

门多萨假单胞菌 *Pseudomonas mendocina* NK-01 合成褐藻寡糖及其结构鉴定

郭文斌¹, 王淑芳², 曹名锋¹, 耿伟涛¹, 宋存江¹

1 南开大学生命科学学院微生物系 南开大学生命科学学院分子微生物学与技术教育部重点实验室, 天津 300071

2 南开大学生命科学学院 生物活性材料教育部重点实验室, 天津 300071

摘要: 研究发现门多萨假单胞菌 NK-01 在菌体内积累中长链聚羟基脂肪酸酯(PHA_{MCL})的同时也能够合成褐藻寡糖分泌到发酵液中, 其产量与培养基的碳氮比有关, 高碳氮比有利于褐藻寡糖的合成。本研究利用紫外-可见分光光度法、傅立叶红外光谱分析、¹H 和 ¹³C 核磁共振对褐藻寡糖的结构进行了分析鉴定, 发现褐藻寡糖的结构是由β-D-甘露糖醛酸、α-L-古洛糖醛酸通过β-(1→4)/α-(1→4)键连接而成的无支化线性多糖, 并且在单体的 2 位或 3 位羟基上部分乙酰化。凝胶渗透色谱(GPC)对分子量的测定结果为 2054。

关键词: 门多萨假单胞菌, 发酵, 褐藻寡糖, 结构鉴定

Synthesis and characterization of alginate oligosaccharides produced by *Pseudomonas mendocina* NK-01

Wenbin Guo¹, Shufang Wang², Mingfeng Cao¹, Weitao Geng¹, and Cunjiang Song¹

1 Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Ministry of Education, Department of Microbiology, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China

2 The Key Laboratory of Bioactive Materials, Ministry of Education, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract: In this study, we found that when *Pseudomonas mendocina* NK-01 accumulated intracellular carbon reserve, medium chain length poly (3-hydroxyalkanoates), it also synthesized extracellular saccharides, alginate oligosaccharides. The high carbon nitrogen ratio of culture medium facilitated alginate oligosaccharides production. We analyzed the structure of alginate oligosaccharide by Ultraviolet-Visible Spectrophotometry, Fourier Transform Infrared Spectroscopy, ¹H and ¹³C of Nuclear Magnetic Resonance, and found that it was compounded in line from β-D-mannuronic acids and α-L-gluronic acids via β-(1→4)/α-(1→4) bonds, which acetylated partly on the 2- and/or 3-hydroxy. In addition, we determined the weight-average molecular weight of alginate oligosaccharides by gel permeation chromatography to be 2054.

Keywords: *Pseudomonas mendocina*, fermentation, alginate oligosaccharides, structure characterization

褐藻寡糖是褐藻多糖的寡聚物, 是聚合度较小的褐藻多糖。褐藻多糖是由海藻和细菌合成的一种

Received: May 9, 2009; **Accepted:** August 6, 2009

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA06Z323), Basic Research Foundation of Tianjin (No. 09JCZDJC18400).

Corresponding author: Cunjiang Song. Tel: +86-22-23503866; Fax: +86-22-23503866; E-mail: songcj@nankai.edu.cn

国家高技术研究发展计划(863 计划) (No. 2007AA06Z323), 天津市基础研究重点项目(No. 09JCZDJC18400)资助。

多糖, 海藻中褐藻多糖主要起骨架作用, 而细菌中褐藻多糖是细胞壁的一种成分, 抵制不良的环境^[1], 有些细菌则将合成的褐藻多糖分泌到细胞外。褐藻多糖是由 β -D 甘露糖醛酸、 α -L-古洛糖醛酸通过 β -(1 \rightarrow 4)/ α -(1 \rightarrow 4)键连接而成的无支化线性多糖^[1]。其中 β -D 甘露糖醛酸中的 C₅ 被差向异构化即是 α -L-古洛糖醛酸。褐藻多糖中有 3 种类型的链段 (Block structure), 其一是完全由 β -D 甘露糖醛酸按照 β -(1 \rightarrow 4)键结合的 M-M 型; 二是完全由 α -L-古洛糖醛酸按 α -(1 \rightarrow 4)键结合的 G-G 型; 三是由 β -D 甘露糖醛酸和 α -L-古洛糖醛酸混合交替结合的 M-G 型。来自细菌的褐藻多糖和来自海藻的褐藻多糖具有相同的基本结构, 差别仅在于细菌褐藻多糖中 C₂ 和/或 C₃ 羟基常常不同程度地被乙酰化, 乙酰化程度因菌株及生长条件的不同而有明显的差异^[2]。

