

光合细菌 H₃ 菌株色素分析*

李勤生 王若雪**

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

提 要

H₃菌株系由盐田微生物层中分离获得的光合细菌株。具有丰富的天然色素。经活细胞色素光谱吸收峰值测定, 色素经有机溶剂提取、硅胶薄板层析、SDS-PAGE电泳等, 结果表明 H₃菌株的主要色素包括细菌叶绿素 a、细菌脱镁叶绿素 (Bacteriophaeophytin) 和三种类胡萝卜素。总胡萝卜素含量占细胞干重的 0.6%, 胡萝卜素蛋白复合体的分子量约 11,000。培养条件的差异对色素形成及相对含量有不同程度的影响。

关键词 光合细菌, 天然色素, 细菌叶绿素 a, 胡萝卜素蛋白复合体

光合细菌细胞中含有丰富的天然色素。细菌叶绿素和类胡萝卜素在光合作用过程中各自执行着重要功能, 它们是光合作用机理研究的关键部分。有关光合色素的研究很多。目前已知光合细菌中细菌叶绿素即有 6 种, 包括细菌叶绿素 a、b、c、d、e 和 g^[1]。由光合细菌合成的类胡萝卜素超过 80 种^[2], 并不断有新的报道。

光合细菌色素在特定培养条件下是具有特征性的, 是分类鉴定的重要依据之一。此外, 天然色素是开发新产品的对象, 在药品、食品添加剂等方面有着广阔的应用前景^[3]。

有关盐田微生物垫中光合细菌株色素的研究在国内尚未见有报道。本文将 H₃菌株色素分离纯化方法、组成分析, 以及培养条件对色素的影响等研究结果报告如下, 为进一步深入研究提供科学依据和基础资料。

1 材料与方法

1.1 菌种来源 H₃菌株系由我国海南省莺歌海盐田微生物垫中分离获得。

1.2 培养条件 根据实验要求对培养基成份、培养温度、pH、盐分以及光照条件作适当的组合, 以比较不同培养条件下活细胞色素吸收光谱峰值。采用日本产岛津 U.V.—3 000 双光束分光光度计扫描, 波长范围为 320—900nm。样品制备方法参照文献 [4]。

1.3 色素及色素蛋白的提纯和分析 载色体的提取: 离心收集细胞, 悬浮于蒸馏水中, 超声波处理破碎细胞。离心收集上清液, 等电点沉淀, 再用 (NH₄)₂SO₄ 沉淀。离心收集沉淀物溶于少量 10mmol/L pH7.0 的磷酸缓冲液中, 对水透析 24h, 测定制备物的吸收光谱。

* 本研究系农业部重点科研合同项目, 编号 85—91060104

** 系武汉大学实习生, 现在 Wayne State University, USA.

1994年12月1日收到, 1996年10月8日收到修改稿。

色素提取和组份分析: 色素用丙酮提取后, 转入正己烷或石油醚中, 在惰性气流下浓缩色素液。用硅胶薄板层析方法分析其组份。展层剂为石油醚 80%, 异丙醇 2%、丙酮 7.5%、甲醇 2.5%。

1.4 类胡萝卜素纯化 制备型硅胶薄板层析纯化, 展层剂与分析薄板层析同。展层后, 取下薄板上的不同色素带, 加入丙酮溶出色素, 离心取上清液, 测吸收光谱。

氧化铝柱层析分离纯化柱 $20 \times 1.5\text{cm}$ 。将氧化铝悬浮于石油醚中, 湿法装柱。将溶于石油醚中的色素上样, 用含 3%—10% 丙酮的石油醚洗脱, 分部收集类胡萝卜素, 除去洗脱剂, 将色素溶于丙酮或正己烷中。

1.5 胡萝卜素蛋白复合体的纯化 破细胞后加入含 1.5% 浓氨冷丙酮, 充分提取; 离心去上清, 蒸馏水洗涤, 再离心去上清, 加入 0.1mol/L pH7.0 的磷酸缓冲液, 充分提取, 离心取上清, 硫酸铵分部沉淀、透析, 再离心收集胡萝卜素蛋白复合体。

1.6 SDS-PAGE 分离 胶为 7.5% 浓度薄型板状凝胶, 稳压 50V 电泳, 染色液为考马斯亮兰 R250(0.05% 溶于含异丙醇 25%, 冰醋酸 10% 水溶液中); 胶板浸入 5% 甘油水溶液中过夜。然后在室温下干燥, 封入塑料薄膜中保存。SDS 凝胶电泳分子量标记为 Sigma 产品 V11-L, 牛血清白蛋白 (66,000), 磷酸-3-甘油醛脱氢酶 (36,000), 碳酸酐酶 (29,000), 胰蛋白酶原 (24,000), 胰蛋白酶抑制剂 (20,000) 和 α -乳清蛋白 (14,000)。

