

文章编号:1001-6880(2016)11-1736-06

# 产胞外黑色素菌株的鉴定及发酵条件优化

张慧,马连杰,朱金山,余端,廖敦秀\*

重庆市农业科学院农业资源与环境研究所,重庆 401329

**摘要:**从重庆不同区域收集土壤,分离到一株高产黑色素的菌株(H4),通过16SrDNA序列测定,菌株与*Streptomyces puniciscabiei*序列相似性为99%,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。采用响应面法对其发酵条件进行了优化,结果表明该菌株在L-酪氨酸的含量为0.73 g/L,pH值为6.05,温度28 °C的条件下,菌株黑色素实际产量达2.49 g/L。

**关键词:**黑色素;链霉菌;16SrDNA;响应面法

中图分类号:Q939

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.11.009

## Identification and Culture Condition Optimization for a Marine Extracellular Melanin Producing Bacterium

ZHANG Hui, MA Lian-jie, ZHU Jin-shan, YU Duan, LIAO Dun-xiu \*

Institute of Agricultural Resources and Environment, Chongqing Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 401329, China

**Abstract:** A high yield of melanin producing strain (H4) was isolated from soil collected from different regions of Chongqing, by 16SrDNA sequencing. The isolated strain showed 99% similarity with *Streptomyces puniciscabiei*. The melanin produced by strain H4 had a distinct absorption in UV light and as the wavelength decreased, the absorption increased. It has an absorption peak at around 210 nm. Response surface methodology was used to optimize its fermentation conditions, the results showed that the optimal fermentation conditions were as follows: the content of L-Tyrosine of 0.73 g/L, pH value of 6.05, at a temperature of 28 °C. Under these conditions, the actual output of melanin reached 2.49 g/L.

**Key words:** melanin; *Streptomyces*; 16SrDNA; response surface methodology

黑色素(Melanin)是一种大量存在于动物、植物和微生物中的天然色素,它是一种非均质的类多酚聚合体,结构复杂多样。通常不溶于水、酸溶液和普通有机溶剂,可溶于碱溶液。黑色素虽然对于生物的生长、发育并不十分重要,但却能提高生物生存、竞争的能力<sup>[1]</sup>。黑色素有广泛的应用潜力,比如可作为酒类、饮料类、婴儿保健品及大众食品的添加剂,紫外保护剂,可以保护体内细胞免受辐射损伤<sup>[2]</sup>,储存电能再缓慢转化成为热能<sup>[3]</sup>,作为无定形半导体<sup>[4]</sup>,是一种新的分子标记,对生物杀虫剂具有光保护作用<sup>[5,6]</sup>。黑色素具有清除自由基、抗氧化的功能,是一种新型的天然药物载体和有效的抗病毒类新药。另外,化学合成的黑色素安全性不高,而从动植物体内提取的黑色素因生产过程繁琐,

成本较高等缺点而无法进行大规模生产,利用微生物生产黑色素具有资源丰富、工艺流程简单、产量高的优势,因此研究微生物发酵生产黑色素,并对其进行开发利用,具有很大的优势,并越来越得到广泛的重视<sup>[7,8]</sup>。

本文从土壤中分离筛选得到一株产黑色素链霉菌,将其命名为H4,为了提高发酵液中黑色素的产量,本论文对产黑色素最佳初始pH、温度和最适培养基等发酵条件进行了摸索,并通过响应面法对其发酵条件进行了优化,以期为微生物资源的开发与利用提供科学依据与理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种来源

