

文章编号:1673-1689(2006)04-0059-04

Halobacillus trueperi SL39 Ectoine 诱导 生成条件研究

赵轶男¹, 张苓花¹, 张冠群¹, 永田进一², 王运吉¹

(1. 大连轻工业学院 生物与食品工程学院, 辽宁 大连 116034; 2. 日本神户大学 内海域环境教育研究中心, 日本 神户 658)

摘要:研究了耐盐菌 *Halobacillus trueperi* SL39 在 NaCl 的诱导下,体内合成渗透压补偿溶质 Ectoine,并优化 Ectoine 合成的诱导条件。采用高效液相色谱检测 Ectoine 合成量,结果表明,耐盐菌 *Halobacillus trueperi* SL39 合成 Ectoine 的最适诱导条件为 30 ℃,初始 pH 7.0,NaCl 浓度 2.0 mol/L,诱导 48 h,合成量高达 304.8 mg/L,胞外释放量为 90.11%。

关键词: *Halobacillus trueperi* SL39; Ectoine; 诱导合成; 高效液相色谱

中图分类号:Q 939

文献标识码: A

Optimization of Inducing Synthesis Conditions of Ectoine in *Halobacillus trueperi* SL39

ZHAO Yi-nan¹, ZHANG Ling-hua¹, ZHANG Guan-qun¹, SHINICHI Nagata², WANG Yun-ji¹

(1. College of Food Science and Biotechnol,Dalian Institute of Light Industry,Dalian 116034,China; 2. Research Institute of Marine Cargo,Kobe University, Fukae,Higashinada-ku 658,Japan)

Abstract: This paper studied induction of Ectoine in *Halobacillus trueperi* SL39 in the medium containing NaCl. Optimization of Ectoine production condition was also discussed. The amount of Ectoine in *Halobacillus trueperi* SL39 could reach the highest level under the conditions of inducing temperature of 30 ℃, pH 7.0, and NaCl concentration of 2.0 mol/L. After 48 h induction, the concentration of Ectoine was detected as 304.8 mg/L by HPLC, and the extracellular secretion ratio was 90.11%.

Key words: *Halobacillus trueperi* SL39; Ectoine; Inducing synthesis; HPLC

Ectoine(1,4,5,6-tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid),即 1,4,5,6-四氢-2-甲基-4-嘧啶羧酸^[1]。Ectoine 是某些耐盐微生物体内自身合成的一种渗透压补偿溶质,当微生物处于高渗环

境中时,能够维持细胞内外渗透压平衡,使生物体进行正常代谢活动^[1]。有关 Ectoine 的研究最早在 1985 年由 Galinski 等人^[2-3]提出。Ectoine 具有独特的生理学功能,在酶应用技术、制药和化妆品工

收稿日期:2006-01-18; 修回日期:2006-03-15.

基金项目:辽宁省高校发酵工程重点实验室资助项目(辽发重开 2004-002).

作者简介:赵轶男(1979-),女,辽宁抚顺人,发酵工程硕士研究生.

业方面的前景最为引人注目。在医学上, Ectoine 可以作为治疗癌症的化疗保护剂; 在轻工业上, 可作为化妆品成分保护皮肤不受各种刺激因素影响, 防止皮肤老化^[4]。研究其诱导生成、制备并使其产业化, 具有重要的意义。

随着人们对 Ectoine 认识的深入, 近几年来, 国外研究人员 Shinichi Nagata^[5]、Bernard T.^[6]、Ono H.^[7]等人对 Ectoine 的合成及生理学功能等方面进行了较系统的研究, 已取得了较大进展。目前所研究的 13 种细菌种类, 5 种能合成 Ectoine^[8-10], 此外, Galinski 和 Truper 报道 *B. halophilus* 和两无核种类的杆状细菌能进行 Ectoine 合成^[11]。国内还没有 Ectoine 的相关报道。作者研究了不同的诱导条件对耐盐菌 *Halobacillus trueperi* SL39 诱导生成 Ectoine 的影响, 建立 HPLC 检测方法, 优化 Ectoine 合成的诱导条件。

