

环状糊精葡萄糖基转移酶产生菌—— 碱杆菌的分类研究

谈 家 林

(中国科学院微生物研究所, 北京)

自土壤中分离到两类能在碱性培养基中生长并产生环状糊精葡萄糖基转移酶的细菌。经鉴定,一类属芽孢杆菌,另一类为无芽孢的杆状细菌,《伯杰氏鉴定细菌学手册》(第八版)和现有其他分类文献均未见其分类位置,拟订为新属碱杆菌属 (*Alcalibacterium* gen. nov.) 和新种产环糊精碱杆菌 (*Alcalibacterium cyclodextrinogenes* sp. nov.)。

关键词 环状糊精葡萄糖基转移酶;碱杆菌属;产环糊精碱杆菌

产生环状糊精葡萄糖基转移酶的细菌,已知的有 *Bacillus macerans*、*B. circulans*、*B. stearothermophilus*、*B. megaterium* 和嗜碱芽孢杆菌等芽孢杆菌和 *Klebsiella pneumoniae*^[1]、*Micrococcus* sp.^[2] 两种无芽孢的细菌。*B. macerans* 和嗜碱芽孢杆菌已在环状糊精工业生产中使用。我们在1980年分离嗜碱细菌时,得到两类产生这种酶的杆菌,一类产生芽孢,一类不生芽孢^[3]。嗜碱芽孢杆菌是 Horikoshi 等^[4] 发现的生产菌种,无芽孢的嗜碱杆菌则未见文献报道,经生产环状糊精的中间试验,已取得了满意的结果。本文报告选用两类细菌中各两株作为代表进行鉴定的结果,并探讨其分类学位置。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

嗜碱芽孢杆菌 32-2 和 56-2 菌株;嗜碱无芽孢杆菌 41-3 和 52-2 菌株。

(二) 基础培养基

按 Horikoshi 等^[4] 法配制 (g/L): 蛋白胨 5, 酵母膏 5, K_2HPO_4 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, Na_2CO_3 10, 可溶性淀粉改为葡萄糖 10, pH 10.2。观察

产芽孢能力再用文献[10]的大豆汁和玉米粉酵母膏培养基,添加 0.5% 的 Na_2CO_3 。

(三) 鉴定方法

一般方法按 Cowan 和 Steel 手册^[11]。测定 NO_3^- 、 NH_4^+ 和柠檬酸利用的培养基不加蛋白胨,酵母膏减至 0.005%。碳水化合物产酸和 Hugh 及 Leifson 试验用的培养基加蛋白胨 0.2% 和酚红 0.001%。产乳酸试验用在空气中培养 5 天的培养液作硅胶薄层层析鉴定。DNA 中 G + C 克分子%的测定按林万明等^[12]的方法。

结 果

在碱性培养基中分离出的细菌,经过淀粉分解能力测定,产环状糊精葡萄糖基转移酶活性测定,和多种方法肯定酶作用产物为环状糊精后,选出产酶活性较高的菌株,取有代表性的四株进行鉴定,结果见表 1。

