

胶样菌 CB39 产海藻糖的研究*

郑玉娟 张红缨 赵 莹 张 今

(吉林大学酶工程国家重点实验室 长春 130023)

摘 要:从长白山天池水中筛选到一株低温条件下产糖的细菌。通过薄层层析、成脲反应、毛细管等速电泳以及红外光谱法确定该糖为海藻糖;经鉴定此菌株是胶样菌属中的一个新种(*Colloides* Sp.)定名为 CB39;与已报道的产海藻糖菌株不同的是,菌株 CB39 能将产生的海藻糖分泌到细胞外,18℃ 时其培养液中海藻糖含量为 256.2mg/g_{干菌体};采用紫外诱变法筛选到一株在 25℃ 条件下产海藻糖量为 416.7mg/g_{干菌体}的高产突变株 5,产糖量是同温度下野生菌的 8 倍。

关键词:海藻糖, 筛选, 紫外诱变

中图分类号: Q533 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209 (2000) 02-0204-09

海藻糖是由两分子葡萄糖通过半缩醛羟基缩合而成的一种非还原性二糖,甜味较弱,易溶于水和热醇中,化学性质非常稳定,对人体无毒副作用。

自然界中海藻糖分布比较广泛且功能各异。早期研究认识,细菌中大部分海藻糖与长链脂肪酸酯化后作为一种结构组分存在^[1-3];真菌及酵母中,海藻糖主要是细胞非增殖期的一种储备碳源^[4];在昆虫中则作为血液中的一种主要糖份以提供飞行能量^[5]。近年来的研究表明,海藻糖不但可以保护生物膜及蛋白质分子免受冷冻与干燥的破坏^[6],而且还可以保护细胞中 DNA 分子,使其在强辐射条件下免受损害^[7]。

海藻糖的应用十分广泛,可作为食品工业中的一种添加剂或甜味剂,使干燥食品在得水后保持原有的色、香、味^[8];也可以作为医药工业中的非特异性的生物制品和生化药品保护剂,使其可在常温下保存,从而降低运输与储存费用;另外,在农业生产中也可以利用现代分子生物学技术构建产海藻糖的转基因植物,提高农作物的抗旱、抗冻等抗逆性能。

目前,国内从酵母菌中获取海藻糖的研究已有报道^[9,10],但由于其分子小,含量低,从菌体直接提取步骤多,费用高,产率不理想,限制了海藻糖的工业化生产,故很有必要寻找一个高产且易获取海藻糖的菌株。本文报道了来自长白山天池水和天池附近土壤中产海藻糖菌株的筛选及诱变。

1 材料和方法

1.1 材料

长白山天池水及长白山天池附近土壤样品

作者简介:郑玉娟(1972-),女,吉林长春人,硕士,主要从事生物化学研究,现于中国科学院长春应用化学研究所攻读博士学位

收稿日期:1998-10-19, **修回日期:**1999-05-14

1.2 培养基

分离用 LB 固体培养基, pH7.4; 筛选用 YPG 液体培养基^[11]; 发酵用 GPB 液体培养基(10g 葡萄糖, 1g 蛋白胨, 0.1mol/L pH6.8 的磷酸盐缓冲液定容至 1L)。

1.3 方法

1.3.1 菌株的分离按文献[12]进行。

1.3.2 产海藻糖菌株的筛选: 将分离到的菌株分别接种于 40mL YPG 液体培养基中, 37℃ 振荡培养 18h, 再降温至 14℃~18℃ 培养 24h; 离心收集菌体, 蒸馏水洗涤菌体两次, 再将菌体重新悬浮于 5mL 蒸馏水中, 沸水浴中加热 60min, 离心收集上清获得粗糖样品。通过薄层层析法检测该样品(展层剂: 乙腈/水 85/15; 显色剂: 硫酸/甲醇 3/1)。

1.3.3 粗糖样品还原性的鉴定^[13]: 取 1mL 粗糖样品加入 1mL 新配制的苯肼溶液, 沸水浴中煮沸 20~30min, 室温下放置 20min 后观察是否形成糖脎沉淀。

