

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
52(6):760-768; 4 June 2012
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

紫细菌光合色素指纹图谱的建立与色素分析

卓民权, 赵春贵^{1*}, 程茜茹¹, 杨素萍^{1*}, 曲音波²

¹ 华侨大学生物工程与技术系, 厦门 361021

² 山东大学, 微生物技术国家重点实验室, 济南 250100

摘要: 【目的】探索快速高效的色素样品制备方法; 为建立紫细菌全色素 TLC 和 HPLC 标准指纹图谱和数据库提供研究方法和思路; 为色素代谢与调控等研究提供快速的色素分析方法。【方法】选择沼泽红假单胞菌 (*Rhodospirillum rubrum* CQV97) 为材料, 采用改良丙酮甲醇提取法、TLC 重复展层法、图像灰度分析法、吸收光谱法、HPLC 和 MS 法进行色素分析。【结果】甲醇或丙酮可选择性地提取样品的细菌叶绿素和类胡萝卜素, 通过对丙酮甲醇法的改良, 使色素提取总量提高了 13.5%。建立了 CQV97 菌株全色素的 TLC 和 HPLC 指纹图谱, 二者均含有 11 种色素组分。图像灰度分析法估算了 TLC 指纹图谱各色素组分的表观相对含量。以 TLC 图谱的各色素组分为外标物, 明确了 HPLC 图谱中各色素组分的保留时间 (R_t) 与 TLC 图谱中各色素组分的迁移率 (R_f) 之间的对应关系。结合色素代谢途径、光谱分析和 MS, 定性分析了指纹图谱中 11 种色素组分。TLC 或 HPLC 分析结果表明, 理论样品与对照样品色素组分和含量一致, 而实际样品与对照样品色素组分一致, 但含量不同, 重复测定 3 次, 样品中色素相对含量的 RSD 均小于 5%。【结论】改良的丙酮甲醇法可以快速高效地提取光合细菌的色素。采用 TLC 重复展层法和 HPLC 法建立的全色素指纹图谱色素组成一致, 重复稳定性好, 各具特色。TLC 和 HPLC 两种指纹图谱分析方法均能进行光合色素的快速分析, 适合于紫细菌色素合成途径中主要积累色素的组分和含量变化规律研究。

关键词: 紫细菌, 类胡萝卜素, 细菌叶绿素, 沼泽红假单胞菌

中图分类号: Q93-3 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 06-0760-09

不产氧光合细菌 (简称光合细菌) 含有丰富的类胡萝卜素 (Car) 和细菌叶绿素 (BChl), 是光合作用的重要功能单位, 细胞中积累的主要色素组分和含量是色素代谢与环境调控的综合体现。近年来, 光合作用功能单位 Car 和 BChl 及其色素蛋白复合体的环境适应性调控机制成为新的研究热点^[1-3]。另外, 由于光合细菌在营养食品、饲料添加剂、医药

保健和化妆美容等领域的诱人应用前景, 其产品种类和数量近年来迅速增加^[4]。因此, 迫切需要建立简单、快捷、成本低廉、选择性高的光合色素分析方法, 以满足色素代谢调控机制研究、菌种或菌株的快速鉴别和鉴定以及光合细菌产品质量评价等需要。

用于光合色素分析的方法主要包括光谱分析 (UV-Vis)、核磁分析 (NMR)、质谱分析 (MS)、HPLC

基金项目: 国家自然科学基金 (31070054); 福建省自然科学基金 (2010J01209); 中国科学院城市环境与健康重点实验室基金 (KLUEH201005)

* 通信作者。Tel: +86-592-6166178; E-mail: chungui@hqu.edu.cn, yangsuping@hqu.edu.cn

作者简介: 卓民权 (1986-), 男, 广西人, 硕士研究生, 研究方向为微生物资源与利用。

收稿日期: 2011-11-28; 修回日期: 2012-02-23

和 TLC 等。目前常用光谱测定法,结合 Jessen 和 Beer-Lambert-Bouguer 公式估算菌体中 Car 和 BChl 的总量。但由于色素组分中检测信号相互干扰,光谱分析、MS 和 NMR 对光合细菌色素的纯组分容易分析,很难进行色素多组分分析。HPLC 是多组分分析常用的方法,由于采用的色谱柱类型、洗脱剂成分、洗脱方式等存在较大差异,通常采用标准对照进行分析。但由于大多数色素不稳定,目前尚缺乏光合色素标品,因此 HPLC 方法很难进行光合色素多组分定性定量分析。目前主要采用 HPLC 与 UV-Vis、MS 和/或 NMR 等相结合的方法和策略进行光合细菌 Car 组分^[5-7]或 BChl 组分^[8]的分析,但仪器昂贵、成本较高。另外,TLC 指纹图谱已广泛用于多种物质鉴定和分析^[9-10]。利用 TLC 结合 UV-Vis、MS 或 NMR 等方法已应用于光合细菌光合色素研究,例如本课题组对紫色非硫细菌 *Rhodobacter azotoformans* 色素光氧调控和海洋紫色硫细菌 *Marichromatium gracile* 色素组分的研究^[11-12]。鲜有光合细菌光合色素 Car 和 BChl 同时系统分析的报道,也未见到 HPLC 或 TLC 指纹图谱的分析方法用于 Car 和 BChl 组分快速分析的报道。