1 材料与方法

1.1 实验菌种

Halobacillus trueperi SL39: 作者所在实验室分离筛出。

1.2 培养基及试剂

肉汤培养基: 牛肉膏 5 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 加水 1 L, 自然 pH 值。

诱导培养基: 牛肉膏 5 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 116.88 g, 加水 1 L, 自然 pH 值。

Buffer 洗液: pH 7.2、50 mmol/L K₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液。

1.3 Ectoine 的诱导合成

将菌株 *H. trueperi* SL39 接种于肉汤培养基, 在 30 ℃ 条件下, 130 r/min 摇瓶活化培养 24 h, 1% 接菌量接入 50 mL Ectoine 诱导培养基中, 于 30 ℃, 130 r/min 摇瓶诱导培养 48 h。

1.4 Ectoine 的释放

取诱导菌液 50 mL, 12 000 r/min 离心 10 min 后收集菌体。加入 50 mL 2 mol/L 的 buffer 洗液, 漩涡混合仪震荡, 12 000 r/min 离心 10 min。弃上清取菌体, 加 50 mL 蒸馏水, 静置 1 h, 每 10 min 用漩涡混合仪震荡一次, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 测细胞外 Ectoine 含量。取菌体加入体积分数 80% 乙醇, 漩涡混合仪震荡, 放置过夜。12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 待测细胞内 Ectoine 含量。

1.5 标准曲线绘制及回归方程

准确称量平衡后的 Ectoine 标准品, 分别配制

成 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 浓度的标准品, 经 HPLC 检测不同浓度的标准品 Ectoine 含量, 计算其峰面积, 以峰面积为横坐标(C), 标准品浓度 (mmol/L) 为纵坐标(A) 建立 Ectoine 标准品浓度-峰面积线性关系图, 确立 Ectoine 浓度计算公式。

1.6 Ectoine 的检测

1.6.1 Ectoine 核磁共振检测 按文献[12]方法进行。

1.6.2 Ectoine 高效液相色谱检测 按文献[13-14]方法进行。分离柱采用 TOSOH TSK-GEL (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 pH 6.0、50 mmol/L K₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液, 体积流量 1.0 mL/min, 上样量 20 μL, 柱温 35 ℃, 检测波长 λ=210 nm。

1.7 优化 Ectoine 诱导生成条件

1.7.1 温度对 Ectoine 诱导生成的影响 菌株 *H. trueperi* SL39 活化后 1% 接菌量接于 50 mL 诱导培养基中, 在不同温度下 (22, 26, 30, 37 ℃), 130 r/min 诱导培养 48 h, 释放检测 Ectoine 合成量, 同时在 560 nm 波长下测定培养液 OD 值。

1.7.2 pH 值对 Ectoine 诱导生成的影响 将菌株 *H. trueperi* SL39 活化后 1% 接菌量接于不同初始 pH 值 (5~10) 的 50 mL 诱导培养基中, 于最适温度 30 ℃, 130 r/min 诱导培养 48 h, 释放检测 Ectoine 合成量, 同时在 560 nm 波长下测定培养液 OD 值。

1.7.3 NaCl 浓度对 Ectoine 诱导生成的影响 将菌株 *H. trueperi* SL39 活化后 1% 接菌量接于含不同 NaCl 浓度 (1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mol/L) 的 50 mL 诱导培养基中, 在最适温度 30 ℃, 最适初始 pH 7.0 条件下, 130 r/min 诱导培养 48 h, 释放检测 Ectoine 合成量, 同时在 560 nm 波长下测定培养液 OD 值。

2 结果与讨论

2.1 检测 Ectoine 的标准曲线及回归方程

配制 0, 0.5, 1.0, 2.0 mmol/L 浓度的 Ectoine 标准品, 经 HPLC 分析, 记录不同浓度标准品的峰面积, 建立 Ectoine 标准品浓度(A)-峰面积(C) 线性关系图(图 1), 并求得线性回归方程: A=0.161 8 C+0.014 6, R=0.999 1。Ectoine 相对分子质量为 140, Ectoine 质量浓度(B, mg/L) 为 B=140A。