1.3.4 菌体产糖的发酵、结晶与鉴定: 将复壮后菌种接种于 5L LB 液体培养基中, 37℃ 培养 18h, 离心收集菌体, 无菌水洗涤两次, 转入 5L GPB 发酵培养液中, 于 14℃~18℃ 振荡培养, 以薄层层析法检测培养液上清中无葡萄糖存在时, 离心收集上清液, 浓缩至 100mL, 加入活性炭过滤, 滤液浓缩, 加入一定体积无水乙醇, 于 4℃ 静止结晶。

将所得晶体溶解在 pH9.0 硼酸钠溶液中, 在 IP-2A 型(日本岛津公司)毛细管等速电泳仪上进行检测^[14]。前导电解液为 L-890, 末端电解液为 T-100, 以电位梯度监测器进行检测。

晶体烘干后, 同溴化钾固体共同研磨后制片, 在 IFS-66V 型(德国布鲁克公司)红外光谱仪上测定该糖的结构。

1.3.5 产海藻糖菌株的紫外诱变: 野生菌的紫外诱变按文献[12]进行。选取诱变后的单菌落分别在 18℃、25℃ 的 GPB 培养液中培养, TLC 法检测培养上清中无葡萄糖存在时, 取 1mL 培养液, 10000r/min 离心 10min, 上清液用硫酸-酚法显色后, 根据其在 470nm 处的吸光度进行糖的定量。

2 结果和讨论

2.1 海藻糖产生菌的筛选与初步鉴定

由于海藻糖是生物体处于逆境时诱导合成的一种应激代谢产物。因而采用降温培养法对来自低温环境的样品进行初筛, 得到了几个所希望菌株, 其中一株细菌(经鉴定是胶样菌属中的一个新种, *Colloides* CB39)来源于长白山天池水样。以薄层层析法检测从菌体中提取的粗糖样品, 发现其迁移位置与标准海藻糖相同(图 1A), 因而可以初步确定该菌株产生的糖为海藻糖。进一步采用成脎反应来鉴别菌体产糖的还原性, 发现糖样品在成脎反应中未出现任何沉淀, 同时对反应后的糖样品进行薄层层析检测(图 1B), 结果显示标准海藻糖、粗糖样品分别与苯肼试剂反应后迁移距离缩短, 但二者仍呈现相同的迁移位置, 再次证明了该糖可能是非还原性二糖—海藻糖。

通过薄层层析法对该菌培养液离心后的上清进行检测, 意外发现部分海藻糖出现在上清液中(图 1A)。推断可能是随着培养时间的延长, 部分菌体自溶使胞内的糖类外泄, 也可能是胞内海藻糖外泌。为此通过平板计数法, 在菌体培养过程中每隔 2h 取样观察发

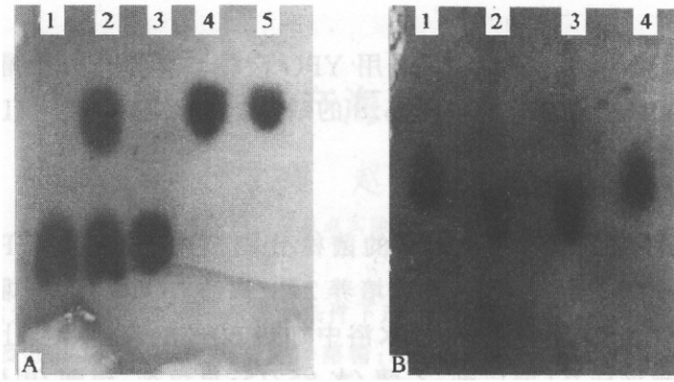


图 1 薄层层析法检测培养液上清及菌体中的海藻糖

Fig.1 TLC analysis of trehalose from supernatant of culture solution and cells

A. 1. Standard trehalose; 2. Supernatant of culture solution; 3. Sugar sample extracted in vivo; 4. Control; 5. Standard glucose.

B. 1. Standard trehalose; 2. Standard trehalose reacted with phenylhydrazine reagent; 3. The sugar sample reacted with phenylhydrazine reagent; 4. Sugar sample extracted in vivo.

