

一株芽孢杆菌胞外多糖的分离纯化 及其抗氧化性测定

袁建锋 蔡 恒 单咸旻 徐传学 万红贵*

(南京工业大学生物与制药工程学院 江苏 南京 210009)

摘 要: 基于实验室从新疆罗布泊沙漠筛选到一株芽孢杆菌, 研究了该菌胞外多糖的分离纯化工艺及其抗氧化性质。发酵液经离心, 抽滤等预处理后, 使用 Sevag 试剂除蛋白, 并以无水乙醇作提取溶剂, 通过正交实验确定最佳提取条件为: pH 为 7.0, 温度为 4°C, 时间为 1.5 h, 料液比为 1:4。粗多糖溶解后上活性炭柱(1.5 cm × 24 cm), 用蒸馏水、60%乙醇及 95%乙醇洗脱, 分离得到主要部分, 再经 Sephadex G-100 凝胶柱, 用 0.2 mol/L 的 NaCl 溶液洗脱, 硫酸苯酚法和考马斯亮蓝法分别检测洗脱多糖和蛋白质, 结果表明, 该产物为均一组分的糖蛋白(EPS)。在体外抗氧化性实验显示 EPS 具有很强的抗氧化性, 能清除羟基自由基($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子自由基($\cdot\text{O}_2^-$), 并且对脂质过氧化有抑制作用, 是一种很好的天然抗氧化剂。

关键词: 芽孢杆菌, 糖蛋白, 分离纯化, 抗氧化性

Isolation and Purification of Exopolysaccharide from the Fermentation Broth of *Bacillus* sp. and Its Antioxidant Effect

YUAN Jian-Feng CAI Heng SHAN Xian-Yang XU Chuan-Xue WAN Hong-Gui*

(College of Life Science and Pharmacy, Nanjing University of Technology, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

Abstract: Based on the *Bacillus* sp., isolated from Lop Nur Desert, the technology of separation and purification and the antioxidant effect were studied. After centrifugation and vacuum filtration, the deproteinization of supernatant was operated with Sevag reagent. The crude exopolysaccharide (EPS) was obtained by precipitation with ethanol. The optimum conditions for the isolation were as follow: pH 7.0, temperature 4°C, time 1.5 h, and material to ethanol ratio 1: 4. Dissolved in water, the crude EPS was fractional separated on activated carbon column (1.5 cm × 24 cm), eluted with distilled water, 60% ethanol, 95% ethanol, and the main fraction was collected. Then the EPS was purified on Sephadex G-100 gel column, eluted with NaCl (0.2 mol/L). Fractions (4 mL, each) were also combined according to total sugar by phenol-sulfuric acid method and protein content was determined by Coomassie brilliant blue. The results showed that EPS was relatively homogeneous glycoprotein. The data of antioxidation *in vitro* showed that the EPS had a high antioxidant activity, which could quench hydroxyl radical, superoxide radical and had antilipid peroxidation activity. All of these indicated that EPS was a good natural antioxidant.

* 通讯作者: Tel: 86-25-83172087; ✉ hg_wan@sina.com

收稿日期: 2009-03-17; 接受日期: 2009-05-12

Keywords: *Bacillus* sp., Glycoprotein, Isolation and purification, Antioxidant effect

多糖在自然界高等植物、藻类、细菌及动物体内均有存在,分布极广,尤其是细菌和真菌的胞外多糖,因其易于分离纯化而且产量高等优点在工业生产中颇受人们青睐^[1]。胞外多糖指的是糖被(Glycocalyx),包括微荚膜、荚膜、黏液层和菌胶团,对细菌本身来说它具有很多的功能,例如:保护细菌免受干旱损伤、免受宿主细胞的吞噬、储藏养料、堆积某些代谢和表面吸附作用等。细菌胞外多糖除了其对细菌自身的生物学意义之外,更重要的是它具有安全无毒、理化性质独特、用途广泛、易与菌体分离及可通过深层发酵实现工业化生产等优良性质。