2.2 *H. trueperi* SL39 Ectoine 诱导生成

在含 NaCl 的培养基中诱导培养菌株 *H. trueperi* SL39, 并进行 Ectoine 释放, 经 HPLC

测定 2 mmol/L 浓度 Ectoine 标准品及菌株 *H. trueperi* SL39 体内 Ectoine 合成量,检测图谱如图 2。菌株 *H. trueperi* SL39 Ectoine 总合成量为 304.87 mg/L,细胞外 Ectoine 合成量为 274.67 mg/L,释放量达 90.11%。

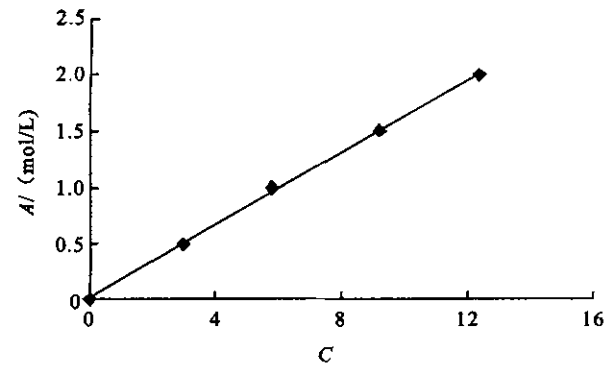


图 1 检测 Ectoine 合成量标准曲线
Fig.1 Sdandard line of Ectoine concentration

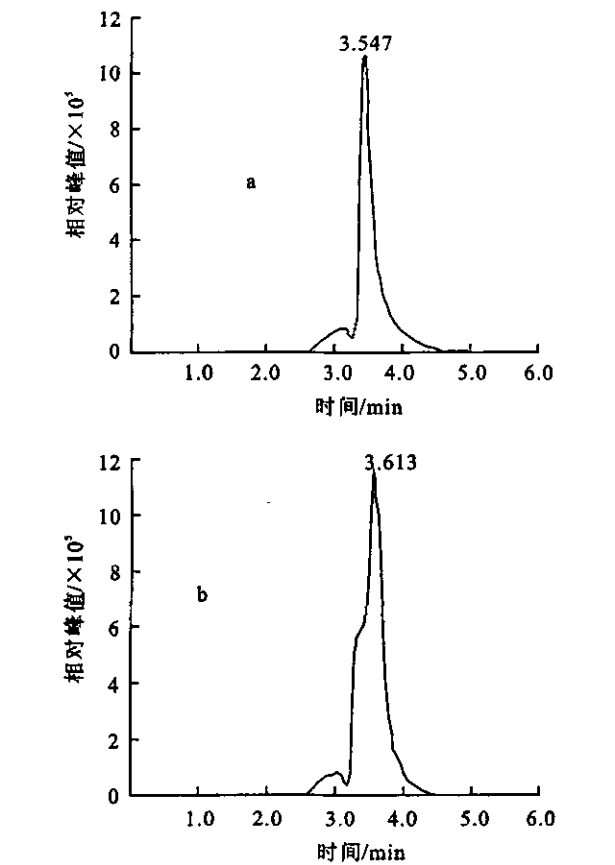


图 2 Ectoine 标准品(b)及 *H. trueperi* SL39 诱导合成 Ectoine(a)高效液相色谱图
Fig.2 HPLC diagram of Ectoine standard(b) and Ectoine produced in *H. trueperi* SL39(a)

2.3 温度对 Ectoine 诱导生成的影响

考察不同温度对菌株 *H. trueperi* SL39 诱导合成 Ectoine 的影响,结果如图 3 所示。在不同的温

度条件下,Ectoine 诱导生成量有明显的不同。菌株 *H. trueperi* SL39 在 30 ℃ 条件,Ectoine 合成量达到最大值,最适 Ectoine 诱导合成温度为 30 ℃,与 *H. trueperi* SL39 菌株的最适生长温度相同。

