

海洋细菌 *Planococcus rifietoensis* 发酵产色素培养基的优化

孔 菲^{1,2,3}, 蔡宇杰^{*2}, 许 晨³, 许建中³, 夏金梅³

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 3. 国家海洋局第三海洋研究所 海洋生物遗传资源重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 在单因素的基础上, 以 Plackett-Burman (PB) 设计结合响应面 (RSM) 分析法, 对产色素海洋细菌 *Planococcus rifietoensis* 发酵培养基的 8 个营养成分配比进行优化。结果表明: 培养基最佳碳氮源分别是葡萄糖和蛋白胨, 葡萄糖、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和酵母粉添加量显著影响色素的产量。Box-Behnken 设计分析确定最优培养基配方为: 葡萄糖 9.78 g/L, 蛋白胨 8.00 g/L, 酵母粉 2.05 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8.17 g/L, Na_2HPO_4 0.1 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g/L, NaCl 10 g/L, CaCl_2 0.1 g/L, 培养 54 h, 在此培养条件下, 色素的 OD 值可达 0.984, 比优化前提高了 245%。

关键词: 海洋细菌; 响应面优化; 色素

中图分类号: Q 815 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2017)02-0179-08

Optimization of Fermentation Medium for the Production of Pigments by Marine Bacteria *Planococcus rifietoensis*

KONG Fei^{1,2,3}, CAI Yujie^{*2}, XU Chen³, XU Jianzhong³, XIA Jinmei³

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

Abstract: Based on monofactorial experiments, Plackett-Burman (PB) design and response surface methodology (RSM) were applied to optimize 8 medium components for the production of pigments by marine bacteria strain *Planococcus rifietoensis*. Results showed that optimal carbon and nitrogen sources of the medium were glucose and peptone, respectively, and glucose, yeast extract and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ had major effects on the production of pigments. The optimal culture medium was comprised of glucose 9.78 g/L, peptone 8.00 g/L, yeast extract 2.05 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8.17 g/L, Na_2HPO_4 0.1 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g/L, NaCl 10 g/L and CaCl_2 0.1 g/L. The incubation time was 54 hours. Under these conditions, the optical density (OD) of pigments reached to 0.984, which was

收稿日期: 2015-04-08

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目(海三科 2015027)。

* 通信作者: 蔡宇杰(1973—), 男, 江苏无锡人, 工学博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事生物工程方面的研究。

E-mail: yjcai@jiangnan.edu.cn

引用本文: 孔菲, 蔡宇杰, 许晨, 等. 海洋细菌 *Planococcus rifietoensis* 发酵产色素培养基的优化[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(02): 179-186.

245% higher than that before optimization.

Keywords: marine bacteria, response surface optimization, pigment

色素是食品添加剂的重要组成成分,不仅广泛应用于食品工业以全面改善食品的外观和色泽^[1],还广泛应用于生物制药、化妆品和纺织等领域^[2]。天然色素由于产量低,着色力低,对光、热、氧、酸碱稳定性差,成本高等因素,在19世纪中叶逐步被合成色素取代^[3-4]。随着现代生物学和医学的发展,发现大多数合成色素具有不同程度的毒性,危害人体健康。而天然色素源于自然,在自然界中易被分解,不在生物体内累积,无毒、安全性高,有很高的营养价值和药理功能,因而越来越受到人们的青睐^[5-6]。但是,动植物来源的天然色素提取困难,难以大规模生产,与动、植物色素相比,微生物色素不易受气候、地域等因素影响,是一类优良的天然色素来源^[7-8]。微生物生产的色素种类繁多,有类胡萝卜素、黑色素、醌类等^[9]。国内外学者对各种微生物色素进行了研究,Vimal S等用响应面设计优化了红曲霉 MTCC410 液态发酵产红曲色素的培养条件^[10],Wang等采用 Plackett-Burman 和 Box-Behnken 设计研究培养条件对 *Duganella* SP 发酵生产紫色杆菌素的影响^[11],Claira等分离 *Serratia marcescens* 并以红糖作为其营养物质生产灵菌红素^[12]。海洋微生物产色素也得到了关注,何磊研究了培养基组分和发酵工艺条件对一株海洋酵母菌产虾青素的影响并探索了胞内色素的保藏稳定性^[13],王晓磊对1株由威海近海分离得到的海洋细菌 SS04 进行了鉴定并探究了其发酵条件的优化^[14]。

