

一株产紫色素放线菌的鉴定及其色素特性研究*

王丽 雷娟 向文良 蒋思远 孙建瑞 杨志荣**

(四川大学生命科学学院 成都 610064)

摘要 从河南碱性土壤样品中筛选到一株命名为LK-178的放线菌菌株,在高氏合成培养基上其气生菌丝灰白,产可溶性紫色素.镜检观察孢子链长直、孢子圆柱形,通过形态、生理生化特征初步确定为链霉菌.16S rRNA序列分析显示,该菌基因序列与比基尼链霉菌(*Streptomyces bikiniensis*) AB208713基因序列有99.0%的最高相似性.用Neighbor-joining (NJ)等构建系统发育树,并用Bootstrapping法对其评价,将菌株LK-178归属于比基尼链霉菌(*S. bikiniensis*).抑菌试验表明,该菌具有抗革兰氏阳性、革兰氏阴性细菌和真菌活性.用紫外可见分光光度计和化学分析确定该色素性质稳定,产量较高,总色价相对单位较高,达到147 U/mL,产量达到13.4 g/L.图3 表3 参18

关键词 比基尼链霉菌;鉴定;色价;16S rRNA;紫色素

CLC Q939.9

Identification and Characterization of Purple Pigment-producing Actinomycete Strain*

WANG Li, LEI Juan, XIANG Wenliang, JIANG Siyuan, SUN Jianrui & YANG Zhirong**

(College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract An actinomycete, named strain LK-178, was isolated from an alkaline soil sample in Henan, China. It produced grayish-white aerial mycelium and purple diffusible pigment on Gause's synthetic agar. Microscopic observation revealed that it produced straight chain of cylindrical spores. It was primarily identified as genus *Streptomyces* according to its morphological, physiological and biochemical characteristics. The 16S rRNA gene sequence of strain LK-178 shared the highest similarity (99.0%) with that of *S. bikiniensis* AB208713. The phylogenetic tree of strain LK-178 was derived with NJ and analyzed with bootstrapping. The result demonstrated that it belonged to *S. bikiniensis*. The test on antimicrobial activities showed that it had ability against the Gram-positive, Gram-negative bacteria and fungi. The UV-VIS spectrometry and chemical analysis revealed that the pigment produced by this strain was stable, total relative color value of the pigment was as high as 147 U/mL and total pigment yield reached 13.4 g/L. Fig 3, Tab 3, Ref 18

Keywords *Streptomyces bikiniensis*; identification; color value; 16S rRNA sequence; purple pigment

CLC Q939.9

放线菌作为一类具有重要经济价值的微生物资源,与人类关系极其密切,对人类健康的贡献尤为突出,它可以产生抗生素、维生素、酶抑制剂、抗寄生虫剂和免疫调节剂等多种生物活性物质,少数放线菌特别是链霉菌还能产生天然色素,其中包括罕见的天然紫色素.在目前为数不多的报道^[1~4]中,天然色素主要包括放线紫素(Actinhordin)、石蕊杀菌素(Litmocidin)和花青素(Anthocyanidin)等.放线菌产生的色素可以作为保健药和临床治疗用药,例如黑色素可抑制流感病毒、延缓衰老,还具有防止紫外线辐射的功能^[5],花色素可用于预防关节炎,而且色素还可以作为药品、食品的着色剂以及酸碱指示剂、生物染色剂、化学试剂等^[6].最近一项研究表明,柳珊瑚虫排泄管骨片中增加的紫色素对自身抵抗疾病、保护机体方面具有积极作用^[7~9],在拉曼显微镜观察下进

一步确定该紫色素是一种在碳14-15之间含有双键的类胡萝卜素,这项成果为后来者在研究紫色素结构性质方面提供了宝贵的经验.

