

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49 (12) :1590 – 1595 ; 4 December 2009
ISSN 0001 – 6209 ; CN 11 – 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

Cobetia marina CICC10367 渗透压冲击下羟基四氢嘧啶的合成及释放

郎亚军, 任亚男, 柏林, 张苓花*

(大连海事大学环境科学与工程学院, 大连 116026)

摘要: 【目的】筛选获得耐受渗透压冲击的羟基四氢嘧啶合成菌株, 利用“细菌挤奶”工艺提高羟基四氢嘧啶的产率。【方法】从盐池中分离羟基四氢嘧啶合成菌株, 并对其进行形态、生理生化及 16S rDNA 鉴定。考察了培养基及其 NaCl 浓度对羟基四氢嘧啶合成的影响, 在优化的条件下利用“细菌挤奶”工艺制备羟基四氢嘧啶。【结果】筛选获得的一株羟基四氢嘧啶合成菌株, 鉴定为 *Cobetia marina* CICC10367 (*C. marina* CICC10367)。NaCl 浓度为 90 g/L 的、谷氨酸单钠为唯一碳氮源的培养基有利于羟基四氢嘧啶合成, 最高合成量为 694.5 mg/L。6 次渗透压冲击的细菌挤奶, 羟基四氢嘧啶的总合成量 4179.0 mg/L, 产率 597.0 mg/L/d, 羟基四氢嘧啶对底物的转化率为 80.2 mg/g。【结论】筛选获得的菌株 *C. marina* CICC10367 在 NaCl 诱导下合成羟基四氢嘧啶, 该菌株耐受渗透压冲击, 利用细菌挤奶工艺显著地提高了该菌株羟基四氢嘧啶的产率和转化率。

关键词: *Cobetia marina*; 羟基四氢嘧啶; 渗透压冲击; 细菌挤奶

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2009) 12-1590-06

四氢嘧啶类物质是中度嗜盐菌应答环境高渗透压胁迫所合成的渗透压补偿溶质^[1], 主要包括四氢嘧啶 (1,4,5,6-四氢-2-甲基-4-嘧啶羧酸) 和羟基四氢嘧啶 (1,4,5,6-四氢-2-甲基-5-羟基-4-嘧啶羧酸)。同其它渗透压补偿溶质相比, 四氢嘧啶特别是羟基四氢嘧啶作为酶的抗逆 (抗热、抗冷冻、抗干燥等) 保护剂性能优越^[2-3]; 羟基四氢嘧啶在大肠杆菌长期保存过程中显著地减少了其菌株活力的降低^[4]; 羟基四氢嘧啶还可以通过干扰疏水作用和 π - π 键的相互作用, 阻止在阿尔兹海默氏症发病机制中起着重要作用的 A β 42 聚合体的形成^[5]。羟基四氢嘧啶在化妆品、食品、生物制剂和制药等领域具有广泛的应用前景^[6-7]。然而, 羟基四氢嘧啶分子结构中含有两个手性碳原子, 难以化学合成^[8], 因此, 通过筛选羟

基四氢嘧啶合成菌株及其合成条件的研究提高其产率, 已成为该领域的研究热点。

文献报道的羟基四氢嘧啶合成菌株有海球菌 (*Marinococcus* sp. M52)、嗜盐海球菌 (*Marinococcus halophilus* DSM 20408^T)、伸长盐单胞菌 (*Halomonas elongata* DSM 142^T)、喜海水盐单胞菌 (*Halomonas halmophila* CCM 2833)、嗜盐盐单胞菌 (*Halomonas halophila* CCM 3662)、色盐杆菌 (*Chromohalobacter salexigens* DSM 3043^T)、扩展短杆菌 (*Brevibacterium linens* DSM 20425^T) 和嗜盐假单胞菌 (*Pseudomonas halophila* DSM 3050^T) 等^[8-12]。羟基四氢嘧啶多采用分批或分批补料的发酵工艺, Frings 等报道的 *Marinococcus* sp. M52 的羟基四氢嘧啶发酵, 1.5 L 工作体积发酵罐的分批补料发酵, 合成量达到 7 g/L

