

芽孢杆菌活性多糖的分离纯化及合成基因研究

韩玉竹^{1,2,3}, 刘恩岐¹, 李彦岩², 刘丽莎⁴, 范 熠², 李平兰^{2,*}

(1.徐州工程学院, 江苏省食品资源开发与质量安全重点实验室, 江苏 徐州 221111;

2.中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 3.西南大学荣昌校区动物科学系, 重庆 402460;

4.北京市食品科学研究院, 北京 100162)

摘 要: 选用自行选育的1株活性多糖高产菌株(*Bacillus amyloliquefaciens* LPL061), 经醇沉、除蛋白、透析、冷冻干燥从其发酵上清中分离得到活性多糖粗品, 并采用色谱纯化技术进一步纯化, 得到1个中性糖组分(EPS1)和1个酸性糖组分(EPS2)。根据GeneBank中已报道芽孢杆菌产糖相关基因设计引物, 经PCR扩增获得解淀粉芽孢杆菌LPL061的5个EPS生物合成相关基因。对其功能预测分析表明这些基因主要参与EPS合成过程多糖聚合、糖基转移、糖链长度控制以及多糖转运和输出。

关键词: 解淀粉芽孢杆菌; 胞外多糖; 分离纯化; 基因簇

Separation and Purification of Exopolysaccharides from *Bacillus amyloliquefaciens* and Bioinformatic Analysis of Exopolysaccharide Biosynthesis

HAN Yu-zhu^{1,2,3}, LIU En-qi¹, LI Yan-yan², LIU Li-sha⁴, FAN Yi², LI Ping-lan^{2,*}

(1. Jiangsu Key Laboratory of Food Resource Development and Quality Safety, Xuzhou Institute of Technology, Xuzhou 221111, China;

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

3. Department of Animal Science, Rongchang Campus, Southwest University, Chongqing 402460, China;

4. Beijing Academy of Food Sciences, Beijing 100162, China)

Abstract: In this paper, lyophilized crude exopolysaccharides (EPS) were isolated by ethanol precipitation, deproteinization and dialysis from the cell-free culture supernatant of *Bacillus amyloliquefaciens* LPL061, demonstrated to be able to produce high amounts of EPS, and fractionated into two peaks by anion exchange chromatography on DEAE-Sepharose fast flow column, named as EPS1 and EPS2. The high yield and favorable proportion of EPS1 and EPS2 were obtained in optimized medium (pH 7.0) containing 22 g/L sucrose and 18.4 g/L yeast extract when *B. amyloliquefaciens* LPL061 was cultivated at 28 °C at 220 r/min for 24 h. The specific primers of EPS A, EPS B, EPS C, EPS E and EPS G were designed according to the conservative gene sequences of *B. amyloliquefaciens* DSM 7 from GenBank (accession number: NC_014551.1). The bioinformatic alignment and analysis from GeneBank database searching showed that the 5 genes had high homology with the EPS biosynthetic genes of *Bacillus amyloliquefaciens* reported in NCBI, respectively. We acquired 5 gene sequences such as repeat unit transporter (Wzx). Functional prediction analysis of open reading frames indicated that these 5 genes were involved mainly in polysaccharide chain length determination, polymerization and export.

Key words: *Bacillus amyloliquefaciens*; exopolysaccharides; isolation and purification; gene cluster

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2014)11-0179-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201411036

胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)是微生物生长代谢过程中分泌到细胞壁外的黏液或荚膜多糖;是一种包含有分支结构的, 单糖或单糖衍生物的重复单位组

成的长链多糖;是具有广泛生物活性和工艺学特性的天然大分子物质^[1]。多糖因具有调节免疫、抗肿瘤、抗病

收稿日期: 2014-01-08

基金项目: 江苏省食品资源开发与质量安全重点实验室资助项目(SPKF201301); 公益性行业(农业)科研专项(20113030144);

国家自然科学基金面上项目(31271827; 31101760); 北京市自然科学基金项目(5122018);

中央高校基本科研业务费专项资金项目(XDJK2011C034); 西南大学博士基金项目(2013Bsr06)

作者简介: 韩玉竹(1982—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为微生物活性代谢产物。E-mail: 63214419@qq.com

*通信作者: 李平兰(1964—), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品微生物。E-mail: lipinglan@cau.edu.cn

