

以四氢嘧啶为主要相容性溶质的中度嗜盐菌 I15 的分离和特性研究

何 健 汪 婷 孙纪全 顾立锋 李顺鹏*

(南京农业大学生命科学院 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室 南京 210095)

摘 要: 从草地土壤中分离到一株中度嗜盐菌 I15 经过 16S rDNA (GenBank 登录号为 DQ010162) 序列分析、形态学和生理生化特征分析, 该菌株初步鉴定为 *Virgibacillus marismortui*。I15 能在 0% ~ 25% NaCl 的培养基中生长, 最适生长 NaCl 浓度为 10%, 最适生长温度为 30℃, 最适 pH 为 7.5 ~ 8.0。在高盐条件下, I15 细胞内主要的相容性溶质为四氢嘧啶, 在 15% NaCl 培养基中其含量达到 1.608 mmol/(g·cdw), 占到相容性溶质总摩尔含量的 89.6%。渗透冲击试验表明 I15 细胞内四氢嘧啶在低渗冲击时能够快速分泌到细胞外, 在高渗冲击剂时能够较快地重新合成。

关键词: 中度嗜盐菌 相容性溶质 四氢嘧啶 细菌泌乳工艺

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-6209(2005)06-0900-05

近年来, 存在于中度嗜盐菌 (Moderately halophilic bacteria) 中的一类被称为“相容性溶质” (Compatible solutes) 的物质越来越被人们所关注。相容性溶质一词最早是由澳大利亚人 Brown 于 1972 年提出, 这类物质一般是有机小分子如氨基酸、多元醇、甜菜碱和四氢嘧啶等, 其特点是高度水溶性、不带静电荷、没有活性基团, 在细胞内高浓度积累可以平衡外界渗透压, 但不会影响生物大分子如蛋白质和核酸正常的生理功能。四氢嘧啶 (ectoine, 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid) 是大多数中度嗜盐菌中主要的相容性溶质^[1~4]。最近的研究发现, 四氢嘧啶可以稳定天然蛋白质的水合层, 保护酶、DNA 等生物大分子和细胞膜结构, 帮助细胞抵抗冷冻、干旱、高温、高盐、辐射等各种逆境。目前四氢嘧啶已经开发出许多商业用途, 比如酶的稳定剂、微生物的保护剂、护肤品中的保湿剂、用于化疗中健康细胞的保护剂等; 德国 Merck kGaA 公司开发出一种以四氢嘧啶为主要成分的化妆品, 并以“Rona Care Ectoin”品牌进行销售^[1]。

四氢嘧啶含有一个手性碳原子, 很难用化学方法来合成。目前国外利用一种新型的生物技术细菌泌乳工艺 (Bacterial milking) 来生产四氢嘧啶 (或其它相容性溶质)^[5]。其原理是将在高盐培养基中培养的积累高浓度四氢嘧啶的中度嗜盐菌细胞转移到低渗溶液中, 为了维持细胞内外渗透压平衡, 细胞会将积累的相容性溶质释放到细胞外 (“泌乳”); “泌乳”后的细胞再送回高盐培养基中培养, 通过高渗与低

渗环境的反复交替, 刺激菌体大量合成四氢嘧啶, 配合高密度发酵可以实现四氢嘧啶的工业化生产。国外进行细菌泌乳工艺研究采用的菌株一般为革兰氏阴性菌株, 如已报道的菌株有短杆菌 (*Brevibacterium* sp. JCM6894), 延长盐单胞菌 (*Halomonas elongata*), 盐脱氮盐单胞菌 (*Halomonas halodenitrificans*) 等^[5,6]。而利用革兰氏阳性的中度嗜盐芽孢类杆菌进行细菌泌乳工艺的研究还未见报道; 国内中国科学院微生物研究所、中国农业大学等单位在中度嗜盐菌生态、生理和分类等方面进行了较多的研究^[3,7,8], 但目前还未开展细菌泌乳工艺菌株筛选与工艺条件方面的研究。

本文从草地土壤中分离筛选到一株中度嗜盐芽孢类杆菌 I15, 对其生物学特性和渗透冲击研究结果表明此菌株具备细菌泌乳工艺条件, 为国内开展细菌泌乳工艺生产相容性溶质的研究和应用提供了一个极好的材料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 培养基: 每升含牛肉膏 3.0g, 蛋白胨 10.0g, NaCl 视需要添加, pH 7.5。固体培养基加入 2% 琼脂。