产黑色素的H4菌株,分离自重庆市农科院永川多年连作油菜田土壤。

### 1.1.2 培养基

LB 培养基:蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, NaCl 10 g, 蒸馏水定容至 1 L,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 30 min。牛肉膏蛋白胨培养基:牛肉膏 5.0 g, 蛋白胨 10.0 g, NaCl 5 g, 蒸馏水定容至 1 L,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 30 min。LB-Tyr 培养基:蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, NaCl 10 g, L-酪氨酸 1 g, 蒸馏水定容至 1 L,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 30 min。Tyr 发酵培养基<sup>[1]</sup>:葡萄糖 1 g, 蛋白胨 5 g, NaCl 5 g, CaCl<sub>2</sub> 0.1 g, L-酪氨酸 1 g, 蒸馏水定容至 1 L,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 30 min。Fd 发酵培养基:葡萄糖 1.2 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.3 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, CaCO<sub>3</sub> 3 g, MgSO<sub>4</sub> 0.56 g, L-酪氨酸 1 g, 蒸馏水定容至 1 L,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 30 min。Fw 发酵培养基<sup>[9]</sup>:葡萄糖 2 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g, MgSO<sub>4</sub> 1 g, L-酪氨酸 1 g, 蒸馏水定容至 1 L,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 30 min。酪素培养基:蛋白胨 10 g, 葡萄糖 1 g, NaCl 5 g, CaCl<sub>2</sub> 0.1 g, 干酪素 5 g, L-酪氨酸 1 g, 蒸馏水定容至 1 L,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 30 min。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 产黑色素菌株的分离筛选

采集重庆市永川的新鲜土样, 做 10 倍系列稀释, 稀释到  $10^{-5}$  涂板, 28 ℃ 和 37 ℃ 培养 5 d, 选取在菌落周围呈明显黑色的菌株作为初筛目标菌株作进一步产黑色素能力测试。将初筛目标菌株接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 180 rpm 30 ℃ 震荡培养 7 d, 12000 rpm 离心取上清液, 测 OD<sub>400</sub> 处吸光度, 用于比较菌株的产黑色素能力。保留吸光度值高的菌株, 作为高产黑色素目标菌株, 作进一步分析。

表 1 实验设计因素水平表

Table 1 Factors and levels of the Box-Behnken experimental design

因素 Factors	水平 Level		
	-1	0	1
(A) 初始 pH Initial pH	5	6.5	8
(B) 温度 Temperature ( ℃ )	20	28.5	37
(C) L-酪氨酸浓度 L-tyrosine concentration ( g/L )	0.1	0.68	1.25

## 2 结果与分析

### 2.1 产黑色素菌株的分离筛选

经稀释涂布平板法分离、平板划线纯化后, 从土壤中得到了 22 株产黑色素的菌株, 其中 H4 产黑色素能力较强, H4 在培养基平板上菌落表面高高隆起, 干燥、不透明、边缘整齐, 与培养基结合紧密, 难

### 1.2.2 黑色素的提取

将菌株 H4 接种于酪素培养基, 发酵 5 d, 黑色素纯化依据 Guo<sup>[10]</sup> 方法稍加修改, 发酵液经滤纸去除菌体, 调 pH 至 2~3, 静置过夜, 离心(12000 rpm, 20 min)后的沉淀在 6 mol/L HCl 中浸泡 4 h, 接着用无菌乙醇洗涤 2 次, 烘干后即得黑色素粉末。

### 1.2.3 黑色素特性

离心发酵液后取上清, 稀释适当倍数, 利用可见-紫外连续扫描仪(UV-6100)进行 190~900 nm 紫外-可见吸收光谱的连续扫描, 对黑色素做初步的鉴定。

### 1.2.4 菌种鉴定

基因组 DNA 的提取参照 Laurent<sup>[11]</sup> 的方法。PCR 扩增的通用引物: F primer: 5' AGAGTTGATC-CGGCTCAG3', R primer: 5' ACGGCTACCTTGT-TACGACTT 3'。PCR 反应条件: 94 ℃ 5 min, 94 ℃ 1 min, 55 ℃ 1 min, 72 ℃ 2 min, 30 个循环; 72 ℃ 10 min, PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 用 PCR 回收试剂盒回收后与 pMD18-T 载体相连并转化 *E. coli* DH5α, 利用菌落 PCR 的方法检测阳性克隆, 引物合成和序列测定均由北京华大基因有限公司完成。所测得的序列提交至 GenBank, 获得登录号, 序列进行 BLAST 比对分析, 选取同源性较高的 16S rDNA 序列作为参比对象, 并用 MEGA 软件构建系统进化树。

