

一株转化淀粉或麦芽寡糖生成海藻糖的菌株 D-97 鉴定

荣绍丰 徐 骥 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: 由东北大田采集的土样中筛选到菌株 D-97, 该菌株胞内酶可以利用淀粉或麦芽寡糖合成海藻糖。通过生理、形态、结构特征分析及 16S rDNA 基因全序列与参比菌株的序列比较, 菌株 D-97 与食尼古丁节杆菌的 16S rDNA 序列同源性高达 97.98%, 故将该菌株命名为食尼古丁节杆菌 D-97 (*Arthrobacter nicotinovorus* D-97)。我们还将 D-97 菌株与日本林原公司的海藻糖生产菌——节杆菌 Q36 的有关生理生化特征进行了比较。

关键词: 海藻糖, 菌株鉴定, 食尼古丁节杆菌 D-97

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 02-0057-05

IDENTIFICATION OF BACTERIUM D-97 PRODUCING TREHALOSE FROM STARCH OR MALTOOLIGOSACCHARIDES

RONG Shao-Feng XU Ji ZHANG Hai-Ping YANG Jing DUAN Zuo-Ying MAO Zhong-Gui

(The School of Biotechnology, Southern Yangtze University, wuxi 214036)

Abstract: A bacterium D-97 whose endocellular enzymes can produce trehalose from starch or maltooligosaccharides was isolated from Datian in Northeast of China. The morphological, Cultural and Physiological Characteristics of trehalose-producing bacterium D-97 were described in this paper. There are galactose and lysine in its cell wall but no diamino-pimelic acid (DAP) arabinose. The content of G + C mol% is 61.3. The full-length of 16s rDNA (770bp) has been tested and compared with the type strains of all known *Arthrobacter* sp. in Genebank, the results showed the similarity values of 16s rDNA sequence between bacterium D-97 and *Arthrobacter nicotinovorus* were 97.98%, therefore bacterium D-97 was named *Arthrobacter nicotinovorus* D-97. In this paper we also carried out some comparisons of Physiological Characteristics between *Arthrobacter nicotinovorus* D-97 and *Arthrobacter* sp. Q36.

Key words: Trehalose, Strain identification, *Arthrobacter nicotinovorus* D-97

海藻糖是由两个吡喃环葡萄糖分子以 α, α -1, 1 键联结而成的非还原性双糖。目前海藻糖在食品工业、农业、医药工业及分子生物学等领域的应用日益广泛。

本研究室从大量的土样中筛选得到一株具有海藻糖合成酶系的菌株 (本文称之为菌株 D-97), 实验研究表明菌株 D-97 的海藻糖合成酶系可以将淀粉或麦芽寡糖转化为海藻糖, 并且转化率较高。在对菌株 D-97 形态生理学研究的基础上, 我们完成了该菌株的 16S rDNA 基因序列的测定, 并对其作了系统发育学初步分析, 同时文中也将菌株 D-97 与日本林原公司的海藻糖生产菌株——节杆菌 Q36 (*Arthrobacter* Q36) 的部分理化特性进行了比较讨论。

* 联系人

收稿日期: 2002-04-28, 修回日期: 2002-09-09

1 材料与方法

1.1 菌株及其培养条件

本实验室由东北大田采集的土样中筛选到细菌 D-97。D-97 的培养基见文献 [1]。

1.2 形态特征

对菌株 D-97 的形态特征、培养特征及生理生化特征等分类鉴定参照文献 [4, 5] 的有关内容。在牛肉浸汁琼脂和营养琼脂上 30℃ 培养 48h, 取样涂片, 革兰氏染色, 用光学和电子显微镜进行菌体和孢子表面结构的观察。