基金项目: 国家自然科学基金 (20776021)

* 通信作者。Tel: +86-411-84723926; E-mail: dlzlh2008@163.com

作者简介: 郎亚军 (1979-) 女, 吉林九台人, 博士研究生, 主要从事环境微生物研究。E-mail: posy1008@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-05-07; 修回日期: 2009-06-26

(发酵 142 h) 产率为 1.2 g/L/d, 是截止目前文献报道的最高水平。^[1] 四氢嘧啶发酵工艺研究中, Sauer 等采用“细菌挤奶 (bacteria milking)”工艺, 即 *H. elongata* DSM 142^T 在较高盐浓度 (15% NaCl) 下进行分批流加的高密度发酵, 细胞合成四氢嘧啶, 然后收集细胞, 转入 3% NaCl 的低渗溶液中 (低渗冲击), 细胞迅速释放胞内四氢嘧啶 (约释放总合成量的 64%)。释放了胞内四氢嘧啶的细胞返回至 15% NaCl 的培养基 (高渗冲击), 诱导合成四氢嘧啶。然后再进行低渗冲击释放。重复循环这种渗透压冲击过程, 大幅度地提高了四氢嘧啶的合成量^[1]。目前在羟基四氢嘧啶发酵工艺的研究中还没有细菌挤奶工艺的报道。

本文为了获得羟基四氢嘧啶发酵产率高的、且能够适合于细菌挤奶工艺的菌株, 从盐池中分离了一株羟基四氢嘧啶合成菌株, 对其进行形态、生理生化及 16S rDNA 鉴定, 考察了培养条件对羟基四氢嘧啶合成的影响, 并利用细菌挤奶工艺进行羟基四氢嘧啶合成的研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 培养基: MG 培养基 (g/L), 谷氨酸单钠 40, KH₂PO₄ 3, K₂HPO₄ 9, MgSO₄·7H₂O 0.4, MnSO₄·4H₂O 0.01, pH 7.0。PY 培养基^[3]。BP 培养基^[4]。BM 培养基^[1]。MM63 培养基^[5]。上述培养基中均加入 120 g/L NaCl。

1.1.2 主要试剂和仪器: 16S rDNA Bacterial Identification PCR kit (D310) 试剂盒 [中国宝生物工程 (大连) 有限公司]。羟基四氢嘧啶 (1,4,5,6-tetrahydropyrimidine-2-methyl-5-hydroxy-4-carboxylic acid, BIOMOL 公司, 德国)。高效液相色谱仪 P230 (中国大连依利特分析仪器有限公司), TSK-GEL 反向色谱柱 (TOSOH 公司, 日本)。核磁共振波谱仪 Varian INOVA 400 M (Varian 公司, 美国)。

1.2 菌种分离纯化及分类鉴定

从盐池中采集的分离样品于 120 g/L NaCl 的无菌盐水中进行梯度稀释, 稀释液涂布于 BP 培养基平板上, 30℃ 培养。将单菌落划线纯化, 初筛在 NaCl 浓度为 5~200 g/L 的 BP 培养基平板上生长速度快、适应盐浓度范围广的菌株, 复筛筛选合成羟基四氢嘧啶的菌株。菌株的形态和生理生化鉴定参照文献 [16] 进行。16S rDNA 鉴定采用 16S rDNA Bacterial Identification PCR kit (D310) 试剂盒, 按试剂

盒操作说明进行。16S rDNA 序列测定委托宝生物工程 (大连) 有限公司进行。

1.3 摇瓶发酵

菌种 30℃ 活化 24 h, 以 1% 接种量转接至发酵培养基中 (30 mL/300 mL), 30℃, 120 r/min 摇床培养。

1.4 羟基四氢嘧啶测定

羟基四氢嘧啶浓度用每 L 发酵液的细胞中所含的羟基四氢嘧啶质量表示 (mg/L)。高效液相色谱 (HPLC) 测定羟基四氢嘧啶浓度^[7]。

1.5 羟基四氢嘧啶鉴定

按文献 [17] 方法抽提细胞内羟基四氢嘧啶。按文献 [9] 方法纯化羟基四氢嘧啶。按文献 [17] 方法氢核磁共振 (¹H-NMR) 鉴定羟基四氢嘧啶。

1.6 细胞干重测定

参照文献 [8] 方法进行。最小二乘法拟合细胞干重 (CDW) 与 OD₆₀₀ 之间的函数关系为: CDW = 0.0186 × OD² + 1.189 × OD。

