

一株产黑色素芽孢杆菌的分离与鉴定

张丽香¹, 刘 强², 孙忠伟¹, 王 斐¹, 刘海燕¹, 牛天贵¹

(1 中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 2 天津师范大学 化学与生命科学学院, 天津 300387)

摘要:从人的头发样品中筛选出1株产黑色素芽孢杆菌 ZH168. 对该菌株形态、生理生化特征、16S rDNA 基因序列及全细胞蛋白电泳研究结果表明, ZH168 菌株为枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*. 该菌产生的胞外黑色素在可见-紫外光区均有吸收, 紫外区光吸收强, 随着波长的减小, 吸收增强, 在 210 nm 左右有 1 个吸收高峰; 红外光谱与合成的多巴黑色素很相近, 具有黑色素吲哚结构的吸收峰. 电子自旋共振谱是轻微不对称的典型单线一次微商波谱. 综合以上结果确定该菌所产生的色素为黑色素.

关键词:芽孢杆菌; 黑色素; 分离; 鉴定

中图分类号: Q939

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2010)02-0063-05

Isolation and Identification of a *Bacillus* sp. Producing Melanin

ZHANG Li-xiang¹, LIU Qiang², SUN Zhong-wei¹, WANG Fei¹, LIU Hai-yan¹, NIU Tian-gui¹

(1 College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2 College of Chemistry and Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China)

Abstract: A *Bacillus* strain ZH168 isolated from human hair can produce extracellular dark pigment. Based on the colony morphology, physiological and biochemical properties, 16S rDNA gene sequence analysis and whole-cell protein electrophoresis, strain ZH168 was identified as *Bacillus subtilis*. The pigment produced by strain ZH168 has a distinct absorption in UV light, and as the wavelength decreased, the absorption increased. It has an absorption peak at approximately 210 nm. The pigment exhibited a similar infrared absorption spectrum to synthetic melanin and contained indole structure. The electromagnetic spin resonance spectrum of the pigment was a slightly asymmetric singlet without hyperfine structure. These characteristics suggest that the pigment is melanin.

Key words: *Bacillus* sp.; melanin; isolation; identification

黑色素 (Melanin) 是一种在细菌、真菌、动植物中均有分布的天然色素. 它是一种非均质的类多酚聚合物, 结构复杂, 至今尚未全部研究清楚. 微生物所产黑色素主要分为胞内 (壁结合) 和胞外 2 种. 黑色素的应用前景广阔, 可用于研发防晒霜、染发剂、太阳伞、抗紫外眼镜、生物杀虫剂的保护剂等. 由于其具有抗氧化的功能, 可作为开发新型的酒类、饮料和保健品的添加剂等. 可溶性黑色素还具有抗艾滋病病毒, 抑制其复制的功能, 因此科学家认为其可能

成为一种新的有效药物和作为新型的天然药物载体^[14].

目前国内外研究发现, 产黑色素的微生物种类很多, 在芽孢杆菌类中对苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* 研究较深入^[5-7], 也有坚强芽孢杆菌 *B. firmus* 的报道^[8], 本研究报道了分离自人毛发样品的 1 株产黑色素芽孢杆菌 ZH168, 旨在获得更多的产黑色素的菌种资源, 筛选出高产黑色素的芽孢杆菌.

收稿日期: 2009-04-13

作者简介: 张丽香 (1976—), 女, 讲师, 博士研究生; 通信作者: 牛天贵 (1949—), 男, 教授, E-mail: niutianguai@163.com

基金项目: “863” 计划项目 (2006AA10Z421); 国家公益性行业 (农业) 科研经费专项 (200803033-B0402)

1 材料与方 法

1.1 材 料

头发样品:从北京理发店收集头发样品,按个人分别保存.对照菌种:枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* (ATCC6633)、萎缩芽孢杆菌 *B. atrophaeus* (ATCC9372)购自中国普通微生物菌种保藏管理中心;蜡样芽孢杆菌 *B. cereus* 为中国农业大学食品微生物实验室保存菌株.

培养基:①种子培养基:肉汤培养基.②初筛固体培养基:肉汤培养基和添加 Tyr($w=0.5\%$)的肉汤培养基.③复筛发酵黑色素培养基:Fd 培养基^[9], L-Tyr($w=0.5\%$)灭菌间隙法加入.

主要试剂和仪器:L-Tyr、L-Dopa(Sigma 公司),DNAout 革兰阳性菌试剂盒、凝胶回收试剂盒(Qiagen 公司),其他试剂均为国产分析纯;JCM-1230 电子显微镜(日本 JEOL 公司),电子自旋顺磁共振(EPR)波谱仪(ER-200D,德国 Bruker 公司),PTC100 型 PCR 仪(PerkinElmer 公司),3730XL 型 DNA 测序仪(ABI 公司),NEXUS-470 型傅立叶红外分光光度计(Nicolet 公司),TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司).

1.2 方 法

产黑色素芽孢杆菌的筛选:1份头发样品(约1g)加入到9mL肉汤培养基中,充分振荡,80℃水浴15min,取出放入37℃全温振荡器中150r/min培养20~24h,用无菌水梯度稀释后,吸取0.1mL涂肉汤培养基平板,37℃培养72h,选取颜色变黑菌落划线纯化,保存于肉汤斜面.再对初筛产黑的菌株在Fd培养基液体发酵进行复筛.

细胞形态特征:观察固体培养基上菌落形态,对菌体做光学显微镜和透射电子显微镜观察.

