

一株高产黑色素细菌的分离及鉴定*

倪丽娜**

(武汉大学生命科学学院 武汉 430072)

摘要:从武汉东湖中分离出一株高产胞外黑色素的细菌(BFHM2002)。BFHM2002具有产黑色素速度快,产量高且不需要酪氨酸诱导等优点;而且经酪氨酸诱导可显著提高BFHM2002胞外黑色素的产量,初步鉴定BFHM2002属坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)。鉴于BFHM2002的产黑色素特性,将成为芽孢杆菌属的一个新的菌种资源。

关键词:黑色素, 坚强芽孢杆菌, 菌种资源

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 01-0055-05

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF A HIGH-MELANIN-PRODUCING BACTERIUM

NI Li-Na OU Jian-Hong XIE Zhi-Xiong SHEN Ping

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract: A bacterium strain BFHM2002 is isolated from Lake Donghu, Wuhan. BFHM2002 has advantages that it can produce melanin with a high rate and high yield in the absence of tyrosine. Induced by tyrosine, melanin yield can be dramatically increased. BFHM2002 may be identified as a new strain in *Bacillus firmus*, for melanin-production.

Key words: Melanin, *Bacillus firmus*, Strain resource

黑色素(melanin)是一类由细菌、真菌及动植物产生的棕黑色色素,具有复杂结构、非均质的类多酚聚合物,能作为紫外线吸收剂、抗氧化剂和新型的天然药物载体;用来治疗某些与黑色素缺乏有关的神经系统疾病,如着色性干皮病、帕金森氏症、老年性痴呆症、亨廷氏舞蹈病等;具有体外抗HIV病毒的作用^[1-3]。黑色素广泛存在于人体皮肤、眼睛及其它组织中,是目前所知道的唯一保护皮肤免受辐射伤害的天然生物聚合物^[4-6]。因此,它在医疗、食品和化妆品工业中的应用潜力巨大。我们已从嗜麦芽假单胞菌(*Pseudomonas maltophilia*) P2分离到黑色素基因(*mel* gene),并分别在大肠杆菌和苏云金芽孢杆菌中成功地进行了克隆和表达^[7,8]。由于,黑色素的生产主要用提取法和氧化合成法,工艺繁琐。所以,我们还用构建的含*mel*基因的工程菌株*E. coli* WY8进行了发酵生产黑色素的研究,获得了很有价值的结果^[1]。为了获得更优良的产黑色素的微生物资源,我们从武汉东湖进行了大量的分离筛选工作。本文将对其中的BFHM2002进行产胞外黑色素特性方面的研究,并对其进行了初步鉴定。

1 材料与方法

1.1 样品来源

实验样品采集于武汉东湖。用取样器将东湖表层水直接注入预先备好的无菌玻璃

*湖北省重点自然科学基金资助项目(No.2001aba0006)

武汉市晨光计划资助项目(No.20015005051)

**联系人 E-mail: whubmg@whu.edu.cn, Tel: 027-87648533 (O)

收稿日期: 2002-11-11, 修回日期: 2003-05-01

锥瓶。

1.2 培养基

LB培养基: Tryptone 1g, Yeast extract 0.5g, NaCl 0.5g, 定容至 1L, pH 7.2~7.4。

L-Tyr培养基: Tryptone 1g, Yeast extract 0.5g, NaCl 0.5g, L-Tyr 0.10g, 定容至 1L, pH 7.0。

葡萄糖发酵培养基: Tryptone 0.5g, Glucose 0.5g, K_2HPO_4 0.2g, 定容至 1L, pH 7.0~7.2^[10]。

1.3 筛选与鉴定

将 10 倍稀释的水样 50 μ L 涂布 LB 平板, 室温培养 20h 左右, 观察是否在菌落周围呈现明显黑色。

1.4 不同菌株产黑色素速度能力的比较

在平板上比较嗜麦芽假单胞菌 (*Pseudomonas maltophilia*) P2、坚强芽孢杆菌的模式菌株 ATCC14575 (来自 CCTCC)、大肠杆菌 TG-1 及 BFHM2002 的产黑色素情况。

