

有机溶剂胁迫处理对菌株 *Bacillus subtilis* OST23a 产胞外多糖的影响

房耀维¹ 刘姝¹ 王淑军^{1,2*} 吕明生¹ 焦豫良¹ 陈丽³ 曹纯¹

(1. 淮海工学院 海洋学院 江苏 连云港 222005)

(2. 江苏省海洋生物技术重点实验室 江苏 连云港 222005)

(3. 江苏省海洋资源研究院 江苏 连云港 222000)

摘要: 【目的】研究有机溶剂胁迫处理对菌株分泌胞外多糖的影响并确定最佳条件。

【方法】利用分泌抗氧化活性胞外多糖海洋细菌 *Bacillus subtilis* OST23a 及其突变菌株 UD292 为出发菌株, 在考察菌株有机溶剂耐受性的基础上, 测定不同浓度正己烷胁迫处理不同时间后该菌株抗氧化胞外多糖产量。【结果】结果表明最佳胁迫处理浓度和时间分别为 3% 和 6 h, 此时 *Bacillus subtilis* OST23a 和菌株 UD292 胞外多糖分泌量分别从 9.02 mg/L 和 43.92 mg/L 显著提高到 52.97 mg/L 和 201.81 mg/L, 且胞外多糖的抗氧化性能无显著变化。*Bacillus subtilis* OST23a 和菌株 UD292 连续传代试验结果表明菌株遗传性状较稳定。【结论】有机溶剂胁迫可以提高细菌分泌胞外多糖的能力, 在微生物育种方面有潜在的应用。

关键词: 海洋细菌, 抗氧化胞外多糖, 有机溶剂胁迫

Effects of n-hexane stress on secretion of antioxidant exopolysaccharides from marine strain *Bacillus subtilis* OST23a

FANG Yao-Wei¹ LIU Shu¹ WANG Shu-Jun^{1,2*} LÜ Ming-Sheng¹
JIAO Yu-Liang¹ CHEN Li¹ CAO Chun¹

(1. School of Marine Science and Technology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang, Jiangsu

基金项目: 江苏省高校自然科学基金面上项目(No. 10KJB550002)

*通讯作者: Tel: 86-518-85895430; ✉: foroei@163.com

收稿日期: 2011-07-18; 接受日期: 2011-09-30

222005, China)

(2. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Lianyungang, Jiangsu 222005, China)

(3. Jiangsu Marine Resources Development Research Institute, Lianyungang, Jiangsu 222005, China)

Abstract: [Objective] In this paper, the effects of organic solvent stresses on the yield of antioxidant exopolysaccharide (EPS) from *Bacillus subtilis* was evaluated and the best condition was also determined. **[Methods]** Marine strain *Bacillus subtilis* OST23a and mutant UM29, both with the ability to produce antioxidant exopolysaccharide (EPS), were used as the original strain. Based on the detection of the tolerance of the strains to the organic solvent, n-hexane was used to stress treatment. Effects of concentrations and treatment time of n-hexane on the exopolysaccharide excretion from *Bacillus subtilis* OST23a and strain UD292 were studied. **[Results]** The productivity of the EPS of *Bacillus subtilis* OST23a and strain UD292 were 52.97 mg/L and 201.81 mg/L respectively after stress treatment with 3% n-hexane for 6 h. There was no significant difference in the antioxidation activities of the extracellular polysaccharides between strains stress with n-hexane and the original strains. Moreover, the continuous passage experiment showed that the strains have high genetic stability. **[Conclusion]** The organic solvent stress could improve the productivity of the exopolysaccharide from bacteria, which possesses the potential application in microbial breeding.