鉴于此,本文选择沼泽红假单胞菌 CQV97 菌株为材料,系统研究了 Car 和 BChl 全色素样品的快速制备,探索了 TLC 和 HPLC 全色素色谱分析条件,获得了 CQV97 菌株 TLC 和 HPLC 色素指纹图谱;以 TLC 条带的色素为参考标准品,明确了 HPLC 指纹图谱色素保留时间(R_t)与 TLC 指纹图谱色素迁移率(R_f)之间的对应关系;利用 UV-Vis 和 MS 对 TLC 指纹条带的色素进行了定性分析。以定性分析的 TLC 和/或 HPLC 指纹图谱为标准图谱,进行了实际样品的色素分析。通过待测菌株与对照菌株色素指纹图谱相比较,实现了色素的快速分析,为光合细菌色素代谢与调控研究、菌种鉴别和产品质量检测与评价等色素测定提供了快速分析方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:沼泽红假单胞菌 CQV97 (*R. palustris* CQV97) 和海洋着色菌 *Marichromatium gracile* YL28, GenBank 登录号分别为 EU882154 和 JF719917,本实验室分离、鉴定并保存。

1.1.2 主要试剂和仪器:甲醇、丙酮及乙腈为色谱纯,其它试剂为分析纯,均来自国药集团化学试剂有限公司。UV-3200PCS 紫外可见分光光度计(MAPADA)。智能人工气候培养箱(ZRX-300E 型)。高效液相色谱仪(CTO-20A, DAD Detector, Shimadzu)。台式高速离心机(5417R, Eppendorf)。超声细胞破碎仪(JY92-I, 宁波新芝生物科技公司)。旋转蒸发器(RE-52C, 巩义予华仪器公司)。LC/MS (Agilent Technology, 1200 series, 6310 Ion Trap)。硅胶薄板(G 型, 青岛海洋化工)。

1.2 培养基和培养条件

采用改良的 Ormerod 培养基^[13],用 2.46 g/L 乙酸钠替代其中的 6.0 g/L 苹果酸钠。培养条件为 2500 lux、30℃ 条件下光照厌氧培养。

1.3 色素的提取和含量测定

离心收集光照厌氧液体培养物菌体细胞,蒸馏水洗涤 3 次。以提取液中 BChl 和 Car 含量为指标,通过超声波处理,对传统的丙酮甲醇法进行了改良。方法 1 采用传统的丙酮甲醇法(7:2, V/V)提取 5 次。方法 2 和 3 为改良的丙酮甲醇提取法,方法 2 依次用甲醇和丙酮甲醇(7:2, V/V)各提取 1 次,再用丙酮提取 3 次。方法 3 用甲醇提取 2 次,再用丙酮提取 3 次。按菌体细胞和溶剂为 1:12 (w:v, g:mL) 的比例加入提取剂,冰浴超声波处理 10 min (400 W, pulse 4s, stop 6s),离心收集上清,残余物继续依次加入提取剂重复上述处理过程,最后合并提取液。Car 的定量按 Jessen 公式进行计算, $C = (D \cdot V \cdot f \times 10) / 2500$, 其中 C 为 Car(mg), V 为提取液总体积(mL), f 为稀释倍数, D 为 Car 最大吸收峰的光密度, 2500 为 Car 平均消光系数。BChl 含量参照 Beer-Lambert-Bouguer 定律进行计算, $C = D \cdot V \cdot f / (a \cdot L) \times 10^3$, 其中 a 为消光系数($l \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$), L 为光程(cm)。全色素总量是 Car 总量和 BChl 总量之和。

1.4 色素 TLC 指纹图谱

色素提取液经减压旋转蒸发干燥,用乙醚溶解并定容,使 BChl 总含量为 0.5 mg/mL,在硅胶 G 板上进行点样,点样量为 10-20 μ L,然后选择不同极性的展层剂进行展层,结束后将展层板用扫描仪扫描或拍照,得到色素的 TLC 指纹图谱图像,再用 Gel-Pro analyzer 软件分析。

1.5 吸收光谱测定

从 TLC 层析板上刮取各条带色素,将其溶于相

同体积的色谱纯丙酮中,充分振荡,离心取上清,用光程为 1 cm 石英比色杯,于 UV-3200PCS 紫外-可见分光光度计上进行全波长扫描。

1.6 色素 HPLC 指纹图谱

色素提取液经减压旋转蒸发干燥,用色谱纯甲醇溶解并定容,使 BChl 总含量为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,经 0.45 μm 滤膜过滤,用 HPLC 进行色素组分分析。刮取 TLC 各条带的色素溶于色谱纯甲醇,离心过滤, HPLC 分析,确定 TLC 色素条带与 HPLC 洗脱峰之间的对应关系。HPLC 测定采用反向 C18 柱 (Shim-pack VP-ODS, 150 mm \times 4.6 mm I. D, Shimadzu),柱温 25 $^{\circ}\text{C}$; DAD 检测器,检测波长为 190 nm - 800 nm。Car 检测波长为 475 nm, BChl 检测波长为 770 nm,上样量为 20 μL ,选择不同极性的溶剂和洗脱方式进行洗脱。