本文研究的菌株LK-178具有抗革兰氏阳性、革兰氏阴性和真菌活性,产生的色素性质稳定,产量较高,为天然放线菌色素资源的开发利用奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 菌种

从河南兰考盐碱土壤中采集分离所得.

1.2 培养基

高氏1号合成及鉴定用培养基参照文献[10]制备.

1.3 菌株鉴定

1.3.1 形态观察 在高氏1号琼脂固体培养基采用平皿插片法培养,28℃培养14 d,每2 d、5 d、7 d、14 d取插片进行革兰氏染色^[10,11],用光学显微镜进行菌株形态观察.

1.3.2 生理生化指标测定及培养特征观察 按文献[11]方法进

收稿日期: 2007-11-28 接受日期: 2008-03-17

*四川省微生物资源共享平台项目资助 Supported by the Project of the Microbial Resources Sharing Platform of Sichuan, China

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: bioyang@163.com)

行生理生化指标测定及培养特征观察。

1.3.3 16S rRNA的PCR扩增及其序列分析 选用通用引物27f5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1504r5'-AAGGAGGTGATCCA GCCGCA-3'。PCR扩增25 μ L反应体系: 2.5 μ L10 $\times$ Taq酶缓冲液, 0.2 μ mol/L引物, 2 μ L 200 mmol/L dNTP, 20 ng DNA模板, 1 U Taq酶(TaKaRa), 17 μ L ddH₂O。PCR反应按下述程序进行扩增: 94 $^{\circ}$ C预变性5 min, 94 $^{\circ}$ C变性1 min, 56 $^{\circ}$ C复性1 min, 72 $^{\circ}$ C延伸2 min, 进行30个循环, 72 $^{\circ}$ C延伸5 min。回收的目的片段, 测序工作由TaKaRa宝生物工程(大连)有限公司完成。

1.3.4 系统发育树的构建 将所测的16S rRNA 序列采用Mega3.0等软件对菌株进行系统发育分析, 采用NJ法构建系统进化树。

1.3.5 拮抗性测定 按文献[10]培养方法, 种子培养液28 $^{\circ}$ C、180 r/min振荡培养48 h, 转入发酵液摇瓶中, 同样的条件下发酵120 h。拮抗性采用牛津杯法测定抑菌圈的大小, 实验选用枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、白色链球菌(*Streptococcus albus*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)、白色念珠菌(*Candida albicans*) 和黄曲霉菌(*Aspergillus flavus*)等11种细菌、真菌作为测试菌株。

1.4 紫色素提取、薄层层析分析

1.4.1 紫色素提取 取500 mL发酵144 h的发酵液过滤, pH值调至9.0, 100 $^{\circ}$ C水浴30 min后, 冷却静止, 取液面紫色物质加入去离子无菌水, 4 000 r/min离心去沉淀, 上清烘干, 依次用乙酸乙酯、甲酸甲酯等有机溶剂洗涤, 最后离心得上清液, 85 $^{\circ}$ C烘干留紫色物质。

1.4.2 薄层层析分析 取紫色素甲醇溶液点样于硅胶G板, 参考文献[12, 13]方法, 在丙酮: 石油醚(V/V=3: 1)展开剂上行展开, 显色, 计算 R_f 值(R_f =溶质移动的距离/溶剂移动的距离)。

1.5 紫色素的色泽变化及溶解性

紫色素样品溶解在不同pH值的水溶液中, 观察其色泽变化; 紫色素溶于常见有机溶剂中, 测定其溶解性。

1.6 紫色素色价和产量的测定

将紫色发酵液pH值调至9.0, 再用pH值9.0的缓冲液将其稀释5倍测色素 $D_{199\text{ nm}}$ 值即色价。另取500 mL发酵144 h的发酵液过滤, pH值调至9.0, 100 $^{\circ}$ C水浴, 取液面紫色物质纯化后充分干燥得紫色素样品, 计算色素产量。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定