生理生化特征测定参照文献[10]进行.

16S rDNA 序列测定:方法参见文献[11].测序结果提交 GenBank,在 NCBI 使用 blastn 比对初步确定种.

全细胞蛋白电泳:ZH168 在 37℃、150 r/min 条件下,液体肉汤培养基发酵 24 h. 9 000 r/min 离心 15 min 得菌体,无菌水清洗 2 次,用 pH 7.0 的磷酸缓冲液溶解,超声波处理,功率 400 W,工作 3 s,间隔 4 s,工作 200 次,9 000 r/min 离心 15 min,上清液即为全细胞蛋白样品. SDS-PAGE 采用 10% 的分离胶,5% 的浓缩胶,电压 80 V,其他参见文献[12].

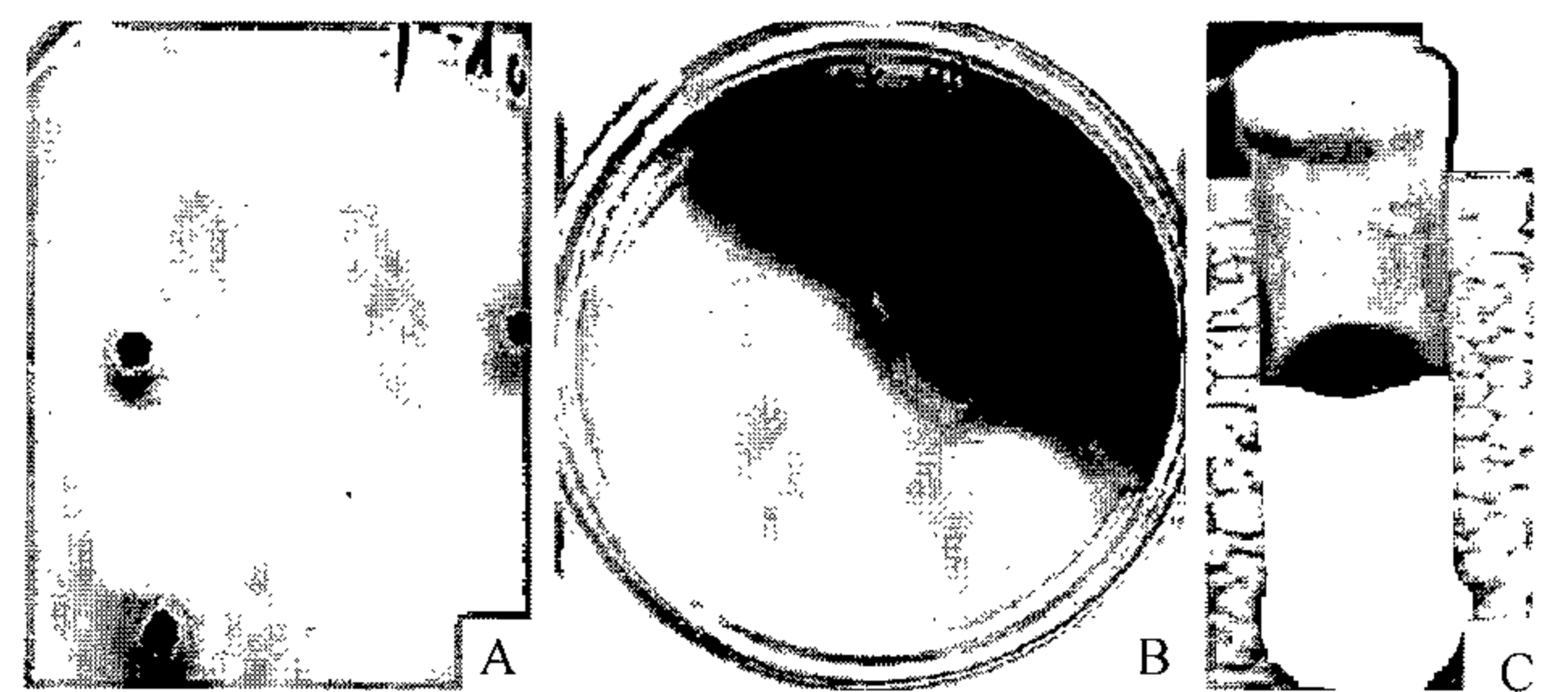
黑色素样品制备:发酵黑色素方法参见文献[13].发酵上清,9 000 r/min,离心 15 min 除菌,黑色上清液直接冷冻干燥,得黑色素粉末.

黑色素的特性:①离心发酵液后取上清,稀释适当倍数,进行 190~700 nm 紫外-可见吸收光谱的连续扫描;②黑色素粉末与 KBr 研磨压片,做红外光谱(IR)测定,谱域 400~4000 cm^{-1} ;③取黑色素粉末 0.1 mg,电子顺磁共振波谱仪测定,检测条件为:扫宽 400.0 Gs、中心磁场 3385.0 Gs、调制幅度 3.2 Gs、放大倍数 4×10^4 、微波功率 20.0 mW、温度 298 K.

2 结果与分析

2.1 ZH168 菌株分离及其产黑色素条件

从头发样品中分离 1 株芽孢杆菌 ZH168,在固体肉汤平板上培养 24 h 后,即有胞外黑色素产生(图 1A),在添加了 L-Tyr 的肉汤平板上,黑色素产量增加(图 1B).添加与未添加 Tyr 的液体肉汤培养基发酵都不产生黑色素,Fd 发酵培养基中产生可溶性的黑色素(图 1C).



