] 瓦克斯曼 S A,洛舍瓦列 H A. 放线菌及其抗生素鉴定指南 [M]. 阎逊初译.北京: 科学出版社, 1958.
- [6] [美] 瓦克斯曼 S A. 放线菌属和种的分类、鉴定和描述 (第二卷) [M]. 阎逊初译.北京: 科学出版社, 1974.

- [7] 中国科学院生物研究所放线菌分类组.链霉菌鉴定手册 [M].北京:科学出版社,1975.
- [8] 阮继生,卢运玉,阎逊初.放线菌分类的研究(VIII.蓝色放线菌类别的鉴定) [J].微生物学报,1964,3: 369- 377
- [9] 赵东红,陆玲,秦怀兰.一种微生物发酵产蓝色素的稳定性及毒性研究 [J].食品与发酵,1998,24(5): 21- 24
- [10] 林启寿.中草药成分化学 [M].北京:科学出版社,1958.
- [11] 朱文适.贵州农学院农业生化第一集 [M].贵阳:贵州农学院出版社,1984,112- 139

## **Identification of a Blue- Pigment Producing *Streptomyces* and the Properties of Blue Pigment**

ZHANG He-chun, CHEN Liang, JI Wen-ming, WU Kang, WANG Wu

(School of Bioengineering, Wuxi University of Light Industry, Jiangsu Wuxi 214036)

**Abstract** A blue- pigment producing *Streptomyces* isolated from soil was identified, the properties of the blue pigment were studied. The results showed that the blue pigment has no odor, and is well dissolved in water or methanol. The color of the pigment is red below pH 8 and blue above pH 8. It is relatively stable at 100°C for a short time and under the lights including ultraviolet rays when the value of pH around 7. Metal ions such as Ba<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup> don't have any effect on the pigment stability. The concentration of Fe<sup>2+</sup> make the pigment denatured above 5× 10<sup>-4</sup> mol/l, a little effect below 5× 10<sup>-5</sup> mol/l. Pb<sup>2+</sup> precipitate the pigment, but the pigment redissolve after HCl- Ethanol was added. The pigment can be exploited as natural pigment or potential pH indicator.

**Key words** blue pigment; property; *Streptomyces*; identification