海洋微生物主要包括生活在海水、海洋沉积物中的微生物(海泥)及与海洋动植物共附生的微生物^[15]。由于其所处的高压、高盐、低温、缺氧、低营养等独特的环境,海洋微生物能够产生大量结构新颖并具有良好生物活性的天然产物。目前海洋微生物资源的研究和开发越来越受到世界各国的重视^[16]。海洋色素正处在一个快速发展的阶段,很多的色素分子已经被证明具有生物活性,从抗微生物到抗肿瘤等^[17-18]。

本文作者以一株能产黄色素的海洋细菌为研究对象,首先在单因素的基础上用 PB 试验筛选出对色素产量有显著影响的因素,再进行响应面的

Box-Behnken 试验设计,对发酵培养基进行了优化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 莱比托泉动性球菌 *Planococcus rifietoensis* (菌株编号 1A05980),国家海洋局第三海洋研究所菌种保藏中心提供。

1.1.2 培养基

1)平板培养基:2216E 海洋细菌培养基。

2)种子培养基:蛋白胨 5 g,酵母粉 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 g,陈海水 1 000 mL;pH 为 6。

3)基础发酵培养基:同种子培养基。

4)培养基灭菌条件为:121 °C 下灭菌 20 min。

1.1.3 主要仪器 紫外可见分光光度计,北京普希通用仪器有限公司制造;DYML-S50A-3 型压力蒸汽灭菌锅,北京勤诚盛达科学仪器有限公司制造;SW-CJ-1FD 型超净工作台,苏州净化设备有限公司制造;LRH-70F 型生化培养箱,上海一恒科技有限公司制造;GZX-9420 MBE 型电热恒温鼓风干燥箱,上海博讯实业有限公司医疗设备厂制造;J-25 型低温高速离心机,贝克曼有限公司制造;KQ-700DA 型数控超声波清洗器,昆山超声仪器有限公司制造。

1.2 方法

1.2.1 菌株培养 挑取一环活化于 2216E 平板固体培养基上的 1A05980 单菌落,接种至装有 50 mL 液体培养基的 250 mL 的三角瓶,在 180 r/min、25 °C 条件下培养 12 h。以体积分数 6% 的接种量移取种子液至装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 的三角瓶中,在 180 r/min、25 °C 条件下振荡培养 54 h,获得已产色素的发酵液。

1.2.2 色素的提取 将发酵液在 118.54 g 的条件下离心 15 min,弃上清液,得金黄色菌体,烘干至质量恒定,研碎,添加一定体积的溶剂,作超声波提取 15 min,浸泡 2 h 后,离心得黄色素浸提液,浓缩得黄色素粗提物^[19]。菌体干重法测定生物量。

1.2.3 最大吸收波长的测定 取色素的甲醇浸提液,利用紫外可见分光光度计进行光谱扫描,空白

对照为甲醇,选取扫描波长为 200~800 nm,确定其最大吸收波长。

1.2.4 发酵条件的优化 通过单因素试验筛选出发酵培养基适宜的氮源、碳源。再进行 Plackett-Burman 实验设计^[20]。本实验中采用 $N=12$ 的 PB 试验设计,对发酵培养基中的 8 个成分质量浓度(A 为葡萄糖; B 为蛋白胨; C 为酵母粉; D 为 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; E 为 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; F 为 Na_2HPO_4 ; G 为 $CaCl_2$; H 为 $NaCl$)进行考察,响应值为色素 OD 值(Y)。每个因素取高水平“1”和低水平“-1”,并设 3 个虚拟变量作误差分析,用 Design expert 8.0 软件进行实验设计,见表 1。

表 1 PB 设计因素水平

Table 1 Factors and levels of the Plackett-Burman design

变量	因素	低水平/(g/L)	高水平/(g/L)
A	葡萄糖	6.0	14.0
B	蛋白胨	5.0	10.0
C	酵母粉	0.8	1.5
D	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2.0	5.0
E	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0	0.01
F	Na_2HPO_4	0.1	0.3
G	$CaCl_2$	0	0.2
H	$NaCl$	6.0	12.0
I, J, K	虚拟变量	-	-