A ZH168 单菌落;B ZH168 菌苔;C 菌株 ZH168 黑色发酵液.

图 1 菌株 ZH168 的黑色发酵液及菌落形态

Fig. 1 Melanin and the colony morphology of the ZH168 strain

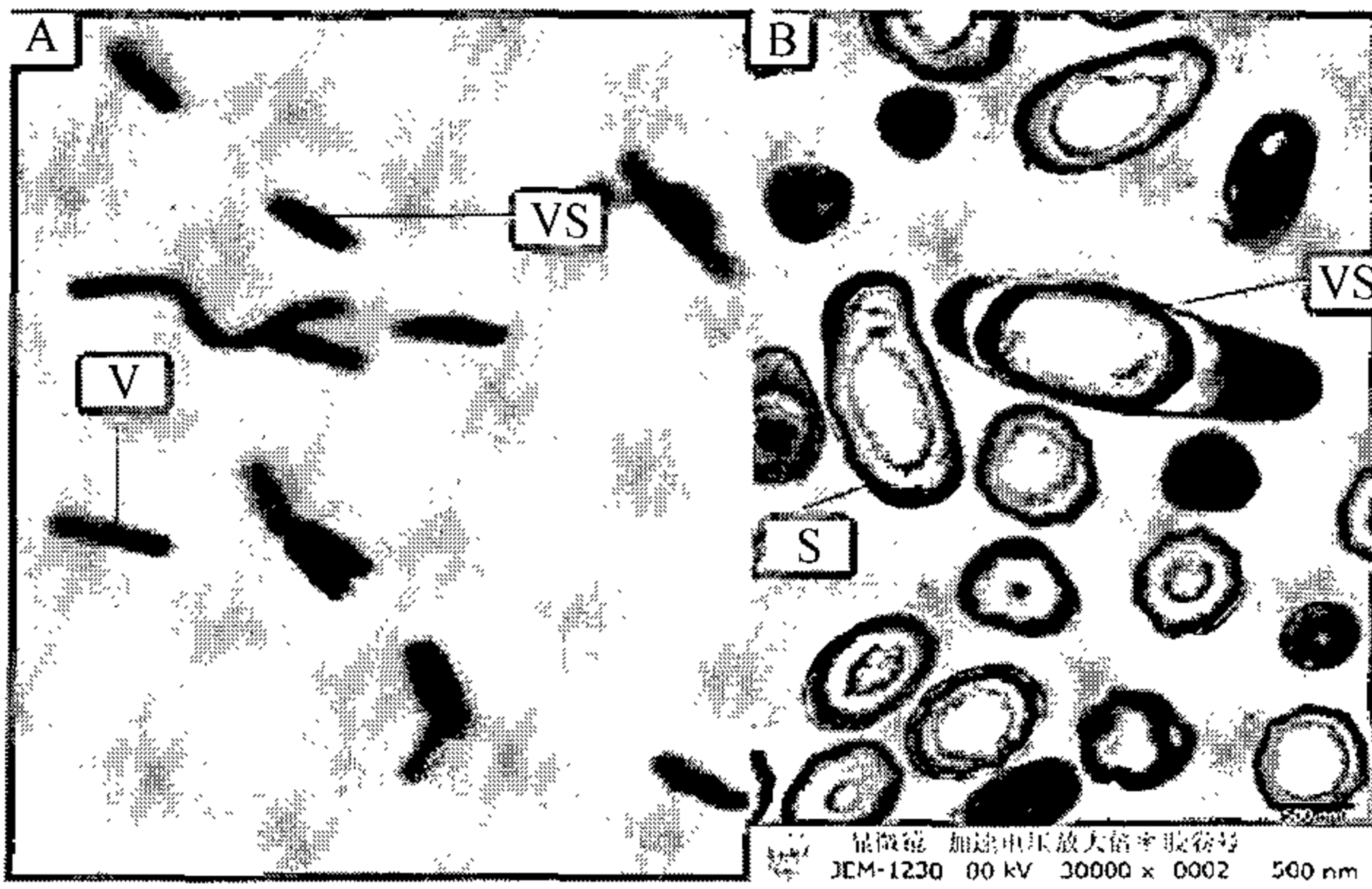
2.2 ZH168 菌株的菌落与细胞形态特征

ZH168 菌株的菌落形态如图 1A 所示,在细菌肉汤培养基平板上菌落干燥,表面有褶皱,边缘较整齐,菌落初期乳白色,不透明,随着培养时间延长,有黑色素产生,菌落呈棕黑色,单菌落直径 1.5~3.0 mm(37℃,48 h).

菌体革兰染色阳性(图 2A).菌体直杆状,直杆两端圆头,营养细胞大小一般在 $(1.9 \sim 2.5) \mu\text{m} \times (0.6 \sim 0.75) \mu\text{m}$,单个存在或是三四个成链.菌体产芽孢,芽孢中生或偏端生,椭圆形,略膨大,芽孢体大小为 $(0.9 \sim 1.4) \mu\text{m} \times (0.6 \sim 0.8) \mu\text{m}$.菌体内部结构如图 2B 所示,芽孢形成时有黑色素的积聚.