酵体系中活菌数的变化,发现由葡萄糖转化为海藻糖期间,体系中活菌数基本恒定在 5×10^9 个/mL 的水平,随着培养时间的延长,培养液中海藻糖含量较菌体中海藻糖含量增高,当 GPB 培养液中全部葡萄糖均被利用时,菌体中海藻糖含量为 24.8mg/g 干菌体,而培养液中海藻糖含量达 256.2mg/g 干菌体,约是菌体中海藻糖含量的 10 倍。由此推断,培养液上清中的海藻糖是由菌体外分泌而来的。但究竟是细胞内合成海藻糖的酶外分泌,直接在胞外进行这种转换,或参与将葡萄糖转变为海藻糖的酶是膜酶,还是海藻糖在细胞内合成后分泌到胞外,还需要深入研究。

2.2 CB39 的细胞、菌落形态特征及其所产糖类的鉴定

该菌体呈球形,菌落为白色,凸起,表面光滑,边缘清晰(图 2)。

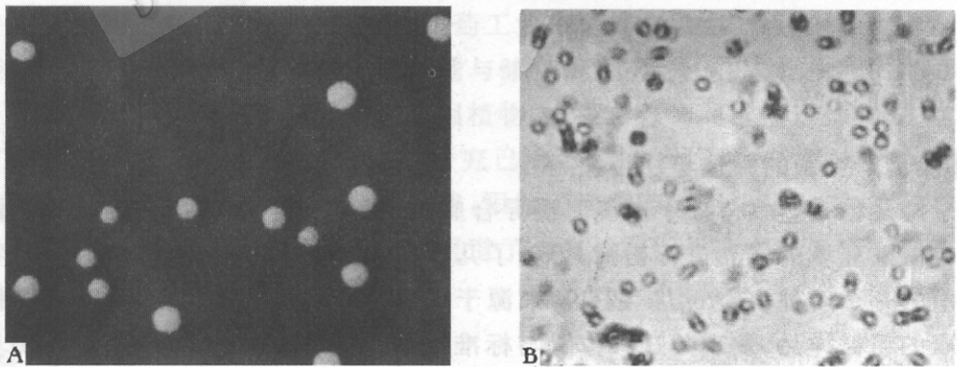


图 2 胶样菌 CB39 的菌落及菌体照片

Fig.2 Clone and cell Photography of *Coloides* CB39

A. Clone Photography of *Coloides* CB39; B. Cell Photography of *Coloides* CB39.

菌株 CB39 发酵培养液中粗糖样品经纯化后获得了海藻糖晶体(图 3),用毛细管等速电泳进行分析,可见图中只出现一个样品峰,说明该晶体已经很纯(图 4),从糖晶体的红外光谱发现由菌株 CB39 所得糖晶体与标准海藻糖的峰形、峰位均一致,进一步证明了该菌株产生的糖确系海藻糖(图 5)。

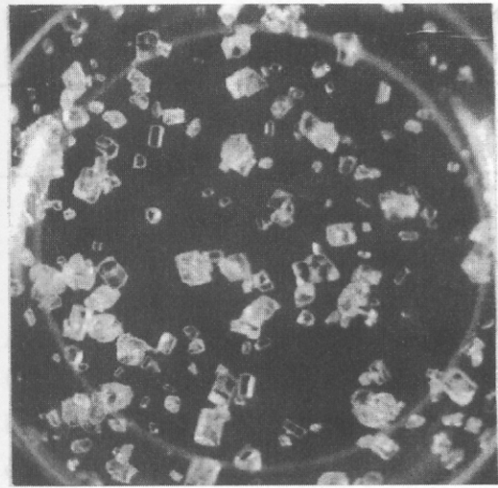


图 3 菌株 CB39 产生的海藻糖的结晶照片

Fig.3 Photograph of sugar crystal produced by strain CB39

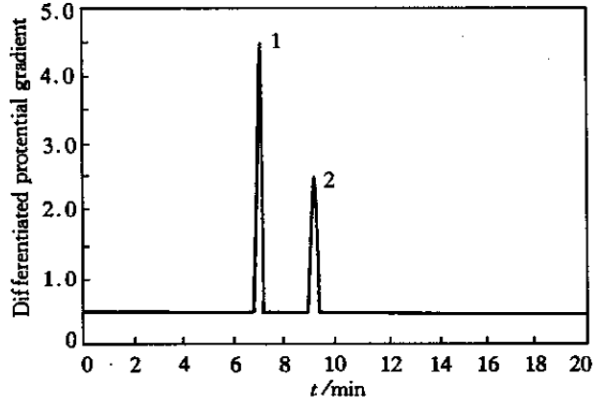


图 4 菌株 CB39 产糖结晶的毛细管等速电泳图谱

Fig.4 Capillary electrophoresis analysis of sugar crystal produced by strain CB39

- 1. The first peak is the potential gradient between leading electrolyte L-90 and terminal electrolyte T-100;
- 2. The second peak is the potential gradient between trehalose and leading electrolyte L-890.

