

研究报告

## 渗透压冲击下中度嗜盐菌 *Halomonas* sp. Y 四氢嘧啶类相容性溶质的合成与释放

王慧敏 姚倩倩 李月月 蔡溯林 孙明珠 顾向阳\*

(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实验室 江苏 南京 210095)

**摘要:**【背景】四氢嘧啶类物质在高温、冷冻和干燥等逆境条件下,对酶、蛋白质、核酸及整个细胞具有良好的保护作用,已经应用于酶制剂、生物医药及护肤品等相关领域。目前此类物质只能依赖中度嗜盐菌采用细菌泌乳工艺进行商业化生产,因此四氢嘧啶类高产菌株及其发酵技术的研究日益受到国内外研究者关注。【目的】分离获得高产合成四氢嘧啶类相容性溶质的中度嗜盐细菌,研究渗透压冲击对其胞内四氢嘧啶合成与释放的影响,探索细菌泌乳法制备四氢嘧啶的可行性。【方法】采用涂布平板法分离中度嗜盐菌,对分离菌株进行形态、生理生化和 16S rRNA 基因序列分析,鉴定其种属;采用高效液相色谱法(HPLC)和质谱法(MS)分析四氢嘧啶类物质,细菌泌乳法制备四氢嘧啶类物质。【结果】从盐池土样中分离到一株以四氢嘧啶类物质为主要相容性溶质的中度嗜盐菌 Y,鉴定为盐单胞菌(*Halomonas* sp.) Y。盐单胞菌 Y 能在 NaCl 质量浓度为 10–250 g/L 的培养基中生长,最适生长的 NaCl 浓度为 100 g/L; HPLC-MS 测试结果证明盐单胞菌 Y 可同时合成四氢嘧啶和羟基四氢嘧啶 2 种相容性溶质,在最适生长的盐浓度下其合成量分别达 175.5 mg/g 和 47.9 mg/g; 在 NaCl 质量浓度为 0–30 g/L 的低渗溶液中胞内四氢嘧啶类物质经 5 min 即可达到最大释放率,而细菌泌乳工艺中最适合诱导四氢嘧啶释放的低渗溶液为质量浓度为 10 g/L 的 NaCl 溶液;采用细菌泌乳工艺制备四氢嘧啶,经连续 11 轮的高渗/低渗冲击,四氢嘧啶总合成量为 6.0 g/L,总释放量为 5.7 g/L,平均释放率为 64.5%,底物转化率为 128.9 mg/g。【结论】盐单胞菌 Y 是一株较高产合成四氢嘧啶类的中度嗜盐菌,能够耐受反复的渗透压冲击,采用细菌泌乳工艺显著提高了四氢嘧啶的制备效率。

**关键词:** 中度嗜盐菌, 四氢嘧啶, 羟基四氢嘧啶, 细菌泌乳, 高渗-低渗冲击

**Foundation item:** International Foundation for Science (W4260-1)

\*Corresponding author: Tel: 86-25-84396348; E-mail: gxy@njau.edu.cn

Received: May 05, 2017; Accepted: August 16, 2017; Published online (www.cnki.net): August 31, 2017

基金项目: 国际科学基金项目(W4260-1)

\*通信作者: Tel: 86-25-84396348; E-mail: gxy@njau.edu.cn

收稿日期: 2017-05-05; 接受日期: 2017-08-16; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-08-31

## Synthesis and release of ectoines in a moderate halophile *Halomonas* sp. Y subjected to osmotic shocks

WANG Hui-Min YAO Qian-Qian LI Yue-Yue CAI Su-Lin SUN Ming-Zhu GU Xiang-Yang\*

(College of Life Sciences, Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environments, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

**Abstract:** [Background] Ectoines have been applied in cosmetics, enzyme preparations and pharmaceutical industry due to their powerful stabilizing property of protecting enzyme, protein, nucleic acid and the whole cell against high temperature, freeze and dryness. Up to now, industrial-scale production of ectoines relies on bacterial milking process using moderately halophilic bacterium. Therefore, development of high-yield ectoine-producers and related fermentative technology has attracted considerable attention worldwide. [Objective] The objective of the present study was to isolate a moderately halophilic bacterium capable of synthesizing ectoines as main compatible solute, study the effects of osmotic shocks on synthesis and release of ectoines in this bacterium and explore the feasibility of producing ectoines by using bacterial milking process. [Methods] Moderately halophilic bacterium was isolated by spread-plate method and identified through analysis of its morphology, physicochemical properties and 16S rRNA gene sequence similarity. Ectoines were analyzed quantitatively and qualitatively by high performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry (MS), respectively. Ectoines were prepared by bacterial milking process. [Results] A moderately halophilic bacterium Y capable of synthesizing ectoines as main compatible solute was isolated from saltern sediment and identified as a member of the genus *Halomonas* according to its physiological properties and 16S rRNA gene sequence similarity. *Halomonas* sp. Y showed growth in lactate medium containing a wide range of NaCl concentrations of 10–250 g/L. Optimum growth was observed in the medium containing 100 g/L NaCl. HPLC-MS analysis revealed that this bacterium could synthesize both ectoine and hydroxyectoine as the main compatible solute. The yields of each compatible solute synthesized in the presence of 100 g/L NaCl were 175.5 mg/g and 47.9 mg/g for ectoine and hydroxyectoine, respectively. Maximum release rate of intracellular ectoines could be achieved within 5 min when Y cells experienced hypo-osmotic stress brought about by 0–30 g/L NaCl solutions. Hypo-osmotic saline solution with salinity of 10 g/L NaCl was the most appropriate for ectoine release during bacterial milking process. During the bacterial milking process eleven rounds of hyper/hypo osmotic shocks were exerted to the isolate and the total yields of synthesized and released ectoines were 6.0 g/L and 5.7 g/L, respectively. This corresponded to an average release rate of 64.5% and a high conversion rate of 128.9 mg/g. [Conclusion] *Halomonas* sp. Y is a moderately halophilic bacterium with quite high yield of ectoines. It could resist repeated osmotic shocks as characterized by ectoine release under hypo-osmotic stress and synthesis of ectoine under hyper-osmotic condition. Ectoine productivity was significantly improved by using bacterial milking process.