在 Plackett-Burman 实验结果的基础上,对确定影响黄色素产量的 3 个主要因素进行 Box-Behnken 设计^[20]。每个因素取 3 个水平(见表 2),对实验数据结果进行回归分析得到一个二次多项式方程,此方程反映了响应量与自变量的关系,进而分析确定细菌 1A05980 发酵产色素的最佳培养基。

表 2 响应面设计因素水平

Table 2 Factors and levels of the response surface methodology

量符	因素	水平		
		-1	0	1
α	葡萄糖/(g/L)	5.0	10.0	15.0
β	酵母粉/(g/L)	1.5	2.0	2.5
γ	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ /(g/L)	3.0	7.0	11.0

2 结果与分析

2.1 提取溶剂的选择

将等量的菌体分别浸泡于多种试剂 2 h 后,观察发现,该黄色素在极性不同的溶剂中的溶解度存

在明显的差异,如表 3 所示。石油醚、乙酸乙酯、三氯甲烷等极性较小的溶剂浸泡菌体后,所得溶液几乎不呈现黄色,即该黄色素在其中的溶解度极小;而甲醇浸泡菌体所得溶液黄色明显较深,乙醇和乙酸次之。因此选择甲醇作为色素的提取溶剂。

表 3 色素提取溶剂的选择

Table 3 Choice of extraction solvents

溶剂	溶解性
水	微溶
甲醇	易溶
乙醇	微溶
乙酸	微溶
丙酮	不溶
乙腈	不溶
正己烷	不溶
乙酸乙酯	不溶
三氯甲烷	不溶
DMSO	易溶

2.2 最大吸收波长的确定

全波长扫描后分析图谱(图 1)可知其最大吸收波长为 480 nm。

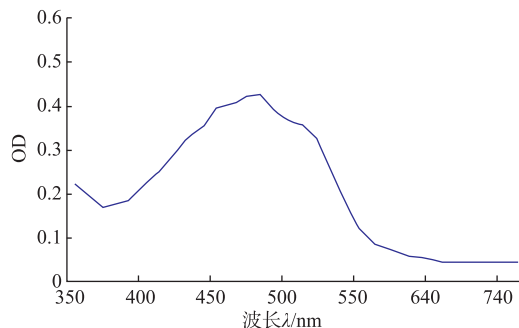


图 1 色素溶液的吸收光谱

Fig. 1 Absorption spectrum of the pigment solution

2.3 最佳发酵时间的确定

按 1.2.1 培养细菌 1A05980,分别取培养时间为 6、12、18、24、30、36、48、54 h 和 72 h 的发酵液 20 mL 提取色素,测定色素 OD 值,其结果如图 2 所示,在发酵过程中,1A05980 菌株在 6~72 h 范围内均有黄色素产生,且培养至 54 h 时,黄色素产量最高,由此得出该菌株最适发酵时间为 54 h。

2.4 单因素实验

2.4.1 不同碳源对色素产量的影响 按照基础发酵培养基,分别添加质量浓度 0.5 g/dL 的葡萄糖、蔗糖、乳糖、甘油、麦芽糖、麦芽糊精、可溶性淀粉作为碳源,接种量体积分数 6%、25 ℃、180 r/min 培养

54 h, 测色素OD值和生物量。如图3所示,以葡萄糖作为碳源时,海洋细菌1A05980产色素OD值最高,以麦芽糖作为碳源时,生物量虽然较高,但是色素产量较少,加之工业葡萄糖价格便宜,使用起来成本较低,因此选择葡萄糖作为发酵生产的碳源。