Keywords: Marine bacterial, Antioxidant exopolysaccharide, Organic solvent stress

多糖(Polysaccharide)是由至少超过 10 个以上的单糖通过糖苷键结合而成的高分子碳水化合物,具有多种生物活性,广泛应用于医药、食品、环保及石油工业^[1]。根据来源,多糖可分为动物多糖、植物多糖和微生物多糖。植物和动物多糖如甲壳素和壳聚糖已经广泛应用于食品及保健品工业。但是植物和动物多糖由于受季节和环境的影响,资源有限。微生物具有生长旺、繁殖快、生长不受季节限制、利于大规模连续发酵生产和在线控制等特点使得微生物多糖可以低成本生产。另外,微生物多糖安全无毒、易于纯化、具有多种生物活性,成为人们研究和开发的重点^[2]。

海洋环境中分布着约 $(0.1-2.0) \times 10^8$ 种微生物中,目前只对其中 1 500 种进行了研究,有大量的海洋微生物有待于深入开发^[3]。海洋的高盐、高压、低温、寡营养等特殊环境赋予海洋微生物代谢产物多样性、新颖性和独特

性,因此海洋微生物胞外多糖往往具有独特的生化结构和生物学活性。研究和开发海洋微生物多糖已日益成为世界各国竞相研究的一个重要领域和发展方向^[4]。其中,抗氧化活性的微生物胞外多糖能作为天然抗氧化剂清除自由基,用于食品工业和医疗保健,日益得到研究者的关注^[5]。

本研究室从海洋细菌中分离获得一株分泌抗氧化活性多糖的菌株 *Bacillus subtilis* OST23a,对其发酵产胞外多糖的培养基进行了优化^[6],并采用紫外、硫酸二乙酯复合诱变处理后筛选得到一株高产胞外多糖的优良突变菌株 UD292,发酵产胞外多糖水平达到 43.92 mg/L (另文发表)。据报道,微生物可以通过提高胞外多糖的分泌量提高菌株对有机溶剂的耐受性^[7]。本文考察了不同极性常数有机溶剂对菌株产胞外多糖的影响,进一步提高菌株 *Bacillus subtilis* OST23a 分泌胞外多糖的产量。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器: PHS-3C 型精密酸度计, 上海精密科学仪器厂; 680 ELX-800 酶标仪, 美国 Bio-Rad 公司; Centrifuge 5804R 高速冷冻离心机, 美国 Eppendorf 公司。

1.1.2 试剂: 胰蛋白胨、酵母提取物为英国 Oxoid 公司产品, 试验所用有机溶剂(色谱纯)均购自国药集团化学试剂有限公司, 其它化学试剂均为国产分析纯。

1.1.3 菌株来源: *Bacillus subtilis* OST23a 是本研究室从连云港海域海泥样品中分离、纯化得到的。菌株 UD292 是 *Bacillus subtilis* OST23a 通过紫外、硫酸二乙酯复合诱变处理后筛选获得的胞外多糖高产菌株。

1.1.4 培养基: 2216E 液体培养基(g/L): 胰蛋白胨 5, 酵母提取物 1, 海水配制, pH 7.0, 固体培养基添加 2%琼脂。

种子培养基(g/L): 葡萄糖 10, 胰蛋白胨 5, 酵母提取物 1, 海水配制, pH 7.0。

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 10, 胰蛋白胨 5, 酵母提取物 1, K_2HPO_4 3, KH_2PO_4 1, $MgSO_4$ 0.5, 海水配制, pH 7.0。

1.2 方法

1.2.1 *Bacillus subtilis* OST23a 及突变菌株 UD292 生长曲线的测定: 将活化的斜面上的 *Bacillus subtilis* OST23a 菌种用接种环接种于装有 5 mL 2216E 液体培养基的 50 mL 三角瓶中, 28 °C、160 r/min 培养 24 h 后, 以 1%接种量接种至装有 30 mL 2216E 液体培养基的 250 mL 的三角瓶中。培养不同时间后, 600 nm 下测定 OD 值, 绘制枯草芽孢杆菌生长曲线。