1.7 色素 MS 分析

从 TLC 层析板上刮取各条带色素,溶于色谱纯甲醇中,离心上清液经 0.45 μm 滤膜过滤后进行 LC-ESI-MS 分析。LC 条件:柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,流动相为甲醇:乙腈水溶液(乙腈:水,95:5, V/V),甲醇比例为 95%,乙腈水溶液为 5%,等度洗脱,流速 0.8 mL/min。Car 检测波长为 475 nm, BChl 检测波长为 770 nm。MS 条件:正离子模式,毛细管电压 5500 eV,干燥气流速 12 L/min,干燥气温度 350 $^{\circ}\text{C}$,雾化器压力 30 Psi,扫描范围 200 m/z - 1200 m/z,测定色素的相对分子量。

1.8 样品测定

以 *R. palustris* CQV97 作为理论样品,海洋着色菌 *Marichromatium gracile* YL28 作为实际样品,同时以 *R. palustris* CQV97 为对照样品,按优化的提取方法提取色素,以优化的 TLC 和 HPLC 参数分别测定实际样品和对照样品色素组分及相对含量,多次重复测定以评价方法的重复稳定性,同时与对照样品比较分析了 YL28 菌株的色素组分和相对含量。

2 结果和分析

2.1 色素的提取和含量的测定

3 种方法对色素的提取结果见图 1,方法 3 提取次数对色素提取的影响见图 2。方法 2 经过 3 次提取,Car 和 BChl 均达到最大提取量,色素总含量比方法 1 提高了 13.5%。方法 3 对色素提取具有选

择性,提取次数不同,提取物中 Car 和 BChl 的含量明显不同,第一次和第二次提取物以 BChl 为主,BChl 提取量达到最大,Car 仅提取了 10%,明显呈现 BChl 特征光谱,第三次和第四次提取以 Car 为主,仅第三次提取所得 Car 约占总 Car 80%,主要呈现 Car 的特征光谱,第五次几乎提取不到色素。结果表明:方法 2 提取 3 次,提取色素的总量高,适用于色素组分的快速分析。方法 3 对色素的提取具有选择性,经过 3 次提取分别获得以 BChl 和 Car 为主要色素的提取液,适用于 BChl 和 Car 组分的提取与分离。

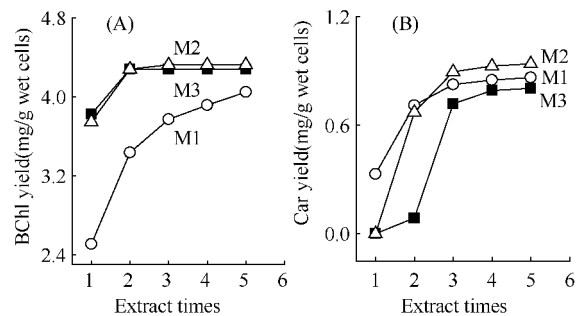


图 1 三种提取方法对 BChl (A) 和 Car (B) 提取量的影响

Fig. 1 Effects of pigment extract methods on yields of Car and BChl. M1 (method 1): extracted by acetone: methanol (7:2, V/V) five times. M2 (method 2): extracted by methanol once, acetone: methanol (7:2, V/V) once, acetone three times. M3 (method 3): extracted by methanol twice, acetone three times.

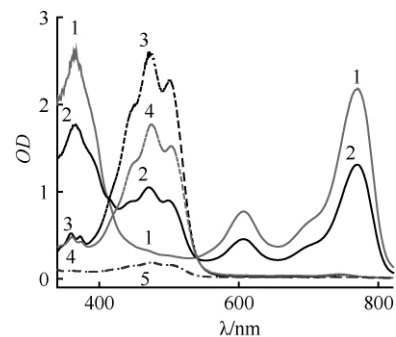


图 2 方法 3 中提取次数对色素提取的影响

Fig. 2 Effects of extract times on pigment components extracted by method 3. 1: methanol extract diluted 14 times. 2: methanol extract diluted 2 times. 3: acetone extract diluted 6 times. 4-5: acetone extract.

2.2 TLC 色素指纹图谱和灰度分析

依据条带分辨情况调整展层剂的极性,经探索

得到适合于色素分析的展层剂配方 a:石油醚、正己烷、异丙醇、丙酮和甲醇比例分别为 8-10:0.75-0.95:0.2-0.30:0.8-1.0:0.25-0.35。配方 a 能将色素提取液较好地分辨成 8 条彩色条带(图 3-A)。色素组分是否能被进一步展开? 进而又尝试采用重复展层的方法,即将展层剂 a 展层后的硅胶板吹干后再次展层,反复调整二次展层剂的极性进行重复展层,摸索出展层剂 b,能将色素提取液较好地分辨成 11 条彩色条带(图 3-B),展层剂 b 的配方为石油醚:正己烷:异丙醇:丙酮,比例为 10:0.95:0.22-0.25:0.38-0.41。结果表明,重复展层法呈现的 TLC 指纹图谱能将 CQV97 菌株全色素分辨成 11 条不同颜色条带的色素组分,从下而上依次为黄绿色、蓝绿、深蓝绿、绿色、紫色、黄色、黄色、紫色、红色、红棕色和橙黄色,编号为 T1-T11。

