

文章编号: 1001-3555(2007)05-0453-05

靛降解菌 LHI38 生物合成靛蓝的研究

邱森^{1,2}, 章俭¹, 宋昊¹, 夏春谷^{1*}

(1. 中国科学院兰州化学物理研究所 羰基合成与选择氧化国家重点实验室, 甘肃 兰州 730000;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 靛降解菌 LHI38 在金属盐培养基中加入水杨酸钠诱导培养后能提高其生物合成靛蓝的能力, 在 LB 培养基中加入水杨酸钠反而抑制了其生物合成靛蓝的能力. 与 LHI38 最适生长 pH 值不同, LHI38 生物合成靛蓝的最佳 pH 值范围是 8.45—9.45, 在 pH 为 8.95 的情况下生物合成靛蓝能力是其在 pH 值为 6.95 的情况下的两倍.

关键词: 靛蓝; 生物合成; 水杨酸钠; 诱导; 吲哚

中图分类号: O643.32 **文献标识码:** A

靛蓝是最早发现的天然染料之一, 广泛用于印染、医药和食品工业^[1-3]. 传统靛蓝的生产方法是从含有靛蓝的植物中提取. 自从 Bayer 发现靛蓝的分子结构以后, 植物靛蓝逐渐被合成靛蓝替代, 然而合成靛蓝反应中使用的邻苯二甲酸酐能导致人体急性和慢性中毒, 对呼吸道和中枢神经以及肝脏均有一定的损害; 苯胺是一种潜在的致癌物质. 因此, 利用生物转化合成靛蓝的研究引起了科学工作者的注意. 上世纪八十年代, Ensley 等人^[1]发现克隆有靛降解基因的 *E. coli* 菌能生物合成靛蓝, 随后, 一些能够生物合成靛蓝的其他菌株陆续被报道^[3-11]. 与化学合成法相比, 生物转化法生产靛蓝在降低生产成本、减少能耗、生产安全及环境安全等方面无疑都具有重要意义.

在生物转化合成靛蓝的过程中, 以单加氧酶或双加氧酶为核心^[1,12]. 在双加氧酶催化合成靛蓝的过程中, 首先将吲哚氧化成二羟二醇, 二羟二醇脱氢生成羟化吲哚, 后者在空气中二聚生成靛蓝.

现有关生物合成靛蓝的报道大都集中在以靛蓝为染色指示剂来指导相关酶的基因重组表达, 而对生物合成靛蓝反应体系及动力学研究较少^[3,11,13]. 微生物双加氧酶降解靛过程中, 水杨酸钠为中间产物, Bhushan 等人^[5]研究发现, 水杨酸钠能有效诱导靛降解菌 *Ps. Putida* RKJ1 生物合成靛蓝. 本研究以吲哚为底物, 利用靛降解菌 *Hydrogenophaga Pal-*

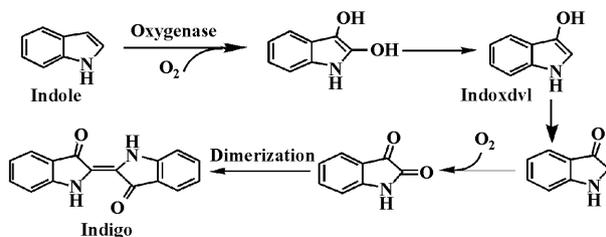


图1 以吲哚为底物生物合成靛蓝

Fig. 1 The biosynthesis of indigo from indole

leronii LHI38^[14] 静止细胞生物合成了靛蓝, 并考察了水杨酸钠以及 pH 值对 LHI38 生物合成靛蓝的影响.

1 材料和方法

1.1 菌种

帕氏氢噬胞菌 (*Hydrogenophaga Palleronii*) LHI38, 由中科院兰州化学物理研究所 osso 国家重点实验室筛选, 经中国典型培养物保藏中心鉴定并保藏, 保藏编号 No. M203053.

1.2 培养基

金属盐培养基: Na_2HPO_4 9.0 g, KH_2PO_4 1.5 g, NH_4Cl 2.0 g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 15.3 mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3.0 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 mg, 去离子水 1 000 mL.