1.1.2 土壤样品: 土壤样品采集于南京农业大学校园草地土壤, 取土壤表面 0 ~ 10cm 左右内土壤。

1.1.3 主要试剂和仪器: 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* 酶、4 种 dNTP 等购自 TaKaRa 公司; IPTG 和 X-Gal 购自 Amresco 公司; 氨基酸测定试剂盒购自

基金项目 国家自然科技资源平台项目 (2004DKA30560-2)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-25-84396314; E-mail lsp@njau.edu.cn

作者简介 何 健 (1973 -) 男, 南京农业大学讲师, 博士研究生, 研究方向为环境微生物学。E-mail hejian@njau.edu.cn

收稿日期 2005-05-13, 修回日期 2005-07-21

南京建成生物工程公司 ;PCR 仪为美国 MJ 公司的 PCT-200 型 ;高效液相色谱仪为美国 Waters 公司的 waters600 型 ;检测器为紫外检测器 ,工作波长 215nm ,分离柱为 20cm 长内填有 C₁₈ 的反相柱。

1.2 菌株的分离筛选

将供试土壤样品于含 15% NaCl 的无菌盐水中进行梯度稀释 ,稀释液涂布于含 15% NaCl 的培养基平板上 ,30℃ 培养 ;将单菌落划线纯化 ,初筛生长速度快 ,适应盐浓度范围广的菌株 ;复筛筛选细胞内四氢嘧啶含量高的菌株。

1.3 菌株的鉴定

1.3.1 株的形态和生理生化 :参照文献 [9] 进行。

1.3.2 菌株 16S rDNA 分析 :采用细菌的 16S rDNA 通用引物 ,正向引物 :5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (*Escherichia coli* 16S rDNA 对应位置为 8 ~ 27) ,反向引物 :5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' (*E. coli* 16S rDNA 对应位置为 1541 ~ 1522) ,由上海博亚生物技术有限公司合成。PCR 反应体系(25μL) :模板 (I15 总 DNA)1μL ,dNTP(各 2.5mmol/L)2μL ,引物 (1mmol/L)各 1μL ,10 × *Taq* 缓冲液 2.5μL ,Mg²⁺ (25mmol/L)1.5μL ,*Taq* 酶(5U/μL)0.3μL ,无菌超纯水 15.7μL。PCR 条件 :95℃ 3min ;94℃ 1min ,52℃ 1min ,72℃ 3min ,循环 50 次 ,72℃ 10min。PCR 产物用 Vitagene Gel Extraction Kit 纯化后 ,与 pMD18-T 载体连接 ,转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞 ,在含有 IPTG 和 X-Gal 的 LB(含 100mg/L Amp)平板上进行蓝白斑筛选 ,挑取白色菌落 ,提取质粒验证后 ,交由上海博亚生物技术有限公司测定插入片段序列 ,分子操作详细步骤参照文献 [10]。序列登录 GenBank 进行比对 ,从 GenBank 中调取亲缘关系近的芽孢类杆菌 13 个菌株的 16S rDNA 序列用于系统发育学的分析 ,16S rDNA 全序列用 MEGA version 2 软件包排序 ,选择 *Bacillus aquamaris* 为外群 ,用 MEGA version 2 软

件包中的 Kimura2-Parameter Distance 模型计算进化距离 ,用 Neighbor-Joining 法构建系统发生树 ,1000 次随机抽样 ,计算自引导值(Bootstrap)以评估系统发生树的置信度。

1.4 相容性溶质的提取和测定

1.4.1 相容性溶质的提取 :参照文献 [11] 进行 ,如测定四氢嘧啶则冻干粉用 500μL 80% (V/V)乙腈溶解 ,如测定氨基酸和甜菜碱则冻干粉用 500μL 水溶解。