经 Gel-Pro analyzer 软件分析,将 TLC 指纹图谱中各色带转化成色素的灰度(Intensity)对 R_f 的曲线,呈现出 TLC 各色带灰度与其 R_f 值的关系,见图 4。用各色素条带的灰度的相对面积表示其相对含量,见表 1。结果表明,CQV97 菌株各色素条带 R_f 在 0.11-0.95 之间,各条带色素的相对含量不同,其中 T2、T3 和 T7 为菌体主要积累的色素组分,各条带色素的定性还需要进行以下分析。TLC 层析图像的灰度分析法用于定量分析简便快速,体现的是

表观相对含量,虽不能体现各色素组分的真实相对含量,但与真实相对含量之间存在一定的内在对应关系。

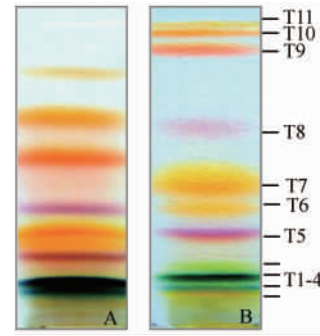


图 3 色素的 TLC 指纹图谱

Fig. 3 Profile of pigment fingerprints on TLC

A: Once Developing Method. B: Repeated Developing Method.

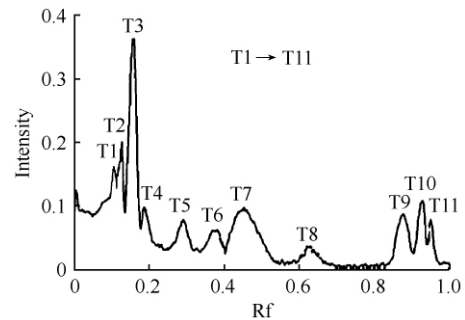


图 4 TLC 色素指纹图谱的图像灰度分析曲线

Fig. 4 Intensity curve of pigment fingerprintings on TLC.

表 1 TLC 指纹图谱各色带的 R_f 值、相对含量及特征吸收峰

Table 1 The R_f value, relative contents (from Figure 3B) and Characteristic absorption (from TLC spots) of different pigments

Spot on TLC	R_f value	Contents/%	Characteristic absorption	Compositions
T1	0.11	7.0	360, 396, 436, 455, 576, 682, 771	BChl
T2	0.13	12.2	360, 390, 433, 570, 682, 770	BChl
T3	0.16	33.2	360, 390, 433, 575, 680, 770	BChl
T4	0.20	5.7	385, 415, 680, 764	BChl
T5	0.29	6.0	357, 384, 523, 678, 747	Bphe
T6	0.38	5.4	458, 483, 516	Car
T7	0.46	11.5	473, 501	Car
T8	0.62	3.0	497, 524	Car
T9	0.87	7.5	492, 524	Car
T10	0.92	5.9	459, 483, 516	Car
T11	0.95	2.8	446, 471, 501	Car

2.3 TLC 色素指纹的光谱学特征

TLC 色素指纹图谱中各条带色素的吸收光谱见图 5,特征吸收峰见表 1。依据吸收光谱及特征吸收

峰可知,条带 T1-T4 为 BChl a 衍生物(图 5-A),T5 为细菌脱镁叶绿素(bacteriopheophytins, Bphe)(图 5-B),T6-T11 属于 Car 组分(图 5-C)。

