

一株产红色素细菌的分离鉴定及色素性质研究

马连杰, 张 慧, 杭晓宁, 胡留杰, 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:本研究对分离自重庆垫江稻田土壤的一株产红色素细菌进行了形态学和 16S rRNA 序列鉴定, 测定红色素最大紫外吸收波长, 并对其稳定性进行研究。结果显示, 该菌与多株粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) 16S rRNA 序列一致; 产生的色素在 541 nm 处有最大紫外吸收峰, 与灵菌红素最大吸收峰接近, 初步推测其为灵菌红素或其衍生物; 该红色素在 pH 6~11 性质稳定; 紫外光照射稳定性差, 耐氧化能力较强, 与还原剂产生沉淀; 金属阳离子对该色素有不同程度的消色作用, Cu^{2+} 消色作用最明显, 遇 SO_4^{2-} 离子产生沉淀。

关键词: 灵菌红素; 色素; 黏质沙雷氏菌; 16S rRNA

中图分类号: Q939.9; R917

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.10.014

Isolation and Identification of A Bacterial Strain Producing Red Pigment and Research on the Pigment Properties

MA Lian-Jie, ZHANG Hui, HANG Xiao-ning, HU Liu-jie, YU Duan, LIAO Dun-xiu*

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

Abstract: In this study, a bacterium producing red pigment was isolated from the paddy field in Dianjiang, Chongqing. It was determined as *Serratia marcescens* by morphology and 16S rRNA sequencing. The red pigment had maximum UV absorption peak at 541 nm, indicating that this pigment is probably a kind of prodigiosin derivatives. Results of the studies on the stability of the red pigment showed that it was stable in pH 6-11, strong resistance to oxidation, low stability over UV light, precipitate with reductant. Moreover, results indicated the red pigment produced different degree of desaturation with metal cations, being most obvious with Cu^{2+} , and produced precipitate with SO_4^{2-} .

Key words: prodigiosin; pigment; *Serratia marcescens*; 16S rRNA

灵菌红素 (prodigiosins) 是一类天然红色素, 具有吡咯环结构, 主要包括 prodigiosin、nonylprodigiosin、cydonylprodiginine 和 metacycloprodigiosin 等^[1]。1929 年由 Amak 等人首次从粘质沙雷氏菌中提取出来, 后经研究发现该色素可由沙雷氏菌属 (*Serratia*)、链霉菌属 (*Streptomyces*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 等属的部分菌株产生^[2,3]。目前众多研究发现, 灵菌红素表现出抗菌、抗疟疾、抑藻、免疫抑制和抗肿瘤等生物活性^[4-11], 有重要研究意义。目前, 国内对灵菌红素的研究尚处在起步阶段, 且主要研究内容集中于其生物活性, 而对其产生菌种的选育及新型分子的筛选研究较少。本文从水稻土壤中筛选得到一株具有产红色素能力的粘氏沙雷氏

菌, 从紫外吸收光谱图、pH、氧化还原剂等影响结果与之前报道的灵活菌素有一定差异, 初步推测为灵菌红素或其衍生物, 可能具有新的分子结构, 为后续结构鉴定、菌株优化和进一步开发利用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

从重庆市垫江县水稻试验田表层土壤分离获得。

1.1.2 培养基

LB 液体培养基: 胰蛋白胨 10.0 g/L, 酵母粉 5.0 g/L, 氯化钠 10.0 g/L, 加蒸馏水 (调节 pH 值为 7.0), 121 °C 灭菌 20 min 后备用。LB 固体培养基: LB 液体培养基中加入琼脂粉至终浓度为 20 g/L。

1.1.3 试剂与设备

PCR 扩增用试剂购自生工生物工程股份有限公司, DNA 纯化回收试剂盒购自天根生化科技 (北

收稿日期: 2017-12-22 接受日期: 2018-06-05

基金项目: 重庆特色效益农业基础科研工作项目 (NKY, 2016A A002); 国家重点研发计划; 重庆市科委基本科研业务费项目 (2016cstc-jbky-00516)

* 通信作者 Tel: 86-23-68643826; E-mail: xiuchai2006@163.com

京)有限公司,PCR 仪购自 BIO-RAD 公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离纯化

称取 10 g 土壤样品加入 10 mL 无菌水,37 °C 摇床震荡过夜后,离心收集上清,将上清制备成 10^4 、 10^5 、 10^6 梯度的样品,取 3 个稀释度的样品各 200 μ L,分别涂布于 LB 固体培养基上。28 °C 恒温培养 2 d,挑取产红色素的菌落进行平板划线法分离纯化,直至得到纯的菌株后,转到 LB 液体培养基中,待其长到对数期时,加甘油保存于 -80 °C 冰箱中。