2.3 ZH168 菌株的生理生化特征

以枯草芽孢杆菌 ATCC6633 为参比菌株,对 ZH168 菌株进行了部分生理生化特征测定. ZH168 菌株为专性好氧菌,能在 10~55℃,pH 5.5~10.0 条件下生长,耐受质量分数为 10% 的 NaCl,具有氧化酶和过氧化氢酶活力,详细结果见表 1.经比照文献[14-15]发现,ZH168 和枯草芽孢杆菌的相似度最高,生化特性基本一致.



V:营养体细胞;S:芽孢体;VS:内生芽孢.

A: 油镜观察拍摄(10×100);B: 电镜照片(标尺为500 nm).

图2 ZH168菌体的光学显微镜和透射电镜照片

Fig. 2 Micrograph of vegetative and sporulating cells of the ZH168 strain using phase-contrast light microscope and transmission electron microscope

表1 ZH168菌株生理生化试验结果¹⁾

Tab. 1 Results of physiological and biochemistry experiments of the ZH168

试验项目	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus subtilis</i>
	ZH168	ATCC6633
葡萄糖发酵	+	+
麦芽糖发酵	+	+
棉子糖发酵	+	+
木糖发酵	-	-
乳糖发酵	-	-
甘露醇发酵	+	+
阿拉伯糖发酵	+	+
w(NaCl) = 2%	+	+
w(NaCl) = 5%	+	+
w(NaCl) = 7%	+	+
w(NaCl) = 10%	+	-
葡萄糖产气	-	-
厌氧生长	-	-
淀粉水解	+	+
硝酸盐还原	+	+
H ₂ O ₂ 酶试验	+	+
卵磷脂酶	-	-
柠檬酸盐试验	+	+
石蕊牛奶还原	+	+
V-P测定	+	+
明胶液化试验	+	+

1)“+”为反应阳性,“-”为反应阴性.

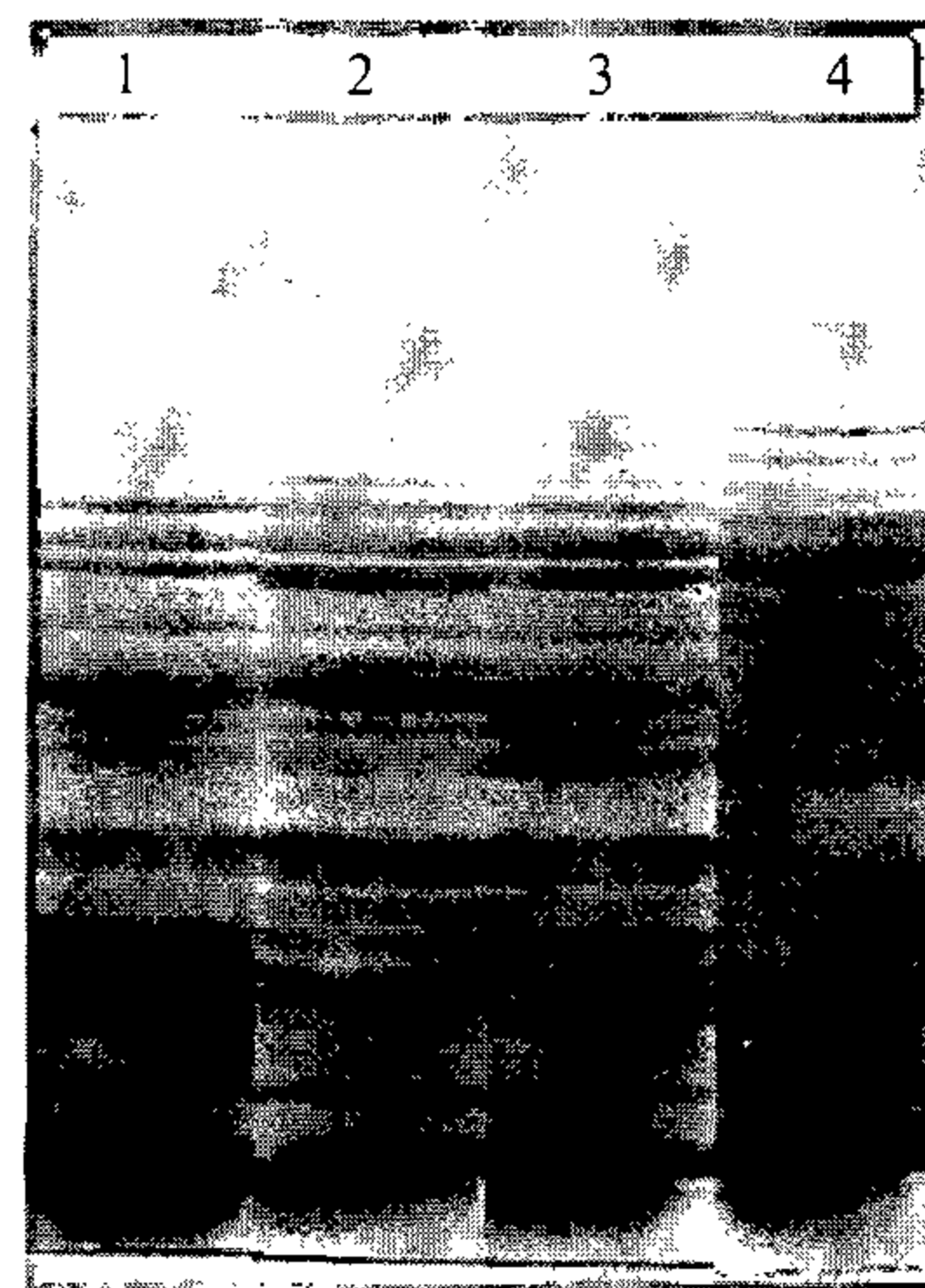
2.4 ZH168菌株的16S rDNA序列分析

ZH168菌株的16S rDNA序列测定后,得到了1466个碱基组成的核苷酸序列,提交至GenBank数

据库后的Accession number为FJ851424.据GenBank中提供的基因序列进行blastn,ZH168菌株与枯草芽孢杆菌相似度达99%.但因在枯草芽孢杆菌菌群(*B. amyloliquefaciens*、*B. vallismortis*、*B. mojavensis*、*B. atrophaeus*等)中16S rDNA序列相似度均很高,所以确定其属于枯草芽孢杆菌菌群.

