

产胞外黑色素菌株的筛选*

李建波 宋欣** 曲音波

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘要: 对不同来源获得的47株菌株在酪素培养基上生长、产色素情况进行了对比研究。从中选取了T4和 *Neurospora crassa* AS 3.1602, 比较了二者利用5种不同培养基产黑色素的能力。对T4菌株产生的黑色素做了初步研究, 并初步鉴定T4菌株为奇异变形杆菌 (*Proteus mirabilis*)。

关键词: 黑色素, 筛选, 奇异变形杆菌, 粗糙脉孢菌

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 01-0050-05

SCREENING OF STRAINS PRODUCING EXTRACELLULAR MELANIN*

LI Jian-Bo SONG Xin** QU Yin-Bo

(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100)

Abstract: The growth and pigment production of 47 strains on casein medium were studied comparatively. T4 and *Neurospora crassa* AS 3.1602 were selected for their capacity of producing melanin on five different culture media. Melanin produced by T4 was investigated, and T4 was identified as *Proteus mirabilis* primarily.

Key words: Melanin, Screening, *Proteus mirabilis*, *Neurospora crassa*

黑色素 (melanin) 是一种广泛存在于动植物和微生物中的非均质的类多酚聚合物。微生物产生的黑色素主要分为壁 (膜) 结合黑色素和胞外黑色素。黑色素通常不溶于水、酸溶液和普通有机溶剂。黑色素的黑色是因为它吸收所有波长的可见光。黑色素在紫外区的吸收率最高, 随着波长的增加而逐渐降低。通常光吸收的降低与波长的增加是呈线性的。因此, 光吸收线性曲线的斜率可作为鉴定自然来源黑色素的特征参数。研究者认为, 不同类型的黑色素其光吸收斜率值是不同的。然而, 黑色素氧化后其斜率就会改变, 因此并不把这一参数作为黑色素分类的依据^[1]。

所有黑色素的红外图谱因为-OH和-NH₂而在3,000 nm (3,333 cm⁻¹)附近处有一吸收峰, 羰基的聚集使得在6,000 nm (1,667 cm⁻¹)处有一吸收峰。多数图谱因为其他信息较少而不能有效的对不同黑色素进行区分^[1]。

黑色素在化妆品、染发剂的装饰作用、防紫外线辐射、清除自由基、作为无定形的半导体、以及生物杀虫剂的光保护剂等方面有着广阔的应用前景^[1,2]。另外, 黑色素对病理学、分类学的研究也具有重要意义。Eric S. J. 等认为真菌黑色素可抵抗高锰酸盐、次氯酸盐及其他氧化物的氧化作用; Malgorzata 等认为由酪氨酸酶催化产生的黑色素能阻止心磷脂脂质体的氧化。黑色素除赋予生物体某些特殊防御作用外, 还具有外表修饰、抗辐射、抗氧化等功能。近年来, Montefiori 等报道, 化学合成的可溶性黑色素还具有抑制艾滋病病毒 (HIV-1) 感染宿主细胞的作用, 并认为此类黑色素可能成为一种有效的抗病毒类新药^[1-4]。

*教育部留学回国人员启动基金资助项目 (No. 留 [2003] 14)

**联系人 Tel: 86-531-8361379, Fax: 86-531-8565234, E-mail: songx@sdu.edu.cn

收稿日期: 2003-02-24, 修回日期: 2003-06-25

为了获得高产胞外黑色素的优良菌种,本文工作从土样中得到了18株产胞外黑色素菌株,对菌株在酪素培养基、Tyr发酵培养基上生长、产色素情况进行了对比研究;对已有菌株也进行了筛选。最终选取了T4和N. crassa AS 3.1602进行了黑色素发酵生产的初步研究。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