褐藻多糖及其寡聚物已广泛应用于食品、制药、化工等多个领域, 具有广阔的开发前景, 如富含甘露糖醛酸的褐藻多糖和寡糖具有抗肿瘤和免疫调节等作用^[3-5]。

褐藻寡糖有多种合成方法。化学合成法主要缺点是需要多重基团保护和去保护步骤, 产量低, 因而没有实际的工业价值。用酶法制备褐藻寡糖, 多是先分离纯化得到褐藻寡糖裂解酶后再制备褐藻寡糖系列产物, 但酶的分离纯化比较繁琐, 且在这一过程中酶也容易失活, 酶法合成的价格也比较昂贵。本研究采用门多萨假单胞菌 NK-01 合成褐藻寡糖属于液体发酵, 工艺简单, 发酵周期短, 适合大规模工业化生产。

研究发现 *Pseudomonas mendocina* NK-01 在菌体内积累中长链聚羟基脂肪酸酯(PHA_{MCL})的同时, 也能够合成褐藻寡糖分泌到发酵液中。本研究采用多种分析手段, 对褐藻寡糖的结构进行了鉴定。

1 材料与方法

1.1 菌株

门多萨假单胞菌 NK-01 为南开大学环境微生物及微生物合成研究室分离保藏。

1.2 褐藻多糖标准品

褐藻多糖标准品购自日本东京化成株式会社。

1.3 培养基

LB 培养基: 用于种子培养。LB 固体培养基为 LB 培养基中加入 1.5% 的琼脂。

发酵培养基(g/L): Na₂HPO₄ 3.8, KH₂PO₄ 2.65, MgSO₄ 0.2, 微量元素液 1 mL/L (微量元素液: 0.1 mol/L HCl 1000 mL, CoCl₂·6H₂O 0.218 g, CaCl₂ 7.8 g, CrCl₃·6H₂O 0.105 g, NiCl₂ 0.118 g, CuSO₄·5H₂O 0.156 g, FeCl₃ 9.7 g), 葡萄糖 15, NH₄Cl 分别为 0.888、0.666、0.533、0.444、0.381、0.333, 此时相应的碳氮比为 30、40、50、60、70、80, 调 pH 为 7.0。

磷酸盐缓冲液(g/L): Na₂HPO₄·12H₂O 8.95, KH₂PO₄ 1.5, pH 为 7.0。

1.4 培养方法

种子培养: 从活化的 LB 固体平板上挑取单菌落接入含有 5 mL LB 液体培养基的 L 试管中, 30°C、150 r/min 培养过夜。然后, 以 1% 接种至含有 150 mL LB 液体培养基的 500 mL 三角瓶中, 培养至 OD₆₀₀=1.3, 8000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 用 18 mL 磷酸盐缓冲溶液悬浮菌体。

发酵实验: 以 1 mL 悬浮菌体接种于含 150 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中, 30°C、150 r/min 培养 48 h。

1.5 褐藻寡糖的提取^[6]

发酵结束后, 离心除去菌体后得到上清液, 调 pH 值至 10.8, 用 3 倍体积的无水乙醇沉淀过夜, 弃去上清, 沉淀用水溶解后, 采用定性滤纸过滤, 滤液进行冷冻干燥。

1.6 褐藻寡糖的结构鉴定

褐藻多糖 Na 型标准品的制备: 将购买的褐藻多糖标准品溶于水, 用 NaOH 调节 pH 值以增加褐藻多糖的溶解度, 待溶液由胶状变澄清后进行冷冻干燥。

紫外可见分光光度分析: 分别配制 1 g/L 的褐藻寡糖提取物和 Na 型褐藻寡糖标准品溶液。然后将溶液放置在 1 cm 的比色杯中, 用日本岛津紫外-可见分光光度仪 UV1800 Shimadzu 从 190 nm 到 800 nm 进行扫描。