按 1% 接种量分别将活化后的 BFHM2002 及嗜麦芽假单胞菌 P2 培养物接种于 50mL 的 LB 培养基及 L-Tyr 培养基中, 28 $^{\circ}$ C 培养, 将发酵液离心, 测上清液 OD_{400} 值, 由于在一定范围内, OD_{400} 与溶液中黑色素含量成正比, 可用于比较两个菌株的产黑色素能力。

1.5 不同浓度酪氨酸对 BFHM2002 产黑色素的影响

按 1% 接种量分别将活化后的培养物接种于 5mL 不同酪氨酸浓度的 LB 培养基, 28 $^{\circ}$ C 培养 18h, 将发酵液离心, 测上清液 OD_{400} 值, 观察不同培养基中产黑色素的情况。

1.6 黑色素提取和鉴定

黑色素的提取: 按文献[8]进行。黑色素的鉴定: 用红外光谱仪进行特征红外光谱分析, 观察有无黑色素的特征吸收峰^[9]。

1.7 菌种鉴定

1.7.1 革兰氏染色及形态观察: 根据文献所述方法^[10], 对 BFHM2002 进行革兰氏染色, 鞭毛染色及穿刺培养, 过氧化氢反应。取对数生长前期培养物, 以生理盐水洗净培养基, 用透射电子显微镜 (H-8100) 观察细胞形态。

1.7.2 葡萄糖的早期抑制效应: 按 1% 接种量分别将活化后的培养物接种于 5mL 不同葡萄糖浓度的 LB 培养基, 观察葡萄糖对 BFHM2002 的早期抑制效应, 并测定各发酵液的 pH 值。

1.7.3 酸的抑制效应: 按 1% 接种量分别将活化后的培养物接种于 5mL 不同 pH 值的 LB 培养基中, 观察酸对 BFHM2002 的抑制效应^[10]。

1.7.4 糖发酵试验: 在葡萄糖发酵培养基中加入 0.04% 的溴甲酚紫做指示剂, 观察 BFHM2002 发酵产酸情况^[10]。

2 结果与分析

2.1 结果

2.1.1 产黑色素能力的比较: 在 LB 及 L-Tyr 培养基上, BFHM2002 在培养 36h 时即可观察到其菌落周围成明显黑色, 与产黑色素的嗜麦芽假单胞菌 P2 及坚强芽孢杆菌的模式菌株 ATCC14575 相比, 具有产黑色素速度快且无需酪氨酸诱导的优点 (图 1, 图 2)。用酪氨酸诱导可以显著提高 BFHM2002 产黑色素的产量 (图 3)。

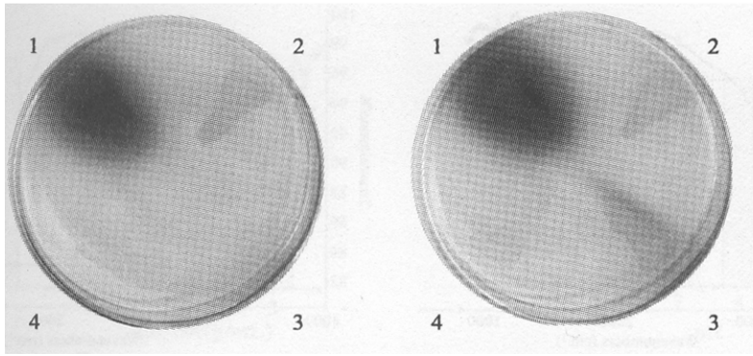


图1 不同菌株在 LB (左)、L-Tyr (右) 平板上的产黑色素能力 (培养 36h)
1 BFHM2002, 2 嗜麦芽假单胞菌 P2, 3 坚强芽孢杆菌的模式菌株, 4 大肠杆菌 TG-1