**Keywords:** Moderate halophile, Ectoine, Hydroxyectoine, Bacterial milking, Hyper/hypo-osmotic shocks

相容性溶质机制是嗜盐微生物抵御高渗透压逆境胁迫而生存的主要策略, 所谓相容性溶质就是嗜盐微生物合成的能够平衡细胞渗透压, 并且能与细胞内体系相容而不影响其它生物大分子功能的小分子有机化合物<sup>[1]</sup>。文献报道的相容性溶质主要有甜菜碱类、四氢嘧啶类、多元醇类、糖类和氨基酸类等, 其中四氢嘧啶类物质(包括四氢嘧啶和羟基

四氢嘧啶)是中度嗜盐菌胞内合成的最常见的相容性溶质<sup>[2]</sup>。近年来的体外试验研究发现四氢嘧啶类物质还可用作保护剂缓解高温、冷冻、干燥、辐射、变性剂等对蛋白质、核酸、细胞膜甚至完整细胞结构造成的有害作用, 具有优异和长效的皮肤保湿效果, 并可缓解紫外线照射引起的皮肤细胞损害; 对神经系统退行性疾病如阿尔兹海默氏症、帕金森病等有

一定的疗效<sup>[3]</sup>。目前四氢嘧啶已经应用于酶制剂、生物医药及护肤品等相关领域,因此,其合成方法及商业化生产越来越受到国内外研究者的关注。

四氢嘧啶的化学合成尚无成功的报道,目前只有依赖中度嗜盐菌进行商业化生产。早期采用生物发酵后从菌体中直接提取的方法<sup>[4]</sup>,产物的提取和纯化工艺复杂,制备成本较高。1998年 Sauer 等利用某些中度嗜盐菌可在高渗透压条件下合成四氢嘧啶而低渗透压下释放至胞外的功能,成功开发出细菌泌乳工艺,其特点是发酵培养的菌体可以反复使用,产物可多次回收,四氢嘧啶的合成量得到大幅提高,因而具有巨大的应用潜力<sup>[5-8]</sup>。目前国际上报道的适合于细菌泌乳工艺的菌株主要有 *Halomonas elongata*、*Brevibacterium* sp. JCM 6894、*Halomonas boliviensis*、*Chromohalobacter salexigens* DSM304 等,单位质量细胞中四氢嘧啶的合成量达 0.1–0.2 g/g<sup>[5-8]</sup>,国内分离的优良菌株尚不多见<sup>[9-10]</sup>,也未见商业化生产的报道。本研究的目的在于分离、筛选以四氢嘧啶类化合物为主要相容性溶质的中度嗜盐菌,研究渗透压冲击对四氢嘧啶合成和释放的影响,为四氢嘧啶的生物合成积累菌种资源。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 培养基

乳酸培养基(g/L): 乳酸 5.0, NaCl 100.0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.25, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.25, pH 7.0。

保存培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, NaCl 100.0, 琼脂 20.0, pH 7.0。

### 1.2 主要试剂和仪器

四氢嘧啶和羟基四氢嘧啶标准品购自 Sigma 公司; *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、PCR 引物及 PCR 缓冲液等试剂均购自南京金斯瑞生物技术有限公司。PCR 扩增仪,美国赛默飞世尔科技有限公司;高效液相色谱仪,日本岛津公司;高分辨质谱仪,美国沃特世公司。

### 1.3 中度嗜盐菌的分离筛选

试验菌株分离自江苏省连云港市某盐池土样。将盐池土样于 100 g/L 的无菌盐水中进行梯度稀释

并涂布于乳酸培养基平板,35 °C 培养 1 周,从平板上挑取单菌落,经划线纯化得到 2 株中度嗜盐菌 Y 和 J。预备试验中发现菌株 Y 能同时合成四氢嘧啶和羟基四氢嘧啶 2 种相容性溶质,在低渗冲击(NaCl 质量浓度为 10 g/L)中表现出较好的分泌功能(65.3%),而菌株 J 只能合成四氢嘧啶,不能合成羟基四氢嘧啶且其分泌率较低(45.3%),因此选择菌株 Y 进行进一步研究。

