

极地寡营养细菌(*Alteromonas stellipolaris* sp. nov.) 色素的提取及其理化性质的研究*

刘 彬¹ 戚向阳³ 杨季芳^{2,3}

(1. 华中农业大学食品科技学院 武汉 430070; 2. 宁波市微生物与环境工程重点实验室 宁波 315100;
3. 浙江万里学院生物与环境学院 宁波 315100)

提要 以分离自南极海洋的寡营养细菌所产的褐色素为试验材料,进行了该色素的提取和稳定性分析。结果表明,色素粗品至少含有 3 种以上不同的褐色素,该褐色素易溶于水和甲醇;最大吸收波长为 214nm;在 pH 4.0、热、光照(自然光与紫外线)下都能表现出良好的稳定性;抗 H₂O₂、HNO₃ 氧化能力强,NaClO 对其破坏较大;Na₂SO₃、抗坏血酸对其有护色作用;Fe³⁺、Fe²⁺和 Pb²⁺则有一定的破坏作用,Mg²⁺对该色素有护色作用,其它金属离子影响不大。试验表明,寡营养细菌褐色素在稳定性上呈现出一定优势,具有作为一种天然色素资源的开发和应用价值。

关键词 极地寡营养细菌,褐色素,稳定性

中图分类号 TS202.3

色素是食品、饲料、化妆品和医药工业广泛应用的着色剂。天然色素来自动物、植物、微生物的组织或代谢产物,其色调自然、柔和,能更好地模仿天然物质的颜色,大多无副作用,安全性高,且本身具有其它某些营养或抑菌的特殊功能,因此成为当今世界研究的热点。微生物色素是微生物次生代谢产物,由微生物发酵产生,易于规模化生产。微生物的培养基大多为植物淀粉,来源广、价格低廉,所以生产微生物色素成本较低,是一类优良天然色素来源,具有较大的发展潜力(吴晓冰等,2008)。不少海洋微生物均能产生色素(Francesco *et al.*, 1997),但利用海洋微生物发酵提取色素,国内外报道较少,多见于利用红曲霉菌产红色素、黄色素;利用红酵母产虾青素;利用霉菌等产β-胡萝卜素等(王普等,2002)。褐色素由于具有保健功能和鲜明的色调,在副食和饮料中应用最为广泛,安全性也得到了人们的一致认可。在我国现阶段,褐色素大都采用可可、咖啡等为原料,根据其特性进行提取(马钟锦,1999)。

极地寡营养细菌(*Alteromonas stellipolaris* sp.

nov.)由于其对低温和寡营养的南极海洋环境独特的适应性和强抗逆性形成了其独特的代谢方式和防御体系,可以提供在陆地微生物中罕见的代谢产物,多数为新型生物活性和先导化合物,如抗冻物质、低温酶、多糖、抗菌病毒物质、抗紫外辐射、色素等,是一种资源丰富的生防菌(Stefanie *et al.*, 2004)。但目前未见有关利用寡营养细菌 *A. stellipolaris* sp. nov.生产天然褐色素的报道。

由于微生物所产生的色素对光、热和酸碱的稳定性将直接影响其使用价值,本文对 *A. stellipolaris* sp. nov.菌株发酵液的色素提取方法、光谱学特征、色素的理化稳定性进行了研究,以为寡营养细菌 *A. stellipolaris* sp. nov.褐色素在生物化工、食品工业中的规范应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

本课题实验菌株 *Alteromonas stellipolaris* sp. nov.(以下简称 AT52),分离自南极海洋,由德国

* 国家科技部国际合作重点资助项目,2007DFA21300 号;中德政府海洋双边合作项目, BMBF CHN 00/019 号;宁波市科技局资助项目,2004C100056 号、2007C11002 号。刘 彬,2007 级硕士研究生, E-mail: zhaojunhaitang@126.com

通讯作者: 杨季芳, 研究员, E-mail: jfkw1q@163.com

收稿日期: 2009-03-17, 收修改稿日期: 2009-05-26

Alfred Wegener 极地与海洋研究所(AWI) Dr. Tjhing Lok Tan 惠赠。

1.2 培养基

采用改良的 Zobell 2216E 培养基(袁宝红, 2005) (发酵培养: 蛋白胨 = 0.4%, 酵母浸出物 = 0.075%, 溶于 100ml 陈海水中, 调 pH = 7.7)于 10.5 ℃ 下培养, 发酵 10 天后收集发酵液。

1.3 仪器、设备与试剂

754 紫外可见分光光度计: 上海菁华科技仪器有限公司; UV-2102PC 型紫外可见分光光度计: 尤尼柯(上海)仪器制造有限公司; 超声波细胞粉碎仪: 宁波新芝科器研究所; 超低温冷冻干燥机: Thermo Electron(美国)分析仪器有限公司; 低速离心机: 上海安亭科学仪器厂; 旋转蒸发器: Heidolph(德国)仪器有限公司; HH.W21.600 数显式电热恒温水浴锅: 上海悦丰仪器仪表有限公司; 试验所用试剂为分析纯, 水为双蒸水。

