DOI:10.12441/spyswjs.20230210002 [文章编号] 1673-1689(2024)11-0143-09

β-胡萝卜素降解菌的分离鉴定及其降解机制研究

李诚昊[1,2,3] 兰佳鑫[1,2,3] 姬淑洁[1,2,3] 李晓敏[1,2,3*]

(1. 江南大学生物工程学院,江苏 无锡 214122; 2. 江南大学粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心,江苏 无锡 214122; 3. 江南大学江苏省生物活性制品加工工程技术研究中心,江苏 无锡 214122)

摘要: 类胡萝卜素是存在于植物中的一种天然色素,其降解产物如紫罗兰酮、β-环柠檬醛等具有阈值低、香气品质好等特征,是食品和烟草产品的特征香气。作者采用选择培养基筛选可降解β-胡萝卜素的菌株,并利用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用(headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, HP-SPME-GC-MS)技术检测易挥发组分,液相色谱-质谱联用(high performance liquid chromatography-mass spectrometry,HPLC-MS)分析其活性组分的主要成分,结合分子对接和水解氨基酸谱研究菌株降解β-胡萝卜素的机制,并利用分光光度计法分析活性组分的基本性质。结果表明,从黄酒酒曲中分离出一株高效β-胡萝卜素降解菌L-4,鉴定为蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)。其最佳降解条件为接种体积分数3%、培养温度37 ℃、pH 7.0,主要降解产物是β-胡萝卜素C_9—C_{10}双键裂解形成的β-紫罗兰酮和C_7—C_8双键裂解形成的β-环柠檬醛。活性组分FS1主要成分为RF1(ALTFR)、RF2(VYHYVTYQPPG)、RF3(WYMCC)、RF4(KKPVLLHA)共4条多肽,其中的疏水性氨基酸在降解β-胡萝卜素过程中起到重要作用。蜡样芽孢杆菌L-4能够高效降解β-胡萝卜素,其分泌的疏水性肽类破坏了β-胡萝卜素乳化液的稳态,使β-胡萝卜素在FS1组分的氨基酸残基和金属离子的作用下发生双键断裂和褪色。该研究挖掘的类胡萝卜素降解微生物资源对食品和烟草加工业具有重要意义。

关键词: β-胡萝卜素;香气成分;微生物降解;蜡样芽孢杆菌

Isolation and Identification of β-Carotene-Degrading Bacterium and Its Degradation Mechanism

LI Chenghao[1,2,3] *LAN Jiaxin*[1,2,3] *JI Shujie*[1,2,3] *LI Xiaomin*[1,2,3*]

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. National Engineering Research Center of Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Jiangsu Provincial Research Center for Bioactive Product Processing Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Carotenoids are natural pigments found in plants, and their degradation products, such as ionone and β-cyclocitral, exhibit characteristics such as low threshold values and high-quality aroma, which contribute to the characteristic flavors of food and tobacco products. In this study, β-carotene-degrading strains were screened using selective media, and volatile components were detected using headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry (HP-SPME-GC-MS). The primary components of the

基金项目: 云南省烟草化学重点实验室开放课题项目(2019539200340162)。

通信作者: 李晓敏(1984—),女,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事食品微生物研究。E-mail:xiaomin@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2023-02-10 **修回日期:** 2023-04-01

activity ingredients were analyzed by high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS). The degradation mechanism of *β*-carotene by the strain was investigated using molecular docking and hydrolyzed amino acid spectroscopy. The basic properties of the active components were analyzed using a spectrophotometer. A high-efficiency *β*-carotene-degrading bacterium, L-4, was isolated from rice wine koji and identified as *Bacillus cereus*. The optimal degradation conditions were a 3% inoculum volume fraction, a cultivation temperature of 37 ℃, and a pH of 7.0. The primary degradation products included *β*-ionone, formed by cleavage at the C_9—C_{10} double bond of *β*-carotene, and *β*-cyclocitral, produced by cleavage at the C_7—C_8 double bond of *β*-carotene. The active component FS1 is predominantly composed of four peptides: RF1 (ALTFR), RF2 (VYHYVTYQPPG), RF3 (WYMCC), and RF4 (KKPVLLHA). Hydrophobic amino acids in these peptides play a crucial role in the degradation of *β*-carotene. *Bacillus cereus* L-4 effectively degrades *β*-carotene by secreting hydrophobic peptides that destabilize the *β*-carotene emulsion, promoting double bond cleavage and decolorization through the action of amino acid residues in FS1 and metal ions. The carotenoid-degrading microbial resources identified in this study have significant implications for the food and tobacco industries.

Keywords: *β*-carotene; aroma components; microbial degradation; *Bacillus cereus*

类胡萝卜素是一种重要的天然色素的总称，通常由8个类异戊二烯单元组成，属于四萜类化合物。目前已发现700多种不同的结构，主要分为胡萝卜素和叶黄素两大类，这些色素广泛存在于动物、植物和微生物中[1]。

类胡萝卜素的性质不稳定，在高温下易裂解，并且在化学氧化、光氧化、生物氧化及酶催化条件下易被氧化降解[2]。其中最具代表性的一种类胡萝卜素是*β*-胡萝卜素，它是一种橘黄色的脂溶性化合物，大量存在于植物中。在食品加工中*β*-胡萝卜素的降解对产品的品质有重要影响。如面粉制品加工中，*β*-胡萝卜素被氧化降解为氧化异佛尔酮、二氢猕猴桃内酯等，这些物质构成了成品特有的香气[3]。同时，在烟草行业中，*β*-胡萝卜素作为含量最高的类胡萝卜素，在烟叶成熟、调制、醇化过程中均可发生降解[4]，其降解产物如突厥烯酮、*β*-大马酮、*β*-紫罗兰酮、巨豆三烯酮、二氢猕猴桃内酯等是烤烟风味中至关重要的成分[5]。

