

海藻糖生产菌株筛选过程中产物鉴定的研究

荣绍丰 张海平 杨 静 段作营 毛忠贵

(江南大学生物工程学院 无锡 214036)

摘 要 在海藻糖生产菌的筛选过程中,微生物胞内酶转化淀粉生成的产物复杂,将产物逐一纯化是非常烦琐的,但又必须确证产物中是否含有海藻糖。本文将薄层层析、高效液相电喷雾电离质谱联用及核磁共振等分析手段综合应用于海藻糖生产菌株的筛选,在酶反应产物不必被纯化的前提下,准确、快捷地鉴定了酶反应产物中的未知糖组分,最终证明食尼古丁节杆菌(*Arthrobacter nicotinovorus*) D-97 利用淀粉或麦芽寡糖的酶反应产物中含有海藻糖。该方法在筛选海藻糖及其它功能性葡二糖生产菌株时较为严密。

关键词 海藻糖,薄层层析,高效液相-电喷雾电离质谱联用,核磁共振

中图分类号:Q939.9 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2003)01-0104-07

海藻糖(Trehalose α -D-glucospyranosyl- α -D-glucopyranoside)是由两个吡喃环葡萄糖分子以 α -1,1 键连接而成的非还原性双糖。它广泛分布于微生物(尤其是极端微生物)和动植物中。最新研究表明海藻糖对生物染色体、大分子蛋白、生物膜等具有非特异性保护作用^[1-3]。目前海藻糖广泛应用于食品工业、农业、医药工业及分子生物学领域。

自然界中由两个吡喃环葡萄糖分子以 α -葡萄糖苷键连接而成的双糖有 5 种,分别为海藻糖(α -1,1 键葡萄糖苷键)、曲二糖(α -1,2 键葡萄糖苷键)、黑曲二糖(α -1,3 键葡萄糖苷键)、麦芽糖(α -1,4 键葡萄糖苷键)和异麦芽糖(α -1,6 键葡萄糖苷键)。海藻糖又存在 3 种空间异构体,分别为 α , α -海藻糖(α - α -1,1 键)、 α , β -海藻糖(α , β -1,1 键,又名新海藻糖)和 β , β -海藻糖(β , β -1,1 键,又名异海藻糖)。另外与海藻糖具有相同分子量的双糖还有很多种,如异麦芽糖、蔗糖、乳糖等。实际上无论是采用薄层层析色谱(TLC)还是高效液相色谱(HPLC)进行糖分析,这些与海藻糖结构、性质相近的双糖(如曲二糖、黑曲二糖)是很难与海藻糖分开的^[4],而海藻糖与其空间同分异构体的选择性分离更加困难。

在筛选利用麦芽寡糖或淀粉合成海藻糖的菌株时,首先遇到的问题是确证筛选的野生菌酶反应终产物中是否含有海藻糖,以便决定对野生菌的取舍。另外即使初筛到的野生菌具有合成海藻糖能力,一般而言酶反应海藻糖的得率也较低,同时终产物中又会含有一些其它的糖类物质(干扰组分),但对糖组分逐一纯化是非常烦琐的,因此对初筛野生菌的酶反应产物进行快速、准确地鉴定就显得尤为重要。本文对本研究室筛选到的食尼古丁节杆菌 D-97 进行培养,并破壁获取胞内酶,而后对其酶转化淀粉(或麦芽寡糖)得到的产物进行了分析鉴定。

作者简介 荣绍丰(1969-)男,河北唐山人,江南大学(原无锡轻工大学)生物工程学院博士研究生,现从事酶法合成海藻糖方面的研究。E-mail: rongshaofeng@yahoo.com

收稿日期 2002-03-25, 修回日期 2002-07-22

1 材料和方法

1.1 菌株

本实验室由南方亚热带、东北温泉、东北大田、无锡等地采集的土样中最终筛选到食尼古丁节杆菌 D-97,通过生理、形态、结构特征分析及 16S rDNA 序列测定,该菌株定名为食尼古丁节杆菌(*Arthrobacter nicotinovorus*)D-97。

1.2 材料

葡萄糖、麦芽糖、蔗糖为上海化学试剂公司生产,麦芽三糖、异麦芽三糖、潘糖、异麦芽糖和海藻糖购自 Sigma Chemical Co.