2.5 ZH168菌株的全细胞蛋白SDS-PAGE

图3为菌株ZH168与不同种芽孢杆菌的全细胞蛋白SDS-PAGE,通过全细胞蛋白条带比较发现,菌株ZH168与枯草芽孢杆菌的蛋白谱带基本相同,与萎缩芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌有较明显的区别,据此认为ZH168是枯草芽孢杆菌.



1:萎缩芽孢杆菌 *B. atrophaeus* ATCC9372;2:枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* ATCC6633;3:*Bacillus* sp. ZH168;4:蜡样芽孢杆菌 *B. cereus*.

图3 菌株ZH168与芽孢杆菌属不同种菌株的全细胞蛋白SDS-PAGE

Fig. 3 Whole-cell protein SDS-PAGE of ZH168 and related strains of the *Bacillus*

2.6 ZH168菌株产生的黑色素特性

图4的UV-VIS光谱显示,ZH168菌株产生的黑色素在可见区仅有弱吸收,在紫外光区吸收明显加强,在210 nm左右处有个吸收峰,与报道的Sigma公司合成黑色素的标准品紫外吸收峰一致^[16].

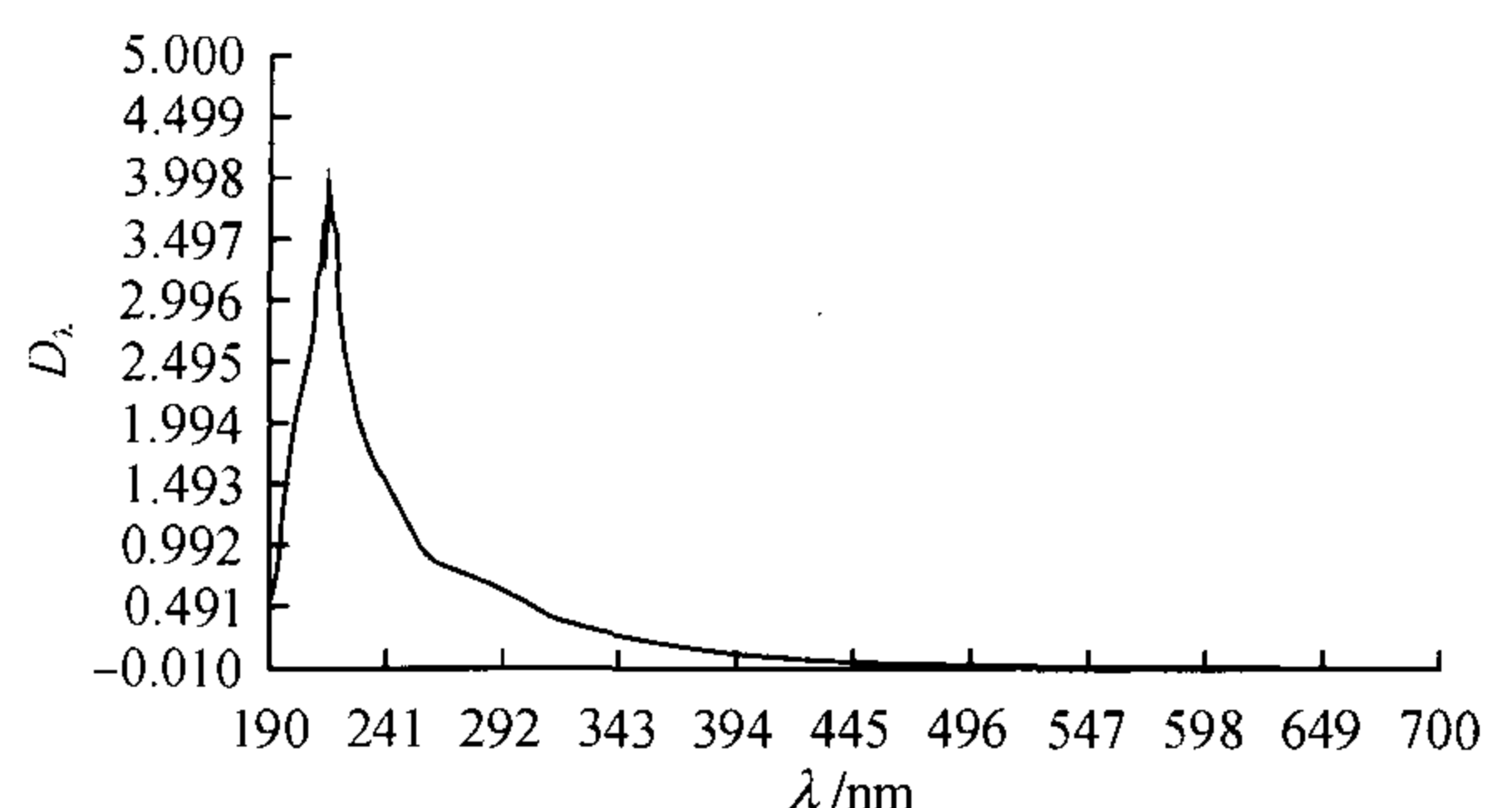
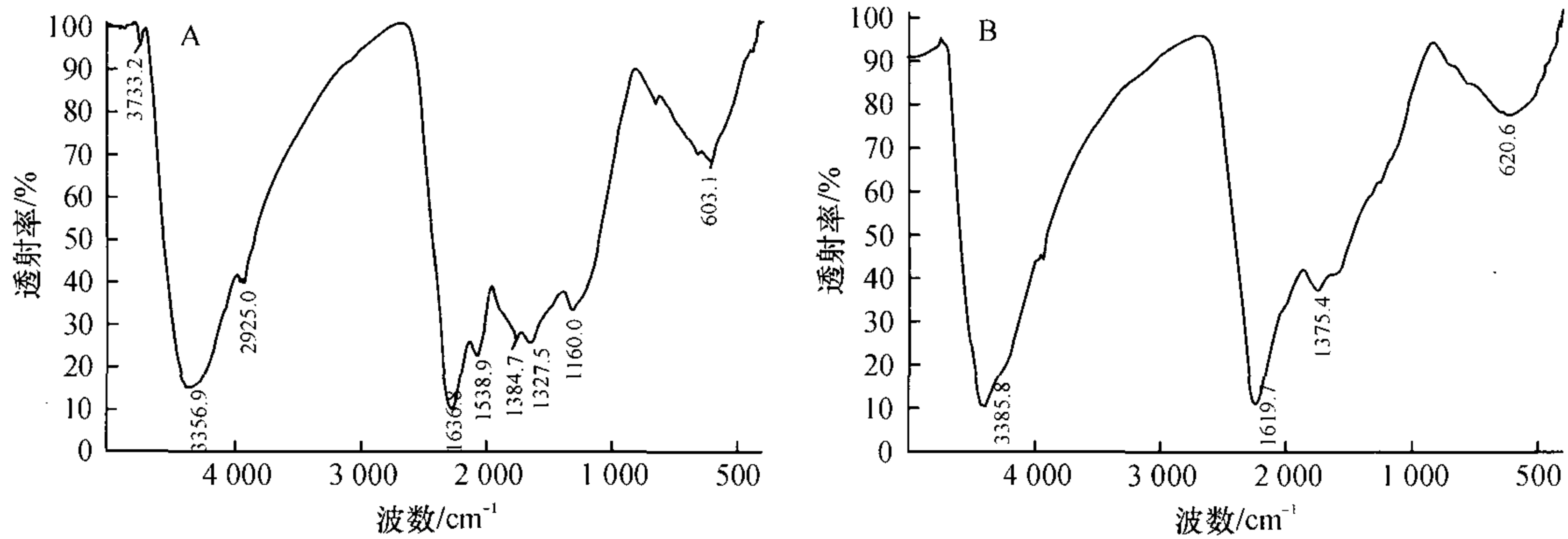