1.7 渗透压冲击下羟基四氢嘧啶的合成及释放

参照文献 [9] 方法进行。在 90 g/L NaCl 的 MG 培养基中进行高渗冲击, 诱导合成羟基四氢嘧啶, 在 30 g/L NaCl 水溶液中进行低渗冲击, 释放胞内羟基四氢嘧啶。

2 结果和分析

2.1 羟基四氢嘧啶合成菌株的分离

从盐池中分离筛选的一株菌, 经 MM63 培养基培养后, HPLC 测定其细胞抽提物中含有羟基四氢嘧啶。进一步进行¹H-NMR 鉴定, 结果见图 1。

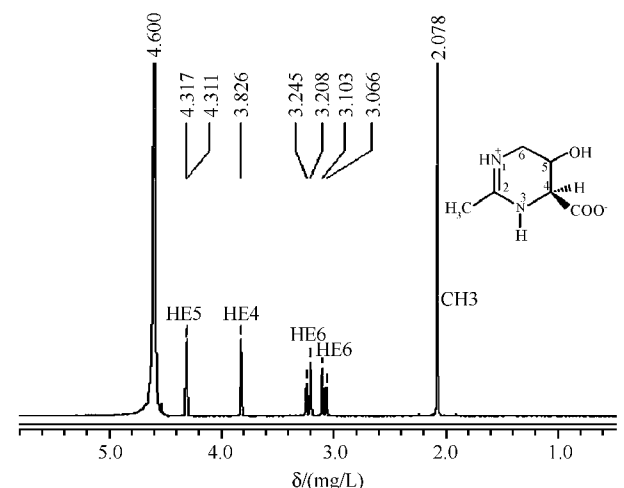


图 1 羟基四氢嘧啶的¹H-NMR 鉴定

Fig. 1 ¹H-NMR identification of hydroxyxectoine.

$^1\text{H-NMR}$ 谱图中呈现的特征峰与文献报道的羟基四氢嘧啶特征峰一致^[8],表明该菌株在 NaCl 诱导下合成羟基四氢嘧啶。

2.2 羟基四氢嘧啶合成菌株的分类鉴定

分离的羟基四氢嘧啶合成菌株细胞呈直杆状;生长温度范围为 $10^\circ\text{C} \sim 42^\circ\text{C}$,生长 pH 范围为 pH 5~10,生长 NaCl 浓度范围为 5~200 g/L;氧化酶阴性, β -半乳糖苷酶阳性,七叶灵水解阴性,酪蛋白水解阳性,DNA 水解阳性,明胶水解阴性;以葡萄糖、甘油、肌醇和甘露醇为唯一碳源生长,以阿拉伯糖、乳糖、蔗糖、甘露糖、组氨酸和山梨醇为唯一碳源不生长,甲基红阴性,硝酸盐还原阴性, H_2S 产生阴性,苯丙氨酸脱氨酶阴性,脲酶阳性;G+C 含量为 63 mol%。16S rDNA 鉴定结果显示与 *Cobetia marina* DSM 4741 的 16S rDNA 序列 (GenBank, AJ306890) 一致。该菌株鉴定为 *Cobetia marina*^[9]。该菌株保存于中国工业微生物菌种保藏管理中心,编号 *Cobetia marina* CICC10367 (下记为 *C. marina* CICC10367)。

