

玫瑰色微球菌 A-04 的红色素鉴定及稳定性分析

邓振山*, 占鹏, 张袞

延安大学生命科学学院, 延安 716000

摘要:从石油污染的土壤和水样中筛选出一株玫瑰色微球菌 A-04 *Micrococcus roseus*, 对其所产红色色素进行了分离, 并初步鉴定了色素种类, 基于对影响 A-04 色素稳定性的单因素分析基础之上, 采用 3 因素 3 水平响应面分析法, 进一步对影响色素稳定性的主要因素进行了优化分析。结果表明 A-04 所产红色色素为类胡萝卜素, 对该菌株的色素稳定性的单因素条件分析, 色素对环境条件的耐受性较好, 在 80 °C、pH5.0 ~ 8.0 等条件下依然能长时间保持鲜红而不褪色。经响应面优化分析表明: 温度、pH 和溶剂是影响该色素稳定性的主要因素, 温度与溶剂的交互作用对色素稳定性的影响也较为明显。pH5.0 ~ 8.0 之间时, 在 80 °C 范围内, 温度越低, 同时溶剂的极性越大, 越有利于维持色素的稳定性。本研究结果为该色素的实际开发和应用奠定了基础。

关键词:玫瑰色微球菌; 天然色素; 稳定性; 响应面分析

中图分类号: Q936; R917

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)2-0273-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.2.015

Identification of the red pigment from *Micrococcus roseus* A-04 and the analysis of its stability

DENG Zhen-shan*, ZHAN Peng, ZHANG Xi

Department of Lifescience, Yan'an University, Yan'an 716000, China

Abstract: The purpose of this study was to identify a red pigment produced by *Micrococcus roseus* A-04 which was isolated from an oil-polluted soil and water and preserved by our laboratory. The factors influencing on the pigments' stability were analyzed by using the single factor experiment. Moreover, a response surface methodology with three factors and three levels was used in this study to investigate the key factors that influenced pigments' stability based on single factor analyses. The results showed that the red pigment from *Micrococcus roseus* A-04 belongs to carotenoids on the basis of spectroscopic analysis. The single factor experiment showed that the pigment exhibited high stability under a variety of conditions, and did not fade after a long time. This article explored the interactions between the factors and the pigments' stability. The results showed that temperature, pH and solvent are the key factors, and the interaction between temperature and solvent effects the stability of pigment obviously. Under 80 °C and pH between 5 and 8, the lower temperature and stronger polarity is, the more stability the pigments will be. This work lays a foundation for the development and application of this pigment.

Key words: *Micrococcus roseus*; natural pigment; stability; response surface analysis

天然色素广泛存在于多种生物体内, 植物、动物以及一些微生物是主要来源^[1]。天然色素开发是当前色素发展的一个重要趋势, 很多天然色素具有

无毒、安全性高、色调自然、营养价值高和具有药理保健功能等优点^[2]。目前天然色素的获得主要有 3 条途径: 天然产物提取、化学人工合成和生物技术生产, 但前两者受到资源和环境等因素的制约较大。近年来随着生物技术的发展, 利用生物技术生产天然色素为人们开辟了广阔的领域, 而微生物生产天然色素更具有重要的研究与应用价值^[3]。通过微生物资源发酵生产红曲色素、类胡萝卜素等多种天然色素已成为现实^[2,4], 但其远不能满足各种食品、工业发展的需要。微生物色素作为一种天然、绿色、

收稿日期: 2017-12-18 接受日期: 2018-07-02

基金项目: 陕西省科技统筹创新工程(2016TTC-N-3-1); 陕西省教育厅服务地方专项(16JF029); 延安市菌草工程研究中心专项; 延安市生物资源开发与利用科技创新团队专项; 延安大学“陕北微生物资源与利用研究中心”科研机构专项; 2017 年延安大学产学研合作研发项目

* 通信作者 E-mail: zhenshandeng214@163.com

安全的色素资源十分具有研究价值,因此,从自然资源中筛选具有产天然色素能力的微生物,开发新品种的天然色素,尤其是具有药用价值的天然色素,具有广阔的前景^[1,2]。

