

沙漠生物结皮芽孢杆菌产胞外多糖的纯化及其絮凝性的研究

王正荣^{1*} 生吉萍² 申琳²

(1. 河南科技学院 食品学院 河南 新乡 453003)

(2. 中国农业大学 食品科学与营养学院 北京 100083)

摘要:【目的】以新疆古尔班通古特沙漠的生物结皮为样品,通过培养、筛选、分离得到一株高产胞外多糖(EPS)的菌株 XJ-27,对 XJ-27 菌株所产的胞外多糖进行分离纯化,并对其絮凝性进行研究。【方法】利用 DEAE sepharose CL-6B 阴离子层析和 Sephadex G100 凝胶层析的方法对胞外多糖进行纯化,通过紫外分析方法和高效凝胶渗透色谱进行纯度的测定,利用高效凝胶渗透色谱法(HP-GPC)测定其分子量,以高岭土为体系对其絮凝性进行研究。【结果】利用层析分离的方法共得到 2 个胞外多糖的组分,对其中一个组分进一步纯化,得到组分 EPS-I。结果表明, EPS-I 纯度较高,分子量为 575 kD。同时对胞外多糖的絮凝性进行了研究,结果表明该胞外多糖对高岭土为体系的絮凝率为 80.4%。【结论】菌株 XJ-27 产胞外多糖,其胞外多糖具有絮凝性,对该胞外多糖进行分离纯化后,得到分子量为 575 kD 的多糖组分 EPS-I。

关键词:生物结皮,胞外多糖,絮凝率,纯化

Purification and bioflocculant activity characterization of exopolysaccharide from *Bacillus thuringiensis* in sand biological soil crust

WANG Zheng-Rong^{1*} SHENG Ji-Ping² SHEN Lin²

(1. School of Food Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003, China)

(2. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: [Objective] By screening from sand biological soil crusts in Gurban Tonggut Desert, Xinjiang, China, a novel strain *Bacillus thuringiensis* XJ-27 with high yield of exopolysaccharide (EPS) was obtained. Exopolysaccharide was purified from XJ-27 and its bioflocculant activity in kaolin system was studied. [Methods] Purification of exopolysaccharide was carried out by DEAE sepharose CL-6B ion-exchange chromatography and Sephadex G100 gel-permeation chromatography. Its physiochemical properties and molecular weight were investigated by chemical analysis and high performance liquid chromatography (HPLC) as well. The bioflocculant activity

基金项目: 河南科技学院-2012 年校攀登计划创新基金项目

*通讯作者: Tel: 86-373-3040674; ✉: wazhro@qq.com

收稿日期: 2014-11-12; 接受日期: 2015-01-20; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-03-06

was studied in kaolin system. **[Results]** Exopolysaccharide EPS-I was purified with DEAE sepharose CL-6B ion-exchange chromatography and Sephadex G100 gel-permeation chromatography. The average molecular weight of the exopolysaccharide EPS-I was 575 kD. The bioflocculant activity in kaolin system of exopolysaccharide was 80.4%. **[Conclusion]** The average molecular weight of the exopolysaccharide EPS-I was 575 kD. The bioflocculant activity in kaolin system of exopolysaccharide was 80.4%.

Keywords: Biological soil crust, Exopolysaccharide, Bioflocculant activity, Purification

沙漠生物结皮是在沙漠藻类拓殖作用下由活的微生物及其代谢产物(胞外多糖)与沙粒组成,是土壤颗粒与有机物紧密结合在土壤表层形成的一种壳状体,是沙漠地区最具特色的微自然景观,遍布于沙漠或荒漠地区,在促进土壤演替、改善表层土壤水分状况,防止土壤侵蚀方面起着重要的作用。在沙漠生物结皮形成过程中,微生物的活动及其分泌的代谢产物,尤其是胞外多糖起到了非常重要的作用^[1-2]。微生物胞外多糖指由特定微生物代谢产生的,分泌到培养基中的生物聚合物。目前已大量工业化生产的有黄原胶(Xanthan gum)、结冷胶(Gellan gum)、热凝多糖(Curdlan)等,而胞外多糖作为絮凝剂的有效成分也在很多研究中被报道^[3-5]。

本研究从新疆古尔班通古特沙漠生物结皮中分离筛选到具有絮凝活性的高产胞外多糖的菌株^[6],分离纯化其胞外多糖,并对絮凝性进行了测定,为寻找新的微生物絮凝剂提供新的材料来源。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

