

海洋新细菌 *Zooshikella* sp. SY01 的培养条件研究^{*}

蓝文健¹, 莫林峰², 蔡创华³, 周毅频³, 姚骏骅⁴, 李厚金²

(1. 中山大学药学院, 广东 广州 510080)

2. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275

3. 中国科学院南海海洋研究所, 广东 广州 510301;

4. 中山大学分析测试中心, 广东 广州 510275)

摘要: 从海南三亚海域表面海水分离得到一株能产具有强效生理活性的灵菌红素类化合物的海洋新细菌 *Zooshikella* sp. SY01, 对这株细菌的培养条件进行了研究。在 2216E 培养基中分别加入色氨酸、组氨酸、内酯酸、樟脑、柠檬烯、干酪素、二苯胍、香豆素、间二硝基苯等 9 种不同物质, 培养 5 d 后, 利用 (+) ESI-MS 技术测定了不同培养条件下代谢产物的产生情况。研究结果表明, 加入色氨酸、组氨酸、干酪素, 不影响细菌灵菌红素的生物合成; 加入内酯酸、樟脑、柠檬烯、二苯胍、香豆素对细菌生长或者灵菌红素的生物合成具有一定的抑制作用, 能明显延迟培养液变红的时间; 而加入间二硝基苯则能完全抑制细菌产灵菌红素类化合物。(+) ESI-MS 对细菌 *Zooshikella* sp. 代谢产物相对分子质量检测的结果也表明, 在不同培养条件下能够产生化学结构多样的代谢产物, 尤其是在柠檬烯组, 检测到系列相对含量高的较大相对分子质量的化合物, 表明该菌具有丰富的生物合成潜力。深入研究并优化该菌的培养条件, 有望从该菌的代谢产物中发现更多新的灵菌红素类化合物和其它新结构的活性先导化合物。

关键词: 海洋细菌; *Zooshikella* sp. SY01; 培养; 灵菌红素

中图分类号: Q93-335 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2007) 06-0055-04

大量的海洋微生物代谢产物的研究结果表明, 海洋微生物 (真菌和细菌) 能产生多种结构类型的化合物。通过对部分真菌和细菌基因全序列的分析也表明, 单一微生物菌株也有产生多种结构类型化合物的生源合成潜力。只是由于人工培养条件与自然环境的不同, 微生物很多的功能基因都没有表达, 其生源合成能力没有得到发掘。近年, 在国外有学者试图系统地改变培养条件, 比如: 培养基的组成、通氧、培养器皿的选择、加入酶抑制剂等, 来促使单一菌株产生更多数目的代谢产物, 并称这一策略为 “OSMAC (one strain—many compounds) approach”。Axel Zeck 等^[1] 利用这一策略, 成功地使 1 个菌株产生 20 多种不同的代谢产物, 并且产率高于 2.6 g/L。这些化合物涵盖了天然产物所有的结构类型。另外, 在微生物培养基中加入某些简单的有机化合物, 也往往能开启新的代谢产物合成途径。如: Axel Zeck 等添加 0.05% 的邻氨基苯甲酸到海洋微生物 *Halomonas* sp. GWS-BW-H81M 的培养液中, 能完全改变代谢方式产生不同的代谢产物, 使该菌产生桔红色的 2-aminophenoxazin-3-one

chandrananinycin C 和 3 个新的 2-aminophenoxazin-3-one 的衍生物, 这些化合物具有抗菌和抗微生物活性^[2]。通过改变某一培养条件, 高产率地生产代谢产物, 且其中很多化合物在目前或者是将来都无法通过化学工业制备的途径来获得, 这为今后直接通过微生物发酵来制备化学结构多样的、有实际应用价值的产品提供了可能。

海洋细菌 *Zooshikella* sp. SY01, 是从海南三亚海域采集的, 经 16S rRNA 基因序列分析, 并与 Genbank 的数据进行比较, 确定该菌与 *Zooshikella* ganghwensis strain JC2045 具有较高的同源性 (97%), 该菌是一个新的细菌^[3]。用 2216E 对该细菌进行培养, 当培养到第 3 天时培养液出现红色, 同时也产生少量的红色的菌体。培养到第 5 天时, 有大量的红色菌体产生, 培养液呈深红色。经乙酸乙酯提取, 快速硅胶柱层析和 C₁₈ 高效液相色谱分离, 并经 1D 和 2D NMR-MS 分析确定该菌产生的主要红色色素物质为灵菌红素 (prodigiosin) (图 1), 该化合物相对分子质量为 323.2, 具有独特的吡咯吡咯亚甲基吡咯骨架结构, 该化合物具有