由于化学合成类胡萝卜素因合成时无法控制其异构体,具有一定毒性而使其应用受到限制^[5]。微生物合成具有生物活性的类胡萝卜素因其高效和易于操控正受到广泛关注^[6]。罗金亮^[7]等筛选了一株类胡萝卜素高产菌,对其进行了形态、生理生化特征、类胡萝卜素产量、分子生物学特征等研究。肖亦农^[8]等对不同的色素提取方法进行了研究比较,并认为超声波浸提法提取类胡萝卜素效果最好。刘军^[6]等对其分离的红色素产生菌进行了鉴定和色素稳定性试验,并未研究色素种类。但以前文献关于环境因素对色素稳定性的影响研究,主要集中在单因素分析方面,而多因素的交互作用对色素稳定性的研究鲜有报道。鉴于此,本文以本实验室保藏并鉴定过的1株产红色色素的玫瑰色微球菌(*Micrococcus roseus*) A-04菌株为研究材料,对其红色色素进行了分离和初步鉴定,并进一步探讨了色素对不同环境因素的耐受性以及环境因素之间的交互作用对色素稳定性的影响,以期为食用色素的应用和产业化提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

供试菌株玫瑰色微球菌(*Micrococcus roseus* A-04)分离自陕北某采油厂的石油污染土壤和水样,由本实验室鉴定并保存。

1.1.2 培养基

牛肉膏蛋白胨培养基:蛋白胨 10 g,牛肉膏 5 g, NaCl 10 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL, pH7.0 ~ 7.5。

摇瓶发酵培养基:葡萄糖 10 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5 g, KH_2PO_4 10 g, Na_2HPO_4 4.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.5 g,蒸馏水 1 000 mL, pH 调节至 7.0。

1.1.3 仪器设备

UV-300 紫外-可见分光光度仪,日本岛津公司; VHX-6000 数码显微系统,基恩士(中国)有限公司; R-100 旋转蒸发仪,上海秦高实业有限公司; ZF-200 暗箱式紫外分析仪,上海速科实业有限公司; LC-2010AHT 高效液相色谱仪,日本岛津公司。

1.2 方法

1.2.1 色素的分离和纯化

将玫瑰色微球菌 A-04 在牛肉膏蛋白胨培养基活化培养后,配置成 2 mL/L 的菌悬液,接种至发酵培养基,25 °C,160 rpm 摇床培养 5 天后,取发酵液在 5 000 rpm 离心 5 min。收集上层色素相,取无水乙醇缓慢加入色素液,并不断摇动,使两溶液充分混匀,直至有白色絮状物出现,停止加入乙醇。静置至混合液分层,取下层色素相用氯仿萃取 2 次,合并氯仿相,于 40 °C 旋转蒸发仪浓缩,得红色粘稠的色素粗品,室温保藏备用。

以硅胶(柱层析用)和石油醚装柱(湿法),取少量色素样品用洗脱剂(氯仿:甲醇 = 8:1)溶解后加到色谱柱上,添加洗脱剂至色谱柱以增加柱压。待柱内红色色素带将到达筛板时,收集色素溶液。于 40 °C 旋转蒸发仪上蒸干,即为色素纯品。

1.2.2 色素种类初步鉴定

1.2.2.1 色素的显色反应^[9,10]

按照文献 9 和 10 中描述的方法,采用浓 H_2SO_4 显色反应进行色素的鉴定。

1.2.2.2 色素的吸收光波测定

将该色素溶液通过扫描其在 300 ~ 650 nm 的紫外吸收光谱,确定该色素的特征性吸收峰(或最大吸收峰)。

1.2.3 单个环境因素对色素稳定性的影响

设置温度、pH、溶剂、添加剂、金属离子等环境因子(溶剂极性从小到大依次为:石油醚,正丁醇,丙三醇,丙酮;金属离子氧化性从弱到强依次为: K^+ , Ca^{2+} , Al^{3+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} ;添加剂的氧化性从弱到强依次为:蔗糖,柠檬酸,苯甲酸,过氧化氢)作为变量,每处理 3 个重复,探究单个环境因素对色素稳定性的影响^[11]。

1.2.3.1 温度对色素的稳定性影响

分别取 3 mg/mL 色素溶液,分别在 60、80、100、120 °C 的避光条件下,每隔 1 天测定一次溶液吸光值,连续测定 5 天。

1.2.3.2 pH 对色素的稳定性影响

分别取 3 mg/mL 色素溶液,调 pH 至 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11,避光保存,半小时后测定溶液吸光值。