1.4 方法

1.4.1 AT52 褐色素的胞内胞外分泌鉴定方法 采用常规检测(马自超等, 1994)与细菌负染电镜观察进行判断。取细菌发酵液, 5000r/min 离心 10min, 得上清液和下层菌体, 观察上清液及菌体颜色, 再将所得菌体加少量蒸馏水, 超声波细胞破碎 10min, 5000r/min 离心 10min, 观察上清液颜色; 另做 AT52 负染示胞外产物电镜图片。

1.4.2 AT52 褐色素的提取方法 采用郭凤华等(2008)方法, 并略作改进。取寡营养细菌 AT52 发酵液 200ml, 于烧杯中加入等体积的 50% 甲醇浸泡 12h, 6000r/min 离心 15min, 取上层色素清液, 70 ℃ 旋转蒸发浓缩上清液, 无水乙醇溶解, 6000r/min 离心 15min 去除非溶解杂质, 再经旋转蒸发器浓缩, 制得黏稠状色素粗品, 超低温冷冻干燥, 得色素干品。

色素粗品产率计算方法如下(马自超等, 1994): $n = M/V$, 式中, n 为粗品产率(mg/ml), M 为干燥后色素粗品质量(mg), V 为发酵液体积(ml)。

1.4.3 色素吸收光谱的测定 称取 10mg 色素溶于 10ml 甲醇中, 制成 1mg/ml 的色素甲醇溶液, 并以甲醇溶液作参比液, 用紫外分光光度计于 200—800nm 进行全波长扫描。

1.4.4 色素的溶解性测定(袁保红等, 2005) 分别称取 AT52 褐色素粗品 0.050g 16 份于 16 支试管中, 然后分别加入水、甲醇、95% 乙醇、50% 甲醇、30% 乙醇、丙酮、异丙醇、苯、乙酸乙酯、石油醚、乙醚、

正丁醇、1% NaHCO₃、1% Na₂CO₃、1% NaOH、1% HCl 各 5ml, 玻璃棒搅拌 30min, 静置 2h 后观察现象。

1.4.5 色素薄层色谱分析(何丽一, 2005) 基于薄层色谱分析 AT52 褐色素分离分析, 用甲醇配制浓度为 1mg/ml 的色素溶液, 用毛细管点于硅胶板 H(25mm × 75mm), 通过多次筛选, 确定用氯仿: 乙酸乙酯: 甲醇: 乙酸 = 4: 4: 1.5: 1 作展开剂在层析缸中进行展开, 分别在 254nm、360nm 紫外灯下观察展开结果, 计算色带的 R_f 值。

1.5 细菌色素稳定性实验

1.5.1 pH 值对色素稳定性的影响 分别用 pH 值 2.0—12.0 的缓冲溶液配制 0.5mg/ml 的色素溶液, 静置 2h 后观察色素溶液色调, 并在波长为 475nm 处测其 Abs 值。每个试验样重复 3 次。以色素原液为对照, 计算不同 pH 色素溶液的色素残存率。

$$\text{色素残存率} = Abs_n / Abs_0$$

式中, Abs_0 、 Abs_n 分别为处理前后色素溶液在波长 475nm 处的 Abs 值(袁保红等, 2005)。

1.5.2 光照对色素溶液稳定性的影响 取等量色素溶液置于室内自然光下照射 7 天, 期间每隔 24h 观察色调, 取样, 并于波长 475nm 处测其 Abs 值。每个试验样重复 3 次。另一份置紫外灯下 254nm 照射 30、60、90、120min, 分别观察色调, 同时以色素原液为对照, 于波长 475nm 处测定 Abs 值, 计算色素溶液色素残存率。

1.5.3 温度对色素稳定性的影响 用蒸馏水配制浓度 1mg/ml 的色素溶液, 分别于 30、40、50、60、70、80、90、100 ℃ 水浴中加热。每隔 30min 取样一次, 快速冷却至室温, 在波长 475nm 处测其 Abs 值。每个试验样重复 3 次。同时以色素原液为对照, 计算色素溶液色素残存率。

1.5.4 还原剂对色素溶液稳定性的影响 用 0.5、1.0、3.0mmol/ml 各 3 个不同浓度等级的 Na₂SO₃、抗坏血酸溶液配制 1mg/ml 的色素溶液。室温(25 ℃)下放置 2h 后观察其色调并在波长为 475nm 处测其 Abs 值, 每个试验样重复 3 次。以色素水溶液为对照, 计算色素溶液色素残存率。

1.5.5 氧化剂对色素溶液稳定性的影响 用 0.5、1.0、3.0mmol/ml 的 H₂O₂、NaClO 和 HNO₃ 溶液配制 1mg/ml 的色素溶液, 室温(25 ℃)下放置 2h 后观察其色调并于波长为 475nm 处测其 Abs 值, 每个试验样重复 3 次。以色素水溶液为对照, 计算色素残存率。