1.4.2 四氢嘧啶含量的测定 :参照文献 [11] 进行。

1.4.3 甜菜碱含量的测定 :碘结晶沉淀法 ,参照文献 [12] 进行。

1.4.4 氨基酸含量的测定 :茚三酮比色法 ,按南京建成生物工程公司提供的使用说明书进行。

2 结果和分析

2.1 I15 的分离筛选

土壤样品稀释液涂布于以 15% NaCl 作为选择压力的 LB 培养基经 30℃ 培养 5d 后 ,LB 培养基平板上长出多种形态的菌落 ,菌落数量在 1.5 ~ 5.5 × 10⁴ CFU/g 干土 ;根据菌落特征和个体形态特征的不同 ,从平板上分离纯化到 19 株能在 15% NaCl LB 培养基中生长的细菌 ,将这 19 个菌株分别接种到低盐 LB 培养基(NaCl 浓度从 0% ~ 5%)和高盐 LB 培养基(NaCl 浓度从 15% ~ 25%)30℃ 培养 ,考察各菌株的菌落大小、厚度和适应盐浓度变化范围 ;从这 19 个菌株中筛选到生长快 ,能在 0% ~ 20% NaCl LB 培养基中生长的菌株 5 株 ,分别命名为 I6、I15、I100、I101 和 I122。将这 5 个菌株于 15% NaCl LB 培养基中培养后 ,提取相容性溶质 ,对四氢嘧啶含量进行了测定。表 1 结果表明菌株 I15 细胞内四氢嘧啶含量最高 ,达到 1.63mmol(g·cdw) ,选择 I15 作为进一步研究的材料。

表 1 分离菌株细胞内四氢嘧啶含量

Table 1 Intracellular ectoine concentration in isolated strains					
Stains	I6	I15	I100	I101	I122
Ectoine level[mmol(g·cdw)]	1.21 ± 0.13	1.63 ± 0.11	1.52 ± 0.13	1.49 ± 0.12	1.60 ± 0.15

2.2 I15 的鉴定

在 15% NaCl 的 LB 培养基平板上 ,I15 菌落大且厚实 ,呈淡黄色 ,不透明 ,边缘圆整 ,表面光滑、平坦、不隆起 ,I15 菌体形态为杆状 ,大小为(0.7 ~ 1.0)μm × (2.5 ~ 4.0)μm ,革兰氏染色阳性 ,周生鞭毛 ,产中生芽孢 ,但芽孢形成率非常低 ,在 1% 以下 ,芽孢囊

不膨大(图 1) ;I15 在 15℃ ~ 45℃ 范围内均能生长 ,最适生长温度为 30℃ ;在 pH6.5 ~ 9.5 范围内均能生长 ,最适生长 pH 为 7.5 ~ 8.0 ,稍偏碱性 ;I15 氧化葡萄糖产酸 ,氧化酶试验阳性 ,接触酶试验阳性 ,硝酸盐还原阴性 ,VP 试验阴性 ,吡唑试验阴性 ,淀粉水解阳性 ,不产 H₂S ;I15 能较好地利用葡萄糖、果

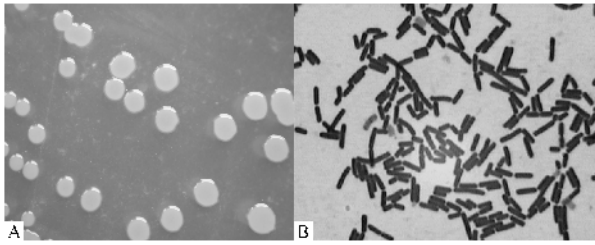


图 1 (A) I15 的菌落形态 (B) I15 的菌体形态(1000 ×)

Fig.1 (A) The colony morphology of stains I15 ; (B) The cell morphology of stains I15(1000 ×)

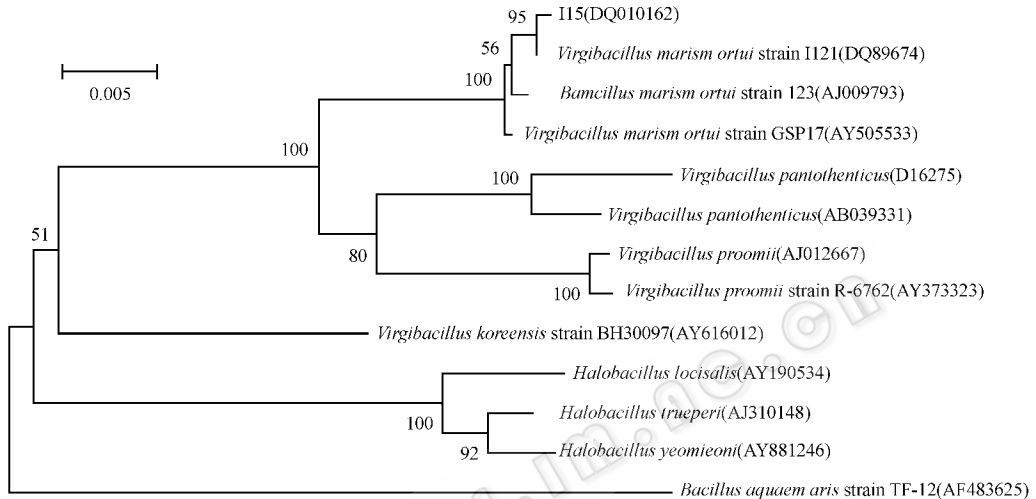


图 2 基于 16S rDNA 序列同源性的菌株 I15 和相关芽孢类杆菌的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequences showing the relationships of strain I15 with the most close related *Bacillus*. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar , 0.5% sequence divergence.