1.2.3.3 不同溶剂对色素的稳定性影响

分别用石油醚、正丁醇、丙三醇、丙酮等不同溶剂分别溶解等量色素,至浓度为 3 mg/mL,测定其吸光值。

1.2.3.4 添加剂对色素的稳定性影响

分别取 3 mg/mL 色素溶液,分别按照 1、2、3、4、5、6 mL 的梯度加入 1 mg/mL 的蔗糖、苯甲酸、柠檬酸、过氧化氢等添加剂,避光保存,半小时后测定其吸光值。

1.2.3.5 离子的氧化性对色素的稳定性影响

分别取 3 mg/mL 色素溶液,分别加入 KCl、CaCl₂、AlCl₃、MnCl₂、ZnCl₂、FeCl₂ 等金属离子,避光保存,半小时后测定其吸光值。

1.2.4 多个环境因子交互作用对色素稳定性的响应面分析

依据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理,综合单个环境因子对色素稳定性的影响结果,选取温度、pH 和溶剂这 3 个对色素稳定性影响较大的因素,进一步采用三因素三水平的响应面分析方法^[12,13]。

对影响色素稳定性的 3 个主要因素进行响应面试验设计,因素及水平设置如表 1 所示:

为了数量化表示溶剂,采用溶剂极性的近似值来代表溶剂。分别为:石油醚(1)、丙三醇(3)、丙酮(5)。

表 1 响应面试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of experiment of response surface analysis

试验因素 Factors	因素水平 Factor levels		
	-1	0	1
A 温度 Temp.	60	80	100
B pH	4	6	8
C 溶剂 Solvent	1	3	5

1.2.5 数据分析

利用 Excel 2013 整理数据,用 Origin 对“单因素对色素稳定性的影响”部分数据绘图并分析,用 Design Expert 对“因素间交互作用对色素稳定性的影响”部分数据进行响应面分析法的设计、绘图及分析。

2 结果与分析

2.1 色素种类初步鉴定结果

2.1.1 色素的显色反应鉴定结果

将采用上述的提取方法,从菌体中提取到的含有纯色素的石油醚溶液,倾入装有 1 ~ 2 mL 浓 H₂SO₄ 的试管中,发现在两相交处呈青兰色。再将其倾入装有 1 ~ 2 mL 浓 HCl 的试管中,振荡片

刻,下层呈浅兰色。以上试验结果说明样品中含有类胡萝卜素。

2.1.2 色素光谱特征鉴定结果

该色素在 300 ~ 650 nm 范围内有 7 个吸收峰(见表 2)。其中的特征吸收峰为 445.1、459.4、537.1 nm。因类胡萝卜素类物质在 400 ~ 600 nm 之间存在三指吸收峰,因此,证实菌株 A-04 能够产类胡萝卜素类产物。

表 2 波峰检测结果

Table 2 Result of waveform peak's detecting

编号 No.	P/V	波长 λ (nm)	吸收值 Absorption value
1	波峰	638.1	0.010
2	波峰	596.7	0.014
3	波峰	537.1	0.236
4	波峰	459.4	0.043
5	波峰	445.1	0.040
6	波峰	369.9	0.122
7	波峰	337.2	0.160

由表 2 结果可知,3 号峰对应的波长为 537 nm,吸收值为 0.236,是该色素的最大吸收峰。说明在色素结构正常的情况下,在 537 nm 的波长下,色素的吸收值最大。

2.2 单个环境因素对色素稳定性的影响

2.2.1 温度对色素稳定性的影响

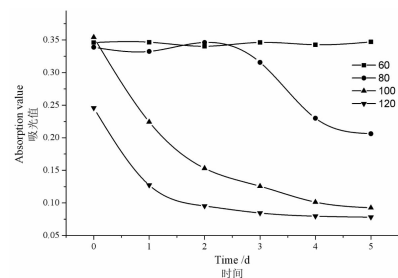


图 1 温度对色素稳定性的影响

Fig. 1 Effect of temperature on the pigments' stability

图 1 表明:相同时间内,温度越高,色素的 OD 值越小;随着温度升高,即使时间变短,其 OD 也会变小。这说明在一定温度下,随着时间的变长,OD 呈下降趋势,但温度较低时趋势并不明显;但当温度较高(超过 100 °C)时,则下降的趋势十分明显。说明 60 °C 及稍高的温度对色素结构的破坏并不显著,而 100 °C 甚至 120 °C 的高温对色素结构的破坏则是显