1.5.6 金属离子对色素溶液稳定性影响 分别用

0.5mmol/L、10mmol/L 的 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 、 K^+ 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Al^{3+} 、 Pb^{2+} 溶液配制 0.2mg/ml 的色素溶液。每隔 30min 观察色调并于波长 475nm 处测 A_{475} 值, 每个试验样重复 3 次。以色素水溶液为对照, 计算色素溶液色素残存率。

1.6 统计学方法

计量资料用平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm \text{SD}$) 表示(吴晓冰等, 2008)。

2 结果与分析

2.1 色素粗品产率

色素的产率直接影响色素生产效益, 因此采用此指标评价 AT52 褐色素综合品质的优劣, 并指导发酵培养条件的调整。

试验结果得出发酵液色素产率为 15mg/ml, 后继试验将进行发酵培养条件的探索, 以期获得更高的产率。

2.2 细胞色素胞内外分泌鉴定分析

将细菌发酵液离心后, 可以观察到上清液为深红褐色, 下层菌体超声波破碎离心后, 发现上清液无色; 由此判定该色素属于胞外分泌产物。细菌 AT52 细胞负染电镜观察进一步佐证了上述分析, 如图 1 所示。

2.3 褐色素的溶解性

通过溶解性试验可以看出, AT52 褐色素可溶于极性较大的溶剂, 而不溶于或难溶于弱极性与非极性溶剂(图 2); 其中, 蒸馏水、50% 甲醇、30% 乙醇、1.0% NaHCO_3 、1.0% HCl 能完全溶解色素, 具有较强提取能力; 甲醇、95% 乙醇部分有一定提取能力; 1.0% NaOH 、1.0% Na_2CO_3 有絮状物生成, 非极性



图1 寡营养细菌AT52细胞负染电镜观察示胞外产物分泌
Fig.1 Electron micrographs of negatively stained preparations of AT52 cells, showing extracellular products

注: 箭头所指为AT52胞外产物

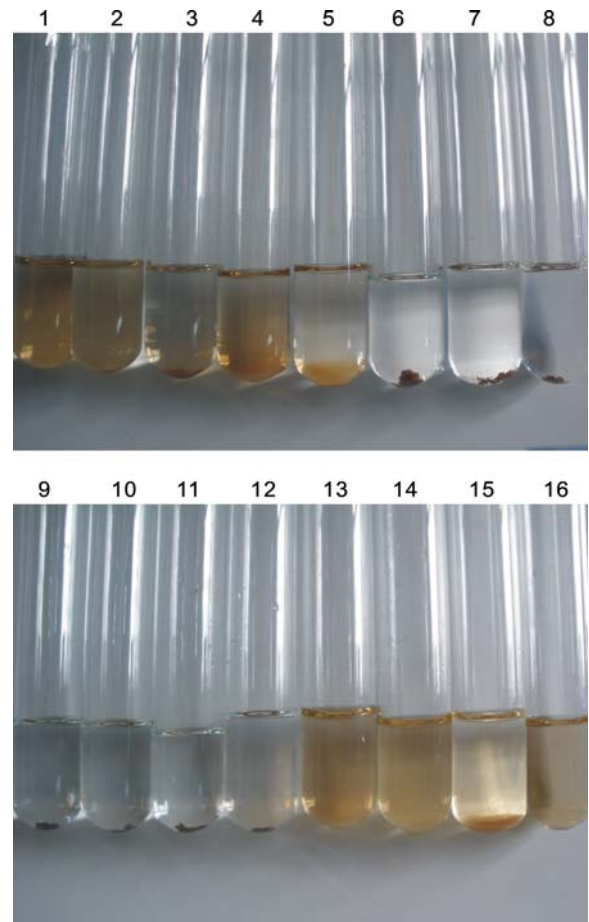


图2 AT52 色素提取溶剂选择试验结果

Fig.2 Selection of solvents for the extraction of AT52 pigments

注: 1. 蒸馏水, 2. 甲醇, 3. 95% 乙醇, 4. 50% 甲醇, 5. 30% 乙醇,

6. 丙酮, 7. 异丙醇, 8. 苯, 9. 乙酸乙酯,

10. 石油醚, 11. 乙醚, 12. 正丁醇, 13. 1% NaHCO_3 , 14. 1%

Na_2CO_3 , 15. 1% NaOH , 16. 1% HCl

极性较小的溶剂如石油醚、乙酸乙酯、丙酮等不能提取色素。利用这一性质可以通过萃取技术对 AT52 粗提色素进行初步纯化, 以除去大部分脂溶性杂质。相同条件下, 在 475nm 处测得 50% 甲醇吸光度最大, 提取率较高, 后续试验均以 50% 甲醇作为提取剂。