类胡萝卜素的生物氧化降解因条件温和、效率高且专一性强受到广泛关注[6]。研究人员从富含类胡萝卜素的水果和落花土壤等基质中分离出能够降解类胡萝卜素的丝状真菌[7]、酵母[8]、分散泛菌[9]和巴氏葡萄球菌[10]，并从中提取了可能用于生产维生素A的类胡萝卜素裂解酶[11]。作者从福建药白曲中分离出一株可高效降解*β*-胡萝卜素的蜡样芽孢杆菌，通过对该菌株发酵液中的相关功能组分进行结构鉴定和性质分析，初步探索其降解*β*-胡萝卜素的机理，为类胡萝卜素的生物降解发掘了优良的微生物资源，并为类胡萝卜素的生物降解研究提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

红花大金元复烤烟叶：云南中烟有限责任公司；福建药白曲：福建南平红曲黄酒酿酒厂。

β-胡萝卜素（纯度95%）：上海麦克林生物科技有限公司；Taq DNA Polymerase P222、DL5000 DNA Marker MD101：南京诺维赞有限公司；通用16S引物：金唯智生物技术有限公司；乙腈、甲酸（均为色谱纯）：麦克林生物科技有限公司；KCl、K_2HPO_4、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$、$FeSO_4 \cdot 7H_2O$、$NaNO_3$、蔗糖、酵母浸粉（均为分析纯）：国药集团化学试剂有限公司。

β-胡萝卜素乳化液：将30 mg的*β*-胡萝卜素于50 mL二氯甲烷中充分溶解，加入3 g的Tween-80，使用氮吹仪吹干二氯甲烷。加入50 mL无菌蒸馏水溶解*β*-胡萝卜素，得到橙红色的*β*-胡萝卜素乳化液母液。使用0.22 μm滤膜过滤除菌，于4 ℃冰箱储存。全程操作需避光，并在通风橱中进行。

富集培养基：K_2HPO_4 0.50 g、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25 g、$NaNO_3$ 3.00 g、$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g、KCl 1.00 g、蔗糖30.00 g、酵母浸粉3.00 g、无菌水定容至1 L，高温高压灭菌。选择培养基：在富集培养基中添加30 mg/L的*β*-胡萝卜素乳化液。如需制备固体平板和固体斜面，则需要加入质量分数2%的琼脂粉。

1.2 仪器与设备

HP-SPME-GC-MS：MALDI SYNAPT MS型，美国沃特世公司；电子天平：JA3003B型，上海精天电子仪器有限公司；磁力搅拌器：CJ-78-1型，上海将任实验设备有限公司；数显恒温搅拌水浴锅：HH-4型，上海新诺仪器设备有限公司；pH计：PE20型，上海梅特勒托利多仪器有限公司；三重四级杆气质联用仪：TSQ型，美国安捷伦公司。

1.3 研究方法

1.3.1 β-胡萝卜素降解菌的富集和分离

1）富集：称取适量烟草粉碎物于无菌三角瓶中，加入无菌水浸提并灭菌处理，再加入质量浓度为0.5 g/L的酒曲，于37 ℃、170 r/min培养12 h。之后按体积分数1%转接到富集培养基中，于37 ℃、170 r/min条件下培养48 h。

2）初筛：将富集的菌悬液按梯度进行逐级稀释，选择1×10^{-3}、1×10^{-4}、1×10^{-5} CFU/mL的菌悬液分别涂布于选择培养基固体平板上；同时设立对照组，即使用相同方法涂布于富集培养基固体平板上。于37 ℃静置培养24~48 h，挑选形态良好且周围颜色变淡的单菌落，反复划线至菌落形态单一。最后挑取单菌落至选择培养基固体斜面，培养后于4 ℃保存。

3）复筛：将初筛得到的单菌落接种到富集培养基中进行活化，然后按体积分数5%转接到50 mL的液体选择培养基中，于37 ℃、170 r/min培养12 h，观察并记录发酵前后的颜色变化。参考Scherzinger等[12]的方法，使用分光光度计测定发酵前后样品的OD_{460}值，利用标准曲线计算β-胡萝卜素质量浓度及其降解率，筛选出的β-胡萝卜素降解菌株保存在甘油管中备用。

1.3.2 菌株鉴定

采用平板涂布法进行接种，37 ℃恒温培养2 d后观察菌落的平板形态，使用革兰氏染色法观察菌株的形态。参考《常见细菌系统鉴定手册》对所筛选的菌株进行各项生理生化试验。从筛选到的最优降解菌中提取基因组，并进行16S基因扩增与测序，随后利用MEGA 11软件构建菌株的系统发育树。

1.3.3 L-4菌株降解β-胡萝卜素单因素试验

设置不同接种体积分数（1%、3%、5%、8%、10%）、pH（5.0、6.0、7.0、8.0、9.0）、温度（28、30、32、35、37 ℃）和转速（130、150、170、200、220 r/min），研究发酵条件对L-4菌株降解β-胡萝卜素的影响。对照组为不接种任何菌株的空白培养基，培养12 h后，取样测定β-胡萝卜素的降解率。

