

丹参提取液对球形红细菌生长的影响

张 辉¹, 李建文¹, 宋艳红², 杨官娥^{1*}

1. 山西医科大学药学院, 山西 太原 030001

2. 山西省兽药监察所, 山西 太原 030027

摘要: **目的** 考察丹参提取液对球形红细菌(光合细菌)生长的影响。**方法** 通过添加不同质量浓度的常规培养基和丹参提取液, 培养球形红细菌, 考察球形红细菌的活菌数、生长曲线、脱氢酶活性及光合色素吸收光谱, 研究丹参提取液对球形红细菌生长的影响。**结果** 培养基中添加丹参提取液后可使球形红细菌活菌数增加到之前的1.6倍, 并缩短球形红细菌生长的延迟期, 提前进入指数期及稳定期, 可使球形红细菌脱氢酶活性提高到之前的6.6倍。低质量浓度丹参提取液基本不影响球形红细菌中光合色素的形成, 高质量浓度时吸收均变低, 且影响类胡萝卜素的形成, 其红外光谱855 nm处红移至863 nm。**结论** 培养基中添加丹参提取液可影响球形红细菌生长, 缩短球形红细菌生长周期, 提高球形红细菌的活力, 高质量浓度时影响光合色素的形成。

关键词: 丹参; 光合细菌; 球形红细菌; 脱氢酶活性; 光合色素

中图分类号: R282.21 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)07-1413-04

Effects of *Salvia miltiorrhiza* extract on growth of *Rhodobacter sphaeroides*

ZHANG Hui¹, LI Jian-wen¹, SONG Yan-hong², YANG Guan-e¹

1. School of Pharmaceutical Sciences, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

2. Shanxi Provincial Supervision Institute for Veterinary Drug Control, Taiyuan 030027, China

Abstract: **Objective** To study the effects of *Salvia miltiorrhiza* extract on the growth of *Rhodobacter sphaeroides* (photosynthetic bacteria, PSB). **Methods** The effects of *S. miltiorrhiza* extract on the growth of *R. sphaeroides* were researched by observing the effects of *S. miltiorrhiza* and general culture medium at concentration on the number, growth curve, dehydrogenase activity, and absorption spectra of photosynthetic pigment of alive *R. sphaeroides*. **Results** After adding *S. miltiorrhiza* extract into culture medium for 3 d, the number of alive *R. sphaeroides* was increased in 1.6 times, the delay period was shortened and the exponential and stationary periods were advanced which could shorten the growth period of *R. sphaeroides*, the dehydrogenase activity of *R. sphaeroides* was improved in 6.6 times as before. When *S. miltiorrhiza* concentration was higher, the absorption of photosynthetic pigment of alive *R. sphaeroides* was getting lower, which was almost insensitive while *S. miltiorrhiza* concentration was lower. When *S. miltiorrhiza* concentration was high, the formation of carotenoid which was in short wavelength region was influenced and the peak at 855 nm was approximately blue-shifted to 863 nm. **Conclusion** When adding *S. miltiorrhiza* extract into culture medium, the growth and the activity of *R. sphaeroides* could be improved, the growth cycle be shortened and the formation of photosynthetic pigment be effected.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bunge; photosynthetic bacteria (PSB); *Rhodobacter sphaeroides* (van Niel) Imhoff, Truper et Pfennig; dehydrogenase activity; photosynthetic pigment

光合细菌(photosynthesis bacteria, PSB)具有发酵、固氮及产氢等功能^[1], 被广泛应用于废水处理、水产养殖、医药保健等方面。研究发现甘草、槲寄

生等植物对部分光合细菌生长具有促进作用^[2-4]。球形红细菌 *Rhodobacter sphaeroides* (van Niel) Imhoff, Truper et Pfennig 为光合细菌紫色非硫菌群红细菌

收稿日期: 2010-12-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30672621); 山西省自然科学基金资助项目(2010011048-2)