由表 1 可见,四株菌中特征相近的各有二株,可归纳成两种类型,即芽孢杆菌 32-2 和 56-2 菌株,无芽孢杆菌型 41-3 和 52-2 菌株。

本文于 1982 年 2 月 3 日收到。

承徐冠珠和徐纯锡同志协助,特此致谢。

表 1 菌株的形态和生理生化特性

Table 1 Morphological and physiological characteristics of strains

菌株 Strain	32-2	56-2	41-3	52-2
细胞形态 cell morphology				
革兰氏染色 Gram's staining	+	+	+	+
运动 motility	+	+	+	+
细胞形状 cell shape	杆状 rod		杆状, 长丝状, 无角或栅状排列 rod, slender, no angular and palisade arrangements	
细胞大小 cell size (μm)	0.6×1.2—2.8	0.6×1.2—3.0	0.6×1.7—10	0.5×1.8—10
芽孢位置 spore position	中至稍偏 center to subterminal		以上	以上
芽孢形状 spore shape	椭圆 elliptical		—	—
芽孢大小 spore size (μm)	0.7×1.0	0.7×1.0	—	—
子囊膨大 distends sporangium	+	+		
鞭毛 flagella	周毛 peritrichous		周毛 peritrichous	
菌落形态 colony morphology				
菌落形状 colony shape	光滑, 边缘整齐 smooth, entire		光滑, 边缘整齐 smooth, entire	
菌落颜色 colony color	橙黄, 老变肉色 yellowish orange, pink in old		橙黄, 半透明 yellowish orange, semitransparent	
生长条件 conditions for growth				
pH: 生长 growth	6.0—12.0	7.0—12.0	7.0—12.0	7.0—12.0
最适 optimum	8.0—10.0	8.0—10.0	8.0—9.0	8.0—9.0
温度 temperature ($^{\circ}\text{C}$)				
最高 maximum	40	40	35	35
最适 optimum	30—38	30—38	<30	25—30
耐热存活 survival after heating				
63 $^{\circ}\text{C}$, 30 分钟 min.	N	N	—	—
72 $^{\circ}\text{C}$, 15 分钟 min.	N	N	—	—
7%NaCl 中生长 growth	+	+	+	+
营养源 nutrient sources				
酵母膏 yeast extract	±	±	+	+
玉米浆 corn steep liquor	+	+	+	+
蛋白胨 peptone	+	+	±	±
天门冬酰胺 asparagine	+	+	+	+
NaNO_3	—	—	—	—
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	—	—	—	—
柠檬酸 citrate	+	+	—	—
生理活性 physiological activities				
淀粉水解 hydrolysis of starch	+	+	+	+
明胶水解 hydrolysis of gelatin	+	+	+	+
吐温 80 水解 hydrolysis of tween 80	—	—	—	—
NO_3^- 还原 reduction	—	—	—	—
环状糊精生成 production of cyclodextrin	+	+	+	+
吲哚生成 production of indole	±	±	—	—
3-羟基丁酮生成 production of acetoin	—	—	—	—
乳酸产生 production of lactic acid	N	N	—	—
三丁酸甘油酯水解 hydrolysis of tributyrin	+	+	+	±

续表 1

菌株 Strain	32-2	56-2	41-3	52-2
纤维素水解 hydrolysis of cellulose	N	N	—	—
氧化酶 oxidase	—	—	+	±
接触酶 catalase	+	+	+	+
Hugh & Leifson 试验 test				
无氧生长 anaerobic growth	+	+	±	±
无氧产酸 acid from anaerobic growth	+	+	±	±
有氧产酸 acid from aerobic growth	+	+	±	±
无氧产气 gas from anaerobic growth	—	—	—	—
有氧产气 gas from aerobic growth	—	—	—	—
碳水化合物产酸 acid production from carbohydrates				
木糖 xylose	+	+	±	±
阿拉伯糖 arabinose	+	+	+	±
鼠李糖 rhamnose	—	—	—	—
果糖 fructose	+	+	+	+
葡萄糖 glucose	+	+	±	±
半乳糖 galactose	+	+	—	—
乳糖 lactose	—	—	±	—
麦芽糖 maltose	+	+	+	+
蔗糖 sucrose	+	+	+	+
松三糖 melezitose	+	+	±	—
棉子糖 raffinose	+	+	—	—
水杨苷 salicin	+	+	±	±
半乳糖醇 dulcitol	—	—	±	±
山梨醇 sorbitol	—	—	—	—
甘油 glycerin	+	+	+	±

注: + 正反应 positive; — 负反应 negative; ± 反应弱或时间长 weak or delay;

N 未作 no tested.

讨 论

32-2 和 56-2 菌株的形态特征和生理特性相似, 应是同一个种的细菌。不产芽孢的 41-3 和 52-2 菌株相似, 区别仅在于后者的生理活性稍弱。因此, 我们得到两类产环状糊精生成酶的细菌。

第一类细菌同掘越等^[4]发现的嗜碱芽孢杆菌比较, 十分相似。按照《伯杰氏鉴定细菌学手册》第八版(下简称“手册”)的分类系统, 这类细菌的细胞为杆状, 芽孢位于细胞的次末端, 细胞膨大, 葡萄糖产酸不产气, 以及产生三羟基丁酮等特点, 同 *B. larval*、*B. brevis* 及 *B. circulans* 比较接近。*B.*

larval 可长至 6 μ m, 为昆虫寄生细菌, 在培养基中连续传代即死亡。*B. brevis* 可在 60℃ 生长, 阿拉伯糖和木糖不产酸, 不水解淀粉, 不能无氧生长。这些性质排除了这类细菌归入这两个种的可能。这类细菌能在强碱性环境中生长并产生环状糊精, 则又与 *B. circulans* 不同。因此, 这类细菌不能按“手册”定出分类位置。

第二类细菌作为产生环状糊精生成酶的细菌, 未见文献报道, 而分类研究则有相近的报道。Souja 等^[8]自碱性废水和 Gee 等^[9]自碱性马铃薯脱皮工厂流出水中, 分离到的无芽孢杆菌 A-1 和 BL77/1 号菌株, 与第二类细菌有许多相同之处。这些

菌株的细胞都是杆状,革兰氏阳性,无芽孢,无分枝,周生鞭毛运动,也有大量在 $10\mu\text{m}$ 以上至数十微米的丝状细胞。菌落产生水不溶橙色色素,葡萄糖不发酵产气,能分解淀粉,接触酶阳性,在 7% 的 NaCl 中能生长,不产生吡啶,不利用 NO_3^- 和 NH_4^+ 作氮源,能水解明胶,以及不水解吐温 80。这些菌株也有一些不同之点,详见表 2。