从济南近郊土样中分离得到了18株菌株;本实验室保存的21株黑曲霉;微生物技术国家重点实验室菌种室提供的:链孢霉(*Neurospora*) 3.49,黑曲霉(*Aspergillus niger*) 3.3928,铜绿假单菌(*Pseudomonas aeruginosa*) 1.15,蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) 1.32;购自中国科学院微生物研究所菌种保藏中心的粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*) AS 3.1598, 1600, 1602, 1604。

1.2 培养基

1.2.1 酪素培养基(初筛培养基)^[4]:蛋白胨10g,葡萄糖1g,NaCl 5g,CaCl₂ 0.1g,干酪素5g,L-酪氨酸2g,定容至1L,pH7.0。

1.2.2 Fd发酵培养基^[2]:葡萄糖1.2g,(NH₄)₂SO₄ 1.3g,K₂HPO₄ 1g,CaCO₃ 3g,MgSO₄ 0.56g,定容至1L,pH7.0。

1.2.3 Fw发酵培养基^[4]:葡萄糖2g,(NH₄)₂SO₄ 5g,K₂HPO₄ 7g,KH₂PO₄ 3g,NaCl 5g,MgSO₄ 1g,定容至1L,pH7.0。

1.2.4 Tyr发酵培养基^[2]:葡萄糖1g,蛋白胨5g,NaCl 5g,CaCl₂ 0.1g,L-酪氨酸2g,定容至1L,pH7.0。

1.2.5 5[#]培养基:葡萄糖1g,(NH₄)₂SO₄ 5g,NaCl 5g,CaCl₂ 0.1g,L-酪氨酸2g,定容至1L,pH7.0。

1.2.6 LB培养基(细菌种子培养基):蛋白胨10g,NaCl 10g,酵母膏5g,定容至1L,pH7.0。

1.2.7 真菌种子培养基:KH₂PO₄ 2g,MgSO₄·7H₂O 0.615g,CaCl₂ 0.3g,蛋白胨5g,酵母膏3g,麦芽汁3mL,葡萄糖10g,微量元素10mL(FeSO₄·7H₂O 5.0mg/L,ZnSO₄ 1.4 mg/L,MnSO₄·4H₂O 1.6 mg/L,CoCl₂ 2.0 mg/L),定容至1L,pH5.0。

1.3 土样中菌株的筛选

1.3.1 初筛:土样作10倍系列稀释。取10⁻²~10⁻⁵稀释液0.1mL涂布酪素平板,28℃、37℃培养5d,挑取产色素菌落。

1.3.2 复筛:挑取产红色、黄色、棕色、褐色和黑色色素菌落用3次划线法分离纯化。获得的纯化菌株在Tyr发酵培养基中培养,比较产色素情况。

1.4 黑色素纯化

发酵液调pH到2~3,使黑色素沉淀出来。离心后,沉淀在6mol/L HCl中酸解4h,以除去蛋白质、碳水化合物和脂类。进一步纯化则在氯仿、乙酸乙酯、乙醇等有机溶剂中依次抽提,剩余物就认为是纯化的黑色素^[1,5,6]。

1.5 黑色素的紫外可见光谱

仪器:UV-3100 SPECTROPHOTOMETER;方法:发酵液直接在200~800nm扫描。

1.6 黑色素的红外光谱表征

仪器:NICOLET NEXUS 470 FT-IR SPECTROMETER;方法:采用KBr压片,400~

4,000cm⁻¹扫描。

1.7 黑色素的透射电镜观察

仪器：HITACHI JEM-100CX II 透射电镜；方法：纯化的黑色素在无水乙醇中分散后观察。

1.8 黑色素的扫描电镜观察

仪器：HITACHI S-520 扫描电镜；方法：样品镀金后观察。

2 结果与讨论

2.1 土样筛选结果

从土样中筛选到 18 株产黑色色素菌株，其中 T4 菌株产色素量较大（图 1 左）。

2.2 已知菌株的筛选

本实验室保存的 21 株黑曲霉在酪素平板上均可生长，但不分泌色素到培养基中；菌种室提供的链孢霉 3.49，黑曲霉 3.3928，铜绿假单胞菌 1.15，蜡状芽孢杆菌 1.32，在酪素平板上均可生长，前两者不分泌色素到培养基中，后两者没有所需颜色色素产生；*N. crassa* AS 3.1602 产生黑色色素（图 1 右）；1598、1604 产黄褐色色素，1600 不产生色素。

