

# 芽孢杆菌属产生的胞外多糖的研究

李凤珍 潘星时 芦耀波 刘瑞君 李琦

(中国科学院林业土壤研究所, 沈阳)

不同芽孢杆菌能产生不同的胞外多糖, 根据多糖中的中性糖组成, 可以把产生多糖的芽孢杆菌划分为三大类: 第一类为中性糖由甘露糖和葡萄糖组成的菌株, 计有 *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. alvei*, *B. cereus*, *B. sphaericus*, *B. licheniformis*, *B. laterosporus*, *B. pulvifaciens*, *B. brevis*, *B. mycooides*, *B. polymyxa*, *B. popilliae*, *B. macerans*, *B. firmus* 和 *B. megaterium*; 第二类为中性糖由甘露糖, 葡萄糖和半乳糖组成的菌株, 计有 *B. polymyxa*, *B. larvae*, *B. thermophilus* 和 *B. mycooides*; 第三类为中性糖由四种以上单糖组成的菌株, 计有 *B. megaterium*, *B. coagulans* 和 *B. circulans*。

*B. polymyxa* 和 *B. larvae* 产生的胞外多糖是一种类琼脂型的多糖, 它们的水溶液(1%)具有加热融化, 冷却后凝固的特征, 这种多糖是酸性多糖, 它由甘露糖、葡萄糖, 半乳糖和糖醛酸组成。

关键词: 芽孢杆菌属; 胞外多糖

芽孢杆菌属是土壤中常见的细菌类群。为了了解这类微生物所产生的胞外多糖在土壤肥力中的作用, 以及芽孢杆菌产生的胞外多糖的组成糖的差异与产生菌之间的关系, 为开发利用产生胞外多糖的芽孢杆菌资源提供依据, 我们采用气相色谱法, 对分属于 19 个种的 30 株芽孢杆菌产生的胞外多糖的组成糖, 进行了分析比较。

## 材料与方 法

### (一) 供试菌株

本试验选用的菌株, 系从 99 株土壤芽孢杆菌中筛选出的 30 株产生胞外多糖的芽孢杆菌, 它们分属于 19 个种, 计有枯草杆菌 (*B. subtilis*) 4 株, 巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*) 4 株, 犁状芽孢杆菌 (*B. mycooides*) 3 株, 多粘芽孢杆菌 (*B. polymyxa*) 3 株, 短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*) 1 株, 蜂房芽孢杆菌 (*B. alvei*) 1 株, 蜡状芽孢杆菌 (*B. cereus*) 2 株, 球形芽孢杆菌 (*B. sphaericus*) 1 株, 短芽孢杆菌 (*B. brevis*) 1 株, 地衣芽孢杆菌 (*B.*

*licheniformis*) 1 株, 凝结芽孢杆菌 (*B. coagulans*) 1 株, 侧孢芽孢杆菌 (*B. laterosporus*) 1 株, 嗜热芽孢杆菌 (*B. thermophilus*) 1 株, 幼虫芽孢杆菌 (*B. larvae*) 1 株, 尘埃芽孢杆菌 (*B. pulvifaciens*) 1 株, 日本甲虫芽孢杆菌 (*B. popilliae*) 1 株, 环状芽孢杆菌 (*B. circulans*) 1 株, 浸麻芽孢杆菌 (*B. macerans*) 1 株, 坚强芽孢杆菌 (*B. firmus*) 1 株。

### (二) 培养基和培养条件

培养基组成 (%): 葡萄糖 4.0, 酵母膏 0.5, 碳酸钙 0.3, 500ml 三角瓶装 50ml 培养液, 0.7 气压灭菌 20 min, 培养物置 110 转/min 往复式摇床上, 30℃ 培养 5—6 天, 用于提取多糖。

在不同碳源试验中选用 4% 蔗糖或 3% 乙二醇代替葡萄糖。

### (三) 多糖的提取

按图 1 所示的程序进行。

### (四) 多糖组份的测定

1. 总糖含量用酚-硫酸法测定<sup>[1]</sup>。

2. 中性糖的组成糖测定, 用气相色谱法进行<sup>[2]</sup>。将多糖样品经 0.1N 或 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 水解