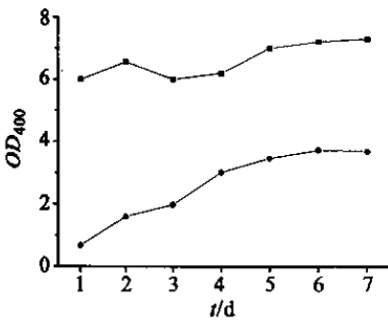


图2 BFHM2002 与嗜麦芽假单胞菌 P2 产黑色素比较

LB sample 代表 BFHM2002 在 LB 培养基中产黑色素曲线, L-Tyr PM 代表嗜麦芽假单胞菌 P2 在 L-Tyr 培养基中的产黑色素曲线

■ LB sample, ● L-Tyr PM

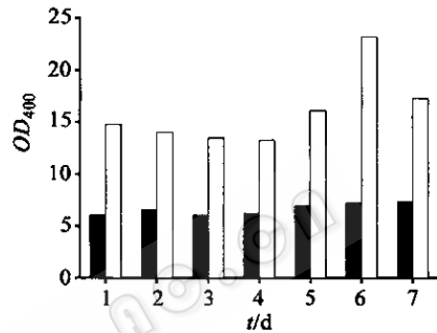


图3 不同培养基中 BFHM2002 的产黑色素比较

LB sample 和 L-Tyr sample 分别表 BFHM2002 在 LB 和 L-Tyr 培养基中的 OD₄₀₀ 值

■ LB Sample, □ L-Tyr sample

2.1.2 不同浓度酪氨酸对 BFHM2002 产黑色素的影响: 通过 OD₄₀₀ 比较不同浓度的酪氨酸对 BFHM2002 产黑色素的影响, 说明在其他条件相同的情况下, 黑色素的产量随酪氨酸浓度的提高而提高 (图 4a, b)。

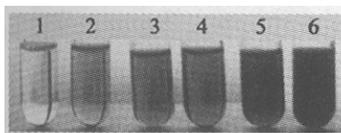


图4a 不同浓度的酪氨酸对 BFHM2002 的产黑色素影响 (18h)

1~6 分别 LB 培养基, 酪氨酸浓度为 0、0.025%、0.050%、0.075%、0.100%, L-Tyr 培养基

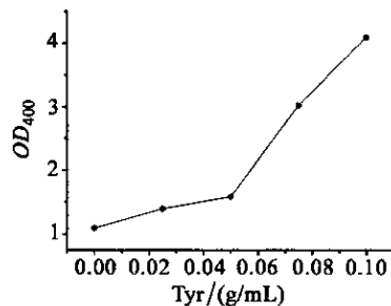


图4b 不同浓度的酪氨酸对 BFHM2002 的产黑色素影响 (18h)

2.1.3 黑色素的鉴定: 红外光谱分析表明, 3 个样品在 3,300 ~ 3,400cm⁻¹、1,625cm⁻¹ 附近有强吸收峰, 在 1,385cm⁻¹、1,500 ~ 1,600 cm⁻¹、1,700 ~ 1,980cm⁻¹ 附近有弱吸收峰; 2,900 cm⁻¹、2,300 cm⁻¹ 附近有中强吸收峰 (图 5)。