2.1.1 形态学特征 形态观察结果见图1。在高氏1号固体培养基, 于28 $^{\circ}$ C培养96 h可以观察到LK-178的菌落白色, 呈圆形, 表面可见同心圆结, 边缘整齐, 表面干燥。培养7 d后, 气生菌丝和基内菌丝均很丰富, 颜色一致, 紫或灰白, 产紫色色素。图1-A中可以观察到基内菌丝交织紧密, 形成长主径, 不断裂。由图1-B可知, 孢子丝非轮生, 柔曲或直, 孢子圆柱形或卵圆形, 表面光滑, 该菌株革兰氏染色呈阳性。

2.1.2 生理生化指标测定及培养特征观察 生理生化指标测定[14]及培养特征[15, 16]观察结果见表1、表2。由表1结果可知:

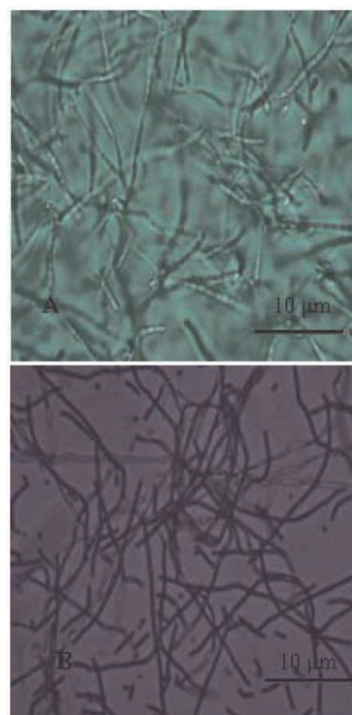


图1 菌株LK-178的光学显微镜照片

Fig. 1 Strain LK-178 under optical microscope

该菌较好利用麦芽糖, 产紫红色素; 中等利用葡萄糖产粉红色素; 利用棉子糖、蔗糖但不产色素; 不利用D-阿拉伯糖、鼠李糖、肌醇等作唯一碳源。同时该菌水解淀粉能力强; 明胶液化; 产H₂S; 产酪氨酸酶; 牛奶石蕊实验阳性。从表2可以看出: 在不同培养基不同生长条件, 菌株的生长情况很丰茂, 但菌丝颜色不大相同, 在高氏1号和马铃薯块琼脂分别产淡紫和蓝褐色素。

表1 碳源的利用和生理生化特征

Table 1 Utilization of carbon sources and their physiological and biochemical characteristics

碳源 Carbon source	结果 Result	理化特征 Physiological and biochemical characteristics	结果 Result
D-阿拉伯糖 D-arabinose	-	纤维素水解 Hydrolysis of cellulose	-
D-果糖 D-fructose	-	硝酸盐还原 Nitrate reduction	-
甘露醇 Mannitol	-	淀粉水解 Amylohydrolysis	+
鼠李糖 Rhamnose	-	明胶液化 Gelatin liquefaction	+
肌醇 Myo-inositol	-	石蕊牛奶 Litmus milk	+
D-葡萄糖 D-glucose	+	产硫化氢 Production of H ₂ S	+
蔗糖 Sucrose	+	酪氨酸酶 Monophenolase	+
棉子糖 Raffinose	+		
麦芽糖 Maltose	+		
乳糖 Lactose	+		
L-山梨醇 L-glucitol	-		

+: 阳性; -: 阴性 +: Positive; -: Negative

2.1.3 16S rRNA的PCR扩增及其序列分析 PCR扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳后, 利用Q IA Quick Gel Extraction Kit进行目的片段DNA回收, 将回收产物与pMD18-T克隆载体连接,