图4 ZH168菌株产生黑色素的紫外可见光谱扫描

Fig. 4 UV-VIS spectra of melanin of the ZH168 strain

图5为ZH168菌株产生的黑色素和合成多巴黑色素的红外吸收光谱,二者有很大的相似性. 3400 cm^{-1} 附近较强的共振吸收峰,为—OH和—NH基团伸缩振动,1620~1650 cm^{-1} 为C=C和COO—伸

缩振动,1400 cm^{-1} 附近的C—O—H振动吸收峰^[15-16],具有吡啶环结构吸收峰. 在较低指纹区,ZH168产生的黑色素有较多的峰,是由于本研究的黑色素样品只是粗提纯物所致.



A ZH168产生的黑色素;B 合成的多巴黑色素.

图5 黑色素的红外吸收光谱

Fig. 5 IR spectra of microbial

图6显示,菌株ZH168产生的黑色素电子自旋顺磁共振波谱(EPR)是轻微不对称的典型单线一次微商波谱,表明其具有未成对电子,与随机标准品(Strong pitch)比对后,计算出该黑色素电子自旋浓度约为 3.92×10^{17} spins/g,与报道的乌骨鸡黑色素处在同一个数量级^[17-19].

酚、对甲苯二胺和邻甲苯二胺等,由于其潜在的致癌、致畸、致突变特性,对人们的健康也造成了一定的威胁^[21-22]. 因此,无毒、无害、无污染的天然染发剂的开发,逐渐成为一种热点和研究方向. 而从毛发中分离到的产黑色素菌株有望应用于生产天然染发剂或开发活体生物染发技术,而且我们已做了离体染发的初步研究.