目前国内外食品行业普遍使用的抗氧化剂主要有丁基-4-羟基苯甲醚(BHA)、二丁基羟基甲苯(BHT)、叔丁基对苯二酚(TBHQ)和没食子酸丙酯(PG)等,但近年来许多研究^[2-4]表明,BHA和BHT等存在潜在的肿瘤促进作用,因此人们更多地开始关注天然来源的食品添加剂,这促使了天然抗氧化剂的研究与开发。本实验室筛选到一株芽孢杆菌,其产生的胞外多糖经研究表明具有显著的抗氧化活性,且无毒无害,具有一定的开发应用价值。

1 材料与amp;方法

1.1 供试菌株

芽孢杆菌 *Bacillus* sp., 筛选自新疆罗布泊沙漠,实验室保藏,暂未鉴定。物理环境:年均红外辐射量为 2549 MJ/m²/a~3170 MJ/m²/a,年均紫外辐射量为 386 MJ/m²/a~444 MJ/m²/a^[5]。

1.2 培养基与培养方法

培养基使用葡萄糖牛肉膏蛋白胨培养基。

16 h 的种子以 1% (V/V)的接种量转接至发酵培养基,500 mL 发酵摇瓶的装液量为 50 mL,于 30℃,200 r/min 的条件培养 48 h。

1.3 实验方法

1.3.1 发酵液的预处理: 发酵液 10000 r/min 离心 10 min,去除菌体得上清液。上清液以新华 3 号滤纸抽滤,除去上层漂浮物。

1.3.2 Sevag 法除蛋白: Sevag 法(氯仿:正丁醇=3:1,V/V)进行除蛋白,样品液与 Sevag 试剂的体积比为 3:1。

检测:硫酸-苯酚法^[6]测定总糖,以葡萄糖为标准品;考马斯亮蓝法^[7]测定蛋白量;

1.3.3 粗多糖分离提取条件优化: 多糖提取工艺中,影响因素很多,在单因素实验基础上,选定 pH、提取温度、时间、料液比等因素,采用 L9 (3⁴) 正交设计进行优化,因素水平设计见表 1。将 1.3.1 预处理后的上清液 20 mL,用无水乙醇作为提取溶剂,将不同条件下所得的粗多糖于 40℃ 真空干燥箱干燥至恒重,由重量法确定粗多糖最佳分离条件。

表 1 粗多糖分离提取因素水平表
Table 1 The level factors table of separation of crude polysaccharide

水平 Level	因素 Factor			
	A pH	B 温度 (°C)	C 时间 (h)	D 料液比 (V/V)
1	6.0	4	1.0	1:3
2	7.0	20	1.5	1:4
3	8.0	30	2.0	1:5

1.3.4 多糖的纯化: 将 1.3.2 所得的粗多糖溶解后,上活性炭柱(1.5 cm × 24 cm),先用蒸馏水 60 mL 洗脱,再用 60%乙醇 60 mL 洗脱,最后 95%乙醇 60 mL 洗脱,每管收集 5 mL 洗脱液,硫酸-苯酚法跟踪多糖分布,收集主峰部分。经过真空浓缩,上 Sephadex G-100 柱纯化,硫酸苯酚法和考马斯亮蓝法同时监测,收集其主峰部分,使用 95%乙醇沉淀,真空干燥得到多糖纯品。

1.3.5 多糖抗氧化活性测定: 1) 羟基自由基($\cdot\text{OH}$)的清除作用。实验采用 H₂O₂-FeSO₄ 体系,研究 EPS 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用^[8]。在 3.0 mL 的反应体系中,有 25 mmol 的 FeSO₄, 2 mmol 的水杨酸钠,以及 6 mmol 的 H₂O₂。样品以 0.02 mg/mL、0.04 mg/mL、0.06 mg/mL、0.08 mg/mL、0.10 mg/mL、0.12 mg/mL 的添加量来考察 EPS 的羟基自由基清除活性。将整个混合体系于 37℃ 恒温培养 1 h,在 510 nm 检测吸光度。羟基自由基的清除率=(1-样品 A₅₁₀/空白 A₅₁₀) × 100%。