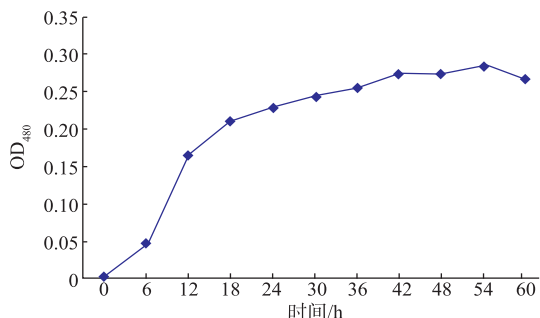


图2 菌株1A05980的产色素曲线

Fig. 2 Time dependence of pigment production by strain 1A05980

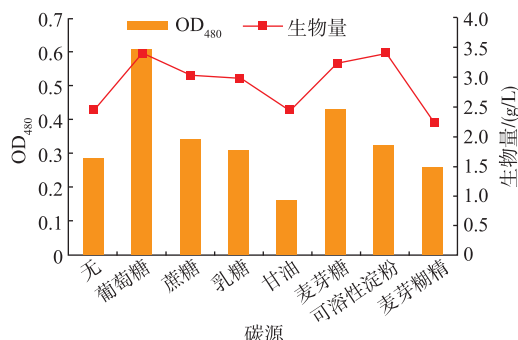


图3 碳源种类对海洋细菌1A05980产色素的影响

Fig. 3 Effect of different carbon sources on pigment production of marine bacterium 1A05980

2.4.2 不同氮源对色素产量的影响 以质量浓度为1 g/dL的葡萄糖作为碳源,分别添加质量浓度0.5 g/dL的酵母粉和蛋白胨,接种体积分数6%、180 r/min、25℃培养54 h,测定色素OD值和生物量。如图4所示,单独以酵母粉或蛋白胨为氮源时,色素的产量都不高,再考察添加质量浓度0.1 g/dL的酵母粉分别与质量浓度0.5 g/dL的蛋白胨、酵母膏、干酪素、硝酸钾、脲和硫酸铵混合作为氮源。研究发现,以酵母粉和蛋白胨混合作为氮源时,色素的OD值较高。因此选择酵母粉和蛋白胨混合作为细菌发酵产色素的氮源。结果总体显示,添加有机氮源比无机氮源对产色素更有利,这可能是有机氮源除了为菌体的生长提供氮源外,还能提供必要的生长因子,有利于色素的产生。

2.4.3 NaCl添加量对产色素的影响 由于菌株1A05980为海洋细菌,仍具备海洋微生物一些不同于陆地微生物的生活习性和遗传特征。NaCl通常在培养基中起着维持菌体内外渗透压、维持细胞内外电势差、参与物质运输的作用^[21]。在液体发酵培养基中分别加入0~40 g/L的NaCl,考察菌株产色素和生长的变化,结果显示(图5),当NaCl质量浓度处于10~20 g/L范围内,均有利于菌体的生长。考虑到过高的盐度造成反应设备的腐蚀并在下游工程中造成不便,选择10 g/L的NaCl添加量。

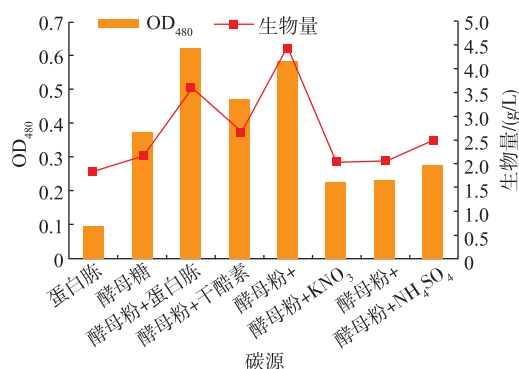


图4 氮源种类对海洋细菌1A05980产色素的影响

Fig. 4 Effect of different nitrogen sources on pigment production of marine bacterium 1A05980