LB 培养基: 蛋白胨 10 g, 酵母浸膏 5 g, NaCl 10 g, 去离子水 1 000 mL.

收稿日期: 2006-12-13; 修回日期: 2007-01-31.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(20273080).

作者简介: 邱森, 男, 1979年12月出生, 硕士研究生.

* 通讯联系人, E-mail: cgxia@lzb.ac.cn

1.3 试剂和仪器

Indigo 购自 Fluka 公司, indole 为化学纯试剂, 其余试剂均为国产分析纯. HP8453UV-VIS 紫外光谱仪(美国 HP 公司); HP1090 高效液相色谱仪; Himac CR 21 高速冷冻离心机(日本 Hitachi 公司).

1.4 实验方法

1.4.1 靛蓝的生物合成实验 LB 培养基用高压灭菌釜灭菌后接种 LHJ38, 在 28 °C, 150 rpm 条件下培养过夜, 高速离心机离心(8 000 rpm, 10 min, 4 °C), 菌体用磷酸盐缓冲溶液洗涤两次, 再悬浮于 200 ml 磷酸盐缓冲溶液中. 移取 4 ml 菌悬液, 转入 10 ml 三角瓶中, 再加入 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的吡啶溶液($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 3:1$) 100 μl , 密封, 28 °C, 150 rpm 条件下反应, 隔一定时间取一次样. 样品离心, 上清液做 HPLC 分析(色谱条件同下面靛蓝的测定, 流动相为 90% $\text{CH}_3\text{OH} + 10\% \text{H}_2\text{O}$, 检测波长 280 nm). 下层紫黑色固体(细胞)悬浮于 4ml N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中, 超声 5 min, 离心, 取上层蓝色清液做紫外-可见分析.

1.4.2 靛蓝的分离与鉴定 TLC 分析: LB 培养基 100 mL 用高压灭菌釜灭菌后, 接种 LHJ38, 再加入吡啶溶液 2.5 mL, 在 28 °C, 150 rpm 条件下培养 2 d, 高速离心机离心, 悬浮于 100 mL DMF 中, 超声, 离心, 取上层清液做 TLC 分析, 展开剂为 $\text{CHCl}_3\text{-CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3/4\text{-}1$.

HPLC 分析: 条件如 TLC 分析所获得的第一次离心样品, 去离子水洗涤 5 次(每次都重新悬浮和离心), 样品悬浮于 10 mL DMF 中, 超声, 加入 100 mL CHCl_3 , 等体积的去离子水洗涤 5 次, CHCl_3 溶液用无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤, HPLC 分析.

HPLC 色谱条件: Diamonsil C_{18} 柱(250 mm \times 4.6 mm), 柱温 25°C, 进样量 10 μL , 流动相为 A: 10 mmol/L NH_4Ac 水溶液; B: 10% A + 90% CH_3OH . 梯度洗脱: 0 min 90% B + 10% A; 0 ~ 15 min 90% B + 10% A 梯度变化到 100% B; 15 min 后为 100% B. 流速 0.5 mL \cdot min⁻¹, 检测波长 612 nm.

1.4.3 水杨酸钠对生物合成靛蓝的影响

1.4.3.1 水杨酸钠在金属盐培养基中对 LHJ38 生物合成靛蓝的诱导作用

金属盐培养基中加入 $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的水杨酸钠溶液, 使水杨酸钠的最终浓度为 2.5 mmol/L, 与未加水杨酸钠的金属盐培养基一同用事先灭菌的微孔滤

膜过滤除菌, 接种 LHJ38, 加入碳源萘, 28 °C, 150 rpm 条件下培养 2d. 培养基中加入少量的环己烷, 萃取除去未降解完全的碳源萘, 离心, 磷酸盐缓冲溶液洗涤两次, 洗涤后的菌体再悬浮于 100 ml 磷酸盐缓冲溶液中. 移取 4 ml 菌悬液, 转入 10 ml 三角瓶中, 加入吡啶溶液 100 μl , 密封, 28 °C, 150 rpm 条件下反应. 隔一定时间取一次样, 离心, 下层固体悬浮于 DMF(4 ml)中, 超声, 离心, 取上层蓝色清液做紫外-可见分析.