2.3 I15 在不同盐浓度培养基中的生长情况

I15 适应盐浓度范围非常广(图 3-A),能在含 0 ~ 25% NaCl 的 LB 培养基中生长 ,最适生长盐浓度为 10% ,在 0 ~ 15% NaCl 的 LB 培养基中生长非常迅速 ,在 15% NaCl 的 LB 培养基中 ,对数生长期的 I15 代时为 35min 左右。

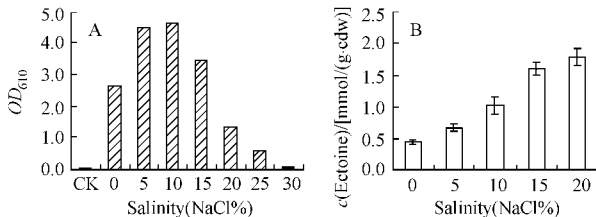


图 3 (A) I15 在不同盐浓度的 LB 培养基中的生长情况 ; (B) 盐浓度对 I15 细胞内四氢嘧啶积累的影响

Fig.3 (A) Growth of I15 in LB medium with different salinity ; (B) Effect of salinity on the accumulation of intracellular ectoine in I15 cell

2.4 I15 细胞内相容性溶质种类含量与盐浓度变化的关系

由于 15% NaCl LB 培养基中培养的 I15 细胞内

糖、乳糖、甘油、蔗糖和淀粉等各种碳源 ,但不能利用四氢嘧啶作为碳源。

I15 的 16S rDNA 有 1530bp(GenBank 登录号为 DQ010162) ,在 GenBank 中 BLAST 结果显示与枝芽孢杆菌属(*Virgibacillus*)细菌有较高的同源性 ,图 2 为 I15 的 16S rDNA 与其它芽孢类细菌 16S rDNA 构建的系统发育树 ,结合形态和生理生化特征 ,将 I15 初步鉴定为 *Virgibacillus marismortui*(又名 *Bacillus marismortui* 和 *Salibacillus marismortui*)^[13,14]。

四氢嘧啶含量很高 ,为获得理想的 HPLC 图谱 ,在进行 HPLC 检测时 ,将 I15 细胞提取物稀释 2000 倍进样 ,得到的四氢嘧啶标准物和 I15 细胞提取物的 HPLC 图谱(图 4) ,结果表明 I15 细胞提取物由于稀释倍数很高 ,杂质峰已经很少 ,但有一个和四氢嘧啶标样峰形特征和出峰时间均一致的吸收峰 ,说明 I15

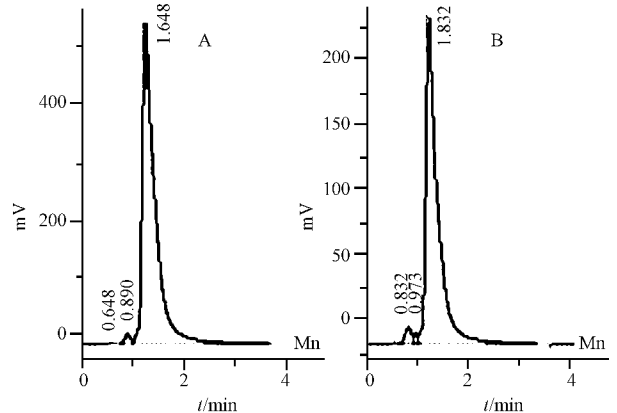


图 4 四氢嘧啶标样 (A) 和 I15 细胞提取物 (B) 的 HPLC

Fig.4 HPLC spectra of ectoine(A) and I15 cell extraction(B)

细胞内含有高浓度的四氢嘧啶 ,且细胞内的四氢嘧啶含量与培养基中盐浓度呈正相关(图 3-B)。

2.5 I15 细胞内相容性溶质组成及分泌

提取并测定了在 15% NaCl 培养基中培养的 I15 细胞内各种相容性溶质含量(表 2)。I15 细胞内的主要相容性溶质为四氢嘧啶 ,占相容性溶质总摩尔含量的 89.6% ,游离氨基酸占 8.8% ,而甜菜碱仅占 1.4%。