本文于 1983 年 12 月 23 日收到。

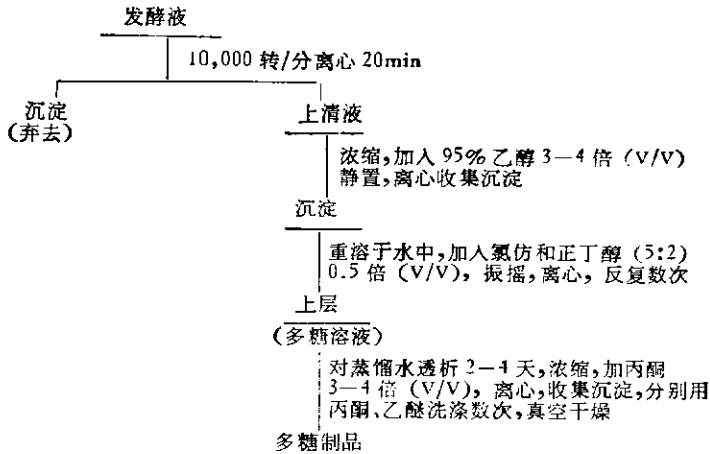


图1 芽孢杆菌胞外多糖的提纯程序

Fig. 1 Program of purification of exopolysaccharides produced by *Bacillus* sp.

1 或 6h 后,前者以甘露糖为内标,制备成三甲基硅烷化衍生物,采用程序升温 ( $150^{\circ}\rightarrow 200^{\circ}\text{C}$ ,  $3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ ) 进行果糖的测定。后者以木糖为内标,制备成三氟乙酰化衍生物,进行除果糖外的其他中性糖的测定。

3. 糖醛酸含量用吡唑硫酸法测定<sup>[3]</sup>。

4. 氨基糖含量用对二甲氨基苯甲醛法测定<sup>[4]</sup>。

## 结果与讨论

### (一) 芽孢杆菌胞外多糖的中性糖组份

不同种的芽孢杆菌能产生由不同的中性糖组成的多糖。根据我们对 19 个种 30 株芽孢杆菌所产生的胞外多糖分析来看,在以葡萄糖为碳源的培养基上,能产生由不同组成糖组成的胞外多糖,如果根据芽孢杆菌产生的胞外多糖中的中性糖组成的差异来划分,大致可以把芽孢杆菌划分为三个主要类群。第一类群,其中性糖由甘露糖和葡萄糖所组成,甘露糖和葡萄糖的克分子比为 (1.4—16.3):1,大部分芽孢杆菌都属于这一类群,如 *B. subtilis* (6.8—16.3:1), *B. pumilus* (15.7:1), *B. alvei* (14.3:1), *B. cereus* (4.0—14.3:1), *B.*

*sphaericus* (12.8:1), *B. licheniformis* (5.9:1), *B. laterosporus* (3.8:1), *B. pulvifaciens* (3.1:1), *B. brevis* (3.5:1), *B. mycoides* (6.9—9.6:1), *B. polymyxa* (12.2:1), *B. popilliae* (14.3:1), *B. macerans* (11.2:1), *B. firmus* (5.7:1) 和 *B. megaterium* (1.4:1)。

第二类群,其中性糖是由甘露糖,葡萄糖和半乳糖所组成。属于这类群的芽孢杆菌有 *B. polymyxa* (1:1:0.4 和 1.3:1:0.4), *B. larvae* (0.9:1:0.5), *B. thermophilus* (8:1:1.3) 和 *B. mycoides* (9.8:1:0.6)。

第三类群,其中性糖是由四种以上的中性糖组成。属于这类群的芽孢杆菌比较少,在 *B. megaterium* 中发现其多糖是由甘露糖,葡萄糖,半乳糖和鼠李糖(或岩藻糖和核糖)组成。此外, *B. coagulans* 和 *B. circulans* 的胞外多糖也是由四种以上的中性糖所组成。

一般而言,芽孢杆菌产生的胞外多糖,其中性糖组成与所属的种存在一定的相关性,但也有少数例外,例如,按产生胞外多糖的中性糖组成来划分, *B. megaterium* 可以划归为第一,第三类群, *B. mycoides* 和 *B.*

表 1 芽孢杆菌胞外多糖中的糖醛酸和氨基糖含量比较

Table 1 Comparison of content of uronic acids and amino sugar of the exopolysaccharide of *Bacillus* sp. (%)

菌株 Strain	糖醛酸 <sup>1</sup> Uronic acid	氨基糖 <sup>2</sup> Amino sugar
<i>B. subtilis</i>	106	6.6
	396	15.1
	393	13.0
	498	9.4
<i>B. megaterium</i>	490	0
	488	0
	139	0
	136	6.2
<i>B. polymyxa</i>	510	0
	204	0
	539	0
<i>B. mycoides</i>	495	9.2
	496	11.7
	370	12.9
<i>B. cereus</i>	369	0
	491	17.6
<i>B. pumilus</i>	289	11.0
<i>B. alvei</i>	377	13.6
<i>B. larvae</i>	532	0
<i>B. thermophilus</i>	384	12.5
<i>B. brevis</i>	357	0
<i>B. sphaericus</i>	520	0
<i>B. licheniformis</i>	517	17.3
<i>B. laterosporus</i>	387	0
<i>B. pulvifaciens</i>	518	0
<i>B. popilliae</i>	49	0
<i>B. coagulans</i>	530	16.0
<i>B. circulans</i>	141	6.3
<i>B. macerans</i>	144	13.5
<i>B. firmus</i>	153	12.9