2 结果与讨论

2.1 不同培养条件下 H_3 菌株细胞色素光谱吸收曲线的比较

在不同培养基 (R 或 N)、光照 (白炽灯或日光灯)、温度、盐份和 pH 条件下, H_3 菌株细胞色素光谱吸收曲线检测结果有不同程度的差异 (表 1)。

表 1 培养条件对 H_3 菌株细胞色素光谱吸收峰值的影响

Tab.1 Absorption spectra of living cells of H_3 strain under different culture conditions

编号 No.	培养基 ¹⁾ Medium	NaCl %	pH pH	温度℃ Temperature	光照 Illumination	色素光谱吸收峰值nm				
						Spectral absorption values nm				
2	R	1.0	7.0	30	日光灯	385	527	590*	680	805 830
26	N	1.0	7.0	30	日光灯	380	490	520	590*	676 805 856
3	R	1.5	7.0	30	日光灯	382	527	590*	680	805* 830
22	N	1.5	7.0	20	日光灯	375	520	590*	678	805* 830 875
13	R	3.6	7.0	30	日光灯	384	527	590*	680	805* 830
14	R	3.6	7.0	30	白炽灯	385	527	590*	680	805 830 850*
15	R	3.6	7.0	30	白炽灯	375	520	590*	676	805* 830 850*
12	R	3.6	7.0	25	日光灯	380	488		590	676 805 856
17	R	3.6	7.0	25	日光灯	380	490		590	676 805 858
10	R	3.6	8.0	30	日光灯	382	527	590*	680	805 830
5	R	5.0	7.0	30	日光灯	382	527	590*	680	805* 830

* 肩峰

1) 李勤生、卫翔、王若雪。光合细菌 H_3 菌株的分离及其生物学特性研究, 水生生物学报 (待发表)。

在 R 和 N 两种不同培养基中, H₃ 菌株细胞色素吸收峰值有所不同, 如 26 号培养物在 856、490nm 处出现有吸收峰, 而 2 号在 R 培养基中则在 830nm 处有一吸收峰。当盐份提高至 1.5% 时, 加上温度的差别, 3 号和 22 号培养物除后者有 875nm 吸收峰外, 其它却是相似的。13、14、15 号培养物在盐分、pH、温度均相同的条件下, 仅光照条件有别, 白炽灯光照者有 —850nm 肩峰。当培养物在 20—25℃ 培养时, 它们的吸收峰值亦与 30℃ 培养者有明显的差别, 如 12、17 号培养物与相应培养物比较即可发现。在本试验中差异不甚显著的是在 pH=8、四种不同浓度盐份培养物之间, 但在吸收峰值相似的培养物中, 各吸收峰的相对比例量是有差别的, 如 14 号培养物 527nm 和 830nm 处两吸收峰的比例量约为 1:1, 而在 3 号培养物中, 此两峰的比例量为 1.05:1 左右。这种差别在不同培养物中均可发现(图 1,2), 表明其中色素组成量上有所变化。在 R 培养基中培养的 H₃ 菌株细胞类胡萝卜素含量约占细胞干重的 0.6%。

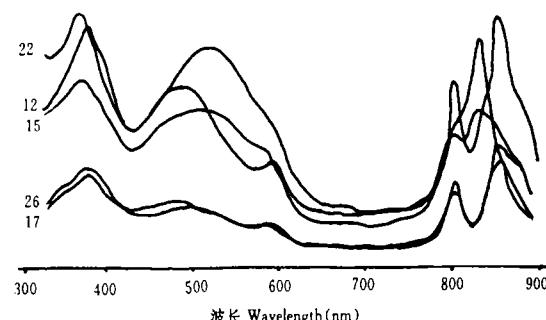


图2 在不同培养条件下 H₃ 菌株活细胞吸收光谱(二)

Fig.2 Absorption spectra of living cells of H₃ strain under different culture conditions (2).