¹H 核磁共振分析: 将褐藻寡糖提取物溶解在重水中。用 varian infinity plus 400 核磁共振仪在

400 MHz 测定 ^1H 谱, 化学位移以 ppm 记录。

^{13}C 固体核磁共振分析: 将褐藻寡糖提取物用 varian infinity plus 400 核磁共振仪在 400 MHz 测定 ^{13}C 谱, 化学位移以 ppm 记录。

傅立叶红外光谱测定: 将褐藻寡糖加入少量 KBr 研磨成淀粉状粉末, 置入圆柱模具中。使用 FT-IR-8300 Shimadzu 在 $400\sim 4500\text{ cm}^{-1}$ 记录红外光谱, 进行分析。

1.7 褐藻寡糖提取物的分子量测定

使用 0.25 mol/L 硝酸钠为流动相, 流速为 0.6 mL/min, 泵压为 105 psi, 样品浓度为 2 mg/mL, 色谱柱为 shodex KW-804。

2 结果

2.1 碳源浓度一定的条件下碳氮比对褐藻寡糖合成的影响

当葡萄糖浓度为 15 g/L 时, 本研究探讨了不同的 C/N 对褐藻寡糖合成的影响。从表 1 可以看出, 当碳氮比从 30 增加到 80 时, 褐藻寡糖的产量呈递增趋势, 从 3.923 g/L 增加到 14.632 g/L, 而细胞干重呈递减趋势, 从 2.767 g/L 减少到 1.762 g/L。当碳氮比为 80 时, 褐藻寡糖产量最高为 14.632 g/L, 而此时细胞干重最低, 为 1.762 g/L。因此高碳氮比更加有利于褐藻寡糖的合成。

表 1 碳源浓度一定的情况下碳氮比对褐藻寡糖合成的影响

Table 1 Effect of carbon nitrogen ratio on alginate oligosaccharides synthesis with certain carbon concentration

C/N	Cell dry weight (g/L)	Alginate oligosaccharides concentration (g/L)
30	2.767	3.923
40	2.362	7.538
50	2.253	7.313
60	2.217	10.774
70	1.924	12.502
80	1.762	14.632

2.2 褐藻寡糖结构鉴定

2.2.1 紫外-可见分光光度法

紫外-可见分光光度分析表明, 提取物的曲线(图 1 曲线 Sample)和 Na 型标准品(图 1 曲线 NaALG)

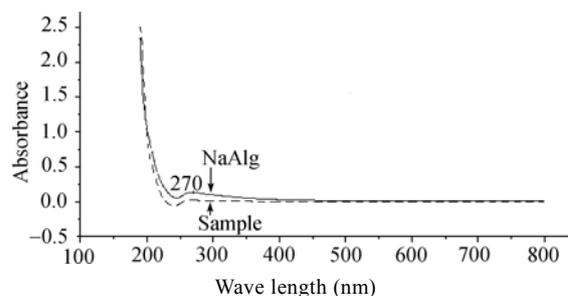


图 1 褐藻寡糖提取物(Sample)和 Na 型褐藻多糖标准品(NaALG)的紫外-可见分光光度分析结果

Fig. 1 Ultraviolet-visible spectrum of the extracted alginate oligosaccharides and the commercialized NaALG.

的吸收曲线吸收峰的位置一致, 表明二者存在结构上的相似性。250 nm~350 nm 内显示中、低强度的吸收, 说明羰基或共轭羰基的存在。

2.2.2 ^1H 核磁共振分析

从图 2 ^1H 核磁共振图谱可以看出, 3.2~4.2 ppm 处为 2 位-4 位次甲基 H 的化学位移, 5.213 ppm 处为还原端 1 位次甲基 H 的化学位移, 4.634 ppm 处为 5 位次甲基 H 的化学位移, 8.460 ppm 处为羧基活泼 H 的化学位移, 0.5~1.9 ppm 处为羟基活泼 H 的化学位移, 2.381 ppm 处为乙酰基的甲基 H 的化学位移。