* 收稿日期: 2007-07-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20502036 20602044); 广东省自然科学基金资助项目 (05300667)

作者简介: 蓝文健 (1976 年生), 女, 讲师; 通讯联系人: 李厚金; E-mail: ceslh@mail.sysu.edu.cn

强效的抗菌、抗肿瘤、抗疟疾、促进细胞凋亡、以及免疫抑制活性。目前, 寻找新的灵菌红素产生菌, 发现更多新的具该骨架的衍生物, 为开展构效关系的研究以及深入的药物研究开发提供更多的候选化合物已成为一个研究热点^[4]。

本文研究了海洋细菌 *Zooshikella* sp. SY01 在 2216E 培养基中, 分别加入色氨酸、组氨酸、内酯酸、樟脑、柠檬烯、干酪素、二苯胍、香豆素、间二硝基苯等 9 种不同的物质, 用电喷雾质谱 (ESI-MS) 检测了在不同培养条件下代谢产物的产生情况, 初步探讨了不同物质对代谢产物产生的影响, 并评价确定了以 2216E 培养基中加入柠檬烯能促进细菌产生化学结构多样性的代谢产物, 值得以该培养条件开展大规模的发酵以进行深入代谢产物研究。

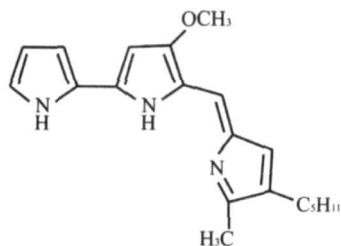


图 1 灵菌红素 (prodigiosin) 的结构

Fig. 1 The chemical structures of prodigiosin

1 实验部分

1.1 菌株和培养基

海洋细菌 *Zooshikella* sp. SY01 样品采自海南三亚海域, 储藏于中山大学化学与化学工程学院天然有机化学研究室。

2216E 培养基组成如下: 蛋白胨 5 g/L, 酵母膏 1 g/L, 柠檬酸亚铁 0.1 g/L, NaCl 19.45 g/L, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 8.8 g/L, $Na_2SO_4 \cdot 10H_2O$ 3.24 g/L, $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 1.8 g/L, KCl 0.55 g/L, NH_4HCO_3 0.16 g/L, KBr 0.08 g/L, $SiCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.034 g/L, HbQ 0.022 g/L, NaSO₄ 0.004 g/L, NaF 0.0024 g/L, NH_4NO_3 0.0016 g/L, K_2HPO_4 0.008 g/L, H_2O 1 L, pH 7.5。

1.2 实验方法

配制共 20 L 的 2216E 培养基, 分装于 1 000 mL 的三角瓶中, 每瓶装液 400 mL, 于 124 °C 灭菌 30 min。灭菌液均分成 10 组, 每组 5 瓶共 2 L, 一组做空白, 其余每组分别加入 200 mg/L 的底物, 底物分别为: 色氨酸、组氨酸、内酯酸、樟脑、柠檬烯、干酪素、二苯胍、香豆素、间二硝基苯。每瓶灭菌液的 *Zooshikella* sp. 接种量为 1 mL, 培养温

度为 28 °C, 摇床的转速为 120 r/min, 每隔 12 h 观察并记录生长状况, 在摇床上培养 5 d 后, 用乙酸乙酯提取培养液, 提取液用 LCQ DECA XP 高效液相色谱-质谱联用仪进行 ESI-MS 分析, 检测质量范围 120~2 000 amu。

2 结果与讨论

从外部观察, 在培养基里面加入色氨酸、组氨酸、干酪素, 对细菌产红色素的速度影响不是很大。加入内酯酸、樟脑、柠檬烯、二苯胍、香豆素则对细菌生长或者灵菌红素的生物合成具有一定的抑制作用, 能明显延迟培养液变红的时间。在间二硝基苯的实验组, 培养液的颜色不变红。一些氨基酸类化合物常被添加到微生物培养液中, 以助于含氮有机化合物的生物合成, 而这里加入的色氨酸、组氨酸、干酪素是否参与了色素类化合物的生源合成, 有待深入研究。樟脑、柠檬烯等亲脂性的化合物对微生物的细胞膜有一定的毒性, 而微生物细胞具有自我调节和保护功能, 能对该类化合物转化或降解以进行解毒, 膜上的部分酶活力增强, 将能得到不同于空白对照条件下的生物代谢过程^[5]。间二硝基苯具有很大的毒性, 对中枢神经系统、肝细胞、生殖细胞有直接的损害。我们也筛选出一批海洋细菌能把间二硝基苯转化为间硝基苯胺和间苯二胺, 微生物还原酶活性增强。在本实验中, 间二硝基苯可能完全抑制了细菌产灵菌红素类化合物。