表2 在不同培养基中的生长特征
Table 2 Characteristics of culture on different media

培养基 Medium	生长 Growth	基内菌丝颜色 Substrate mycelium color	气生菌丝颜色 Aerial mycelium color	色素 Pigment
淀粉培养基 Inorganic salt-starch agar	丰度 Good	灰白、淡紫 Grayish white, pale purple	淡紫 Light purple	-
甘油-天门冬酰胺培养基 Glycerol-asparagine agar	丰度 Good	灰色 Gray	灰褐 Grayish -fuscescent	-
玉米粉综合培养基 Corn flour synthetic agar	适度 Moderate	灰红 Grayish red	粉白 Pink white	-
高氏1号培养基 Gause's synthetic agar	丰度 Good	淡紫、灰白 Light purple, grayish white	淡紫 Light purple	+
马铃薯培养基 Potato dextrose agar	丰度 Good	黑褐 Dark fuscescent	蓝褐 Blue fuscescent	+
LB培养基 Luria-Bertani agar	丰度 Good	灰白 Grayish white	灰白 Grayish white	-
酪蛋白胨培养基 Casein peptone agar	适度 Moderate	浅灰 Light gray	浅紫褐 Light purple fuscescent	-
牛肉膏培养基 Brewis agar	丰度 Good	灰白 Grayish white	淡黄褐 Light yellow fuscescent	-
基本培养基 Basic agar	-	-	-	-

—: 不产生可溶性色素 —: Diffusible pigments were not produced

挑选出克隆子, 利用primer1 / primer2进行PCR验证, 选出阳性克隆子进行测序, 其所测16S rRNA序列长度为1 558 bp, 并提交GenBank注册(登录号为EU560974).

2.1.4 系统发育树的构建 菌株LK-178的16S rRNA序列在NCBI数据库比对分析后显示,与模式菌株*S. bikiniensis* AB208713具有较高同源性.从GenBank中调取相关的16S rRNA 序列,采用Mega3.0等软件对菌株进行系统发育分析,采用NJ法构建系统进化树^[14, 17] (图2).从菌株的16S rRNA序列聚类分析结果来看,菌株LK-178与*S. bikiniensis*亲缘关系最密切,结合以上菌体的形态、生理生化特征把菌株初步鉴定为*S. bikiniensis*.

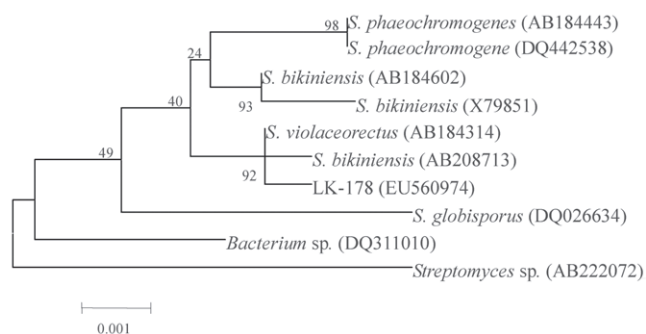


图2 菌株 LK-178 的系统发育树状关系图

Fig. 2 Phylogenetic tree analysis of strain LK-178

Neighbor-joining tree, based on 16S rRNA sequences showing the relation between strain LK-178 and type species of *Streptomyces*. The numbers at the nodes indicate the levels of bootstrap support based on neighbor-joining analyses of 1000 resampled data sets; Bar, 0.001 nt substitution per nt position

2.1.5 拮抗性测定 结果见表3。由表3可以看出: LK-178菌株具有抗革兰氏阳性、阴性细菌和真菌活性^[14, 15], 同等条件下对大肠杆菌、伤寒沙门氏、青枯假单胞菌、白色链球菌抗菌活性较强。

表3 菌株LK-178的抑菌活性
Table 3 Antimicrobial activity of strain LK-178

测试菌株 Tested microorganisms	抑菌圈大小 Size of inhibited zone (d/mm)
革兰氏阳性细菌 Gram-positive bacteria	
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	++
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	++
卡拉双球菌 <i>Diplococcus cata</i>	++
青枯假单胞菌 <i>Pseudomonas solanacearum</i>	+++
耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	++
白色链球菌 <i>Streptococcus albus</i>	+++
革兰氏阴性细菌 Gram-negative bacteria	
伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella typhi</i>	+++
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	+++
真菌 Fungi	
白色念珠菌 <i>Candida albicans</i>	++
黑曲霉 <i>Aspergillus niger</i>	—
黄曲霉菌 <i>Aspergillus flavus</i>	—

