

一株耐辐射新菌种的分离鉴定及其多糖的抗氧化研究

宋素琴^{1,2*} 顾美英^{1,2} 朱静^{1,2} 张志东^{1,2} 王伟^{1,2} 唐琦勇^{1,2} 谢玉清^{1,2} 张丽娟^{1,2}

(1. 新疆农业科学院微生物应用研究所 新疆 乌鲁木齐 830091)

(2. 新疆特殊环境微生物实验室 新疆 乌鲁木齐 830091)

摘要:【目的】确定新疆辐射污染土样中分离筛选获得的一株产多糖的耐辐射菌株 W36-1 的分类学地位和抗氧化特性。【方法】对该菌株进行的 ⁶⁰Co 辐照, 结合菌落形态和菌丝特征显微观察、Biolog 鉴定以及 16S rRNA 基因序列分析。采用苯酚硫酸法测定其多糖含量, 采用 Fenton 法测定多糖的粗提物对超氧阴离子清除率; 用 DPPH 法测定抗氧化性; 采用邻苯三酚自氧化法测定对超氧阴离子的清除率。【结果】W36-1 可耐 5 kGy 辐照, 为一株欧文氏菌属(*Erwinia*)新种; 其粗多糖含量为 53.17%, 该多糖对超氧阴离子清除率为 75.63%, 对 DPPH 清除率为 62.43%, 羟基自由基去除率为 54.89%。【结论】菌株 W36-1 产的多糖具有抗氧化性。

关键词: 耐辐射筛选, *Erwinia* sp., 鉴定, 多糖, 抗氧化活性

Isolation and identification of a new radiation-tolerant species and the antioxidant of its polysaccharides

SONG Su-Qin^{1,2*} GU Mei-Ying^{1,2} ZHU Jing^{1,2} ZHANG Zhi-Dong^{1,2} WANG Wei^{1,2}
TANG Qi-Yong^{1,2} XIE Yu-Qing^{1,2} ZHANG Li-Juan^{1,2}

(1. Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi, Xinjiang 830091, China)

(2. Xinjiang Laboratory of Special Environmental Microbiology, Urumqi, Xinjiang 830091, China)

Abstract: [Objective] The taxonomic status and antioxidant properties were studied on the radiation resistant strain W36-1 producing polysaccharide from the radiation-tainted soil of Xinjiang. [Methods] The strain W36-1 with the ⁶⁰Co gamma rays irradiation was classified in combination with characteristics of hyphae of colony morphology and microscopic observation and Biolog appraisal and the analysis of the 16S rRNA gene sequences. Phenol-sulfuric acid method was employed to determine polysaccharide contents, the polysaccharides on O²⁻ scavenging effect were measured by the Fenton method, the anti-oxidative effects of extracts were studied by using DPPH and pyrogallol autooxidation methods. [Results] The strain W36-1 was a novel species as genera *Erwinia*, and it could survive at 5 kGy of the ⁶⁰Co gamma rays irradiation. The crude polysaccharide content was 53.17%, its polysaccharide to the ultra oxygen anion clearance rate was 75.63%, the DPPH clearance rate was 62.43%, the hydroxyl free radical removal rate was 54.89%. [Conclusion] The polysaccharide from the strain W36-1 has the antioxidant capacity.

Keywords: Resistance to ⁶⁰Co gamma rays, *Erwinia* sp., Identification, Polysaccharide, Antioxidant activity

基金项目: 新疆自然科学基金项目(No. 2012211A100)

*通讯作者: Tel/Fax: 86-991-4520524; 邮箱: suqin_song@163.com

收稿日期: 2013-11-11; 接受日期: 2014-04-25; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-04-30

多糖是生物体内除蛋白质和核酸外又一类重要的生物大分子,具有抗感染、免疫促进、肿瘤防治和抗氧化等多方面功能和生物活性的特征,在医药领域有着广阔的应用前景,此外还可作为食品添加剂、食品防腐保鲜剂、化妆品、动物饲料及环境治理中^[1-2]。与其他多糖相比,微生物多糖具有以下优势:生产周期短,不受季节、地域、病虫害等条件的限制;具有较强的市场竞争力和广阔的发展前景;已作为胶凝剂、成膜剂、保鲜剂、乳化剂等广泛应用于食品、制药、石油和化工等多个领域。据估计,目前全世界微生物多糖年加工业产值可达80 亿元左右^[3-5]。