1.2.2 *Bacillus subtilis* OST23a 及突变菌株 UD292 对菌株的耐受性: 参照 Gupta 报道的方

法^[8], 将 250 mL 三角瓶装有 26.1 mL MSB 培养基, 添加具有不同极性常数的有机溶剂 0.9 mL, 将活化好的菌株以 1% 接种量接种到上述培养液中, 用橡胶塞防止有机溶剂蒸发, 28 °C、180 r/min 培养 36 h 后, 取 10 mL 培养液, 4 °C 条件下 8 000×g 离心 10 min, 细胞用蒸馏水清洗 2 次, 真空冷冻至恒重。实验重复 3 次, 以不含有有机溶剂培养液为对照。

1.2.3 不同浓度正己烷胁迫对菌株分泌胞外多糖的影响: 取按 1.2.1 方法培养菌株 18 h 后获得的培养液 3 瓶, 无菌条件下分别准确吸出 0.3、0.6 和 0.9 mL 培养液, 并添加 0.3、0.6 和 0.9 mL 环己烷, 使环己烷浓度分别为 1%、2%和 3%。分别在 28 °C、160 r/min 摇瓶发酵继续培养 3 h 后取培养液 2 mL, 8 000×g 离心 5 min, 收集菌体, 用无菌生理盐水洗涤 2 次, 1 mL 无菌生理盐水悬浮, 用于接种制备种子液。

1.2.4 正己烷胁迫时间对菌株分泌胞外多糖的影响: 取按 1.2.1 方法培养菌株 18 h 后获得的培养液 1 瓶, 无菌条件下准确吸出 0.9 mL 培养液, 并添加 0.9 mL 环己烷。分别在 28 °C、160 r/min 摇瓶发酵继续培养 0、3、6、9、12 h 后取培养液 2 mL, 8 000×g 离心 5 min, 收集菌体, 无菌生理盐水洗涤 2 次, 1 mL 无菌生理盐水悬浮, 用于接种制备种子液。

1.2.5 粗胞外多糖的制备: 将菌种接种到种子培养基, 28 °C、160 r/min 培养 24 h 后, 以 1%接种量接种至发酵培养基, 28 °C、160 r/min 培养 36 h 后, 8 000×g 离心 10 min, 取 20 mL 上清液加 3 倍体积的 95%乙醇, 4 °C 沉淀过夜, 10 000×g 离心 20 min, 所得沉淀用蒸馏水定容至 20 mL, 获得粗胞外多糖, 测定粗多糖含量。

1.2.6 变异菌株稳定性测定: 将胁迫处理的菌株在固定培养基上连续培养传 20 代, 隔两代测定其胞外多糖产量, 考察产胞外多糖的稳

定性。

1.2.7 多糖含量的测定: 采用苯酚-硫酸显色法测定多糖含量^[9]。

1.2.8 对 $O_2^{\cdot-}$ 清除能力的测定: 采用氮蓝四唑(NBT)法^[6]。配制 50 mmol/L、pH 7.4 的磷酸盐缓冲液(含 150 $\mu\text{mol/L}$ 的 NBT)、60 $\mu\text{mol/L}$ 的吩嗪硫酸甲脂(PMS)、468 $\mu\text{mol/L}$ 的 NADH, 量取 1 mL 该缓冲液加入 1 mL 0.25 mg/mL 粗胞外多糖溶液, 25 °C 反应 5 min, 然后在波长 560 nm 处测定吸光度(A_i)。对照液以 1 mL 蒸馏水代替待测液, 测定其吸光度(A_{01})。 $O_2^{\cdot-}$ 清除能力用 TR 表示, 通过公式(1)计算。