血脂等多种药理作用^[2], 也因其其在低浓度下良好的流变学特性和乳化特性, 具有良好的pH值稳定性和热稳定性等优势, 越来越受到研究人员的重视, 并逐渐成为现代生物、医药、食品和化工行业的研究开发重点, 具有很大的发展潜力^[3-4]。

目前醋酸杆菌属 (*Acetobacter*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、明串珠菌属 (*Leuonostoc*) 和乳球菌属 (*Lactococcus*) 等细菌胞外多糖的研究较多^[5], 但大多数产糖细菌对生长条件要求苛刻且产糖量低, 大大限制了活性EPS的进一步应用和发展。因此, 选育培养条件简单粗放、EPS产量高的菌株是当前研究的重要方向, 芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) 能产生抗逆性的芽孢、生命力顽强、对培养条件要求较低, 因此具有产糖能力的益生芽孢杆菌是获取EPS的理想菌株来源。但国内外关于芽孢杆菌EPS的研究较少, EPS的产业化生产工艺及具体成分的功能还不清楚, EPS合成基因簇及代谢调控鲜有报道, 严重限制了芽孢杆菌EPS在产业中的应用。

本实验选用自行选育的高产活性EPS芽孢杆菌菌株LPL061^[6], 前期研究已证实所产EPS粗品具有免疫调节活性, 且具有良好的乳化和流变特性^[7]。本研究在此基础上, 对活性EPS粗品进行分离纯化, 制备色谱级的EPS纯品, 并对EPS合成相关基因簇的结构和序列进行分析。结果不仅为找到高效快速利用芽孢杆菌多糖的途径、完善产业化生产工艺、弄清芽孢杆菌多糖的有效成分和功能的关系提供依据, 也为探明EPS的合成机制及对多糖结构的调控途径、后续利用基因工程技术进一步提高EPS产量提供理论依据, 同时也为进一步开发新型食品、饲料添加剂、保健食品提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 菌株与培养基

胞外多糖高产菌株LPL061分离自康乃馨, 由本实验室分离并保存。该菌株通过形态观察、生理生化试验、16S rDNA同源性序列分析以及部分特异性基因序列分析, 鉴定该菌为解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)^[6]。

选用本实验前期优化后的产糖培养基: 蔗糖22 g/L、酵母膏18.4 g/L, pH 7.0; 发酵条件: 温度28 ℃、转速220 r/min、接种量3%、发酵时间24 h, 胞外多糖产量达4.46 g/L^[8]。

1.2 仪器与设备

TC-512聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪 英国TechNet公司; BG-Power 300电泳仪 北京百晶生物技术有限公司; 玻璃离子交换柱 (2.6 cm × 20 cm,

填充DEAE-Sepharose Fast Flow)、玻璃凝胶过滤柱 (1.6 cm × 80 cm, 填充Sepharose CL-6B) 美国Pharmacia公司; UV-1800型紫外-可见分光光度计 上海美谱达仪器有限公司; DHL-A电脑恒流泵、TH-500梯度混合器、BS-100A自动部分收集器 上海青浦沪西仪器厂; LGJ-12冷冻干燥机 北京松源华兴科技发展有限公司。

1.3 方法

1.3.1 芽孢杆菌EPS的提取

将芽孢杆菌培养液10 000 r/min离心10 min去除菌体细胞; 取上清液加入3倍体积无水乙醇, 4 ℃醇沉过夜; 10 000 r/min离心10 min收集沉淀, 用少量去离子水复溶后, 8 000 D透析袋4 ℃透析48 h, 每8 h换1次水, 除去乙醇、小分子糖、蛋白质、盐等。真空冷冻干燥后得EPS粗品, 避光干燥保存备用。

1.3.2 芽孢杆菌EPS的分级纯化

1.3.2.1 DEAE Sepharose Fast Flow阴离子交换柱分级纯化

用EPS粗品配制成10 mg/mL溶液, 0.45 μm微孔滤膜过滤后上样, 经DEAE Sepharose Fast Flow柱层析, 上样量为7 mL, 依次用0.05 mol/L Tris-HCl缓冲液 (pH 7.50) 和0~1.0 mol/L Tris-HCl-NaCl 缓冲液线性梯度混合洗脱, 流速4.0 mL/min, 部分收集器收集洗脱液, 每管收集8 mL, 收集40管, 逐管检测蛋白质含量 (紫外 $A_{280\text{ nm}}$) 和多糖含量 (苯酚-硫酸法 $A_{490\text{ nm}}$), 按检测值分别合并收集单一峰组分, 去离子水透析、冷冻干燥。