1.2.2 菌株鉴定

1.2.2.1 菌株形态及革兰氏染色特征

将保存的菌液在 LB 固体培养基上划线,28 °C 培养 48 h,观察菌落形态,另对 LB 液体培养菌液进行革兰氏染色,光学显微镜下观察革兰氏染色结果。

1.2.2.2 分子生物学鉴定

使用天根细菌 DNA 提取试剂盒进行菌株 DNA 提取,取 1 μ L 作为模板,进行 16S rRNA 基因扩增。16S rRNA 的通用引物:27F 序列 5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3',1429R 序列 5'-GGTACCTT-GTTACGACTT-3'。PCR 扩增反应参数:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 1 min,共 30 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min^[12]。将 PCR 扩增产物用回收试剂盒纯化后,送至北京华大基因有限公司测序。将所测序列在 NCBI 的 Gen-Bank 数据库中进行 BLAST 比对分析。

1.2.3 红色素性质研究

1.2.3.1 红色素的制备与提取

从 -80 °C 取出保存菌种,接种于 LB 液体培养基中,28 °C、160 rpm 振荡培养过夜。以此为种子液,按 200 μ L/平板的接种量均匀涂布于 LB 平板,并于 28 °C 培养箱培养 36 h。用药匙刮下红色菌苔,置于无水乙醇(3 mL/平板)中浸提色素。充分振荡混匀后于室温放置 1 h,8 000 rpm,离心 8 min 收集上清,过滤色素浸提液,减压浓缩从而得到紫红色色素乙醇浓缩液。

1.2.3.2 红色素的紫外光谱特征

对色素乙醇溶液作 250 ~ 650 nm 大范围波长扫描,得到色素紫外光谱图,确定其特征吸峰值。

1.2.3.3 温度对红色素稳定性的影响

取色素乙醇溶液,分别于 40、60、80 °C 恒温水浴中孵育 2 小时,2 小时后测定其吸光值。

1.2.3.4 光照对红色素稳定性的影响

取色素乙醇溶液,分别置于白光和紫外光下 8 h 后测定其吸光值。

1.2.3.5 pH 对红色素稳定性的影响

用 HCl 和 NaOH 将蒸馏水的 pH 值调至 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12,分别取 5 mL 各 pH 值的蒸馏水,再加入 200 μ L 色素乙醇浓溶液,混匀后观察色素在不同 pH 条件下的颜色变化,并于静置后 0 h 和 2 h 测定其吸光值。

1.2.3.6 氧化还原剂对红色素稳定性的影响

配制体积分数 10% 的 H_2O_2 和质量浓度 100 g/L 的 Na_2SO_3 ,按下表(表 1)制备不同浓度梯度反应体系。混合均匀后,测定静置 0 h 和 2 h 后的吸光值。

表 1 氧化还原反应

Table 1 The ReDOX reaction system

序号 No.	色素 Pigmentum (μ L)	$H_2O_2/NaSO_3$ (μ L)	无水乙醇 Anhydrous ethanol (μ L)
1	2000	50	450
2	2000	100	400
3	2000	150	350
4	2000	200	300
5	2000	250	250

1.2.3.7 离子对红色素稳定性的影响

配制 100 mmol/L 的 Mg^{2+} 、 Na^+ 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 K^+ 、 Ca^{2+} 和 Cu^{2+} 共 7 种金属阳离子的氯化物溶液,和相同浓度的 Mg^{2+} 、 K^+ 、 Mn^{2+} 和 Cu^{2+} 的硫酸根溶液。取 0.5 mL 上述离子溶液加到 4.5 mL 红色素乙醇溶液,使其最终浓度为 10 mmol/L,混合均匀后,测定静置 0 h 和 2 h 后的吸光值。

2 结果与分析

2.1 菌株的形态鉴定

该菌株在 LB 平板上 28 °C 培养 48 h,菌落为鲜红色,边缘整齐,表面光滑,中间有小凸起。革兰氏染色结果为阴性。

2.2 菌株的分子生物学鉴定

将 16S rRNA 的测序结果经 BLAST 比对,与多株粘质沙雷氏菌的 16S rRNA 序列相似度达到 99%,亲缘关系最近,故初步推测该细菌属于粘质沙雷氏菌,其产生的红色素可能为灵红菌素或其衍生物。

2.3 红色素的紫外吸收光谱分析

红色素的紫外光吸收光谱见图 1, 250 ~ 650 nm 波长扫描结果显示, 该红色素乙醇溶液在 541 nm 处具有最大吸收峰, 与灵菌红素的紫外吸收光谱 532 nm 临近, 因此推测可能为灵菌红素或其衍生物。