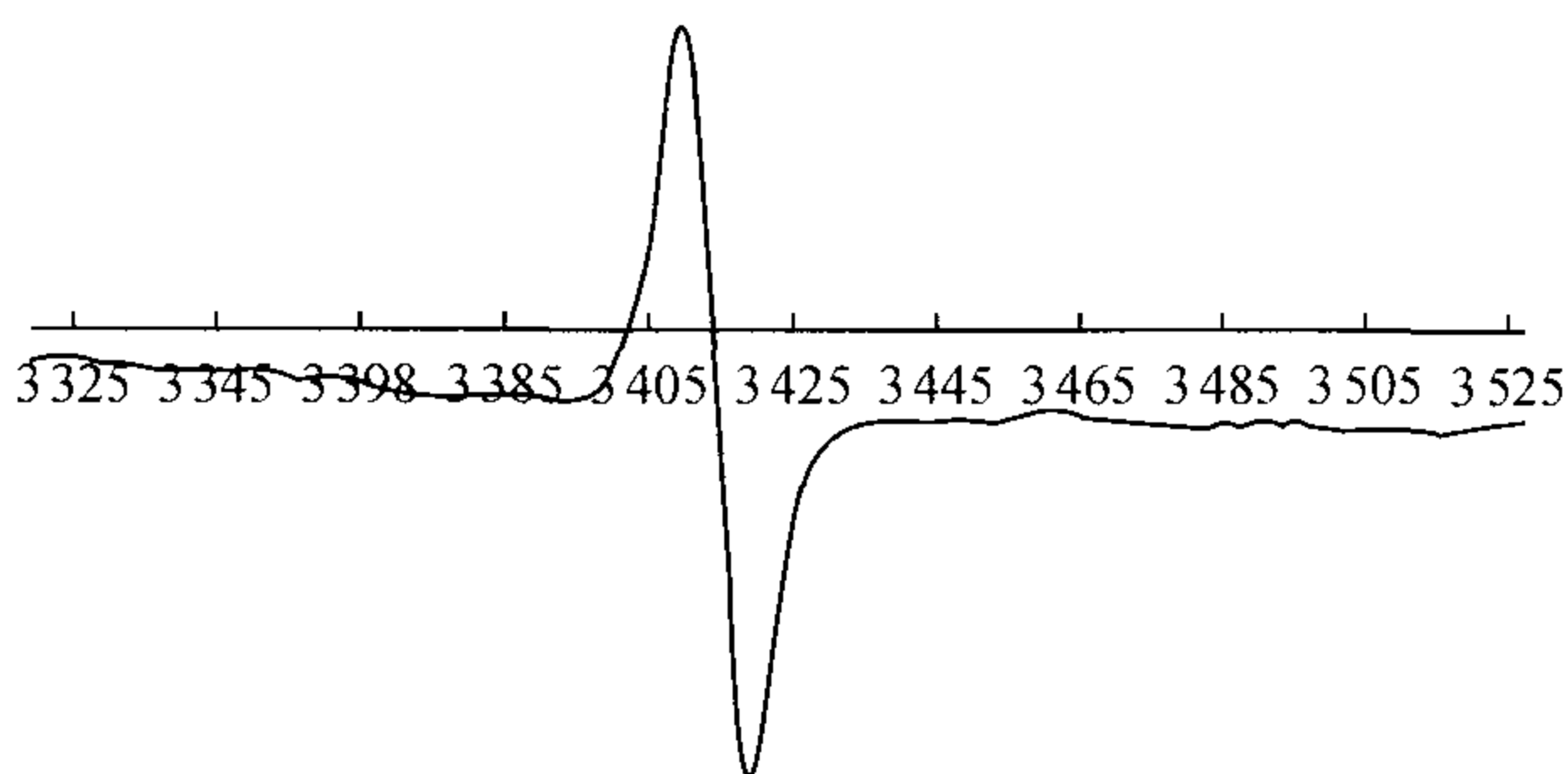


图6 ZH168产生黑色素的电子自旋顺磁共振波谱

Fig. 6 Electron paramagnetic resonance(EPR) spectra of melanin of the ZH168 strain

3 讨论与结论

从人的毛发上分离到1株产黑色素细菌ZH168,通过表型及生理生化性质、16S rDNA序列测定比对以及全细胞蛋白电泳3种方法,鉴定并命名该菌株为枯草芽胞杆菌 *B. subtilis* ZH168,可见紫外光谱、红外光谱和电子自旋共振波谱均显示该菌所产色素为黑色素特性.

永久性染发剂是一种重要的化妆品,满足了人们对健康外在形象的追求. 然而,市售永久性染发剂的主要生色成分对苯二胺、对氨基苯酚、邻氨基苯

ZH168菌株在液体肉汤培养基发酵不产生黑色素,在Fd液体培养基能产生黑色素. 由于其他培养条件相同,区别在于2种培养基的营养成分,前者营养丰富,后者营养匮乏,因此,推测该菌是在营养胁迫下,生长后期才合成黑色素. 该菌在固体肉汤平板上生长,24 h以后即能产生黑色素,可能是由于固体静止培养营养分布不均匀或通气量等条件胁迫导致形成黑色素.

蛋白质是基因表达的产物,亲缘关系近的细菌在蛋白质组成上会有一些的相似性,标准条件下培养的蛋白质组分可以通过电泳技术区分开来. 全细胞蛋白电泳技术主要用于种以下水平鉴定,同种的不同菌株的电泳图谱相似性较高,如果2个菌株的电泳图谱差异较大,则可断定不是同种. 全细胞蛋白电泳技术方法简单,重复性好,可以建立用作菌株鉴定的数据库,分析的结果与数值分类、DNA-DNA杂交等也具有较好的一致性^[23],本研究中采用了全细胞蛋白方法,进一步确定了菌株ZH168的分类地位.