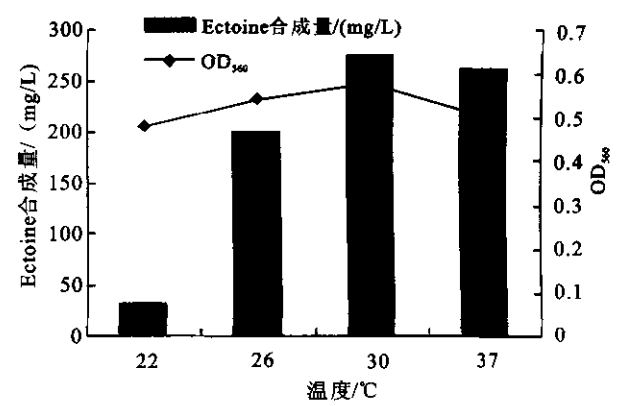


图 3 温度对 Ectoine 诱导合成的影响
Fig.3 Effect of temperature on Ectoine synthesis

2.4 培养基初始 pH 对 Ectoine 诱导生成的影响

不同初始 pH 培养基对菌株 *H. trueperi* SL39 诱导合成 Ectoine 的影响,结果如图 4 所示。在 pH 5.0 条件下,菌株 *H. trueperi* SL39 不能诱导合成 Ectoine,在 pH 7.0—9.0 条件下合成量较高,其中 pH 7.0 时 Ectoine 合成量达到最大值,最适诱导初始 pH 为 7.0,与菌株的最适生长初始 pH 值相同。

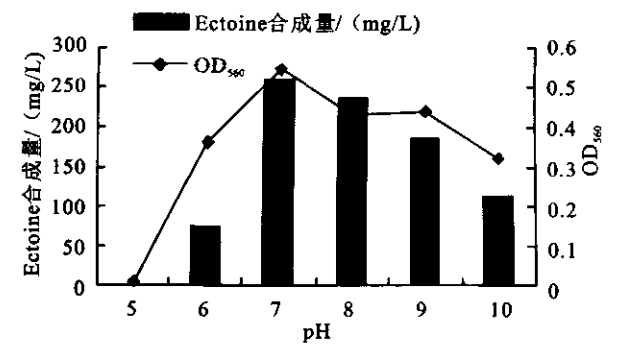


图 4 培养基初始 pH 值对 Ectoine 诱导合成的影响
Fig.4 Effect of initial pH on Ectoine synthesis

2.5 NaCl 诱导浓度对 Ectoine 生成的影响

不同 NaCl 浓度对菌株 *H. trueperi* SL39 诱导合成 Ectoine 的影响,结果如图 5。NaCl 浓度 2.0 mol/L 条件下,Ectoine 合成量最高,高达 304.8 mg/L。培养基的 NaCl 浓度不同时,菌株诱导生成 Ectoine 的量有很大差别,说明 NaCl 对 Ectoine 的合成起诱导作用,是 Ectoine 诱导合成的重要因素。

3 结 论

耐盐菌 *H. trueperi* SL39 在含 NaCl 的培养基中,体内能够合成渗透压补偿溶质 Ectoine。温度、

培养基初始 pH、NaCl 浓度对 Ectoine 的合成有明显影响,NaCl 对 Ectoine 的合成起诱导作用。通过对 Ectoine 诱导合成条件的优化,经 HPLC 检测,30℃,初始 pH 7.0,NaCl 浓度 2.0 mol/L 时,为 Ectoine 合成的最适诱导条件,合成量高达 304.8 mg/L,胞外释放量达 90.11%。参考有关文献,Dassar-ma S,Arora P,Ventosa A 等人^[15]对 Halobacillus trueperi 菌株诱导生成 Ectoine 进行了初步研究,作者采用的 Halobacillus trueperi SL39 菌株 Ectoine 诱导合成量较高,为进一步研究 Ectoine 的功能提供了一定的依据。