目前微生物活性多糖的研究对象包括真菌类、细菌、地衣、藻类等,担子菌门真菌中分离纯化得到的香菇多糖、裂褶多糖、云芝多糖、茯苓多糖等,具有不同程度的抗肿瘤功能,在国内外临床上已普遍应用^[6-7]。海洋和南极特殊环境微生物产生的胞外多糖,由于其新颖的结构特征、独特的化学性质、丰富的生物活性以及潜在的商业价值,成为了近几年新的研究热点^[8]。新疆特殊多样的生态环境孕育了特殊多样的微生物资源^[9]。

本研究筛选到一株具有抗氧化性的欧文氏菌属(*Erwinia*)潜在新种。现有研究表明欧文氏菌属具有多种生物学特性与功能,如在医药及化妆品领域可产多糖类物质、具免疫调节功能^[9];在环境工程领域具高效脱色性能^[10]以及高抗重金属铅和镉^[10-11],是具有重大工业开发前景的一类微生物。而本研究发现的欧文氏菌属新种能够产生较多的多糖物质,并具有一定的研究和开发的价值和意义。

因此,本文对从新疆辐射干旱区分离的一株大量产生多糖的微生物进行了鉴定,并对其多糖的提取和纯化以及多糖的抗氧化性进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土样: 采自新疆辐射干旱区荒漠土壤。

1.1.2 培养基: 马铃薯葡萄糖培养基(PDA, g/L): 马

铃薯 200, 葡萄糖 20, 琼脂粉 16, 纯净水, pH 自然。

查氏培养基(g/L): NaNO₃ 2.00, K₂HPO₄ 1.00, KCl 0.50, MgSO₄ 0.50, FeSO₄ 0.01, 蔗糖 30, 琼脂粉 16, 纯净水, pH 自然。

1.1.3 仪器和试剂: UV-2550 紫外-可见分光光度计, 日本岛津公司; DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)、浓硫酸分析纯 95.5%、6%苯酚、分析纯葡萄糖, 均购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 菌种的分离和纯化: 采用常规梯度稀释平板涂布培养法, 30 ℃ 恒温培养 48-72 h, 并定期观察。挑选在 PDA 培养基上生长并大量产生粘稠多糖的单菌落, 进行分离纯化并保存至斜面。

1.2.2 ⁶⁰Co 不同辐照剂量对菌株进行耐辐射筛选: 设立 ⁶⁰Co 不同辐照剂量(0、1.25、2.50 和 5.00 kGy)对菌株进行耐辐射筛选。

1.2.3 菌种鉴定: (1) 菌株生理生化鉴定。菌株的形态特征鉴定参照东秀珠等《常见细菌系统鉴定手册》^[9], 生理生化鉴定使用 Biolog GN2 板碳源利用, 初步确定该菌株的归属。

(2) 菌株 16S rRNA 基因序列测定及系统发育树的构建^[12]。菌株采用细菌基因组 DNA 抽提试剂盒, 进行总 DNA 的提取。然后进行 16S rRNA 基因的 PCR 扩增, 引物为: 正向引物 27F: 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 反向引物 1492R: 5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3', 产物经胶纯化洗脱后, 送往测序公司进行测序。

将实验菌株所得 16S rRNA 基因序列与 GenBank 数据库中的已知序列进行 BLAST 比对, 确定与实验菌株亲缘关系最近的种属, 并从数据库获得相关种属的 16S rRNA 基因序列构建系统发育进化树^[13], 进一步确定其生物分类学地位。

1.2.4 多糖的提取和纯化: (1) 多糖的提取分离。对菌株 W36-1 进行发酵培养 72 h 后, 取 100 mL 发酵液在 6 000 r/min 条件下离心 10 min, 上清液加入 3 倍体积的无水乙醇, 混匀后静置过夜, 析出

的沉淀物在 6 000 r/min 条件下离心 30 min, 所得的沉淀物用 70% 乙醇洗涤 2-3 次, 恒温通风 40 ℃ 干燥得多糖粗品^[14]。

(2) 多糖的纯化。用 Savag 法去蛋白, 重复 5 次。以水溶解, 采用紫外-可见分光光度计进行全波段(200-800 nm)紫外-可见光扫描分析, 其吸收峰在 200-300 nm, 符合多糖描述特征^[15]。