不同分子量葡聚糖标准品 Dextran, 美国 Fluka 公司;树脂 DEAE sepharose CL-6B、Sephadex G100, 法玛西亚普强公司;蔗糖、牛肉膏、蛋白胨、NaCl、CaCl₂、无水乙醇、氯仿、正丁醇、苯酚、硫酸, 国产分析纯试剂。

1.2 主要仪器

Sartorius PB-10 酸度计, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;UV-1800 紫外可见分光光度计, 岛津(中国)有限公司;恒流泵, 北京博医实验仪器有限公司;BSZ-100 自动部分收集器, 上海嘉鹏科技有限公司;RE-52A 旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器

厂;1200 series 高效液相色谱, 安捷伦生命科技有限公司。

1.3 菌株鉴定及胞外多糖的提取

菌株在牛肉膏蛋白胨培养基^[7]上培养 24 h 后, 呈现黄色不透明的单菌落, 表面光滑, 凸起, 边缘整齐, 菌落直径约为 2 mm, 呈现粘稠状, 革兰氏阳性菌, 芽孢呈椭圆形。将 XJ-27 菌株的 16S rRNA 基因的 PCR 反应产物送样测序后, 得到其序列长度 1 452 bp。使用 BLASTn 在 GenBank 基因库中进行同源性搜索, 并通过相似性比对, 发现菌株与苏云金芽孢杆菌的相似度达到 99%以上, 初步确定该菌为苏云金芽孢杆菌^[6]。

菌株发酵液经 4 000 r/min 离心 15 min, 去除菌体, 准确吸取上清液, 再将预冷 2 h 的 95%乙醇缓慢加入到浓缩液中(体积比 4:1), 边加边搅拌, 有沉淀析出, 把醇沉后的溶液放入冰箱中静置过夜。以 4 000 r/min 离心 15 min, 弃去上清液。残渣用 80%乙醇溶液洗涤, 离心后弃去上清液, 反复操作 3 次。残渣用水定容至 10 mL, 混匀。

1.4 胞外多糖脱蛋白及粗多糖的制备

采用改进的 Sevage 法进行脱蛋白^[8-9], 具体步骤如下: 首先配置 Sevage 试剂, 氯仿:正丁醇=5:1, 再将粗多糖制品与 Sevage 试剂以 5:1 的形式混合, 以上均为体积比, 混合后, 剧烈振荡, 静置 20-30 min, 使混合液完全分层, 除去下层的有机溶剂和界面处的蛋白变性胶状物, 保留上清液, 再按上述比例加入 Sevage 试剂, 如此反复处理 4 次。脱蛋白后的糖溶液 4 °C 透析 48 h 去小分子杂质, 浓缩、真空冷冻干燥后获得粗多糖。粗多糖进行蛋白质含量的测定, 采用 Folin-酚试剂法测定^[10], 用结晶牛血清白

蛋白作标准。

1.5 DEAE sepharose CL-6B 阴离子交换树脂层析纯化

参考文献[11]并进行改进,将粗多糖溶于少量的水中,加入到 DEAE 阴离子层析交换柱中,以浓度为 0.5 mol/L 的 NaCl 进行洗脱,流速为 0.8 mL/min。用部分收集器进行收集,其中每管收集大约 10 mL,通过苯酚硫酸法进行糖含量的测定,并收集多糖部分,进行透析,冷冻干燥后留待下一步纯化,该部分共收集到 2 个峰,根据收集时间的前后,分别命名为 EPS-I 和 EPS-II。

1.6 凝胶柱 Sephadex G100 的纯化

参考文献[12],选取样品 EPS-I,利用 Sephadex G100 凝胶柱进一步纯化,上样量:1 mL,流速 0.8 mL/min,每隔 8 min 收集一管,每管约 6 mL,洗脱液为 0.1 mol/L NH₄Ac,自动部分收集,以苯酚-硫酸法跟踪检测。合并峰部的洗脱液,透析后浓缩冻干。采用紫外分光光度法进行扫描,初步确定其纯度。

1.7 胞外多糖 EPS-I 分子量的测定

参考文献[13],采用高效凝胶渗透色谱法(HP-GPC)测定胞外多糖 EPS-I 的分子量。分析条件:Shodex Sugar KS-805 色谱柱;流动相 0.1 mol/L NaCl 溶液,流速 5 mL/min;柱温 60 °C,示差折光检测器检测。以标准 Dextran T 系列葡聚糖作标准曲线,计算分子量。

1.8 多糖含量的测定

发酵液经 7 000 r/min 离心 15 min,取 2 mL 上清液加 3 倍体积的 95%乙醇,4 °C 沉淀过夜,7 000 r/min 离心 15 min 去上清液,所得沉淀加入蒸馏水溶解,透析 24 h,定容至 20 mL,以葡萄糖作为标准曲线,用苯酚硫酸法^[14]测定多糖的含量。