1.4.3.2 水杨酸钠在 LB 培养基中对 LHJ38 生物合成靛蓝的抑制作用

LB 培养基加入 $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的水杨酸钠溶液, 使水杨酸钠的最终浓度为 2.5 mmol/L, 与未加水杨酸钠的 LB 培养基一同用事先灭菌的微孔滤膜过滤除菌, 接种 LHJ38, 在 28 °C, 150 rpm 条件下培养过夜. 剩余步骤与 1.4.3.1 相同.

1.4.3.3 水杨酸钠和 pH 值对 LHJ38 生物合成靛蓝的影响

配制 200 mL LB 培养基, 分成 4 份, 两份加入水杨酸钠, 使水杨酸钠的最终浓度为 2.5 mmol/L. 分别取加水杨酸钠与不加水杨酸钠的培养基各一份, 调 pH 值为 8.95. 四份培养基过滤除菌, 接种 LHJ38, 28 °C, 160 rpm 条件下培养过夜, 离心, 缓冲溶液洗涤两次, 悬浮于 pH 值为 8.95 的缓冲溶液中. 移取 4 ml 菌悬液, 转入 10 ml 三角瓶中, 迅速加入 100 μL 吡啶溶液, 密封, 28 °C, 160 rpm 条件下反应 3 h. 离心, 弃去上清液, 下层固体悬浮于 DMF 中, 超声, 离心, 取上清液做紫外-可见分析.

2 结果和讨论

2.1 靛蓝的生物合成实验

LHJ38 生物合成靛蓝的量通过测定样品紫外-可见吸收获得, 吡啶的浓度的变化通过高效液相色谱测定. 以 LB 培养基为能源和碳源的 LHJ38 生物合成靛蓝的最大速率为 $96.73 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g (dry weight)}^{-1}$. 如图 2 所示, 在 40 min 以前 LHJ38 能迅速的合成靛蓝, 40 min 后, 合成速度逐渐降低, 经过 120 min 的反应后, 尽管还有大量的吡啶, 但是 LHJ38 生物合成靛蓝的能力已经变得非常微弱. 大约 12 mg/L 的吡啶被 LHJ38 生物合成了约 10 mg/L 的靛蓝.

2.2 靛蓝的分离与鉴定

薄层层析色谱分析发现蓝色样品的 R_f 值

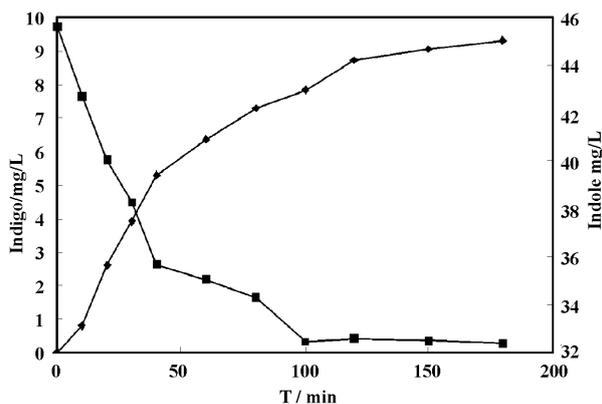


图 2 LHJ38 以吲哚为底物生物合成靛蓝反应

Fig.2 The biosynthesis of indigo by LHJ38 from indole

(0.74; 展开剂, $\text{CHCl}_3\text{-CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3/4\text{-}1$) 与标准靛蓝 R_f 值的一样. 高效液相色谱分析表明蓝色样