1.2.5 多糖的定性显色、纯化评价和含量测定: 将纯化后的多糖以水溶解, 分别以 α -萘酚浓硫酸溶液和茚三酮溶液显色, 同时在紫外测 250-280 nm 有无吸收峰^[15]。采用苯酚硫酸法测定多糖的含量^[16]。

1.2.6 多糖的抗氧化功能: (1) 清除 DPPH 自由基的能力测定。参照文献[17]方法。

$$\text{清除率}(\%) = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100$$

其中: A_1 : 加提取液后 DPPH 溶液的吸光度; A_2 : 提取液的吸光度; A_0 : 未加提取液时 DPPH 溶液的吸光度。

(2) 清除羟自由基作用的测定^[15-16]。用 Fenton 试剂: 加入 1 mL 0.15 mol/L FeSO_4 溶液, 0.3 mL 2 mmol/L 水杨酸, 样品溶液 1 mL, 最后加入 0.7 mL 6 mmol/L H_2O_2 启动, 25 ℃ 反应 1 h, 测定 OD_{510} ^[17]。

$$\text{自由基清除率}(\%) = [1 - (A_i - A_{0i}) / A_0] \times 100$$

A_0 : 对照不加样品; A_i : 样品的吸光值; A_{0i} : 不加水杨酸样品的吸光值。

(3) 超氧阴离子清除率的测定。采用邻苯三酚自氧化法, 具体操作参照文献[16-17], 稍作修改。按下式计算抗氧化剂清除率。

$$\text{清除率}(\%) = (A_0 - A_1 + A_2) / A_0 \times 100$$

式中: A_0 : 不加样品的对照值; A_1 : 加样品后的测定值; A_2 : 样品在体系中的吸光值。

2 结果与分析

2.1 菌株 W36-1 的耐辐射测定

设立 ^{60}Co 不同辐照剂量对菌株进行耐辐射筛选, 发现菌株 W36-1 可耐 5.00 kGy 辐照, 为耐辐射菌株(图 1)。

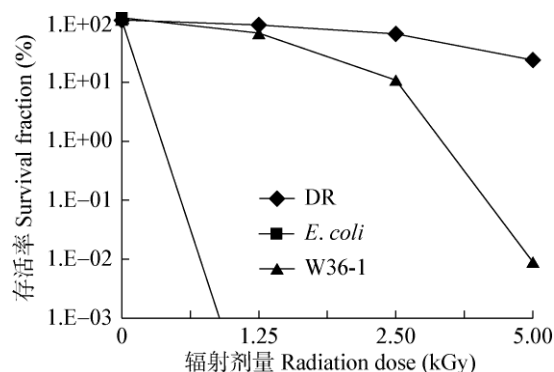


图 1 菌株 W36-1 的耐辐射测定

Figure 1 Determination of resistance to radiation of the strain W36-1

2.2 多糖产生菌 W36-1 的鉴定

菌株 W36-1 菌落表面呈圆形、光滑湿润、凸起、乳白色、黏稠不易挑取, 透明; 革兰氏阴性(G^-)、氧化酶反应阴性、好氧、细胞杆状、不形成芽孢; 可在中温范围内(15-45 ℃)生长^[18], 菌落形态见图 2, 菌体形态见图 3。



图 2 菌株 W36-1 菌落形态

Figure 2 The colony morphology of the strain W36-1

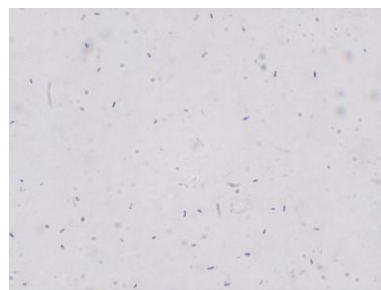


图 3 菌株 W36-1 菌体形态

Figure 3 The cell morphology of the strain W36-1

经 Biolog GN2 鉴定板对其进行鉴定表明, W36-1 菌株的鉴定结果 SIM 值均小于 0.5, 与克吕沃尔氏菌属 *Kluyvera cochleae* 的 SIM 值仅为 0.35, 说明该菌株可能为一株新种。生理生化鉴定见表 1。

通过进一步对菌株 16S rRNA 基因序列测定及与 GenBank 中序列比对分析, 使用 MEGA 5.0 进行 ClustalX 多重比对, 分别利用 NJ 法构建系统发