著而快速的。

2.2.2 pH 对色素稳定性的影响

由图 2 显示,色素在中性环境 pH5.0 ~ 8.0 的范围内均表现出较好的耐受能力,证明其能够在较宽泛的 pH 下依然保持其稳定性。通过三次项曲线拟合还可以得到一条 pH6.0 为最大值的曲线。证明该色素也存在一个适于使之保持稳定结构的 pH 范围,该范围大约在 pH5 ~ 8 之间。

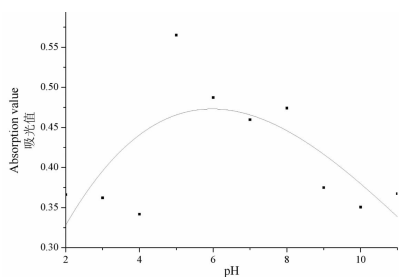


图 2 pH 对色素稳定性的影响

Fig. 2 Effect of pH on the pigments' stability

2.2.3 不同溶剂对色素稳定性的影响

由图 3 结果表明,色素在极性较小的溶剂中吸光值小,即表明色素在极性较小的溶剂中,稳定性小;而在极性较大的溶剂(丙酮)中稳定性大。此结果说明,该色素分子是一种极性较大的物质。

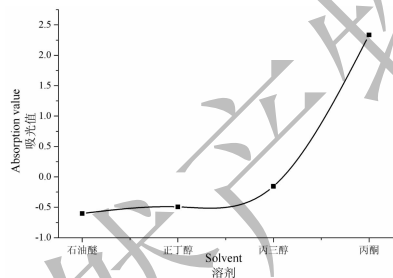


图 3 溶剂对色素稳定性的影响

Fig. 3 Effect of solvent on the pigments' stability

2.2.4 添加剂对色素稳定性的影响

对图 4 分析表明:添加剂的氧化性并非是造成吸光值波动的主因,并且同一添加剂,即氧化性相同的情况下,随着添加剂的用量的增多,色素的稳定性只是小幅度地变化。说明在试验范围内(蔗糖、柠檬酸、苯甲酸和过氧化氢)添加剂不能引起色素稳定性出现的显著变化,即不会对色素结构造成较大影响。

2.2.5 金属离子对色素稳定性的影响

对六种金属离子的试验结果表明,分别按照粒

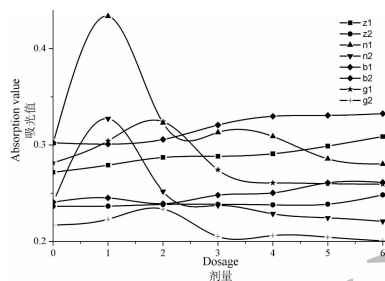


图 4 添加剂对色素稳定性的影响

Fig. 4 Effect of additives on the pigments' stability

注:z:蔗糖;n:柠檬酸;b:苯甲酸;g:过氧化氢;1:第一组;2:第二组

Note:z:Cane sugar;n:Citric acid;b:Benzoic acid;g:Hydrogen peroxide;1:First group;2:Second group

子大小、所带电荷、氧化性进行排序,发现只有关于氧化性的排序是有规律可循的。试验结果如图 5 所示。总体看来,在金属离子氧化性较弱时,色素 OD 值小;当金属离子氧化性较强时,则色素吸光值变大。这说明金属离子氧化性与色素稳定性呈正相关性。

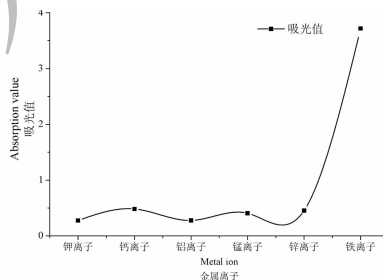


图 5 金属离子对色素稳定性的影响

Fig. 5 Effect of ions on the pigments' stability

2.3 多个环境因子的响应面分析

2.3.1 方案设计及其结果

结合上述试验结果,选择对色素稳定性影响较大的温度(A)、pH(B)、溶剂(C)作为自变量,以色素吸光值为响应值(Y),进行响应面分析试验。试验方案及结果见表 3。

2.3.2 多元二次响应面回归模型的建立与分析

表 3 的试验结果通过 RSA 软件进行二次回归响应面分析,建立多元二次响应面回归模型:

$$Y = 0.24 - 0.11 \times A + 0.049 \times C + 0.02 \times A \times C + 0.13 \times A^2 - 0.17 \times B^2 + 0.049 \times C^2$$