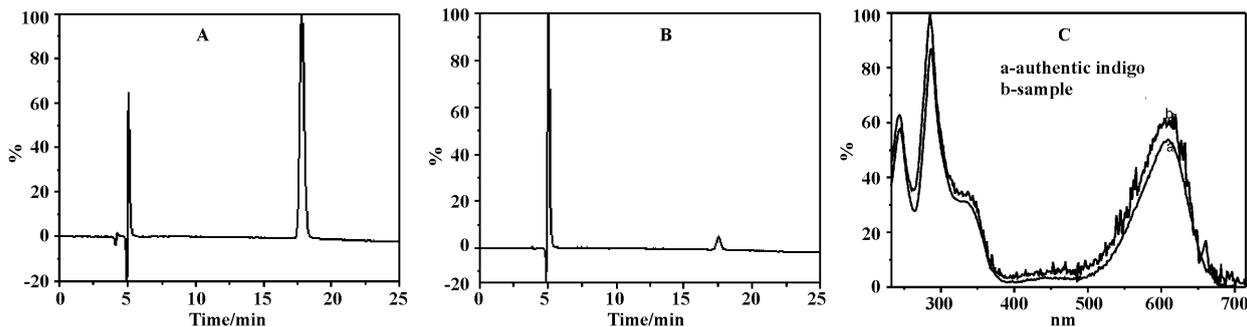


图 3 标准靛蓝和样品的 HPLC 图谱及紫外吸收图谱

Fig.3 HPLC spectra UV spectrum of authentic indigo and the pigment

(A) HPLC of authentic indigo; (B) HPLC of the pigment; (C) UV spectrum of authentic indigo and the pigment

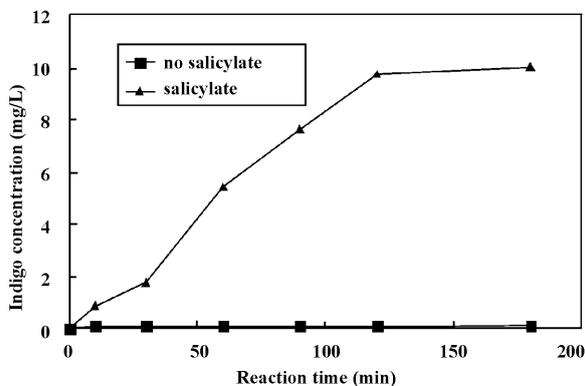


图 4 水杨酸钠在金属盐培养基中对 LHJ38 生物合成靛蓝的诱导作用

Fig.4 The biosynthesis of indigo by LHJ38 in mineral salts medium in the presence or absence of the salicylate (2.5 mmol/L)

品与标准靛蓝有相同的保留时间(图 3a, b), 相同的紫外吸收图谱(图 3c, d).

2.3 水杨酸钠对生物合成靛蓝的影响

2.3.1 水杨酸钠在金属盐培养基中对 LHJ38 生物合成靛蓝的诱导作用 在金属盐培养基条件下以萘为唯一碳源和能源培养两天, LHJ38 整细胞在缓冲溶液中具有微弱的生物合成靛蓝的能力(图 4), 其生物合成靛蓝的最大浓度为 0.13 mg/L. 在金属盐培养基条件下以萘为碳源, 并加入最终浓度为 2.5 mmol/L 水杨酸钠, 经过两天的诱导培养, LHJ38 整细胞在缓冲溶液中生物合成靛蓝的能力比没有经过水杨酸钠诱导大为提高, 其生物合成靛蓝的最大浓度能达到 9.99 mg/L. 整细胞经过 120 min 的反应后, 其生物合成靛蓝的能力基本消失.

2.5 mmol/L 的水杨酸钠, 经过两天的培养, LHJ38

整细胞在缓冲溶液中生物合成靛蓝的最高浓度为 7.05 mg/L(图 5). 在 LB 培养基条件下培养两天, LHJ38 整细胞在缓冲溶液中合成靛蓝的最高浓度为 19.71 mg/L. 其生物合成靛蓝的能力为加入水杨酸钠时的 2.80 倍. 这种情况与以往报道不同^[7]. 从图 5 还可以看出, 在 40 min 前加入水杨酸钠的 LB 培养基合成靛蓝的速度明显高于未加水杨酸钠的速度, 说明在 LB 培养基中水杨酸钠的加入也能提高其生物合成靛蓝的能力. 到 40 min 后其合成靛蓝的量不再明显增加, 而不加水杨酸钠的 LB 培养基合成靛蓝的量却在继续增加, 我们推测可能是水杨酸钠与 LB 培养基相互作用的结果或者是生物合成靛蓝是多种酶系共同作用的结果, 而水杨酸钠对细胞相关酶的合成的影响使得整个酶系失衡, 相关的研究还在进行中.