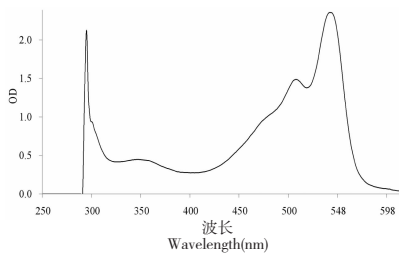


图 1 红色素的紫外吸收光谱图

Fig. 1 The ultraviolet absorption spectrum of the red pigment

2.4 红色素的稳定性研究

2.4.1 温度对红色素稳定性的影响

如图 2 所示, 该色素溶液分别在 3 个不同温度下避光保温 2 h, 测定 OD₅₄₁ 时的紫外吸光度, 结果显示, 40、60、80 °C 红色素残存率分别为 98.72%、92.38% 和 92.00%。可见在 80 °C 残存率仍为 92.00%, 消色不明显, 表明该红色素具有极强的温度稳定性。

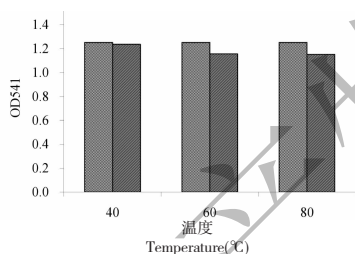


图 2 温度对红色素稳定性的影响

Fig. 2 The influence of temperature on the stability of the red pigment

2.4.2 光照对红色素稳定性的影响

如图 3 所示, 该红色素对光照敏感, 日光照射和紫外照射对色素均有一定程度的消减作用, 分别照射 8 h 后残存率为 86.82% 和 78.44%, 黑暗保存为佳。

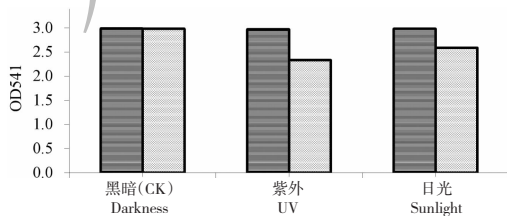


图 3 光照对红色素稳定性的影响

Fig. 3 The influence of light on the stability of the red pigment

2.4.3 pH 对红色素稳定性的影响

如图 4 所示, 红色素在强酸和强碱中颜色均有削减, 在 pH3 ~ 5 之间时, 其残存率保留 70% 左右; 但颜色有微弱的变化, 和原样相比, 其颜色仍为淡紫红色。在 pH12, 颜色呈橙黄色, 明显变浅, 且其残存率在 pH12 的时候仅为 30%。在 pH6 ~ 11 之间, 色素基本保持其原本的颜色和紫外吸收值。

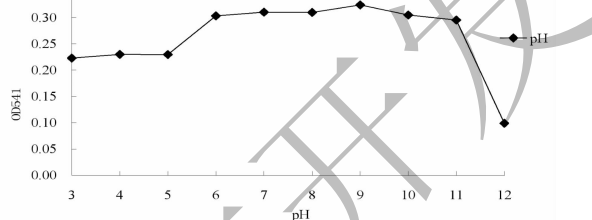


图 4 pH 对红色素稳定性的影响

Fig. 4 The influence of pH on the stability of the red pigment

2.4.4 氧化还原剂对红色素稳定性的影响

如图 5 所示, 随着氧化剂 10% H_2O_2 加入量的增加, 色素的吸光值略有下降; 终浓度 1% 时, 其残存率还保留 78% 以上, 表明红色素的抗氧化能力较强。而从表 2 中可以看出, 还原剂 100 g/L Na_2SO_3 的加入, 5 个浓度梯度呈现淡粉到黄色的颜色变化, 并且全部出现沉淀, 表明还原剂对该红色素有很强的消色作用。

2.4.5 离子对红色素稳定性的影响

如图 6 所示, K^+ 对色素具有一定的消色作用, Cu^{2+} 加入使色素变为灰蓝色。 Mg^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 对色素稳定性影响不大, Na^+ 、 Fe^{2+} 有小幅增色效果。但测试的 4 种 SO_4^{2-} 溶液均和色素反应产生沉淀, 说明该色素能够和 SO_4^{2-} 反应产生沉淀。

3 结论

灵菌红素作为一种新型的天然抗癌待选药物, 已经成为国内外癌研究的热点之一。利用化学合成

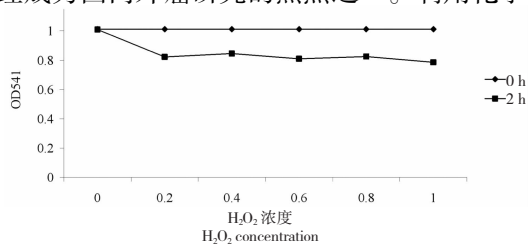


图 5 氧化剂对红色素稳定性的影响

Fig. 5 The influence of oxidant on the stability of the red pigment

表 2 还原剂对红色素稳定性的影响

Table 2 The influence of reductant on the stability of the red pigment

氧化还原剂 Redox agent	浓度 Concentration (%)					
	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
NaSO ₃	1.012	淡粉(产生沉淀) Pink (Precipitation)	橘黄(产生沉淀) Orange (Precipitation)	黄色(产生沉淀) Yellow (Precipitation)	黄色(产生沉淀) Yellow (Precipitation)	黄色(产生沉淀) Yellow (Precipitation)

