文章编号：1009－038X(2003)04－0007－07

新型蛋白聚糖类生物絮凝剂 REA-11 的合成途径

关惠琴[1]， 李 寅[1,2]， 何 宁[1]， 堵国成[1]， 陈 坚[1,2]
(1. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214036；2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214036)

摘 要：谷氨酸棒杆菌 CCTCC M201005 能合成一种以半乳糖醛酸为主要结构单元的蛋白聚糖类生物絮凝剂(命名为 REA-11)．为了研究该聚合物的生物合成途径，首先构建了谷氨酸棒杆菌生物合成 REA-11 的假设途径，然后从(1)中间代谢产物的添加及相关途径关键酶活性的检测和(2)胞内中间代谢产物的检测两个方面来验证该代谢途径的合理性．研究表明，在培养基中添加代谢途径的中间产物 UDP-葡萄糖，可显著提高 REA-11 的絮凝活性，并且 UDP-半乳糖差向酶和 UDP-半乳糖脱氢酶的比酶活也分别提高了 200％和 50％；以不同底物为碳源，UDP-葡萄糖焦磷酸化酶、UDP-半乳糖差向酶和 UDP-半乳糖脱氢酶的比酶活与 REA-11 产量的相关系数可分别达到 0.75，0.89，0.97．此外，利用 HPLC 检测出 REA-11 合成途径中 3 种关键中间产物 UDP-葡萄糖、UDP-半乳糖和 UDP-葡萄糖醛酸．由此证明，所构建的 REA-11 生物合成途径基本合理．

关键词：谷氨酸棒杆菌；生物絮凝剂；半乳糖醛酸；蛋白聚糖；代谢途径
中图分类号：Q 935　　**文献标识码**：A

Biosynthetic Pathway of a Novel Bioflocculant Consisting of Galacturonic Acid as the Functional Structural Unit Produced by *Corynebacterium glutamicum*

GUAN Hui-qin[1]， LI Yin[1,2]， HE Ning[1]， DU Guo-cheng[1]， CHEN Jian[1,2]
(1. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: *Corynebacterium glutamicum* CCTCC M201005 produces a novel polysaccharide-protein bioflocculant REA-11 consisting of galacturonic acid as the main structure unit. A hypothetical biosynthetic pathway of REA-11in *C. glutamicum* CCTCC M201005 was therefore proposed. The rationality of the biosynthetic pathway was demonstrated by (1) analyzing the response upon addition of UDP-glucose to the culture medium; (2) correlating the activities of several key enzymes involved in the pathway with the yields of poly-galacturonic acid; and (3) detecting the existence of several key intermediates in the pathway. It was shown that poly-galacturonic acid production, UDP-galactose epimerase activity, and UDP-galactose dehydrogenase activity were improved 24％, 200％, and 50％, respectively, upon UDP-glucose addition. In addition, it was found the activities of UDP-glucose pyrophosphorylase ($R^2 = 0.97$), UDP-galactose epimerase ($R^2 = 0.75$) and UDP-galactose

收稿日期：2003－02－24； 修回日期：2003－03－24．
基金项目：国家自然科学基金项目(20176042)资助课题．
作者简介：方数惠琴(1975－)，女，山西临汾人，环境工程硕士研究生．

dehydrogenase ($R^2 = 0.89$) were well correlated with the yields of poly-galacturonic acid when different sugars were used as a sole carbon source. Furthermore, the key intermediates in the hypothetical biosynthetic pathway, such as UDP-glucose, UDP-galactose and UDP-glucuronic acid, were detected in the cell-free extract.

Key words: *Corynebacterium glutamicum*; bioflocculant; galacturonic acid; polysaccharide-protein; biosynthetic pathway

微生物絮凝剂作为一种安全、高效且能自然降解的新型水处理剂,在污水处理工业、发酵液的下游处理以及食品工业中大分子物质的分离等方面有着广泛的应用前景[1].与化学合成絮凝剂相比,生物絮凝剂目前的主要问题是生产成本较高,进而限制了它在实际中的推广应用[2].因此,如何提高生物絮凝剂的产量并有效降低生产成本,已成为该领域的一个研究重点.为了实现这一目标,国内外学者广泛研究了生物絮凝剂产生菌的选育、发酵条件优化、分离纯化及结构鉴定[3],但在生物絮凝剂的代谢途径和机制方面尚无文献报道.

