

三叶草根瘤菌胞外多糖的研究

俞南雄 史志敬 王先极

(中国科学院微生物研究所, 北京)

根瘤菌胞外多糖的研究在国际上有着广泛、持续的兴趣。首先是由于根瘤菌胞外多糖对根瘤菌与它们寄主植物间的专一性起着重要的作用^[1,2]; 根瘤菌的血清学专一性也依赖于它们的多糖; 另外根瘤菌中的许多菌株能产生大量高粘度的或具有某些特殊流变学性能的胞外多糖, 因而在工业上具有潜在的应用可能性。

在研究国内保藏的根瘤菌时发现, 三叶草根瘤菌 (*Rhizobium trifolii*) 1.170 能利用葡萄糖产生大量的高粘度的胞外多糖。本文主要报道该胞外多糖的产生、它的化学组份及其流变学性能等方面的研究结果。

材料和方法

(一) 菌株

三叶草根瘤菌 (*Rhizobium trifolii*) 1.170, 为我所保藏的菌株。

(二) 培养基和培养条件

固体斜面培养基采用普通土豆汁斜面 (葡萄糖 1%) 或甘露醇培养基^[3](%)。甘露醇 1.0, 酵母膏 0.1, K_2HPO_4 0.05, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.025,

$NaCl$ 0.01, 琼脂 1.5。生产多糖培养基(%): 葡萄糖 4.0, $(NH_4)_2HPO_4$ 0.5, KH_2PO_4 0.1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05, $NaCl$, $CaCl_2$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 各 0.001, $CaCO_3$ 0.5, 酵母膏 0.1, pH7.0。250ml 三角瓶装 50ml 培养基。8 磅高压蒸汽灭菌 30 分钟。

培养物置 200 r/min 旋转式摇床上 (30℃) 培养 4 天, 用于多糖的提取。

(三) 多糖的提取

发酵液用 4 体积水稀释, 于 $15,000 \times g$ 下离心 40 分钟以除去细胞及 $CaCO_3$ 。于上清液中加入 1% $NaCl$ 及 2 体积乙醇沉淀多糖, 沉淀物复用乙醇洗涤数次、干燥后称重。用于化学分析的样品经酸化、蒸馏水透析后冷冻干燥。细胞及 $CaCO_3$ 的离心沉淀分别用稀盐酸及生理盐水洗涤, 离心空干后称湿重。

(四) 分析方法

纸层析采用新华 1 号滤纸。展开剂: 正丁醇: 吡啶: 水 (6:4:3, V/V), 二次展开。显色剂: 碱性硝酸银溶液^[3]。气液色谱采用上海分析仪器厂的 103 型气相色谱仪。不锈钢柱 $2M \times 2mm$, 固定液: ECNSS-M 3%, 载体: Chro-

mosorb. W AW DMCS 60/80 目。层析柱温 190℃。

糖醛酸的测定用吡唑法^[4], 丙酮酸用 2,4-二硝基苯肼法^[5]测定。

红外光谱分析用 DC-701G 红外分光光度计。

粘度用 RV-2 旋转粘度计在 45℃ 下测定。

结果和讨论

(一) 多糖的产生及发酵液的流变学性能

采用产多糖的培养基, 三叶草根瘤菌 1.170 产生大量的高粘度的胞外多糖。典型的发酵过程示于图 1。经 12 小时培养后, 发酵液的粘度迅速增加, 在发酵 48 小时其粘度接近 40,000 厘泊 (45℃, 剪切速率 s^{-1})。发酵终了时培养液中多糖含量达 24g/l。发酵液的流变学性能