2.3 培养条件对 *C. marina* CICC10367 羟基四氢嘧啶合成的影响

2.3.1 培养基

MG 等 5 种培养基 (除 MG 外的其它 4 种培养基为文献报道的四氢嘧啶类物质合成培养基)对 *C. marina* CICC10367 羟基四氢嘧啶合成和细胞干重的影响见表 1。不同的培养基对羟基四氢嘧啶的合成和细胞生长有较大的影响,在实验的 5 种培养基中, MG 培养基与其它 4 种培养基相比,其羟基四氢嘧啶浓度、细胞干重和单位干细胞羟基四氢嘧啶合成量均为最高,分别为 443.3 mg/L、5.8 g/L 和 76.4 mg/g。谷氨酸单钠为唯一碳氮源的 MG 培养基有利于 *C. marina* CICC10367 羟基四氢嘧啶的合成。

表 1 不同培养基对羟基四氢嘧啶合成和细胞生长的影响
Table 1 Effect of different medium on hydroxyectoine synthesis and cell growth

Medium	c (Hydroxyectoine) / (mg/L)	Cell dry weight / (g/L)	The amount of hydroxyectoine synthesized by per gram dry cell weight / (mg/g)
MG	443.3	5.8	76.4
PY	53.8	4.6	11.7
BP	46.4	4.1	11.3
BM	142.7	2.5	57.1
MM63	151.7	3.1	48.9

2.3.2 NaCl 浓度

考察 NaCl 浓度对 *C. marina* CICC10367 细胞生长和羟基四氢嘧啶合成的影响。*C. marina* CICC10367 在含 30~180 g/L NaCl 的 MG

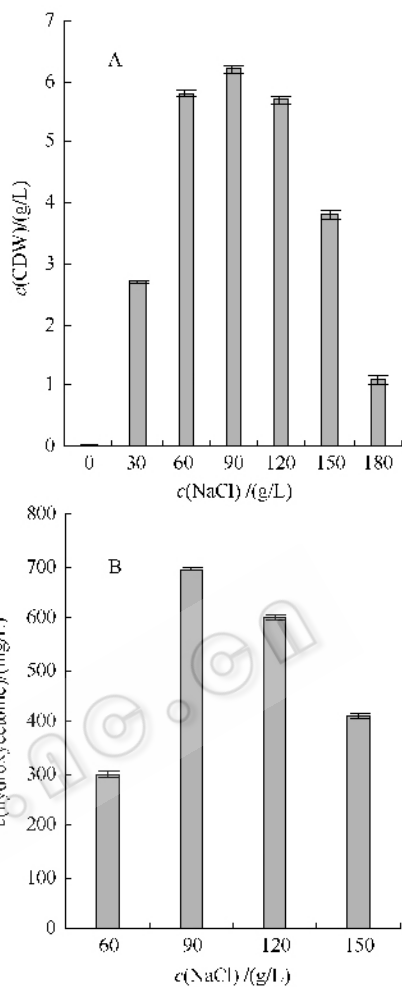


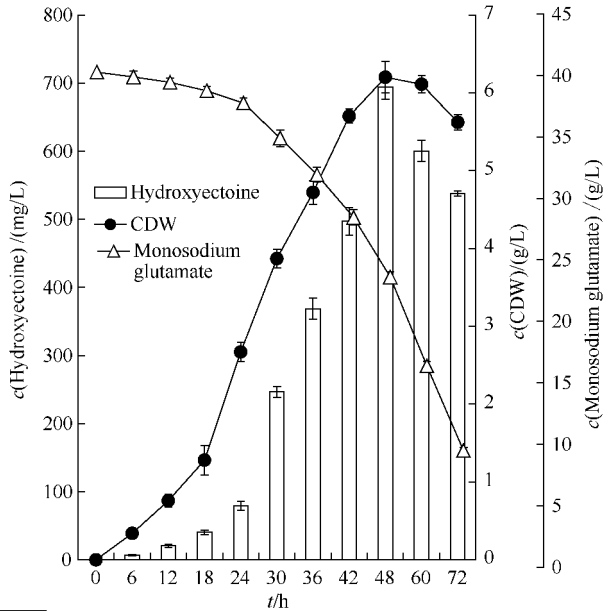
图 2 NaCl 浓度对细胞生长和羟基四氢嘧啶合成的影响

Fig. 2 Effect of NaCl concentration on cell growth and hydroxyectoine synthesis. The cell dry weight (CDW) of the strain which grew at the MG medium with the NaCl concentration between 30 g/L ~ 180 g/L was showed in Fig. 2-A. The concentration of hydroxyectoine synthesized by the strain which grew at the MG medium with the NaCl concentration between 60 g/L ~ 150 g/L was showed in Fig. 2-B.