2.3.3 水杨酸钠和 pH 值对 LHJ38 生物合成靛蓝的影响 LHJ38 在 LB 培养基中培养过夜后, 在 pH

2.3.2 水杨酸钠在 LB 培养基中对 LHJ38 生物合成靛蓝的抑制作用 LB 培养基中加入最终浓度为

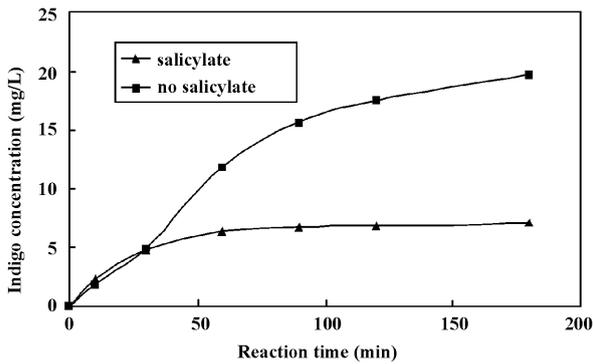


图 5 水杨酸钠在 LB 培养基中对 LHM38 生物合成靛蓝的影响

Fig. 5 The biosynthesis of indigo by LHM38 in LB medium in the presence or absence of the salicylate (2.5 mmol/L)

值为 6.95 的磷酸盐缓冲溶液中每毫克(干重)整细胞生物合成的靛蓝是同等条件下加入 2.5 mmol/L 的水杨酸钠培养的两倍(图 7)。从图 6 可以看到 LHM38 生物合成靛蓝的最佳 pH 值区间是从 8.45 ~ 9.45, 而不是 LHM38 的最适生长 pH 值 6.95。这说明 LHM38 的最适生长 pH 值与其体内双加氧酶生物

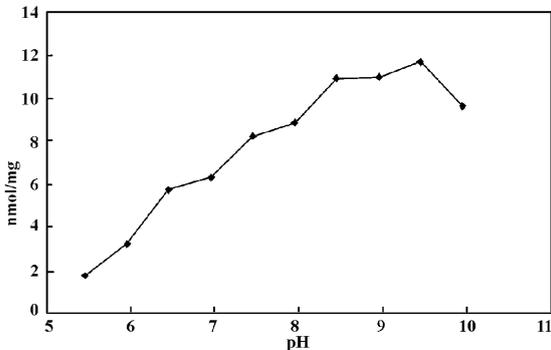


图 6 不同 pH 对 LHM38 生物合成靛蓝的影响

Fig. 6 The effect of pH in the biosynthesis of indigo by LHM38

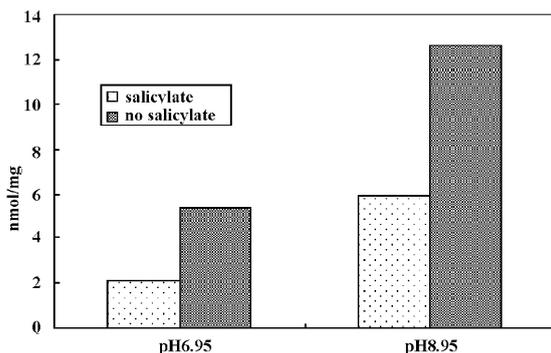


图 7 不同 pH 及有无水杨酸钠对 LHM38 生物合成靛蓝的影响

Fig. 7 Indigo formation by LHM38 grown in LB medium at pH 6.95 and 8.95 in the presence or absence of salicylate (0.25 mmol/L)

合成靛蓝的最适 pH 值不同。从图 7 可以看出, 无论是否加水杨酸钠, 在缓冲溶液 pH 值为 8.95 的情况下, 每毫克(干重)的 LHM38 整细胞生物合成靛蓝的量都大约是 pH 值为 6.95 的情况下的两倍。

