

# 两种碳源对纤维单胞菌生长及代谢的影响

高惠玲<sup>1</sup> 袁其朋<sup>1\*</sup> 周 延<sup>1</sup> 钱忠明<sup>2</sup>

(1. 北京化工大学生命科学与技术学院,北京 100029; 2. 香港理工大学应用生物及化学科技学系,中国 香港)

**摘 要:**文中以麦芽糖和环糊精为碳源,研究了碳源对纤维单胞菌生长和代谢的影响。研究表明,碳源不但对菌株的生长起着重要作用,而且对其胞内酶的合成有选择性诱导作用;环糊精利于菌体生长,比麦芽糖做碳源时的生物量高了近 20%;麦芽糖则有利于胞内 6-磷酸海藻糖合成酶/6-磷酸海藻糖磷酸酯酶的生成,使胞内海藻糖含量达到 13 mg/g 干细胞。

**关键词:**纤维单胞菌;生长;代谢;海藻糖;酶

**中图分类号:** TQ920.1

纤维单胞菌(*Cellulomonas sp.*)属于细菌中的棒状杆菌类,因产纤维素酶和葡聚糖酶而广受重视,多用于环保等行业<sup>[1]</sup>。

海藻糖是一种具有特殊功能的非还原性双糖,对核酸、蛋白质等生物大分子具有非特异性保护作用。因此,它除了是一种甜味剂外,还可用作食品防腐剂、生物产品稳定剂、细胞防冻剂等<sup>[2-3]</sup>。近年来,随着对其特殊生化性质研究的不断深入,市场前景十分广阔。

微生物的生长代谢受多种因素的影响,在对纤维单胞菌的研究过程中发现,碳源的作用最为明显。碳源不但对细胞形态、生长周期及最终生物量的影响大,胞内海藻糖合成酶也受其性质的调节控制。因此,对碳源影响的定性探讨,不仅有着理论上的意义,而且还可为提高胞内海藻糖合成酶的产量及开辟纤维单胞菌的新应用领域提供线索和手段。本实验室通过对自筛的一株纤维单胞菌的研究,发现该菌胞内存在合成海藻糖的酶,胞内海藻糖含量较高,这一成果无疑可以进一步扩大纤维单胞菌的应用范围。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂

1.1.1 海藻糖为 sigma 产品,α-淀粉酶为无锡酶

制剂厂生产;HPLC 分析用试剂为色谱纯;其它试剂均为分析纯。

1.1.2 供试菌株 纤维单胞菌(*Cellulomonas sp.*),本实验室自筛保存。

1.1.3 所用主要培养基 斜面培养基质量浓度(g/L):酵母提取物 5,蛋白胨 10,NaCl 10,琼脂 15。发酵培养基质量浓度(g/L):C 源 10,蛋白胨 5,酵母粉 2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5。

### 1.2 分析方法

1.2.1 海藻糖的分析方法 - HPLC 法<sup>[4]</sup> 日本岛津 LA-10vp HPLC, ZORBAX-NH<sub>2</sub> 柱(150 cm),柱温 20℃,流动相:乙腈与水的体积比为 80:20,体积流量 1 mL/min;示差折光检测器。

1.2.2 菌体浓度的测定 采用光吸收 OD 值法,取发酵液按一定比例稀释,用 722 型光栅分光光度计测其在波长 420 nm 处的吸光度。

### 1.3 实验方法

1.3.1 发酵培养 将细菌由斜面培养基接种于种子摇瓶培养基,30℃,170 r/min,培养 24 h。然后以体积分数 5%的接种量接入发酵培养基,30℃,170 r/min,接入 72 h。

1.3.2 细胞破壁 将上述发酵液以 5 000 r/min 离心 10 min,菌体用适量缓冲液洗涤两遍,然后将菌体以质量分数 40%悬浮于一定离子强度的磷酸缓冲液中,加入体积分数 5%的甲苯 30℃处理 1 h。

1.3.3 海藻糖的溶出 在带塞三角瓶中,将上述经细胞破碎的酶液与去离子水(或葡萄糖、淀粉等溶液)混合,于一定温度下,水浴振荡 1 h 后,以 5 000 r/min 的转速离心分离,取上清液测海藻糖浓度。

收稿日期:2004-02-13

第一作者:女,1973 年生,硕士生

\*通讯联系人

E-mail:lynn0228@126.com

## 2 结果与讨论

### 2.1 纤维单胞菌对不同碳源利用情况

纤维单胞菌有多种底物特异性,选取葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、环糊精、玉米淀粉、淀粉液化液、CMC Na、麸皮做碳源,考察了纤维单胞菌的生长和产海藻糖情况(见表 1)。