各因素的方差分析见表 4。

由表 4 结果可知, P 值 < 0.0001 ,表明模型极显著,回归模型的决定系数为 A(温度)、C(溶剂)、AC

表 3 响应面分析方案及试验结果

Table 3 Observed and estimated value for different levels of experimental design

编号 No.	因素 Factors			色素吸光值 Absorption value	编号 No.	因素 Factors			色素吸光值 Absorption value
	温度 Temp.	pH	溶剂 Solvent			温度 Temp.	pH	溶剂 Solvent	
1	-1	1	0	0.3163	10	0	-1	-1	0.0791
2	0	0	0	0.2372	11	0	-1	1	0.1581
3	0	1	-1	0.0791	12	1	-1	0	0.0791
4	0	0	0	0.2372	13	1	1	0	0.0791
5	0	1	1	0.1581	14	0	0	0	0.2372
6	0	0	0	0.2372	15	0	0	0	0.2372
7	-1	0	-1	0.4744	16	1	0	1	0.3953
8	-1	-1	0	0.3163	17	1	0	-1	0.2372
9	-1	0	1	0.5534					

表 4 二次响应面回归模型方差分析

Table 4 Variance analysis for Response Surface Quadratic Model

方差来源 Source	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F 值 F	Prob > F
Model	0.304	9	0.034	151.5	< 0.0001
A-A	0.094	1	0.095	423.5	< 0.0001
B-B	0	1	0	0	1.0000
C-C	0.019	1	0.020	87.5	< 0.0001
AB	0	1	0	0	1.0000
AC	0.002	1	0.002	7	0.0331
BC	0	1	0	0	1.0000
A ²	0.069	1	0.070	311.3	< 0.0001
B ²	0.119	1	0.119	532.4	< 0.0001
C ²	0.010	1	0.010	46.1	0.0003
残差 Residual	0.0016	7	0.0002		
失拟性 Lack of Fit	0.0016	3	0.0005		
纯误差 Pure Error	0	4	0		
总差 Cor Total	0.30593	16			

(温度与溶剂的交互作用), 它们的 Prob > F 值分别为 < 0.0001, < 0.0001, 0.0331, 对色素稳定性的影响显著, 说明该模型的拟合度较好。

由表 4 结果可以看出, 影响色素稳定性的各因素按影响大小排序依次为 A(温度)、C(溶剂), 并且温度和溶剂均达到极显著水平。

由表 4 的结果分析表明, 本试验中 AC 的交互作用影响显著(见图 7)。由图 7 可知, 温度越低, 色素稳定性越大, 溶剂极性越大, 色素稳定性越大, 二者交互作用还可以一定程度上提高色素稳定性。这

与单因素对色素稳定性影响探究结果是一致的, 因为温度的升高使色素分子结构变得不稳定, 而溶剂极性增大使色素更好的溶解于相应体系中。

另外, 虽然响应面分析指出 pH 对色素稳定性的影响并不显著, 但单因素分析时 pH 对色素稳定性是有重要影响的。因此, 图 2 中也列出了 pH 和其它因素的交互作用。分析图 6 和图 8 可以发现 pH 对色素的影响依然是钟形曲线, 是非线性的, 在与另一个因素的影响曲线复合后形成了马鞍状的三维曲面图形。这说明 pH 增大的同时, 色素 OD 值是

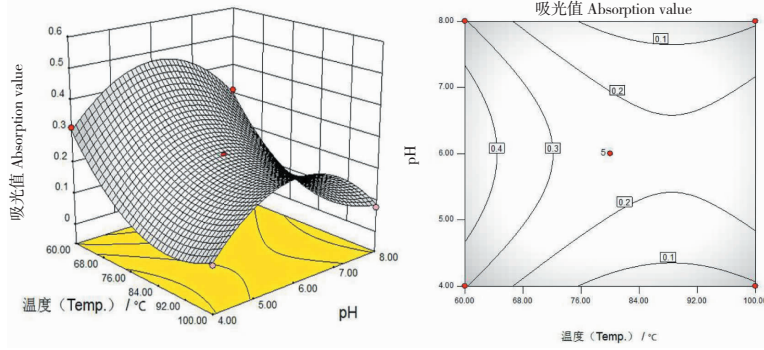


图 6 温度和 pH 交互作用对色素稳定性的影响响应面图

Fig. 6 Response surface plots showing interactive effects between temperature and pH on the pigments' stability