1.3.4 β-胡萝卜素降解产物鉴定

采用HP-SPME-GC-MS鉴定发酵液中β-胡萝卜素的降解产物，其中HP-SPME参考朱佳琪等[13]的方法，GC-MS参考Chen等[14]的方法。顶空瓶中加入5 mL样品和1.0 g NaCl，在45 ℃下预热5 min，萃取60 min，萃取完成后解吸附5 min。以终质量浓度50 μg/L的二辛醇为内标物，检测反应液中的易挥发成分，并通过峰面积归一化法计算各挥发性成分在样品中的相对质量浓度。

1.3.5 L-4菌株降解β-胡萝卜素活性组分的分离和性质分析

将L-4菌株活化后分别接种于液体选择培养基和LB培养基中，培养至对数生长期，13 000 r/min离心20 min，收集上清液。分别利用截留相对分子质量为10 000和3 000的超滤管进行分离，测定滤出液和截留液组分中β-胡萝卜素的降解率。将利用选择培养基发酵分离得到的降解率最高的组分（即相对分子质量小于3 000的组分）作为具有β-胡萝卜素降解能力的活性组分FS1。使用Tricine SDS-PAGE检测活性组分FS1的相对分子质量。LB培养基发酵分离得到的组分为LS1。

1）最适反应温度：取适量活性组分FS1加入β-胡萝卜素乳化液，于25~65 ℃反应20 min，测定β-胡萝卜素降解率，最高降解率定义为100%。

2）最适pH：在pH 3.0~9.0内测定活性组分FS1的β-胡萝卜素降解率，β-胡萝卜素最高降解率定义为100%。所用缓冲液为醋酸钠缓冲液（pH 3.0~6.0）、磷酸钠缓冲液（pH 6.0~8.0）和Tricine缓冲液（pH 8.0~9.0）。

3）金属离子耐受性：在活性组分FS1中加入5 mmol/L的不同金属离子，不加金属离子活性组分FS1的β-胡萝卜素降解率定义为100%。

4）蛋白酶耐受性：在活性组分FS1中加入不同蛋白酶（相同酶活力）预反应1 h，检测活性组分对β-胡萝卜素的降解率。未用蛋白酶处理的活性组分FS1的β-胡萝卜素降解率定义为100%。测定降解率时均以未加入活性组分FS1的β-胡萝卜素溶液作为空白对照。

5）水解氨基酸质量分数测定：参考GB 5009.124—2016的方法分别测定FS1和LS1组分

的水解氨基酸质量分数。

1.3.6 活性组分FS1的鉴定

参考Lu等[15]的方法，使用色谱仪进行UPLS-ESI-Q-TOF-MS/MS分析。根据欧阳小健[16]的方法，通过Peaks软件的DB search在uniprot的UP000001417数据库中检索质谱图，−10lg *P*>15的结果被认为是可信的。同时，通过De novo测序进一步筛选可能的多肽序列。设置参数为：一级质谱误差为0.000 01，二级质谱误差为0.05，De novo Score>50的结果被认为是可信的。通过ProtParam数据（https://web.expasy.org/protparam/）计算多肽的亲水性总平均值（grand average of hydropathicity，GRAVY）。

1）配体及靶标多肽结构准备：从Pubchem数据库（https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/）下载*β*-胡萝卜素的结构，利用Chem3D获取其最低能量构象。利用殷赋云计算平台预测多肽结构，选取最低能量状态的多肽作为靶标多肽，并对靶标多肽和配体进行加氢去电荷操作。

2）分子对接：利用Vina工具进行分子对接试验，研究多肽与*β*-胡萝卜素的作用方式，利用Ligplus软件对相互作用力进行可视化。

1.3.7 统计分析

使用Rsudio软件进行统计学分析并进行最小显著差异法（least-significant difference，LSD）检验，*P*<0.05表示差异显著。

2 结果与讨论

2.1 *β*-胡萝卜素降解菌的分离鉴定

从福建药白曲中分离出6株可降解*β*-胡萝卜素的菌株，见表1。其中L-4菌株的*β*-胡萝卜素降解率最高（95.23%），高于酿酒酵母Z-6（89.23%）、鞘氨醇单胞菌L-1（77.33%）等具有高效降解能力的菌株。L-4菌株的菌落形态见图1。可以看出，L-4菌株在固体平板上菌落透明，形状较规则，其12 h的发酵上清液与空白培养基相比，明显更澄清。革兰氏染色结果显示，该菌株为杆状革兰氏阳性菌。

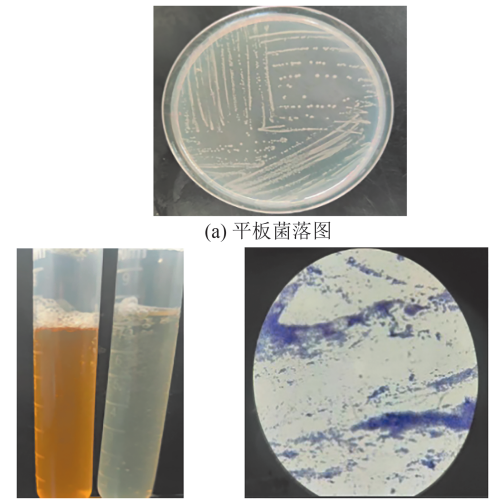
表1 各菌株*β*-胡萝卜素降解率

Table 1 *β*-carotene degradation rate of the isolated strains

菌株编号	菌株	中文名称	*β*-胡萝卜素降解率/%
L-1	*Sphingomonas*	鞘氨醇单胞菌	77.33±1.91^{c}
L-2	*Acetobacterium balch*	醋酸杆菌	32.70±1.45^{d}
L-3	*Lactobacillus plantarum*	植物乳杆菌	34.63±1.75^{d}
L-4	*Bacillus cereus*	蜡样芽孢杆菌	95.23±0.90^{a}
L-5	*Escherichia coli*	大肠杆菌	16.90±1.57^{e}
Z-6	*Saccharomyces cerevisiae*	酿酒酵母	89.23±2.05^{b}