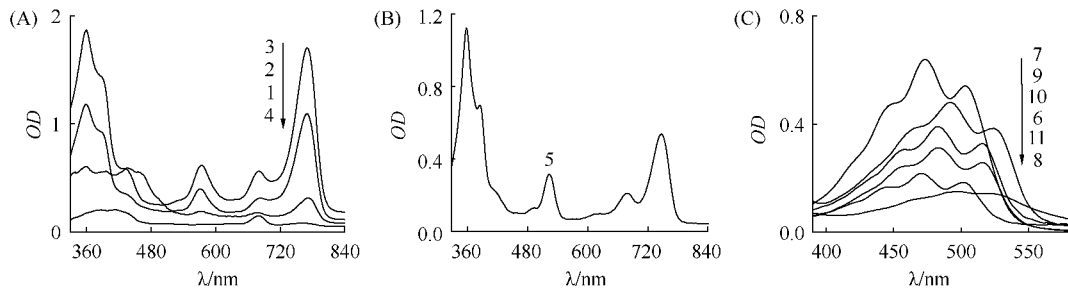


图5 TLC 各条带色素的吸收图谱

Fig. 5 Absorption spectra of pigment fingerprints from TLC

A: BChls. B: Bacteriopheophytin. C: Carotenoids

2.4 色素 HPLC 指纹图谱分析

经过洗脱剂和洗脱方式的优化,得到了 HPLC 全色素指纹图谱,显示 11 个洗脱峰,见图 6。依据二极管阵列检测器(DAD)检测的吸收光谱分析,这 11 个洗脱峰中含有 6 种 Car 和 5 种 BChl 组分,其中第 1-4 洗脱峰属于 BChl,第 10 洗脱峰为 Bphe,其余为 Car。HPLC 分析参数为:流动相 A 为乙腈和水(90:10, V/V),流动相 B 为甲醇,梯度洗脱程序为 0 min-5 min 90% B,5 min-20 min 95% B,20 min-60 min 100% B,流速 0.8 mL/min。为确立 HPLC 与 TLC 指纹图谱组分之间的对应关系,以 TLC 图谱的各色素带作为参考标准品,通过外标法分析表明,HPLC 指纹图谱与 TLC 指纹图谱中 11 个色素组分完全一致,并且呈一定的对应关系(表 2)。HPLC 与 TLC 分析色素的极性规律较为一致,基本上与理论相吻合,即 BChl 极性大,HPLC 分析保留时间短,TLC 分析的 R_f 小;Car 极性小,则保留时间长, R_f

大,只有个别组分的洗脱顺序与 TLC 图谱分析的极性顺序不一致。以洗脱峰的相对面积表示各色素的相对含量,如表 2 所示,HPLC 分析与 TLC 分析的 CQV97 菌株中积累的主要 Car 和 BChl 组分一致,但这两种方法分析的色素表现相对含量有较大差异。

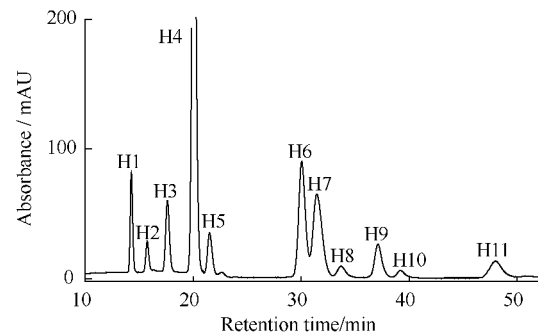


图6 菌株 CQV97 色素组分的 HPLC 分析

Fig. 6 HPLC profile of photosynthetic pigments from *R. palustris* CQV97. BChls (H1-H4) were detected at 770 nm. Cars (H5-H11) were detected at 475 nm

表2 TLC 与 HPLC 色素指纹的对应关系和色素组分分子量的测定

Table 2 Relationships of the pigment components analyzed by TLC and HPLC, and MW determination

No. (TLC)	No. (HPLC)	R_f (min)	Contents (%)	Molecular ion [MH] ⁺	Compounds
T1	H1	14.3	4.84	905.5	BChl a _{CC}
T2	H3	17.6	5.47	909.6	BChl a _{THCC}
T3	H4	20.1	42.84	911.6	BChl a _p
T4	H2	15.8	1.90	907.6	BChl a _{BHCC}
T5	H10	39.6	0.43	889.6	Bphe
T6	H6	30.1	15.60	552.4	3- β -dehydrorhodopin
T7	H7	31.5	15.12	554.4	rhodopin
T8	H5	21.5	4.31	584.5	rhodovibrin
T9	H8	33.7	1.83	596.5	spirilloxanthin
T10	H9	37.9	3.97	566.4	anhydrorhodovibrin
T11	H11	48.2	3.70	536.2	lycopene

2.5 TLC 和 HPLC 指纹图谱色素的定性分析

通过对 TLC 层析各条带色素的 LC-MS 分析,测定了各色素组分的相对分子量(表 2)。将得到的吸收光谱数据和相对分子量与螺菌黄质系 Car 和 BChl a 合成途径中各中间代谢物吸收光谱和分子量进行综合分析比较,对各色素组分进行了定性分析(表 2)。结果表明,TLC 色带 1 至 4 分子量分别为 905.5、909.6、911.6、907.6,彼此之间分子量依次相差 2,符合 BChl a 合成途径中最后 4 步加氢反应规律,依据吸收光谱特征和分子量综合分析,这 4 种色素为 BChl a 的衍生物,分别为 BChl a_{CG}、BChl a_{THCG}、BChl a_P 和 BChl a_{DHCG}^[3,8]。色带 5 分子量为 889.6,与 BPhe 分子量相符。色带 6 至 11 分子量分别为 552.4、554.4、584.5、596.5、566.4、536.2,分别为 3-*A* 双脱氢紫菌红素乙(3-*A*-didehydrorhodopin)、玫红品(rhodopin)、紫菌红醇(rhodovibrin)、螺菌黄质素(spirilloxanthin)、脱水玫红品(anhydrorhodovibrin)和番茄红素(lycopene)。

2.6 样品分析

理论样品的色素分析,TLC 呈现 11 条清晰的彩色色素条带,与对照样品的 R_f 相一致,见图 7,经过 6 次分析,理论样品与对照样品各色素条带的表观相对含量相吻合,其相对标准偏差(RSD)小于 5%;HPLC 呈现 11 个洗脱峰,与标准对照样品各色素洗脱峰的保留时间(R_t)相一致,经过 3 次分析,理论样品与对照样品各洗脱峰色素的表观相对含量相吻合,其 RSD 均小于 3%。结果表明 HPLC 和 TLC 两种方法进行色素分析的重复稳定性较好。