光合细菌色素复杂多样,许多因素都可能影响其色素合成和积累,以

图1 在不同培养条件下 H₃ 菌株活细胞吸收光谱(一)

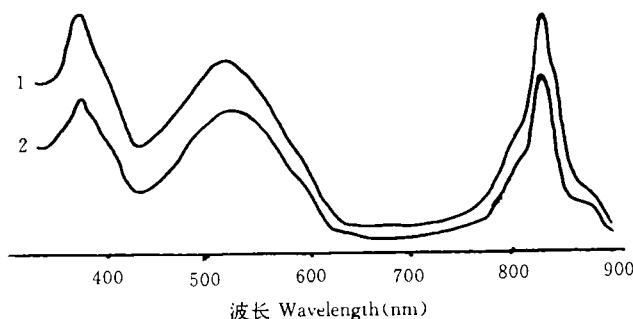
Fig.1 Absorption spectra of living cells of H₃ strain under different culture conditions (1).

表 2 H₃ 菌株色素光谱吸收峰值测定结果

Tab.2 Absorption spectra of pigments of H₃ strain by chromatography on silica gel and Al₂O₃ column

组别 Groups		色素光谱吸收峰值 (nm) Spectral absorption values					
硅胶 薄板 层析 on silica	I	486	516				
	II	481	520				
	III	486	521				
	IV	358*	381	523*	676	747*	
	V	359*	431	573*	676*	772*	
氧化铝柱层析		I	375	481	520		
Chromatography on Al ₂ O ₃ column		II	380	484	514		

*主峰

图 3 H_3 菌株整细胞与载色体色素光谱吸收曲线比较

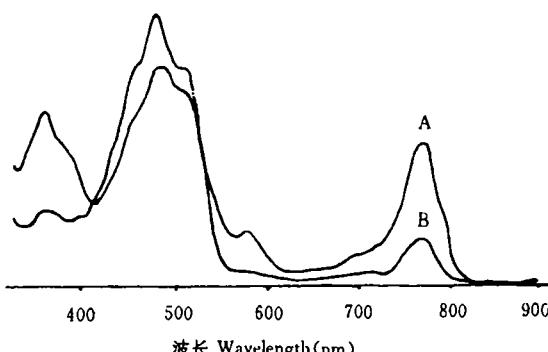
1: 整细胞, 2: 载色体

Fig. 3 Comparison of absorption spectra between living cells
and chromatophore of H_3 strain.

可见, 载色体与整细胞光谱吸收峰值相似, 说明采用等电点沉淀、硫酸铵分部沉淀方法获得的载色体基本保存了细胞色素的特性, 提取效果是好的。

2.2.2 色素组成分析: 硅胶薄板层析结果表明 H_3 菌株含有 5 种主要色素。I、II、III 均属类胡萝卜素; V 为细菌叶绿素 a, IV 与细菌脱镁叶绿素光谱吸收峰相似^[5]。氧化铝柱层析所收集的类胡萝卜素已达相当纯度, 其中残留的细菌叶绿素甚少。(表 2)。

2.2.3 类胡萝卜素的提纯: 丙酮和正己烷均可用于提纯此种色素。但比较两种有机溶剂提纯的效果发现, 在本样品中以正己烷为佳, 其中残留的细菌叶绿素量较之丙酮提取液少得多(图 4)。经检测三种类胡萝卜素的最大吸收峰值为 481—486 nm, 516—521 nm(I-III)。与已有文献记载数据比较, 它们与 3, 4-脱氢玫瑰红品(3, 4-Dehydrorhodopin)、奥氏酮(Okoneone)、红极毛杆菌烯酮(Sphaeroidenone)、紫菌红醇(Rhodovibrin)、脱水紫菌红醇(Anhydrorhodovibrin)等相似^[6]。这几种

图 4 H_3 菌株类胡萝卜素提取液光谱吸收曲线

A——丙酮提取液, B——正己烷提取液

Fig. 4 Absorption spectra of carotenoids of H_3 strain.
A——In acetone, B——In hexane

及其组成的变化。为了进一步深入研究影响 H_3 菌株色素合成的调控因子, 增加新的试验组合, 扩大各组间培养条件的差异程度, 将有可能发现易被忽略的各种变化, 探讨其调控机制为人类定向合成和积累某类天然色素提供科学依据, 是有其理论和应用价值的。