1.3.2.2 凝胶色谱层析

将DEAE Sepharose Fast Flow阴离子交换柱分级纯化后冻干的样品复溶, 配制成10 mg/mL溶液, 0.45 μm微孔滤膜过滤后上样, 0.05 mol/L NaCl洗脱, 流速30 mL/h、12 min/管, 自动部分收集器收集洗脱液。逐管检测蛋白质含量 (紫外 $A_{280\text{ nm}}$) 和多糖含量 (苯酚-硫酸法 $A_{490\text{ nm}}$), 按检测值分别合并收集单一峰组分, 去离子水透析、冷冻干燥^[9]。

1.3.3 多糖纯度测定

1.3.3.1 紫外扫描

将EPS配成0.1 mg/mL的溶液, 以去离子水为空白对照, 用紫外-可见分光光度计在波长200~580 nm范围内进行紫外全波长扫描, 检测是否有蛋白质 (280 nm) 和核酸 (260 nm) 等杂质吸收峰。

1.3.3.2 高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 法

利用K-501高效液相色谱、KS-805 Shodex糖柱、示差检测器, 在柱温60 ℃、流速1.0 mL/min、0.1 mol/L NaNO₃作流动相、样品质量浓度5.0 mg/mL、进样量10 μL、进样速率15 min/个、进样间隔10 min的条件下检测。

1.3.3.3 扫描电镜观察

取适量芽孢杆菌EPS样品黏着于样品台上,置真空溅射仪内镀导电层,电子枪加速电压为15 kV, EPS粗品和分级后的纯品(EPS1、EPS2)进行扫描电镜观察。

1.3.4 EPS聚合及转运相关基因的克隆

EPS合成相关基因簇在芽孢杆菌种属间存在较大差异,但已报道的解淀粉芽孢杆菌全基因组序列,与多糖聚合输出相关的蛋白具有较高的保守性,因此根据GenBank中已报道的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens* DSM 7, GenBank序列号: NC_014551.1)全基因组序列信息,利用Primer Premier 5.0设计多糖重复单元转运子(polysaccharide transporter)等引物见表1。

表1 引物列表
Table 1 List of primers

基因	序列(5'-3')	目的片段大小/bp	退火温度/℃
EPS A	F: GACGGGATACATCCAATT R: TCATACACAACCCCTAAA	600	48
EPS B	F: AAGACGGGGATTGGCTCA R: TTTTCCGCTCAAAACGAC	600	51
EPS C	F: ACGTATCTCGTTTACTTT R: TGATTTCGATTGCCTCA	1 800	46
EPS E	F: GAATCCATCCTGAGCCAATC R: CCGTCTGCACGCTGAAA	600	50
EPS G	F: CCGGGTTACGCTACAGAG R: TACGGAAGCACAGACGAA	900	55

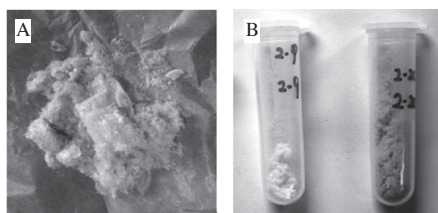
PCR反应体系(25 μL): Taq Mix 12.5 μL、dd H₂O 10.5 μL、上下游引物(表1)各0.5 μL、模板1 μL。反应条件: 94 ℃预变性5 min; 94 ℃变性1 min、退火45 s、72 ℃延伸2 min,共30个循环; 72 ℃终延伸10 min。

1.3.5 生物信息学分析

PCR产物电泳检测后送至金唯智生物科技有限公司(北京)测序,获得的序列相似性比较采用NCBI的BLAST软件在线分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),核酸序列分析和翻译采用BioEdit Software Version 7.0.5.2软件进行。