在前期工作中,作者从土壤中筛选得到一株谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*),发现该菌株具有向胞外分泌大量生物絮凝剂的能力,经GC-MS检测分析,确定该絮凝物质是一种以半乳糖醛酸为主要结构单元的蛋白聚糖类生物絮凝剂,命名为REA-11[4].虽然聚糖类生物絮凝剂在国际上已有多篇报道,如*Aspergillus sojae*分泌的以半乳糖胺为主的氨基糖和蛋白质的复合体[5];*Cyanobacterium phrmidium*产生的杂多糖[6](主要成分为糖醛酸、鼠李糖、甘露糖及半乳糖);*Alcaligenes cupidus*合成的由葡萄糖、半乳糖、葡萄糖醛酸组成的杂多糖[7],以及*Paecilomyces sp*.产生的由氨基半乳糖组成的粘多糖[8],但以半乳糖醛酸为主要结构单元的生物絮凝剂在国际上尚属首次发现[4].REA-11分子组成的定性鉴定为研究其代谢途径奠定了基础.然而,半乳糖醛酸作为微生物代谢产物,其合成机制尚不清楚.为使研究问题简化,作者首先根据植物细胞内糖醛酸的代谢途径[9]和Leloir途径[10]提出了*C. glutamicum* CCTCC M201005合成REA-11的可能代谢途径,然后通过检测中间代谢产物和研究代谢途径关键酶活性的变化,证明了作者所构建的REA-11生物合成途径基本合理.

1 材料与方法

1.1 菌种和培养基

1.1.1 菌种 *Corynebacterium glutamicum* CCTCC M201005,由作者筛选获得,现保藏于武汉中国典型培养物保藏中心.

1.1.2 培养基 见文献[4].

1.2 仪器和试剂

1.2.1 仪器 Waters 600高效液相色谱仪:惠普公司生产,包括600四元泵系统,2487双通道紫外检测器,M32色谱工作站,7725i进样器. RE-52CS旋转蒸发器:上海本波仪器有限公司产品;VCX400超声波仪:sonics δ materials. inc kenosia AVE DNN BURY CT USA;CF7D-2l冷冻高速离心机:日本日立公司生产.

1.2.2 试剂 UDP-葡萄糖,UDP-半乳糖,UDP-葡萄糖醛酸,UDP-葡萄糖脱氢酶,NAD标准品:SIGMA公司产品.乙腈(色谱纯):江苏汉邦科技有限公司产品;水(超纯级):无锡华晶微电子公司产品.其它试剂均为分析纯.

1.3 培养方法

1.3.1 种子培养、摇瓶培养方法 见文献[4].

1.3.2 小罐分批培养方法 以体积分数5%的接种量将种子培养液接入发酵培养基中,5 L发酵罐(韩国发酵公司生产,KF-5 L)装液量3 L,通气量1 L/min,发酵温度28℃,溶氧在线控制.搅拌转速均为100 r/min. 发酵过程的溶氧通过改变通气量和搅拌转速控制在一定的水平.

1.4 测定方法

1.4.1 絮凝活性测定方法 见文献[2].取40 mL 1 g/dL高岭土溶液加至50 mL刻度试管中,然后依次加入2.5 mL 1 g/dL的$CaCl_2$溶液和1 mL待测样品,蒸馏水加至满刻度,充分混合后,迅速置于比色杯中,静止5 min后,于550 nm处测定吸光度.以空白培养基代替待测样品做对照.絮凝活性以絮凝率表示.

$$\text{絮凝率} = [(B - A)/B] \times 100 \times D$$

式中,A:待测样品的OD_{550}值;B:空白培养基的OD_{550}值;D:菌株发酵液稀释倍数.

1.4.2 聚半乳糖醛酸含量测定 见文献[11].取新鲜发酵液50 mL,4 ℃,6 000 r/min离心15 min,去

万方数据

除菌体,将上清液加入透析袋(MD-25-7000),用蒸馏水在 4℃ 透析 24 h,目的是去除小分子物质如发酵液中的半乳糖醛酸及葡萄糖醛酸等;收集上清液,然后用硫酸咔唑法测定.

1.4.3　UDP-半乳糖差向酶活性测定　见文献[12].

1.4.4　UDP-葡萄糖脱氢酶和 UDP-半乳糖脱氢酶活性测定　见文献[13].

1.4.5　UDP-葡萄糖焦磷酸化酶活性测定　见文献[14].

1.4.6　蛋白质测定　见文献[15].