$$TR(\%) = \frac{A_{01} - A_i}{A_{01}} \times 100 \quad (1)$$

1.2.9 对 $\cdot\text{OH}$ 清除能力的测定: 采用 α -脱氧核糖氧化法^[6]。准确量取 0.2 mL FeSO_4 -EDTA 混合液(二者浓度均为 10 mmol/L)移至具塞试管中, 加入 10 mmol/L 2-脱氧核糖溶液 0.2 mL, 再加入 1 mL 0.25 mg/mL 粗胞外多糖溶液, 随后用磷酸盐缓冲溶液(pH 7.4)定容至 1.8 mL, 最后加入 10 mmol/L 过氧化氢溶液 0.2 mL, 混合均匀后将该体系置于 37 °C 恒温水浴中 1 h, 取出后向该体系加入 1.0 mL 2.8% 的三氯乙酸溶液(TCA)、1.0 mL 1.0% 的硫代巴比妥酸溶液(TBA), 混合均匀后于水浴中反应 10 min, 取出, 冷水冷却, 在 532 nm 波长处测定该体系的吸光度 A_s 。对照液以 1.0 mL 蒸馏水代替待测液, 测定吸光度 A_{02} 。 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力用 SA 表示, 通过公式(2)计算。

$$SA(\%) = \frac{A_{02} - A_s}{A_{02}} \times 100 \quad (2)$$

1.2.10 统计方法: 本研究每个试验设 3 个重复, 采用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计分析, 数据用平均值 \pm 标准差表示, 利用 F 检验进行显著性分析。

2 结果与讨论

2.1 *Bacillus subtilis* OST23a 及突变菌株 UD292 生长曲线的测定

以培养时间为横坐标, 菌液 OD_{600} 值为纵坐标, 制作菌株生长曲线, 结果如图 1 所示。菌株 *Bacillus subtilis* OST23a 的延迟期为 0–8 h, 对数生长期为 8–20 h。在对数生长期的中后期, 细胞代谢活力旺盛, 并且处在这个时期内的细胞对某些异常的条件要比处在这个时期内的细胞敏感得多, 利于进行育种处理。

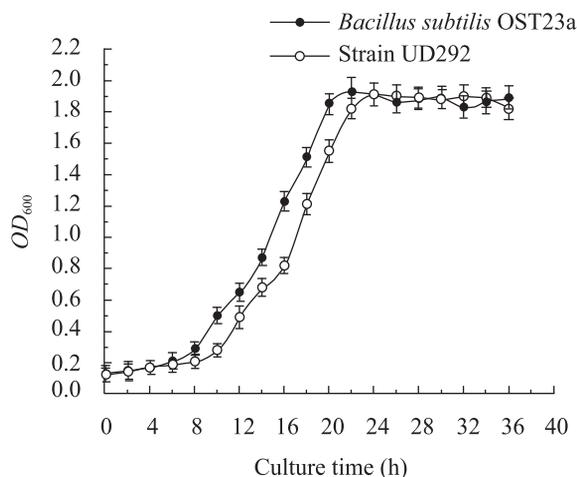


图 1 *Bacillus subtilis* OST23a 和菌株 UD292 的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *Bacillus subtilis* OST23a and strain UD292

2.2 *Bacillus subtilis* OST23a 及突变菌株 UD292 对菌株的耐受性

有机溶剂通过破坏微生物细胞质膜结构, 影响其功能, 从而抑制甚至杀死微生物细胞。极性常数代表溶剂在水相与正辛醇两相中的分配系数比值(LogP), 有机溶剂的极性越大, 极性常数越小^[10]。在 3% (V/V) 具不同极性常数有机溶剂存在情况下, 28 °C、180 r/min 培养 36 h 后, 测定细胞干重。结果如图 2 所示, LogP 高于 4.0 的有机溶剂对两菌株生长的影响较小; 而 LogP 为 3.5