1.3 培养特征

在牛肉浸汁琼脂、营养琼脂、蛋白胨酵母膏琼脂、无机盐酵母膏琼脂共 4 种培养基上 30℃ 培养 48h 后观察菌落颜色和形态。

1.4 生理生化实验

生理生化实验按照文献 [4, 5] 中描述的方法进行。

1.5 细胞壁化学组分分析

快速薄层层析法^[6] (TLC) 对菌株进行全细胞水解液糖型及氨基酸分析。

1.6 DNA 的 G + C mol% 测定

主要按照 Marmur 等^[7] 的方法提取菌株染色体 DNA, 用紫外分光光度计测定 DNA 的热变性温度 T_m , 根据公式 $G + C \text{ mol\%} = 2.44 (T_m - 53.5)$ 计算出菌体 G + C 含量。

1.7 16S rDNA 序列分析

待测菌株培养后取新鲜菌体用溶菌酶法提取总 DNA 模板, 以通用引物 PCR 扩增 DNA, PCR 产物经纯化后, 直接用 Taq DyeDeoxy Terminator Cycle 测序试剂盒测序, 电泳及数据收集用 Applied Biosystems DNA Sequencer (model 373A) 自动进行。所得序列与国际基因库 GenBank 序列数据库中相关属种进行比较, 以确定该菌株的分类地位。

2 实验结果

2.1 形态特征

D-97 菌株幼龄培养物的细胞呈不规则形状, 菌体大小为 $0.7 \sim 0.9 \mu\text{m} \times 1.2 \sim 2.0 \mu\text{m}$ 。常呈现 V 形排列, 端圆, 没有丝状体。生长过程中由杆状断裂成小球状, 直径 $0.6 \sim 1.0 \mu\text{m}$, 单个或成对排列, 成不规则堆状。较老的培养物全部或绝大部分是球状细胞, 具有明显的杆、球周期变化; 稳定期的培养物几乎全部是球状, 无芽孢, 无鞭毛, 不运动 (见图 1 和图 2)。革兰氏染色可变性, 有时阳性, 有时阴性。

2.2 培养特征

培养特征见表 1。

表 1 菌株 D-97 在 4 种培养基上的培养特征比较

培养基	菌落颜色	形状特征
牛肉浸膏琼脂	杏仁黄色	有突起, 润湿, 不透明, 边缘整齐
营养琼脂	桔草黄色	光滑, 略干, 圆形, 半透明, 边缘整齐
蛋白胨酵母膏琼脂	浅梨黄色	光滑, 润湿, 圆形, 不透明, 边缘整齐
无机盐酵母膏琼脂	浅黄色	有突起, 润湿, 圆形, 不透明, 边缘整齐

2.3 生理生化特征

菌株 D-97 的生长温度范围为 8℃ ~ 39℃, 最适生长温度 28℃ 左右。在 pH 值 6 ~ 10

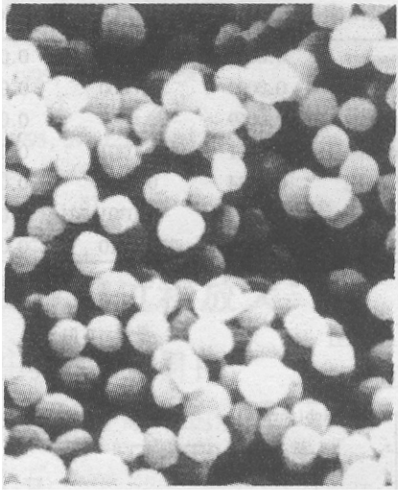
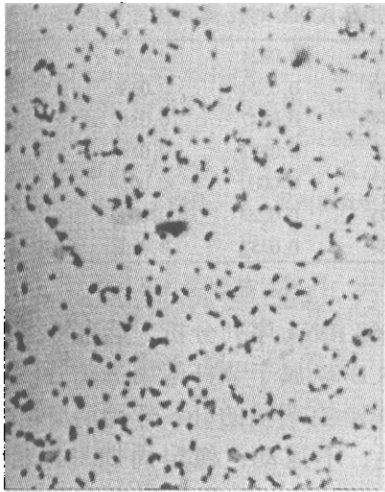


图1 D-97 菌株的杆状与球状菌体形态 (750×) 图2 D-97 菌株的电镜扫描照片 (8,000 ×)