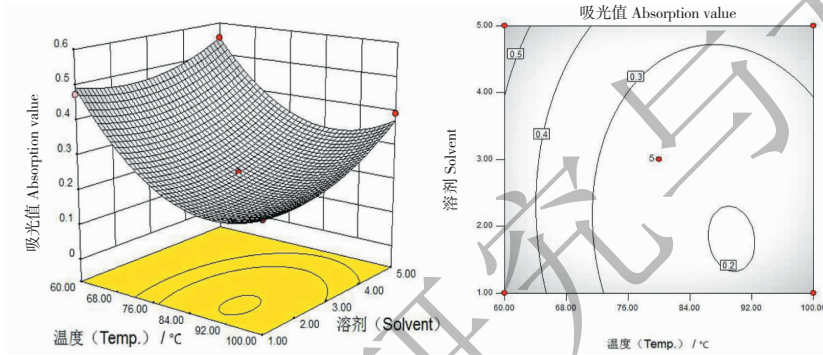


图 7 温度和溶剂交互作用对色素稳定性的影响响应面图

Fig. 7 Response surface plots showing interactive effects between temperature and pH on the pigments' stability

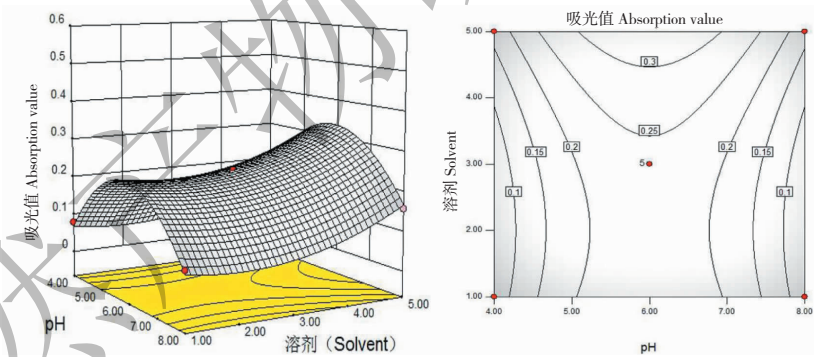


图 8 溶剂和 pH 交互作用对色素稳定性的影响响应面图

Fig. 8 Response surface plots showing interactive effects between solvent and pH on the pigments' stability

先增大后减小的,因此,pH4~6与pH6~8对色素稳定性有显著影响。这与单因素对色素稳定性的影响探究结果是相同的,因为,该色素分子可能具有最适的pH范围,而增大或减小pH都会使其结构发生改变。

3 结论

本文通过对玫瑰色微球菌 A-04 的色素分离和初步鉴定,明确其产生的色素为类胡萝卜素。国内关于微球菌产类胡萝卜素的研究,以前已有文献报道,如袁婀娜等^[13]从野外土壤中分离得到 1 株产类

胡萝卜素菌株。根据其形态特征、生理生化特征的测定结果分析,该菌株应归为微球菌属 (*Micrococcus*) 玫瑰色微球菌 (*Micrococcus roseus*)。周明辉等^[14]的研究结果证实归属于玫瑰色微球菌 (*Micrococcus roseus*) 的菌株 M1 的细胞内含有类胡萝卜素,此结果与前期鉴定及本文产类胡萝卜素的研究结果一致。但本研究发现 A-04 的类胡萝卜素的吸收光谱与已有的文献报道不同^[13,14],因此,该色素可能是一种新型类胡萝卜素或类胡萝卜素衍生物,色素