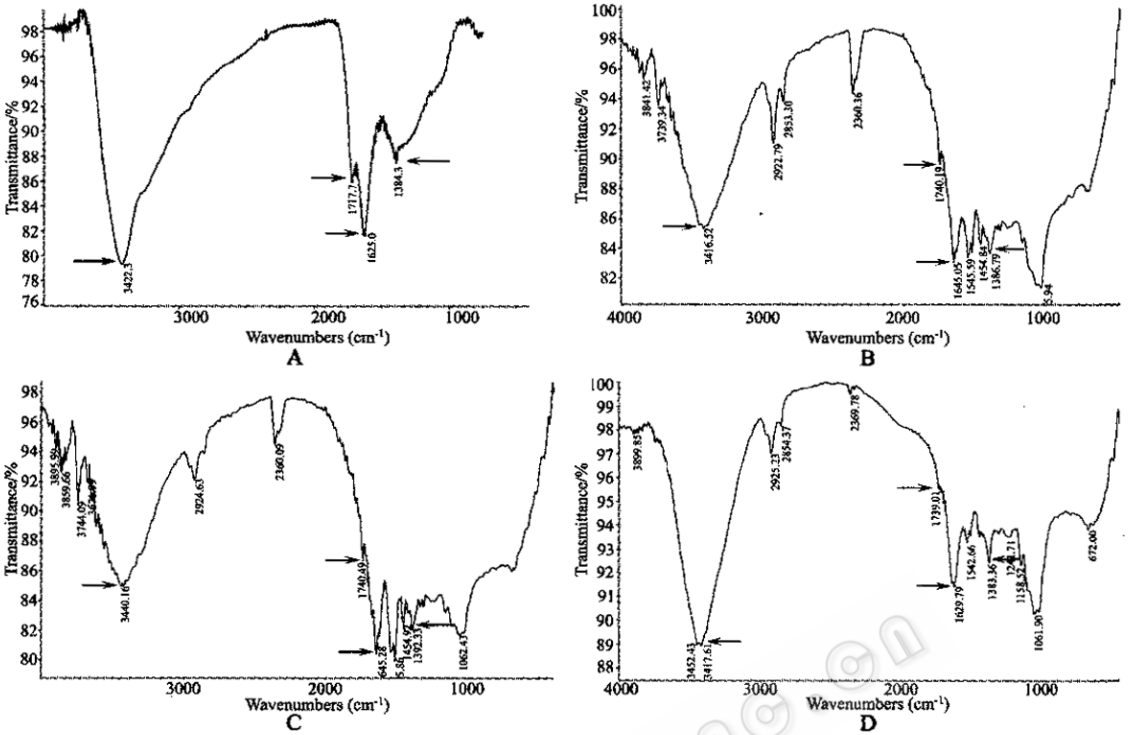


图5 黑色素红外光谱

箭头处为特征峰所在位置, A SIGMA 公司提供的标准黑色素样品, B 嗜麦芽假单胞菌 P2 在 L-Tyr 培养基中所产黑色素, C BFHM2002 在 LB 培养基中所产黑色素, D BFHM2002 在 L-Tyr 培养基中所产黑色素

2.1.4 菌种鉴定: BFHM2002 在 LB 平板上 28℃ 培养 3d, 菌落呈圆形、凸状、边缘整齐、不透明、产胞外黑色素。细胞革兰氏染色呈阳性, 不运动, 过氧化氢反应呈阳性, 形成中生芽孢, 杆状, 细胞大小为 (0.6~0.8) μm × (3~5) μm (图 6, 图 7)。

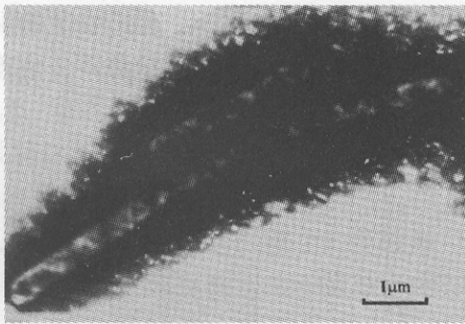


图6 菌体形态 (10,000 ×)

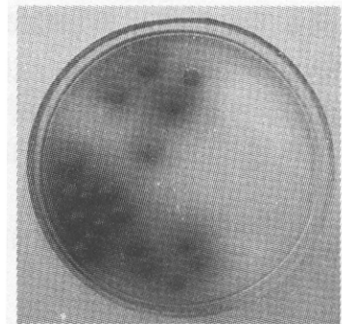


图7 菌落形态

通过不同浓度的葡萄糖对 BFHM2002 的抑制实验发现, 葡萄糖浓度大于 1g/mL 时, 对 BFHM2002 的早期生长有明显抑制 (图 8)。同时, 测定各发酵液的 pH 值, 在培养基中加入葡萄糖的发酵液的 pH 值均为 6, 而 LB 培养基中, 其发酵液的 pH 值为 8。用不同 pH 值的 LB 培养基测定 BFHM2002 对酸的敏感性 (图 9), BFHM2002 在 pH5 时, 生长受到明显抑制。在糖发酵试验中, 发酵液由紫色变为红色, 依据《伯杰氏系统细菌学鉴定手册》(第八版) 可初步鉴定 BFHM2002 为坚强芽孢杆菌。

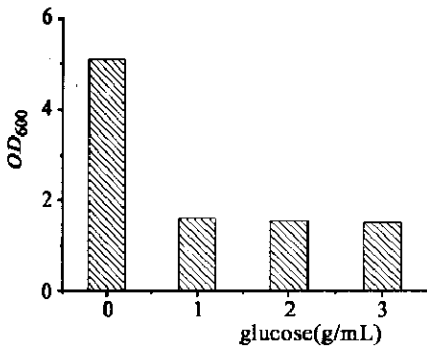


图8 葡萄糖对BFHM2002早期生长的抑制(24h)