由此判定该色素为水溶性色素, 这一基本特性决定了后继试验设计, 对色素的应用具有实际指导意义。

2.4 色素吸收光谱

如图 3 所示, AT52 褐色素在紫外区有一最大吸收, $\lambda=214\text{nm}$; 在可见光区, 该色素的吸光度随波长增大而减小, 无最大吸收波长。色素可见光区无吸收峰, 说明稳定的褐色素为混合物(吕俊芳等, 2001; 段晓红等, 1997; 徐磊等, 2003), 从吸收光谱推测本色素分子含有苯环及酚羟基。一般认为, 典型黄酮类化合物

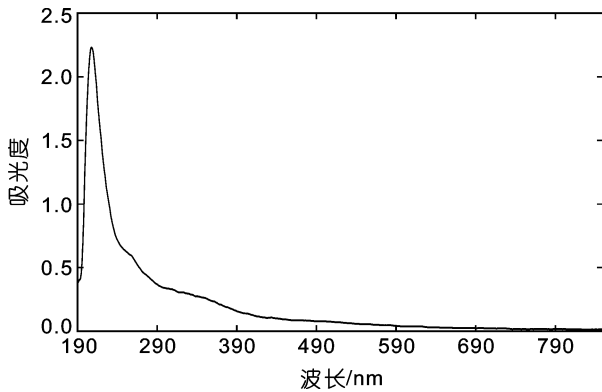


图3 AT52 褐色素紫外-可见光谱图

Fig.3 Ultraviolet-visible spectrogram of AT52 brown pigment

在波长 240—400nm 内有两个吸收带(刘静波等, 2007), 而 AT52 褐色素光谱不具有这一特点, 推测本色素可能不属于黄酮类化合物。试验所用培养基、溶剂及色素粗品中其它非显色物质在波长 475nm 没有吸收峰, 不影响色素 Abs 值的测定(王海燕等, 2003)。

2.5 色素薄层色谱分析

R_f 值表示样品组分在层析板上的位置, 也表示该组分在流动相和固定相中的运动状况。根据某组分 R_f 值再结合展开剂的极性大小可以基本推断该组分的极性大小。

色素薄层色谱分析结果显示, 薄层板上可见 3 条色带, 其 R_{f1} 、 R_{f2} 、 R_{f3} 值分别为 0.12、0.28、0.783, 在紫外灯下均有吸收, 其中 R_{f1} 值为 0.28 的色带有荧光, 表明本试验 AT52 发酵所得的色素粗品中含有至少 3 种以上不同褐色素。其中, R_{f3} 值为 0.783 的褐色带稳定性较差, 暴露在空气中并在室内自然光照射下易褪色, R_{f1} 值为 0.12 的褐色带颜色最深, 对光、氧较稳定

2.6 pH 对色素稳定性的影响结果

经测得 AT52 发酵液 pH 值为 8.32。由表 1 可知, 随着 pH 值的上升, 色素溶液 Abs 值总体呈上升趋势, 在 pH 3.0—12.0 范围内, 溶液呈褐色, 无沉淀生成; 其中以 pH 12.0 的色素溶液 Abs 值最大, 残存率为 99.6%, 说明该色素与碱发生了反应, 有助色基团生成(吕俊芳等, 2001; 段晓红等, 1997), 但在 pH 8.0 时, 色素残存率仍达到 97.7%, 考虑到碱性越强, 色素容易与碱发生反应, 因而寡营养细菌 AT52 培养以中性培养基为宜, 这也与测得的色素发酵液 pH 8.32 相接近。试验表明, 寡营养细菌 AT52 所产褐色素, 在 pH <3 时损失率较大; 而在 pH 4 时稳定。

表 1 pH 值对色素稳定性的影响

Tab.1 Effects of pH value on the stability of AT52 brown pigment

| pH 值 | 残存率(%) | 色调 | 沉淀 |
|------|------------|-----|----|
| 2.0 | 89.2±0.036 | + | * |
| 3.0 | 79.7±0.031 | + | - |
| 4.0 | 94.6±0.028 | + | - |
| 5.0 | 94.6±0.041 | + | - |
| 6.0 | 95.6±0.055 | + | - |
| 7.0 | 93.9±0.042 | + | - |
| 8.0 | 97.7±0.055 | + | - |
| 9.0 | 92.7±0.052 | + | - |
| 10.0 | 93.5±0.047 | + | - |
| 11.0 | 98.9±0.043 | ++ | - |
| 12.0 | 99.6±0.056 | +++ | - |

注: “+”表示褐色深浅程度, “+”越多表明颜色越深; “*”表示色素溶液有沉淀产生, “-”表示无沉淀产生

2.7 光照对色素稳定性的影响

由表 2 知, 相同的色素溶液, 在 254nm 紫外照射下, 从 0—120min, Abs 值虽有所下降, 但是不明显, 色调不变, 120min 后色素残存率高达 93.6%; 在室内自然光(25℃)下放置 7 天后色调均保持原有的褐色, 色素残存率达 90.8% (pH 8.0), 色素的色调较稳定。说明 AT52 褐色素在紫外线与自然光下均能表现很好的稳定性。