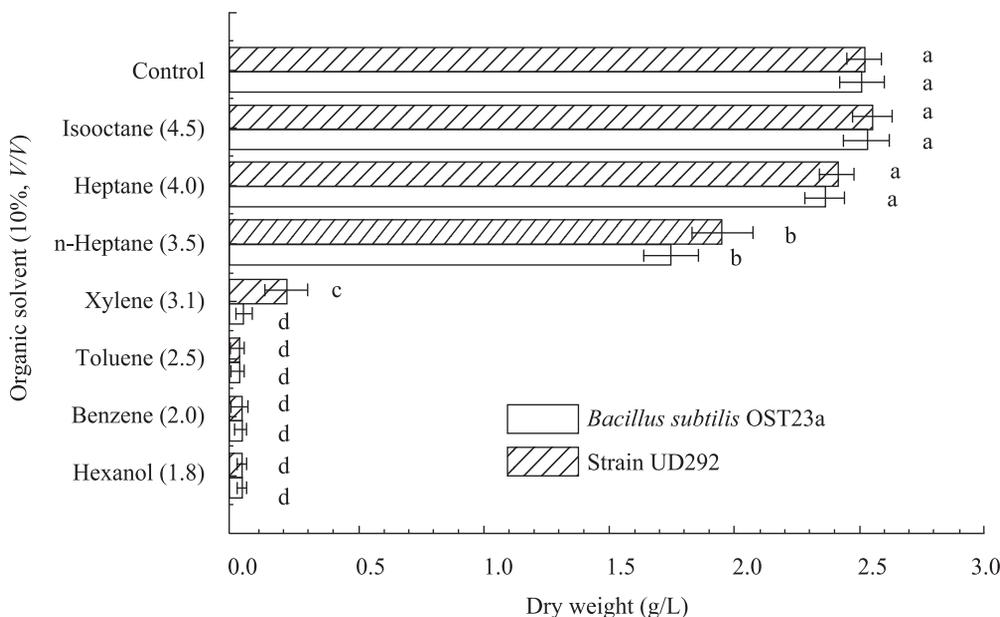


图 2 不同极性常数有机溶剂对 *Bacillus subtilis* OST23a 和菌株 UD292 生长的影响

Fig. 2 Effects of organic solvents with different LogP on the growth of *Bacillus subtilis* OST23a and strain UD292

注: 不同字母表示在 0.05 水平差异显著。

Note: The different letters mean significant difference at 0.05 levels.

的正己烷对两菌株的生长均具有显著抑制作用; LogP 为 3.1 时完全抑制菌株 *Bacillus subtilis* OST23a 生长, 但是突变菌株 UD292 还可以缓慢生长。目前有研究表明有机溶剂极性越大对微生物细胞的毒害作用越大, 但多糖分泌量增加的菌株的有机溶剂耐受性提高^[7]。根据菌株的耐受性, 选择正己烷对菌株进行胁迫处理。

2.3 不同浓度正己烷胁迫对菌株分泌胞外多糖的影响

用不同浓度的正己烷处理 *Bacillus subtilis* OST23a 和菌株 UD292, 发酵后测定多糖产量。结果如图 3 所示, 不同浓度有机溶剂胁迫处理均可以显著提高两株菌胞外多糖分泌产量。随着正己烷浓度从 1% 增加到 3%, 多糖分泌量增加, 进一步增加浓度, 多糖分泌量不再显著增加, 因此后面研究选择正己烷浓度为 3%。3% 正己烷处理 3 h 后 *Bacillus subtilis* OST23a 和菌株 UD292 胞外多糖分泌量最高。

有趣的是有机溶剂胁迫处理不仅可以提高野生型菌株的多糖产量, 也可以提高诱变育种获得的突变菌株的多糖产量。部分微生物通过增加胞外多糖分泌量提高其有机溶剂耐受性, 因此, 有机溶剂胁迫会提高胞外多糖产量。研究者发现在发酵培养基中添加有机溶剂可以提高多糖产量^[7], 但有机溶剂可能会造成环境污染, 并且去除发酵液中的有机溶剂相对困难。用有机溶剂胁迫处理后发酵产胞外多糖, 不用在培养基中添加有机溶剂, 降低成本, 减少工艺, 绿色环保。

2.4 不同正己烷胁迫时间对菌株分泌胞外多糖的影响

用 3% 正己烷处理 *Bacillus subtilis* OST23a 和菌株 UD292 不同时间, 发酵后测定多糖产量。结果如图 4 所示, *Bacillus subtilis* OST23a 在 3% 正己烷处理 3 h 后多糖分泌量为 51.96 mg/L, 处理 6 h 后, 分泌量稍有增加, 达到 52.97 mg/L, 但增加