表 1 纤维单胞菌在不同碳源中的生长及产海藻糖情况

Table 1 Growth and trehalose production of *Cellulomonas* sp. in different carbon sources

碳源	生长	海藻糖	碳源	生长	海藻糖
葡萄糖	++	+	糊精	++	+
麦芽糖	++	+++	淀粉	+	+
蔗糖	++	++	CMC Na	+	+
环糊精	+++	++	麸皮	+	+

注: + 表示有生长(或有产物), ++ 表示生长较好(或产物较多), +++ 表示生长最好(或产物最多)。

实验结果表明,纤维单胞菌能够在所选择的各种碳源中生长,也就是说,其体内含有分解利用相应碳源的酶。其中,以淀粉、麸皮、CMC Na 为碳源产生的菌体量不大,这些碳源较难在短时间内利用;而在葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、环糊精、糊精等相对易用的碳源中,从环糊精得到的菌体最多,其它碳源差别不大。同时,在胞内海藻糖质量浓度的检测中发现,以麦芽糖为碳源时产生的海藻糖最多。海藻糖总量与菌体量和胞内海藻糖质量浓度成正比,因此,实验对产菌量最多的环糊精和产海藻糖量最多的麦芽糖进行了深入的研究。

### 2.2 两种碳源对菌体生长的影响

实验分别考察了在环糊精和麦芽糖为碳源时,纤维单胞菌的生长曲线。结果如图 1 所示。

从图 1 可以看出,以环糊精做碳源时发酵 12~60 h 是菌体生长的对数期,菌体生长快,pH 值由 7.33 降到 5.18,之后,由于 pH 值太低,菌体生长速度趋缓,进入稳定期,发酵 180 h 仍没有进入衰亡期。而以麦芽糖做碳源时,产酸量大。发酵 24 h 内,生长速率与环糊精做碳源时的对数生长期接近,但发酵 24 h 后,由于 pH 值低,菌体呈缓慢增长趋势,没有明显的对数期和稳定期的分界。

以环糊精和麦芽糖做碳源,菌体吸光浓度分别在 156 h 和 132 h 达到最大值, $A_{max}$  分别为 18.98 和 11.86。此外从图 1 还可以看到,该菌进入衰亡期很

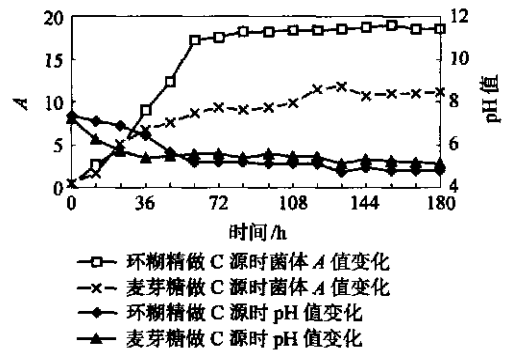


图 1 不调 pH 时菌体在两种碳源中的生长曲线

Fig. 1 Growth curves in two carbon sources without adjusting pH

慢,说明发酵液中营养物充足,pH 值是限制性因素。

鉴于菌体生长过程中产酸不能反映其真实的生长情况,实验从培养基 pH 值接近 6 开始,每 6 h 滴加氨水来调节培养基的 pH 值,重新观察其生长情况(见图 2)。

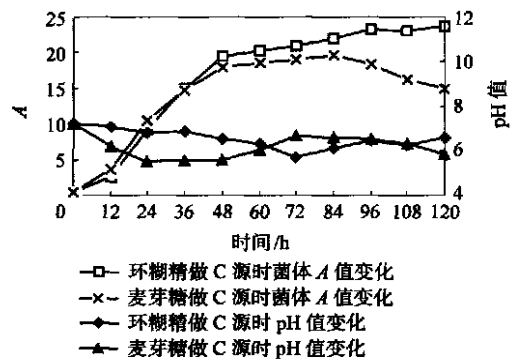


图 2 调 pH 时菌体在两种碳源中的生长曲线

Fig. 2 Growth curves in two carbon sources with adjusting pH

从图 2 看出,调 pH 值后在两种碳源中,纤维单胞菌的生长速率明显加快。特别是以麦芽糖为碳源时,菌体生长的各时期特征已很明显,发酵 48 h 达到稳定期,发酵 84 h 菌体开始出现自溶现象,进入衰亡期。而以环糊精为碳源时,仍没有衰亡期,发酵 120 h 仍可以继续生长。