从图 3 ^{13}C 核磁共振图谱可以看出, 169 ppm 处为 6 位碳的化学位移, 97 ppm 处为中间糖环和非还原端糖环的 1 位碳的化学位移, 72 ppm 处为 2 位和 3 位碳的化学位移, 87 ppm 处有 1 个小峰为 4 位碳的化学位移, 34 ppm 处的小峰为 5 位碳的化学位移, 19 ppm 处为乙酰基的碳的化学位移。由于固体核磁的灵敏度比较低, 所以一些化学位移的峰型不明显, 需要仔细辨认。

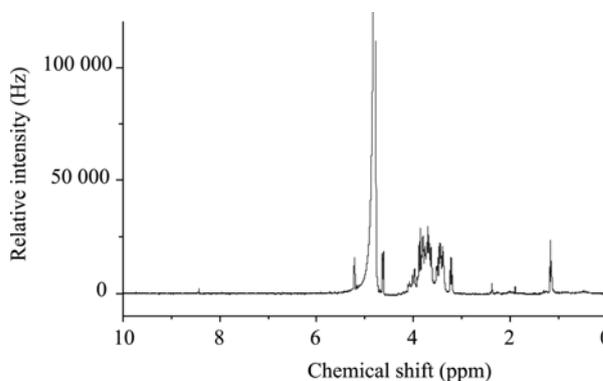


图 2 褐藻寡糖提取物的 ^1H 核磁共振图谱

Fig. 2 ^1H NMR spectrum of the extracted alginate oligosaccharides.

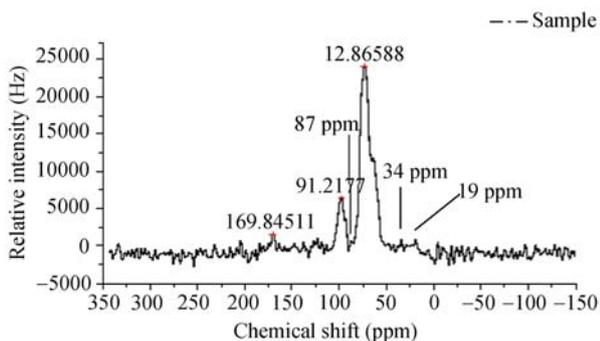


图 3 褐藻寡糖提取物的 ¹³C 核磁共振图谱
Fig. 3 Solid state ¹³C NMR spectrum of the extracted alginic oligosaccharides.

2.2.4 傅立叶红外光谱分析

羟基的吸收处于 3200~3650 cm⁻¹ 范围。当羟基在分子间缔合时, 形成以氢键相连的多聚体, 因而红外吸收位置移向较低波数(3300 cm⁻¹ 附近), 峰形宽而钝。羟基在分子内也可以形成氢键, 仍使羟基红外吸收移向低波数方向。羧酸内由于羰基和羟基的强烈缔合, 吸收峰底部可延续到 2500 cm⁻¹, 形成一个很宽的吸收带, 如图 4 所示, 2492 cm⁻¹ 附近就是该吸收带。C-H 的振动分界线是 3000 cm⁻¹, 饱和碳(除三元环外)的碳氢伸缩振动频率低于 3000 cm⁻¹, 从图 4 可以看出, 2870 cm⁻¹ 处为饱和 C-H 及乙酰基上甲基的 C-H 的位置。醇的 C-O 键伸缩振动吸收 1149 cm⁻¹ 的位置。1774 cm⁻¹ 位置为乙酰基上羰基的吸收峰位置, 其强度不大, 说明乙酰化程度不高。1458 cm⁻¹ 和 1600 cm⁻¹ 这 2 个峰为羧酸盐均化的 2 个峰与乙酰基的羰基相互作用的结果。

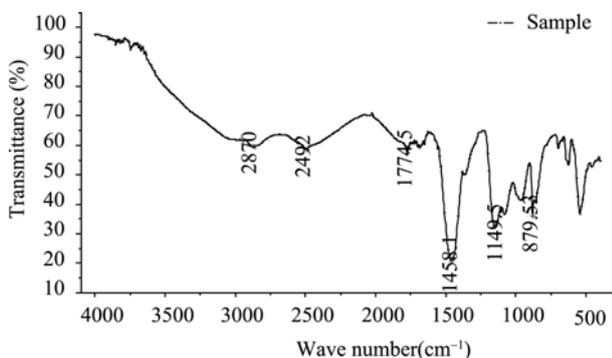


图 4 褐藻寡糖提取物的傅立叶红外光谱图
Fig. 4 FT-IR spectrum of the extracted alginic oligosaccharides.