### 1.4 细菌生理生化特性的测定及菌种鉴定

菌株的细胞形态及生理生化特性测定参照文献[11]进行。菌株基因组 DNA 的提取及 16S rRNA 基因的扩增按照文献[12]进行,扩增产物送南京金斯瑞生物技术有限公司测序,测定所得序列提交到 GenBank,通过 EzTaxon 网站与相关细菌模式菌株的 16S rRNA 基因序列进行比对,采用 MEGA 6.0 软件中的邻接法构建系统发育树。

### 1.5 盐度对分离菌株生长及四氢嘧啶合成的影响

菌种经活化培养后,以 10% 接种量转接至新鲜的乳酸培养基中(50 mL/500 mL),各摇瓶培养基中 NaCl 的终浓度依次为 10、30、50、100、150、200 和 250 g/L,所有摇瓶 35 °C、170 r/min 振荡培养 24 h 后,分别吸取 1 mL 菌液 8 000 r/min 离心 10 min 沉淀菌体,用等体积的 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液溶解菌体细胞,采用 Folin 酚试剂法<sup>[13]</sup>测定菌体蛋白的质量浓度,并换算成菌体干重(菌体干重/菌体蛋白比值为 2.04,由预备试验测定);另取 1 mL 菌液,离心沉淀菌体后去上清液,加入等体积的 80% 乙醇溶液静置过夜,再次离心取上清液于 50 °C 烘干,加入 1 mL 超纯水溶解提取物,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤后按照文献[14]的方法进行四氢嘧啶类物质的定量分析和质谱鉴定。HPLC 检测条件如下:流动相为 95% (体积比)、pH 7.0、50 mmol/L 的磷酸缓冲液加 5% (体积比)甲醇,流速 0.8 mL/min,柱温 40 °C,检测波长为 210 nm,进样体积为 20 μL。

### 1.6 渗透压冲击下四氢嘧啶的合成与释放

分离菌株以 10% 接种量接种至 50 mL 乳酸培养基中,35 °C、170 r/min 振荡培养 24 h,8 000 r/min

离心 10 min 收集菌体, 重新悬浮于等体积的 NaCl 质量浓度分别为 0、2.5、5.0、10.0、20.0、30.0 g/L 的低渗溶液中并置摇床振荡培养, 定时取样 1 mL 离心沉淀菌体, 上清液用于测定释放的四氢嘧啶含量, 低渗冲击 30 min 后将菌液再次离心沉淀菌体, 然后用 45 mL 高渗培养基重新悬浮后置摇床振荡培养, 定时取样测定胞内四氢嘧啶的合成量。

### 1.7 细菌泌乳法制备四氢嘧啶

分离菌株在 NaCl 质量浓度为 100 g/L 的乳酸培养基中 35 °C、170 r/min 摇瓶培养 24 h, 取 200 mL 发酵液于 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 悬浮于 50 mL 质量浓度为 10 g/L 的 NaCl 溶液中振荡培养 20 min, 释放四氢嘧啶。再次离心收集菌体并重新悬浮于 50 mL NaCl 质量浓度为 100 g/L 的高渗培养基中诱导四氢嘧啶合成。之后按照上述方法反复交替进行低渗-高渗冲击, 每次低渗冲击后取样测定释放的四氢嘧啶含量, 高渗冲击后取样测定合成的四氢嘧啶含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株 Y 的分离与鉴定

采用 NaCl 质量浓度为 100 g/L 的乳酸培养基从盐池土中分离到一株中度嗜盐菌 Y, 该菌株在乳酸培养基上形成乳白色圆形菌落, 菌落呈半球状隆起, 表面光滑、湿润。菌株 Y 为革兰氏阴性的杆状细菌, 不产芽孢, 能运动。菌株 Y 对淀粉水解试验、明胶液化试验、酯酶试验、蛋白酶试验和吲哚试验的结果均呈阴性, 过氧化氢酶试验、苯丙氨酸脱氢酶试验、脲酶试验、产硫化氢试验和乙酰甲基甲醇试验结果均呈阳性。菌株 Y 可利用乳酸、乙酸、丙酸、正丁酸、正戊酸等有机酸, 以及葡萄糖、纤维二糖、果糖、蔗糖、麦芽糖等糖类物质为唯一碳源生长, 但不能利用淀粉、乳糖、半乳糖、木糖、核糖、鼠李糖、阿拉伯糖为唯一碳源生长。厌氧条件下菌株 Y 不发酵葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、纤维二糖等糖类碳源, 也不能以硝酸盐或亚硝酸盐为电子受体进行生长, 说明菌株 Y 为严格好氧的细菌。

以细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCT

GGCTCAG-3') 与 1492R (5'-GGTTACCTTGTTAC GACTT-3') 扩增菌株 Y 的 16S rRNA 基因, 对扩增产物测序后得到序列长度为 1 400 bp 的片段 (GenBank 登录号为 KY977527), 通过 EzTaxon 网站与相关细菌模式菌株的 16S rRNA 基因序列进行比对发现, 该菌株同 *Halomonas aquamarina* 和 *Halomonas meridiana* 的相似性最高达 99.1%, 可以归至相同的属, 但在系统发育树(图 1)中与上述 2 个菌株并不处于同一分支, 而是形成一个独立的分支, 可见菌株 Y 在进化关系上又不同于上述 2 个种。根据菌株 Y 的生理生化特性和 16S rRNA 基因序列比对结果, 将菌株 Y 鉴定为盐单胞菌属的一个种, 并命名为盐单胞菌(*Halomonas* sp.) Y。