1.3 微生物的培养

菌株 D-97 的液体产酶培养基:麦芽糖 30g,蛋白胨 0.5g,酵母膏 0.1g, K_2HPO_4 0.5g, NaH_2PO_4 0.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4g,蒸馏水定容 1L,pH7.2。摇床 200r/min 培养 40~48h。

1.4 菌体收集和粗酶制备

3 500r/min 离心 30min 收集菌体,采用 30mmol/L 柠檬酸缓冲液(pH6.4)洗涤 2~3 次,该菌体于冰箱冻融后加入 2% 甲苯 40℃ 水浴振荡破壁 1~2h,将破壁后的菌液 12 000r/min 离心 30min,收集上清液,65% 硫酸铵沉淀,沉淀物溶于 50mmol/L 的柠檬酸缓冲溶液(pH6.4),透析(10kD 透析袋)24h。上述过程在 4℃~10℃ 完成。

1.5 酶反应底物麦芽寡糖的制备

50-60U/g 的 α -高温淀粉酶(无锡杰能科)处理玉米淀粉,再加入 1PUN/g 普鲁兰酶(Novo Nordisk A/S)于 60℃ 脱枝处理该底物 3h,取样测 DE 值并微滤(孔径 0.22 μ m)后用于酶反应底物。

1.6 酶反应样的制备

将粗酶液与酶反应底物混合,缓冲体系采用柠檬酸缓冲液(pH6.4)或磷酸缓冲液(pH6.4)40℃~45℃,100r/min 振荡 24h,酶转化结束后加入 2AG/g 糖化酶(Novo Nordisk A/S)60℃ 水浴 24h 完全糖化,灭酶活、脱蛋白后 8 000r/min 离心,微滤后进行 HPLC 检测。

1.7 方法

标准样包括葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、海藻糖、异麦芽糖、麦芽三糖、潘糖。TLC 测定方法按照文献 5 进行。

1.8 HPLC 检测

高效液相色谱仪,主要由 Waters510 泵,2410 示差折光检测器,740 积分仪及 7725 进样阀组成。钙型阳离子交换柱为 Sugarpak1(6.8 mm \times 30mm),色谱条件:流动相为超纯水,流速 0.4 或 0.5mL/min,柱温 85℃。氨基键合柱为 Waters Spherisorb S 5NH₂(4.6 mm \times 150mm),色谱条件:流动相为乙腈/水(3:1),流速 1.0 mL/min,柱温 30℃。

1.9 HPLC/ESI-MS 检测

仪器:Waters Platform LCZ2000HPLC/ESI-MS。色谱条件:色谱柱 Waters Spherisorb S 5NH₂,流动相为乙腈/水(3:1),流速 1.0 mL/min,柱温 30℃。质谱条件参见文献 6。

1.10 ¹³C-NMR 测定

核磁共振谱仪:FX90Q Fourier Transformation NMR Spectrometer(日本电子公司),13C

核磁共振分析条件:共振频率 22.49MHz;去偶频率 89.55MHz;去偶方式为全去偶;观察谱宽 5 000Hz(200ppm);脉冲宽度 $4\mu\text{s}$;脉冲间隔 2s;累加次数 5 000。

2 结果和讨论

2.1 TLC 对照法对食尼古丁节杆菌 D-97 胞内酶酶反应产物的研究

TLC 对照法主要是利用各种糖组分在不同显色剂条件下的显色不同这一原理,从而达到比较判断各种糖类异同的目的。由于海藻糖性质稳定,与大部分显色剂不发生显色,而麦芽糖、异麦芽糖等则与大部分显色剂发生显色反应。本文选择了两种显色剂:显色剂 1(硫酸-甲醇显色剂)被称为糖类的“万能显色剂”;显色剂 2(丙二酸-苯胺显色剂)被称为选择性显色剂,它对海藻糖不显色,但对麦芽糖、异麦芽糖等显色。

葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、海藻糖、异麦芽糖、麦芽三糖、潘糖和酶反应样在薄层上的 R_f 值及显色结果见表 1, TLC 对照结果如图 1 所示,显色剂 1 的显色结果见图 1A,显色剂 2 的显色结果见图 1B。显色剂 1 对上述单糖和低聚糖均产生显色反应,显色剂 2 仅对标样中的海藻糖不显色,酶反应物中 R_f 值为 0.3115 的未知糖组分对显色剂 2 也不显色,说明该未知糖组分不同于的上述单糖和低聚糖(除海藻糖以外)。另外该未知低聚糖的 R_f 值介于麦芽糖和异麦芽糖这两个双糖之间,提示这可能是一种双糖。