为考察 I15 细胞内相容性溶质能否向外分泌 ,模拟细菌泌乳工艺过程 ,将 15% NaCl 培养基中培养的 I15 细胞接入 2% NaCl 溶液中进行低渗冲击处理 10min ,测溶液中各相容性溶质含量 ;结果(表 2)表明经过 10min 的低渗冲击处理 ,细胞内约 70% 四氢嘧啶能从细胞内释放 ;与细胞内相容性溶质组成相比 ,释放到低渗溶液中的四氢嘧啶摩尔百分含量由 89.6% 上升到 94.0% ,而氨基酸的摩尔百分含量则由 8.8% 下降到 4.8% ,四氢嘧啶占有如此高的比重对细菌泌乳工艺后期产物提取纯化是非常有利的。

表 2 I15 细胞内及泌乳到溶液中的相容性溶质组成和含量
Table 2 Comparison of the compatible solutes content of I15 and product solution obtained through bacterial milking

Compatible solutes	Cytoplasm		Product solution	
	mmol(g·cdw ⁻¹)	Mol%	mmol/L	Mol%
Ectoine	1.608 ± 0.144	89.6	31.6 ± 3.8	94.0
Betaine	0.025 ± 0.007	1.4	0.41 ± 0.08	1.2
Free amino acid	0.164 ± 0.019	8.8	1.57 ± 0.17	4.8

2.6 I15 细胞内四氢嘧啶的重新合成

为考察高渗冲击过程中 ,细胞内四氢嘧啶重新合成的情况 ,将低渗透冲击后的 I15 细胞离心 ,接入 15% NaCl 的 LB 培养基中悬浮 ,进行高渗冲击 ,定时取样测定 I15 细胞内四氢嘧啶含量的变化 ;结果表明(图 5)在高渗冲击条件下 ,I15 细胞内的四氢嘧啶能迅速合成以抵御外界的渗透压 ,在 4-5h 内细胞内的四氢嘧啶恢复到正常水平的 90% 以上。

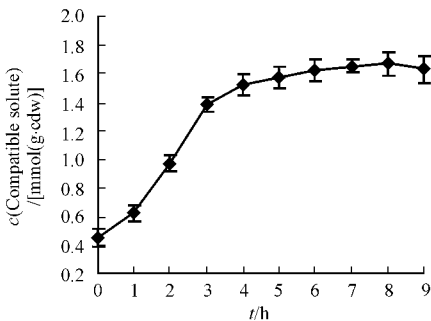


图 5 高渗冲击条件下细胞内四氢嘧啶的重新合成
Fig.5 Resynthesis of ectoine after hyperosmotic shock

3 讨论

细菌泌乳工艺是一种新型的生物发酵工艺 ,具有巨大的应用前景。获得一个性能优良的菌株是细菌泌乳工艺取得成功的关键 ;一般来说 ,用于细菌泌乳工艺的菌株必须满足以下几点要求 :①有广泛的盐浓度耐受范围 ,在低盐和高盐环境中都能生长良好 ;②细胞内相容性溶质组成较单一 ,便于产物回收纯化 ;③低渗冲击时相容性溶质会快速向环境中释放 ;④当所选菌株转入高渗环境中时 ,能够很快重新合成相容性溶质 ;⑤细胞要经得起高渗与低渗环境的反复交替(多达 9 轮)而不死亡。据报道海球菌 *Marinococcus* M52 在低渗冲击时 ,几乎没有观察到相容性溶质的释放 ,但是发现细胞吸收胞外水分而膨胀 ,细胞湿重上升了约 35% ,这可能是由于革兰氏阳性细菌的细胞壁结构坚韧 ,且其细胞膜上缺乏相容性溶质通道蛋白的缘故 ,所以一般认为革兰氏阳性细菌不适合细菌泌乳工艺^[5]。国外进行细菌泌乳工艺研究采用的菌株一般为革兰氏阴性菌株 ,如已报道的菌株有短杆菌(*Brevibacterium* sp. JCM6894) ,延长盐单胞菌(*Halomonas elongata*) ,盐脱氮盐单胞菌(*Halomonas halodenitrificans*)^[1,5] ;阳性菌株海球菌 *Marinococcus* M52 虽也进行过四氢嘧啶的生物发酵 ,但采取的工艺是一次培养工艺(而不是细菌泌乳工艺) ,产物用细胞破碎法提取^[1,5]。而我们分离的 I15 为革兰氏阳性的芽孢杆菌适应盐浓度范围广 ,生长速度快 ,细胞内四氢嘧啶含量高[与已报道的延长盐单胞菌 *Halomonas elongata* (DSM 142^T) 相当^[5]] ,其它相容性溶质含量低 ,且在渗透冲击条件下 ,细胞内的四氢嘧啶能快速释放出来 ,重新进入高渗环境中后细胞内四氢嘧啶能快速重新合成 ,所以 I15 应该符合进行细菌泌乳工艺菌株的要求 ,同时也认为革兰氏阳性细菌也可以作为细菌泌乳工艺的备选菌株 ,这需要进行更深入细致的实验对 I15 进行细菌泌乳工艺的可行性、工艺参数和生物学机制研究。