### 2.2 NaCl 浓度对菌株 Y 生长及四氢嘧啶合成的影响

菌株 Y 可以适应 10–250 g/L 的 NaCl 质量浓度并以乳酸为唯一碳源生长(图 2), 最适生长的 NaCl 质量浓度为 100 g/L, 高于或低于该浓度时菌株 Y 的生长速率逐渐下降。在 NaCl 质量浓度为 100 g/L 的乳酸培养基中菌株 Y 的生长速率最高, 对数时代时为 4.5 h。

采用 80% 的乙醇溶液提取菌株 Y 胞内的相容性溶质并用高效液相色谱仪检测, 在 HPLC 图谱中 3.61 min 和 4.04 min 处各有一个峰, 出峰时间分别与羟基四氢嘧啶和四氢嘧啶标准品相同(图 3), 质谱检测结果显示, 提取液中存在 2 种物质, 其中丰度较高物质的化学式及其分子质量与四氢嘧啶标准品一致, 而丰度较低物质的化学式及其分子质量同羟基四氢嘧啶标准品一致(图 4), 证明菌株 Y 细胞提取液中的相容性物质确为四氢嘧啶和羟基四氢嘧啶。HPLC 定量分析结果显示, 菌株 Y 合成的相容性溶质以四氢嘧啶为主(67.2%–85.3%), 羟基四氢嘧啶积累量相对较低, 仅占 14.7%–32.8%。盐浓度对菌体四氢嘧啶的合成量有很大影响, 当培养基中 NaCl 浓度为 150 g/L 时, 总四氢嘧啶的合成量最高, 达 246.6 mg/L, 低于或者高于该盐浓度时四氢嘧啶的合成量均呈显著下降趋势(图 2)。从耐盐的浓度范围和相容性溶质合成量来看, 菌株 Y 是一株以四氢嘧啶为主要相容性溶质的中度嗜盐菌。

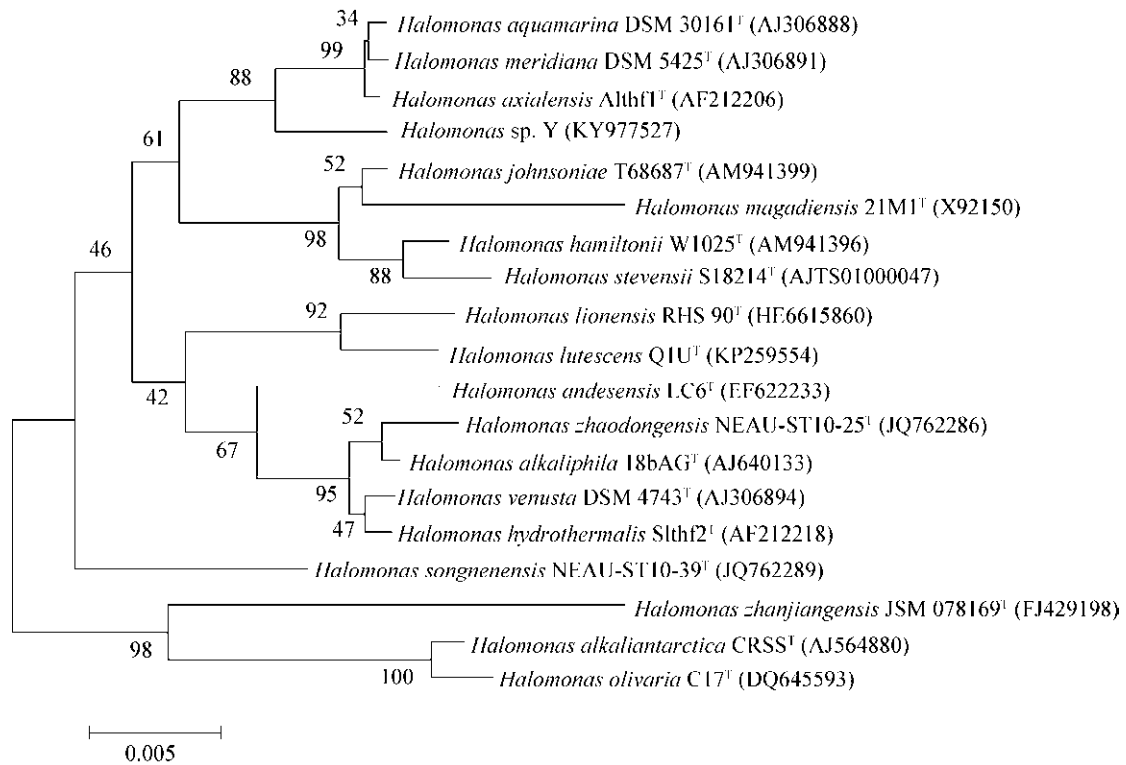


图1 菌株 Y 基于 16S rRNA 基因序列相似性构建的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of strain Y based on the 16S rRNA gene sequences

注：进化树各分支点的数字为自展值，括号中为菌株的 16S rRNA 基因序列号，标尺表示每个位点 0.005 次碱基替换。

Note: Bootstrap values are shown in branching points. GenBank accession numbers of 16S rRNA gene sequence are given in parentheses. The bar represents 0.005 substitutions per site.