作者简介: 张 辉(1985—), 女, 山西应县人, 山西医科大学在读硕士, 主要从事中药物物质基础研究。

Tel: (0351) 4690143 E-mail: zhanghui8538@126.com

*通讯作者 杨官娥 Tel: (0351)4690143 E-mail: yangguane@hotmail.com

属,已有文献报道球形红细菌可以转化中药的部分成分^[5-6]。本课题组前期研究表明,经球形红细菌转化后的丹参提取液成分发生了很大变化,明显提高了对高脂血症大鼠的调血脂、抗氧化等作用。本实验通过考察丹参提取液对球形红细菌生长的影响,为球形红细菌转化丹参提取液调血脂及转化机制研究提供理论依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

药材产于山东,购自安国市祈澳中药饮片有限公司,经山西医科大学高建平教授鉴定为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的干燥根及根茎。

球形红细菌 *R. sphaeroides* 由山西大学光合细菌研究室分离鉴定,光照厌氧培养 3 d,菌液含菌数 5.0×10^8 个/mL。

1.2 常规培养基

醋酸钠 1.640 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.075 g, EDTA 0.020 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.200 g, 酵母膏 1.000 g, K_2HPO_4 0.900 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.320 g, KH_2PO_4 0.600 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.118 g、微量元素 1.0 mL、去离子水 1.0 mL, pH 6.8~7.2。其中微量元素溶液组成为 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.800 g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.250 g, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.010 g, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.010 g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.700 g, ZnCl_2 0.100 g, H_3BO_3 0.500 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.030 g, $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.010 g, 蒸馏水 1 L。

1.3 仪器

TU—1901 双光束紫外可见光分光光度计(北京普析通用仪器有限公司), DL—5-B 低速大容量离心机(上海安亭科学仪器厂), YS100 型显微镜(日本 Nikon 公司), 超净工作台(上海新苗医疗器械有限公司)。

2 方法

2.1 试验条件

实验用培养液和实验仪器均经过高温湿热灭菌 30 min, 接种前在超净工作台内紫外线照射灭菌 30 min。培养容器为 100 mL 注射瓶, 平行样品 3 个, 重复 3 次。实验温度 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, 厌氧培养, 光照强度 2 500 lx。用血球计数法测定菌液活菌数以示球形红细菌的生长情况。实验数据取 3 个平行样的平均值。

2.2 培养方法

每次 1 h, 合并滤液, 浓缩至一定体积, 按丹参原药材不同的质量分别装入注射瓶, 加入不同体

积的水或培养液, pH 值调至 7.0, 121°C 灭菌 30 min, 得不同常规培养液(全量常规培养液、半量常规培养液、无常规培养液)和含不同质量浓度丹参提取液(按丹参原药材计)的球形红细菌培养基。无菌条件下, 接种 1/5 体积的球形红细菌菌液后培养 3~5 d, 得球形红细菌转化丹参培养液。

2.3 脱氢酶活性测定方法

2.3.1 固定化培养 取培养好的球形红细菌菌液 250 mL, 离心后得湿菌体 1.56 g, 以聚乙烯醇为固定化材料, 以饱和硼酸溶液为固定剂, 制成固定化细胞 26.1 g, 于培养液中活化 12 h 后, 分别取 5 g 接种于质量浓度分别为 0、4.5、100、200 g/L 丹参提取液的全量常规培养基中, 培养 3 d, 得固定化球形红细菌转化丹参培养液。

2.3.2 脱氢酶活性的测定 采用氯化三苯基四氮唑(TTC)法, 按文献方法^[7]稍作修改。具体方法为取“2.3.1”项中培养的固定化细菌, 剪碎, 蒸馏水洗 3 次, 分别加入 9 mL Tris-HCl (pH 8.4)、3 mL 0.4% TTC、0.36% Na_2SO_3 、水, 混匀, $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温水浴振荡培养, 5 min 后用吸管迅速吸取 6 mL 培养液于 10 mL 离心管中, 加入 0.6 mL 甲醛溶液, 作为空白对照。吸出 5 mL 培养液, 培养 30 min, 加入 1.2 mL 甲醛溶液混合均匀, 4 800 r/min 与对照一起离心 5 min, 弃去上清液, 向每支离心管中加入 6 mL 80%丙酮, 搅拌混合均匀, 在 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 条件下水浴振荡 10 min, 离心 5 min, 取其上清液即为样品显色液, 在波长 485 nm 处进行比色分析, 将所测吸光度值代入标准曲线 $Y = 0.024X + 0.0003$, $r = 0.9962$, 得到三苯基甲酯(TF)浓度。其中 X 为 TF 浓度, Y 为吸光度。再计算样品的脱氢酶活性。以每小时每毫升球形红细菌菌液产生的 TF 为一个活力单位。试验重复 3 次, 取平均值。