从 (+) ESI-MS 的检测结果来看, 除间二硝基苯的实验组外, 其余各组均检测到灵菌红素 [m/z 324, $(M+H)^+$], 并且在空白组、色氨酸、内酯酸、樟脑、柠檬烯、以及香豆素组均是最强峰; 分子离子峰为 m/z 322 [$M+H$]⁺ 的另一个红色物质在空白组、色氨酸、组氨酸、内酯酸、樟脑、柠檬烯、干酪素、以及香豆素组也均能产生, 在组氨酸以及干酪素组是最强峰; 在空白组、色氨酸、组氨酸、柠檬烯实验组, 均能检测到相对分子质量较大 (大于 m/z 500) 的化合物, 尤其是在柠檬烯组, 检测到 m/z 391.0 (33%), 680.2 (52%), 899.2 (52%), 927.0 (23%), 984.3 (30%), 986.2 (53%), 1343.4 (28%) 等 (见图 2)。研究含量高的较大相对分子质量的化合物, 发现新的药物先导化合物的可能性大。

本研究表明, 细菌 *Zooshikella* sp. 在不同的培养条件下能够产生不同的代谢产物, 说明了该微生物代谢产物具有丰富的化学结构多样性, 深入研究有望发现新的灵菌红素类化合物和其它的新化合物, 在寻找活性先导化合物方面具有巨大的潜力。

表 1 不同培养条件对细菌 *Zooshikella* sp. SY01 代谢产物产生的影响
Tab 1 The influences of culture conditions on the metabolic production of *Zooshikella* sp. SY01

编号	底物	培养液开始 变红时间 /h	培养 5 d后 培养液的颜色	(+) ESIMS检测结果 (m/z)			
1	空白	48	深红	322.2 (21%) , 900.9 (16%) , 930.1 (8%)	324.3 (100%) , 930.1 (8%)	683.0 (8%) , 706.9 (10%)	
2	色氨酸	48	深红	322.1 (16%) , 683.2 (11%) , 707.0 (12%) , 900.9 (9%) , 928.9 (13%)	324.3 (100%) , 368.2 (13%) , 469.1 (10%)		
3	组氨酸	48	深红	322.2 (100%) , 926.6 (19%)	324.3 (53%) , 704.9 (12%) , 898.4 (19%)		
4	肉酯酸	96	浅红	252.3 (14%) , 663.4 (16%)	322.3 (33%) , 324.3 (100%) , 435.2 (8%)		
5	樟脑	96	浅红	252.3 (14%) , 322.3 (17%) , 324.3 (100%)			
6	柠檬烯	96	浅红	279.1 (25%) , 680.2 (52%) , 986.2 (53%) , 1343.4 (28%) , 1907.7 (11%) , 1965.6 (12%)	322.1 (68%) , 324.4 (100%) , 391.0 (33%) , 899.2 (52%) , 927.0 (23%) , 984.3 (30%)		
7	干酪素	48	红	322.3 (100%) , 324.4 (40%)			
8	二苯胍	96	浅红	212.2 (100%) , 422.8 (7%) , 458.9 (7%)	324.3 (13%) , 422.8 (7%) , 458.9 (7%)		
9	香豆素	96	浅红	252.3 (16%) , 322.2 (21%) , 324.3 (100%) , 459.0 (20%)			
10	间二硝基苯	不变红	不变红	212.2 (100%)			