3 结论

萘降解菌 LHM38 在金属盐培养基中培养后能够催化吲哚生物合成靛蓝, 但是其在金属盐培养基中生物合成靛蓝的能力相当微弱, 加入水杨酸钠诱导能够提高其生物合成靛蓝的能力。LHM38 在 LB 培养基中培养后也能够催化吲哚生物合成靛蓝, 但是在 LB 培养基中加入水杨酸钠反而抑制了其双加氧酶生物合成靛蓝的能力。以 LB 培养基为能源和碳源的 LHM38 生物合成靛蓝的最大速率为 $96.73 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g (dry weight)}^{-1}$ 。通过实验发现, 与其最适生长 pH 不同, LHM38 生物合成靛蓝的最佳 pH 值范围是 8.45 ~ 9.45, 在 pH 为 8.95 的情况下生物合成靛蓝能力是其在 pH 值为 6.95 的情况下的两倍。

参考文献:

- [1] Ensley B D, Ratzkin B J, Osslund T D, *et al.* *Science* [J], 1983, **222**: 167 ~ 169
- [2] Li Hong-mei(李红梅), Mei Le-he(梅乐和), Vlada U. *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理进展). [J], 2005, **37**(7): 630 ~ 635
- [3] O' Connor K E, Dobson A D W, Hartmans S. *Appl. Environ. Microbiol.* [J], 1997, **63**: 4 287 ~ 4 291
- [4] Royo J L, Ruiz E M, Cebolla A, *et al.* *Journal of Biotechnology* [J], 2005, **116**: 113 ~ 124
- [5] Bhushan B, Samanta S K, Jain R K. *Lett. Appl. Micro.* [J], 2000, **31**: 5 ~ 9
- [6] Gordon M, Dobson A D W. *Biodegradation* [J], 2001, **12**: 393 ~ 400
- [7] Alemayehu D, Gordon L M, O_Mahony M M, *et al.* *FEMS Microbiology Letters* [J], 2004, **239**: 285 ~ 293
- [8] Gillam E M J, Aguinaldo A M A, Notley L M. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [J], 1999, **265**: 469 ~ 472
- [9] Mermod N, Harayama S, Timmis K N. *Bio/Technology.* [J], 1986, **4**: 321 ~ 324
- [10] Murdock D, Ensley B D, Serdar C, *et al.* *Bio/Technology.* [J], 1993, **11**: 381 ~ 386
- [11] Lu Yan(陆燕), Mei Le-he(梅乐和), Li Hong-mei(李红梅), *et al.* *Progress in Nature Science* (in Chinese 自然科学进展) [J], 2006, **16**: 1 047 ~ 1 050

- [12] Meyer A, Wursten M, Schmid A, *et al.* *J. Biol. Chem.* [J], 2002, **144** (37): 34 161 ~ 34 167
- [13] Murdock D, Ensley B D, Serdar C. *et al.* *Bio/Technology.* [J], 1993, **11**: 381 ~ 386
- [14] Song Hao(宋 昊), Qiu Sen(邱 森), Zhang Jian(章 俭), *et al.* *Environmetal Protection of Chemical Industry* (化工环保) [J], 2006, **26**: 87 ~ 90

Biosynthesis of Indigo by Naphthalene-degrading Bacteria LHJ38

QIU Sen^{1,2}, ZHANG Jian¹, SONG Hao¹, XIA Chun-gu^{1*}

(1 *State Key Laboratory for Oxo Synthesis and Selective Oxidation, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Gansu Lanzhou 730000 China*)

(2 *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039 China*)

Abstract: The biosynthesis of indigo by naphthalene-degrading bacteria LHJ38 from indole has been studied. Indigo formation capacity by LHJ38 growing in mineral salts medium in the presence of salicylate greatly increased, contrarily, indigo formation capacity by LHJ38 growing in LB medium in the presence of salicylate decreased by 2 times. The optimum pH ranges for biosynthesis of indigo is 8.45 ~ 9.45 which is different from the incubation pH of LHJ38, and indigo formation by LHJ38 growing in LB medium at pH 8.95 increased 2 times compared with that at pH 6.95.

Key words: indigo; biosynthesis; salicylate; induce; indole