2) 超氧阴离子自由基($\cdot\text{O}_2^-$)清除作用。超氧阴离子自由基 $\cdot\text{O}_2^-$ 通过邻苯三酚在微碱条件下自养化体系产生^[9]。0.1 mmol/L 的邻苯三酚,pH 8.2,50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液,反应总体积 9 mL。在反应体系中,EPS 以 0 mg/mL、0.05 mg/mL、0.10 mg/mL、

<http://journals.im.ac.cn/wwxtb1467n>

0.15 mg/mL、0.20 mg/mL、0.25 mg/mL 添加, 反应体系置于 25°C 的恒温池中, 同时维生素 C 和甘露醇也以同等浓度参与对照反应, 并采用 325 nm 作为检测波长, 每隔 30 s 测一次吸光度 A, 计算线性范围内每分钟 A 的增值, 即邻苯三酚的自氧化速率。超氧阴离子自由基的清除率=(1-样品邻苯三酚自氧化速率/空白品邻苯三酚自氧化速率)×100%。

3) 脂质过氧化抑制作用。以卵黄脂蛋白为底物的模型 LPO 反应体系^[10]包括: 1: 40 稀释的卵黄悬液(卵黄用等体积的 pH 7.45, 0.1 mol/L 的 PBS 配成, 用前先磁力搅拌 10 min) 0.2 mL、25 mmol/L 的 FeSO₄·7H₂O 溶液 0.2 mL、一定浓度的 EPS 溶液 100 μL, 用 PBS 溶液补足 2.0 mL。对照管除不加 EPS 溶液外其它试剂同前并提前加入 20% TCA 溶液 0.5 mL。试验开始将上述两种试管同时置 37°C 水浴中振荡 15 min, 取出后, 样品试管加入 20% TCA 溶液 0.5 mL, 静置 10 min 后, 与对照管于 3500 r/min 离心 10 min, 取上清液, 分别加入硫代巴比妥酸(TBA 0.8%)溶液 1.0 mL, 加塞于 100°C 水浴 15 min, 取出冷却。以空白管调零(空白以 2.0 mL PBS 溶液代替), 测定 A₅₃₂, 样品 EPS 对卵黄脂蛋白 LPO 的抑制率(%)表示为:

$$\text{EPS}(\%) = (1 - \text{样品 } A_{532} / \text{对照 } A_{532}) \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 粗多糖除蛋白结果

取 20 mL 样品, 按 1.3.2 比例操作, 在分液漏斗中振荡 20 min, 静止后分离, 重复操作数次, 实验结果见下表 2。

实验结果显示: 随着萃取次数增加($n > 4$), 多糖含量急剧下降, 同时, 在 $n=4$ 次时, 蛋白的含量与 $n=3$ 次时相对接近, 随着 n 的增加, 蛋白的含量也急剧下降, 说明该多糖可能是一个糖蛋白, 随着蛋白的除去, 多糖也一并被除去, 因此, 除蛋白次数以 4 次为宜。

2.2 粗多糖分离提取条件优化

表 3 表明: 1) 从极差 R 值的大小可以看出各因素作用的主要次序是: D(料液比) $>$ C(时间) $>$ A(pH) $>$ B(温度); 2) 最佳因素水平为 A₂B₁C₂D₃, 但考虑提取

表 2 粗多糖除蛋白实验结果
Table 2 The experimental results of crude polysaccharide on removing protein

萃取次数(n) Times of extraction	多糖含量(%) Content of polysaccharide	蛋白含量(%) Content of protein
1	93.83	7.56
2	93.81	6.12
3	93.81	5.73
4	93.80	5.70
5	85.03	5.10
6	73.52	3.95
7	64.23	2.24

表 3 粗多糖提取分离正交试验结果
Table 3 Orthogonal test results of crude polysaccharide on separation

序号 Serial number	A	B	C	D	粗多糖克数(g) Gram of crude polysaccharide (g)
1	1	1	1	1	0.14
2	1	2	2	2	0.26
3	1	3	3	3	0.28
4	2	1	2	3	0.38
5	2	2	3	1	0.20
6	2	3	1	2	0.22
7	3	1	3	2	0.24
8	3	2	1	3	0.20
9	3	3	2	1	0.19
K1	0.68	0.76	0.56	0.53	
K2	0.80	0.66	0.83	0.72	
K3	0.63	0.69	0.72	0.86	
k1	0.23	0.25	0.19	0.18	
k2	0.27	0.22	0.28	0.24	
k3	0.21	0.23	0.24	0.29	
R	0.06	0.03	0.09	0.11	