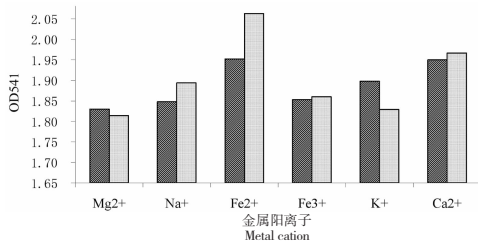


图 6 金属阳离子对红色素稳定性的影响

Fig. 6 The metal cation effect on the stability of the red pigment

方法大量合成灵红菌素未能实现^[13,14],通过微生物发酵生产是理想的生产途径,国内外对产灵红菌素微生物的研究主要集中在陆地微生物沙雷氏菌上,通过菌株诱变、发酵培养基改进、发酵条件优化以及分子生物学手段提高红色素产量至 38.75 g/L^[15-18]。同时,新菌源的不断发现和保存对于拓宽微生物生产灵红菌素来源渠道也至关重要。

本研究从重庆垫江水稻土壤中筛选到一株红色菌株,经形态学、生理生化特征和 16S rRNA 测定,该菌株与多株粘质沙雷氏菌序列相似度达到 99%,将该菌株定为粘质沙雷氏菌。该红色素紫外吸收光谱显示,最大吸收峰为 541 nm,在灵红菌素最大吸收峰 532 nm 临近区域,根据产红色菌株种属、平板产红色素形态和颜色以及最大紫外吸收峰推测为灵红菌素或其衍生物。红色素抗氧化能力强,紫外光照射易分解、酸性条件下性质稳定等特性与刘晓侠等^[3]、李春燕等^[12]相关研究结果吻合,遇 SO₄²⁻产生沉淀未见报道。红色素具体结构和生理活性有待于进一步研究。

参考文献

- Hao MH(郝名慧), Lou ZH(楼志华), Zhang L(张梁), et al. Fermentation and structural elucidation of the red pigment by a new strain of *Serratia marcescens* subsp. H31 [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2007, 19: 439-442.
- Harashima K, Tsuchida N, Tanaka T, et al. Prodigiosin 25-C:

isolation and the chemical structure [J]. *Agric Biol Chem*, 1967, 31: 481-489.

- Liu XX(刘晓侠), Tang W(唐威), Sun SQ(孙诗清), et al. Structural elucidation and stability of red pigment by a new strain of *Serratia marcescens* subsp. jx1 [J]. *J Anhui Agr Univ* (安徽农业大学学报), 2010, 37: 488-492.
- Cang S, Sanada M, Johdo O, et al. High production of prodigiosin by *Serratia marcescens* grown on ethanol [J]. *Biotech Lett*, 2000, 22: 1761-1765.
- Nakashima T, Kato Y, Yamaguchi K, et al. Evaluation of the anti-trichophyton activity of a prodigiosin analogue produced by γ -proteobacterium, using stratum corneum epidermis of the Yucatan micropig [J]. *J Infect Chemother*, 2005, 11: 123-128.
- Matz C, Deines P, Boenigk J, et al. Impact of violacein producing bacteria on survival and feeding of bacterivorous nanoflagellates [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70: 1593-1599.
- Shi RJ(史荣君), Huang HH(黄洪辉), Qi ZH(齐占会), et al. Algicidal activity against red-tide algae by marine bacterial strain N3 isolated from a HABs area, Southern China [J]. *Env Sci* (环境科学), 2013, 34: 1922-1929.
- Han SB, Lee CW, Yoon YD, et al. Effective prevention of lethal acute graft-versus-host disease by combined immunosuppressive therapy with prodigiosin and cyclosporine A [J]. *Biochem Pharmacol*, 2005, 70: 1518-1526.
- Montaner B, Perez TR. The cytotoxic prodigiosin induces phosphorylation of p38-MAPK but not of SAPK/JNK [J]. *Toxicol Lett*, 2002, 129: 93-98.
- Zhang J, Liu JW, Shen YL, et al. Inhibitive effect of prodigiosin on the proliferation of human malignant pancreatic cancer cells [J]. *Med Chem Res*, 2005, 14: 181-197.
- Amanguli H(阿曼古力·海瓦尔), Weinila W(维尼拉·吾甫尔), Pazilaiti B(帕孜来提·拜合提). Inhibition effects of 2M3P Prodigiosin crude extract on human esophageal carcinoma eca-109 cells [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2016, 28: 766-770.

(下转第 1751 页)