### 1.2.5 响应面法优化发酵条件

采用 Box-Behnken 中心组成设计原理, 设计了三因素三水平的响应面分析(RSA)实验, 实验因素和水平见表 1。

于挑取, 镜检结果为丝状体, 有孢子。

### 2.2 菌株的鉴定结果

该菌株的 16S rDNA 序列长度为 1276 bp, GenBank 登录号为 KT963091。进行 BLAST 分析, 选取同源性高的 5 株菌的 16S rDNA 序列构建系统发育树, 如图 1 所示, 该菌株与 *Streptomyces puniciscabiei* (KP970681) 处于进化树的同一分支, 同源性为 99% ,

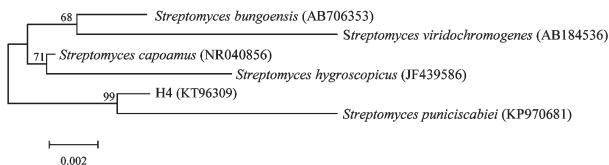


图 1 菌株 H4 及其近缘模式菌株 16S rRNA 基因序列系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the relationship between strains H4

注: 分支上的数字为 Bootstrap 值, 代表分类单位被聚在一起的概率; 标尺代表碱基替换。

Note: The numbers of nodes indicated bootstrap values, and represented the percentage of 1000 bootstrap replications in which the taxa to the right are placed together. The scale bar indicated 1.0 nt substitution.

将其归为 *Streptomyces puniciscabiei*。

### 2.3 H4 菌株产生的黑色素特性

UV-VIS 光谱显示 H4 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<sup>[12]</sup>。

### 2.4 响应面优化实验结果

#### 2.4.1 中心组合实验

在不同培养基中发酵培养 5 d 后, 菌株 H4 在酪素培养基中黑色素产量最高。采用中心组合实验设计 (CCD) 优化黑色素发酵条件。采用三因素三水平的中心组合实验设计, 将初始 pH 值、温度和 L-酪氨酸浓度重新编码和进行水平标注, 见表 2。

表 2 Box-Behnken 实验设计及结果

Table 2 Box-Behnken experimental design and results

编号 No.	因素 Factor			响应值 Response
	A	B	C	
1	-1	0	1	1.5
2	0	0	0	2.53
3	1	-1	0	0.27
4	0	-1	1	0.46
5	-1	-1	0	0.36
6	1	0	-1	0
7	0	0	0	2.53
8	-1	0	-1	0.97
9	1	0	1	0
10	1	1	0	0
11	-1	1	0	0.047
12	0	0	0	2.53
13	0	-1	-1	0.64
14	0	1	1	0.075
15	0	0	0	2.53
16	0	1	-1	0.066
17	0	0	0	2.53

#### 2.4.2 模型的建立与方差分析

利用统计软件 Design-Expert 8.0 软件对上述实验结果进行分析, 黑色素的产量经多元回归方差分析结果分别见表 3。根据对表 3 实验数据进行回归分析, 得到该模型的二次多项回归方程: 黑色素的产量 ( $Y$ ) = + 2.53 - 0.33A - 0.19B + 0.045C + 9.375E - 003AB - 0.13AC + 0.047BC - 1.03A<sup>2</sup> - 1.34B<sup>2</sup> - 0.89C<sup>2</sup>。

F 检验反映的是所建模型的有效性, 由表 3 可知, 所建模型可反映各因子与响应值之间的关系, 模型  $P = 0.0004 < 0.01$ , 表明回归模型极显著; 复相关系数  $R^2$  为 95.97%, 即回归方程中所有自变量的变化可以解释 95.97% 的因变量变化, 这主要是因为微生物黑色素提取过程的影响因素很多, 未计入方程的变量与回归方程的变量之间总会有交互作用,

表 3 回归模型方差分析  
Table 3 Analysis of variance for regression model

变异来源 Source of variation	平方和 Sum of Squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean Square	F 值 F value	Pro > F 显著性 Significance
模型 Model	18.22	9	2.02	18.53	0.0004
A	0.85	1	0.85	7.78	0.027
B	0.3	1	0.3	2.71	0.144
C	0.02	1	0.02	0.15	0.7144
AB	0	1	0	0	0.9563
AC	0.07	1	0.07	0.63	0.4531
BC	0.01	1	0.01	0.08	0.7848
$A^2$	4.44	1	4.44	40.63	0.0004
$B^2$	7.51	1	7.51	68.82	<0.0001
$C^2$	3.3	1	3.3	30.26	0.0009
残差 Residuals	0.76	7	0.11		
失拟项 Lack of fit	0.76	3	0.25		
纯误差 Pure error	0	4	0		
总和 Sum	18.98	16			
相关系数 Correlation coefficient	0.9597				