培养基中生长见图 2-A,最适生长盐浓度为 90 g/L。60~150 g/L NaCl 的 MG 培养基中羟基四氢嘧啶浓度见图 2-B,在 90 g/L NaCl 下合成的羟基四氢嘧啶浓度最高为 694.5 mg/L。

2.4 羟基四氢嘧啶发酵进程

C. marina CICC10367 在 90 g/L NaCl 的 MG 培养基中的羟基四氢嘧啶发酵进程见图 3。细胞生长 48 h 达到平衡期,此时细胞干重为 6.2 g/L。羟基四氢嘧啶浓度随细胞生长而增加,在细胞干重最大时刻 (48 h) 呈最大浓度 (694.5 mg/L),产率为 347.3 mg/L/d,底物谷氨酸单钠从初始的 40 g/L 消耗至发酵終了 (72 h) 的 9.4 g/L,消耗谷氨酸单钠 30.6 g/L,羟基四氢嘧啶对底物的转化率为 22.7 mg/g。



3 羟基四氢嘧啶发酵进程

Fig.3 Time course of hydroxyectoine fermentation.

2.5 渗透压冲击下羟基四氢嘧啶的合成及释放

C. marina CICC10367 渗透压冲击下羟基四氢嘧啶的合成及释放结果见图 4。首先,在 90 g/L NaCl 下培养 48 h,细胞合成 694.5 mg/L 的羟基四氢嘧啶,然后在 30 g/L NaCl 水溶液下进行低渗冲击 (D) 30 min,从细胞内释放到细胞外的羟基四氢嘧啶为 564.6 mg/L。然后再进行高渗冲击 (U) 24 h,细胞重新合成羟基四氢嘧啶。在前 6 次渗透压冲击中,细胞干重和羟基四氢嘧啶浓度依次略有增加,而第 7 次的高渗冲击,细胞干重和羟基四氢嘧啶浓度较第 6 次分别下降了 12.0% 和 17.9%。前 6 次循环中,高渗冲击中合成的羟基四氢嘧啶平均浓度为 814.6 mg/L,低渗冲击下平均释放量为 659.8 mg/L,平均释放率为 81.0%。羟基四氢嘧啶的总合成量为 4179.0 mg/L,产率为 597.0 mg/L/d。发酵初始 48 h,底物谷氨酸单钠的消耗量为 16.6 g/L,其后的每一次高渗冲击中,底物谷氨酸单钠的消耗量平均