YL28 菌株色素的 TLC 分析,呈现 11 条彩色色素条带,其中条带 1、2、3、4、5、7 和 11 清晰,而条带 6、8、9 和 10 肉眼可辨,但颜色非常淡,与对照样品各色素条带 R_f 基本一致(见图 7),经 3 次分析,条带 1-11 色素的表观相对含量分别为 9.99、18.77、30.08、9.48、3.30、2.53、19.82、0.33、0.71、0.38 和 4.61,其 RSD 均小于 5%;与对照样品相比,待测样品中各色素组分的相对含量的增量(Δ)可按公式(1)计算,公式(1)为 $\Delta(\%) = [(P_s - P_c) / P_c] \times 100\%$,其中“ Δ ”代表增量百分率,“ P_s ”和“ P_c ”分别代表待测样品和对照样品各组分的相对含量,结果见图 8-A,YL28 样品 TLC 图谱中色素条带 1、2、3、7 和 11 的相对含量升高,其余则下降。YL28 菌株色素的 HPLC 分析,呈现 11 个色素洗脱峰,与对照样

品相比,YL28 菌株的各洗脱峰的 R_t 基本一致,经过 3 次分析,洗脱峰 1-11 色素的表观相对含量(%)分别为 0.56、0.32、2.04、58.61、0.39、2.75、29.70、0.13、0.29、0.23 和 4.97,RSD 均小于 3%。同样按公式(1)计算,YL28 的洗脱峰 4、7 和 11 的色素相对含量上调,其余则下调,见图 8-B。结果表明:TLC 和 HPLC 对色素指纹图谱分析的重复稳定性较好。与对照样品各色素组分的 R_f 、 R_t 以及相对含量相比,YL28 菌株含有与菌株 CQV97 相同的 11 种色素组分,主要积累 lycopene (T11)、rhodopin (T7) 和 2 种 BChl a (T2 和 T3) 4 种色素。TLC 和 HPLC 两种方法测定表观相对含量的结果不同,但与实际含量存在一定的内在关系,均适用于色素组分和含量变化规律的分析。

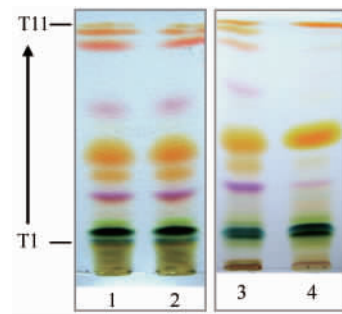


图 7 菌体色素的 TLC 分析

Fig. 7 Profile of pigments fingerprints on TLC. 1, 3: CK (strain CQV97). 2: strain CQV97. 4: strain YL28.

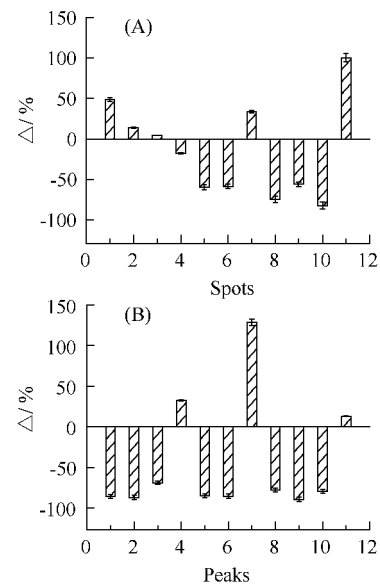


图 8 YL28 菌株与对照菌株色素组分相对含量的比较

Fig. 8 Comparison of pigment contents in strain YL28 and CK. A: TLC analysis; B: HPLC analysis.

3 讨论

HPLC 和 TLC 结合 MS 或 NMR 等方法已用于光合色素组分的分析,由于光合细菌色素标准品难以获得,HPLC 和 TLC 很难进行光合细菌色素组分的快速分析。本文以一株合成螺菌黄质系 Car 的光合细菌为参考菌株,建立其色素组分定性的标准指纹图谱,同时测定和比较待测样品与参考菌株的指纹图谱,实现了 BChl a 和 Car 色素组分的快速分析。

针对紫细菌而言,菌体中主要积累的 Car 和 BChl a 色素颜色鲜艳,特征吸收峰波长较长,检测信号受到的干扰很小,为 Car 和 BChl 色素组分的指纹分析研究提供了可行性和必要前提。目前研究表明,紫细菌螺菌黄质系 Car 合成途径中,有 6 种色素组分普遍存在,而 OH-spirilloxanthin、rhodopin-glucoside 和 rhodopinol-glucoside 等则因物种或菌株而异^[14],例如 Takaichi 报道螺菌黄质系 Car 合成途径有 7 种 Car^[15],Gall 等报道 *R. palustris* 2. 6. 1 中含有 5 种 Car^[14],Feng 等报道 *R. palustris* LH2 中含有 7 种 Car^[16],赵江艳等报道 *Marichromatium gracile* 含有 5 种 Car^[12]。现有研究认为,BChl a 合成途径中积累 4 种 BChl a 衍生物^[3,8]。本文研究的 *R. palustris* CQV97 主要积累 6 种普遍存在的 Car 和 4 种 BChl a 衍生物,且都能被识别检测,是色素分析的良好菌株,用于 Car 和 BChl 色素指纹图谱的建立和分析具有一定代表性。