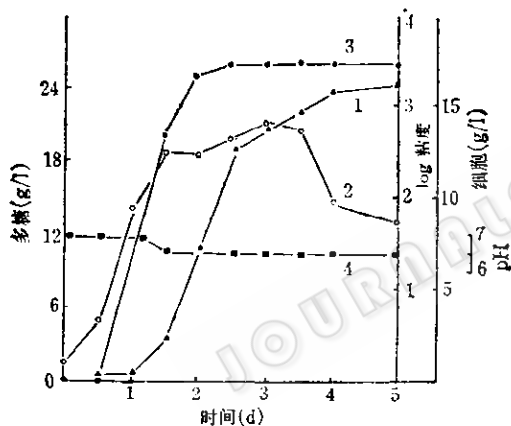


图 1 *R. trifolii* 1.170 发酵产生胞外多糖动态

1. 胞外多糖; 2. 细胞(湿重);
3. 粘度, 剪切速率 ($9.0s^{-1}$); 4. pH

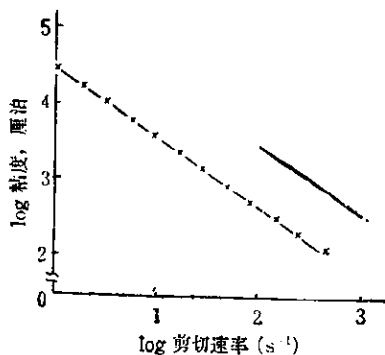


图 2 发酵液的流变学性能

示于图 2, 它们呈现与黄单胞菌多糖 KELZAN (KELCO Co.) 相似的流变学性能。

(二) 提取多糖的流变学性能

研究了提取多糖 (PS1.170) 的不同浓度与粘度的关系。如图 3 所示, PS1.170 与黄单胞菌多糖 KELZAN 一样, 在低浓度时能产生很高的粘度, 并呈现出相似的浓度-粘度依赖关系。图 4 表明了该多糖的稠度和剪切稀化性能均与 KELZAN 相仿。

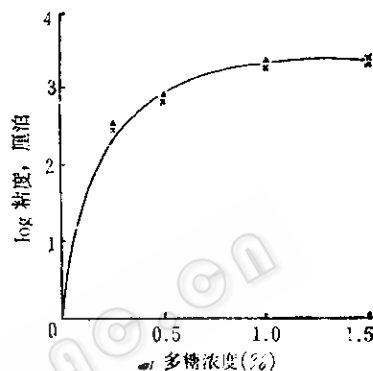


图 3 多糖的浓度对粘度的影响

▲: PS1.170; X: Kelzan

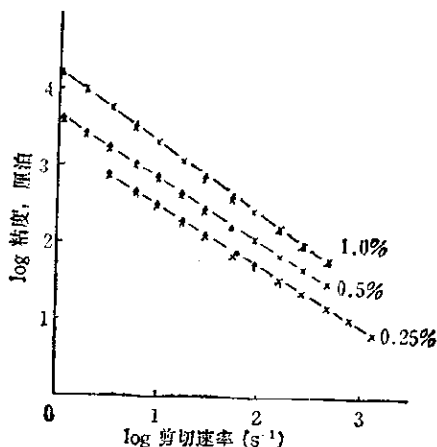


图 4 剪切速率对 PS 1.170 胞外多糖粘度的影响

▲: PS1.170; X: KELZAN(Kelco Co. U. S. A.)

(三) 多糖的组份分析

多糖水解液的纸层析(图 5)表明, 该多糖含有 D-葡萄糖、D-半乳糖和 D-葡萄糖醛酸, 其中葡萄糖醛酸内酯的斑点为浓缩时由葡萄糖醛酸生成。水解后生成的单糖经乙酰化后的