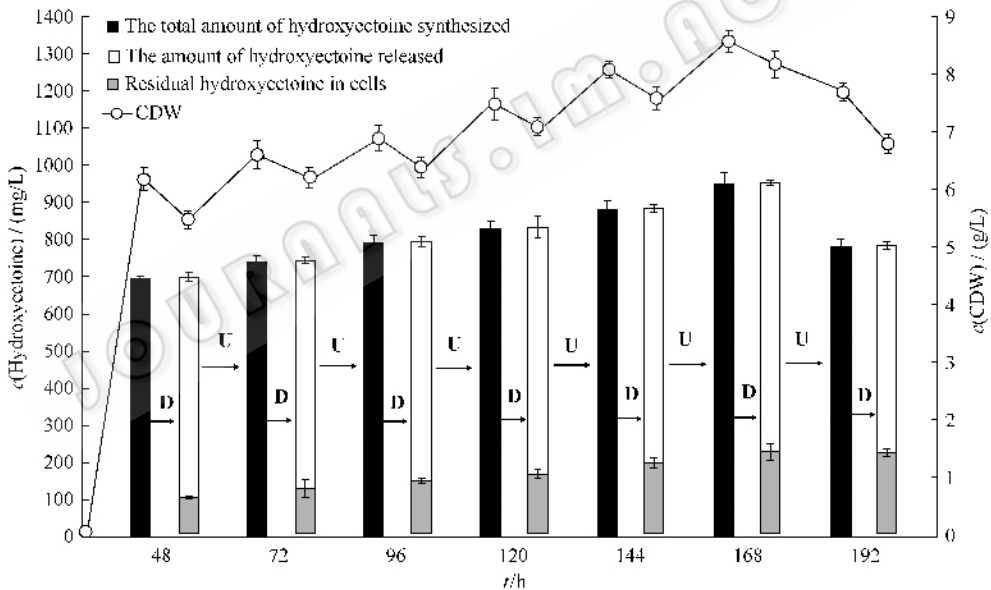


图 4 渗透压冲击下羟基四氢嘧啶的合成及释放

Fig.4 Synthesis and release of hydroxyectoine under osmotic shock. U: up shock; D: down shock.

为 7.1 g/L 细菌挤奶工艺羟基四氢嘧啶对底物的转化率为 80.2 mg/g。

3 讨论

本文首次报道了筛选鉴定的 *C. marina* CICC10367 在 NaCl 诱导下合成羟基四氢嘧啶。*Cobetia marina* 曾经被分类划归为盐单胞菌属 (*Halomonas*)^[20], 2002 年分类为 *Cobetia* 属^[9]。*Cobetia marina* 合成羟基四氢嘧啶的研究未见报道。

C. marina CICC10367 耐受渗透压冲击,细菌挤奶工艺较常规分批发酵,羟基四氢嘧啶产率提高了 71.9%。羟基四氢嘧啶对底物的转化率提高了 2.5 倍。利用细菌挤奶工艺制备羟基四氢嘧啶的研究未见报道。

四氢嘧啶类物质发酵研究中使用的含酵母膏、牛肉膏和蛋白胨的培养基 (如本文所述的 PY 和 BY 培养基)^[3-14],虽然能够获得较大的细胞生长量,但是酵母膏中含有甜菜碱或它的前体胆碱,它们能够

被大多数的嗜盐菌作为渗透压补偿溶质,而且它们的吸收和累积通常优先于重新合成的渗透压补偿溶质。因此培养基中胆碱或甜菜碱的存在,会降低胞内合成的渗透压补偿溶质的浓度^[8]。另外,蛋白胨中的赖氨酸、蛋氨酸和苏氨酸对羟基四氢嘧啶合成途径中的天冬氨酸激酶有反馈抑制作用,因此可能抑制羟基四氢嘧啶的合成^[21]。四氢嘧啶类物质发酵研究中使用的其它培养基(如本文所述的 BM 和 MM63 培养基)^[9,15],单位质量细胞羟基四氢嘧啶合成量较大,但是细胞生长量小,因此,羟基四氢嘧啶浓度较低。四氢嘧啶和羟基四氢嘧啶的合成途径是草酰乙酸经过天冬氨酸、天冬氨酸- β -磷酸、天冬氨酸- β -半醛、L-2,4-二氨基丁酸、N γ -乙酰-2,4-二氨基丁酸,而后转变为四氢嘧啶,最后羟基化为羟基四氢嘧啶^[21]。谷氨酸通过脱氨基生成 α -酮戊二酸后直接进入三羧酸循环,然后经过若干步骤转化为草酰乙酸,因此,谷氨酸为合成羟基四氢嘧啶提供了较为充足的底物。另外,草酰乙酸转变为天冬氨酸的反应、天冬氨酸- β -半醛转变为 L-2,4-二氨基丁酸的反应,均需要谷氨酸脱氨提供氨基,即谷氨酸对羟基四氢嘧啶的合成流具有强化作用。因此谷氨酸单钠为唯一碳氮源的 MG 培养基有利于 *C. marina* CICC10367 羟基四氢嘧啶的合成。