光合细菌色素分析,首要问题是色素样品的快速提取和制备,以及提取的色素样品能够代表菌体中所含的色素。丙酮甲醇法是光合细菌色素常用提取方法^[5-6]。本文结合超声波处理,对丙酮甲醇法进行了改良,色素提取量明显提高,甲醇或丙酮单独或联合使用可选择性提取 BChl 和 Car。因此,针对提取的色素种类和极性的不同,应选择不同极性 or 极性变化的溶剂更有利于光合色素的提取。

本文的特色是系统比较研究了 TLC 和 HPLC 对光合色素的分析。结果表明,这两种方法对光合细菌 BChl a 和 Car 各组分均具有良好的分辨率,能够同时实现 BChl a 和 Car 的分析。在 CQV97 菌株 TLC 和 HPLC 两种色素指纹图谱中,均含 11 种色素组分,依据色素代谢途径、吸收光谱和 MS 数据的综

合分析,对 11 种色素组分进行了定性,得到了 TLC 和 HPLC 全色素指纹标准图谱。以该图谱为标准,采用相同的分析参数,通过理论样品(CQV97 菌株)和实际样品(YL28 菌株)的测试,TLC 分析 RSD 小于 5%,HPLC 分析 RSD 小于 3%,HPLC 与 TLC 对色素组分分析的结果一致,但相对含量有所差异。究其原因,这两种方法估算的是各色素组分的表观相对含量,是以检测信号的相对强度代表被检测物的相对含量,HPLC 以光谱为检测信号,TLC 灰度分析以灰度作为检测信号,而并非样品的真实相对含量。从理论上讲,检测信号与检测物浓度呈正比关系,由于检测物不同,检测信号与含量之间的关系系数不同,因此导致了 HPLC 和 TLC 分析各色素组分相对含量不同。但对于一个样品而言,色素的组分和含量相对固定,一种方法对各组分检测信号的相对强度也相对稳定,与各组分真实含量之间有特定的固有关系,可以通过标准品校对成各组分的真实含量。但由于色素不稳定,一些色素标准品尚未商品化,目前很难对多色素组分实施定量分析。但通过表观相对含量,能够方便地分析样品中各色素组分的变化规律和关系。因而,本文建立的 HPLC 和 TLC 这两种方法单一或二者结合都能实现光合细菌色素的组分和表观相对含量分析,但各有其特色。HPLC 自动化程度高,分辨率更高,但仪器相对昂贵,成本较高;TLC 不需要昂贵的仪器,操作简单、快速,结果直观,成本低廉,同时还能容易地获得一定量的纯化样品。

综上所述,结合超声波处理,依次用甲醇、丙酮甲醇(7:2, v/v)和丙酮各提取 1 次,可快速高效提取光合色素。依次用甲醇提取 2 次,丙酮提取 1-2 次,可选择性地提取 BChl 或 Car。以提取的色素为样品,建立了含螺菌黄质系菌株的 Car 和 BChl a 的 TLC 和 HPLC 指纹图谱。将 TLC 和 HPLC 指纹图谱分析方法用于理论样品和实际样品的测定,重复稳定性较好,实际样品 YL28 菌株中含有与 CQV97 菌株相同的色素组分,但主要积累 rhodopin、lycopene 和 2 种 BChl a 衍生物。因此,TLC 和/或 HPLC 色素指纹图谱分析方法可用于含有螺菌黄质系 Car 合成途径的紫细菌中积累的主要色素组分和含量变化规律的分析,两种方法简单、快捷、方便,但各有特点,这为色素代谢与调控规律的研究、菌种或菌株的鉴别、产品的检测与评价等提供快速分析方法,也为建