2.8 温度及受热时间对色素溶液稳定性的影响

由表 3 可知, 对照组初始 Abs 为 0.194, 在 30—100℃ 范围内加热 30min, 对色素溶液的色泽影响极小。100℃ 下加热 30min 色素残存率仍高达 93.8%。高温加热超过 60min 时, 会使色素产生不同程度的褪

表 2 光照射对色素稳定性的影响

Tab.2 Effects of natural light on the stability of AT52 brown pigment

| 条件 | 时间 | 吸光值 | 残存率(%) | 色调 |
|-----|--------|-------------|--------|----|
| 紫外线 | 30min | 0.195±0.036 | 97.8 | 褐色 |
| | 60min | 0.194±0.031 | 97.5 | |
| | 90min | 0.191±0.045 | 95.9 | |
| | 120min | 0.186±0.051 | 93.6 | |
| 自然光 | 1d | 0.190±0.053 | 97.6 | |
| | 2d | 0.188±0.034 | 97.1 | |
| | 3d | 0.186±0.049 | 95.7 | |
| | 4d | 0.182±0.051 | 94.3 | |
| | 5d | 0.181±0.048 | 93.8 | |
| | 6d | 0.178±0.042 | 92.0 | |
| | 7d | 0.176±0.051 | 90.8 | |

表 3 温度及受热时间对色素稳定性的影响

Tab.3 Effects of temperature and heating time on the stability of AT52 brown pigment

| 温度() | 残存率(%) | | 色调 |
|-------|-------------|------------|----|
| | 30min | 150min | |
| 30 | 100±0.051 | 95.8±0.056 | 褐色 |
| 40 | 99.4±0.044 | 97.4±0.061 | |
| 50 | 102.5±0.045 | 98.4±0.047 | |
| 60 | 102.1±0.051 | 97.4±0.047 | |
| 70 | 101±0.052 | 97.4±0.055 | |
| 80 | 98.9±0.048 | 97.9±0.043 | |
| 90 | 97.4±0.046 | 91.7±0.049 | |
| 100 | 93.8±0.039 | 74.7±0.041 | |

色。试验表明: AT52 代谢的褐色素具有很好的热稳定性。80 以下的加热温度对该褐色素几乎无影响, 其色调仍保持明亮褐色。80 以上的加热温度对色素产生影响, 表现为色素溶液的 Abs 值下降, 且损失度与温度和加热时间呈正相关, 但其色调仍保持褐色, 无沉淀生成。试验表明该色素在加工中对温度要求比较低, 有可能应用于热加工的产品中(张捷莉等, 2005)。

2.9 还原剂对色素溶液稳定性的影响

色素还原剂稳定性试验结果见表 4。处理前色素溶液 Abs 对照为 0.215。加入 Na_2SO_3 和抗坏血酸的色素溶液残存率均有所提高, 且无沉淀或浑浊出现, 溶液颜色随还原剂浓度增加而逐渐变深, Abs 值有小幅升高。 Na_2SO_3 浓度 3mmol/ml、放置 2h 后色素残存率为 107.9%; 抗坏血酸浓度为 3mmol/ml 时, 2h 后色素残存率为 121.8%, 这与吕俊芳等(2001)、陈杰等(2007)研究的核桃外果皮中棕褐色素性质相似。说明还原剂对寡营养细菌 AT52 所产生的褐色素有很好的护色效果, 且其程度依赖于还原剂的浓度。抗坏血酸

属于自由基消除剂, 具有电子给予体的作用, 光照条件下, 能阻断 AT52 褐色素氧化的游离基连锁反应, 减少色素的损失(张晓丽等, 2008; 童斌等, 2005)。因此, 在 AT52 褐色素的贮藏和应用中, 可通过适量添加抗氧化剂来减少色素的损失。

表 4 还原剂对色素溶液稳定性的影响

Tab.4 Effects of reductant on the stability of AT52 brown pigment

| 还原剂 | 浓度 | 吸光值(2h) | 残存率(%) | 色调 |
|------------|-----|-------------|--------|----|
| 对照 | | 0.215±0.021 | 99.7 | 褐色 |
| Na_2SO_3 | 0.5 | 0.219±0.043 | 101.8 | |
| Na_2SO_3 | 1 | 0.225±0.045 | 104.5 | |
| Na_2SO_3 | 3 | 0.232±0.057 | 107.9 | |
| 抗坏血酸 | 0.5 | 0.226±0.046 | 105.4 | |
| 抗坏血酸 | 1 | 0.239±0.038 | 111.2 | |
| 抗坏血酸 | 3 | 0.262±0.044 | 121.8 | |