育进化树。结果表明, 其中菌株 W36-1 在进化树中落于 *Erwinia* 属分支中, 并具有较高的支持率, 系统学地位明显。与相似性最高的标准模式菌 *Erwinia pyrifoliae* Ep1/96^T (AJ009930)最大相似性为 97.1%, 与同属其它菌株小于 97.0%, 极可能为新种, 其生物学名称暂定为 *Erwinia* sp. W36-1。其系统发育树见图 4。

表 1 Biolog Microstation 系统的 GN2 测定卡菌株 W36-1 的生理生化特性							
Table 1 Physiological characteristics of strain W36-1							
生理生化反应	结果	生理生化反应	结果	生理生化反应	结果	生理生化反应	结果
Reaction	Results	Reaction	Results	Reaction	Results	Reaction	Results
m-肌醇	—	山梨醇	+	龙胆二糖	+	尿苷	—
m-Inositol	—	D-Sorbitol	+	Gentiobiose	+	Uridine	—
D-纤维二糖	+	海藻糖	+	松二糖	+	木糖醇	—
D-Cellobiose	+	D-Trehalose	+	Turanose	+	Xylitol	—
D-阿拉伯糖	—	L-丙氨酸	+	丙三醇	+	L-丝氨酸	—
D-Arabitol	—	L-Alanine	+	Glycerol	+	L-Serine	—
D-果糖	+	D-半乳糖	+	柠檬酸	+	糊精	+
D-Fructose	+	D-Galactose	+	Citric acid	+	Dextrin	+
D-葡萄糖酸	+	L-棉子糖	+	α-D-乳糖	+	蔗糖	—
D-Gluconic acid	+	L-Rhamnose	+	α-D-Lactose	+	Sucrose	—
D(L)-乳酸	+	肌苷	+	琥珀酸	—	L-谷氨酸	—
D,L-Lactic acid	+	Inosine	+	Succinic acid	—	L-Glutamic acid	—
乙酸	+	D-棉籽糖	+	α-D-葡萄糖	+	D,L-肉碱	—
Acetic acid	+	D-Raffinose	+	α-D-Glucose	+	D,L-Carnitine	—

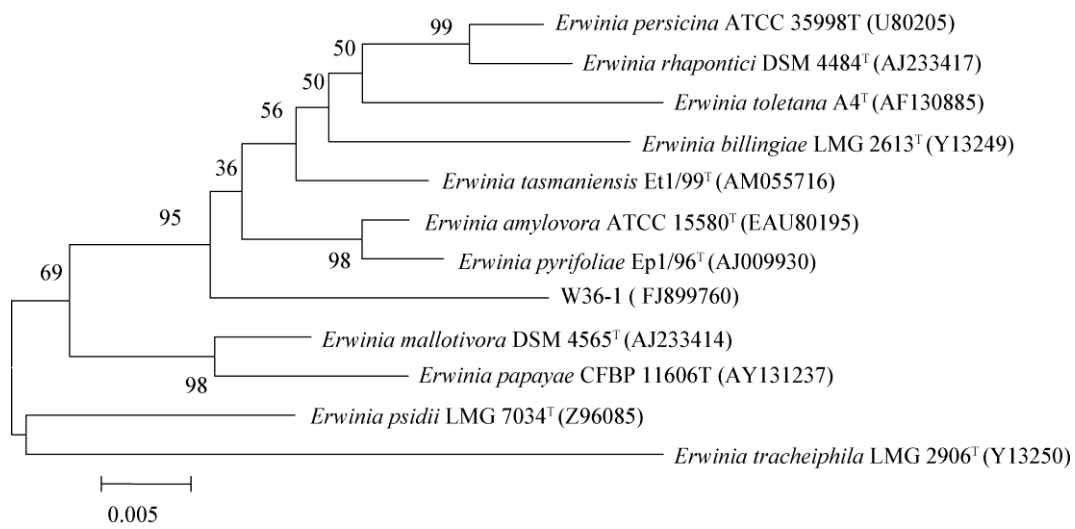


图 4 菌株 W36-1 的 16S rRNA 基因序列 N-J 法构建的系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree showing the positions of strain W36-1 based on 16S rRNA gene sequences by the Neighbour-Joining method of MEGA