表 1 几种单糖和低聚糖 TLC 的 R_f 值及显色结果

Table 1 The displaying results and R_f values of monosaccharide and oligosaccharides by TLC

Samples	R_f values	Visualization reagent 1	Visualization reagent 2
Glucose	0.5039	+	+
Sucrose	0.4196	+	+
Maltose	0.3655	+	+
Isomaltose	0.2785	+	+
Maltotriose	0.2133	+	+
Panose	0.1839	+	+
Trehalose	0.3158	+	-
Enzymatic reactant	0.5024	+	+
	0.3115	+	-

Note: “+” visualization, “-” not visualization.

2.2 HPLC/ESI-MS 联用对食尼古丁节杆菌 D-97 胞内酶酶反应产物的研究

为了确定酶反应物中未知糖组分的分子量,采用高效液相电喷雾电离质谱联用(HPLC/ESI-MS)对酶反应物进行分析,获得该样品的色谱图(图 2)和质谱图(图 3),同时在上述条件下也将海藻糖标物进行分析检测(图 2 和图 3)。图 2 中酶反应样色谱图给出葡萄糖和另外一种与海藻糖出峰位置基本相同的未知糖,图 3 中该未知糖质谱图分别给出了质荷比(m/z)为 341.3 的 $[M-1]$ 分子离子峰和 377.2 的 $[M+Cl]$ 分子离子峰,表明该未知糖的分子量为 342,其分子量与海藻糖的相同。