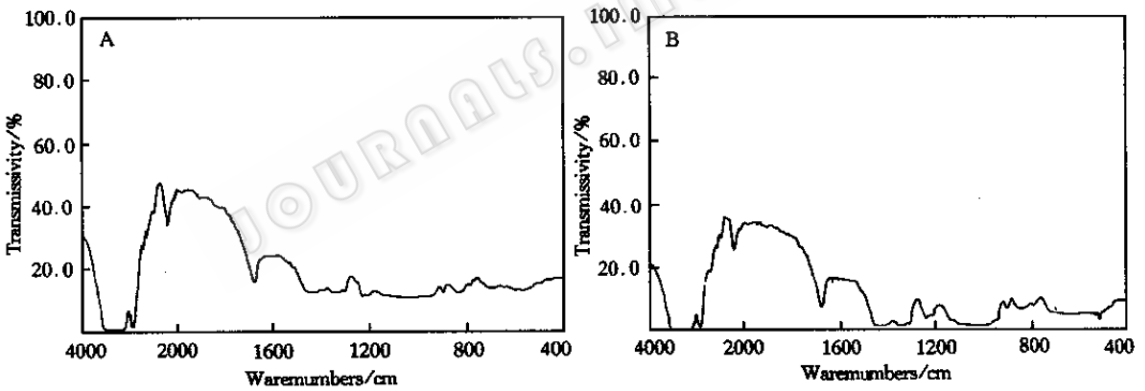


图 5 海藻糖标准品与 CB39 产生的海藻糖的红外光谱

Fig.5 Infrared spectrum of standard trehalose and trehalose produced by CB39

A. Infrared spectrum of standard trehalose;

B. Infrared spectrum of trehalose produced by CB39.

2.3 菌株 CB39 的紫外诱变

原始野生菌株来自于长年低温的长白山天池,产糖温度为 14℃~18℃。为了获得可在室温下产糖,且生产周期短的高产菌株,对野生菌株进行了紫外诱变。诱变后的部分突变株产海藻糖结果见表 1。

由表中结果看出,某些突变株丧失了 25℃、18℃ 时的产糖能力,而在 18℃ 时,突变株 7 的海藻糖产量最高(540.9mg/g 干菌体),是野生菌株 CB39 的 2 倍,其转化时间(从菌体转入 GPB 发酵培养基液到培养液中葡萄糖全部被利用的时间)也由 96h 缩短为 36h。在 25℃ 时,突变株 5 产糖量最高(416.7mg/g 干菌体),是野生菌的 8.3 倍,但转化时间与野

表 1 18℃、25℃ 时野生菌和各突变株分泌到培养液中的海藻糖量

Table 1 trehalose productivity of the wild strain and all the mutant strains at 18℃ and 25℃

Strains	18℃ Trehalose		25℃ Trehalose	
	productivity/(mg/g dry weight of cells)	Conversion time/h	productivity/(mg/g dry weight of cells)	Conversion time/h
Wild type CB39	256.2	96	50.0	210
Mutant 1	57.9	146	153.6	90
Mutant 2	127.3	146	171.9	96
Mutant 3	73.7	176	371.8	420
Mutant 4	202.2	176	243.2	420
Mutant 5	142.1	172	416.7	210
Mutant 6	356.5	52	0	-
Mutant 7	540.9	36	285.7	92
Mutant 8	0	-	0	-
Mutant 9	175.0	176	0	-
Mutant 10	411.1	172	0	-

生菌相同。25℃ 时, 突变株 7 产糖量(286.7mg/g 干菌体), 是同温度下野生菌的 5 倍, 虽然比突变株 5 产糖量低, 但生产周期显著低于突变株 5, 因此突变株 5 和突变株 7 可在不同条件下应用于生产。