范围内能良好生长，一般地，按照 1.1 的培养条件，培养结束后 pH 值由 7.0 上升到 9.0 左右。

生理生化特征实验结果见表 2 和表 3，同时将日本林原公司报道的有关节杆菌 Q36 的生理生化特征也列于此表以便进行比较。

2.4 细胞壁化学组分及 DNA 的 G + C mol%

D-97 菌株细胞壁无二氨基庚二酸 (DAP)，含有半乳糖但不含阿拉伯糖和马多拉糖，含有赖氨酸。D-97 菌株 DNA 的 T_m 值为 78.5℃，从而计算出 DNA 的 G + C mol% 为 61.3。

2.5 16S rDNA 全序列分析

D-97 菌株 16S rDNA 全序列测定结果，共计 770 个碱基，已进入国际基因库，接受号 Accession No. DDBJ: 20020926145046.46976。

菌株 D-97 的 16S rDNA 序列分析与 GenBank 中相关菌株的 Blast 进行比较，并得出 D-97 菌株与已知菌株（亲缘关系最近的 6 个节杆菌种）的距离矩阵 (表 4)，其中相似性值为：相似系数 = (1-距离值) × 100%。在此基础上对菌株 D-97 进行的系统发育学分析 (图 3)。

表 2 菌株 D-97 碳源利用与产酸性

培养碳源	碳源利用	产酸性	培养碳源	碳源利用	产酸性
D-葡萄糖	+	+	蜜三糖	+	+
D-果糖	+	+	甘露糖醇	+	+
D-半乳糖	-	-	糊精	+	+
L-阿拉伯糖	+	+	异麦芽酮糖醇	+	+
L-鼠李糖	+	+	异麦芽酮糖	+	+
D-木糖	+	+	棉籽糖	+	+
麦芽糖	+	+	松三糖	-	-
蔗糖	+	+	海藻糖	+	+
乳糖	+	+			

注：+ 表示利用或产酸，- 表示不利用或不产酸

表 3 菌株 D-97 和节杆菌 Q36 一些生理生化反应结果比较

理化实验	结果	理化实验	结果
明胶液化	+ /	V-P 实验	+ / +
牛奶凝固	+ /	H ₂ S 产生	- / +
牛奶胨化	+ /	纤维素生长	- / +
吲哚反应	- /	甲基红实验	+ / -
淀粉水解	- / -	氧化酶反应	+ / -
硝酸盐还原	- / +	脲酶反应	+ / +
柠檬酸盐利用	+ / +	DNase	+ / +
过氧化氢酶	+ / +	接触酶反应	+ /

注：+ 表示反应阳性，- 表示反应阴性，反斜杠 “/” 下方数据为日本林原海藻糖生产菌一节杆菌 Q36 (*Arthrobacter* Q36) 的一些生理生化特征^[8,9]

表 4 菌株 D-97 与节杆菌属的 6 个已知菌株的 16S rDNA 对比得到的距离矩阵

<i>A. pascens</i>	0.0000	0.0000	0.0069	0.0201	0.0324	0.0301	0.0410
<i>A. ramosus</i>	0.0000	0.0000	0.0069	0.0210	0.0324	0.0301	0.0410
<i>A. globifor</i>	0.0069	0.0069	0.0000	0.0244	0.0347	0.0317	0.0439
<i>A. oxydans</i>	0.0201	0.0201	0.0244	0.0000	0.0222	0.0195	0.0368
<i>A. histidin</i>	0.0324	0.0324	0.0347	0.0222	0.0000	0.0027	0.0257
<i>A. nicotino</i>	0.0301	0.0301	0.0317	0.0195	0.0027	0.0000	0.0202
D-97	0.0410	0.0410	0.0439	0.0368	0.0257	0.0202	0.0000