参 考 文 献

[1] Antonio V , Joaquín J , Nieto A O. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* , 1998 , 62(2) : 504 – 544.
[2] Oren A. Diversity of halophilic microorganisms : Environments , phylogeny , physiology , and applications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* , 2002 , 28 : 56 – 63.
[3] 任培根 ,周培瑾. 中度嗜盐菌的研究进展. *微生物学报* , 43 (3) : 427 – 431
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [4] 王颖群, 陶涛. 微生物渗透压调节过程中的相容性溶质. 微生物学通报. 1994, **21**(5): 293 – 296.
- [5] Thomas S, Erwin A G. Bacterial milking: A novel bioprocess for production of compatible solutes. *Biotechnology and Bioengineer*, 1998, **57**(3): 306 – 313.
- [6] Eric F, Thomas S, Erwin A G. Production of hydroxyectoine: high cell-density cultivation and osmotic downshock of *marinococcus* strain M52. *Journal of Biotechnology*, 1995, **43**: 53 – 61.
- [7] 曾静, 龚岳坦, 杨苏声. 新疆地区盐湖的中度嗜盐菌的数值分类. 微生物学通报 2002 **29**(3): 8 – 13.
- [8] 曾静, 龚岳坦, 王磊, 等. 新疆地区盐湖的中度嗜盐菌 16S rDNA 全序列及 DNA 同源性分析. 微生物学报, 2002 **42**(2): 133 – 137.
- [9] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1978.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 侯云德, 等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1996.
- [11] Anne U K, Erhard B. Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* spp. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(2): 772 – 783.
- [12] Grieve C M, Grattan S R. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. *Plant and Soil*, 1983, **70**: 303 – 307.
- [13] Arahall D R, Marquez M C, Volcani B E, et al. *Bacillus marismortui* sp. nov., a new moderately halophilic species from the Dead Sea. *Int J Syst Bacteriol*, 1999, **49**: 521 – 530.
- [14] Jeroen H, Niall A L, Hans-Jürgen B, et al. *Virgibacillus carmonensis* sp. nov., *Virgibacillus necropolis* sp. nov. and *Virgibacillus picturae* sp. nov., three novel species isolated from deteriorated mural paintings, transfer of the species of the genus *Salibacillus* to *Virgibacillus*, as *Virgibacillus marismortui* comb. nov. and *Virgibacillus salexigens* comb. nov., and emended description of the genus *Virgibacillus*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, **53**: 501 – 511.

Isolation and characteristic of a moderately halophilic bacterium accumulated ectoine as main compatible solute

HE Jian WANG Ting SUN Ji-quan GU Li-feng LI Shun-peng*

(Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: A moderately halophilic bacterium (designated strain I15) was isolated from lawn soil. Based on the analysis of 16S rDNA (GenBank accession number DQ010162), morphology, physiological and biochemical characteristics, strain I15 was identified as *Virgibacillus marismortui*. This strain was capable of growing under 0% ~ 25% NaCl, and exhibited an optimum NaCl concentration of 10% and an optimum temperature of 30°C and an optimum pH of 7.5 ~ 8.0 for its growth, respectively. Under hyperosmotic stress, strain I15 accumulated ectoine as the main compatible solute. Under 15% NaCl conditions the intracellular ectoine can reach to 1.608 mmol (g · cdw), accounted for 89.6% of the total compatible solutes. The biosynthesis of ectoine was under the control of osmotic, and the accumulated ectoine synthesized intracellularly can be released under hypoosmotic shocks and resynthesized under hyperosmotic shock rapidly.

Key words: Moderately halophilic bacterium, Compatible solutes, Ectoine, Bacterial milking