注：不同字母表示样品间差异显著（*P*<0.05）。

L-4菌株的16S rDNA序列与*B. cereus* RTR的相似度为98%。同时，L-4菌株在系统发育树中的位置处于蜡样芽孢杆菌分支内。结合形态学观察结果（见图1）、生理生化性质（见表2）及系统发育树结果（见图2），将该菌株鉴定为*Bacillus cereus* L-4。



(a) 平板菌落图　(b) 发酵12 h颜色变化图　(c) L-4菌落革兰氏染色图

图1 L-4菌株的菌落形态

Fig. 1 Colony morphology of L-4 strain

表2 L-4菌株的生理生化鉴定表

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of L-4 strain

试验项目	结果	试验项目	结果
革兰氏染色	+	葡萄糖	+
细胞形状	杆状	木糖	−
细胞直径>1 μm	+	*L*-阿拉伯糖	−
形成芽孢	+	甘露醇	−
芽孢膨大	−	发酵葡萄糖产气	−
芽孢圆形	−	利用柠檬酸盐	+
伴孢晶体	−	50 °C生长	−
接触酶	+	pH 5.7生长	+
氧化酶	+	质量分数7%NaCl生长情况	+
厌氧生长	+	淀粉水解	+
VP试验	+	分解酪素	+
VP pH<6	+	硝酸盐还原	+
VP pH>7	−	甲基红试验	+

注：“+”表示结果呈阳性；“−”表示结果呈阴性。

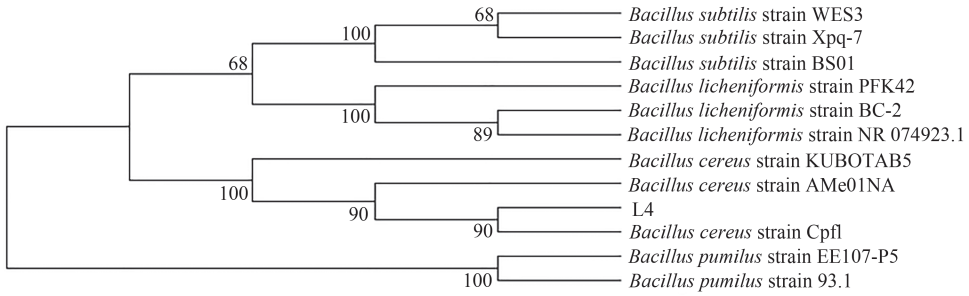


图 2　菌株 L-4 的 16S rDNA 系统发育树

Fig. 2　Phylogenetic tree of the L-4 strain based on 16S rDNA

2.2　L-4 菌株降解 β-胡萝卜素条件优化

单因素试验结果见图 3，结果表明，温度和 pH 对 β-胡萝卜素的降解率影响较大。确定的最佳培养条件为接种体积分数 3%、培养基 pH 7.0、培养温度 37 ℃、转速 170 r/min。在此条件下发酵 12 h 后，β-胡萝卜素的降解率达到 95%。

2.3　L-4 菌株降解 β-胡萝卜素的产物

L-4 菌株在最适降解条件下培养 12 h 后，发酵液的 pH 从 7.0 降至 5.5，β-胡萝卜素的降解率达到 95%。与对照组相比，L-4 菌株发酵液中的 β-紫罗兰酮、β-环柠檬醛、二氢猕猴桃内酯这 3 种 β-胡萝卜素降解产物的质量浓度显著增加，分别是 β-胡萝卜素在 C_9—C_{10}、C_7—C_8、C_{12}—C_{13} 处发生双键断裂形成的[17]。其中，β-紫罗兰酮是一种阈值较低的香料，在烟草工业中是重要的中性香气补充成分；β-环柠檬醛是一种具有烟草香的香料；二氢猕猴桃内酯是一种具有木香和茶香的香料。因此，推测 L-4 菌株对 β-胡萝卜素的降解作用是基于其分泌的能够促进 β-胡萝卜素在不同双键位点断裂的活性物质。