不显著; 而菌株 UD292 在 3% 正己烷处理 6 h 后多糖分泌量达到 201.81 mg/L, 进一步延长处理时间多糖分泌量不显著增加。

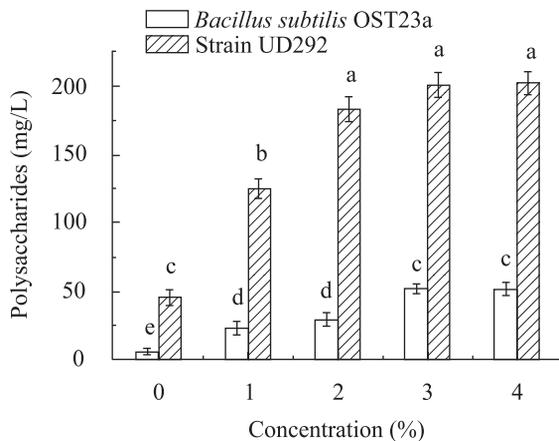


图 3 不同浓度正己烷处理对 *Bacillus subtilis* OST23a 和菌株 UD292 分泌胞外多糖的影响

Fig. 3 Effects of concentrations of n-hexane on the exopolysaccharide excretion from *Bacillus subtilis* OST23a and strain UD292

注: 不同字母表示在 0.05 水平差异显著。

Note: The different letters mean significant difference at 0.05 levels.

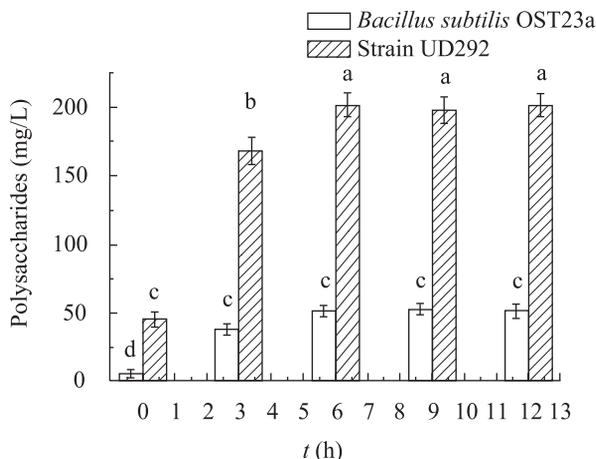


图 4 不同正己烷处理时间对 *Bacillus subtilis* OST23a 和菌株 UD292 分泌胞外多糖的影响

Fig. 4 Effects of time of n-hexane treatment on the exopolysaccharide excretion from *Bacillus subtilis* OST23a and strain UD292

注: 不同字母表示在 0.05 水平差异显著。

Note: The different letters mean significant difference at 0.05 level.

2.5 变异菌株的稳定性

将胁迫处理的菌株在固定培养基上连续培养传 20 代, 隔两代测定其胞外多糖产量, 结果如图 5 所示, 菌株 UD292 在 14 代后多糖产量显著下降, 菌株 *Bacillus subtilis* OST23a 在 10 代后多糖产量缓慢下降。表明通过有机溶剂胁迫获得的胞外多糖高产菌株具有一定的遗传稳定性, 所获得的高产菌株有应用于工业生产的潜力。

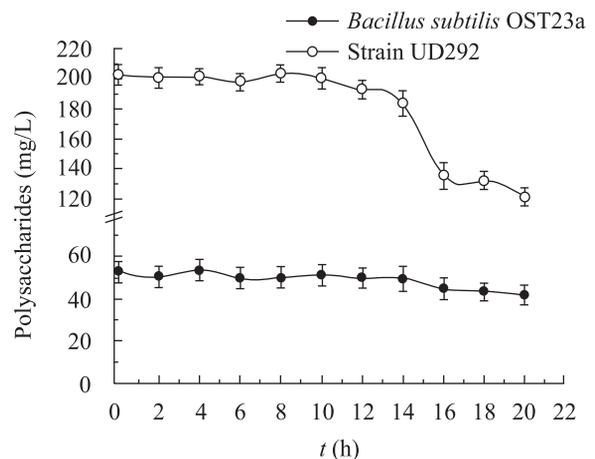


图 5 正己烷处理后 *Bacillus subtilis* OST23a 和菌株 UD292 的遗传稳定性检测

Fig. 5 Detection of the hereditary stability of *Bacillus subtilis* OST23a and strain UD292 after stressed by n-Hexane