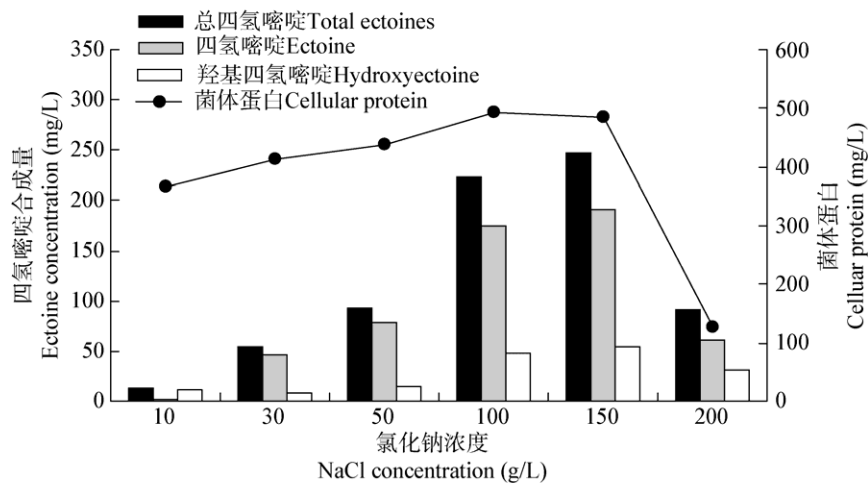


图2 盐浓度对菌株 Y 生长及四氢嘧啶合成的影响

Figure 2 Effects of salinity on the growth of and ectoine synthesis in strain Y

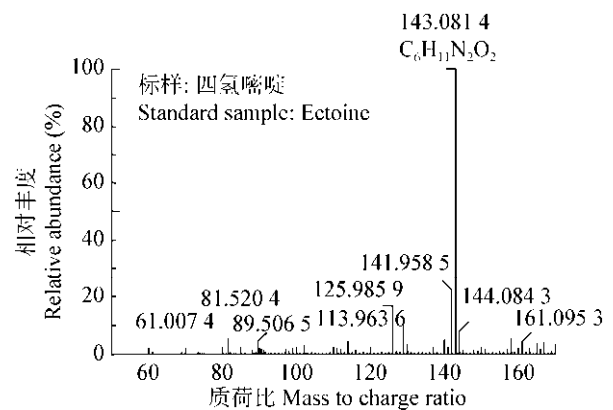
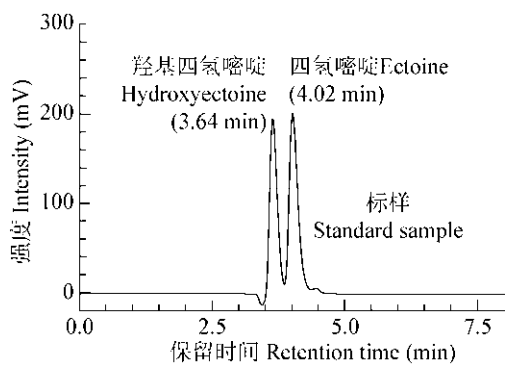
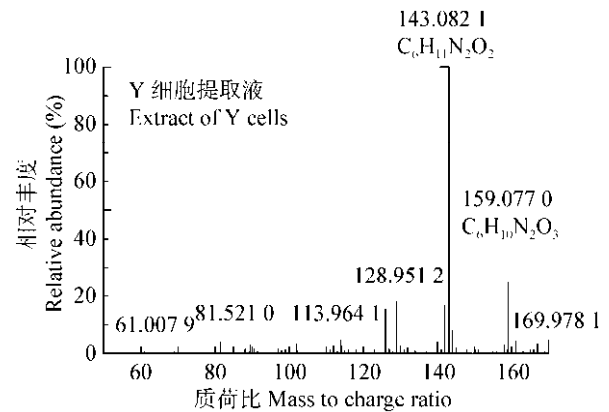
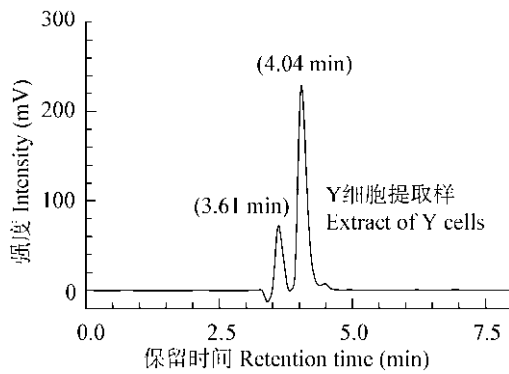