1.9 絮凝率的测定^[15]

在 100 mL 烧杯中配置 4 g/L 的高岭土悬浊液 50 mL 快速搅拌 1 min,加入 90 mmol/L 的 CaCl₂ 溶液 1 mL,快速搅拌 1 min,然后加入 1 mL 发酵液搅拌 0.5 min 静置 4 min,小心取上清液测 OD₅₅₀,

记为 B。同上用空白样操作,不加入发酵液,OD₅₅₀ 值记为 A,则絮凝率按下式计算: $\eta = (A - B) / A \times 100\%$ 。

2 结果与讨论

2.1 胞外多糖的分离纯化

通过第一步醇沉后粗多糖的产量为 10.51 g/L,然后利用 Sevage 法去除蛋白, Folin-酚试剂法测定蛋白质含量为 0.142%,相对于其他去除蛋白的方法,Sevage 法能很好地除去蛋白,且方法简单,条件温和,不会破坏样品的活性。去除蛋白后的多糖经过透析冷冻干燥后,得到纯白色粉末。

将粗多糖,经 DEAE sepharose CL-6B 离子交换层析,通过条件摸索,确定洗脱液为 0.5 mol/L NaCl,初步分离后,可获得 2 个洗脱峰,见图 1。从图 1 中可见第 1 个峰出现在 5-7 管中,第 2 个峰出现在第 15-18 管中,其中第 2 个峰的多糖含量高于第 1 个。将这两个峰得到的组分依据时间先后分别命名为 EPS-I 和 EPS-II (图 1)。

经过 DEAE sepharose CL-6B 离子交换层析后得到的 EPS-I 进行收集,浓缩干燥后,再进行进一步进行 Sephadex G100 层析纯化,发现 EPS-I 呈现单一峰,且峰形基本对称,如图 2 所示。

2.2 组分 EPS-I 的纯度测定

胞外多糖 EPS-I 经过 α -萘酚显色后,呈阳性反应,表明样品是糖组分。胞外多糖 EPS-I 溶液经紫外扫描在 260 nm 和 280 nm 处未见吸收峰,说明样品中不含蛋白质、多肽和核酸,见图 3。

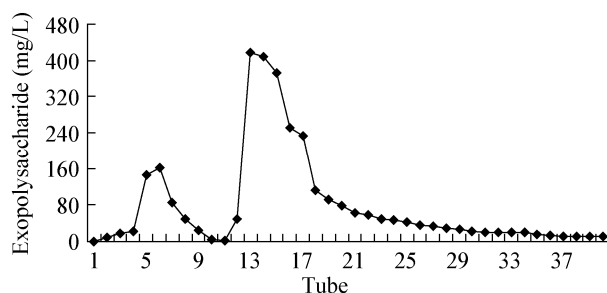


图 1 胞外粗多糖 DEAE sepharose CL-6B 离子交换洗脱图
Figure 1 Elution graph of crude polycaccharide in DEAE sepharose CL-6B column

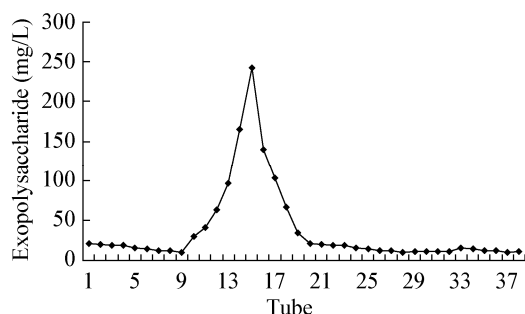


图2 EPS-I的Sephadex G100凝胶洗脱图
Figure 2 Elution graph of the EPS-I in Sephadex G100 column

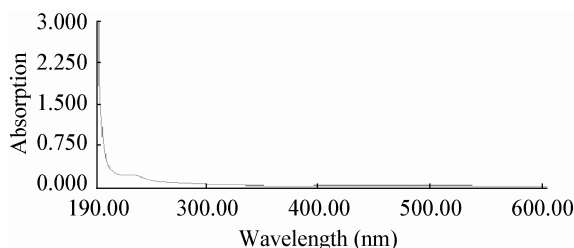


图3 EPS-I的全波长扫描图谱
Figure 3 Result of absorption spectrum of EPS-I

2.3 EPS-I分子量的测定

EPS-I 经过高效液相凝胶渗透色谱分析显示为单一一对称峰，出峰时间为 23.95 min，如图 4 所示，根据标准葡聚糖洗脱结果，以标准葡聚糖的保留时间为 x 轴，以分子量的对数为 y 轴制作标准曲线，所得方程为： $y = -0.210 \ln x + 10.794$ ($R^2 = 0.9832$)， y 为分子量的对数值，计算得到 EPS-I 的分子量为 575 kD。