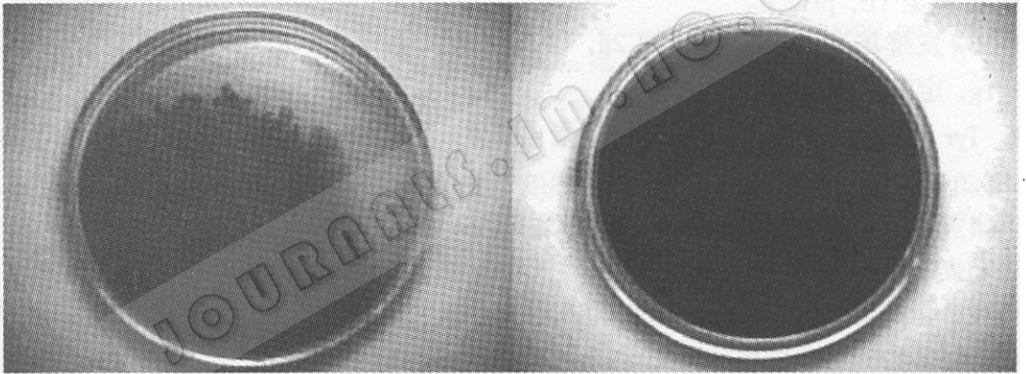


图 1 T4 (左) 和 *N. crassa* AS 3.1602 (右) 在酪素培养基上产色素情况

2.3 菌株利用不同培养基产黑色素能力比较

表 1 T4 和 *N. crassa* AS 3.1602 在 5 种培养基上产黑色素的比较 (mg/100mL 发酵液)

	酪素培养基	Fd	Fw	Tyr 发酵	5 [#]
T4	60.0	30.0	44.0	32.8	18.8
AS 3.1602	42.6	6.4	49.0	22.0	22.2

选取了 T4 菌株和 *N. crassa* AS 3.1602，比较了二者利用 5 种培养基产黑色素的能力，结果见表 1。实验中，发酵液 5,000r/min 离心 10min 去除菌体，调 pH 2~3，过夜。然后 12,000r/min 离心 10min，取沉淀烘干称重。

因为蛋白胨和干酪素中都含有一定量的游离酪氨酸，所以将酪素培养基中酪氨酸去掉后作为培养基，但发现 T4 菌株和 *N. crassa* AS 3.1602 都不能利用该培养基产生黑色素。

从表 1 可以看出，T4 菌株利用酪素培养基和 *N. crassa* AS 3.1602 利用 Fw 发酵培养基产黑色素量较高。

2.4 T4 菌株的鉴定

2.4.1 生理生化鉴定：T4 菌株革兰氏阴性，短杆状，在血平板上有溶血现象，但不能

利用枸橼酸盐生长。另外观察到,在筛选过程中,T4菌株会在生长初期分泌抑菌物质,使得分离纯化较为简易。根据伯杰细菌系统学手册第九版进行生理生化鉴定,结果见表2。

2.4.2 16S rDNA 序列测定:按照细菌中小量基因组 DNA 的制备方法提取 T4 菌株基因组。然后进行 PCR 扩增。扩增引物序列如下:

上游引物: 27F: AGAGTTTGATC-CTCGCTCAG

下游引物: 1492R: TACGGCTAC-CTTGITACGACTT

得 16S rDNA, 大小约为 1.5kb。利用 BLASTN (核酸序列库检索核酸序列) 比对显示 T4 菌与 *Proteus mirabilis* 相似性为 99%。