由于未计入选项的变量较多,故交互作用的累积对回归方程造成一定影响;另一方面是由于实验的过程中总会有不可避免的随机误差。说明该模型拟合程度良好,实验误差小,可以用上述模型来分析和预测 H4 在发酵条件下产黑色素的量。由回归方程系数显著性检验结果可知,模型中一次项 B 项、C 两项线性效应不显著,一次项 A 项效应显著;二次项  $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$  对黑色素干重的影响极显著( $P < 0.01$ );而交互项 AB、AC、BC 不显著。表明各影响因素对黑色素产量的影响不是简单的线性关系。

#### 2.4.3 响应面及等高线分析结果

通过回归方程来绘制分析图,考察所拟合的相应曲面的形状,响应面立体分析图和相应等高图见图 2,从图中及软件分析,回归方程存在稳定点,通过岭峰分析(ridge analysis)得到极大值所对应的各主要因素(A、B、C)即初始 pH、温度、L-酪氨酸的最佳值分别为 6.05,28 °C,0.73 g/L,此时发酵液的黑色素量最高,预测值为 2.54 g/L。

#### 2.4.4 验证实验

利用分析所得优化条件,将 H4 菌株在酪素培养基中发酵,其初始 pH 为 6.05,L-酪氨酸浓度为 0.73 g/L,培养温度为 28 °C,结果测定所产黑素色

干重为 2.49 g/L,与预测值极为接近,说明该模型具有很好的预测性和可靠性。

### 3 讨论

由于黑色素应用广泛,利用微生物生产黑色素,越来越受到重视。国内外微生物生产黑色素的多为细菌类,而放线菌生产黑色素的报道比较少见,柯冠群等<sup>[13]</sup>筛选到产黑色素的链霉菌,该菌产黑色素的产量约为 0.7 g/L。顾敏舟等<sup>[14]</sup>筛选到产黑色素的抗生链霉菌,产量为 3.45 g/L。Madhusudhan 等<sup>[15]</sup>筛选到产黑色素的 *Streptomyces lusitanus* DMZ-3,产量为 5.29 g/L。本研究从重庆市不同区县分别采集土壤样品 58 份,从中得到了 22 株产黑色素的菌株,其中 H4 产黑色素能力较强,研究发现该菌具有产黑色素较快,并且不需要 Tyr 诱导等优点。16SrDNA 扩增和序列分析表明该菌与 *Streptomyces puniciscabiei* 的遗传距离最近,聚为一支,因此将菌株 H4 归为 *Streptomyces puniciscabiei*,可见紫外光谱显示该菌所产色素为黑色素特性。赵昌会等<sup>[16]</sup>从海水中筛选得到产黑色素菌株 S3,经鉴定与 *Streptomyces puniciscabiei* 基本一致,菌株 S3 可在 LB、2216E、Tyr、产孢等培养基上产黑色素,然而并未对