的成本因素, 最佳提取条件为: pH 为 7.0, 提取温度为 4°C, 时间为 1.5 h, 料液比取 1: 4。

2.3 多糖的纯度鉴定

粗多糖复溶后, 经活性炭柱分离所得主要组分, 经 Sephadex G-100 凝胶柱层析, 硫酸苯酚和考马斯亮蓝跟踪洗脱液并计算多糖与蛋白的含量, 如图 1 所示, 结果为单一对称峰, 且多糖与蛋白质呈同步趋势, 经计算得多糖占 93.79%, 蛋白质占 5.62%, 蛋白质的含量与 Sevag 法除蛋白($n=4$ 次)所测的含量相一致, 即该 EPS 为均一糖蛋白。

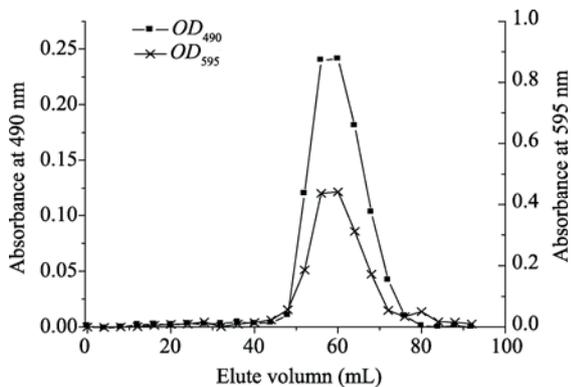


图 1 EPS 的 Sephadex G-100 凝胶渗透色谱图
Fig. 1 The gel permeation chromatography of EPS on Sephadex G-100

2.4 多糖抗氧化活性测定

2.4.1 羟基自由基($\cdot\text{OH}$)与超氧阴离子自由基($\cdot\text{O}_2^-$)清除作用: 如图 2 所示, 芽孢杆菌胞外多糖(EPS)对羟基自由基($\cdot\text{OH}$)具有较强的清除效果, 且对 $\cdot\text{OH}$ 的抑制率随剂量增大而升高, 在 0.12 mg/mL 时达最高清除率 64.21%, 同时 EPS 的 50%清除浓度(IC_{50})为 0.042 mg/mL, 远远比维生素 C 和甘露醇小。EPS 浓度在 0~0.12 mg/mL 的范围内, 浓度与 $\cdot\text{OH}$ 的抑制率呈线性相关, 随着浓度的增加对 $\cdot\text{OH}$ 的抑制率急剧增强。当多糖浓度达 0.05 mg/mL 时, 清除率的增加趋于平缓, 其原因是饱和效应造成的, 也可能是由于在有自由基引发剂存在的条件下, 像单糖那样, 多糖分子也可以自动氧化, 产生新的有机自由基, 使多糖本身产生的有机自由基与它清除的自由基达到平衡, 而在低浓度下, 减少了多糖分子与自由基引发剂的反应概率, 表现出多糖清除自由基的作用。

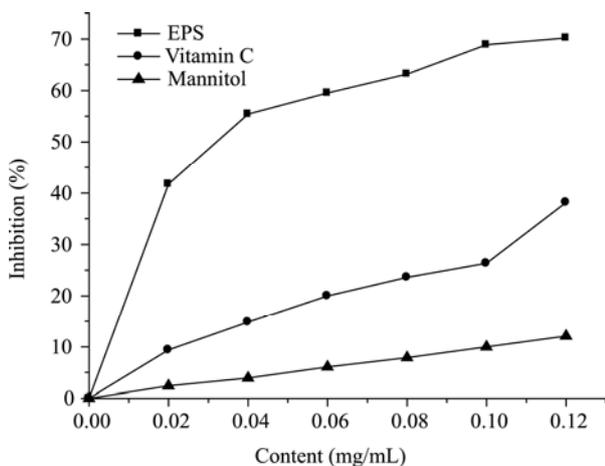


图 2 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用
Fig. 2 Hydroxyl radical scavenging activity