由图 5 GPC 图谱可以看到, 褐藻寡糖在 GPC 谱

图中出现 2 个峰, 保留时间分别为 20.340 min 和 21.017 min, 这 2 个峰离得太近以至于不能完全分开, 通过标准曲线计算的重均分子量为 2054。

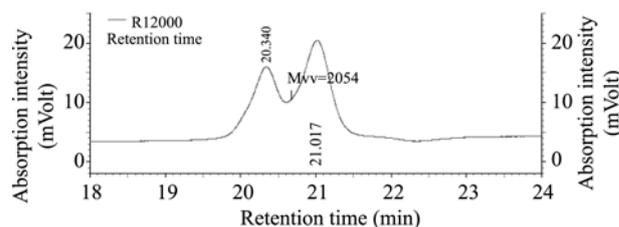


图 5 褐藻寡糖 GPC 测定图谱
Fig. 5 GPC spectrum of the extracted alginic oligosaccharides.

2.3 褐藻寡糖单体结构

综合 2.2 及 2.3 的分析结果及文献报道的情况, 推测褐藻寡糖提取物是由 β-D 甘露糖醛酸、2-乙酰-β-D 甘露糖醛酸、3-乙酰-β-D 甘露糖醛酸、α-L-古洛糖醛酸、2-乙酰-α-L-古洛糖醛酸、3-乙酰-α-L-古洛糖醛酸通过 β-(1→4)/ α-(1→4) 键连接而成的无支化线性寡糖。其 6 种单体结构如图 6 所示。

3 讨论

早在 1987 年就有门多萨假单胞菌合成褐藻多糖的报道^[7], Narbad 等^[8]在 1988 年报道了在铜绿假单胞菌中褐藻多糖的合成途径, 即乙酰辅酶 A 经过 TCA 循环生成丙酮酸, 丙酮酸进入糖异生途径生成 1,6-二磷酸果糖, 然后进入褐藻多糖的合成途径, 在磷酸甘露糖异构酶-GDP 甘露糖焦磷酸化酶 (PMI-GMP) 等一系列酶的催化作用下最后生成褐藻多糖。

聚羟基脂肪酸酯(PHA)是一类微生物在环境营养条件不平衡的条件下, 如碳源过量氮源不足, 积累在体内的能源或碳源颗粒物。据报道已有 300 余种微生物能够积累 PHA^[9]。在假单胞菌中合成中长链 PHA 的途径已经非常清楚^[10], 当以葡萄糖为碳源时是以脂肪酸从头合成途径来合成 PHA, 即葡萄糖经过几步反应后生成乙酰辅酶 A, 乙酰辅酶 A 进入脂肪酸从头合成途径生成 R-3-羟基脂酰 ACP, 再经过 PHA 合成途径的 2 个关键酶 phaG 和 phaC1 的作用合成 PHA。可以看出在假单胞菌中, 褐藻寡糖和中长链 PHA 的合成共同利用乙酰辅酶 A 作为前