综合上述两方面的结果,初步 + ≥90% 菌株为阳性; - ≥90% 菌株为阴性; (+) 缓慢阳性将 T4 确定为 *Proteus mirabilis*。

2.5 菌株发酵产生的黑色素紫外可见光谱

黑色素在紫外及可见光区光谱扫描没有极值(图2),吸光值取对数后对波长作图可以得到一条斜率为负值的直线(图3)。有的研究者认为取对数后做得的直线斜率可以表征不同黑色素之间的差异,例如从黑附球菌(*Epicoccum nigrum*)粉孢子和黄萎病菌(*Verticillium dahliae*)菌核中提取到的黑色素斜率值为-0.0015,刺盘孢(*Colletotrichum coccodes*)菌核提取到的黑色素斜率值为-0.0026,暗膜菌(*Amorphotheca resinea*)菌丝中黑色素斜率为-0.0025,黑孢块菌(*Tuber melanosporum*)中黑色素斜率为-0.0022,DOPA黑色素斜率为-0.0033,但这一假设还没有得到确证^[3]。实验中,T4、AS 3.1602发酵液光吸收值取对数对波长作图后,所得斜率值分别为-0.0022和-0.0021。

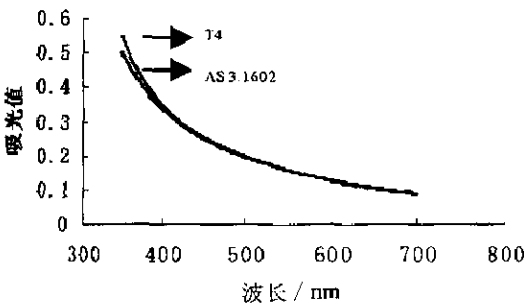


图2 T4发酵液吸收光谱(350~700nm)

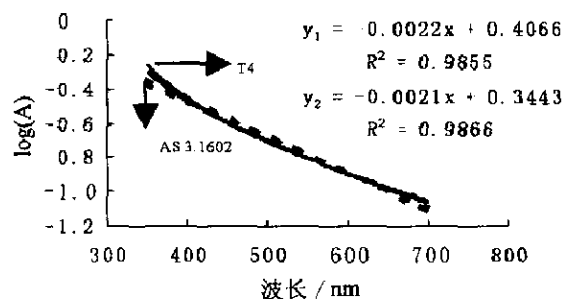


图3 对数吸光值对波长图(虚线 y_1 为 T4 拟合直线, y_2 为 AS 3.1602 拟合直线)

2.6 *Proteus mirabilis* T4 产生的黑色素红外扫描结果

红外光谱能够表征黑色素结构中的主要功能性基团。从图4可以看到,在 $3,396.11 \text{ cm}^{-1}$ 出现吸收峰是因为 -OH、-NH₂ 的伸展振动, $1,655.57 \text{ cm}^{-1}$ 处主要是 C=C、-COO⁻、C=O 伸展振动引起。许多国外研究者对不同来源的黑色素都做过红外光谱研

表2 T4菌株同伯杰细菌系统学手册中相关菌株的生理生化特性比较^[7]

特征	T4	普通变形杆菌	奇异变形杆菌	产粘变形杆菌	彭氏变形杆菌
D-葡萄糖产酸	+	+	+	+	+
D-葡萄糖产气	+	(+)	+	+	(+)
乳糖	-	-	-	-	-
H ₂ S (在三糖铁上)	+	+	+	-	d
脲酶 (Christensen's)	+	+	+	+	+
运动性	+	+	+	+	(+)
吲哚产生	-	+	-	-	-
柠檬酸盐	-	(-)	d	d	-
V-P	-	-	(-)	+	-
甲基红	+	+	+	+	+
明胶液化 (37℃)	+	+	+	+	d
硝酸盐还原	+	+	+	+	+