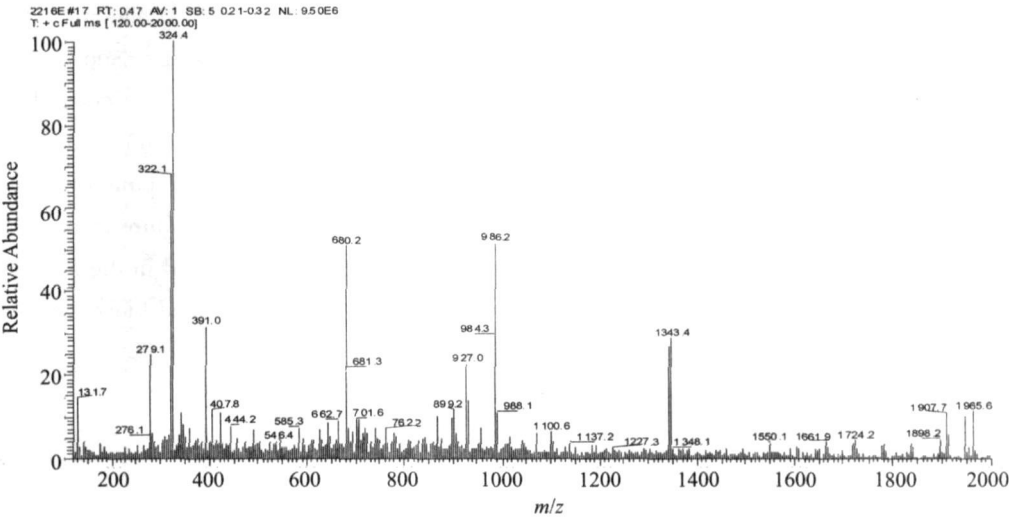


图 2 在 2216E 培养基加入柠檬烯培养细菌得到的代谢产物的质谱图
Fig 2 Mass spectrum of bacterial metabolites obtained from 2216E culture media containing limonene

微生物的代谢产物粗提取物不经分离、通过直接进样进行质谱分析 (direct infusion mass spectrometry DMS), 能获得代谢产物的相对分子质量, 通过测定的相对分子质量相应的数据库, 如: Dictionary of Natural Products (Chapman & Hall) 进行检索, 可初步判定这些分子量所对应的化合物是新或旧的。这种快速地鉴别提取物中的已知化合物的方法被称为“dereplication”技术。该技术能有效避免传统天然产物研究方法带来的耗时和资金浪费, 促使我们经济、高效地发现更多新的、有各种应用价值的天然产物^[9]。

参考文献:

[1] BODE H B, BETHE B, HÖFS R, et al. Big effects from small changes: Possible ways to explore nature's chemical diversity[J]. Chem Bio Chem, 2002, 3(7): 619—627
[2] BITZER J, GROSSE T, WANG L, et al. New amino phenoxazinones from a marine *Halomonas* sp.: fermentation, structure elucidation and biological activity[J]. J Anti biotics, 2006, 59(2): 86—92
[3] YIH CHANG Y H, CH H W, et al. *Zooshikella* *ganghwensis* gen. nov., sp. nov., isolated from tidal flat sediments[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53(4): 1013—1018

- [4] LI H J, LAN W J, CAI C H, et al. The bioactive p~~in~~enins from marine bacteria *Pseudomonas* sp. // ZHU Y Z, et al. NATURAL PRODUCTS: Essential Resources for Human Survival. Singapore [M]. World Scientific Publishing Company 2007: 188—194.
- [5] LI H J, LAN W J, CAI C H, et al. Biotransformation of limonene by marine bacteria [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry 2006, 34(7): 946—950.
- [6] SASHIDHARA K V, ROSAIAH J N. Various dereplication strategies using LC-MS for rapid natural product lead identification and drug discovery [J]. Natural Product Communications 2007, 2(2): 193—202.

Studies on the Culture Condition of New Marine Bacterium *Zooshikella* sp. SY01

LAN Wen-jian¹, MO Lin-feng², CAI Chuang-hua³, ZHOU Yi-ping⁴, YAO Jun-hua⁴, LI Hou-jin¹

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

3. South China Sea Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China;

4. Instrumental Analysis and Research Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract New marine bacterium *Zooshikella* sp. SY01, producer of prodigiosin, was isolated from the seawater of Sanya Bay. The culture conditions of this bacterium were investigated. *Zooshikella* sp. SY01 was cultured in 2216E media which contained tryptophan, histidine, lactic acid, camphor, limonene, casein, diphenylguanidine, coumarin and 1, 3-dinitrobenzene, respectively. After 5 days cultivation, the extracts were detected by direct infusion mass spectroscopy using positive ESI mode. As a result, tryptophan, histidine and casein didn't show any observable influences on the biosynthesis of prodigiosin. Lactic acid, camphor, limonene, diphenylguanidine, coumarin could inhibit the bacterium growth and prodigiosin biosynthesis to a certain extent, slower the culture broth to turn red. However, 1, 3-dinitrobenzene inhibited the bacteria to produce prodigiosin completely. MS data suggested that various metabolites with chemodiversity were produced in different culture media. In particular, a series of high molecular weight compounds with high relative abundances were observed in the medium containing limonene. To further optimize the culture condition, more new prodigiosin analogues and bioactive compounds can be obtained and the goal of "one strain many compounds" can be achieved.

Key words marine bacterium, *Zooshikella* sp. SY01, culture, prodigiosin