2 结果与分析

2.1 芽孢杆菌LPL061胞外多糖的分离纯化



A. EPS粗品; B. EPS纯品(左: EPS1, 右: EPS2)。

图1 芽孢杆菌多糖的形态

Fig.1 Crude EPS and two fractions

由图1可知,芽孢杆菌上清液经醇沉透析后获得粗多糖呈淡棕色、片状、水溶性良好。

多糖经过透析去掉部分杂质后,要想得到高纯度的单一多糖组分,需进一步的分级纯化。多糖分级纯化的方法很多,如柱层析法、季铵盐沉淀法、超滤法等,考虑到EPS自身特点及后续功能应用,纯化时一般选用柱层析法,本实验芽孢杆菌EPS纯化经过初试后,最终选用纤维素阴离子交换柱层析法和凝胶柱层析法,效果较好。

2.1.1 DEAE-Sepharose Fast Flow离子交换柱纯化

本实验首先选用 DEAE-Sepharose Fast Flow离子交换柱(Tris-HCl和Tris-HCl-NaCl线性梯度混合洗脱)对EPS进行分离纯化,结果见图2。

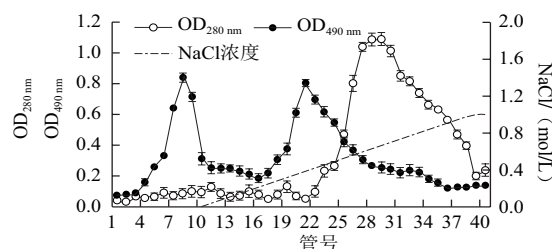


图2 芽孢杆菌EPS的DEAE-Sepharose Fast Flow洗脱曲线

Fig.2 Anion-exchange chromatography on DEAE-Sepharose fast flow of crude EPS

从培养基上清中用乙醇沉淀得到的EPS粗品进行DEAE Sepharose Fast Flow离子交换柱层析。用Tris-HCl缓冲液和含1 mol/L NaCl Tris-HCl缓冲液线性梯度洗脱时,得到两个组分,第1个组分直接由缓冲液洗脱,第2个组分由缓冲液洗脱时先吸附到层析柱上再由含0~1.0 mol/L NaCl缓冲液线性洗脱,第1组分是不带负电荷的中性糖(EPS1),而第2组分为带负电荷的酸性糖(EPS2)。

在DEAE-Sepharose Fast Flow洗脱时, EPS2的洗脱曲线与蛋白质洗脱曲线有部分交叉,多糖峰与蛋白峰也并不完全重叠,表明EPS2紫外吸收检测到的蛋白质并不与多糖缀合,通过不收集与蛋白峰重叠的多糖收集管,可减少EPS2中蛋白质含量。将两个组分按洗脱曲线分别收集,对水透析48 h后冷冻干燥,得到一步纯化的中性糖(EPS1:收集6~10管)和酸性糖(EPS2:收集19~23管,23管后因为蛋白含量太高未收集)。

EPS2的含量较高,是EPS1的8.7倍。EPS1呈纯白色, EPS2呈深棕色(图1B),两者均呈片状或粉末状,水溶性良好。

2.1.2 Sepharose CL-6B柱层析

本实验利用Sepharose CL-6B凝胶柱对EPS各组分进一步分离纯化,将从DEAE-Sepharose Fast Flow收集到的EPS1和EPS2分别配制成多糖溶液,分别利用Sepharose

CL-6B凝胶柱层析进一步纯化。EPS1和EPS2的凝胶柱层析洗脱曲线见图3。

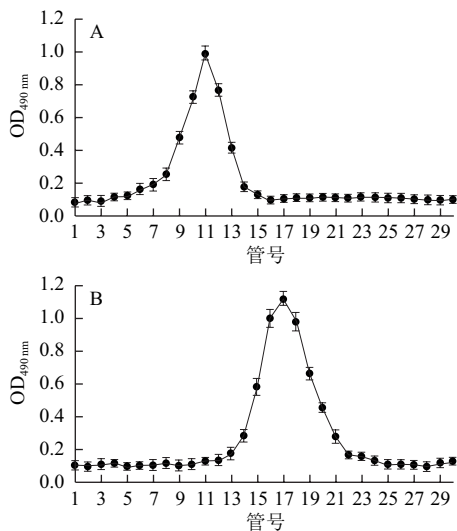


图3 芽孢杆菌EPS1 (A) 和EPS2 (B) 的Sepharose CL-6B 洗脱曲线
Fig.3 Gel permeation chromatography on Sepharose CL-6B of EPS1 (A) and EPS2 (B)