2.6 多糖对 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2\cdot$ 的清除

抗氧化性是海洋细菌 *Bacillus subtilis* OST23a 胞外多糖的主要特性, 为判断有机溶剂胁迫处理后菌株胞外多糖抗氧化性是否发生变化, 对等浓度出发菌株及突变菌株的胞外多糖的抗氧化能力进行检测。结果表明所有菌株胞外多糖对 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2\cdot$ 的清除率均约为 38% 和 56%。表明胁迫育种后菌株胞外多糖产量增加, 但抗氧化活性没有显著变化。

3 结论

本文研究了不同浓度正己烷胁迫处理和胁迫处理时间对分泌抗氧化活性胞外多糖海洋细菌

Bacillus subtilis OST23a 及其突变菌株 UD292 分泌胞外多糖的影响。结果表明正己烷胁迫处理可以显著提高两菌株的胞外多糖产量。在 3% 正己烷胁迫处理 3 h 后, *Bacillus subtilis* OST23a 和菌株 UD292 胞外多糖分泌量分别为 52.97 mg/L 和 201.81 mg/L, 提高了 4.87 和 3.59 倍, 且胁迫后胞外多糖高产菌株遗传性状较稳定, 胞外多糖抗氧化能力无显著变化。

参 考 文 献

- [1] Nichols CAM, Guezennec J, Bowman JP. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine environments with special consideration of the southern ocean, sea ice, and deep-sea hydrothermal vents: a review[J]. *Marine biotechnology*, 2005, 7(4): 253–271.
- [2] 郭敏, 张宝善, 金晓辉. 微生物发酵生产多糖的研究进展 [J]. *微生物学通报*, 2008, 35(7): 1084–1090.
- [3] Baharum SN, Beng EK, Mokhtar MAA. Marine microorganisms: potential application and challenges[J]. *Journal of Biological Sciences*, 2010, 10(6): 555–564.
- [4] 张姗姗, 王长云, 魏晓蕾, 等. 海洋微生物胞外多糖结构与生物活性研究进展[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(1): 153–156.
- [5] 陈艳丽, 任盛, 魏国琴, 等. *Rhizobium* sp. N613 胞外多糖的抗氧化活性[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(2): 234–238.
- [6] 房耀维, 吕明生, 徐炜枫, 等. 产抗氧化胞外多糖海洋细菌的筛选及发酵产糖培养基优化[J]. *食品科学*, 2010, 31(23): 276–280.
- [7] Onbasli D, Aslim B. Effects of some organic pollutants on the exopolysaccharides (EPSs) produced by some *Pseudomonas* spp. strains[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 168(1): 64–67.
- [8] Gupta A, Khare SK. A protease stable in organic solvents from solvent tolerant strain of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Biorsource Technology*, 2007, 97(15): 1788–1793.
- [9] Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. *Analytical Chemistry*, 1956, 28: 350–356.
- [10] Fang YW, Liu S, Wang SJ, et al. Isolation and screening of a novel extracellular organic solvent-stable protease producer[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2009, 43(2): 212–215.

稿件书写规范

论文中统计学符号书写规则

统计学符号一般用斜体。本刊常用统计学符号介绍如下, 希望作者参照执行。

样本的算术平均数用英文小写 x , 不用大写 X , 也不用 *Mean*。标准差用英文小写 s , 不用 *SD*。标准误用英文小写 $s_{\bar{x}}$, 不用 *SE*。 t 检验用英文小写 t 。 F 检验用英文大写 F 。卡方检验用希腊小写 χ^2 。相关系数用英文小写 r 。样本数用英文小写 n 。概率用英文大写 P 。