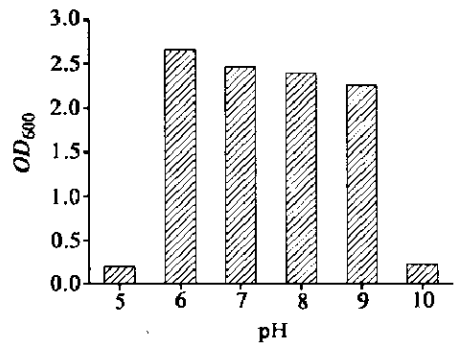


图9 酸对BFHM2002生长的抑制(24h)

2.2 讨论

2.2.1 BFHM2002产黑色素的特性: 本实验室已分离出具有较强产黑色素能力的嗜麦芽假单胞菌 P2; 通过比较, 此次从武汉东湖分离到的 BFHM2002 较嗜麦芽假单胞菌 P2 具有产黑色素产量高 (BFHM2002 在 LB 培养基上的黑色素产量是嗜麦芽假单胞菌 P2 在 L-Tyr 培养基上 2.5 倍), 速度快且不需要酪氨酸诱导的优点; 经酪氨酸诱导可以显著提高其胞外黑色素的产量 (BFHM2002 在 L-Tyr 培养基上的黑色素产量是在 LB 培养基上 2.4 倍), 且黑色素产量随酪氨酸浓度的提高而提高。

2.2.2 BFHM2002 所产黑色素的鉴定: 本文通过提取 BFHM2002 分泌到胞外的棕黑色素, 对其进行红外光谱分析, 并与文献^[9]记载的黑色素的吸收峰进行比较, 并结合其对酪氨酸诱导的有效性, 鉴定该色素为多巴黑色素。其中, 3,300~3,400 cm^{-1} 吸收峰为吡啉的 NH 伸缩振动峰; 1,625 cm^{-1} 附近强吸收峰, 1,500~1,600 cm^{-1} 处弱吸收峰及 675 cm^{-1} 附近的相关峰为苯环骨架振动吸收峰, 1,700~1,980 cm^{-1} 的弱吸收峰代表芳香泛频; 在 1,385 cm^{-1} 附近有烷烃结构的变形吸收峰。以上特征峰与 SIGMA 公司提供的标准黑色素的特征峰一致。

2.2.3 结论: 本次实验根据《伯杰氏系统细菌学鉴定手册》(第八版)对 BFHM2002 进行初步鉴定, 认为我们所分离的 BFHM2002 是一种坚强芽孢杆菌。由于 BFHM2002 具有产黑色素速度快, 产量高, 不需酪氨酸诱导的优点, 用于生产将可以显著缩短生产时间、降低成本, 因此, BRHM2002 将成为芽孢杆菌属的一个新的菌种资源。

致谢 该论文在沈萍教授, 谢志雄副教授指导下完成, 特致谢。

参考文献

- [1] 王戈林, 宁华, 沈萍, 等. 中国医药工业杂志, 1999, 4: 150~154.
- [2] Knoke R, Schniz E, Feuerstein T. J Journal of Chromatography B, 1998, 714: 171~179.
- [3] Riley P A, Melanin I. J Biochem Cell Biol, 1997, 29 (11): 1235~1239.
- [4] 宁华. 华中师范大学学报, 2001, 3: 85~88.
- [5] Reszka K J, Matuszak Z, Chignell C F. Free Radical Biology & Medicine, 1998, 2: 208~216.
- [6] Castro S, Carrera I, Martinez-Drets G. Journal of Microbiological Methods 41, 2000, 173~177.
- [7] Ruan L, Huang Y, Shen P, et al. Letters in Applied Microbiology, 2002, 34: 244~248.
- [8] Wang G L, Shen P. FEMS Microbial, Lett, 2000, 185: 23~27.
- [9] 王岩, 刘学惠, 陆懋荪, 等. 分析试验室, 1996, 6: 63~65.
- [10] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社, 1999.