注: 1.按葡萄糖醛酸计算, 2.按葡萄糖胺计算

As uronic acid

As glucose

*polymyxa* 可以划归为第一和第二类群。

## (二) 芽孢杆菌胞外多糖中的糖醛酸和氨基糖含量

关于芽孢杆菌产生的胞外多糖的组成糖中, 含有糖醛酸和氨基糖的报道不多<sup>[4]</sup>。

从我们分析结果来看(表 1), 有些菌株能产生含有糖醛酸的多糖(约占分析菌株的 40%), 有些菌株则不含有糖醛酸。同样, 也有些菌株能产生含有氨基糖的多糖(约占分析菌株的 44%), 有些菌株的多糖则不含氨基糖。在以葡萄糖为碳源的培养基

表 2 不同碳源对芽孢杆菌产生的胞外多糖的组成糖的影响

Table 2 Effect of various carbon source on the constitutive sugar of exopolysaccharides produced from *Bacillus* sp.

菌株 Strian	碳源 Carbon source	中性糖组成(克分子比) Neutral sugar constituents (Molar ratio)			
		甘露糖 Mannose	葡萄糖 Glucose	半乳糖 Galactose	果糖 Fructose
<i>B. subtilis</i> 498	葡萄糖 Glucose	6.8	1		
	乙二醇 Ethylene glycol	19.4	1		
	蔗糖 Sucrose	5.3	1		16.0
<i>B. megaterium</i> 136	葡萄糖 Glucose	1.8	1	0.6	
	乙二醇 Ethylene glycol	15.0	1		
	蔗糖 Sucrose	1.06	1	0.4	1.0
<i>B. megaterium</i> 139	葡萄糖 Glucose	1.4	1		
	乙二醇 Ethylene glycol	12.0	1		1.7
	蔗糖 Sucrose	1.7	1		1.9
<i>B. polymyxa</i> 510	葡萄糖 Glucose	1.3	1	0.4	
	乙二醇 Ethylene glycol	18.0	1		
	蔗糖 Sucrose	1.8	1	1	0.4
<i>B. polymyxa</i> 539	葡萄糖 Glucose	12.2	1		
	乙二醇 Ethylene glycol	17.8	1		
	蔗糖 Sucrose	15.0	1		1.7
<i>B. larvae</i> 532	葡萄糖 Glucose	0.9	1	0.5	
	乙二醇 Ethylene glycol	14.2	1		
	蔗糖 Sucrose	0.8	1	0.6	

上能产生含糖醛酸多糖的芽孢杆菌有 *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. polymyxa*, *B.*

*mycoides*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. alvei*, *B. larvae*, *B. thermophilus*, *B. brevis*; 能产

生含有氨基糖多糖的芽孢杆菌有 *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. alvei*, *B. licheniformis*, *B. thermophilus*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. macerans*, *B. circulans*。

### (三) 不同碳源对芽孢杆菌胞外多糖性质的影响

不同碳源对芽孢杆菌产生的胞外多糖的性质具有一定的影响。早期研究者的报道, *B. subtilis* 在以蔗糖为碳源的培养基上产生的胞外多糖, 是属于由果糖组成的果聚糖<sup>[6]</sup>; 在以葡萄糖为碳源的培养基上产生的胞外多糖, 是葡萄糖, 半乳糖, 岩藻糖和葡萄糖醛酸组成的酸性多糖<sup>[7]</sup>。同样, *B. polymyxa* 在葡萄糖为碳源上产生的多糖, 是一种由葡萄糖, 甘露糖, 半乳糖和葡萄糖醛酸组成的酸性多糖; 而在蔗糖为碳源上产生的多糖是两种多糖的混合物, 一种是前述的酸性多糖, 另一种是由葡萄糖, 甘露糖, 半乳糖和果糖组成的中性多糖<sup>[8]</sup>。为了进一步阐明碳源对多糖组成糖的影响, 我们以葡萄糖, 蔗糖及乙二醇为碳源, 选用 *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. polymyxa* 和 *B. larvae* 等四个种六株菌进行比较试验, 结果见表 2。从表 2 结果来看, 在所选用的三种碳源试验中, 它们所产生的多糖中的组成糖之间的差异, 主要表现在果糖的存在与否。在以葡萄糖为碳源的培养基上一般不产生含果糖的多糖, 而在乙二醇及蔗糖为碳源的培养基上产生的多糖, 因菌株而异, 或者含有果糖, 或者不含果糖, 甚至某些菌株 (如 *B. subtilis*) 可能产生仅由果糖组成的果聚糖。此外, 在以乙二醇为碳源的培养基上产生的多糖, 一般不含糖醛酸和氨基糖。同时, 其中性糖组成中甘露糖的比例要大大提高。