如图 3 所示, 同样, 超氧阴离子自由基清除效果也与 EPS 的浓度呈正相关, 在 0~0.25 mg/mL 的浓度范围内, 与维生素 C 和甘露醇对比, EPS 的作用效果明显强于甘露醇, 但略低于维生素 C。并且上述糖蛋白的 IC_{50} 为 0.165 mg/mL, 略低于 Vc 的 0.101 mg/mL。羟基自由基和超氧阴离子自由基是引起生物氧化的本源, 如皮肤的衰老等, EPS 作为天然的高分子物质, 能有效的清除这些自由基, 是一种良好的、绿色的抗氧化材料。

2.4.2 抗脂质过氧化作用: 脂质过氧化作用主要是指在不饱和脂肪酸中发生的一种自由基链式反应, $\cdot\text{OH}$ 是脂质过氧化作用的主要引发剂, 研究表明紫外辐射能够诱导发生脂质过氧化反应^[11], 以卵黄脂蛋白为底物的模型 LPO 反应体系结果表明 (见图 4), EPS 具有一定的抗脂质过氧化作用, 在

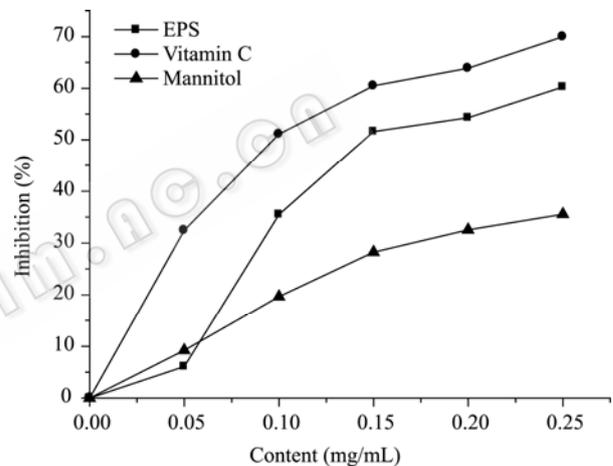


图 3 $\cdot\text{O}_2^-$ 的清除作用
Fig. 3 Superoxide radical scavenging activity

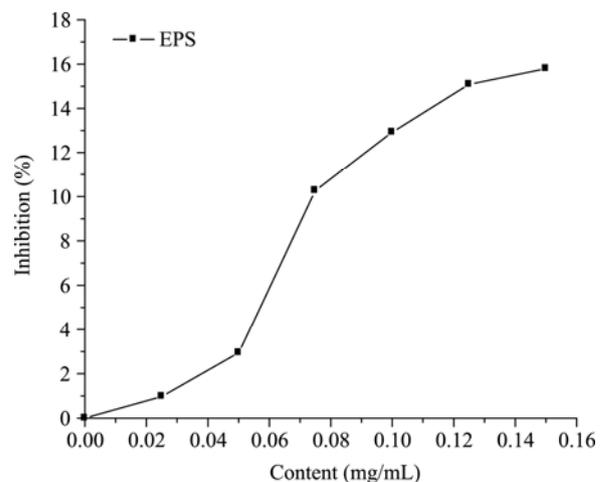


图 4 EPS 抗脂质过氧化作用
Fig. 4 Anti-lipid peroxidation activity of EPS

0.05 mg/mL 的剂量下, 抑制率为 3.12%, 随着 EPS 的浓度增加, 抑制率也随之上升, 当剂量为 0.15 mg/mL 时, 抑制率为 16%, 并且抑制率逐渐趋于平稳。

3 结果与讨论

本文研究了芽孢杆菌产胞外糖蛋白的分离纯化工艺及部分生物活性, 结果表明:

1) 芽孢杆菌粗多糖提取的最佳条件为: pH 7.0, 提取温度为 4°C, 时间为 1.5 h, 料液比取 1:4;

2) 粗多糖经活性炭柱分离和经 Sephadex G-100 柱纯化后, 能得到均一的糖蛋白, 建立了糖蛋白的分离纯化方法;