2.10 氧化剂对色素溶液稳定性的影响

色素氧化剂试验结果见表 5。处理前对照 Abs 为 0.147。低浓度或高浓度的 H_2O_2 、 HNO_3 作用下, 对褐色素的 Abs 值和其残存率的影响均相差不大, 放置 2h 后残存率仍接近对照组, 色调保持较好, 与空白对照处理差别不大, 无沉淀或浑浊。但添加强氧化剂 $NaClO$ 后, 溶液立即变浑浊, 2h 反应后, 试管底部出现沉淀, 色素原液变为轻微白色, 失去原有的褐色。实验说明极端寡营养细菌 AT52 所产褐色素在弱氧化剂下能表现出良好的抗氧化活性; 但在强氧化剂存在下色素会明显褪色, 抗氧化功能大大降低, 这与吴晓冰等(2008)研究结果相近, 推测是由于色素被 $NaClO$ 氧化, 发色集团被破坏, 生成沉淀所致。该褐色素经动物毒理实验证明无毒的情况下, 可考虑作

表 5 氧化剂对色素溶液稳定性的影响

Tab.5 Effects of oxidant on the stability of AT52 brown pigment

| 氧化剂 | 浓度(mmol/ml) | 吸光值(2h) | 残存率(%) | 色调 |
|----------|-------------|-------------|--------|-----------|
| 对照 | | 0.140±0.029 | 99.3 | 褐色 |
| H_2O_2 | 0.5 | 0.145±0.049 | 98.6 | |
| H_2O_2 | 1.0 | 0.143±0.054 | 97.2 | |
| H_2O_2 | 3.0 | 0.141±0.037 | 95.9 | |
| HNO_3 | 0.5 | 0.146±0.039 | 99.3 | |
| HNO_3 | 1.0 | 0.143±0.046 | 97.2 | |
| HNO_3 | 3.0 | 0.144±0.041 | 97.9 | |
| $NaClO$ | 0.5 | 0.118±0.044 | 80.2 | 浅褐色 |
| $NaClO$ | 1.0 | 0.105±0.055 | 71.4 | 微白色伴有沉淀生成 |
| $NaClO$ | 3.0 | 0.065±0.051 | 44.2 | 微白色伴有沉淀生成 |

为食品添加剂使用(马同锁等, 2006)。

2.11 金属离子对色素溶液稳定性的影响

金属离子对色素溶液稳定性试验结果见表 6。由表 6 可以看出, 添加 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 的溶液颜色变化明显, 其中含 Fe^{3+} 溶液变为深黄色并带有絮状沉淀, 含 Fe^{2+} 溶液变为橙黄色浑浊溶液, 褐色素结构基本被破坏, 所以 AT52 褐色素在提取和应用过程中应尽量避免与铁制容器的接触; Pb^{2+} 、 Mg^{2+} 无论浓度高低都能对色素产生增色作用, 试验还发现相同浓度色素溶液, 加入饱和中性醋酸铅溶液后, 有乳白色沉淀生成, 推测是 Pb^{2+} 与色素生成络合物有关(袁保红等, 2005), 使得溶液吸光值变大, 因而相同情况下 Mg^{2+} 对 AT52 褐色素能够起到较好的护色作用; 无论浓度高低, 其它金属离子对色素溶液均无明显变化。

3 讨论与结论

3.1 讨论

天然色素物质在加工及贮藏过程中因受热、受

光、接触空气氧化对色素稳定性产生不同程度的影响。因此, 探讨天然色素在不同条件下稳定性变化规律, 可使原料原有的天然色泽和添加的天然色素得到更好的保持。试验对寡营养细菌 AT52 代谢产生的褐色素进行了稳定性研究, 结果显示, 寡营养细菌 AT52 褐色素在稳定性上呈现出一定优势, 因此具有较大应用潜力。

寡营养细菌 AT52 褐色素为胞外分泌, 水溶性, 与一般细菌胞内分泌不同, 不需要超声波破碎菌体, 色素产量相对较大, 收集也较为容易(Joris *et al*, 2001), 具有广泛应用的可能。该褐色素最大吸收波长与现有较多报道的核桃外果皮色素、花生红衣褐色素、荔枝核褐色素的 λ_{max} (210nm) 相近, 可能具有相近的化学结构(吕俊芳等, 2001; 陈杰等, 2007)。这可能缘于其高度的共轭效应而产生的广谱光吸收特性(段晓红等, 1997; Sun *et al*, 1999; Jakub *et al*, 2006)。由于在紫外区的吸收峰值极高, 该色素与其它物质同时存在时, 可能获得较好的防晒效果。由色素