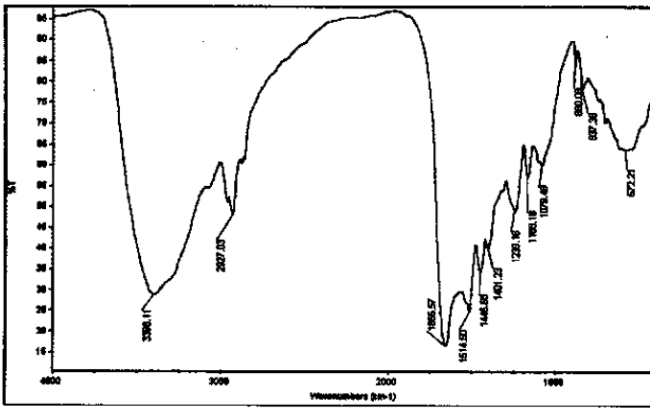


图4 T4菌所产黑色素红外光谱图

$$\text{波数 (cm}^{-1}\text{)} = \frac{10^4}{\text{波长 } (\mu\text{m})}, A = \log_{10} \frac{1}{T}$$

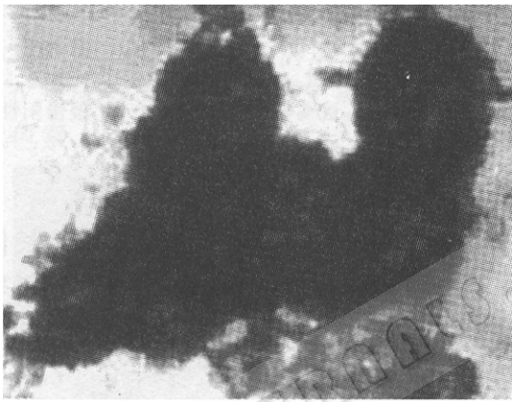


图5 T4菌所产黑色素透射电镜图 (48,000 ×)

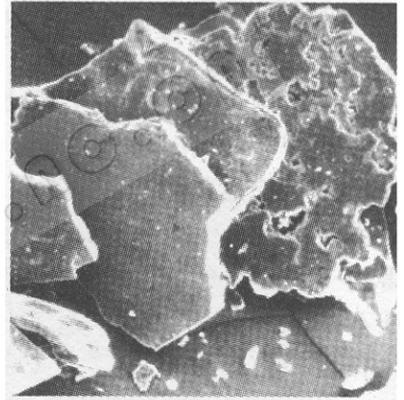


图6 T4菌所产黑色素扫描电镜图 (100 ×)

3 讨论

由于黑色素的难溶性、没有常规的生理生化、色谱、光谱手段能对之进行定性定量，加之不同来源的黑色素之间又存在明显的差异，所以对黑色素的研究存在一定难度。本实验通过筛选，获得了两株产黑色素较好的菌株。为研究不同来源黑色素的特性提供了实验菌株。并对T4菌株产生的黑色素作了初步研究，实验结果与已知黑色素共性相符合。

参考文献

[1] Alois A B, Michael H. Wheeler Ann Rev Phytopathol, 1986, 24: 411 ~ 451.
 [2] 彭方, 王伟, 彭珍荣. 氨基酸和生物资源, 1996, 18 (4): 1 ~ 4.
 [3] Harki E, Talou T R, Dargent. Food Chemistry, 1997, 58: 69 ~ 73.
 [4] 王戈林, 宁华, 沈萍, 等. 中国医药工业杂志, 1999, 30 (4): 150 ~ 154.
 [5] Vasyi M S, Swen M Y, Meng-Y H. Food Chemistry, 2001, 73: 177 ~ 184.
 [6] Agodi A, Stefani S, Corsaro C, et al. Res. Microbiol, 1996, 147: 167 ~ 174.
 [7] John G H, Noel R K, Peter H A. Sneath Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th ed. Williams & Wilkins, 1993.
 [8] Yulin W, Philip A, Arturo C. Infection and Immunity, 1996, 2420 ~ 2424.