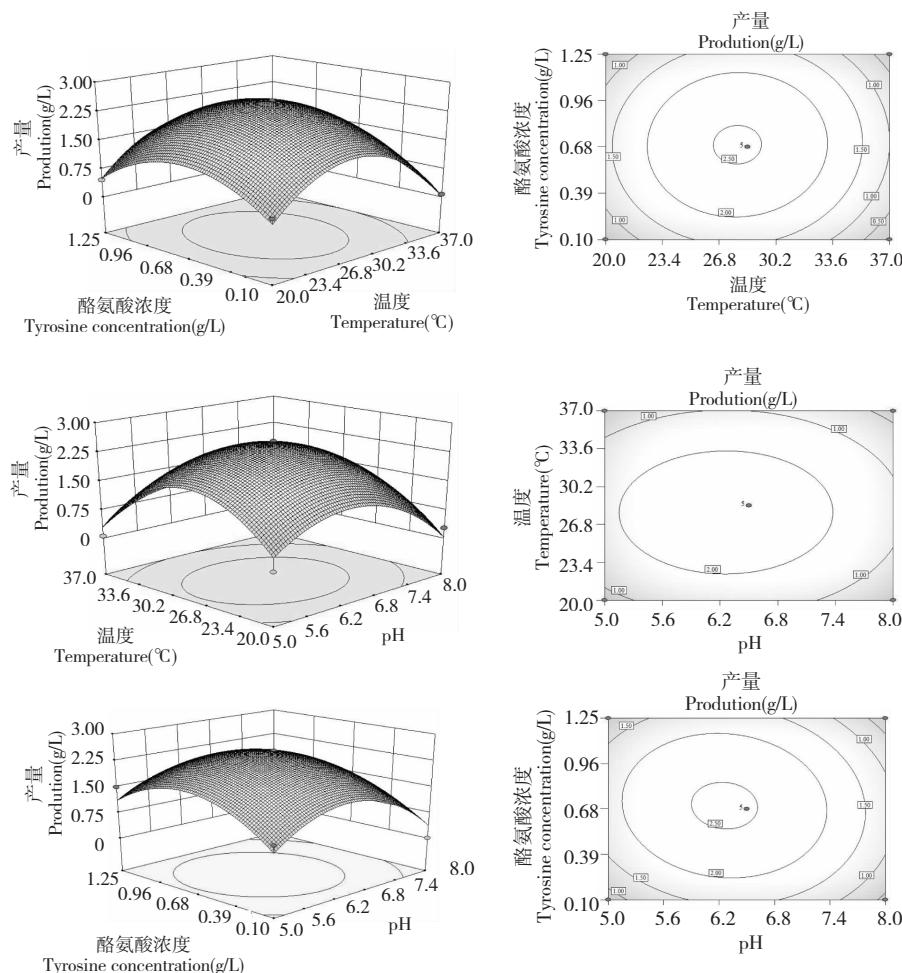


图2 温度、L-酪氨酸浓度和pH对产黑色素量影响的响应曲面图和等高线图

Fig. 2 Response surface and contour plots showing the interactive effects of temperature, L-tyrosine concentration and pH on production yield of melanin

其发酵条件进行优化。

本实验采用响应面分析法对H4菌株产黑色素的培养条件进行优化,通过最陡爬坡实验逐步改变三者的数值,逼近最佳响应面区域;最后采用Box-Behnken设计和SAS软件分析确定出主要因素的最优条件,得到最佳发酵条件为:L-酪氨酸的浓度0.73 g/L,pH值6.05,温度28 °C。同时,回归方程所得到的最大预测值与验证值非常接近,说明回归方程能较真实地反映各培养因素的影响,建立的模型与实际情况是比较吻合的,因此用响应面法优化H4发酵条件是有效可行的。

## 参考文献

- Peng F(彭方),Wang W(王伟),Peng ZR(彭珍荣). Studies on microbial resources for producing high-yield melanin. *Amino Acids Biotic Res*(氨基酸和生物资源),1996,18(4):1-4.
- Sichel G,Corsaro C,Scalia M,et al. Relationship between

melanin content and superoxide dismutase (SOD) activity in the liver of various species of animals. *Cell Biochem Funct*, 1987,5:123-128.

- Crippa PR,Cristofolletti V,Romeo N. A band model for melanin deducted from optical absorption and photoconductivity experiments. *Biochim Biophys Acta*,1978,538:164-170.
- Mizutani U,Massalski TB,McGinness JE,et al. Low temperature specific heat anomalies in melanins and tumor melanosomes. *Nature*,1976,259:505-507.
- Ning H(宁华). Studing on the protection of macromolecule against light by melanin from engieering baeteria. *J Central China Normal Univ:Nat Sci* (华中师范大学学报:自然科学版),2001,35(1):85-88.
- Hu HY(胡海艳),Huang YL(黄雅莉),Liang ZZ(梁志洲),et al. Protection of *Bacillus thuriengensis* toxicity by melanin from engineering bacteria. *Chin J Pest Sci*(农药学学报),2011,13:205-208.

(下转第1763页)