2.4　L-4 菌株活性组分的分离和性质分析

2.4.1　活性组分的分离

L-4 菌株的发酵上清液经超滤分离得到 FS1（相对分子质量<3 000）和 FS2（相对分子质量为

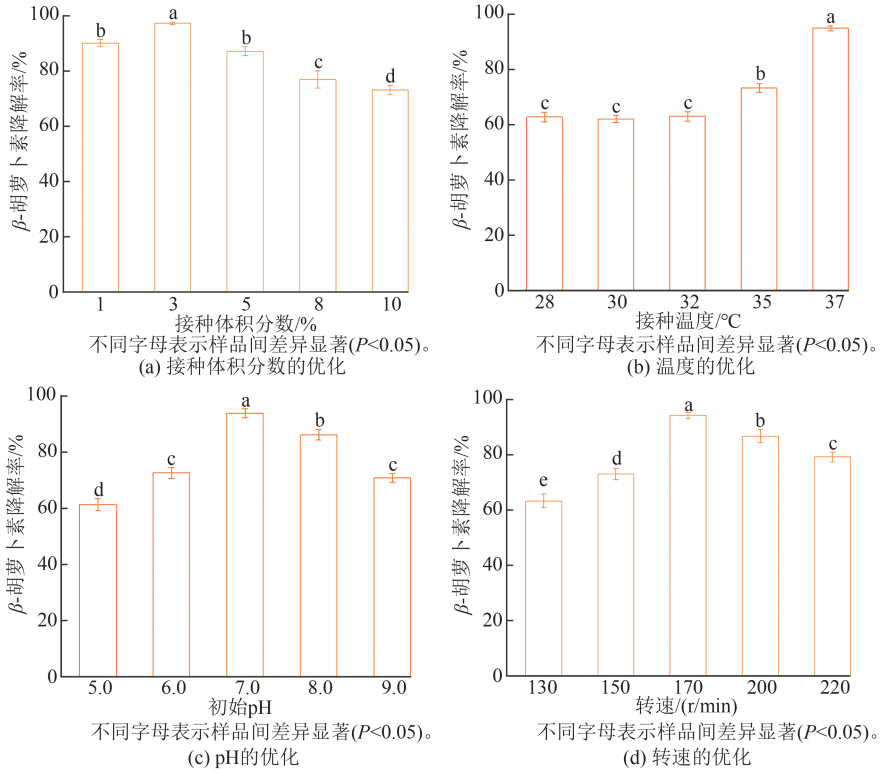


图 3　L-4 菌株降解条件优化

Fig. 3　Optimization of the degradation conditions for L-4 strain

3 000~10 000）2 个组分，FS1 对 β-胡萝卜素的降解率（（95.77±5.97）%）远高于 FS2 对 β-胡萝卜素的降解率（（6.67±6.57）%）。Tricine SDS-PAGE 结果表明，FS1 组分主要由相对分子质量小于 3 000 的肽或小分子蛋白质组成，见图 4。

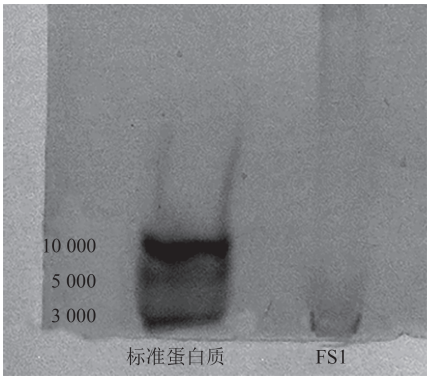


图 4　FS1 的 Tricine SDS-PAGE 结果

Fig. 4　Tricine SDS-PAGE results of FS1

2.4.2　反应温度对活性组分 FS1 的影响

FS1 在 30~60 ℃表现出较高的 β-胡萝卜素相对降解率，40 ℃时降解率最高。当温度高于 60 ℃时，降解率显著降低，但仍高于 70%，说明该组分具有较强的热稳定性，见图 5（a）。在试验过程中发现，对该活性组分进行长时间高温处理并未出现降解率大幅度下降的情况，推测该活性组分不是普遍认为的 β-胡萝卜素双加氧酶。

2.4.3　反应 pH 对活性组分 FS1 的影响

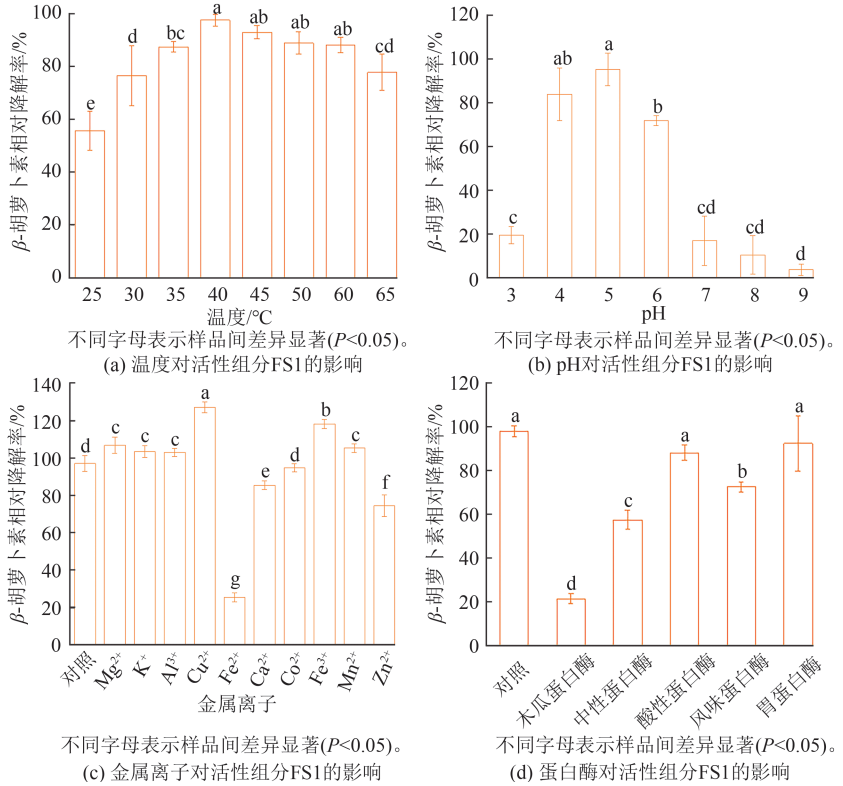
FS1 在 pH 5~6 时具有最高的 β-胡萝卜素相对降解率。在弱酸性环境下能保持较高降解率，在中性和偏碱性条件下，降解率大幅下降，见图 5（b）。