1.5　UDP-葡萄糖和 UDP-半乳糖的测定

采用 HPLC 进行.色谱条件:Agilent ZORBAX 氨基分离柱(250 mm×4.6 mm),粒径 5 μm;保护柱,氨丙基保护柱(30 mm×4.6 mm);流动相:0.125 mol/L KH_2PO_4,含体积分数 60% 乙腈,pH 值 3.6;体积流量:1 mL/min;检测波长:262 nm;检测器:Water™ 2487;进样体积 10 μL;柱温 30 ℃.

1.6　UDP-葡萄糖醛酸的测定

采用 HPLC 进行.分离柱:Zorbar SAX(250 mm×4.6 mm);缓冲液:0.125 mol/L KH_2PO_4;体积流量:1 mL/min;检测波长:262 nm;检测器:Water™ 2487;进样体积 10 μL;柱温 30 ℃.

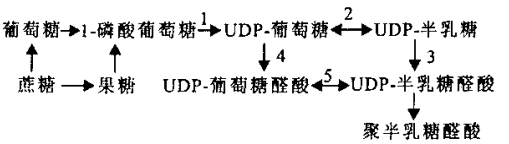
1.7　无细胞液的制备

将培养 30 h 的新鲜发酵液 400 mL,4 ℃,6 000 r/min 离心 15 min,弃去上清液,用蒸馏水洗涤细胞 3 次,称重;将细胞重悬浮在 0.05 mol/L, pH 值 7.5 的冰浴的 Tris-HCl 缓冲液中,使湿菌体质量分数约 10%;冻融法处理 6 次后,用超声波破碎(冰浴),输出功率为 400 W,工作 3 s 停 2 s,总时间为 15 min;破碎的细胞液在 4 ℃ 下,10 000 r/min 离心 10 min,去除细胞碎片与未破碎细胞;取 10 mL 无细胞上清液用于酶活检测;在冰浴的情况下,向剩余上清液(约 40 mL)中缓慢加入 3 倍体积分数 95% 的乙醇,边加边轻轻搅拌,约 30 min;然后在 4 ℃,10 000 r/min离心 10 min,去除蛋白质和多糖等大分子物质;55 ℃ 真空旋转蒸发使终体积为 40 mL,0.22 μm 膜过滤,用于 HPLC 检测.

2　试验结果

2.1　*C. glutamicum* CCTCC M201005 中生物絮凝剂 REA-11 合成途径

在对 REA-11 分子[4]组成了解的基础上,结合 Hall 等人提出的植物细胞内糖醛酸代谢途径[9]和 Leloir 途径[10],作者构建了 *C. glutamicum* CCTCC M201005 以蔗糖为惟一碳源合成生物絮凝剂 REA-11 的代谢途径(见图 1).



1. UDP-葡萄糖焦磷酸化酶;2. UDP-半乳糖差向酶;3. UDP-半乳糖脱氢酶;4. UDP-葡萄糖脱氢酶;5. UDP-葡萄糖醛酸差向酶

图 1　生物絮凝剂 REA-11 的假设合成途径

Fig.1　The proposed biosynthesis pathway of REA-11 in *C. glutamicum* CCTCC M201005

2.2　从酶和底物两方面初步探测 REA-11 的代谢过程

2.2.1　前体代谢物的添加与生物絮凝剂的合成

从作者构建的 REA-11 合成途径可以看出:UDP-葡萄糖到 REA-11 的合成过程为该代谢途径的关键部分,因此,中间代谢产物 UDP-葡萄糖的添加与目的产物是否直接相关决定着该代谢途径的合理与否.另外,REA-11 是由 UDP-半乳糖醛酸聚合而成,还是由半乳糖醛酸直接聚合而成,都直接关系着该途径的合理与否.因此作者首先在 *Corynebacterium glutamicum* CCTCC M201005 培养过程中添加 UDP-葡萄糖和半乳糖醛酸,跟踪检测目的产物 REA-11 的合成情况,以期发现 UDP-葡萄糖、半乳糖醛酸与生物絮凝剂 REA-11 合成途径的关系.实验结果见图 2.