2.2 色素和色素蛋白的提取和分析

2.2.1 载色体的提取: 由图 3

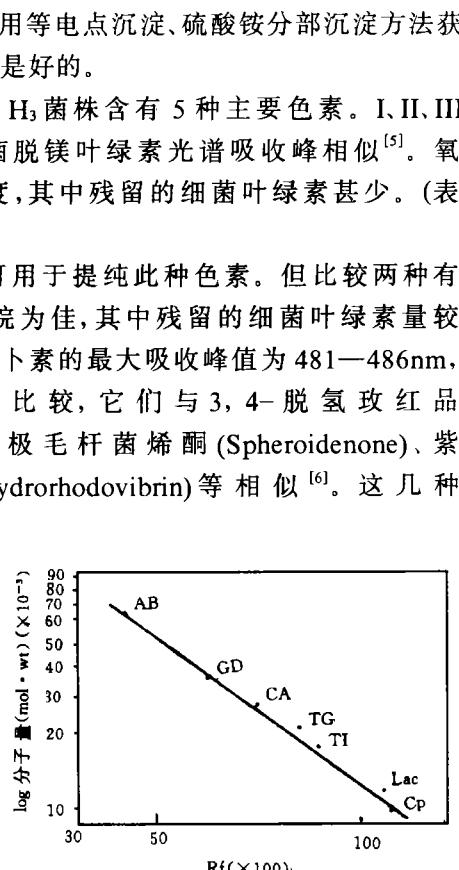
图 5 H_3 菌株类胡萝卜素蛋白复合体分子量电泳测定

Fig. 5 Analysis of molecular weight carotenoprotein of H_3 strain.

色素仅从光谱吸收峰值上难以区分。根据 H₃菌株生物学特性研究结果看来,应属于着色菌属(Chromatium)成员。此类细菌包含色素种类丰富,上述色素多在其中,看来这两方面的结果还是相当吻合的(图 4)。

2.2.4 胡萝卜素蛋白复合体纯化及分子量的测定:图 5 所示 SDS-PAGE 图谱可见纯化效果良好,杂蛋白几乎除尽。与几种标准蛋白比较,此色素蛋白分子量约 11,000。图 5 中,AB-牛血清白蛋白(66,000),CA-碳酸酐酶(29,000),TI-胰蛋白酶抑制剂(20,000),CP-胡萝卜素蛋白(11,000),GD-磷酸-3-甘油醛脱氢酶(36,000),TG-胰蛋白酶原(24,000),Lac-α-乳清蛋白(14,000)。

光合细菌色素种类多,因细菌种类不同而异,同时也受环境因子的影响。光合细菌色素之间的差别往往只是分子结构的微小变化,准确地鉴定它们必须十分谨慎。以上研究结果为 H₃菌株色素组成提供了有价值的科学资料,进一步研究尚在进行中。

参 考 文 献

- [1] Staley J T, Holt J G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore London: 1989.
- [2] Shinichi Takaichi, Keizo Shimada, Charaterization of carotenoids in photosynthetic bacteria. In "Methods in Enzymology" Vol.213, Carotenoids. Part A, 374—391. 1992. Academic Press Inc., Lester Packer (ed).
- [3] 刘如林. 光合细菌及其应用, 北京: 中国农业科技出版社. 1991.
- [4] Imhoff J F. Anoxygenic Phototrophic Bacteria. «Methods in Aquatic Bacteriology», Edited by B. Arstin. 1988, 207—240.
- [5] Jensen A, AAsmundrud O, Eimhjellen K E. Chlorophylls of photosynthetic bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1964, **88**: 466—479.
- [6] Goodwin T W. Microbial carotenoides. In: Handbook of Microbiology 1973, Vol.III. Microbial products, 75—83. CRC Press Cleveland.

ANALYSIS OF PIGMENTS IN PHOTOSYNTHETIC BACTERIUM STRAIN H₃

Li Qinsheng and Wang Ruoxue

(Institute of Hydrobiology, The Chineses Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract

Photosynthetic bacterium strain H₃ was isolated from microbial mat of evaporation pond in the saltern of Hainan Island. The absorption spectrum of living cells showed characteristics peaks of bacteriochlorophyll a and the higher peak of carotenoids. Thin-layer chromatography revealed 5 major photosynthetic pigments including 3 carotenoids with absorption maxima at 485 nm and 516nm, 481nm and 510nm, 486nm and 521nm, respectively in acetone. The total carotenoid content is about 0.6% of dry cell weight. An easily solubilized carotenoid-containing protein has been purified, and SDS-PAGE indicated a single polypeptide of MW 11,000 in the orange protein. A bacteriopnaeophytin is also found. Culture conditions such as light and temperature effect on pigment compositions were examined in photosynthetic bacteria.

Key words Photosynthetic bacteria, Natural pigments, Bchl a, Complex of carotenoprotein.