多相分类由Colwell于1970年提出,指利用微生物多种不同的信息,包括表型的、基因型的和系统

发育的信息,综合起来研究微生物分类和系统进化的过程.多相分类几乎包括了现代分类学中的所有方面,如传统分类、化学分类、分子分类、数值分类等,被认为是目前研究各级分类单位的最有效手段,可用于所有水平上的分类单位的描述和定义^[23].多相分类方法的运用,纠正了部分菌类通过传统鉴定方法确定的分类地位,如 ATCC9372 曾被错误鉴定,命名为枯草芽孢杆菌黑色变种 *B. subtilis* var. *niger*,但现已被重新鉴定为萎缩芽孢杆菌 *B. atrophaeus*^[24].近年来对枯草芽孢杆菌产黑菌株鉴定及其产黑色素的性质研究鲜见报道.

物质的红外光谱,是其分子结构的反映,谱图中吸收峰,与分子中各基团的振动转动形式相对应分析各样品的 IR 谱,可以帮助我们了解关于其官能团类型的信息,不同来源的黑色素的 IR 光谱,一定的共振区内有相近的吸收峰.由于菌株 ZH168 发酵产生黑色素是以酪氨酸为底物,而且具有吡啶结构吸收峰,故推测该菌所产胞外色素为真黑色素(Eumelanin).

参考文献:

- [1] BRENNER M, HEARING V J. The protective role of melanin against UV damage in human skin[J]. *Photochemistry and Photobiology*, 2008, 84: 539-549.
- [2] DALFARD A B, KHAJEH K, SOUDI M R, et al. Isolation and biochemical characterization of laccase and tyrosinase activities in a novel melanogenic soil bacterium[J]. *Enzyme and Microbial Technol*, 2006, 39: 1409-1416.
- [3] 李晓燕, 刘志洪, 王鹏, 等. 工程菌产黑色素的抗氧化作用的研究[J]. *武汉大学学报*, 2003, 49(6): 693-696.
- [4] MANNING J T, BUNDREDB P E, HENZIC P. Melanin and HIV in sub-Saharan Africa[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 2003, 223: 131-133.
- [5] AGHAJANYAN A E, HAMBARDZUMYAN A A, HOVSEPYAN A S, et al. Isolation, purification and physicochemical characterization of water-soluble *Bacillus thuringiensis* melanin[J]. *Pigment Cell Res*, 2005, 18(2): 130-135.
- [6] LIU N, ZHANG T, WANG Y J, et al. A heat inducible tyrosinase with distinct properties from *Bacillus thuringiensis*[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2004, 39(5): 407-412.
- [7] RUAN Li-fang, YU Zi-niu, FANG Bin, et al. Melanin pigment formation and increased UV resistance in *Bacillus thuringiensis* following high temperature induction[J]. *System Appl Microbiol*, 2004, 27: 286-289.
- [8] 倪丽娜. 一株高产黑色素细菌的分离及鉴定[J]. *微生物学通报*, 2004, 31(1): 55-59.
- [9] 彭方, 王伟, 彭珍荣. 高产黑色素微生物资源的研究[J]. *氨基酸和生物资源*, 1996, 18(4): 150-154.
- [10] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 349-412.
- [11] 惠明, 马晓娜, 贾洁, 等. 一株产聚谷氨酸芽孢杆菌的分离与鉴定[J]. *中国农业大学学报*, 2005, 10(1): 45-49.
- [12] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 77-122.
- [13] 王斐, 李俊霞, 张丽香, 等. 产黑色素菌株发酵条件的研究[J]. *食品科技*, 2008, 05: 19-22.
- [14] 中国科学院微生物研究所. 伯杰细菌分类鉴定手册[M]. 9版. 北京: 科学出版社, 1994.
- [15] PRIEST F G, GOODFELLOW M, TODD C. A numerical classification of the genus *Bacillus*[J]. *J Gen Microbiol*, 1988, 134: 1847-1882.
- [16] 万霞, 耿晶, 陈向东, 等. 5株细菌产L-多巴黑色素的比较研究[J]. *武汉大学学报: 理学版*, 2005, 51(4): 472-476.
- [17] 李民赞. 光谱分析技术及其应用[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 49-58.
- [18] 王岩, 刘学惠, 陆懋荪, 等. 几种天然黑色素分子结构的红外光谱表征研究[J]. *分析实验室*, 1996, 15(6): 63-65.
- [19] 刘望夷, 蔡菊娥, 沈枝安. 乌骨鸡黑色素的元素组成与自由基状态初探[J]. *分子科学与化学研究*, 1982, 9: 95-100.
- [20] 林亮全, 陈维泰. 国产乌骨鸡黑色素萃取物的物理化学特性[J]. *台湾农业化学与食品科学*, 2004, 42(5): 335-342.
- [21] 熊习昆, 梁雪梅, 蔡文, 等. 频繁使用染发剂对小鼠染色体畸变率影响的研究[J]. *动物学研究*, 1999, 20(5): 327-331.
- [22] 浦跃朴, 尹立红, 吕冬梅, 等. 氧化型染发剂的遗传毒性与皮肤毒性作用研究[J]. *卫生毒理学杂志*, 1999, 11(6): 333.
- [23] NAKAMURA L K. Taxonomic relationship of black-pigmented *Bacillus subtilis* strains and a proposal for *Bacillus atrophaeus* sp. nov[J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1989, 39(3): 295-300.
- [24] 刘志恒. 现代微生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 38-70.

【责任编辑 李晓卉】