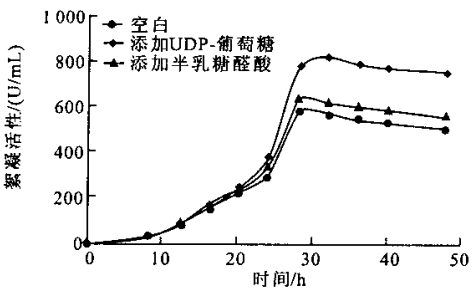


图 2　UDP-葡萄糖和半乳糖醛酸的添加对 *C. glutamicum* CCTCC M201005 合成 REA-11 的影响

Fig.2　Effect of the addition of UDP-glucose and galacturonic acid on the production of REA-11

由图 2 可见,在发酵前 22 h 时,絮凝活性的变化比较缓慢,且 UDP-葡萄糖的添加对絮凝活性的影响也较小,22 h 后,絮凝活性发生大幅度增加,UDP-葡萄糖的添加使 REA-11 的絮凝活性在发酵 32 h 时达到最高,比对照最高值提高了 24%.通过对 REA-11 合成过程中的几种关键酶酶活的测定发

万方数据

现,在发酵 32 h 时,UDP-半乳糖差向酶和 UDP-半乳糖脱氢酶的比酶活与对照相比分别提高了 200% 和 50%,UDP-葡萄糖脱氢酶的比酶活也有所增加. 以上现象说明,UDP-葡萄糖是谷氨酸棒杆菌在本条件下合成的生物絮凝剂 REA-11 的前体代谢物. 与 UDP-葡萄糖的添加效果不同,半乳糖醛酸的添加对生物絮凝剂 REA-11 的合成影响不大,表明 REA-11 并非由半乳糖醛酸直接聚合而来.

2.2.2 代谢途径关键酶活性与生物絮凝剂 REA-11 的合成 为了从酶水平上考察 REA-11 生物合成途径是否成立,作者对糖酵解途径(EMP)中的 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶和 Leloir 途径中的 UDP-半乳糖差向酶、UDP-葡萄糖脱氢酶及 UDP-半乳糖脱氢酶进行跟踪测定. 同时还将比酶活与聚半乳糖醛酸的产量进行相关性分析,结果见图 3~6,表 1,2.

结果表明,以不同的底物为碳源,UDP-葡萄糖焦磷酸化酶比酶活都与聚半乳糖醛酸的产量相偶联,相关系数 R^2 达到 0.75. UDP-半乳糖差向酶和 UDP-半乳糖脱氢酶比酶活也表现出相同的趋势,二者的相关系数分别为 0.89 和 0.97. 但 UDP-葡萄糖脱氢酶比酶活与聚半乳糖醛酸产量的相关系数小于 0.5.

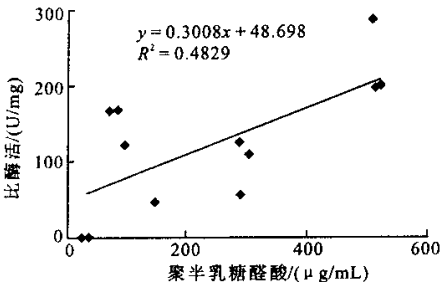


图 3 UDP-葡萄糖脱氢酶与聚半乳糖醛酸合成的相关性

Fig. 3 UDP-glucose dehydrogenase activities and poly-galacturonic acid yields

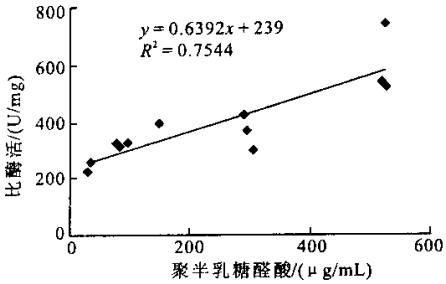


图 4 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶活性与聚半乳糖醛酸合成的相关性

Fig. 4 Relationship between UDP-glucose pyrophosphorylase activities and poly-galacturonic acid yields

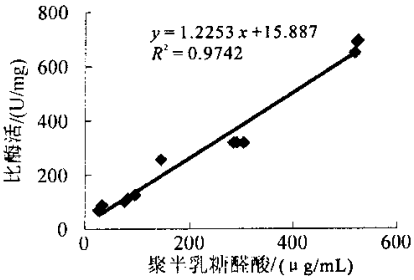


图 5 UDP-半乳糖脱氢酶与聚半乳糖醛酸合成的相关性

Fig. 5 UDP-galactose pyrophosphorylase activities and poly-galacturonic acid yields