按“手册”记载,第二类细菌同已知的革兰氏阳性细菌相距甚远,一些形态特征则和 *Brevibacterium* 属比较相近,即典型的不分枝杆状细胞,简单的细胞分裂繁殖,产红、橙、黄或褐色水不溶色素,如能运动则为周生鞭毛,好氧或兼性好氧。但是,“手册”认为这是一个未定分类位置的属,加以第二类细菌和 Souja 等、Gee 等的菌株一样,都有长至数十微米的细胞(见图 1、2),能在碱性环境中生长,DNA 的 G + C 克分子含量为 36—40% (*Brevibacterium* 为 46.6—70.5%)等突出特点,第二类细菌应是革兰氏阳性无芽孢杆状细菌中的一个新属,命名为碱杆菌属 (*Alcaliba-*

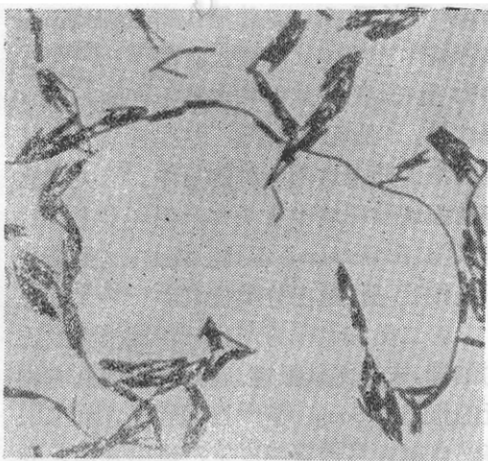


图 1 41-3 菌株的细胞 (960×)
(基础培养基斜面上生长 18 小时,革兰氏染色)

Fig. 1 Cells from strain 41-3

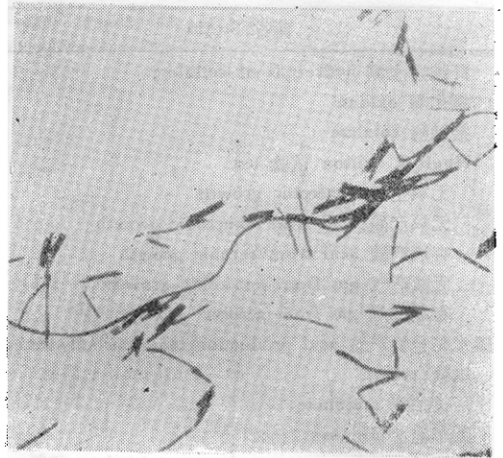


图 2 52-2 菌株的细胞 (960×)
(同上)

Fig. 2 Cells from strain 52-2

cterium gen. nov.)。文献记载的 BL77/1 和 A-1 菌株也可归入此属。由于第二类细菌有产环状糊精葡萄糖基转移酶的能力和 DNA 中 G + C 克分子含量低于 BL77/1 和 A-1 菌株,因此定为新种,命名为产环状糊精碱杆菌 (*Alcalibacterium cyclodextrinogenes* sp. nov.)。

碱杆菌属 新属

Alcalibacterium gen. nov.

无芽孢、不分枝的规则杆状细胞,大小为 $0.5-1.2 \times 3.2-4.5\mu\text{m}$,培养 24 小时多为 $10\mu\text{m}$ 以上的长丝状细胞。细胞分裂繁殖,无折断分裂。革兰氏染色阳性,老细胞可变阴性。菌落光滑、扁平、半透明,产不扩散的浅橙黄色素。生长 pH 范围为 6—12,最适生长 pH 为 8.0—10.0。利用有机氮,但不利用 NH_4^+ 和 NO_3^- 作氮源。糖代谢为呼吸型。好氧生长,无氧生长弱。DNA 中 G + C 克分子含量为 36—56%。典型种为产环状糊精碱杆菌 (*Alcalibacterium cyclodextrinogenes*)。

表 2 几株嗜碱无芽孢杆菌的差异

Table 2 Differences of several alkaliphilic non-spore forming rod shape bacteria

菌株 Strain	41-3	52-2	BL77/1 ⁽⁹⁾	A-1 ⁽⁸⁾
氧化酶 oxidase	+	+	-	+
NO ₃ 还原 reduction	-	-	+	-
无氧生长 anaerobic	±	±	+	-
三丁酸甘油酯水解 hydrolysis of tributyrin	+	+	-	
环状糊精生成 production of cyclodextrin	+	+		
碳水化合物产酸 acid from carbohydrates				
阿拉伯糖 arabinose	+	±	+	+
木糖 xylose	±	±	-	+
鼠李糖 rhamnose	-	-	-	
半乳糖 galactose	-	-	+	+
乳糖 lactose	-	-	-	+
松三糖 melezitose	±	-	-	
水杨苷 salicin	±	±	-	+
半乳糖醇 dulcitol	±	±	-	
甘油 glycerin	+	±	+	-
山梨醇 sorbitol	-	-	-	+
DNA 中 G + C 克分子 moles%	40	36	56	46

产环状糊精碱杆菌 新种

Alcalibacterium cyclodextrinogenes

sp. nov.