图 3 菌株 Y 细胞提取液中四氢嘧啶类相容性溶质的 HPLC 图谱

Figure 3 HPLC spectrum of ectoines in the extract of Y cells

### 2.3 渗透压冲击下 Y 细胞中四氢嘧啶的合成与释放

为了研究细菌泌乳法制备四氢嘧啶的可行性, 首先以最适生长的高渗培养基(NaCl 质量浓度为 100 g/L)中培养的菌体为材料, 研究了低渗溶液对菌株 Y 胞内四氢嘧啶释放的影响。从图 5 可以看出, 在低渗溶液中菌株 Y 胞内四氢嘧啶的释放速率极大, 低渗冲击 5 min 后即可达到最大的释放率, 延长低渗冲击的时间后释放率不再有明显变化。四氢嘧啶的释放率与低渗溶液中盐浓度呈负相关关系, 当冲击液中 NaCl 质量浓度由 0 g/L 逐步提高至 30 g/L 时, 四氢嘧啶的释放率由 93.8% 大幅下降至 40.7%。

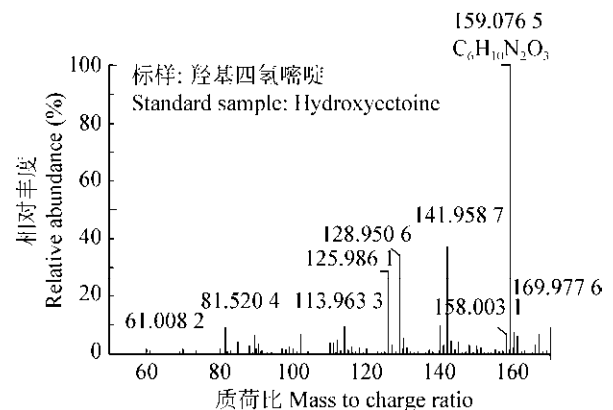


图 4 四氢嘧啶类标样及 Y 细胞提取液中相容性溶质的质谱图

Figure 4 MS spectrograms for standard ectoines and compatible solutes in the extract of Y cells

低渗冲击 30 min 后离心收集菌体,再转移至高渗培养基(NaCl 浓度为 100 g/L)中进一步考察其重新合成四氢嘧啶的能力。结果显示:经 0–5 g/L NaCl 溶液冲击的 Y 菌体转移至高渗培养基中后,四氢嘧啶的合成量较低(126.4–141.7 mg/g),且恢复合成的速率较慢,达到最大合成量所需的时间长达 12 h,说明 NaCl 浓度为 0–5 g/L 的低渗冲击对 Y 菌体的代谢活性已经产生不利影响;10、20 和 30 g/L 的 NaCl 溶液冲击对 Y 菌体的活性影响较小,转移至高渗培养基中后四氢嘧啶恢复合成的速率明显加快,且其最大合成量分别上升至 158.3、178.1 和 186.3 mg/g (图 5)。但是, Y 菌体经 20–30 g/L 的盐溶液低渗冲击时四氢嘧啶的释放率偏低(57.1%–40.7%),再次低渗冲击的情况下并不能释放更多的四氢嘧啶产物,因此也不满足细菌泌乳工艺的要求。相对而言,经 10 g/L 的盐溶液低渗冲击的菌体转入高渗培养基中后虽然四氢嘧啶的合成量不是最高,但胞内四氢嘧啶的释放率较高(65.3%),再次低渗冲击的情况下反而可以释放和收获更多的四氢嘧啶类产物,因此适合于细菌泌乳工艺的要求。在本试验中菌体质量浓度为 1 002 mg/L 的条件下,经质量浓度为 10 g/L 的 NaCl 溶液低渗冲击后释放的四氢嘧啶量可达 142.2 mg/L。

#### 2.4 细菌泌乳法制备四氢嘧啶类相容性溶质

将摇瓶培养的 Y 菌体浓缩 4 倍后采用细菌泌乳工艺制备四氢嘧啶,共进行 11 轮低渗/高渗冲击,冲击周期为 12 h。结果显示,菌株 Y 的确能耐受连续多次的高渗/低渗冲击,并保持持续地合成与释放其胞内四氢嘧啶的能力(图 6)。在 11 轮渗透压冲击循环中,菌株 Y 对四氢嘧啶的合成量与释放量仅有小幅波动,其每轮冲击的平均合成量为  $543.8 \pm 86.8$  mg/L,平均释放量为  $515.5 \pm 58.6$  mg/L,释放量占胞内四氢嘧啶类总量的 64.5%。四氢嘧啶类的总合成量为 6.0 g/L,总释放量为 5.7 g/L,合成效率为 1.03 g/(L·d)。在每轮的高渗/低渗冲击中底物的消耗量为 4 g/L,细菌泌乳工艺中四氢嘧啶对底物的转化率为 128.9 mg/g。