表 6 金属离子对色素溶液稳定性的影响
Tab.6 Effects of different metal ions on the stability of AT52 brown pigment

| 金属离子 | 静置时间(h) | | | 残存率 (%) | 色调 |
|----------------------------|-------------|-------------|-------------|---------|----------|
| | 0 | 2 | 4 | | |
| 原液对照 | 0.186±0.038 | 0.184±0.041 | 0.193±0.054 | | 褐色 |
| 0.5mmol/L Cu^{2+} | 0.173±0.034 | 0.166±0.049 | 0.175±0.064 | 90.67 | |
| 0.5mmol/L Mn^{2+} | 0.180±0.044 | 0.184±0.062 | 0.187±0.032 | 96.89 | |
| 0.5mmol/L Ca^{2+} | 0.181±0.054 | 0.184±0.066 | 0.187±0.039 | 96.89 | |
| 0.5mmol/L Na^+ | 0.171±0.033 | 0.185±0.033 | 0.186±0.047 | 96.37 | |
| 0.5mmol/L K^+ | 0.168±0.029 | 0.183±0.049 | 0.191±0.046 | 98.96 | |
| 0.5mmol/L Zn^{2+} | 0.182±0.031 | 0.180±0.032 | 0.182±0.055 | 94.30 | |
| 0.5mmol/L Mg^{2+} | 0.175±0.039 | 0.186±0.052 | 0.197±0.052 | 102.07 | |
| 0.5mmol/L Al^{3+} | 0.154±0.030 | 0.172±0.029 | 0.184±0.041 | 95.34 | |
| 0.5mmol/L Pb^{2+} | 0.167±0.032 | 0.184±0.042 | 0.196±0.053 | 101.55 | |
| 10mmol/L Cu^{2+} | 0.195±0.032 | 0.196±0.055 | 0.201±0.067 | 104.14 | |
| 10mmol/L Mn^{2+} | 0.189±0.032 | 0.181±0.029 | 0.190±0.049 | 98.44 | |
| 10mmol/L Ca^{2+} | 0.191±0.048 | 0.189±0.037 | 0.199±0.052 | 103.10 | |
| 10mmol/L Na^+ | 0.187±0.041 | 0.180±0.054 | 0.184±0.059 | 95.33 | |
| 10mmol/L K^+ | 0.191±0.049 | 0.200±0.034 | 0.201±0.032 | 104.14 | |
| 10mmol/L Zn^{2+} | 0.180±0.062 | 0.212±0.044 | 0.209±0.034 | 108.29 | |
| 10mmol/L Mg^{2+} | 0.168±0.033 | 0.196±0.032 | 0.204±0.056 | 105.69 | |
| 10mmol/L Al^{3+} | 0.188±0.049 | 0.202±0.029 | 0.208±0.047 | 107.77 | |
| 10mmol/L Pb^{2+} | 0.255±0.031 | 0.250±0.058 | 0.249±0.056 | 129.01 | |
| 0.5mmol/L Fe^{3+} | — | — | — | | 深黄色并带有沉淀 |
| 0.5mmol/L Fe^{2+} | — | — | — | | 橙黄色溶液 |
| 10mmol/L Fe^{3+} | — | — | — | | 深黄色并带有沉淀 |
| 10mmol/L Fe^{2+} | — | — | — | | 橙黄色溶液 |

pH 稳定性推测其结构中可能存在某种共轭双键或烯醇式与酮式互变异构的基团,或是多苯环结构(吴晓冰等,2008;吕俊方等,2001)。金属离子对褐色素的护色增色作用可能与介质 pH 值有关,在中性至碱性环境,Fe³⁺、Pb²⁺更易产生沉淀或絮状物质,其机理有待进一步深入研究。

关于极端寡营养细菌 AT52 高产褐色素菌株的诱变、选育,以及褐色素的分离纯化与结构鉴定及其毒理学试验及功能性评价等,皆在进一步研究之中。作为一种新型的天然食品添加剂,以期应用于食品行业。

3.2 结论

(1) AT52 为胞外分泌色素,菌体本身不含有色素。

(2) AT52 代谢产生的褐色素在 214nm 处有最大吸收峰。且吸收强度大,峰型较锐,在可见光区其吸光度随波长增大而减小,无最大吸收波长。薄层层析结果显示,色素粗品中含有至少 3 种以上不同的褐色素。

(3) AT52 褐色素具有较好的热稳定性,100 加热 30min 色素残存率高达 93.8%,能够满足大部分食品生产要求。100 加热 150min,其色调仍保持不变,无沉淀产生,适合加工高温产品。这可能使 AT52 褐色素在应用方面具有较大优势,可用于软糖、果冻、蛋糕等食品着色(吕俊芳等,2001)。

(4) AT52 褐色素的稳定性与溶液的 pH 值相关,在 pH<3.0 环境中稳定性较差,在 pH 4.0 环境中稳定性较好。

(5) 褐色素的光稳定性较好,色素溶液在自然光(25)下放置 7 天后色调稳定,色素最高残存率达 90.8% (pH 8.0);紫外线照射 120min,残存率仍保持在 93.6%;

(6) AT52 产生的褐色素抗氧化能力强;还原剂能够对该色素起到保色的效果,且其颜色与还原剂浓度正相关;

(7) Mg²⁺能在一定程度上对褐色素起到护色作用;Fe³⁺、Fe²⁺会使色素改变原有的色调,低浓度 Pb²⁺能对色素起到增色作用,高浓度 Pb²⁺会使色素产生灰白色沉淀;其它金属离子对色素无影响。