由图3可知, EPS1和EPS2的洗脱曲线均呈现对称的单一峰, 说明它们是分子质量均一的单一组分, 不含有其他糖类。采用上述阴离子交换柱和凝胶柱层析条件, 反复收集EPS1和EPS2, 用于纯度鉴定及后续的结构分析和功能验证。

2.2 纯度检测

2.2.1 紫外扫描

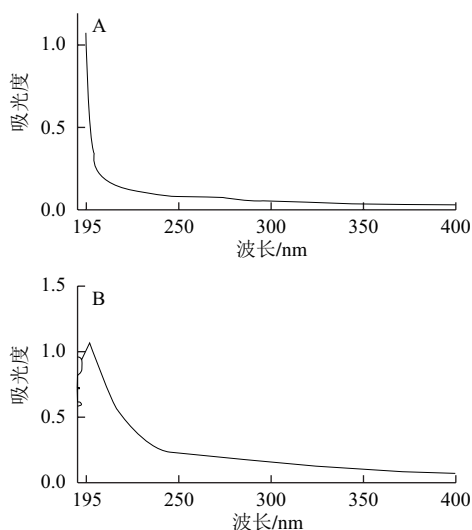


图4 芽孢杆菌EPS1 (A) 和EPS2 (B) 的紫外光谱图
Fig.4 Ultraviolet spectra of EPS1 (A) and EPS2 (B)

为了进一步证明经 Sepharose CL-6B 柱层析纯化的两个EPS组分是否含有核酸和蛋白质, 对其进行紫外全波长扫描, 扫描结果见图4。紫外全波长扫描结果显示,

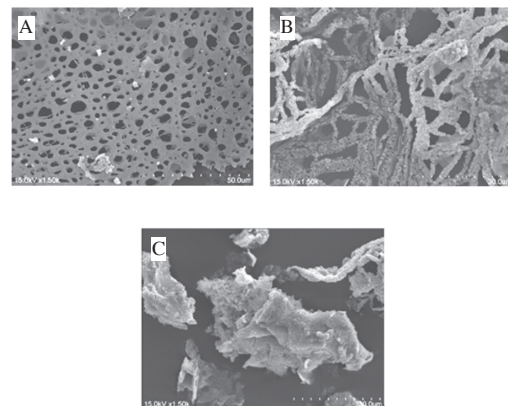
EPS1和EPS2在260 nm和280 nm波长处无吸收峰, 表明不含核酸和蛋白质, 为均一的单一组分。

2.2.2 HPLC检测

与填充凝胶柱相比, 配有糖柱的HPLC具有更高的分辨率, 可验证上述收集的多糖峰是否是单一组分, 组分单一纯度较好时HPLC洗脱曲线呈现单一对称峰。芽孢杆菌EPS1和EPS2的HPLC检测显示为单一且对称的从基线到基线的标准峰, 表示EPS1和EPS2是纯度较好且分子质量均一的多糖组分。

2.2.3 扫描电镜观察

扫描电子显微镜被认为是研究大分子表面形态, 探明其物理特性的重要工具^[10], 目前为止, 还没有利用电镜对芽孢杆菌胞外多糖的研究。EPS粗品和分级后的纯品 (EPS1、EPS2) 的扫描电镜图如图5所示。



A. EPS粗品; B. EPS1; C. EPS2。

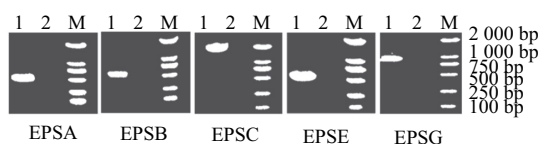
图5 芽孢杆菌多糖EPSs扫描电镜图 (×1 500)

Fig.5 Scanning electron micrographs of crude EPS and two fractions (×1 500)

由图5可知, EPS粗品结构致密结实, 孔隙均匀分布, 该形态与Wang Yanping等^[10]报道的*Lactobacillus plantarum* KF5所产胞外多糖结构类似, 此种表面形态的多糖增塑性较强, 具有作为增塑材料开发前景。EPS1呈均匀颗粒组成的致密的绳索状结构, 可能是由于许多分子或分子集团聚集束束所致。EPS2聚集体呈松散疏松片状, 表面孔隙多且密, 该种疏松多孔的形态具有较好的持水力, 在食品工业中可作为保水材料开发^[11]。