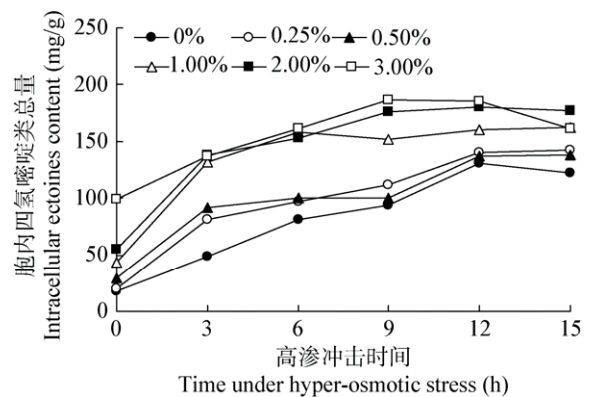
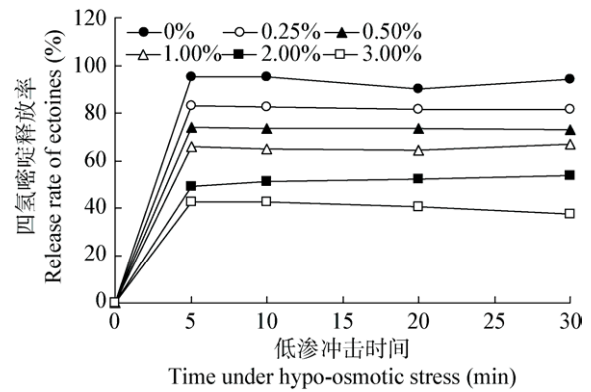


图 5 渗透压冲击下 Y 细胞中四氢嘧啶的释放与重新合成

Figure 5 Release and resynthesis of ectoine in Y cells under hypo/hyper-osmotic stress

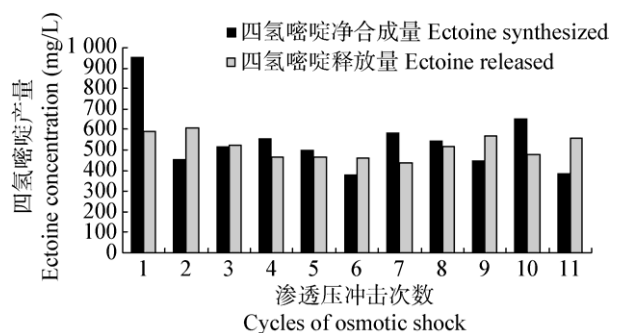


图 6 渗透压冲击下 Y 细胞中四氢嘧啶的释放与重新合成

Figure 6 Release and resynthesis of ectoine in Y cells under hypo/hyper-osmotic stress

### 3 讨论与结论

本文报道的盐单胞菌 Y 最适生长的 NaCl 浓度较高, 单位质量细胞中总四氢嘧啶的合成量达 223.4 mg/g, 其中四氢嘧啶和羟基四氢嘧啶分别为 175.5 mg/g 和 47.9 mg/g, 是一株较高产四氢嘧啶类相容性溶质的中度嗜盐菌。采用细菌泌乳工艺制备四氢嘧啶, 经 11 轮渗透压冲击, 四氢嘧啶总合成量为 6.0 g/L, 总释放量为 5.7 g/L, 平均释放率为 64.5%, 底物转化率达 128.9 mg/g, 底物转化率同常规分批培养相比提高了 2.7 倍, 朗亚军等采用细菌泌乳法制备羟基四氢嘧啶时也得到了类似的结果<sup>[10]</sup>。

中度嗜盐菌在合成四氢嘧啶的同时副产羟基四氢嘧啶是较为普遍的现象<sup>[3,7-8,15-17]</sup>, 盐单胞菌 Y 也具有这个特点, 它在摇瓶分批培养条件下合成的四氢嘧啶类相容性溶质中四氢嘧啶占 67.2%–85.3%, 羟基四氢嘧啶积累量相对较低, 仅占 14.7%–32.8%。不过在连续冲击的条件下, 其合成并释放的四氢嘧啶类物质中四氢嘧啶的比例高达 99.6% 以上, 羟基四氢嘧啶的比例则不到 0.4%, 这对下游工艺中四氢嘧啶的提取、纯化是十分有利的, 同时说明细菌泌乳工艺不利于羟基四氢嘧啶的合成, 这一现象在文献中尚未见报道。细菌泌乳工艺不利于羟基四氢嘧啶合成的原因可以从 2 个方面解释: (1) 羟基四氢嘧啶合成是在四氢嘧啶的基础上经羟基化反应而得, 最后一步羟基化反应相对滞后<sup>[16]</sup>。据报道, 当此类菌体生长到稳定期, 继续延长培养时间会有四氢嘧啶含量下降而羟基四氢嘧啶上升的现象<sup>[17]</sup>; (2) 四氢嘧啶和羟基四氢嘧啶虽然作用相似, 但后者对于嗜盐菌耐受或抵抗更高盐浓度作用更为显著, 通常在盐浓度超过最适生长的浓度而菌体生长较慢时有较高的积累<sup>[18]</sup>, 而本试验在最适生长的盐浓度下进行, 盐单胞菌 Y 优先合成四氢嘧啶可以避免浪费能量。

应当指出的是, 虽然分批培养中盐单胞菌 Y 在 NaCl 质量浓度为 150 g/L 的条件下四氢嘧啶的产量最高, 但在细菌泌乳工艺中我们没有采用该培养

基, 而是选择了生长速率最快、NaCl 浓度为 100 g/L 的高渗培养基来诱导四氢嘧啶的合成, 其原因是盐浓度为 150 g/L 时培养的细胞, 经低渗冲击后转回到高渗培养基中, 其四氢嘧啶再合成的速率较慢, 最终合成量也有明显下降, 导致后续低渗冲击中释放的四氢嘧啶产量并无显著增加。