有的研究者报道, *B. subtilis* 和 *B. polymyxa* 的胞外多糖是一种属于类琼脂

(agar like) 型的多糖<sup>[7,8]</sup>。Nakanishi 等发现, *B. brevis* 和 *B. cereus* 能产生一种具有凝固特性的葡聚糖<sup>[9]</sup>。在我们分析的 30 株菌中也获得了产生具有类琼脂多糖的菌株, 它们分属于 *B. polymyxa* 和 *B. larvae*, 它们是酸性多糖并且不含氨基糖, 其 1% 多糖水溶液加热可溶化, 冷却后凝固。对于这类多糖的性质有待进一步研究。

多糖是一种生理活性物质, 它具有独特而稳定的物理化学性质, 以及复杂的, 多方面的生理功能。微生物产生胞外多糖是微生物代谢的一种现象, 由于它在工、农、医各个方面有着广泛的应用前景, 因而日益引起人们的注意<sup>[5,10-12]</sup>。孢芽杆菌是土壤中常见的细菌类群, 它不仅积极参与土壤中碳、氮的转化, 其所产生的多糖在稳定土壤团粒, 提高土壤肥力中所起的作用也是不容忽视的。如何结合生态条件, 研究产生多糖的芽孢杆菌的分布规律, 了解它产生多糖的条件及其组成糖的特点, 对进一步阐明微生物在土壤中的作用与功能, 以及微生物资源的发掘都具有一定的现实意义。同时, 微生物胞外多糖的种类繁多, 通过生态资源的调查, 可期望今后能发掘出更多的具有新结构特征和功能的多糖, 从而进一步开发新的应用范围。

### 参 考 文 献

- [1] Dubois M. et al.: *Anal. Chem.*, **28**: 350, 1956.
- [2] 李凤珍等: 微生物学通报, **10** (4): 178—181, 1983.
- [3] Bitter T., H. M. Muir: *Anal. Biochem.*, **4**: 330—339, 1962.
- [4] Singh S., Singh P. K.: *J. Indian Soc. Soil Sci.*, **8**: 125—128, 1960.
- [5] Sandford P. A.: *Adv. Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, **36**: 265—319, 1980.
- [6] Forsyth W. G. C., D. M. Webley: *Biochem. J.*, **44**: 455—459, 1949.
- [7] Murao S. et al.: *J. Ferment. Technol.*, **51**: 657—660, 1973.

- [ 8 ] Ninomiya A. et al.: 農化(日), 42: 178-184, 1968.
- [ 9 ] Nakanishi I. et al.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 22: 1-11, 1976.
- [10] Slodki, M. E. and M. C. Cadmus: *Adv. Appl. Microbiol.*, 23: 19-54, 1978.
- [11] 原田篤也: 发酵と工業, 36(1), 2-20, 1978。
- [12] Happer C. M.: Extracellular Polysaccharides of Soil Bacteria, in *Soil Microbiology*, ed. by N. Walker, 1975, p. 93-110.

## STUDIES ON THE EXTRACELLULAR POLYSACCHARIDES OF *BACILLUS* SP.

Li Fengzhen Pan Xingshi Lu Yaobo Liu Ruijun Li Qi  
(*Institute of Forestry and Soil Science, Academia Sinica, Shenyang*)

It has been shown that different *Bacillus* sp. can produce different extracellular polysaccharides. According to the neutral sugar composition of polysaccharide (use glucose as carbon source), *Bacillus* may be classified into three groups: *Bacillus* with neutral sugar composition consisting of glucose and mannose belong to the first group. They are *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. alvei*, *B. cereus*, *B. sphaericus*, *B. licheniformis*, *B. laterosporus*, *B. pultrifaciens*, *B. brevis*, *B. mycoides*, *B. polymyxa*, *B. popilliae*, *B. macerans*, *B. firmus* and *B. megaterium*. Those with the neutral sugar composition consisting of glucose, mannose and galactose belong to the second group. They are *B. polymyxa*, *B. larvae*, *B. thermophiles* and *B. mycoi-*

*des. B. megaterium*, *B. coagulans* and *B. circulans* belong to the third group, whose neutral sugar composition consists of more than four monosaccharides.

Extracellular polysaccharides produced by *B. polymyxa* and *B. larvae* are agar-like gel-forming polysaccharides. The polysaccharides form a gel when their aqueous suspension (more than 1%) are heated to 100°C and then cooled to room temperature. The polysaccharides are acidic, composed of mannose, glucose, galactose and uronic acid.

### Key words

*Bacillus*; extracellular polysaccharides