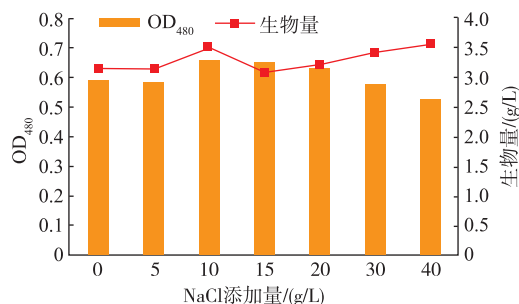


图5 不同盐度对海洋细菌1A05980产色素的影响

Fig. 5 Effect of salinity on pigment production of marine bacterium 1A05980

2.5 Plackett-Burman 设计筛选显著因素

通过 Plackett-Burman 试验,筛选出对海洋细菌1A05980 液态发酵产色素有显著影响的营养成分。实验结果见表4, PB 设计方差分析见表5。从各变量的回归系数可看出葡萄糖、蛋白胨、酵母粉、CaCl₂、MgSO₄·7H₂O、FeSO₄·7H₂O、NaCl 显示正效应, Na₂HPO₄ 显示负效应。PB 设计结果的方差分析表明,葡萄糖、酵母粉和 MgSO₄·7H₂O 的效应最大,且在置信区间 95%之中,是影响色素产量的显著因

表4 Plackett-Burman 设计及结果分析

Table 4 Experimental design and results of the PBD

NO.	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	OD ₄₈₀
1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	0.634 8
2	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	0.697 2
3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	0.643 9
4	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	0.574 0
5	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0.535 0
6	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	0.660 0
7	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	0.652 1
8	1	1	-1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	0.639 7
9	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	0.621 8
10	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	0.653 0
11	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	0.631 7
12	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	0.551 4

表5 Plackett-Burman 设计方差分析

Table 5 Results of the PBD ANOVA analysis

来源	平方和	自由度	回归系数	F 值	P 值	重要性
模型	0.024	8	0.570	12.46	0.031 1	是
葡萄糖	7.711×10 ⁻³	1	0.019	31.93	0.011 0	是
蛋白胨	5.208×10 ⁻⁵	1	2.083×10 ⁻³	0.22	0.674 0	
酵母粉	0.011	1	0.026	45.07	0.006 7	是
MgSO ₄ ·7H ₂ O	4.137×10 ⁻³	1	0.019	17.13	0.025 6	是
FeSO ₄ ·7H ₂ O	6.049×10 ⁻⁴	1	7.100×10 ⁻³	2.50	0.211 7	
Na ₂ HPO ₄	1.242×10 ⁻⁴	1	-3.217×10 ⁻³	0.51	0.525 2	
CaCl ₂	2.083×10 ⁻⁴	1	4.167×10 ⁻³	0.86	0.421 5	
NaCl	3.499×10 ⁻⁴	1	5.400×10 ⁻³	1.45	0.315 0	
误差	7.245×10 ⁻⁴	3				
总和	0.025	11				

素。所以将葡萄糖、酵母粉和 MgSO₄·7H₂O 的质量浓度进一步采用响应面法进行优化,以确定最佳发酵培养基成分。

2.6 响应面优化结果分析

以葡萄糖(α)、酵母粉(β)、MgSO₄·7H₂O(γ)3 个因素为自变量,色素的 OD 值(Y)为响应值,以Box-Benhkn 模型进行试验设计,采用 Design Expert 8.0 对试验数据进行分析。试验设计及结果见表 6。拟合得到二次回归模型如下:

$$y=1.03-0.017\alpha+0.034\beta+0.051\gamma-0.035\alpha\beta+2.350E-003\alpha\gamma-0.021\beta\gamma-0.23\alpha^2-0.15\beta^2-0.083\gamma^2。$$

此数学模型的方差分析结果见表 7,模型的 $P<$

0.000 1,表明该模型显著,可用来进行响应值预测;失拟项的 $P=0.941 2$,表明模型拟合程度理想;复相关系数 $R^2=0.987 9(R^2_{Adj}=0.972 2)$,表明方程的拟合度较好。由回归模型绘出葡萄糖、酵母粉和MgSO₄·7H₂O 对色素吸光度值影响的曲面图和等高线图(图 6)。回归方程求导得到此模型的最大值,当葡萄糖、酵母粉和 MgSO₄·7H₂O 的添加量分别为 9.78、2.05 g/L 和 8.17 g/L,最大响应值为 1.039 35。因此确定海洋细菌 1A05980 发酵产色素的最优培养基组分:葡萄糖 9.78 g/L,蛋白胨 8.00 g/L,酵母粉 2.05 g/L, MgSO₄·7H₂O 8.17 g/L,Na₂HPO₄ 0.1 g/L,FeSO₄·7H₂O 0.005 g/L,NaCl 10 g/L,CaCl₂ 0.1 g/L。为了检验模型