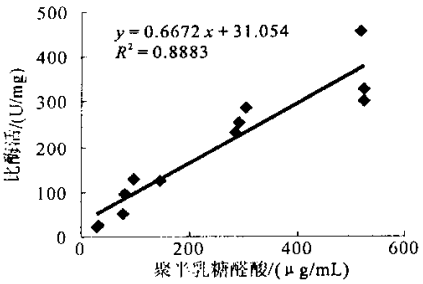


图 6 UDP-半乳糖差向酶与聚半乳糖醛酸合成的相关性

Fig. 6 UDP-galactose epimerase activities and poly-galacturonic acid yields

表 1 *C. glutamicum* CCTCC M201005 以不同底物发酵过程中不同阶段的聚半乳糖醛酸

Tab. 1 Poly-galacturonic acid produced by *C. glutamicum* CCTCC M201005

碳源	以下列底物为碳源时聚半乳糖醛酸质量浓度/(μg/mL)											
	蔗糖			葡萄糖			果糖			半乳糖		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
聚半乳糖醛酸	32.5	284	522	82	302	516	76	290	523	28	96	146

注 在 5 L 罐发酵过程中,分别在延滞期 1、指数期 2、稳定期 3 各点取样 3 次,求平均值.

万方数据

表 2　*C. glutamicum* CCTCC M201005 胞内 EMP 和 Leloir 途径中相关酶活的检测

Tab.2　Specific activities of enzymes involved in the proposed REA-11 biosynthetic pathway

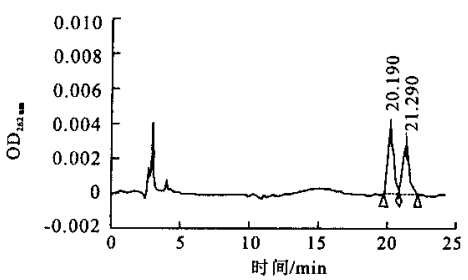
酶	以下列底物为碳源时不同发酵阶段的平均比酶活/(U/mg)											
	蔗糖			葡萄糖			果糖			半乳糖		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
UDP-葡萄糖焦磷酸化酶	256	428	520	310	305	538	320	366	730	222	336	389
UDP-半乳糖差向酶	26	232	326	96	287	456	52	252	301	22	130	126
UDP-葡萄糖脱氢酶	0	126	269	168	108	196	166	56	201	0	120	46
UDP-半乳糖脱氢酶	86	321	686	115	320	653	102	318	696	66	123	255

注 在 5 L 罐发酵过程中,分别在延滞期 1、指数期 2、稳定期 3 各取样 3 次,求平均值.

2.3　胞内关键中间代谢产物的检测

2.3.1　UDP-葡萄糖和 UDP-半乳糖的检测　上述实验从酶的角度初步断定该代谢途径存在的可能性.为了进一步验证该途径的合理性,作者用 HPLC 对 REA-11 途径中上述关键酶的催化产物进行检测.

在 REA-11 合成途径中,UDP-葡萄糖与 UDP-半乳糖为同分异构体,其惟一区别仅为第 4 位羟基位置的不同.尽管许多学者对细胞内这两种物质的分离进行了研究[16],但分离效果均不理想.作者在前人研究的基础上,在 HPLC 上经过尝试不同的分离柱(糖柱、氨基柱和离子交换柱)和不同的缓冲液,最后确定了最佳分离条件(见材料与方法).在此条件下,UDP-葡萄糖和 UDP-半乳糖可被有效分离,见图 7.

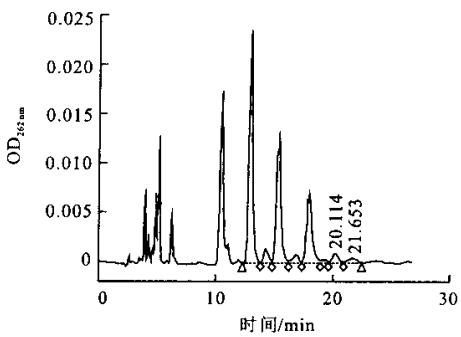


20.190 min,21.290 min 峰分别为混合标样中 UDP-葡萄糖峰和 UDP-半乳糖

图 7　UDP-葡萄糖与 UDP-半乳糖混合标样的 HPLC 图

Fig.7　Separation of a standard samples mixture of UDP-glucose and UDP-galactose on Agilent ZORBAX NH_2 column

从图 8 可看出,*C. glutamicum* CCTCC M201005 胞内的 UDP-葡萄糖与 UDP-半乳糖与标样完全重合,且完全分开.内标法得到同样结果(图谱未给出).由此证明了胞内 UDP-葡萄糖和 UDP-半乳糖的存在.