总的来说, 盐单胞菌 Y 能以乳酸为唯一碳源生长, 营养要求较为简单, 无需以蛋白胨或酵母粉的形式补充生长因子即可满足其生长的需要; 另外, 在菌体细胞培养过程中随着乳酸被逐步利用, 培养基可维持中性至微碱性的 pH 环境, 不会出现 pH 下降, 有利于菌体生长及四氢嘧啶合成产量的稳定, 因而在四氢嘧啶的生物合成领域具有更好的应用潜力。

### REFERENCES

- [1] Horikoshi K, Antranikian G, Bull AT, et al. Halophilic bacteria[M]. Boca Raton: CRC Press, 2011: 255-308
- [2] Zhao BS, Yang LF, Wang L, et al. Study progress on compatible solutes in moderately halophilic bacteria[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2007, 47(5): 937-941 (in Chinese)  
赵百锁, 杨礼富, 王磊, 等. 中度嗜盐菌相容性溶质机制的研究进展[J]. 微生物学报, 2007, 47(5): 937-941
- [3] Pastor JM, Salvador M, Argandona M, et al. Ectoines in cell stress protection: uses and biotechnological production[J]. Biotechnology Advances, 2010, 28(6): 782-801
- [4] Frings E, Sauer T, Galinski EA. Production of hydroxyectoine: high cell-density cultivation and osmotic downshock of *Marinococcus* strain M52[J]. Journal of Biotechnology, 1995, 43(1): 53-61
- [5] Sauer T, Galinski EA. Bacterial milking: a novel bioprocess for production of compatible solutes[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1998, 57(3): 306-313
- [6] Nagata S, Wang YQ, Oshima A, et al. Efficient cyclic system to yield ectoine using *Brevibacterium* sp. JCM 6894 subjected to osmotic downshock[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2007, 99(4): 941-948
- [7] Van-Thuoc D, Guzmán H, Quillaguaman J, et al. High productivity of ectoines by *Halomonas boliviensis* using a combined two-step fed-batch culture and milking process[J]. Journal of Biotechnology, 2010, 147(1): 46-51
- [8] Fallet C, Rohe P, Franco-Lara E. Process optimization of the integrated synthesis and secretion of ectoine and hydroxyectoine under hyper/hypo-osmotic stress[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2010, 107(1): 124-133
- [9] He J, Wang T, Sun JQ, et al. Isolation and characteristics of a moderately halophilic bacterium accumulating ectoine as main compatible solute[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2005, 45(6):



- 900-904 (in Chinese)  
何健, 汪婷, 孙纪全, 等. 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[J]. 微生物学报, 2005, 45(6): 900-904
- [10] Lang YJ, Ren YN, Bai L, et al. Hydroxyectoine synthesis and release under osmotic shock in *Cobetia marina* CICC10367[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009, 49(12): 1590-1595 (in Chinese)  
朗亚军, 任亚南, 柏林, 等. *Cobetia marina* CICC10367 渗透压冲击下羟基四氢嘧啶的合成及释放[J]. 微生物学报, 2009, 49(12): 1590-1595
- [11] Dong XZ, Cai MY. Manual for Systematic Identification of Common Bacteria[M]. Beijing: Science Press, 2001: 364-398 (in Chinese)  
东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 364-398
- [12] Marchesi JR, Sato T, Weightman A. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(2): 795-799
- [13] Walker JM. The Protein Protocols Handbook[M]. New York: Humana Press, 2009: 17-23
- [14] Wei YH, Yuan FW, Chen WC, et al. Production and characterization of ectoine by *Marinococcus* sp. ECT1 isolated from a high-salinity environment[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2011, 111(3): 336-342
- [15] Tao P, Liu H, Yu YJ, et al. Ectoine and 5-hydroxyectoine accumulation in the halophile *Virgibacillus halodenitrificans* PDB-F2 in response to salt stress[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(15): 6779-6789
- [16] Bursy J, Pierik AJ, Pica N, et al. Osmotically induced synthesis of the compatible solute hydroxyectoine is mediated by an evolutionarily conserved ectoine hydroxylase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(43): 31147-31155
- [17] Seip B, Galinski EA, Kurz M. Natural and engineered hydroxyectoine production based on the *Pseudomonas stutzeri* ectABC-ask gene cluster[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(4): 1368-1374
- [18] Stöveken N, Pittelkow M, Sinner T, et al. A specialized Aspartokinase enhanced the biosynthesis of the osmoprotectants ectoine and hydroxyectoine in *Pseudomonas stutzeri* A1501[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(17): 4456-4468

## 征 稿 简 则

### 1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、专栏等。

### 2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿须知”。

### 3 写作要求

3.1 来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.2 英文摘要写作注意事项: (1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者所得; (2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; (3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; (4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。(5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; (6) 在英文摘要中不要使用中文字体标点符号。

3.3 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如“基因”、“表达”等。

(下转 p.804)