表 6 Box-Benhnken 试验设计及结果

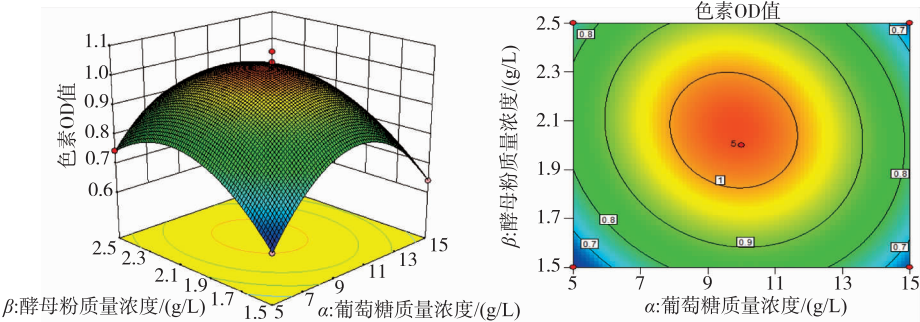
Table 6 Experimental design and results of Box – Benhnken design (BBD)

试验号	α	β	γ	色素 OD 值
1	-1	0	-1	0.682 0
2	1	0	-1	0.642 0
3	-1	1	0	0.745 0
4	0	0	0	1.002 0
5	1	-1	0	0.640 8
6	1	1	0	0.642 0
7	0	0	0	1.024 0
8	-1	0	1	0.793 0
9	0	0	0	1.080 0
10	0	-1	1	0.834 0
11	0	-1	-1	0.703 9
12	1	0	1	0.762 4
13	0	0	0	0.998 0
14	0	1	-1	0.811 4
15	0	1	1	0.856 5
16	-1	-1	0	0.602 1
17	0	0	0	1.045 0

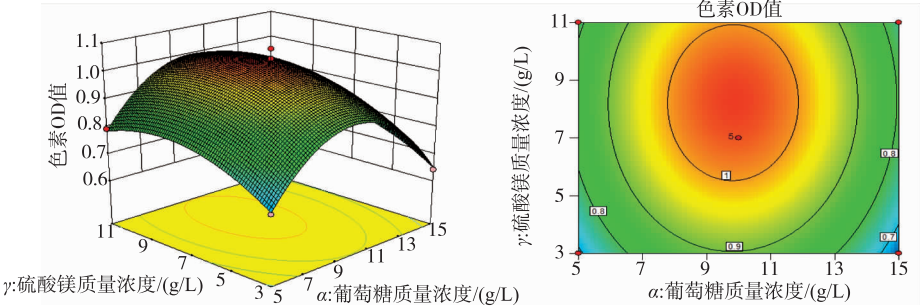
表 7 RSM 设计的多元二次模型方差分析

Table 7 ANONA for the response surface quadratic model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
Model	0.41	9	0.045	63.25	<0.000 1
A	2.275×10^{-3}	1	2.275×10^{-3}	3.19	0.117 3
B	9.391×10^{-3}	1	9.391×10^{-3}	13.17	0.008 4
C	0.021	1	0.021	28.97	0.001 0
AB	5.020×10^{-3}	1	5.020×10^{-3}	7.04	0.032 8
AC	2.209×10^{-5}	1	2.209×10^{-5}	0.031	0.865 3
BC	1.806×10^{-3}	1	1.806×10^{-3}	2.53	0.155 6
A ²	0.22	1	0.22	304.05	<0.000 1
B ²	0.089	1	0.089	124.72	0.000 1
C ²	0.029	1	0.029	40.65	0.000 4
误差	4.993×10^{-3}	7	7.133×10^{-4}		
失拟项	4.246×10^{-3}	3	1.415×10^{-4}	0.12	0.941 2
纯误差	4.569×10^{-3}	4	1.142×10^{-3}		
总和	0.41	16			