组分定性有待进一步研究。

刘军^[6]等对其分离的红色素产生菌进行了鉴定,并进行了色素稳定性试验,但并未研究色素种类。李彦芹^[9]等对光合细菌产生的类胡萝卜素的稳定性进行了研究,认为低温、中性的环境适合类胡萝卜素的存放。而本文研究结果表明色素的存放的最佳条件是在 60 ℃ 以下,而不要在超过 80 ℃ 的条件下持续存放,当处于超过 100 ℃ 的环境则迅速降解,几乎不能使用。色素在 pH5 ~ 8 之间比较稳定,吸光值无较大变化,pH5.5 时色素最稳定,pH 变酸时稳定性迅速降低,变碱时稳定性降低稍慢。不同极性的溶剂中,极性较大的丙酮对色素稳定性保持更有利。此外,添加剂和金属离子对色素稳定性也表现出小幅的抑制性影响。但目前针对环境因素对色素稳定性的影响的研究,主要仍以单因素分析为主,多因素的交互作用对色素稳定性的研究不足^[15]。响应面分析法利用回归分析方法进行函数估算,然后用一次或二次多项式模型将回归因素与试验结果进行拟合,对影响响应值的因子水平及其交互作用进行优化与评价,是一种更为有效合理的试验设计方法。本文通过响应面分析法,克服了正交试验法是线性模型的局限性,在单因素试验的基础上,得出温度(A)、pH(B)和溶剂(C)是影响色素稳定性的主要因素,温度与溶剂的交互作用对色素稳定性的影响也较为明显。在 pH 维持在 5-8 之间时,在 80 ℃ 以下范围内,温度越低,同时溶剂的极性越大,越有利于维持色素的稳定。各因素在本次试验范围内,经响应面分析的最佳存放条件是温度 60 ℃,pH5.5,丙酮(极性 5)溶解。

本文虽然探讨了环境中单因素及多因素的交互作用对色素稳定性的影响,为其实际应用提供了一定的理论依据。但研究缺乏对该菌株所产色素的结构表征及发酵条件的优化,今后还有待于通过各种色谱、光谱、质谱、核磁共振谱来解析该色素分子的结构特征及产色素发酵条件的优化,同时需要增加更多的影响色素稳定性的环境因子,并对其稳定性进行深入的研究,将会有利于提高该色素的实际应用价值。

参考文献

1 Venil CK,Zakaria ZA,Ahmad WA. Bacterial pigments and their applications [J]. Process Biochem, 2013, 48: 1065-1079.

- 2 Dufoss éL. Microbial production of food grade pigment[J]. Food Tech Biotech,2006,44:313-321.
- 3 Xu YL,Li Z,Wang ZF,et al. Application progress of microbial pigments in textile processing [J]. Textile Auxiliaries (印染助剂),2017,34(10):1-4.
- 4 Liu Y,Ning ZX. Monascus colors and application in the prepared meat products [J]. Food Mach(食品与机械),1999(1):28-30.
- 5 Liao ZL,Xu LH,Cai SJ,et al. Study on extraction and stability of pigment from a new marine actinobacteria[J]. Food Sci and Tech(食品科技),2008,10:170-172.
- 6 Liu J,Zhang SS,Yang N. Identification and pigment contents of a marine bacterial strain producing high yield of red pigment[J]. Jiangsu Agri Sci(江苏农业科学),2010,3:318-320.
- 7 Luo JL,Zhou LH,Chen P. Isolation and identification of a bacterium strain with high production yield of carotenoid [J]. Hubei Agri Sci(湖北农业科学),2013,53:2390-2392.
- 8 Xiao YN,Cui YJ,Xu Q,et al. Identification of *Rhodospseudomonas palustris* and its analysis for carotenoids[J]. Sci Tech Rev(科技导报),2013,31(13):58-62.
- 9 Li YQ,Li CQ,Li ZH,et al. Extraction and stability of carotenoids of photosynthetic bacteria[J]. J Henan Norm Univ:Nat Sci(河南师范大学学报:自科版),2011,39:112-115.
- 10 Zhang JR,Yang JF,Chen FS. Optimization of growing conditions and a method for the extraction of crude carotenoids produced by *Rhodococcus* sp. (strain B7740) isolated from the arctic sea[J]. Chin J Polar Res(极地研究),2012,24:168-177.
- 11 Yang P,Gao F. Principles of bioinorganic chemistry(生物无机化学原理)[M]. Beijing:Science Press,2002.
- 12 Yan KY,Gao YX. Optimization of the extraction technology of total flavone from *Sophora Japonica* L. using response surface analysis[J]. Food Res Dev(食品研究与开发),2009,7(30):21-24.
- 13 Yuan AN,Shi GY,Cai YJ. Identification of new carotenoids-producing *Micrococcus roseus*[J]. J Micro(微生物学杂志),2005,25(5):43-45.
- 14 Zhou MH,Jia R. The biological characteristics of *Micrococcus roseus* and the optimization of culture medium[J]. Acta laser biology sinica(激光生物学报),2014,23:439-471.
- 15 He YT,Liu JL,Zheng QB,et al. Optimization of flask fermentation conditions for the production of red pigment from *Monasus sanguineus*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2018,30:438-443.