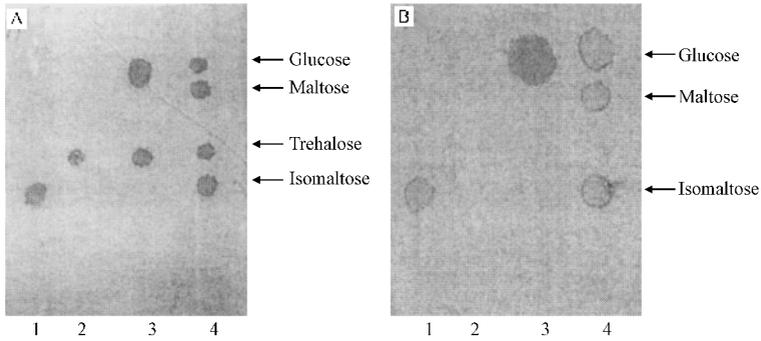


图 1 标准样品及酶反应物的薄层层析对照图谱

Fig.1 The TLC analysis of standard saccharides and enzymatic reaction sample

1. Isomaltose standard ; 2. Trehalose standard ; 3. Enzymatic reactant ; 4. Mixing standard samples .

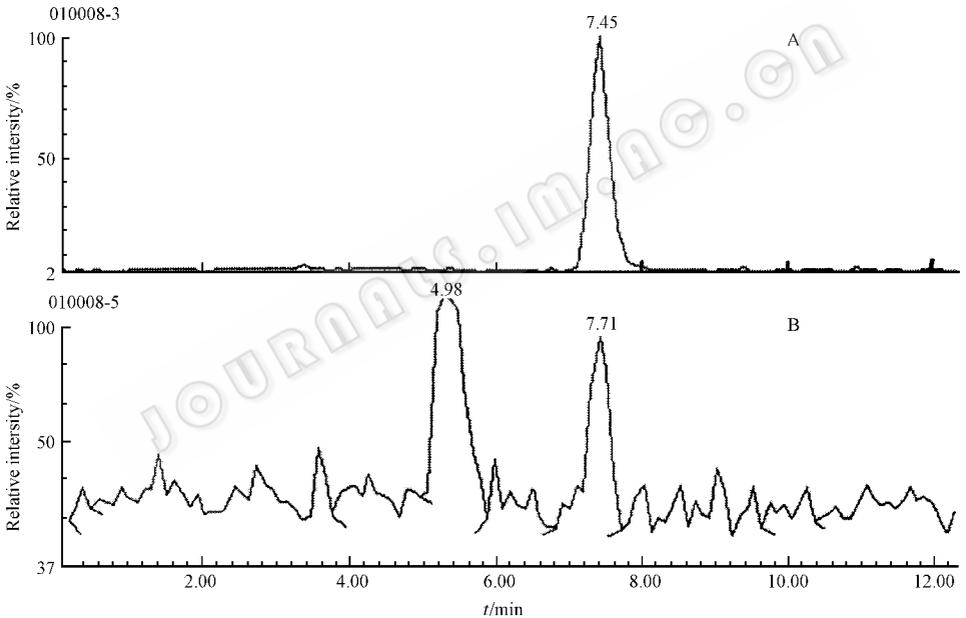


图 2 HPLC/ESI-MS 分析海藻糖标准样品和酶反应物的总离子流图

Fig.2 Total ion current chromatogram of trehalose standard and enzymatic reactant by HPLC/ESI-MS

A. Ion current chromatogram of trehalose standard ; B. Ion current chromatogram of enzymatic reactant .

如果将上述酶反应物进一步用 3 mol/L 盐酸水解处理 ,发现酶反应物中的未知糖被完全水解为葡萄糖。结合 HPLC/ESI-MS 对未知糖分子量的测定结果 ,说明该物质为一种葡二糖。综合 TLC 分析和上述实验结果 ,可以确定酶反应产物中的未知二糖组分不是通过 α -1,4 键或 α -1,6 键连接的 ,并且组成它的葡萄糖单体为吡喃环结构 ,不存在呋喃环结构的葡萄糖。这样该未知二糖只存在 α -1,1 键、 α -1,2 键或 α -1,3 键 3 种连接键的可能。

2.3 ^{13}C 核磁共振谱仪对酶反应样的检测与讨论

分别对海藻糖标准样品、葡萄糖标准样品和酶反应物进行 ,获得它们的核磁共振图

谱,葡萄糖标准样品、海藻糖标准样品和酶反应物的¹³C-NMR 图谱的数据列于表 2。

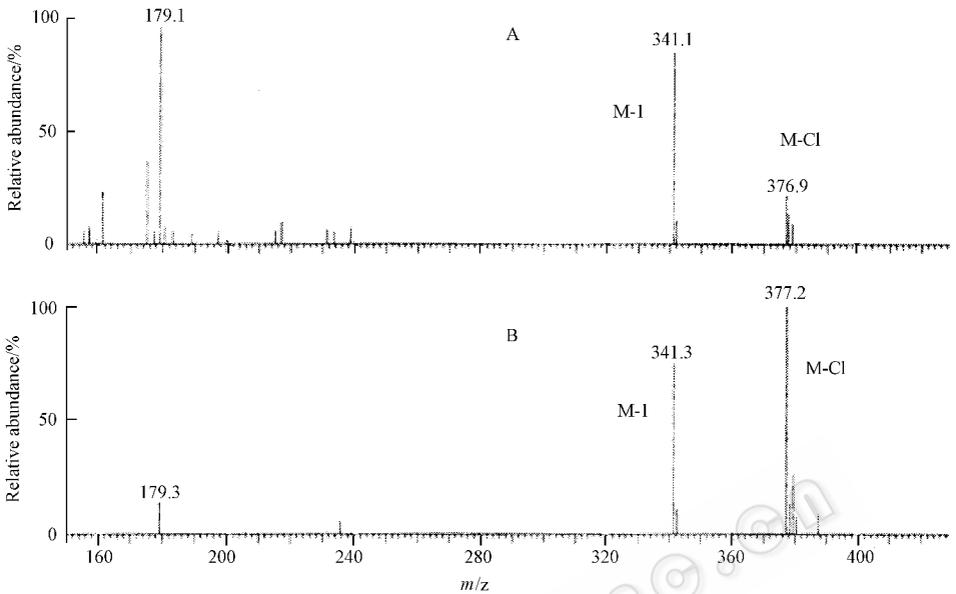


图 3 海藻糖标样和酶反应样中未知糖的 HPLC/ESI-MS 正负离子图谱

Fig.3 The HPLC/ESI-MS spectrum of trehalose standard and unknown saccharide in the enzymatic reactant
A. Spectrum of trehalose standard ; B. Spectrum of unknown saccharide.