(a)葡萄糖与酵母粉交互作用影响色素产量的响应面图和等高线图



(b)葡萄糖与MgSO₄·7H₂O交互作用影响色素产量的响应面图和等高线图

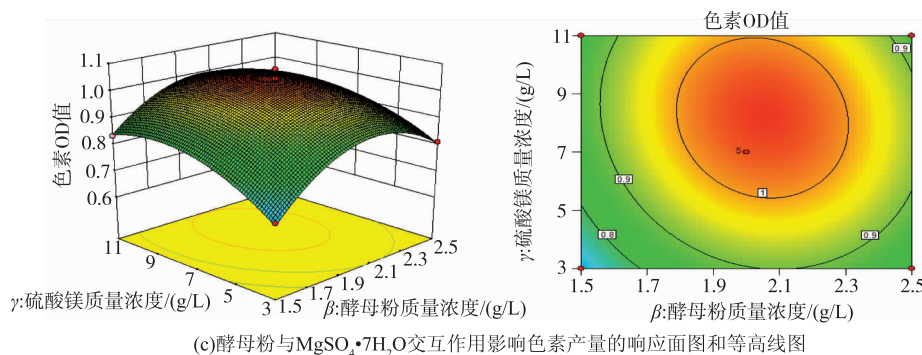


图6 葡萄糖、酵母粉和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 对色素吸光度影响的曲面图和等高线图

Fig. 6 Response surface and contour plots showing the effect of cross-interaction among glucose, yeast extract and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ on the production of pigment

预测的准确性,使用此培养基,控制培养温度 25 ℃,培养时间 54 h,进行 3 次验证实验,所得实际的色素吸光度平均值为 0.984。实际值达到理论预测值的 94.67%,十分接近,说明该模型可以较好地预测实际发酵情况。

3 结 语

运用 Plackett-Burman 法确定了葡萄糖、酵母粉和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 是影响海洋细菌 1A05980 液态发酵产色素的主要因素,然后采用响应面法中的 Box-Behnken 设计建立了显著因子与色素产量的二次多项数学模型,确定液态发酵培养基的成分为:葡萄糖 9.78 g/L,蛋白胨 8.00 g/L,酵母粉 2.05 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8.17 g/L, Na_2HPO_4 0.1 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.005 g/L, NaCl 10 g/L, CaCl_2 0.1 g/L。使用此培养基,控制培养温度 25 ℃,培养时间 54 h,得到发酵液色素的 OD 值为 0.984,较初始量 0.285 提高了 3.45 倍。同时,模型所得到的最大预测值与验证值非常接近,说明回归方程能较真实地反映各筛选因素的影响。在产量优化的基础上,对色素的色谱分析,纯化鉴定及色素的性质将在进一步的研究和后续文章中讨论。

实验证明,Plackett Burman 设计与 Box-Behnken Design 设计相结合的试验统计方法能快速、有效地从众多影响色素液体发酵的因素中筛选出比较重要的影响因素并实现优化,得到最佳培养基成分,优化结果与实际发酵情况吻合较好。

参考文献:

- [1] SWAMY G J, SANGAMITHRA A, CHANDRASEKAR V. Response surface modeling and process optimization of aqueous extraction of natural pigments from Beta vulgaris using Box-Behnken design of experiments[J]. *Dyes and Pigments*, 2014, 111: 64-74.
- [2] MARAN J P, PRITA B, NIVETHA C V. Optimization of ultrasound-assisted extraction of natural pigments from Bougainvillea glabra flowers[J]. *Industrial Crops and Products*, 2015, 63: 182-189.
- [3] CHIDAMBARAM K V, ZAINUL A Z, WAN A A. Bacterial pigments and their applications [J]. *Process Biochemistry*, 2013, 48: 1065-1079.
- [4] NADIM C S, ZUMBUEHL S, DELAVY F, et al. Synthetic organic pigments of the 20th and 21st century relevant to artist's paints; Raman spectra reference collection[J]. *Spectrochimica Acta Part A*, 2009, 73: 505-524.
- [5] SHEN Guoqiang, YANG Chunxia, ZHANG Dong. Research and development of nature colorant (Dyestuff)[J]. *Dyestuffs and Coloration*, 2009, 46(1): 7-10. (in Chinese)
- [6] SAMEER AS-Mapari, ULF T, MEYER A S. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants?[J]. *Trends in Biotechnology*, 2010, 28: 300-307.
- [7] PALANIVEL V, SERALATHAN K K, VELLINGIRI B, et al. Natural pigment extraction from five filamentous fungi for industrial applications and dyeing of leather[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 79: 262-268.