2.4.4　金属离子对活性组分 FS1 的影响

Cu^{2+} 和 Fe^{3+} 对 FS1 活性有明显促进作用，其 β-胡萝卜素相对降解率分别提高了 27% 和 18%。Fe^{2+} 和 Zn^{2+} 则具有较强的抑制作用，降解率分别降低了 70% 和 30%，见图 5（c）。

2.4.5　蛋白酶对活性组分 FS1 的影响

在中性蛋白酶和木瓜蛋白酶作用下，FS1 组分的 β-胡萝卜素相对降解率显著降低，推测该活性组分为含肽键的小分子物质，见图 5（d）。



不同字母表示样品间差异显著（P<0.05）。

（a）温度对活性组分FS1的影响

不同字母表示样品间差异显著（P<0.05）。

（b）pH对活性组分FS1的影响

不同字母表示样品间差异显著（P<0.05）。

（c）金属离子对活性组分FS1的影响

不同字母表示样品间差异显著（P<0.05）。

（d）蛋白酶对活性组分FS1的影响

图 5　温度、pH、金属离子和蛋白酶对活性组分 FS1 的影响

Fig. 5　Effects of temperature、pH、metal ions and protease on FS1 component

2.4.6　活性组分 FS1 降解 β-胡萝卜素的产物

FS1 作用于 β-胡萝卜素乳化液后的易挥发性产物见表 3，主要为 β-紫罗兰酮、β-环柠檬醛及二氢猕猴桃内酯，与 L-4 菌株降解产物一致，证明了

该活性组分的有效性。此外，挥发性产物中还有反式-2-壬烯醛等醛类物质，推测这些物质部分来自β-胡萝卜素裂解的副产物，部分来自β-胡萝卜素乳化液与脂类物质的反应。

表3　β-胡萝卜素降解产物

Table 3　β-carotene degradation products

样品	降解产物的质量浓度/(μg/L)												
	β-紫罗兰酮	β-环柠檬醛	2,4-二甲基环己醇	2,2,6-三甲基环庚烷	二氢猕猴桃内酯	异佛尔酮	戊醛	反式-2-壬烯醛	反-2-辛烯醛	2,6-二甲基十一烷	辛醛	反-2-壬烯-1-醇	β-环高柠檬醛
空白培养基	4.07	51.46	7.04	6.66	6.03	3.49	1.02	—	23.76	1.21	4.14	31.01	4.59
L-4发酵液	116.36	116.79	24.67	9.60	23.76	16.13	1.78	—	14.35	3.33	16.40	48.53	7.30
FS1	374.61	279.53	109.82	21.14	101.64	44.46	—	586.80	101.84	20.45	94.95	—	—

2.4.7　活性组分的水解氨基酸质量分数分析

芽孢杆菌可分泌脂肽类活性物质（相对分子质量为1 000～1 500），这些物质对蛋白酶敏感，但对热不敏感。有研究表明，当作为生物活性剂使用时，脂肽类活性物质会因破乳作用使β-胡萝卜素发生降解[18]，这与本研究中FS1活性组分的性质相似。然而，脂肽类活性物质大多具备亲水性，而本研究中的β-胡萝卜素在FS1组分中无法分散，呈颗粒状。另外，在LB培养基发酵的L-4上清液中分离的LS1组分无法降解β-胡萝卜素，且表现出相反的液体表面张力，使得β-胡萝卜素保持分散状态。水解氨基酸结果显示FS1组分中疏水性氨基酸质量分数超过50 %，见表4。推测FS1组分的降解活性来源于体系里的疏水性肽类而非亲水性脂肽类物质。

表4　不同组分的水解氨基酸质量分数

Table 4　Hydrolyzed amino acid mass fraction of different components

氨基酸分类	序号	氨基酸	水解氨基酸质量分数/%	
			LS1	FS1
疏水性氨基酸	1	亮氨酸	4.12	3.97
	2	异亮氨酸	1.64	3.05
	3	缬氨酸	3.46	3.68
	4	丙氨酸	8.59	5.83
	5	甲硫氨酸	0.76	2.27
	6	苯丙氨酸	3.59	2.84
	7	脯氨酸	10.03	6.09
	8	色氨酸	—	25.41
亲水性氨基酸	9	丝氨酸	3.87	2.70
	10	苏氨酸	2.40	4.56
	11	酪氨酸	3.75	1.08
	12	半胱氨酸	0.44	2.18
	13	甘氨酸	20.13	5.12
	14	组氨酸	2.27	3.38
	15	精氨酸	5.46	4.98
	16	赖氨酸	4.02	4.95
	17	天冬氨酸	8.92	5.77
	18	谷氨酸	16.54	12.14

2.5　活性组分FS1的鉴定结果

FS1组分的质谱测序总离子色谱见图6。通过质谱数据库检索，结合De novo测序分析，共鉴定出54条多肽序列，去除重复序列后，得到22条多肽序列。

与β-胡萝卜素进行分子对接时，参考蛋白质与小分子对接的标准（相似度<−16 743.41 J/mol），筛选出4条能够与β-胡萝卜素结合的肽段：RF1（ALTFR）、RF2（VYHYVTYQPPG）、RF3（WYMCC）、RF4（KKPVLLHA），其中RF2、RF3、RF4均为NCBI NR数据库中芽孢杆菌属的对应序列，见表5。分子对接的3D对接结果见图7。β-胡萝卜素并未远离这些多肽，结合相似度结果认为对接成功。利用Ligplus进一步对相互作用力进行可视化分析（见图8），发现多肽与β-胡萝卜素之间未形成氢键和共价键。参与β-胡萝卜素和多肽间相互作用的氨基酸多为疏水性氨基酸，这与