菌体以环糊精和麦芽糖做碳源时, $A_{max}$  分别达到了 23.32 和 19.62,比不调 pH 值时分别提高了 23% 和 65%。显然,环糊精更利于菌体生长,比麦芽糖做碳源时的生物量高了近 20%。

### 2.3 两种碳源对海藻糖生成酶系的影响

目前,细菌生成海藻糖的酶系一般主要有以下 3 种<sup>[5]</sup>: 胞内以葡萄糖为底物,利用 6-磷酸海藻糖

合成酶/6-磷酸海藻糖磷酸酯酶合成海藻糖；胞外以麦芽糖为底物,利用海藻糖合酶或麦芽糖磷酸化酶/海藻糖磷酸化酶生成海藻糖；胞外以淀粉低聚糖为底物,利用麦芽寡糖基海藻糖生成酶/麦芽寡糖基海藻糖水解酶或新型葡糖基转移酶/新型淀粉酶合成。

纤维单胞菌胞内就有海藻糖,这说明其合成途径是第一种,但为了进一步验证,并排除其它途径的可能性,实验将两种碳源发酵得到的细胞破碎后,分别加入等体积的去离子水、5%葡萄糖、5%麦芽糖和5%淀粉液化液进行反应,测系统内海藻糖质量浓度(海藻糖)。结果见图3,4。

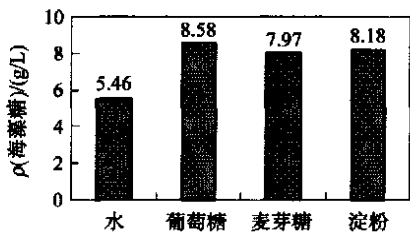


图3 环糊精为碳源的菌体生长海藻糖情况

Fig.3 Trehalose output of *Cellulomonas sp.* cultivated in cyclodextrine

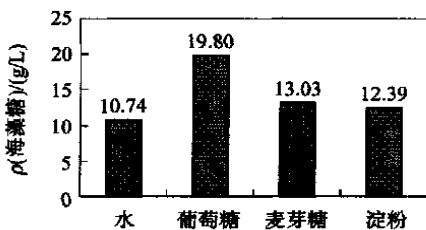


图4 麦芽糖为碳源的菌体生成海藻糖情况

Fig.4 Trehalose output of *Cellulomonas sp.* growing in maltose

图3,4的相同之处在于底物为水时,体系中有海藻糖,添加其他物质海藻糖含量有所提高。这说明纤维单胞菌胞内有6-磷酸海藻糖合成酶/6-磷酸海藻糖磷酸酯酶;底物中加入葡萄糖后海藻糖含量上升很快,也进一步证实了这一点。底物为麦芽糖和淀粉时,体系内海藻糖量提高幅度比葡萄糖少,其原因是纤维单胞菌的酶系将它们转化成为了葡萄糖,然后进行了同样的反应。

图3,4的不同之处在于发现以麦芽糖为碳源时菌体胞内的海藻糖较以环糊精为碳源的高得多,达到了10.74 g/L,相当于近13 mg/g湿细胞和50 mg/g干细胞;加入葡萄糖后比不加时海藻糖含量提高了近一倍,达到了19.80 g/L,提高的幅度比环糊精

高近30%。这说明以麦芽糖为碳源时,胞内海藻糖合成双酶的酶活高;而环糊精为碳源时,胞内分解麦芽糖和淀粉的酶活高,使得添加三种底物海藻糖增加的量相近。

为了进一步对比胞内酶的差异,实验以两种碳源培养得到的细胞,经破碎后加去离子水用高效液相色谱法测海藻糖质量浓度,结果见图5,6。

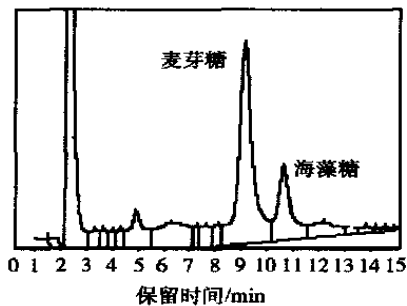


图5 环糊精为碳源的菌体以淀粉为底物反应色谱图

Fig.5 Chromatogram of the product (cyclodextrine used as carbon source)