立球形烯和奥氏酮 Car 合成途径的紫细菌的色素指纹图谱和标准含量指纹图谱奠定基础。

参考文献

- [1] Scheuring S , Sturgis JN. Chromatic adaptation of photosynthetic membranes. *Science* ,2005 ,309 (5733) : 484-487.
- [2] Woronowicz K ,Niederman RA. Proteomic analysis of the developing intracytoplasmic membrane in *Rhodobacter sphaeroides* during adaptation to low light intensity. *Recent Advances in Phototrophic Prokaryotes* ,2010 ,675 (3) : 161-178.
- [3] Willows RD , Kriegel AM. Biosynthesis of bacteriochlorophylls in purple bacteria. *Advances in Photosynthesis and Respiration* ,2008 ,28 (2) : 57-79.
- [4] 关大伟 ,李俊 ,沈德龙 ,曹凤明 ,李力 ,姜昕. 光合细菌 PCR 检测技术的建立与应用. *应用与环境生物学报 (Chinese Journal of Applied and Environmental Biology)* ,2008 ,14 (5) : 699-704.
- [5] Qian P , Saiki K , Mizoguchi T , Hara K , Sashima T , Fujii R , Koyama Y. Time -dependent changes in the carotenoid composition and preferential binding of spirilloxanthin to the reaction center and anhydrorhodovibrin to the LH1 antenna complex in *Rhodobium marinum*. *Photochemistry and Photobiology* , 2001 ,74 (3) : 444-452.
- [6] Kakitani Y , Fujii R , Hayakawa Y , Kurahashi M , Koyama Y , Harada J , Shimada K. Selective binding of carotenoids with a shorter conjugated chain to the LH2 antenna complex and those with a longer conjugated chain to the reaction center from *Rubrivivax gelatinosus*. *Biochemistry* ,2007 ,46 (24) : 7302-7313.
- [7] Mizoguchi T , Isaji M , Harada J , Tamiaki H. Identification of 3 , 4-didehydrorhodopin as major carotenoid in *Rhodospseudomonas* species. *Photochemical and Photobiological Sciences* ,2008 ,7 (4) : 492-497.
- [8] Mizoguchi T , Harada J , Tamiaki H. Structural determination of dihydro-and tetrahydrogeranylgeranyl groups at the 17-propionate of bacteriochlorophylls-a. *Federation of European Biochemical Societies Letters* , 2006 ,580 (28-29) : 6644-6648.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 北京: 中国医药科技出版社,2010.
- [10] Zarzycki PK , Slaczka MM , Zarzycka MB , Wlodarczyk E , Baran MJ. Application of micro-thin-layer chromatography as a simple fractionation tool for fast screening of raw extracts derived from complex biological; pharmaceutical and environmental samples. *Analytica Chimica Acta* ,2011 ,688 (2) : 168-174.
- [11] 岳慧英 ,黄潇 ,赵春贵 ,杨素萍 ,曲音波. 不产氧光合细菌光合色素的光氧调控机制. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)* ,2009 ,49 (3) : 331-336.
- [12] 赵江艳 ,傅英楠 ,赵春贵 ,杨素萍 ,曲音波 ,焦念志. 一株高含玫红品的红树林海洋紫色硫细菌分离鉴定及特性. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)* , 2011 ,51 (10) : 1318-1325.
- [13] Ormerod JG , Ormerod KS , Gest H. Light-dependent utilization of organic compounds and photoproduction of molecular hydrogen by photosynthetic bacteria; relationships with nitrogen metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics* ,1961 ,94 (3) : 449-463.
- [14] Gall A , Henry S , Takaichi S , Robert B , Cogdell RJ. Preferential incorporation of coloured-carotenoids occurs in the LH2 complexes from non-sulphur purple bacteria under carotenoid-limiting conditions. *Photosynthesis Research* ,2005 ,86 (1) : 25-35.
- [15] Takaichi S. Distribution and biosynthesis of carotenoids. *Advances in Photosynthesis and Respiration* , 2008 , 28 (2) : 97-117.
- [16] Feng J , Wang Q , Wu YS , Ai XC , Zhang XJ , Huang YG , Zhang XK , Zhang JP. Triplet excitation transfer between carotenoids in the LH2 complex from photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Photosynthesis Research* ,2004 ,82 (1) : 83-94.

Fingerprinting analysis of photopigments in purple bacteria

Minquan Zhuo¹, Chungui Zhao^{1*}, Qianru Cheng¹, Suping Yang^{1*}, Yinbo Qu²

¹Department of Bioengineering and Biotechnology, Huaqiao University, Xiamen 361021, China

²State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China

Abstract: [Objective] Photopigments, including carotenoid and bacteriochlorophyll a, are the most important functional units of photosynthesis in purple bacteria. We developed rapid qualitative and quantitative methods to determine photopigments. [Methods] Using *Rhodospirillum rubrum* CQV97 as a reference, we used image gray intensity analysis, absorption spectrophotometry, thin layer chromatography (TLC), HPLC and mass spectrometry (MS) for photopigment analysis. [Results] The total amount of photopigments increased by 13.5% by using modified acetone-methanol extraction. We developed two types of photopigment fingerprintings by TLC and HPLC, estimated the apparent relative content of each photopigment of fingerprintings, and determined the corresponding relationships between R_f value of each photopigment on TLC fingerprinting and retention time of each photopigment elution in HPLC fingerprinting. Based on the data from the absorption spectra, MS and related photopigment biosynthetic pathway analysis, we identified 11 photopigments in CQV97 strain. Using this strain as a standard, we analyzed photopigments of the tested samples by TLC or HPLC. It was shown that (1) the relative standard deviation (RSD) of the two methods was less than 5%; (2) the compositions and contents of the theory sample were consistent with that of the standard sample; (3) the photopigment compositions of the real sample was the same as the standard sample, but the photopigment content was different. [Conclusion] Both of TLC and HPLC analyses for photopigment determination have good stability and repeatability. The fingerprintings analyses are suitable for rapid determination of photopigments of purple bacteria and have important application in control of regulation mechanism for photopigment synthesis.

Keywords: purple bacteria, carotenoids, bacteriochlorophylls, *Rhodospirillum rubrum*

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31070054), by the Natural Science Foundation of Fujian Province(2010J01209) and by the Foundation of Key Laboratory of Urban Environment and Health, Institute of Urban Environment of Chinese Academy of Sciences (KLUEH201005)

* Corresponding authors. Tel: +86-592-6166178; E-mail: chungui@hqu.edu.cn, yangsuping@hqu.edu.cn

Received: 28 November 2011 / Revised: 23 February 2012