+: 抑菌圈 <10 mm; ++: $10 \leq$ 抑菌圈 <15 mm; +++: 抑菌圈 ≥ 15 mm; -: 无抑菌圈

+: Inhibited zone < 10 mm; ++: 10 ≤ Inhibited zone < 15 mm; +++: Inhibited zone ≥ 15 mm; -: No inhibition

2.2 紫色素提取和薄层层析分析

2.2.1 紫色素提取 结果表明,在pH 9.0、100 ℃水浴提取色素,加去离子水离心,能除去不溶于水的杂质,用乙酸乙酯、甲酸甲酯等洗涤能除去酯溶性杂质。

2.2.2 薄层层析分析 结果如图3所示, TLC分离出一个紫色斑点, R_f 值=0.885与文献[12]的研究结果0.829相近, 表明得到的紫色素较为纯净。

2.3 紫色素的色泽变化和溶解性

紫色素样品在pH 1.5水溶液呈淡粉红色; pH 3.0溶液呈

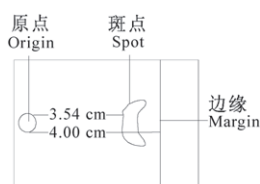


图3 紫色素薄层层析示意图

Fig. 3 Diagram of chromatographic analysis of purple pigment

浅粉红色; pH 5.5溶液呈粉红色; pH 7.5溶液呈紫色; pH 9.0溶液呈淡紫色; pH 12.5溶液呈淡蓝色。

该紫色素为水溶性色素, 溶于碱性溶液, 微溶于酸性溶液, 但酸性越强越不易溶解。它也易溶于甲醇、乙醇、二氯甲烷、丙酮等有机溶剂, 不溶于甲酸甲酯、乙酸乙酯、氯仿、吡啶(色素呈淡蓝色)和二甲基甲酰胺等有机溶剂。

2.4 紫色素色价和产量

稀释5倍的色素溶液 $D_{199\text{ nm}}$ 为0.72即发酵液色价为36.0, 同时测得最佳发酵条件下的紫色素总色价相对单位达到147 U/mL, 与已知报道^[18]的其他色素最高总色价相对单位149.2 U/mL相比较总色价相当, 色素产量达到13.4 g/L, 表明该菌株是一个紫色素高产菌。

3 结论

经形态、培养特征、生理生化特征以及16S rRNA序列系统聚类分析等, 将该菌株鉴定为比基尼链霉菌(*S. bikiniensis*), 但该菌株利用蔗糖, 不利用木糖、D-果糖等碳源及培养特征、理化性质与已报道的比基尼链霉菌都有一定差别。它具有广谱抗菌活性, 所产紫色素性质稳定, 总色价相对单位较高达到147 U/mL, 色素产量达13.4 g/L, 是一个紫色素高产菌, 具有较高的研究价值, 为天然放线菌色素资源的开发利用奠定基础。本文也探索了紫色素的提取与纯化的条件, 得出以下结论:

在碱性条件下, 100 °C水浴有利于提取紫色素, 而且色素易溶于甲醇、丙酮、不溶于甲酸甲酯等有机溶剂的特性为色素进一步纯化和鉴定提供了实验依据。

色素颜色随pH值变化的特性使它可以作为一种天然的食品指示剂即食品腐败变质, 其pH值发生变化而导致色素颜色产生变化, 指示该食品变质不能食用。

References

- Zhang CH (张和春), Chen L (陈亮), Ji WM (季文明), Wu K (吴亢), Wang W (王武). Identification of a blue-pigment producing *Streptomyces* and the properties of blue pigment. *Chin J Wuxi Light Ind* (无锡轻工大学学报), 1999, **18** (3): 23~28
- Leonid VB, Jan KH, Wim K. 5-HydroxyaloesaponarinII, aminor blue pigment in an actinorhodin-negative mutant of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *J Biotechnol Appl Biochem*, 1997, **26**: 195~201
- Abbas A, Edwards C. Effect of metals on *Streptomyces coelicolor* growth and actinorhodin production. *J Appl Environ Microbiol*, 1990, **56**: 675~680
- Lu L, Cui HL, Chen YN. Isolation and identification of *Streptomyces* sp. and assay of its exocellular water-soluble blue pigments. *J Folia Microbiol (Praha)*, 2002, **47** (5): 493~498
- Wang GL (王戈林), Ning H (宁华), Shen P (沈萍), Peng RZ (彭珍荣). Study on production of melanin by tryosinase gene engineering bacteria. *Chin J Pharm Ind* (中国医药工业杂志), 1999, **30** (4): 150~154
- Liu Y (刘毅), Ning ZX (宁正祥). Healt function and application of monascus fermentation products. *J Guangzhou Food Sci & Tech* (广州食品工业科技), 1999, **15** (2): 1~4
- Smith GW, Harvell CD, Kim K. Response of sea fans to infection with *Aspergillus* sp. (fungi). *J Rev Biol Trop*, 1998, **46**: 205~208
- Kim K, Alker A, Shuster K, Quirolo C, Harvell CD. Longitudinal study of aspergillosis in sea fan corals. *Dis Aquat Org*, 2006, **69**: 95~99
- Leverette CL, Warren M, Smith MA, Smith GW. Determination of carotenoid as the purple pigment in *Gorgonia ventalina* sclerites using Raman microscopy. *Spectrochim Acta Part A*, 2008, **69**: 1058~1061
- 瓦克斯曼SA著; 阎逊初译. 放线菌属和种的分类、鉴定和描述(第2卷). 北京: 科学出版社, 1974
- Yan XC (阎逊初). 放线菌的分类和鉴定. 北京: 科学出版社, 1974
- Li YW (李一苇), Chen XL (陈晓琳), Zhang M (张明). Biological characteristics of *Streptomyces*-ZLT and elementary properties of its produced blue pigment. *J Biol* (生物学杂志), 2007, **24** (1): 41~43
- Kamijo M, Suzuki T, Kawai K, Fujii T & Murase H. Ytterbium- Decreasing *Streptomyces* sp. and its naphthoquinone pigment production in the presence of rare-earth elements. *J Biosci & Bioengin*, 1999, **87** (3): 340~343
- Boudjella H, Bouti K, Zitouni A, Mathieu F, Lebrihi A, Sabaou N. Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from a Saharan soil. *Microbiol Res*, 2006, **161**: 288~298
- Zitouni A, Boudjella H, Lamari L, Badji B, Mathieu F, Lebrihi A, Sabaou N. *Nocardiopsis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: Isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. *Res Microbiol*, 2005, **156**: 984~993
- Li WJ, Jiang Y, Kroppenstedt RM, Xu LH, Jiang CL. *Nocardia alba* sp. nov., a novel actinomycete strain isolated from soil in China. *Syst Appl Microbiol*, 2004, **27**: 308~312
- Zhang YX (张燕新), Zhao Y (赵印), Xu JL (许敬亮), Wu Y (吴莹), Hu B (胡冰), Shen B (沈标). Isolation and characterization of three thermophilic proteases-producing bacteria. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2007, **13** (4): 561~564
- Zhang CH (张和春), Wang W (王武). The optimization of the blue pigment fermentation by *Streptomyces coelicolor*. *Food & Fermentation Ind*, 1999, **25** (5): 23~27