

诺卡氏菌形放线菌枝菌酸的气相色谱分析

刘志恒 苏京军 阮继生

(中国科学院微生物研究所,北京)

摘要 以已知的棒杆菌枝菌酸,红球菌枝菌酸及自诺卡氏菌典型株提取的枝菌酸为参照样品,用硅烷化的枝菌酸甲酯气相色谱分析方法,分析测定了包括以前我们发表的两个诺卡氏菌种在内的7株诺卡氏菌形放线菌的枝菌酸。结果表明,鲜黄诺卡氏菌 A100 和黄粉诺卡氏菌 N10 的枝菌酸分子碳原子数(58—64)均在诺卡氏菌枝菌酸的范围内;而另一株原名珊瑚诺卡氏菌 N21 的枝菌酸碳原子数(32—40)则与红色红球菌 R372 一样在红球菌枝菌酸范围内。其余结果均与文献报道的相一致。本文还讨论了这一方法在诺卡氏菌形放线菌分类鉴定中的作用和意义。

关键词 诺卡氏菌形放线菌;枝菌酸;气相色谱。

放线菌分类研究中,化学分类学 (Chemotaxonomy)正在兴起^[1]。它对那些细胞壁 IV/A 型,形态结构简单易变,且含枝菌酸 (Mycolic acid) 的棒杆菌 (*Corynebacterium*), 分枝杆菌 (*Mycobacterium*), 诺卡氏菌 (*Nocardia*), 红球菌 (*Rhodococcus*) 等诺卡氏菌形放线菌 (*Nocardioform-actinomycetes*) 的分类研究尤为重要^[2]。

人们可以根据菌体有无枝菌酸组分及枝菌酸的分子化学特性很容易地将它们加以区分。已有的研究表明,棒杆菌枝菌酸 (*Corynomycolic acid*) 的分子碳链上约有 30 个碳原子^[3,4],诺卡氏菌枝菌酸 (*Nocardomycolic acid*) 约有 50 个碳原子^[5,6],红球菌枝菌酸 (*Rhodomycolic acid*) 约有 40 个碳原子^[5,7,8],分枝杆菌枝菌酸 (*Mycobactomycolic acid*) 约有 80 个碳原子^[9]。因此,枝菌酸的分析已成为诺卡氏菌形放线菌化学分类研究中不可缺少的一项指标。

目前已有许多分析测定枝菌酸的方法可供研究选择^[7,10-14]。比较这些方法,测熔点法和 TLC 法虽能定性分析枝菌酸的有无,但不能测得分子化学特性;热裂解法只能通过枝菌酸裂解后的醛和脂肪酸片断分析推测出分子的大小特性;质谱分析虽能准确测定分子结构,但仪器昂贵。较为理想的方法是硅烷化枝菌酸甲酯气相色谱分析法^[15,16]。

本文报告采用硅烷化枝菌酸甲酯气相色谱

分析法,对7株诺卡氏菌形放线菌枝菌酸的研究结果。

材料和方法

(一) 实验菌株

用于研究的菌株有北京棒杆菌 (*Corynebacterium pekinense* A891, IMAS), 红色红球菌 (*Rhodococcus rhodochrous* R372, IMRU), 珊瑚诺卡氏菌 (*Nocardia corallina* N21, IMAS), 鲜黄诺卡氏菌 [*N. galba* A100(AS4.1177, CCCC)], 黄粉诺卡氏菌 [*N. flavorosea* N10(AS4.1175, CCCC)], 星状诺卡氏菌 (*N. asteroides* 3318, R727, IMRU)。

所有菌株均培养在葡萄糖天冬素酵母膏液体培养基里(葡萄糖 10g, K_2HPO_4 0.5g, 天冬素 0.5g, 酵母膏 3g, 水 1000 ml, pH 7.2), 28℃, 振荡培养 48—72h, 离心收集菌体, 冻干备用。

(二) 枝菌酸甲酯的制备

参照刘志恒等人的方法^[17]。称取冻干菌体 50mg 放入螺口试管里, 加入甲醇-甲苯- H_2SO_4 (30:15:1, V/V) 混合试剂 3ml。然后放在 75℃ 水浴中过夜 (约 16—18h)。取出冷却至室温后, 加入石油醚 (B.P. 60—90) 2ml 充分混合, 低速离心 (3000r/min) 10min。取上层石油醚抽提液通过堵有棉塞的巴斯德吸管制备的碳酸氢铵 (NH_4CO_3) 小柱 (2ml 乙醚予洗 2 次)。收集

洗脱液于指形管里(残留物可用石油醚重复抽提上柱和洗脱),最后用 1ml 乙醚洗脱小柱。合并所有洗脱液,最后在室温下真空干燥,得到全细胞枝菌酸甲酯(Me-Mycolate),保存备用。