嗜盐菌在环境渗透压胁迫下合成四氢嘧啶类物质,培养基中的 NaCl 浓度通过影响渗透压而对羟基四氢嘧啶的合成具有重要的影响。在一定的 NaCl 浓度范围内,羟基四氢嘧啶的合成量随培养基中 NaCl 浓度的升高而增加,但是高浓度的 NaCl 也能降低细胞生长速度和生物量。菌株 *C. marina* CICC10367 最适生长盐浓度为 90 g/L,在该浓度下,羟基四氢嘧啶合成量也最高。

文献报道的 *Marinococcus* sp. M52,虽然其羟基四氢嘧啶合成量较高(7 g/L),但是低渗冲击时细胞吸水膨胀,羟基四氢嘧啶几乎不释放^[8],该菌株不适合于“细菌挤奶”工艺。文献报道的 *Halomonas elongata* DSM142^T 菌株,能够在低渗冲击下释放羟基四氢嘧啶,但是其合成量较低(0.028 mmol/g)^[9]。本文分离获得的 *C. marina* CICC10367 与已报道的羟基四氢嘧啶合成菌株相比,能够耐受渗透压冲击,同时羟基四氢嘧啶合成量较大。因此,利用 *C. marina* CICC10367 进行“细菌挤奶”制备羟基四氢嘧啶,具有潜在的应用价值。

本文研究的 *C. marina* CICC10367 菌株,发酵产物中同时存在四氢嘧啶和羟基四氢嘧啶。150 g/L NaCl 浓度下,四氢嘧啶在发酵 60 h 呈最大浓度,而

羟基四氢嘧啶在 84 h 最大浓度(数据未给出)。60~84 h 期间,四氢嘧啶浓度减少,羟基四氢嘧啶浓度增加。据报道,羟基四氢嘧啶可能通过两条不同途径合成,一是直接由四氢嘧啶羟基化为羟基四氢嘧啶;二是由四氢嘧啶的前体 N γ -乙酰-2,4-二氨基丁酸(不通过四氢嘧啶)转化为羟基四氢嘧啶^[21]。*C. marina* CICC10367 羟基四氢嘧啶是否是由四氢嘧啶转化而来,有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Ventosa A, Nieto JJ, Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62 (2): 504 - 544.
- [2] Zhang LH, Wang Y, Zhang CY, et al. Supplementation effect of ectoine on thermostability of phytase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, 102 (6): 560 - 563.
- [3] Lippert K, Galinski EA. Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1992, 37 (1): 61 - 65.
- [4] Louis P, Trüper HG, Galinski EA. Survival of *Escherichia coli* during drying and storage in the presence of compatible solutes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1994, 41 (6): 648 - 688.
- [5] Kanapathipillai M, Lentzen G, Sierks M, et al. Ectoine and hydroxyectoine inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer's β -amyloid. *FEBS Letters*, 2005, 579 (21): 4775 - 4780.
- [6] Ventosa A, Nieto JJ. Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World Journal Microbiol&Biotechnol*, 1995, 11 (1): 85 - 94.
- [7] Lentzen G, Schwarz T. Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 72 (4): 623 - 634.
- [8] Frings E, Sauer T, Galinski EA. Production of hydroxyectoine: high cell-density cultivation and osmotic downshock of *Marinococcus* strain M52. *Journal of Biotechnology*, 1995, 43 (1): 53 - 61.
- [9] Sauer T, Galinski EA. Bacterial milking: A novel bioprocess for production of compatible solutes. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, 57 (3): 306 - 313.
- [10] Galinski EA, Trüper HG. Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 1994, 15 (2-3): 95 - 108.
- [11] Frings E, Kunte HJ, Galinski EA. Compatible solutes in representatives of the genera *Brevibacterium* and *Corynebacterium*: occurrence of tetrahydropyrimidines and glutamine. *FEMS Microbiology Letters*, 1993, 109 (1): 25 - 32.