表 2 葡萄糖、海藻糖和酶反应物的¹³C-NMR 分析数据

Table 2 Data of ¹³C-NMR spectra of glucose, trehalose and enzymatic reactant

Samples	Data of ¹³ C-NMR spectra related to the three samples in D ₂ O(mg/L)												
Glucose	96.96	93.19	77.35	77.22	75.11	74.29		72.97		71.23	62.40		
Trehalose	94.52						74.26	73.88		72.82	71.50	62.50	
Reaction sample	97.07	94.44	93.33	77.49	77.32	75.75	74.39	74.22	73.80	73.12	72.73	71.38	62.50

由于葡萄糖标准样品中含有 α -D-葡萄糖和 β -D-葡萄糖两种同分异构体,首先由葡萄糖标准样品¹³C-NMR 图谱给出的数据及文献值^[5] 修正出葡萄糖标准样品的两种同分异构体各碳位的化学位移(表 3)。

表 3 葡萄糖标准样品和来自文献的葡萄糖¹³C-NMR 谱图数据

Table 3 Data of ¹³C-NMR spectra of standard glucose and glucose from literature(mg/L)

Glucose	Origin of data	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
α -D-Glucose	Data from literature	93.3	73.1	74.4	71.2	72.9	62.4
	Standard glucose	93.19	72.97	74.29	71.23	72.97	62.4
β -D-Glucose	Data from literature	97.1	75.6	77.3	71.2	77.3	62.4
	Standard glucose	96.93	75.61	77.35	71.23	77.22	62.4

再通过酶反应物与海藻糖、葡萄糖标准样品的¹³C-NMR 化学位移比对,排除酶反应物中混有的葡萄糖分子产生的化学位移,对照文献[7]中海藻糖分子中各碳位的化学位移值,可以得到海藻糖标准样品及酶反应物中未知葡二糖各碳位对应的化学位移(表4),该未知葡二糖 C-1 至 C-6 的化学位移与海藻糖标准样品对应的各碳位化学位移非常吻合,除 C-5 外,该未知葡二糖的化学位移与海藻糖文献值也基本一致。

表 4 海藻糖和酶反应样中未知葡二糖的¹³C-NMR 化学位移

Table 4 ¹³C-NMR Chemical shifts of trehalose and unknown glucobiose of enzymatic reactant in D₂O (mg/L)

Origin of data	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Data of trehalose from literature	94.8	73.9	74.4	71.5	77.3	62.5
Standard trehalose	94.52	72.82	73.88	71.50	74.26	62.50
Unknown glucobiose	94.44	72.73	73.80	71.38	74.22	62.50

由于 α,α-海藻糖分子的两个葡萄糖单体的异头碳位连接成键,分子结构对称,因此两葡萄糖单体的相对应碳位的化学位移相同,使海藻糖的核磁图谱较为特殊,采用上述方法指正海藻糖方便可行,实际上该方法正是建立在海藻糖独特的分子结构基础上,其中海藻糖异头碳位化学位移可视为它的特征化学位移。为更好说明该方法的广泛可行,我们将所有 1,1-葡萄糖苷键、1,2-葡萄糖苷键及 1,3-葡萄糖苷键连接的全部葡二糖(共 11 种)的¹³C-NMR 图谱数据^[7]列于表 5,除 α,α-海藻糖和 β,β-海藻糖外,其它的九种葡二糖异头碳位均有两个化学位移峰值,其中各种二糖异头碳位(包括 C-1 和 C-1')的最大化学位移用粗体标出。

由表 5 数据,α,α-海藻糖的异头碳位的化学位移最大值在所有葡二糖中最小,其余葡二糖的异头碳位的最大化学位移多集中于 100~105mg/L 之间,只有 α-曲二糖(α-Kojibiose)的最大化学位移(97.5mg/L)与海藻糖的接近,但 α-曲二糖还有另外一个异头碳位化学位移(90.8mg/L)。由前述¹³C-NMR 的分析结果,海藻糖标准样品(即 α,α-海藻糖)与酶反应产生的葡二糖的异头碳位的化学位移完全一致(表 4),与文献值也吻合,说明酶反应产生的葡二糖确系 α,α-海藻糖。

表 5 1,1-葡萄糖苷键、1,2-葡萄糖苷键及 1,3-葡萄糖苷键连接的葡二糖异头碳位的化学位移数据

Table 5 The chemical shifts of anomeric carbon of glucobioses linked with 1,1-linkage, 1,2-linkage and 1,3-linkage