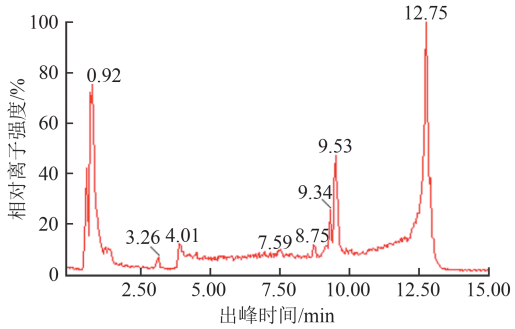


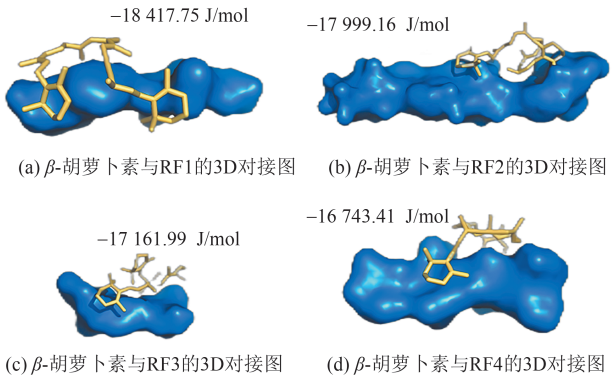
图6　FS1组分的总离子色谱图

Fig. 6　Total ion chromatogram of FS1 component

表 5　肽段信息

Table 5　Peptide sequence information

编号	肽段序列	保留时间/min	质荷比	总亲水性平均值	相对分子质量	结合能/(J/mol)	来源
RF1	ALTFR	4.75	304.181	0.640	606.348 9	−18 417.75	—
RF2	VYHYVTYQPPG	8.01	662.324	−0.591	1 322.629 0	−17 999.16	WP_204202793.1
RF3	WYMCC	12.65	705.213	−0.940	704.212 1	−17 161.99	WP_052723862.1
RF4	KKPVLLHA	9.03	453.344	0.125	904.585 8	−16 743.41	SCV19248.1

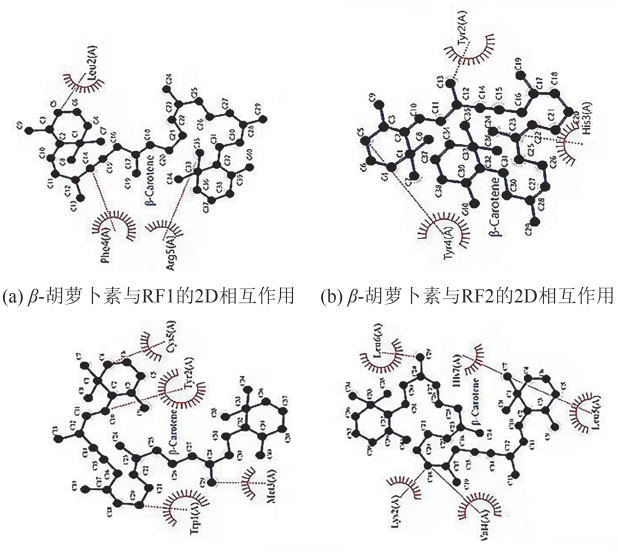


(a) β-胡萝卜素与RF1的3D对接图　(b) β-胡萝卜素与RF2的3D对接图

(c) β-胡萝卜素与RF3的3D对接图　(d) β-胡萝卜素与RF4的3D对接图

图 7　β-胡萝卜素与肽段的 3D 对接图

Fig. 7　3D docking diagram of β-carotene and peptides



(a) β-胡萝卜素与RF1的2D相互作用　(b) β-胡萝卜素与RF2的2D相互作用

(c) β-胡萝卜素与RF3的2D相互作用　(d) β-胡萝卜素与RF4的2D相互作用

图 8　2D 相互作用可视化结果

Fig. 8　2D visualization of interaction results

Allahdad等[19]利用分子对接得出的β-胡萝卜素分别与酪蛋白和乳清蛋白通过疏水相互作用结合的结论类似。因此，推测活性组分FS1中的疏水性氨基酸破坏了β-胡萝卜素乳化体系的稳态，导致β-胡萝卜素在FS1组分的氨基酸残基、金属离子等物质的作用下发生降解和褪色[20]。

3　结论

从福建药白曲中筛选出一株能够降解β-胡萝卜素的L-4菌株，经鉴定为蜡样芽孢杆菌，命名为*Bacillus cereus* L-4。在优化后的降解条件下培养12 h，该菌株对β-胡萝卜素的降解率达到95%，主要降解产物为β-紫罗兰酮、β-环柠檬醛和二氢猕猴桃内酯。通过超滤分离技术，从L-4菌株的发酵上清液中得到可降解β-胡萝卜素的活性组分FS1。该组分最适反应温度为40 ℃，最适反应pH为5.0。金属离子Fe^{2+}、Zn^{2+}能够显著抑制其降解活性，而Cu^{2+}、Fe^{3+}则具有促进作用。结合质谱分析和分子对接结果，推测L-4菌株分泌的疏水性肽类物质破坏了β-胡萝卜素乳化液的稳态，使得β-胡萝卜素在FS1组分的氨基酸残基和金属离子作用下发生双键断裂和褪色。作者采用分光光度法测定β-胡萝卜素质量浓度，但破乳作用引起的吸光度变化可能会影响测定的准确性。为了提高结果的准确性，作者后续将采用HPLC方法深入研究L-4菌株的降解机理。该研究中筛选出一株高效的β-胡萝卜素降解菌株，并初步探索了其降解机理，为类胡萝卜素的生物降解提供了理论依据。