3) 经体外抗氧化性实验, EPS 具有明显的清除羟基自由基、超氧阴离子自由基及抑制脂质过氧化的作用。

自由基被普遍认为是引起生物体衰老的主要物质, 而羟基自由基和超氧阴离子自由基是最主要的形式。目前, 有很多报道表明, 多糖具有清除自由基的作用^[12-14], 而这些报道中的多糖大多从植物、真菌等中提取所得, 羟基自由基的清除作用 IC₅₀ 为 0.32 mg/mL~0.68 mg/mL, 超氧阴离子自由基的清除作用 IC₅₀ 为 0.08 mg/mL~0.15 mg/mL, 较本文报道的 EPS 对自由基的清除作用弱。同时, 本报道生产过程使用液体深层发酵, 原料来源简单, 生产周期短, 产品绿色, 有进一步研究, 开发为新型抗氧化剂的价值。

有研究表明^[15], 自由基的存在能引起生物膜脂质的过氧化作用, 从而导致脂质过氧化作用的积聚; 还有研究表明^[16], 过量的紫外辐射, 特别是 UVA/B 的辐射, 能产生活性氧分子(ROS), EPS 对这些活性氧分子有明显的清除作用, 在后期将研究 EPS 的抗辐射性以及结构与功效的关系, 为开发新型化妆品做铺垫。

参 考 文 献

- [1] Adilma S, Daniela M, Heloisa F, *et al.* Structural studies of CV-70 polysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1997, **21**(1-2): 115-121.
- [2] Matsuoka A, Matsui M, Miyata N, *et al.* Mutagenicity of 3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) and its metabolites in short-term tests *in vitro*. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 1990, **241**(2): 125-132.
- [3] Maziero GC, Baunwart C, Cecilia M, *et al.* Estimates of the theoretical maximum daily intake of phenolic antioxidants BHA, BHT and TBHQ in Brazil. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2001, **18**(5): 365-373.
- [4] 李毅民, 胡燕平, 李彦红. 叔丁基-4-羟基茴香醚致突变性研究. 癌变. 畸变. 突变, 2000, **12**(1): 34-36.
- [5] 傅玮东. 新疆红外与紫外辐射的时空分布规律. 干旱区地理, 2000, **23**(2): 116-122.
- [6] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术. 第二版. 浙江: 浙江大学出版社, 1999, pp.1-540.
- [7] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**: 248-254.
- [8] Smirnoff N, Cumbes QJ. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*. 1989, **28**(4): 1057-1060.
- [9] 邹国林, 桂兴芬, 钟晓凌, 等. 一种 SOD 的测活方法——邻苯三酚自氧化的改进. 生物化学与生物物理进展, 1986, **13**(4): 71-73.
- [10] 张尔贤, 俞丽君. 鼠尾藻多糖清除氧自由基作用研究 II. UVc 鼠尾藻对多糖抗氧化作用的影响. 中国海洋药物, 1997, **63**(3): 1-4.
- [11] Nayama S, Takehana M, Kanke M, *et al.* Protective effects of sodium-L-ascorbyl-2 phosphate on the development of UVB-induced damage in mouse skin. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 1999, **22**(12): 1301-1305.
- [12] Lee BC, Bae JT, Pyo HB, *et al.* Biological activities of the polysaccharides produced from submerged culture of the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, **32**: 574-581.
- [13] Luo DH, Fang BS. Structural identification of ginseng polysaccharides and test their antioxidant activities. *Carbohydrate Polymers*, 2008, **72**: 376-381.
- [14] Zhao X, Xue CH, Li BF. Study of antioxidant activities of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica*. *Journal of Applied Phycology*, 2008, **20**(4): 431-436.
- [15] Xing R, Liu S, Yu HH, *et al.* Preparation of high-molecular weight and high-sulfate content chitosans and their potential antioxidant activity *in vitro*. *Carbohydrate Polymers*, 2005, **61**: 148-154.
- [16] Dissett DL, Chatterjee R, Hannon DP. Photoprotective effect of superoxide-scavenging antioxidants against ultraviolet radiation-induced chronic skin damage in the hairless mouse. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 1990, **7**: 56-62.