参 考 文 献

马同锁,袁红楼,赵士豪等,2006. 一株产色素土壤小单孢菌 SP-15 的筛选及其色素的提取和理化性质研究. 食品工程, 2: 48—49
 马自超,庞世珍,1994. 天然食用色素化学及生产工艺学. 北

京: 中国林业出版社, 25—122
 马钟锦,1999. 豆酱褐色素. 中国食品, 20(2): 9—18
 王 普,裘娟萍,郑裕国,2002. 高产虾青素的红发夫酵母菌种的选育. 微生物学通报, 9(1): 15—19
 王海燕,陈 青,2003. 荔枝核棕色素的提取及稳定性研究. 贵州化工, 28(2): 79—81
 吕俊芳,张美丽等,2001. 核桃外果皮中棕褐色素的提取及性质测试. 化学研究与应用, 13(4): 387—388
 刘静波,林松毅,王作昭等,2007. 笃斯越橘叶片黄酮类化合物分离组分 I 结构鉴定. 食品科学, 28(9): 89—91
 吴晓冰,于 新,吴 青,2008. 绿色木霉菌 T-YY 黄色素的稳定性研究. 农业工程学报, 24(1): 285—289
 何丽一,2005. 平面色谱方法及应用(第 2 版). 北京: 化学工业出版社, 140—144
 张晓丽,刘洪海,张希波等,2008. 番茄红素及其制品稳定性研究进展. 食品与发酵工业, 24(4): 121—123
 陈 杰,徐鹤龙,2007. 花生红衣褐色素的提取工艺研究. 广东农业科学, 9: 76—79
 段晓红,毛 歆,彭珍荣,1997. 固定化细胞生产黑色素的研 究. 武汉大学学报(自然科学版), 43: 294—253
 袁保红,杜青平,蔡创华等,2005. 一株新海洋细菌生物学特性及其色素性质的研究. 广东药学院学报, 21(2): 183—185
 徐 磊,王长海,2003. 短梗霉黑色素的提取及其理化性质的研究. 食品科学, 27(8): 122—124
 郭凤华,王 慧,毛得奖,2008. 产绿色素土壤细菌菌株的生物学特性及色素稳定性的研究. 中国酿造, 198: 19—21
 童 斌,杨薇红,钱树林,2005. V_C 对月季切花开花和衰老的影响. 西北农业学报, 14(5): 87—91
 Francesco Pietra, 1997. Secondary metabolites from marine microorganisms: bacteria, protozoa, algae and fungi. Achievements and prospects. Natural Product Reports, 7(65): 453—463
 Jakub P, Juan B Arellano, Teemu P *et al*, 2006. Internal structure of Chlorosomes from brown-colored Chlorobium species and the role of Carotenoids in their assembly. Biophysical Journal, 91: 1433—1440
 Joris M, An Verhelst, Margo C *et al*, 2001. Characterization of facultative oligotrophic bacteria from polar seas by analysis of their fatty acids and 16 sDNA sequences. Systematic and Applied Microbiology, 24: 98—107
 Stefanie Van Trappen, Tjhing-Lok Tan, Jifang Yang, 2004. *Alteromonas stellipolaris* sp. nov., a novel, budding, prosthecate bacterium from Antarctic seas, and emended description of the genus *Alteromonas*. International Journal of Systematic and Evolution Microbiology, 10(53): 1157—1163
 Sun Baoshan, Belchior G Pedro, Ricardo-da-Silva J M *et al*, 1999. Isolation and purification of dimeric and trimeric proanthocyanidins from grape seeds. Journal of Chromatography, 841(1): 115—121

EXTRACTION AND CHEMO-PHYSICAL CHARACTERISTICS OF BROWN PIGMENT PRODUCED BY OLIGOTROPHIC BACTERIUM *ALTEROMONAS STELLIPOLARIS* sp. nov. IN POLAR SEA

LIU Bin¹, QI Xiang-Yang³, YANG Ji-Fang^{2,3}

(1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, 430070; 2. Municipal Key Laboratory of Microorganism and Environmental Engineering, Ningbo, 315100; 3. College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo, 315100)

Abstract The extraction condition and stability of brown pigment from oligotrophic bacteria *Alteromonas stellipolaris* sp. nov. collected from deep sea of the Antarctica are studied. The results show that at least three types of brown pigments were found in the crude pigment, and they are easy to dissolve in water and methanol. The maximum absorption wavelength is 214nm. The pigment was stable in pH 4.0, heat, and illumination (natural light or ultraviolet radiation) conditions, unstable in NaClO, and strong against H₂O₂ and HNO₃. Na₂SO₃ and ascorbic acid were protective to the pigment. Fe³⁺, Fe²⁺, Pb²⁺, but Mg²⁺ solution was protective to it. Other metals had weak effects on the pigment. Therefore, the brown pigment of *Alteromonas stellipolaris* sp. nov. is quite stable and can be developed for future application.

Key words Oligotrophic bacteria in polar sea, Brown pigment, Stability