2.4 胞外多糖絮凝性的研究

以高岭土为体系，研究该菌株的絮凝性，经过絮凝活性实验测得微生物胞外多糖对高岭土悬液的絮凝率为 80.4%。

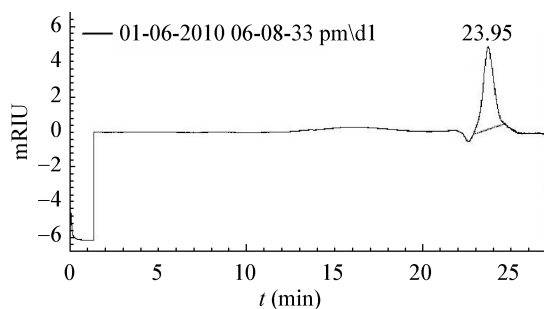


图4 EPS-I 高效液相色谱分析
Figure 4 HPLC analysis of EPS-I

3 结论

本文通过传统的分离、筛选和纯化方法，得到一株高产胞外多糖的菌株，经鉴定为苏云金芽孢杆菌，对该胞外多糖分别进行 DEAE sepharose CL-6B 和 Sephadex G100 层析分离纯化后，共得到 2 个组分，对其中一个组分 EPS-I 进行纯度和分子量的分析后，表明组分 EPS-I 的分子量为 575 kD；而且发现了该胞外多糖的一个有效的功能，即具备一定的絮凝效果，絮凝率为 80.4%。众所周知，微生物絮凝剂因其无毒、无害、没有二次污染，是一种非常好的污水处理剂，在本研究中发现新的微生物絮凝剂的筛选来源，不仅为沙漠生物结皮微生物的筛选和利用提供了可参考的科学依据，同时也为水资源的污染处理带来了新的研究对象。

参考文献

- [1] Redfield E, Barns SM, Belnap J, et al. Comparative diversity and composition of *Cyanobacteria* in three predominant soil crusts of the Colorado Plateau[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2002, 40(1): 55-63
- [2] Wu J, Ye H. Characterization and flocculating properties of an extracellular biopolymer produced from a *Bacillus subtilis* DYU1 isolate[J]. Process Biochemistry, 2007, 42(7): 1114-1123
- [3] Brabender M, Kiss ÁK, Domonell A, et al. Phylogenetic and morphological diversity of novel soil Cercomonad species with a description of two new genera (*Nucleocercomonas* and *metabolomonas*)[J]. Protist, 2012, 163(4): 495-528
- [4] Liu C, Wang K, Jiang J, et al. A novel bioflocculant produced by a salt-tolerant, alkaliphilic and biofilm-forming strain *Bacillus agaradhaerens* C9 and its application in harvesting *Chlorella minutissima* UTEX2341[J]. Biochemical Engineering Journal, 2015, 93: 166-172
- [5] Liu W, Yuan H, Yang J, et al. Characterization of bioflocculants from biologically aerated filter backwashed sludge and its application in dyeing wastewater treatment[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(9): 2629-2632
- [6] Wang ZR, Shen JP, Tian XL, et al. Optimization the production of exopolysaccharides by *Bacillus thuringiensis* 27 in sand biological soil crust and its bioflocculant activity[J]. African Journal of Microbiology Research, 2011, 16(5): 2359-2366
- [7] Quan GJ. Laboratory Experiments in Microbiology[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2010: 122 (in Chinese)
- [8] 全桂静. 微生物学实验[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 122
- [9] Dong YW, Miao JZ, Cao ZH, et al. The Influence of different technique condition on the extracting of *Lappa polysaccharides* by double enzymes[J]. Journal of Xuzhou Institute of Technology, 2007, 22(12): 20-23 (in Chinese)
- [10] 董玉玮, 苗敬芝, 曹泽虹, 等. 不同工艺条件对酶法提取牛蒡多糖的影响[J]. 徐州工程学院学报, 2007, 22(12): 20-23
- [11] Guo YD, Shan B, Li MY. Study on the removal of protein from polysaccharides of *Momordica charantia* L.[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2009, 37(7): 3225-3227 (in Chinese)
- [12] 郭育东, 单斌, 李敬仪. 苦瓜多糖脱蛋白方法的比较研究[J].