2.4 光合色素吸收光谱的测定

取培养 3 d 的纯球形红细菌培养液、3 种球形红细菌转化丹参培养液(丹参提取液质量浓度分别为 4.5、100、200 g/L)分别 4 800 r/min 离心 30 min, 弃去上清液, 菌体悬浮于 60%蔗糖溶液中^[8], 分光光度计上扫描, 波长 300~900 nm。

3 结果

3.1 不同质量浓度丹参提取液和常规培养液对球形红细菌生长的影响

图 1 为不同质量浓度的丹参提取液常规培养基条件下球形红细菌活菌数变化的关系图。由图 1 可

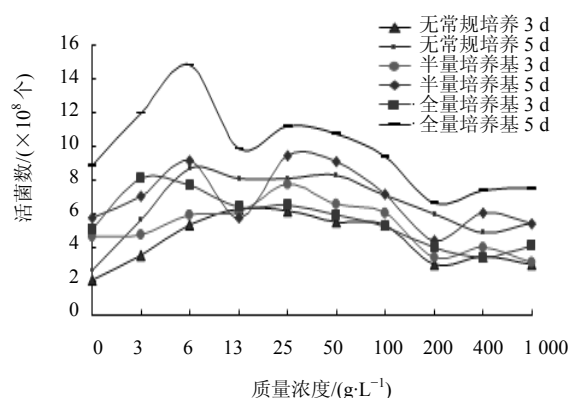


图 1 不同质量浓度丹参提取液对球形红细菌活菌数的影响

Fig. 1 Effects of *S. miltiorrhiza* extract at different concentrations on number of alive *R. sphaeroides* under various culture medium concentrations

知,培养 3 d 时全量培养液中原菌液菌数为 5.11×10^8 个,当丹参提取液质量浓度小于 100 g/L 时,培养液中球形红细菌数大于原菌液菌数,说明其可以促进球形红细菌生长。丹参提取液质量浓度为 3.13 g/L 时,球形红细菌数达到最大,为 8.11×10^8 个,是未加丹参的原菌液中球形红细菌数的 1.6 倍。随着丹参提取液质量浓度的继续增加 (100~1000 g/L),活菌数均低于原菌数,在 $5.23 \times 10^8 \sim 4.12 \times 10^8$ 个,对球形红细菌的生长表现为抑制作用。在半量常规培养基、无常规培养基条件下,当丹参提取液质量浓度在 6.25~100 g/L 时,球形红细菌活菌数均高于原菌液活菌数,表现为促进生长作用,当质量浓度增加到 100 g/L 以上,开始低于原菌液活菌数,表现为抑制作用。

培养 5 d 时,趋势与 3 d 时基本相同。5 d 时全量培养液中原菌液活菌数增长到 8.84×10^8 个,质量浓度低于 100 g/L 时适合细菌生长,但半量培养液只有 6.25、25、50 g/L 3 个质量浓度适合细菌生长,无常规培养基活菌数均低于全量常规培养液。说明无论是否加入丹参提取液,全量常规培养液均为理想的培养液,丹参提取液质量浓度为 3.13~50 g/L 时更适合球形红细菌生长。

3.2 不同质量浓度丹参提取液对球形红细菌生长曲线的影响

由图 2 可知,低于 100 g/L 的丹参提取液半量、全量常规培养基均可以促进球形红细菌的生长,为初步探索其影响机制,以全量常规培养基为对照,4.5、100、200 g/L 丹参提取液全量常规培养基平行