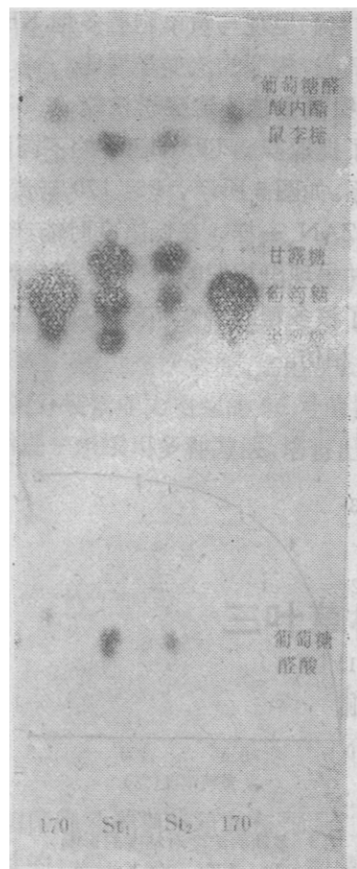


图5 多糖 PS1.170 水解液及标样 St₁ 和 St₂ 的纸层析图谱

气-液色谱分析(图6)表明, D-葡萄糖与 D-半乳糖的相对含量为 5.9:1.0。用呋唑法测得 D-葡萄糖醛酸的含量为 16.4%。用 2,4-二硝基苯肼法测得丙酮酸含量为 9.8%。因此, D-葡萄糖、D-半乳糖、D-葡萄糖醛酸和丙酮酸的克分子比为 5.9:1.0:1.2:2.0。

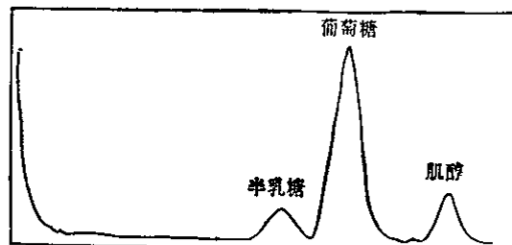


图6 三叶草根瘤菌多糖 PS1.170 的乙酰化单糖的气-液色谱图
单糖以其乙酰化糖醇的形式于 3% ECNSS-M 柱(载体 chromosorb. W AW DMCS. 60/80 目)于 190℃ 分离检出

(四) 红外光谱分析

多糖 PS1.170 的红外光谱分析(图7)表明, 该多糖于 3400cm^{-1} 、 2940cm^{-1} 、 1720cm^{-1} 和 1610cm^{-1} 处有特征性的吸收。

三叶草根瘤菌 1.170 在本试验所采用的条件下利用葡萄糖产生大量的胞外多糖, 最高达

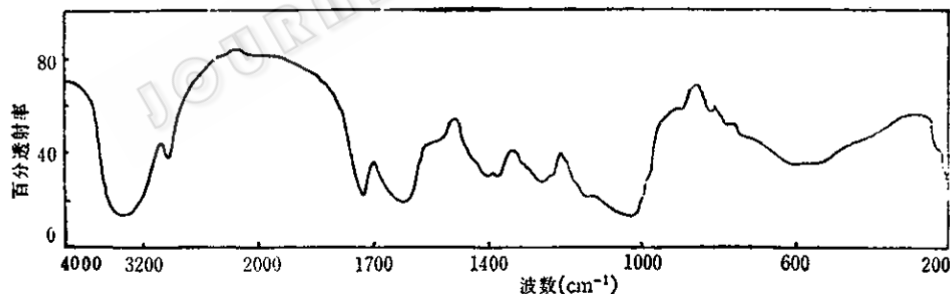


图7 三叶草根瘤菌多糖 PS1.170 的红外光谱图

24g/l, 并呈现与黄单胞菌多糖 KELZAN 相似的流变学性能。其单糖组成亦与国际上报道的三叶草根瘤菌多糖大体相似^[6]。

参 考 文 献

[1] Ljunggren, H. and Fahraeus, G.: *Nature*, 184: 1578, 1959.

[2] Ljunggren, H. and Fahraeus, G.: *J. Gen. Microbiol.*, 26: 521, 1969.
[3] Trevelyan, W. E. et al.: *Nature*, 166: 444, 1950.
[4] Bitter, T. and Muir, H. M.: *Anal. Biochem.*, 4: 330, 1962.
[5] Sloneker, J. H. and Orentas, D. C.: *Nature*, 194: 478, 1962.
[6] Ghai, S. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 122: 33, 1981.