2.3 多糖的提取和纯化

2.3.1 多糖的提取分离和纯化:胞外多糖提取分离主要包括灭菌、粗提取、除蛋白质及小分子等杂质、分级分离等几个步骤。纯化后的多糖紫外-可见光扫描结果如图 5 所示,在 200 nm 左右处出现其吸收峰值,符合多糖的特征。

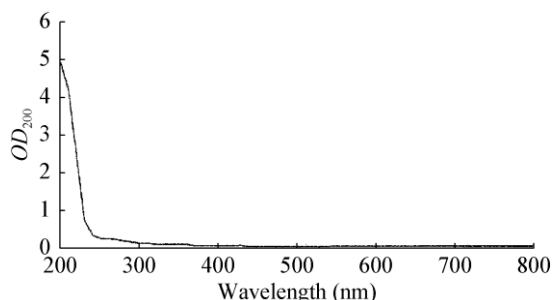


图 5 W36-1 菌株产多糖的紫外-可见光光谱图

Figure 5 Ultraviolet and visible spectrum of the polysaccharide

2.3.2 多糖的定性显色、纯化评价和含量测定:该多糖呈乳白色,微溶于水,不溶于无水乙醇、丙醇、乙醚、乙酸乙酯。a-萘酚浓硫酸溶液显紫色,茚三酮溶液不显色,说明纯化后的物质是多糖,而且没有蛋白质,纯化效果好。同时在 260 nm 和 280 nm 处无明显吸收峰,进一步表明多糖提取物中不含蛋白质和核酸。苯酚硫酸法测定其多糖的含量为 53.17%。

2.4 多糖的抗氧化研究

该多糖对超氧阴离子清除率为 75.63%,对 DPPH 清除率为 62.43%,羟基自由基去除率为 54.89%。

3 结论与讨论

3.1 多糖产生菌株的鉴定

本研究从产多糖的微生物中筛选出一株具有抗氧化活性的菌株,具有很强的针对性。选育到一株有较高抗氧化性的菌株 W36-1,经 16S rRNA 基因测序、比对分析发现与欧文氏菌属(*Erwinia* sp.)同源相似性最高,与 *Erwinia pyrifoliae* Ep1/96^T (AJ009930)最大相似性为 97.1%,与同属其它菌株

小于 97.0%,确定其为欧文氏菌属新种^[18-20]。

3.2 欧文氏菌产多糖的研究现状

目前,真菌多糖在生物学、医学、药理学、食品科学等领域进行了大量的研究,国内外已从近 300 种真菌(分属 51 科 70 多个属)中筛选到 20 余种有生物活性的多糖物质,其中我国发现有重要价值的真菌多糖 30 多种,对灵芝多糖、云芝多糖、香菇多糖、猴头多糖等多糖研究较多^[21-22]。

国内研究欧文氏菌主要集中在病原菌的研究,重点研究其致病性的较多。国外研究欧文氏菌产多糖产物的报道,Gray 等^[23]研究了 *Erwinia chrysanthemi* 胞外多糖的结构;Fukuoka 等^[24]对 *Erwinia carotovora* 脂多糖做了物理化学分析,同时做了其作为内毒素的活性研究。

参 考 文 献

- [1] 章栋梁,郭向莹,余南静,等. 多糖生物活性及应用研究新进展[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(9): 2282-2285.
- [2] 辛娟,王远亮,郭莉霞,等. 多糖的生物活性及其应用[J]. 生物医学工程研究, 2004, 23(3): 56-99.
- [3] 谢遵江,刘文庆,方传龙,等. 多糖类药物对 LAK 细胞增殖功能的影响和抑瘤作用的实验研究[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2002, 9(2): 6-7.
- [4] 杜晓光,耿美玉. 糖类药物[J]. 生命科学, 2011, 23(7): 671-677.
- [5] 李慧芬,李翠妮,徐红星,等. 菌类多糖应用研究进展[J]. 陕西农业科学, 2006(5): 77-80.
- [6] 崔艳红,黄现青. 微生物胞外多糖研究进展[J]. 生物技术通报, 2006, 14(2): 25-28,42.
- [7] 杜志强. 微生物多糖生物活性的研究进展 [A]//International Science and Engineering Center, Hong Kong、Wuhan Institute of Technology, China.Proceedings of 2010 First International Conference on Cellular, Molecular Biology, Biophysics and Bioengineering[C]. International Science and Engineering Center, Hong Kong, Wuhan Institute of Technology, China, 2010, 7: 2.
- [8] 郭守东. 微生物胞外多糖的结构及其抗氧化活性研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 2010.
- [9] 毛培宏,金湘,王芸,等. 新疆特殊环境微生物资源的研究与发展[J]. 生物技术, 2006, 16(5): 88-91.
- [10] 徐向阳,张明洲,俞秀娥. 高效脱色菌的特性及其在染化废水厌氧处理中的生物强化作用[J]. 中国沼气, 2001, 19(2): 3-7,29.