20.114 min,21.653 min 分别为无细胞提取液中 UDP-葡萄糖和 UDP-半乳糖

图 8　*C. glutamicum* CCTCC M201005 无细胞提取液的 HPLC 图谱(氨基柱)

Fig.8　Detection of UDP-glucose and UDP-galactose in cell free extracts on Agilent ZORBAX NH_2 column

2.3.2　UDP-葡萄糖醛酸的检测　检测方法见文献[17~21].由于 UDP-葡萄糖醛酸在氨基柱上的出峰时间较晚,基线漂移比较明显(图未给出);反相键合柱亦无法有效分离 UDP-葡萄糖、UDP-半乳糖和 UDP-葡萄糖醛酸.经反复试验,发现阴离子交换柱对 UDP-葡萄糖醛酸的分离效果较好,并在无细胞提取液中检测出 UDP-葡萄糖醛酸的存在,结果见图 9,10.但是在该分离条件下,UDP-葡萄糖与 UDP-半乳糖不能被有效分离(见图 9).

3　讨　论

为了从根本上提高生物絮凝剂的产量,作者在确定了 REA-11 分子组成的基础上,提出了 REA-11 的生物合成途径假说,然后试图通过检测中间代谢产物和研究代谢途径关键酶活性的变化,来证明所

万方数据

构建的 REA-11 生物合成途径的合理性.

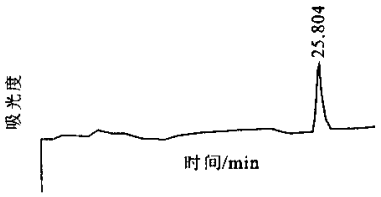


图 9 UDP-葡萄糖醛酸标样的 HPCL 图谱

Fig. 9 Standard sample of UDP-glucturonic acid on Zorbar SAX column

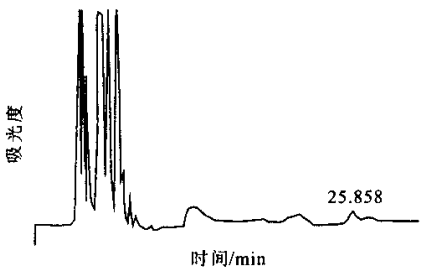


图 10 *C. glutamicum* CCTCC M201005 无细胞提取液的 HPLC 图谱(离子交换柱)

Fig. 10 Detection of UDP-glucturonic acid in cell extraction on Zorbar SAX column

在发酵培养基中添加 UDP-葡萄糖(见图 2),不仅证明 UDP-葡萄糖是生物絮凝剂 REA-11 合成的前体代谢物,同时表明 UDP-半乳糖差向酶和 UDP-半乳糖脱氢酶在 REA-11 合成途径中起重要作用. 但是,半乳糖醛酸的添加对生物絮凝剂 REA-11 的合成影响不大. 这可能是由于 *C. glutamicum* CCTCC M201005 胞内的酶系不能将半乳糖醛酸单体分子直接聚合成具有絮凝活性的半乳糖醛酸聚合体,而必须首先转化为 UDP-半乳糖醛酸分子的形式,才能在聚合酶的作用下聚合成半乳糖醛酸聚合体. 这个推测符合 Sutherland 的结论[22],即微生物胞外多糖(EPS)是 UDP-葡萄糖、UDP-半乳糖、UDP-木糖等的活体形式聚合而成的,而这些糖是在差向酶、脱羧酶和脱氢酶的作用下经过一系列的生物合成反应得来的. 由于生物絮凝剂 REA-11 也是一种微生物多糖,参照黄原胶的生物合成途径[23],作者认为,在 REA-11 的生物合成中,胞内 UDP-半乳糖醛酸是在糖基转移酶的作用下连接在细菌萜醇(bactoprenol-p)上,生成 bactoprenol-p-p-UDP-GalA,进而生成 bactoprenol-p-p-[UDP-GalA-GalA...]$_n$,然后在聚合酶的作用下生成 bactoprenol-p-p-[UDP-GalA-GalA...]$_{n+1}$,一起转移到胞外,bactoprenol-p-p-从正在生长的 bactoprenol-p-p-[UDP-GalA-GalA...]$_{n+1}$链上脱落下来,水解成 bactoprenol-p,为下一步的聚合提供能量.