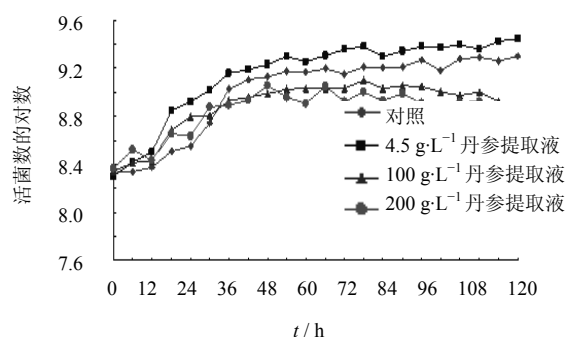


图 2 不同质量浓度丹参提取液对球形红细菌生长曲线的影响

Fig. 2 Effects of *S. miltiorrhiza* extract on *R. sphaeroides* growth curve

绘制生长曲线。由图 2 可知,常规培养液中球形红细菌 24 h 度过延迟期进入指数期,48 h 进入稳定期。4.5、100、200 g/L 丹参提取液全量常规培养液球形红细菌 12 h 度过延迟期进入指数期,36 h 进入稳定期。说明丹参提取液适合球形红细菌生长,可以缩短球形红细菌延迟期,使球形红细菌更快地进入指数期及稳定期,缩短光合细菌的生长周期。

100、200 g/L 丹参提取液培养基虽然在第 1 天球形红细菌活菌数均高于对照,但随着时间的推移均较早进入衰亡期,只有 4.5 g/L 丹参提取液全量常规培养液不仅提前进入指数期,在第 5 天仍处于稳定期,而且球形红细菌活菌数高于对照,说明低质量浓度丹参提取液可以促进球形红细菌生长。

3.3 不同质量浓度丹参提取液对球形红细菌脱氢酶活性的影响

由表 1 可知,4.5、100、200 g/L 丹参提取液中固定化细胞脱氢酶活性分别是常规培养液中固定化细胞脱氢酶活性的 4.7、1.9、6.6 倍。说明丹参提取液可以提高固定化球形红细菌脱氢酶活性,但不呈量效关系。

3.4 不同质量浓度丹参提取液对光合色素吸收光谱的影响

表 1 不同质量浓度丹参提取液对球形红细菌脱氢酶活性的影响 ($n=3$)

Table 1 Effects of *S. miltiorrhiza* extract on dehydrogenase activity of alive *R. sphaeroides* under various culture medium concentrations ($n=3$)

丹参提取液/(g·L ⁻¹)	吸光度	活力/(μg·mL ⁻¹ ·h ⁻¹)
0	0.180	149.75
4.5	0.851	708.92
100	0.350	291.44
200	1.194	994.75

光合细菌的光合色素由细菌叶绿素和类胡萝卜素组成,在不产氧光合细菌活细胞中,光合色素和蛋白质结合在一起,活细胞吸收光谱显示的是色素蛋白复合体的特征性吸收峰^[9],细菌叶绿素和类胡萝卜素的吸收波长分别为715~1050 nm和450~550 nm^[10]。由图3可见,光照厌氧条件下,细菌叶绿素和类胡萝卜素的特征吸收峰分别为855、806 nm和529、498、466 nm。低质量浓度的丹参提取液促进光合色素的形成,高质量浓度时吸收均变低,尤其影响短波长部分即类胡萝卜素的形成,另外855 nm处红移至863 nm。

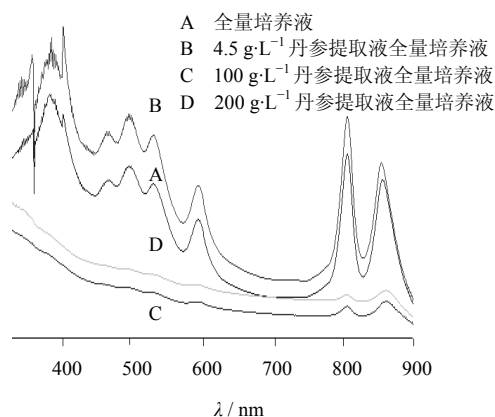


图3 不同质量浓度丹参提取液对球形红细菌光合色素吸收光谱的影响

Fig. 3 Effect of *S. miltiorrhiza* extract at various concentration on absorption spectra of photosynthetic pigment of *R. sphaeroides*