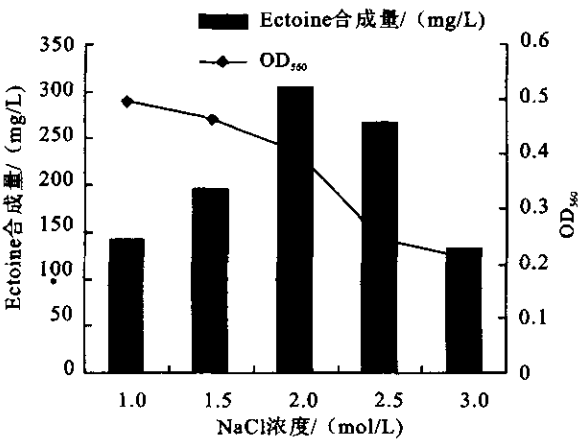


图 5 NaCl 诱导浓度对 Ectoine 生成的影响

Fig. 5 Effect of NaCl concentration on Ectoine synthesis

参考文献：

[1] Galinski E A,Pfeiffer H P, Truper H G. 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methy 1-4- pyrimidinecarboxylic acid. A novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus Ectothiorhodospira[J]. **European Journal of Biochemistry**,1985, 149(1):135—139.

[2] Galinski E A,Herzog R M. The role of trehalose as a substitute for nitrogen- containing compatible solutes (Ectothiorhodospira halochloris)[J]. **Archives of Microbiology**,1990,153 (6):607—613.

[3] Galinski E A, Lippert K. Enzyme stabilization be ectoine-type compatible solutes; protection against heating,freezing and drying[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1992,37(1):61—65.

[4] Nagata S, Yao B W. Interrelation between synthesis and uptake of ectoine for the growth of the halotolerant Brevibacterium species JCM 6894 at high osmolarity[J]. **Microbios**,2001,104:7—15.

[5] Bernard T, Jebbar M, Rassouli Y. Ectoine accumulation and osmotic regulation in Brevibacterium linens[J]. **Microbiol**, 1993,139:129—136.

[6] Ono H, Okuda M, Tongpim, et al. Accumulation of compatible solutes, Ectoine and hydroxyectoine,in a moderate halophile, Halomonas elongate KS3 isolated from dry salty land in Thailand[J]. **Ferment Bioeng**,1998,85,362—368.

[7] Nagata S, Adachi K, Shirai K. ²³Na-NMR spectroscopy of free Na⁺ in the halotolerant bacterium Brevibacterium sp. and Escherchia coli[J]. **Microbios**,1995,140:729—736.

[8] Jung-Hoon, Kang K H, Tae-K wang. Halobacillus locisalis sp. nov. , a halophilic bacterium isolated from a marina solar saltern of the Yellow Sea in Korea[J]. **Springer-Verlag Tokyo Inc**, 2004,8(1):23—28.

[9] Jebbar M,Talibart R,Gloux K,et al. Osmopoprotection of Escherichia coli by ectoine uptake and accumulation characteristics[J]. **Bacteriol**,1992,174,5027—5035.

[10] Louis P,Galinski E A. Characterization of genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine from Marinococcus halophilus and osmoregulated expression in Escherichia coli[J]. **Microbiology**,1997,143,1141—1149.

[11]Nakayama H,Yoshida K,Ono H. Ectoine,the compatible solute of Halomonas elongata,confers hyperosmotic tolerance in cultured tobacco cells[J]. **Plant Physiol**,2000,122(4):1239—1248.

[12] Nagata S,Adachi K,Sano H. NMR analyses of compatible solutes in a halotolerant Brevibacterium sp. [J]. **Microbiology**, 1996,142,3355—3362.

[13] Kuhlmann A,Bremer E. Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in Bacillus pasteurii and related Bacillus spp[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2002,68(2):772—783.

[14] Ono H,Sawada K,Khunajakr N. Characterization of biosynthetic enzymes for ectoine as a compatible solute in a moderately Halophilic eubacterium, Halomonas elongata[J]. **Journal of Bacteriology**,1999,181(1):91—99.

[15] Ventosa A, Nieto J, Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria[J]. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 1998, 62(2): 504—555.