- [12] Severin J, Wohlfarth A, Galinski EA. The predominant role of recently discovered tetrahydropyrimidines for the osmoadaptation of halophilic eubacteria. *Journal of General Microbiology*, 1992, 138 (8): 1629 – 1638.
- [13] Wang CX, Zhu DC, Nagata S. Supplementation effects of hydroxyectoine on praline uptake of downshocked *Brevibacterium* sp. JCM 6894. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, 101 (2): 178 – 184.
- [14] 周月慧, 张苓花, 王飞, 等. 一株中度嗜盐菌 SL21 合成 Ectoine 的研究. 河南工业大学学报 (自然科学版) [Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition)], 2006, 27 (2): 81 – 85.
- [15] Larsen PI, Sydnæs LK, Landfald B, et al. Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organic osmolytes: betaines, glutamic acid, and trehalose. *Archives of Microbiology*, 1987, 147 (1): 1 – 7.
- [16] 东秀珠, 蔡妙英, 等著. 常见细菌系统鉴定手册. 第一版. 北京: 科学出版社, 2001.
- [17] Nagata S, Wang YQ, Oshima A, et al. Efficient cyclic system to yield ectoine using *Brevibacterium* sp. JCM 6894 subjected to osmotic downshock. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, 99 (4): 941 – 948.
- [18] Bursy J, Pierik AJ, Pica N, et al. Osmotically induced synthesis of the compatible solute hydroxyectoine is mediated by an evolutionarily conserved ectoine hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282 (43): 31147 – 31155.
- [19] Arahall DR, Castillo AM, Ludwig W, et al. Proposal of *Cobetia marina* gen. nov., comb. nov., within the family Halomonadaceae, to include the species *Halomonas marina*. *Systematic and Applied Microbiology*, 2002, 25 (2): 207 – 211.
- [20] Dobson SJ, Franzmann PD. Unification of the genera *Deleya* (Baumann et al. 1983), *Halomonas* (Vreeland et al. 1980), and *Halovibrio* (Fendrich 1988) and the species *Paracoccus halodenitrificans* (Robinson and Gibbons 1952) into a single genus, *Halomonas*, and placement of the genus *Zymobacter* in the family Halomonadaceae. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1996, 46 (2): 550 – 558.
- [21] Cánovas D, Borges N, Vargas C, et al. Role of *N*₇-acetyldiaminobutyrate as an enzyme stabilizer and an intermediate in the biosynthesis of hydroxyectoine. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65 (9): 3777 – 3779.

Hydroxyectoine synthesis and release under osmotic shock in *Cobetia marina* CICC10367

Yajun Lang, Yanan Ren, Lin Bai, Linghua Zhang*

(Environmental Science and Engineering College, Dalian Maritime University, Dalian 16026, China)

Abstract: [Objective] To obtain hydroxyectoine-producing strain with tolerance to osmotic shock and improve hydroxyectoine productivity by adopting “bacteria milking” process. [Methods] We isolated a strain from salt lake, and then carried out the identifications of morphology, physiological and biochemical characteristics of the strain. We also investigated the effects of the medium and its NaCl concentration on the hydroxyectoine synthesis of this strain. Under optimal condition, hydroxyectoine was produced by adopting “bacteria milking” process. [Results] A hydroxyectoine-producing strain was obtained and identified as *Cobetia marina* CICC10367 (*C. marina* CICC10367). It could enhance hydroxyectoine synthesis when the medium adopting monosodium glutamate as the sole source of carbon and nitrogen at 90 g/L NaCl. The highest synthesized hydroxyectoine concentration was 694.5 mg/L in the above described medium. After the “bacteria milking” process of six osmotic shock, the total concentration of hydroxyectoine was 4179.0 mg/L, the productivity was 597.0 mg/L/d, and the conversion rate of hydroxyectoine on substrate was 80.2 mg/g. [Conclusion] *C. marina* CICC10367 was able to synthesize hydroxyectoine under NaCl induction and tolerant to osmotic stress. The hydroxyectoine productivity and conversion rate of hydroxyectoine on substrate were both significantly improved by adopting “bacteria milking” process.

Keywords: *Cobetia marina*; hydroxyectoine; osmotic shock; bacteria milking

(本文责编: 王晋芳)