2.3 EPS聚合及转运相关基因克隆及测序

EPS生物合成通常由一大簇基因编码, 基因簇常单向排列, 转录形成单个多mRNA^[12]。以提取的解淀粉芽孢杆菌LPL061基因组DNA为模板, 经PCR扩增与多糖合成输出及转运相关基因, 产物经琼脂糖凝胶电泳检验后如图6所示。



1. LPL061 EPS基因片段; 2.阴性对照; M. Marker 2 000。

图6 解淀粉芽孢杆菌LPL061产糖基因片段PCR产物电泳图

Fig.6 Electrophoretogram of eps gene cluster from *Bacillus amyloliquefaciens* LPL061

2.3.1 EPS A基因片段的克隆与测定

由EPS A特异性引物扩增出546 bp的片段, 编码177 AA的蛋白质, 功能为酪氨酸蛋白激酶EPS B的调节蛋白。经过BLAST比对, 该基因序列与来自解淀粉芽孢杆菌植物亚种UCMB5036的EPS A (YP 007498753.1) 98%同源; 与解淀粉芽孢杆菌Y2的EPS A (CP003332.1) 98%同源; 与解淀粉芽孢杆菌XH7的EPS A (CP 002927.1) 97%同源; 与解淀粉芽孢杆菌TA208的EPS A (YP 005543320.1) 的同源性为98%。

BLASTx结果显示, EPS A属于Wzz基因簇中的基因片段, 其中Wzz是一类Etk-like酪氨酸激酶^[13], 在多糖重复单元跨膜及聚合时作为辅助蛋白控制糖链长度。一种假设认为Wzz相当于分子计时器, 控制Wzy活性, 使其在聚合反应中平衡, 另外一种假设认为起分子尺寸作用, 控制Wzy与辅助蛋白状态控制糖链长度^[14]。

2.3.2 EPS B基因片段的克隆与测定

由EPS B特异性引物扩增出522 bp的片段, 编码170 AA的蛋白质, 其功能为酪氨酸蛋白激酶。酪氨酸激酶 (tyrosine protein kinase, TPK) 是一种分布在细胞质膜表面的酶偶联型受体, 配体与不同受体TPK结合后, 受体自身发生二聚化或结构重排, 并进一步使受体胞内区特异的酪氨酸残基发生自身磷酸化或交叉磷酸化, 从而激活下游的信号转导通路, 它们在信号由胞外转导至胞内的过程中发挥重要的作用^[15]。

经过BLASTx分析, 该基因片段与解淀粉芽孢杆菌AS43.3 (YP 007187922.1) 98%同源; 与解淀粉芽孢杆菌CAU B946 (YP 005132107.1) 同源性为89%; 与来自解淀粉芽孢杆菌植物亚种UCMB5036的EPS B (YP 007498753.1) 99%同源。EPS B基因也是一种链长决定基因, 辅助蛋白控制糖链的长度, 参与糖重复单元的跨膜运输。

2.3.3 EPS C基因片段的克隆与测定

测序得到的基因序列如下, 链长为1 685bp, 共编码561-AA的蛋白质, 功能为UDP-葡萄糖异构酶。经过BLASTx比对, 该基因片段与解淀粉芽孢杆菌LL3 (NC_017190.1) 的EPS C 93%同源; 与解淀粉芽孢杆菌DSM (NC_014551.1) 的EPS C同源性为93%; 与解淀粉芽孢杆菌XH7 (NC_017191.1) 的同源性为93%;

与解淀粉芽孢杆菌TA208 (NC_017188.1) 的EPS C同源性为93%。

UDP-葡萄糖异构酶属于多糖重复单元转运子合成的Wzx基因序列^[20], 能够引发第一个葡萄糖转移到脂类载体上, 参与多糖重复单元在细胞内的聚合, 通过此过程控制多糖链的合成, 目前芽孢杆菌的EPS输出机制并不十分清楚, 有文献报道Wzx是一类膜整合蛋白家族, 具有翻转酶 (flippase) 功能, 将单糖单元从细胞膜的胞质面翻转到外周质空间, Wzx缺失菌株会使O-unit中间产物在质膜内侧积累^[16]。