(三) 枝菌酸甲酯的薄板层析与纯化

枝菌酸甲酯的薄板层析参照刘志恒等人的方法^[17]。在 18 × 18cm 玻板上,使用号型 60 HF₂₅₄ 硅胶(Art. 7739, Merck Darmstadt, G. R.F)6g,加入 0.5% 羧甲基纤维素(CMC)水溶液 20ml,充分调合铺平,置清洁处室温干燥。使用前需在 100℃ 下活化干燥 30min。点样后用石油醚-丙酮(95:5, V/V)溶媒展开系统,室温下进行上行单向层析 2 次,用碘熏蒸或 10% 的磷钼酸铵乙醇溶液喷雾(120℃, 15min)显迹。

枝菌酸甲酯的纯化步骤与上述薄板层析步骤基本相同,只是硅胶铺板时用量为 10g,点样成带状,采用己烷-乙醚(80:20, V/V)溶媒展开系统。使用波长 254nm 的紫外灯观察枝菌酸甲酯在薄板上的位置,然后刮下相应位置上的硅胶(约 1.0—1.5g)加入石油醚-乙醚(5:1, V/V)洗脱抽提,低速离心除去硅胶,抽提液真空干燥,得到纯化后的枝菌酸甲酯。

(四) 枝菌酸甲酯硅烷化衍生物的制备

取经 TLC 纯化的枝菌酸甲酯,加入吡啶溶解,再加入等量的硅烷试剂 BSTFA [Bis-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide, Altrich, Chemical Company Inc USA, A15519-5] 充分混合后密封,然后 80℃ 水浴 10min,取下冷却至室温,即得到硅烷化枝菌酸甲酯(TMS-Me-Mycolate),溶液,冰箱保存。

(五) 气相色谱分析

将 TMS-Me-Mycolate 注入配有 C-R3A 微处理记录仪的日本岛津 GC-7AG 气相色谱仪,使用 1000 × 3mm 盘形不锈钢柱;填充物为涂有 0.5% OV-1 的 Chromosorb G AW-DMCS(80—100 目);检测器为氢火焰离子鉴定器(高纯 H₂, 0.6kg/cm²);载气为高纯 N₂,流量 50ml/min;气化室温度 350℃;使用柱温为:(1) 起始温度 270℃,保持 2min,以 2.5℃/min 程序升温至 350℃,保持 20min;(2) 起始温

度 290℃,保持 4min,以 4℃/min 程序升温至 340℃。记录仪纸速 3mm/min,衰减 1/8。

(六) 分析用参照样品

Nocardomycolate, Rhodomycolate 和 Corynomycolate 等均由美国拉格斯大学 Waksman 研究所 M. Lechevalier 惠赠。

结果和讨论

1. 从诺卡氏菌 *N. asteroides* 3318, *N. asteroides* R727, *N. galba* A100, *N. flavorosea* N10, *N. corallina* N21 及棒杆菌 *C. pekinenses* A891 和红球菌 *R. rhodochrous* R372 菌株中提取制备了枝菌酸甲酯。图 1 显示了其中 4 株诺卡氏菌全细胞枝菌酸甲酯的 TLC 图谱。图中 GX-1 和 No.170 为不含枝菌酸的试验菌株。

2. 由试验菌株制备的枝菌酸甲酯,连同参照枝菌酸甲酯样品分别经 BSTFA 转化处理,得到的 TMS-Me-Mycolate 按本文方法所述条

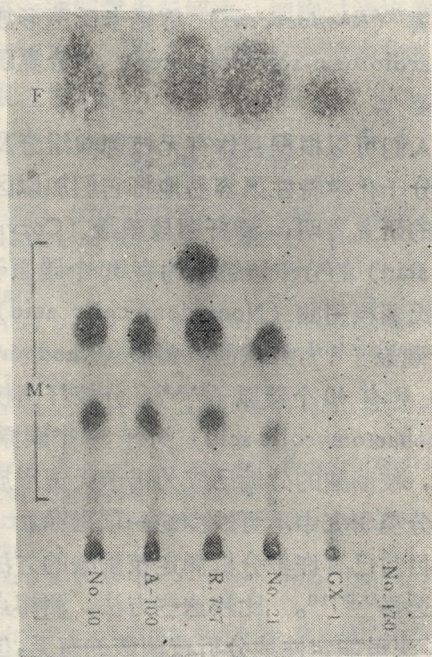


图 1 全细胞枝菌酸甲酯薄板层析(TLC)