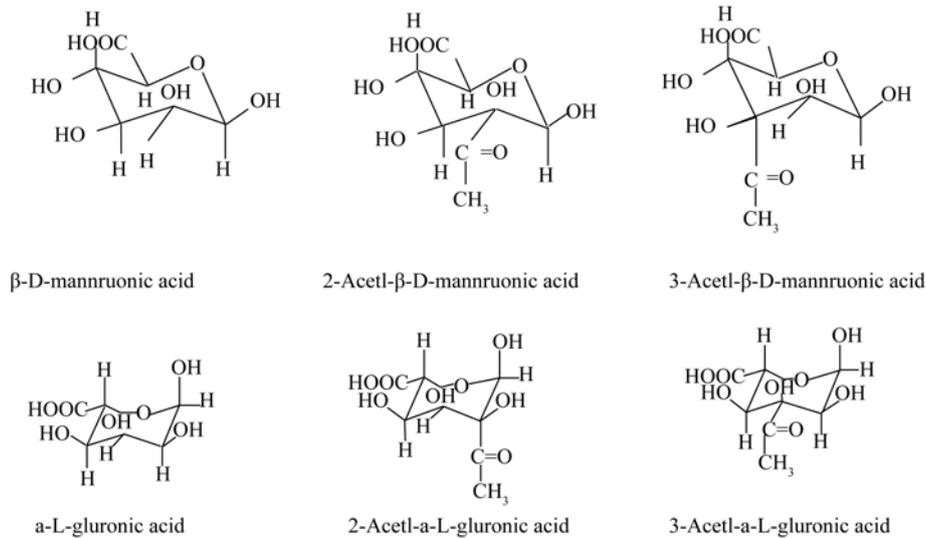


图 6 组成褐藻寡糖的 6 种单体结构

Fig. 6 Six monomers to compose the extracted alginate oligosaccharides.

体。本研究组以前报道了 *Pseudomonas mendocina* NK-01 能够合成由 3-羟基己酸、3-羟基辛酸、3-羟基癸酸、 Δ^7 -3-羟基十六烷酸和 3-羟基十八烷酸 5 种单体构成的 PHA_{MCL}^[11]。本研究表明, *P. mendocina* NK-01 在体内积累 PHA_{MCL} 的同时, 也向胞外分泌褐藻寡糖。本研究合成的褐藻寡糖分子量低, 重均分子量为 2054, 低分子量的寡糖在食品、制药等领域具有广阔的开发前景。由于菌体与发酵液均能分离有用物质, 因此, 采用 *Pseudomonas mendocina* NK-01 发酵法生产褐藻寡糖具有很好的应用前景。研究组正在研究阻断门多萨假单胞菌 NK-01 中 PHA_{MCL} 的合成通路, 使碳源更多地流向褐藻寡糖的合成, 提高褐藻寡糖的积累能力。

REFERENCES

- [1] Sabra W, Zeng AP, Deckwer WD. Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **56**(3/4): 315–325.
- [2] Gorin JPA, Spencer TJF. Exocellular alginic acid from *Azotobacter vinelandii*. *Can J Chem*, 1966, **44**: 993–998.
- [3] Haug A, Lesern B. Uronic acid sequence in alginate from different sources. *Carbohydr Res*, 1971, **32**: 215–217.
- [4] Fujihara M, Nagumo T. The effect of the content of D-mannuronic acid and L-galuronic acid blocks in alginates on antitumor activity. *Carbohydr Res*, 1992, **224**: 343–347.
- [5] Flo TH, Ryan L, Latz E, *et al.* Involvement of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in cell activation by mannuronic acid polymers. *J Biol Chem*, 2002, **277**(38): 35489–35495.
- [6] Muller JM, Alegre RM. Alginate production by *Pseudomonas mendocina* in a stirred draft fermenter. *World J Microbiol Biotechnol*, 2007, **23**(5): 691–695.
- [7] Anderson AJ, Hacking AJ, Dawes EA. Alternative pathways for the biosynthesis of alginate from fructose and glucose in *Pseudomonas mendocina* and *Azotobacter vinelandii*. *J Gen Microbiol*, 1987, **133**(4): 1045–1052.
- [8] Narbad A, Russell NJ, Gacesa P. Radiolabelling patterns in alginate of *Pseudomonas aeruginosa* synthesized from specifically-labelled ¹⁴C-monosaccharide precursors. *Microbios*, 1988, **54**: 171–179.
- [9] Steinbüchel A, Hustede E, Liebergesell M, *et al.* Molecular basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 1992, **9**(2-4): 217–230.
- [10] Timm A, Steinbüchel A. Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) gene locus of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Eur J Biochem*, 1992, **209**(1): 15–30.
- [11] Tao J, Zheng CG, Zhang B, *et al.* Synthesis of medium-chain-length Polyhydroxyalkanoate (PHA_{MCL}) by *Pseudomonas mendocina* NK-01. *Microbiology*, 2008, **35**(5): 782–787.

陶剑, 郑承纲, 张斌, 等. 利用门多萨假单胞菌 NK-01 合成中长链聚羟基脂肪酸酯(PHA_{MCL}). *微生物学通报*, 2008, **35**(5): 782–787.