Chemical shifts	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
C-1 (mg/L)	94.8	100.7	101.3	90.8	97.5	93.1	95.8	93.1	97.0	93.4	97.2
C-1' (mg/L)	94.8	100.7	104.0	97.5	99.0	105.1	103.9	99.8	99.8	103.9	103.9

Note: I α-Glu(1→1)-α-Glu (α,α-Trehalose); II β-Glu(1→1)-β-Glu (β,β-Trehalose); III α-Glu(1→1)-β-Glu (α,β-Trehalose); IV α-Glu(1→2)-α-Glu (α-Kojibiose); V α-Glu(1→2)-β-Glu (β-Kojibiose); VI β-Glu(1→2)-α-Glu (α-Sophorose); VII β-Glu(1→2)-β-Glu (β-Sophorose); VIII α-Glu(1→3)-α-Glu (α-Nigerose); IX α-Glu(1→3)-β-Glu (β-Nigerose); X β-Glu(1→3)-α-Glu (α-Laminaribiose); XI β-Glu(1→3)-β-Glu (β-Laminaribiose).

通过 TLC 对照法排除未知糖分子链中存在 α-1,4 键和 α-1,6 键连接的可能,采用液质

联用获得未知糖分子量,在未知糖不被纯化的前提下,核磁共振分析确证产物的连接键,从而完成产物的鉴定。该方法在筛选海藻糖生产菌株时可作为微生物筛选的“筛子”,按照此方法甚至可以筛选到其它功能性葡二糖(如曲二糖或黑曲二糖)的生产菌株,提高原始菌株筛选效率。

参 考 文 献

- [1] Crowe J H , Crowe L W , Carpenter J F , *et al.* Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *J Biochem* , 1987 , **242** :1 ~ 4.
- [2] Kaasen I , Alkenberg P F , Styrvold O , *et al.* Molecular cloning and physical mapping of the otsBA genes , which encode the osmoregulatory trehalose pathway of *Escherichia coli* : evidence that transcription is activated by katF . *J Bacteriology* , 1992 , **174** 889 ~ 891.
- [3] Yoshinaga K , Yoshioka H , Kurosaki H , *et al.* Protection by trehalose of DNA from radiation damage. *Biosci Biotech Biochem* , 1997 , **61**(1) :160 ~ 162.
- [4] Masao S , Shoichi K. Analyses of α -linked disaccharides of D-glucose by high performance liquid chromatography. *Carbohydrate Research* , 1991 **215** :203 ~ 209.
- [5] 毛忠贵 朱利丹 邓绍荣. 用薄层层析法分析海藻糖. 无锡轻工大学学报, 1997, **16**(4):42 ~ 44.
- [6] 荣绍丰,张海平,段作营,等. HPLC/RI 与 HPLC/ESI-MS 方法研究细菌 D-97 酶合成海藻糖过程. 色谱, 2002, **20**(3):197 ~ 201.
- [7] Taichi U , Naotaka Y , Kazuo M , *et al.* ^{13}C nuclear magnetic resonance spectra of glucobioses , glucotriosies and glucans . *J C S Perkin I* , 1973 , 2425 ~ 2432.

The Product Identification Study on the Isolating Process of Strains Produced Trehalose

Rong Shaofeng Zhang Haiping Yang Jing Duan Zuoying Mao Zhonggui

(*The School of Biotechnology , Southern Yangtze University , Wuxi 214036 , China*)

Abstract : In the isolating process of strains whose endocellular enzymes can produce trehalose on starch or maltooligosaccharides , we discovered the components of enzymatic reactant were complicated and it was difficult to purify them each other , however , we have to know quickly whether there was tehalose in the enzymatic reactant above. In order to make it clearly , thinner layer chromatography , high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry and ^{13}C -nuclear magnetic resonance were adopted. The unknown oligosaccharide produced by *Arthrobacter nicotinovor* D-97 was identified rapidly and this unknown oligosaccharide needn't be purified from the enzymatic reactant solely. The production on starch or maltooligosaccharides by endocellular enzymes of *Arthrobacter nicotinovor* D-97 is trehalose. This research method in our paper can be applied in the isolating process of production trehalose and other functional glucobioses strains.

Key words : trehalose , thinner layer chromatography , high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry , ^{13}C -nuclear magnetic resonance