长丝状细胞可长达 50 μm 以上。生长初始 pH7.0—12.0, 最适生长在 8.0—9.5。生长最高温度 35℃, 最适 25—30℃。不利用柠檬酸作为碳源。水解淀粉、明胶和三丁酸甘油酯; 不水解吐温 80 和纤维素。不还原硝酸盐。氧化酶阳性。产环状糊精葡萄糖基转移酶。自阿拉伯糖、木糖、葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、水杨苷、半乳糖醇和甘油产酸; 自乳糖和松三糖产或不产酸; 自鼠李糖、半乳糖、棉子糖和山梨醇不产酸。DNA 中 G + C 克分子含量: 菌株 52-2 为 36%, 菌株 41-3 为 40%。菌株自土壤分离。

参 考 文 献

- [1] 小林昭一, 貝沼圭二: 発酵と工業, 36: 176, 1978。
- [2] Yoshiaki, Y. et al.: Eur. Pat. Appl. 17242, 1980。
- [3] 谈家林等: 微生物学报, 24: 80, 1984。
- [4] Nakamura, N. and K. Horikoshi: *Agri. Biol. Chem.*, 40: 735, 1976。
- [5] Cowan, S.: *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*, 2nd ed., Cambridge Univ. Press, Britain, 1975。
- [6] 林万明等: 微生物学通报, 8: 245, 1981。
- [7] Buchanan, R. E. et al.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974。
- [8] Souja, K. and H. Deal: *J. Gen. Microbiol.*, 101: 103, 1977。
- [9] Gee, S. M. et al.: *ibid.*, 117: 9, 1981。
- [10] 中国科学院微生物研究所细菌分类组: 《一般细菌常用鉴定方法》, 科学出版社, 北京, 1978。

TAXONOMIC STUDY OF A TYPE OF CYCLODEXTRIN-GLUCOSYL-TRANSFERASE PRODUCING ALKALIPHILIC BACTERIA, *ALCALIBACTERIUM CYCLODEXTRINOGENES* GEN. NOV., SP. NOV.

Dan Jialin

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Two types of bacteria which are capable grow and produce cyclodextrin-glucosyl-transferase in alkaline medium are isolated from soils and characterized. One of these types belongs to the genus *Bacillus*, and it's species name has not been determined. Another one is non-spore-forming rod shape bacterium, and it's taxonomic position has not been studied. We suggest therefore, the name *Alcalibacterium cyclodextrinogenes* gen. nov., sp. nov. for the latter new bacterium.

Description of *Alcalibacterium* gen. nov.

Regular rod without sporing and branching. Cell size $0.5-1.2 \times 3.2-4.5 \mu\text{m}$, and more slender cell in 24 hour culture and over than $10 \mu\text{m}$ in length. Reproduction is by cell division and without snapping. Gram-positive, and may be Gram-negative in old. Colony on agar medium is smooth, flat, semitransparent, and indiffusing light yellowish orange pigment was produced. pH range for growth is 6-12, optimum in 8.0-9.5. Organic nitrogen compounds can be used but NH_4^+ and NO_3^- can not be used as nitrogen source. Metabolism respiratory. Aerobic growth and weak in anaerobic. G+C content of DNA is

36-56 moles %. Type species: *Alcalibacterium cyclodextrinogenes*.

Description of *Alcalibacterium cyclodextrinogenes* sp. nov.

General morphology and physiology are the same as genus. Length of slender cell may be as long as $50 \mu\text{m}$. Initial pH range for growth is about 7.0-12.0, optimum in 8.0-9.0. Maximum temperature for growth is 35°C , optimum in the range of 8.0-9.0. Citrate is not used as sole carbon source. Starch, gelatin, and tributyrin are hydrolysed, Tween 80 and cellulose does not attached. Nitrite is not reduced to nitrite. Cyclodextrin-glycosyl-transferase is produced. Acid is produced from arabinose, xylose, glucose, fructose, maltose, sucrose, salicin, dulcitol, and glycerin. Sometimes acid is produced from lactose and melezitose. Acid is not produced from rhamnose, raffinose and sorbitol. G + C content of DNA is 36-40 moles% Isolated from soil.

Key words

Cyclodextrin-glucosyl-transferase; *Alcalibacterium*; *Alcalibacterium cyclodextrinogenes*