2.3.4 EPS E基因片段的克隆与测定

EPS E特异性引物扩增到一个长约643 bp片段, 编码1个187-AA的蛋白质, 功能为糖基转移酶。经过BLASTx比对, 该基因片段与来自解淀粉芽孢杆菌植物亚种M27的EPS E (ZP16169290.1) 100%同源; 与来自解淀粉芽孢杆菌植物亚种CAUB946的EPS E (YP00513191.1) 100%同源; 这类蛋白参与多糖合成中的糖基转移过程。

2.3.5 EPS G基因片段的克隆与测定

EPS G特异性引物扩增到一个长约907 bp片段, 编码一个302-AA的蛋白, 功能为控制跨膜蛋白的合成。经过BLASTx比对, 该基因片段与解淀粉芽孢杆菌植物亚种CAU B 946 (NC_016784.1) 的产糖基因序列97%同源; 与解淀粉芽孢杆菌I45 (NC_020272.1) 的产糖基因片段的同源性为98%; 与解淀粉芽孢杆菌UCMB5036 (NC_020410.1) 的同源性为98%; 多糖跨膜蛋白参与多糖链的运输, 将合成的多糖从细胞内运输到细胞外, 在多糖重复单元跨膜及聚合时作为辅助蛋白控制糖链长度。

3 讨论

芽孢杆菌内生芽孢、繁殖能力强, 有利于工业化生产, 又是自然界中广泛存在的非致病细菌, 对人畜无害, 不污染环境。本实验室的成员在前期工作中筛选到1株高产活性多糖的芽孢杆菌菌株^[6], 芽孢菌株LPL061对环境要求不严, 在贫瘠的培养基、很宽的温度范围 (10~50℃)、pH值 (3~10)、10%NaCl均能正常生长; 对其产糖条件进行了优化^[8], 确定了EPS的提取方法, 提取的粗EPS已证实具有良好的乳化和流变特性, 及免疫调节活性^[7], 具有发展为药物或保健产品的潜力, 为开展芽孢杆菌活性EPS合成基因簇及EPS分级纯化以备后续研究分子特性打下坚实基础。

本实验经过离心、醇沉、除蛋白、透析、DEAE-Sephacrose Fast Flow阴离子柱层析, 芽孢菌株LPL061的培养基上清中分离到两组分胞外多糖 (EPS1和EPS2), EPS1和EPS2在Sephacrose CL-6B凝胶柱上显示均一组分,

结合紫外光谱、高效液相分析结果表明, EPS1和EPS2为不含蛋白质的多糖类物质。EPS2的含量较大, 是EPS1的8.7倍。EPS粗品为淡棕色, 分级纯化后的EPS1呈纯白色, EPS2呈深棕色, 均呈片状或粉末状, 水溶性良好。电镜扫描结果表明, EPS粗品结构致密结实, 孔隙均匀分布, 该形态与Wang Yanping等^[10]报道的*Lactobacillus plantarum* KF5所产胞外多糖结构类似, 此种表面形态的多糖增塑性较强, 具有作为增塑材料开发前景。EPS1呈均匀颗粒组成的致密的绳索状结构, 可能是由于许多分子或分子集团聚集成束所致。EPS2聚集体呈松散疏松片状, 表面孔隙多其密, 该种疏松多孔的形态具有较好的持水力, 在食品工业中可作为保水材料开发^[11]。本实验结果可为后续芽孢杆菌多糖的基本特性研究及多糖的产业化应用提供参考依据。

如何提高胞外多糖产量一直是研究的热点, 利用基因工程调控代谢合成途径也是实现该目的的重要手段。随着许多全基因组序列的相继测定, EPS合成基因簇也被逐步解析, 如嗜热链球菌Sfi6、鼠李糖乳杆菌ATCC9595等^[16-19]。不同种属菌株产生的EPS结构多种多样, 但由重复单元组成多糖的生物合成途径却很类似, 即通过糖基转移酶将单糖从糖核苷酸顺序性转移到脂类载体上合成重复单元, 随后在蛋白作用下聚合及输出形成多糖^[20]。EPS的生物合成是在多糖基因簇中的调节基因控制下, 由多基因共同作用完成, 大多数细菌EPS基因簇均由调控、链长决定、重复单元合成和聚合输出4个区域构成, 但不同种属的EPS合成基因差异很大^[21]。本实验根据GenBank中已报道的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens* DSM 7, GenBank序列号: NC_014551.1) 全基因组序列信息, 利用Primer Premier 5.0设计产糖相关基因的引物, 经PCR扩增获得解淀粉芽孢杆菌LPL061的5个EPS生物合成相关基因。对各基因功能预测分析表明这些基因主要参与EPS合成过程多糖聚合、糖基转移、糖链长度控制以及多糖转运和输出。本实验可为解淀粉芽孢杆菌胞外多糖生物合成基因的结构和功能的阐明提供信息, 后续可以利用同源交换, 对相关基因进行基因阻断实验, 验证基因的功能, 利用基因工程技术提高胞外多糖的产量, 同时也为通过改变胞外多糖的结构组成及分子量来改善EPS的工艺特性提供依据。由于芽孢杆菌结构及基因簇信息报道较少, 芽孢杆菌LPL061糖基转移酶基因的排列顺序与多糖一级结构的对应关系还有待进一步的研究证实, 利用高通量测序等手段获取菌株LPL061的完整EPS基因簇也会对解析芽孢杆菌产糖机制及发挥益生功能提供帮助。