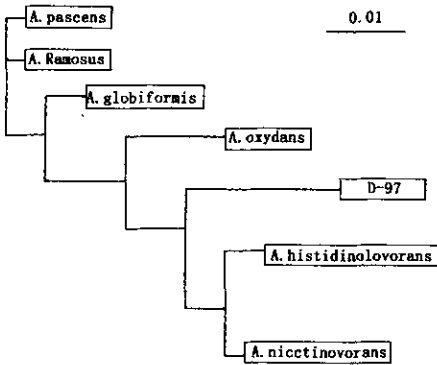


图 3 菌株 D-97 的系统发育学分析

根据 16S rDNA 序列分析、形态特征及化学分类, 菌株 D-97 属于节杆菌属进化分枝。形态特征方面 D-97 有明显的杆、球周期变化, 无芽孢, 无鞭毛, 不运动; 稳定周期呈球状细胞。细胞壁无 DAP, 革兰氏染色阳变阴不定, 不抗酸, 无特征性糖, 属于节杆菌属 (*Arthrobacter* sp.)。根据多相分类的原则, 综合考虑培养特征、生理生化特征及 16S rDNA 序列分析结果, 菌株 D-97 与食尼古丁节杆菌的 16S rDNA 序列同源性高达 97.98%, 目前细菌分类学家普遍认为 16S rDNA 序列同源性大于 97% 为同种成员, 因

此我们将菌株 D-97 定名为: 食尼古丁节杆菌 D-97 (*Arthrobacter nicotinovorans* D-97)。

3 讨论

虽然节杆菌 Q36 和食尼古丁节杆菌 D-97 这两株菌同为节杆菌属, 但它们的生理生化特征 (实验结果 2.3) 有很大的不同。另外在菌体的培养过程中两者也存在一定差异, 如节杆菌 Q36 在培养 60h 左右出现自溶, 海藻糖合成酶系在胞内与胞外的酶活比大约是 5:7^[9]; 但采用与节杆菌 Q36 相同的培养基, 食尼古丁节杆菌 D-97 在培养 60h 左右并不出现自溶, 在菌体胞外培养液中也检测不到海藻糖合成酶活性。

目前我们已经明确了食尼古丁节杆菌 D-97 胞内海藻糖合成酶系合成海藻糖的基本过程^[10], 食尼古丁节杆菌 D-97 的胞内酶不能利用麦芽糖合成海藻糖, 研究表明它只能将聚合度 (DP) 大于 3 的麦芽寡糖转化为海藻糖。谢慧敏等^[12]从长白山天池水中分离得到一株产海藻糖的菌株 CB39, 经过鉴定为胶样菌属 (*Colloides*), 该菌株可以利用麦芽糖合成海藻糖并将海藻糖分泌到胞外陈红歌等^[13]从河南鲁山中汤温泉及叶县盐厂的土壤中分离到一株细菌 CX45, 该菌株可以以淀粉为原料酶法海藻糖, 但没有该菌株的鉴定报道。

参考文献

- [1] 荣绍丰, 张海平, 杨 静, 等. 微生物学报, 2003, 43 (1): 104.
- [2] Noel R K, John G H. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore/London: Williams & Wilkins, 1984.
- [3] 东秀珠, 蔡妙英, 王宝铃, 等. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001. 66 ~ 68.
- [4] Hasegawa T, Takizawa M, Tanida S, et al. J Gen Appl Microbiol, 1983, 29: 319.
- [5] Marmur J, doty p. J Mol Biol, 1962, 5: 109.

- [6] Kazuhiko M, Kubota M, Sugimoto T, *et al.* US6017899: non-reducing saccharide-forming enzyme its preparation and uses, 1996, 12, 18.
- [7] Kazuhiko M, Tetsuya N, Michio K, *et al.* Biosci Biotech Biochem, 1995, **59** (10): 1834.
- [8] 荣绍丰, 张海平, 段作营, 等. 色谱, 2002, **20** (3): 197.
- [9] Tetsuya N, Kazuhiko M, Keiji T, *et al.* Biosci Biotech Biochem, 1995, **59** (12): 77.
- [10] 谢慧敏, 张红缨, 郑玉娟, 等. 吉林大学自然科学学报, 1999, **39** (3): 77.
- [11] 陈红歌, 冉夫来, 王明道, 等. 郑州粮食学院学报, 2000, **21** (1): 57.