F: 脂肪酸甲酯, M: 枝菌酸甲酯

件进行气相色谱分析,均获得了满意的结果。所测 TMS-Me-Corynomycolate 参照样品的气相色谱图基本与文献中报道的结果^[3]一致,未知样品 A₈₉₁ 得到的图谱,根据保留时间和峰形

与参照样品图谱比较,表明其枝菌酸分子含有 24—28 个碳原子,在棒杆菌枝菌酸范围以内。

3. TMS-Me-Rhodomycolate 气相色谱图,无论是参照样品或是由试验菌 *R. rhodochrous* R 372 提取的红球菌枝菌酸甲酯均与文献中报道的结果^[4]一致,前者分子含有 28—42 个碳原子,后者含有 32—44 个碳原子。

4. 5 株诺卡氏菌 TMS-Me-Nocardomycolate 经气相色谱分析,除 *N. corallina* N21 外,其余 4 株的图谱是一致的。根据保留时间和峰形判读,*N. asteroides* 3318 和 R727 的枝菌酸分子含有 54—62 个碳原子,*N. galba* A 100 和 *N. flavorosea* N10 的枝菌酸含有 58—64 个碳原子。它们均在诺卡氏菌枝菌酸范围以内。图 2-a 是 *N. flavorosea* N10 的枝菌酸气相色谱。而 *N. corallina* N 21 的枝菌酸得到了一个不同于诺卡氏菌枝菌酸的气相色谱(图 2-b),其

与红球菌枝菌酸一样,含有 32—40 个碳原子,这一结果与以往文献中报道的基本一致。

上述研究结果表明:(1)用气相色谱分析 BSTFA 硅烷化处理的枝菌酸,在有参考样品或有从已知典型菌株中提取的枝菌酸作对照时,这一方法可以快速、准确地给出不同分子大小的枝菌酸分析结果;(2)分子较大的 *Nocardomycolate* (含 54—62 个碳原子)气相色谱分析需要柱温比分子小的 *Corynomycolate* (含 28—32 个碳原子)柱温要高。故含约 80 个碳原子的分枝杆菌酸在本文使用的条件下尚得不到满意的结果;(3)红球菌枝菌酸的碳原子数介于棒杆菌和诺卡氏菌枝菌酸之间(含 32—42 个碳原子)。这一分子化学特性对于分类学上其他特征(C-W IV/A,MK-8, Type PII 等)与诺卡氏菌属相同的红球菌属来说,枝菌酸分析有着更为重要的分类学价值。*N. corallina* N21 也有与 *Rhodomycolate* 碳数一样的枝菌酸,因此有待于研究了他们的 DNA 同源性后考虑是否合并到 *Rhodococcus* 属中;(4)我们以前发表的两个诺卡氏菌新种^[18,19] *N. galba* A100 和 *N. flavorosea* N10 它们的枝菌酸气相色谱分析结果表明是含有 58—64 个碳原子的诺卡氏菌枝菌酸,这就从碳骨架上证实它们为诺卡氏菌属的成员。

参 考 文 献

1. Goodfellow M et al.: *Biology of Actinomycetes*'88, pp. 233—238, Japan Scientific Societies Press, 1988.
2. 阮继生,刘志恒等:《放线菌研究及应用》,第五章,科学出版社,北京,1990。
3. Yano I and K Sato: *FEBS Letters*, 23(3): 352—356, 1972.
4. Collins M D et al.: *J. Gen. Microbiol.* 128: 182—149, 1982.
5. Yano I et al.: *Biomedical Mass Spectrometry*, 5(1): 14—24, 1978.
6. Tomiyasu I: *J. Bacteriol.*, 151: 828—829, 1982.
7. David E Mimmikin and Pankaj V Patel: *FEBS Letters*, 39(3): 322—324, 1974.
8. Yano I et al.: *Sixth Int. Symp. on Actinomycetes Biology*, eds. G. Szabo, S. Biro, M. Goodfellow, pp. 567—570, 1985.
9. Lechevalier M: *A University Laboratory Approach, In Society for Industrial Microbiology special Pub-*

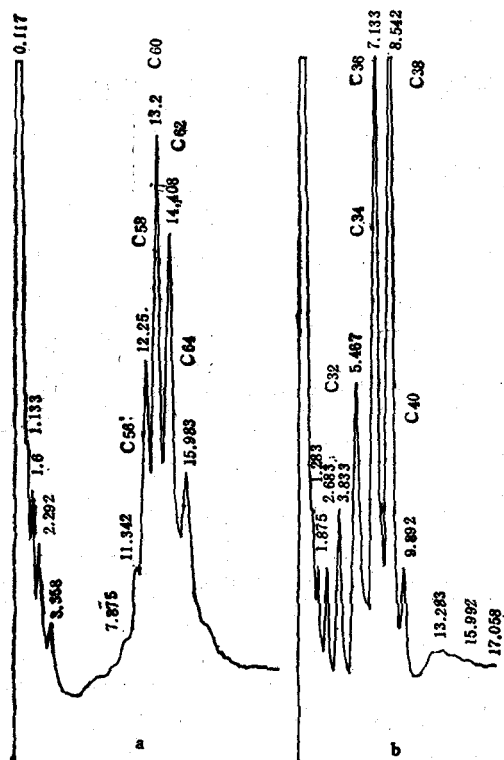


图 2 TMS-Me-Nocardomycolate 气相色谱

a: 自 *N. flavorosea* N10 提取的枝菌酸;