- [11] 张士晋. 环境条件对重金属抗性菌株 J-34活化重金属铅镉的效应研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2006.
- [12] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 364-370.
- [13] 远方, 屈淑平, 崔崇土, 等. 一株新的胡萝卜软腐欧文氏菌的分离和鉴定[J]. 微生物学报, 2004, 44(2): 136-140.
- [14] 赵靛. 云南野生大红菇多糖提取及抗氧化性和抑菌性研究[D]. 昆明: 昆明理工大学硕士学位论文, 2012.
- [15] 郭振楚. 糖类化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 40-42, 59-63.
- [16] 田广文, 陈德育, 李学俊, 等. 猪苓多糖苯酚-硫酸法测定条件的优选[J]. 中国农学通报, 2007, 23(7): 75-78.
- [17] 郑善元, 陈填烽, 郑文杰, 等. 单丛茶水提物清除 DPPH 和 ABTS 自由基的光谱学研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30(9): 2417-2423.
- [18] 曾维才, 石碧. 天然产物抗氧化活性的常见评价方法[J]. 化工进展, 2013, 32(6): 1205-1213, 1247.
- [19] 袁建锋, 蔡恒, 单咸旸, 等. 一株芽孢杆菌胞外多糖的分离纯化及其抗氧化性测定[J]. 微生物学通报, 2009, 36(10): 1466-1470.
- [20] 赵玲, 柴兆祥, 李金花, 等. 四株胡萝卜软腐欧文氏杆菌胡萝卜亚种新菌株的分离鉴定[J]. 草业学报, 2011, 20(4): 244-251.
- [21] 张志东, 谢玉清, 楚敏, 等. 山药内生菌的分离及菌种鉴定研究[J]. 新疆农业科学, 2010, 47(1): 126-129.
- [22] Isaksson J, Karim S, Mandal A. Extracellular enzymes of *Erwinia carotovora* eliminate the need for azacytidine treatment for high frequency transformation of *Arabidopsis thaliana*[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 1998, 34(1): 41-45.
- [23] Gray JS, Brand JM, Koerner TA, et al. Structure of an extracellular polysaccharide produced by *Erwinia chrysanthemi*[J]. *Carbohydrate Research*, 1993, 245(2): 271-287.
- [24] Fukuoka S, Brandenburg K, Müller M, et al. Physico-chemical analysis of lipid A fractions of lipopolysaccharide from *Erwinia carotovora* in relation to bioactivity[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, 1510(1/2): 185-197.

稿件书写规范

高校教改纵横栏目简介及撰稿要求

“高校教改纵横”栏目, 是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教学类栏目, 也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教学栏目。该栏目专为微生物学及其相关学科领域高校教师开辟, 一方面为高校微生物学科的教师提供一个发表论文的平台, 同时微生物关联学科的一部分确实优秀的论文也可以在此发表, 是微生物学及相关领域教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其他实验类研究报告, 特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线, 撰写的稿件内容必须要有新意、要实用, 不是泛泛地叙述教学设计与过程, 而是确实有感而发, 是教学工作中的创新体会, 或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性, 做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进, 注意将国内外新的科技成果和教学理念贯穿到教学之中, 只有这样才能真正起到教与学的互动, 促进高校生物学教学的发展, 更多更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时, 为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台, 本栏目还开辟了“名课讲堂”版块, 邀约相关生命科学领域, 如微生物学、分子生物学、生物医学、传染病学、环境科学等的教学名师、知名科学家就教学和学生培养发表观点, 推荐在教学改革、教学研究、引进先进教学手段或模式以及学生能力培养等方面有突出成绩的优秀论文, 为高校教师以及硕士、博士研究生导师提供一个可资交流和学习的平台, 促进高校教学和人才培养水平的提高。

欢迎投稿! 欢迎对本栏目多提宝贵意见!