4 讨论

一定质量浓度的丹参提取液可用作球形红细菌生长促进剂,且可以作为球形红细菌的培养基,这为球形红细菌转化丹参制剂研究提供可靠依据。

脱氢酶是微生物用于生物合成和维持细胞的生命活动的一类酶。由脱氢酶活性测定可知,丹参提取液可以提高球形红细菌脱氢酶活性,但不呈剂量效应关系,推测随着丹参提取液质量浓度的增加可能会改变球形红细菌的代谢途径、转化丹参提取物中的部分成分、诱导产生新的脱氢酶同工酶^[10]。

Pemberton 等^[11]研究表明,在光和氧变化环境中,细胞可通过诱导合成不同类型的类胡萝卜素、细菌叶绿素及其色素蛋白复合体,并通过调整其量和比例来适应相应环境;岳慧英等^[8]研究表明,氧分压对细菌叶绿素的中间产物积累有较大影响,可通过调节氧分压来获得不同特性的细菌叶绿素。

本实验中球形红细菌光合色素紫外扫描结果表明,低质量浓度丹参提取液促进光合色素的形成,高质量浓度时表现为抑制作用,但在200 g/L时色素形成量大于100 g/L,且855 nm处发生红移。由此推测质量浓度低时只促进其代谢及色素的合成,高质量浓度时可能通过改变其代谢途径和色素合成体系来适应相应环境。高质量浓度时很大程度地影响球形红细菌的色素合成系统,但是否与球形红细菌转化丹参,使其调血脂作用升高有关,有待于进一步研究。

本实验结果表明,球形红细菌脱氢酶活性和光合色素的形成量具有相同的规律,即两者的增加或降低规律相同,这为球形红细菌代谢途径的改变提供了又一佐证。本研究为球形红细菌转化丹参的转化机制研究奠定了基础。

本实验针对丹参对球形红细菌生长的影响进行了研究,其作用机制需进一步探索。培养球形红细菌的具体条件也需要根据用途而定。用于农牧业、水产养殖等,应在全量常规培养基条件下进行培养,丹参提取液3.13~6.25 g/L为佳;用于生物转化,应在充分考虑转化效果、药理活性的前提下,提高球形红细菌活菌数。

参考文献

- [1] 揭晶,赵越. 光合细菌应用的研究进展 [J]. 广东药学院学报, 2006, 22(1): 113-115.
- [2] 孙涛,李兰生,胡现龙. 五种中草药对海洋光合细菌生长影响的研究 [J]. 海洋湖沼通报, 2007, S1: 91-96.
- [3] 杨官娥,张肇铭,王玉军,等. 槲寄生对光合细菌生长的促进作用 [J]. 中草药, 2006, 37(8): 1241-1244.
- [4] 杨官娥,张肇铭,熊琦. 光合细菌化学成分和生理活性研究进展 [J]. 中草药, 2005, 36(7): 1089-1092.
- [5] 曾宇,段巧红. 利用光合细菌发酵转化麸皮 [J]. 生物技术, 2001, 11(5): 44-46.
- [6] 王兴红,李琪德,曹秋娥. 微生物发酵中药应成为中药研究的新内容 [J]. 中草药, 2001, 32(3): 77-78.
- [7] 周春生,尹军. TTC-脱氢酶活性检测方法的研究 [J]. 环境科学学报, 1996, 16(4): 400-405.
- [8] 岳慧英,黄潇,赵春贵,等. 不产氧光合色素的光氧调控机制 [J]. 微生物学报, 2009, 49(3): 331-336.
- [9] 李尽哲,陈国平,胡宗利,等. 光合细菌叶绿素代谢研究进展 [J]. 生物技术通报, 2008(8): 46-49.
- [10] 周晓云. 酶学原理与酶工程 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005.
- [11] Pemberton J M, Horne I M, McEwan A G. Regulation of photosynthetic gene expression in purple bacteria [J]. Microbiology, 1998, 144: 267-278.