b: 自 *N. corallina* N21 提取的枝菌酸。

分析用注射温度 350℃,柱温 290—340℃,4℃/min
程序升温

- lication N.6, Arlington VA, pp. 277—284, ed. by Bietz & Thayer, D. W., 1980.
10. Kanetsuna F et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 70: 209—212, 1972.
 11. Minnikin D E. *J. App. Microbiol.*, 47: 81—95, 1979.
 12. Minnikin D E. *J. Chromatography*, 188: 221—233, 1980.
 13. Leechevalier M et al.: *Advances in Applied Microbiol.*, 14: 47—72, 1971.
 14. Batt R D et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 239: 368—373, 1971.
 15. David L Stilling et al.: *Biochem. Biophys. Research Communication*, 31(4): 616—622, 1968.
 16. Yano I et al.: *FEBS Letters*, 21(2): 215—219, 1972.
 17. 刘志恒,阮继生: 微生物学报, 28(3): 206—210, 1988.
 18. 刘志恒等: 微生物学报, 23(4): 298—304, 1983.
 19. 刘志恒等: 微生物学报, 24(4): 299—303, 1984.

市售洗衣粉提高木霉菌株产生纤维素酶量的研究*

张杰富 文成敬 徐光华

(四川农业大学农学系,雅安市)

摘要 加入不同浓度的双猫牌洗衣粉(主要成份为烷基苯磺酸钠)对木霉菌产纤维素酶的能力发生不同的作用。在浓度为 0.1% 到 0.7% 时,酶产量逐步提高。然而,当加入量为 0.8% 时,提高作用下降;0.9% 与 1% 时,反而起抑制作用。这可能与适量表面活性剂提高了木霉菌的细胞膜透性,克服其胞内产酶的反馈现象有关;而过高浓度,却使细胞膜破坏。

关键词 表面活性剂;纤维素酶;膜透性;木霉

一些真菌所产生的水解酶,在酶的积累和排出过程中,由于反馈现象而抑制酶的继续产生。因而这些酶的产量较低,价格较贵,影响其推广使用。如能设法提高细胞质膜的透性,使产生的酶不断排出,克服反馈现象,则可使酶的产量大幅度提高。栾升与倪晋山^[1]认为表面活性剂与细胞膜结合并插入或透过膜,较多的单分子在膜内形成胶束(micella),浓度进一步提高,造成膜蛋白与拟脂分子分离,在膜上开孔,从而透性加大。故用表面活性剂可提高酶产量。

我们用双猫牌洗衣粉作为表面活性剂进行试验发现也能使木霉纤维素酶活性显著增加。现将试验结果报告如下。

材 料 和 方 法

(一) 材料

供试菌株为从土壤中分离的具有较高纤维素酶活性的木霉菌株 234 (*Trichoderma* sp., 234)。

表面活性剂为市售双猫牌洗衣粉(主要成

份为烷基苯磺酸钠),由成都合成洗涤剂厂出品。

(二) 方法

1. 将木霉菌株 234 接种于 PDA 平板培养基上,培养 4 天后,用打孔器取带有菌丝的琼脂块,分别接种在含 0.1—1% 不同浓度的双猫牌洗衣粉的麦麸-玉米芯粉综合培养基上。于 28℃ 恒温条件下培养 14 天。然后用 28℃ 温水浸提二小时,过滤。滤液离心(3000r/min)30 分钟。上清液即酶液。

2. 滤纸崩溃试验:取上述各酶液 4ml,加 1ml 磷酸缓冲液(pH4.8),再放入 1×3cm 滤纸条。置 50℃ 恒温水浴 1 小时,观察滤纸崩溃情况。

3. 3,5-二硝基水杨酸法测还原糖:取 2ml CMC 缓冲液,加 0.5ml 酶液,于 50℃ 下保温 30 分钟。再加入 2.5ml 的 3,5-二硝基水杨酸试剂以终止反应,放入沸水浴中 5 分钟后,立即放入冷水中冷却。在 721 型分光光度计上用

* 本研究是自然科学基金资助项目。