对 EMP 途径中 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶和 Leloir 途径中 UDP-半乳糖差向酶、UDP-葡萄糖脱氢酶和 UDP-半乳糖脱氢酶在发酵过程中活性变化的研究表明(表 1,2,图 3~6),UDP-葡萄糖焦磷酸化酶、UDP-半乳糖差向酶和 UDP-半乳糖脱氢酶在整个代谢过程中一直保持较高的活性,且三者的比酶活都与聚半乳糖醛酸的产量相偶联,表明这 3 种酶存在于 REA-11 合成途径中,类似的研究结果也发现在 *Streptococcus thermophilus* LY03 合成胞外多糖的途径中[24,25]. 尽管,UDP-葡萄糖脱氢酶在以蔗糖、果糖、葡萄糖为惟一碳源的发酵过程中,也存在较高的比酶活,但与聚半乳糖醛酸的合成相关性却比较小,说明该酶可能在 REA-11 的合成中不占重要地位.

无细胞提取液的 HPLC 分离图谱(图 7~10)不仅证明了预期代谢中间产物 UDP-葡萄糖、UDP-半乳糖的存在,还检测出 UDP-葡萄糖醛酸的存在,说明在 REA-11 的合成途径中,中间产物 UDP-葡萄糖的流向一部分经过 UDP-半乳糖转化成 UDP-半乳糖醛酸,另一部分则在 UDP-葡萄糖脱氢酶的作用下转化成 UDP-葡萄糖醛酸.

综合以上研究结果可以认为,在 *C. glutamicum* CCTCC M201005 的代谢过程中,流向产物的代谢流的主要历程是从 1-磷酸葡萄糖开始,首先在 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶的催化下转化为 UDP-葡萄糖,后者在 UDP-半乳糖差向酶的作用下继续转化为 UDP-半乳糖,UDP-半乳糖再经 UDP-半乳糖脱氢酶还原为产物合成的前体物质 UDP-半乳糖醛酸,最后聚合成半乳糖醛酸多聚体;同时有一部分 UDP-葡萄糖经 UDP-葡萄糖脱氢酶催化转化成 UDP-葡萄糖醛酸,再在 UDP-葡萄糖醛酸差向酶的作用下转化为 UDP-半乳糖醛酸,最后聚合成半乳糖醛酸多聚体. 当然,鉴于微生物体内代谢过程的复杂性,所构建的 REA-11 生物合成途径还需用同位素示踪检测的方法进一步确证. 此外,UDP-半乳糖醛酸如何形成最后的半乳糖醛酸多聚体并分泌至胞外,有待更深入地研究才能揭示.

万方数据

参考文献：

[1] Kurane R, Toeda K, Takena K, *et al*. Culture conditions for production of microbial flocculant by *Rhodococcus erythropolis* [J]. **Agric Bio Chem**, 1986, 50(9): 2309－2313.

[2] Kurane R, Hatamochi K, Kakuno T, *et al*. Production of a bioflocculant by *Rhodococcus erythropolis* S-1 grown on alcohols [J]. **Biosci Biotechnol Biochem**, 1994, 58: 428－429.

[3] Salehizadeh H, Shojaosadati S A. Extracellular biopolymeric flocculants: recent trends and biotechnological importance[J]. **Biotechnol Adv**, 2001, 19: 371－385.

[4] He N, Li Y, Chen J, *et al*. Identification of a novel bioflocculant from a newly isolated *Corynebacterium glutamicum* [J]. **Biochem Eng J**, 2002, 11: 137－148.

[5] Nakamura J, Miyashiro S, Hirose Y. Purification and chemical analysis of microbial cell flocculant production by *Aspergillus sojae* AJ7002[J]. **Agric Biol Chem**, 1976, 40(3): 609－624.

[6] Levy N, Baror Y, Magdassi S. Flocculation of bentonite paricles by a *Cyanobacterial* bioflocculant[J]. **Colloids and Surfaces**, 1990, 48: 337－349.