已报道的海藻糖提取工艺需要以乙醇来抽提酵母细胞, 再经多步分离纯化后才能得到海藻糖晶体。由于产率低(海藻糖产量通常为 7%~10%), 成本高, 因而难以实现工业化。而从我们筛选到的这株菌的发酵液中可方便地获取海藻糖。即将其培养液上清经流硼酸型阴离子交换柱, 再经一定浓度的盐溶液洗脱后即可获得较为纯净的海藻糖。可见, 该法简便, 经济, 易行。诱变后的突变株 5 又可在 25℃ 产海藻糖, 其产量明显高于野生菌 CB39, 比用酵母提取法高 3 倍, 突变株 7 还具有转化速度快等特点。这两株菌具有一定的工业应用潜力。

目前, 海藻糖的合成途径、海藻糖合成酶的相关特性以及含海藻糖合成酶的高产工程菌的构建等方面的研究工作正在进行。

参 考 文 献

- [1] Koyu N, Toru T. *J Biol Chem*, 1965, **240**:2271~2276.
- [2] Frank W, Patrick B. *Biochem Biophys Acta*, 1964, **90**:442~444.
- [3] Toru T, Koyu N. *Eur J Biochem*, 1967, **1**:353~356.
- [4] Elbcin A D. *Adv Carbohydr Chem Biochem*, 1974, **30**:227~256.
- [5] Mayer R J, Candy D J. *Comp Biochem Physiol*, 1969, **31**:409~418.
- [6] Crowe J H, Crowe L M, Carpenter J F, et al. *Biochem Biophys Acta*, 1988, **947**:367~384.
- [7] Koichi Y, Hiroe Y, Hirose K, et al. *Biosci Biotech Biochem*, 1997, **61**(1):160~161.
- [8] Roser B, Colaco C. *New Scientist* 1993, **15**:25~28.
- [9] 刘 洋, 张红缨, 张 今. 吉林大学自然科学学报, 1998, **4**:85~88.
- [10] 刘 洋, 张红缨, 张 今. 中国生化药物杂志, 1999, **1**, 15~16.
- [11] Tomoyuki N, Masayuki N, Shoji I, et al. *Biosci Biotech Biochem*, 1995, **59**(11):2189~2190.
- [12] 范秀容, 李广武, 沈 萍. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社. 第二版. 1989.

[13] 黄 涛. 有机化学实验. 北京: 高等教育出版社, 1992.

[14] 林炳承. 毛细管电泳导论. 北京: 科学出版社, 1996.

STUDIES ON THE TREHALOSE-PRODUCING BY COLLOIDES CB39

Zheng Yujuan Zhang Hongying Zhao Ying Zhang Jin

(State Key Laboratory of Enzymic Engineering, Jilin university, Changchun 130023)

Abstract: A bacterium which had the ability of producing sugar produced sugar at low temperature (18°C) was selected from the water of Tianchi in Changbai mountain. The sugar was identified to be trehalose by methods of thin-layer chromatography, reaction of producing osazone, capillary electrophoresis and infrared spectrum. It was also been found that the trehalose produced by this bacterium (identified to be a new species of *Colloides* Sp. CB39) was exocrine. At 18°C, its trehalose content in culture solution was 256mg/g dry weight of the strain. This characteristic is different from that of other strains, which had been proved to have the ability of producing trehalose. then the strain CB39 was induced by ultraviolet in order to abstain mutants which can produce trehalose in high level at usual temperature. The mutant strain 5 that could produce trehalose in high level at usual temperature (25°C) was selected from all the mutant strains. The value of productivity of trehalose is 416.7 mg/g dry weight of the strain. (At the same temperature, trehalose productivity of mutant strain 5 was eight times of that of the wild type strain CB39)

Key words: Trehalose, Selection, Mutagenesis

《微生物学报》第七届编辑委员会

The Seventh Editorial Board of *Acta Microbiologica Sinica*

顾 问	张树政							
主 编	李季伦							
副主编	陆德如	朱关福	李阜棣	王敖全	谭华荣			
编 委	王修垣	邓子新	田 波	刘志恒	朱庆裴	孙志浩	李焕娄	
	陈世平	陈永青	杨苏声	周培瑾	范云六	范孝用	钱新民	
	钱世钧	诸葛健	徐怀恕	翟中和				
编 辑	戈苏国	刘玉方						