参考文献

[1] WALTER M H, STRACK D. Carotenoids and their cleavage products: biosynthesis and functions[J]. Natural Product Reports, 2011, 28(4): 663-692.

[2] MUSSAGY C U, WINTERBURN J, SANTOS-EBINUMA V C, et al. Production and extraction of carotenoids produced by microorganisms[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103: 1095-1114.

[3] XU M R, CHEN T, BUTT C M. Identification of beta-carotene degradation compounds and their structural elucidation by high-resolution accurate mass spectrometry [J]. Journal of Food Science, 2019, 84(12): 3535-3545.

[4] POPOVA V, IVANOVA T, PROKOPOV T, et al. Carotenoid-related volatile compounds of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)

essential oils[J]. Molecules，2019，24(19)：3446.
[5] SCHWANZ T G，NESPECA M G，CARDOSO DIAS J，et al. GC×GC-TOFMS and chemometrics approach for comparative study of volatile compound release by tobacco heating system as a function of temperature[J]. Microchemical Journal，2020，159：105578.
[6] CZAJKA J J，NATHENSON J A，BENITES V T，et al. Engineering the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* to produce the aroma compound β-ionone[J]. Microbial Cell Factories，2018，17：136.
[7] SCHÜTTMANN I，BOUWS H，SZWEDA R T，et al. Induction，characterization，and heterologous expression of a carotenoid degrading versatile peroxidase from *Pleurotus sapidus*[J]. Journal of Molecular Catalysis B：Enzymatic，2014，103：79-84.
[8] ZELENA K，HARDEBUSCH B，HÜLSDAU B，et al. Generation of norisoprenoid flavors from carotenoids by fungal peroxidases[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2009，57(21)：9951-9955.
[9] ZHAO Y，ZHONG G F，YANG X P，et al. Bioconversion of lutein to form aroma compounds by *Pantoea dispersa*[J]. Biotechnology Letters，2015，37：1687-1692.
[10] ZHU M M，WANG S L，FAN M T，et al. *In vitro* study of the carotenoid-cleavage enzyme from *Staphylococcus pasteuri* TS-82 revealed substrate specificities and generation of norisoprenoid flavors[J]. Food Science and Biotechnology，2016，25：221-227.
[11] WEI T，JIA B L，HUANG S，et al. Purification and characterization of a novel β-carotene-9'，10'-oxygenase from *Saccharomyces cerevisiae* ULI3[J]. Biotechnology Letters，2015，37：1993-1998.
[12] SCHERZINGER D，AL-BABILI S. *In vitro* characterization of a carotenoid cleavage dioxygenase from *Nostoc* sp. PCC 7120 reveals a novel cleavage pattern，cytosolic localization and induction by highlight[J]. Molecular Microbiology，2008，69(1)：231-244.
[13] 朱佳琪，郑飞云，杨悦，等. 佛手果醋乙醇发酵优良酵母菌的选育及鉴定[J]. 食品与生物技术学报，2020，39(5)：23-30.
ZHU J Q，ZHENG F Y，YANG Y，et al. Isolation，screening and identification of yeasts for alcoholic fermentation of bergamot vinegar[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2020，39(5)：23-30.(in Chinese)
[14] CHEN X X，PENG M D，WU D H，et al. Physicochemical indicators and sensory quality analysis of kiwi wines fermented with different *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Food Processing and Preservation，2022，46(11)：e17132.
[15] LU Z D，XIE G F，WU D H，et al. Isolation and identification of the bitter compound from Huangjiu[J]. Food Chemistry，2021，349：129133.
[16] 欧阳小健. 当归多肽的制备及其抗氧化活性机制与构效关系研究[D]. 广州：广州中医药大学，2021.
[17] 田争福，申鹏森，赵璐，等. 类胡萝卜素降解对枸杞酒特征香气的影响[J]. 食品与生物技术学报，2022，41(9)：78-84.
TIAN Z F，SHEN P S，ZHAO L，et al. Effect of carotenoid degradation on characteristic aroma of wolfberry wine[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2022，41(9)：78-84.(in Chinese)
[18] 刘如楠，黄凯，管骁，等. 褚橙精油纳米乳的制备及抑菌性[J]. 食品与生物技术学报，2020，39(5)：59-67.
LIU R N，HUANG K，GUAN X，et al. Preparation and antibacterial activity of Chu orange essential oil nanoemulsion[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2020，39(5)：59-67.(in Chinese)
[19] ALLAHDAD Z，VARIDI M，ZADMARD R，et al. Spectroscopic and docking studies on the interaction between caseins and β-carotene[J]. Food Chemistry，2018，255：187-196.
[20] MORDI R C，ADEMOSUN O T，AJANAKU C O，et al. Free radical mediated oxidative degradation of carotenes and xanthophylls[J]. Molecules，2020，25(5)：1038.

（责任编辑：刘冬梅）