[7] Toeda K, Kurane R. Microbial flocculant from *Alcaligenes cupidus* KT201[J]. **Agric Biol Chem**, 1991, 55: 2793－2799.

[8] Takagi H, Kadowaki K. Purification and chemical properties of a flocculant produced by *Paecilomyces*[J]. **Agric Biol Chem**, 1985, 49(11): 3159－3164.

[9] Mcgarry A, Gahan P B. A quantitative cytochemical study of UDP-D-glucose: NAD-oxidoreductase (E.C.1.1.1.22) activity during stellar differentiation in Pisum sativum L Cv Meter[J]. **Histochemistry**, 1985, 83: 551－554.

[10] Escalante A, Wacher R C, Garcoa G M, *et al*. Enzymes involved in carbohydrate metabolism and their role on exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*[J]. **Journal of Applied Microbiology**, 1998, 84: 108－114.

[11] Dische Z. A new specific color reaction of hexuronic acid[J]. **J Biol Chem**, 1947, 167: 189－198.

[12] Elizabeth S M, Kiyoshi K, Herman M K. Enzymes of the leloir pathway[A]. Colowick SP, Kaplan NO. Methods in Enzymology, Vol. V[C]. New York and London: Academic Press, 1962. 178－179.

[13] Zalitis J, Uram M, Marie A, *et al*. UDP-glucose dehydrogenase from beef live[A]. Ginsburg Methods in Enzymology, Vol. XXVIII: Complex Carbohydrates, Part B[C]. New York and London: Academic Press, 1972. 430－431.

[14] Grobben G J, Smith M R, Sikkema J, *et al*. Influence of fructose and glucose on the production of xopolysaccharides and the activities of enzymes involved in the sugar metabolism and the synthesis of sugar mucletides in *Lactobacillus delbrueckii* sub *Bulgaricus* NCFB2772[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 1996, 46: 279－284.

[15] Lowry O H, Rosenbrough N J, Farr A L, *et al*. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. **J Biol Chem**, 1951, 193: 265－273.

[16] Palmieri M J, Berry G T, Player D A, *et al*. The concentration of red blood cell UDP-glucose and UDP-galactose determined by high-performance liquid chromatography[J]. **Analytical Biochemistry**, 1991, 194: 388－393.

[17] Aw T Y, Jones D P. Direct determination of UDP-glucuronic acid in cell extracts by high performance liquid chromatography [J]. **Analytical Biochemistry**, 1982, 127: 32－36.

[18] Basu S S, Dotson G D, Christian R H, *et al*. A facile enzymatic synthesis of uridine diphospho-[^{14}C] galacturonic acid[J]. **Analytical Biochemistry**, 2000, 280: 173－175.

[19] Liljebjelke K, Adolphson R, Baker K, *et al*. Enzymatic synthesis and purification of uridine diphosphate [^{14}C] galacturonic acid: a substrate for pectin Biosynthesis[J]. **Analytical Biochemistry**, 1995, 225: 296－304.

[20] Mitham E J, Gross K C. Synthesis of uridinediphospho-[U-^{14}C]-D- galacturonic acid by enzyme particulate frations and purification via high performance liquid chromantography[J]. **Phytochemical analysis**, 1991, 2: 112－115.

[21] Orellana A, Mohnen D. Enzymatic synthesis and puification of [^{3}H] uridine diphosphate galacturonic acid for use in studying golgi-localized transporters[J]. **Analytical Biochemistry**, 1999, 272: 224－231.

[22] Sutherland I W, Baddiley J, Carey N, *et al*. In Biotechnology of Microbial Exopolyasccarides Biosynthesis[M], Cambridge UK: Cambridge university press, 1990. 54－59.

[23] Hiroshi N. Microbial polysaccharides and polyesters[J]. **Microbial Biotechnology**, 2000, 246: 265－280.

[24] Degeest B, Vuyst L D. Correlation of the enzymes ∂-phosphoglucomutase, UDP-galactose4-epimerase, and UDP-glucose pyrophosphorylase with exopolysaccharide biosynthesis by *streptococcus thermophilus* LY03[J]. **Applied and Environmental Microbilology**, 2000, 66(8): 3519－3527.

[25] Thomas T D, Crow V L. Lactose and sucrose utilization by *Streptococcus thermophilus*[J]. **Fems Microbiol Lett**, 1998, 17: 13－17.

万方数据

（责任编辑 杨 勇）