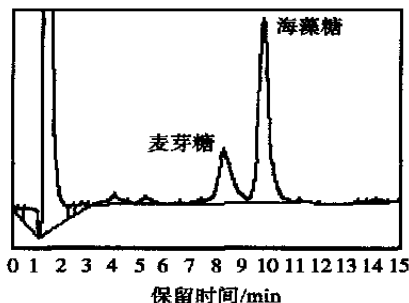


图6 麦芽糖为碳源的菌体以淀粉为底物反应色谱图

Fig.6 Chromatogram of the product (maltose used as carbon source)

从图5可以看出,以环糊精为碳源时,体系中的麦芽糖含量明显高于海藻糖;而图6则表明,以麦芽糖为碳源则刚好相反,海藻糖质量浓度明显高于麦芽糖。分析认为,碳源不同,使合成的代谢产物的数量和种类也不同,环糊精做碳源诱导了将淀粉分解为麦芽糖的酶;而以麦芽糖为碳源时,则因为底物抑制,使得这种酶的数量大为减少,与此同时,海藻糖合成酶的含量却上升。总之,麦芽糖为碳源有利于海藻糖生成酶系的合成,而环糊精则更有利于麦芽糖生成酶的合成。

### 3 结论

本文通过对纤维单胞菌在两种碳源中生长和酶系的考察,发现虽然纤维单胞菌都可以生长和产海

藻糖,碳源不同,其生长情况和酶系的差别很大。环糊精为碳源,更有利于菌体的生长,生物量大,但是它会诱导麦芽糖生成酶,而抑制海藻糖生成酶的活性;相反,以麦芽糖为碳源时,产酸量较大,生物量较小,但是海藻糖生成酶的酶活比较高,其胞内海藻糖质量浓度可以达到 10.74 g/L,通过添加葡萄糖,海藻糖质量浓度可增至 19.80 g/L。这一实验结果对研究海藻糖新的生成途径及扩大纤维单胞菌的应用领域无疑都是有益的。

### 参 考 文 献

- [1] Priya Chaudhary, Nimita N K, Dileep N D. The glucanases of cellulomonas [J]. *Biotechnology Advances*, 1997, 15(2): 315-331
- [2] 丸田和彦,久保田伦夫,杉本利行,等. 海藻糖释放酶及其制备和用途[P]. 日本公开专利, 1107888. 1995-09-06
- [3] Beattie G M, Crowe J H. Trehalose: a cryoprotectant that enhances recovery and preserves functions of human pancreatic islets after long-term storage[J]. *Diabetes*, 1997, 46(3): 519
- [4] 刘传斌,云战友,鲁济青,等. 海藻糖的分析方法[J]. *食品与发酵工业*, 1998, 24(5): 40 - 44
- [5] 李晓东. 以淀粉为原料利用微生物酶生成海藻糖的新方法[J]. *食品与机械*, 2000(1): 35 - 37

[1] Priya Chaudhary, Nimita N K, Dileep N D. The glu-

## Effect of two carbon sources on growth and metabolism of *Cellulomonas* sp.

Gao Hui-ling<sup>1</sup> Yuan Qi-peng<sup>1</sup> Zhou Yan<sup>1</sup> Qian Zhong-ming<sup>2</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

(2. Department of Chemistry Science and Applied Biology, Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong, China)

**Abstract:** The effects of two carbon sources, maltose and cyclo-dextrine, on the growth and the metabolism of *Cellulomonas* sp. were discussed. The experiment showed: cyclo-dextrine could higher enhance the growth of *Cellulomonas* sp. than maltose, the former as carbon source resulted in the final biomass concentration 20% higher than that of the latter. It was found that *Cellulomonas* sp. could synthesize trehalose by trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase; maltose was propitious to induce these two enzymes, and the intracellular trehalose could reach 13 mg/g dry cells.

**Key words:** *Cellulomonas* sp.; growth; metabolism; trehalose; enzyme

(责任编辑 云志学)

## 大赛光盘征订启事

首都高校第二届机械创新设计大赛经过 2004 年 5 月底的初赛,6 月 12 日的决赛,6 月 20 日的颁奖仪式已经圆满结束了。为了宣传大赛的作品,发扬创新精神,在大赛组委会的领导下,承办单位北京化工大学制作了大赛光盘,其中主要内容有:大赛的组织,大赛初赛,大赛决赛,大赛颁奖。分别介绍了大赛组织工作,评奖过程,作品(83 个作品)展示,创新原理,专家采访,视频播放,以及北京电视台的全文报导等。

为此,发布征订启事,愿意购买者请与北京化工大学联系,联系电话:64436737;电子邮箱:zhangml@mail.buct.edu.cn。

联系人:张美麟

价格:每张 60 元(不含邮费)