参考文献:

- [1] KUMAR A S. Bacterial exopolysaccharides-a perception[J]. Journal of Basic Microbiology, 2007, 47: 103-117.
- [2] CISZEK L M. Biological functions of exopolysaccharides from probiotic bacteria[J]. Central-European Journal of Immunology, 2011, 36: 51-55.
- [3] 张铁华, 张春红, 刘迪茹, 等. 一株嗜热链球菌ST1的产胞外多糖流变学特性[J]. 食品科学, 2011, 32(1): 62-65.
- [4] 旭日花. 双歧杆菌胞外多糖的结构解析及调节肠黏膜免疫功能研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2011.
- [5] 刘丽莎. 双歧杆菌EPS生物合成、理化特性及在酸乳中的应用研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2013.
- [6] 张彩, 李彦岩, 范熠, 等. 一株产多糖芽孢杆菌的筛选与鉴定[J]. 中国酿造, 2012, 31(10): 82-85.
- [7] 范熠, 刘丽莎, 韩玉竹, 等. 解淀粉芽孢杆菌胞外多糖的理化性质及免疫调节作用[J]. 中国农业大学学报, 2014, 19(1): 131-136.
- [8] 李彦岩, 张彩, 范熠, 等. 一株解淀粉芽孢杆菌产糖条件的优化[J]. 食品科学, 2013, 34(7): 185-189.
- [9] XU Rihua, SHANG Nan, LI Pinglan. *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity of exopolysaccharide fractions from *Bifidobacterium animalis* RH[J]. Anaerobe, 2011, 17: 226-231.
- [10] WANG Yanping, LI Chao, LIU Peng, et al. Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 82(3): 895-903.
- [11] PRASANNA P H P, BELL A, GRANDISON A S, et al. Emulsifying, rheological and physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CCUG 52486 and *Bifidobacterium infantis* NCIMB 702205[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 90: 533-540.
- [12] 刘贵明. 苏云金芽孢杆菌YBT-1520全基因组测序和比较基因组学研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2008.
- [13] 陈蕾蕾, 王未名, 祝清俊, 等. 细菌多糖的生物合成机制[J]. 微生物学报, 2010, 50(12): 1583-1589.
- [14] 张珊珊. 胶质类芽孢杆菌KNP414染色体外遗传物质鉴定[D]. 杭州: 浙江理工大学, 2012.
- [15] 秦国奎. 深海适冷菌*Pseudoalteromonas* sp.SM9913胞外多糖的结构、生态学功能及其生物合成基因簇的克隆与分析[D]. 济南: 山东大学, 2007.
- [16] 秦启龙. 深海沉积物细菌和丝状真菌的基因组学研究[D]. 济南: 山东大学, 2010.
- [17] OLEG N, CHRISTINA D, JOHAN M, et al. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 48: 249-259.
- [18] 刘丽莎, 范熠, 旭日花, 等. 动物双歧杆菌RH胞外多糖基因簇的克隆及分析[J]. 食品科学, 2013, 34(15): 136-142.
- [19] VANINGELGEM F, ZAMFIR M, MOZZI F, et al. Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(2): 900-912.
- [20] 李磊. 细菌多糖和糖蛋白生物合成途径及相关酶类研究[D]. 济南: 山东大学, 2010.
- [21] 彭爱铭. 地衣芽孢杆菌TS-01胞外多糖生产和功能的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2004.