- [8] NUTHATHAI S, MIREILLE F, ALAIN V, et al. Bacteria belonging to the extremely versatile genus *Arthrobacter* as novel source of natural pigments with extended hue range[J]. **Food Research International**, 2014, 65: 156-162.
- [9] SELVAKUMAR D, ASHOKKUMAR B, DHEVENDARAN K. Food-grade pigments from *Streptomyces* sp isolated from the marine sponge *Callyspongia diffusa*[J]. **Food Research International**, 2009, 42: 487-492.
- [10] VIMAL S P, NIDHI S, UJJVAL B T, et al. An enhancement of red pigment production by submerged culture of *Monascus purpureus* MTCC 410 employing statistical methodology[J]. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2014, 3: 140-145.
- [11] WANG H S, JIANG P X, LU Y, et al. Optimization of culture conditions for violacein production by a new strain of *Duganella* sp. B2[J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2009, 44: 119-124.
- [12] CLAIRA A A, CHIDAMBARAN K V, ZAINUL A Z, et al. Brown sugar as a low-cost medium for the production of prodigiosin by locally isolated *Serratia marcescens* UTM1[J]. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 2014, 95: 19-24.
- [13] 何磊. 产虾青素海洋酵母菌 YS-185 的鉴定, 发酵优化及保藏稳定性的研究[D]. 上海: 上海海洋大学食品科学与工程学院, 2011.
- [14] WANG Xiaolei, XIE Yifang, TANG Wei, et al. Separation and identification of marine bacterium SS04 and optimization of fermentation condition for intracellular red pigment produced by SS04[J]. **China Brewing**, 2013, 32(4): 95-99. (in Chinese)
- [15] CHEN Feifei, WANG Yong, WANG Yiguang, et al. Advance in research and development of natural products from marine microorganisms[J]. **Chinese Journal of Applied and Environmental Biology**, 2011, 17(2): 287-294. (in Chinese)
- [16] MOSTAFA E R, RAINER E. Secondary metabolites of fungi from marine habitats[J]. **Nat Prod Rep**, 2011, 28: 290-344.
- [17] DAVID M P, PATRICIA V, PAULA B, et al. Marine natural pigments: Chemistry, distribution and analysis [J]. **Dyes and Pigments**, 2014, 111: 124-134.
- [18] RATIH P, Se-Kwon K. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae [J]. **Journal of Functional Foods**, 2011, 3: 255-266.
- [19] XIE Fengxia, QIU Zumin, TU Shenghui, et al. Comparison between ethanol and ultrasonic extraction method used in extraction of gardenia yellow[J]. **Journal of Nanchang University (Natural Science)**, 2005, 29(3): 278-281. (in Chinese)
- [20] 刘振学. 实验设计与数据处理[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [21] 汤海青. 用海洋细菌 *Pseudoalteromonas tetrodonis* QZ-4 发酵生产褐藻胶裂解酶的研究[D]. 浙江: 浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 2010.

科 技 信 息

欧盟食品安全局重新评估卡拉牙树胶作为食品添加剂的安全性

据欧盟食品安全局(EFSA)消息,2016年12月21日,欧盟食品安全局就卡拉牙树胶(karaya gum)作为食品添加剂的安全性再次发布意见。

欧盟专家组对卡拉牙树胶的安全性进行评估发现,卡拉牙树胶的基因毒性不会对人体构成影响,动物实验 1250 mg/kg 体重每天的剂量下未产生毒性。人体按照 100 mg/kg 体重每天的剂量服用的耐受性较好,因此专家组得出结论认为,没有必要制定确切的卡拉牙树胶 ADI 值,然而成人每天的摄入量不能超过 7 000 mg。

[信息来源] 食品伙伴网. 欧盟食品安全局重新评估卡拉牙树胶作为食品添加剂的安全性 [EB/OL]. (2016-12-27). <http://news.foodmate.net/2016/12/409962.html>