

桃色欧文氏菌 Cp2 胞外多糖测定方法及培养条件的优化

贾倩英,朱环,李宜娟,张封琪,张振粉*

(甘肃农业大学草业学院,草业生态系统教育部重点实验室,甘肃省草业工程实验室,中-美草地畜牧业可持续发展研究中心,甘肃 兰州 730070)

摘要:【目的】明确紫花苜蓿(*Medicago sativa*)种带桃色欧文氏菌(*Erwinia persicina*)Cp2 胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)的含量测定方法及其最佳培养条件,获得更高产量的胞外多糖。【方法】采用单因素试验优化 Cp2 EPS 的测定方法和培养条件。【结果】优化后的苯酚硫酸法测定条件为最大吸收波长 490 nm、显色时间 20 min、显色温度 100 °C、苯酚质量分数 5%、苯酚用量 0.80 mL、浓硫酸用量 5.00 mL;优化后的最适培养基为大豆蛋白胨 20.00 g、K₂HPO₄ 1.50 g、MgSO₄·7H₂O 1.50 g、淀粉 25.00 g、蒸馏水 1.00 L, pH 值 7.0~7.2, 121 °C 灭菌 15 min;富集培养温度 30 °C。【结论】苯酚硫酸法较蒽酮硫酸法更适于测定 Cp2 EPS。采用优化后的培养条件桃色欧文氏菌 Cp2 EPS 产量较优化前增加了 365.91%。同时本研究结果将为桃色欧文氏菌 Cp2 胞外多糖的功能研究及产品开发提供理论基础。

关键词:桃色欧文氏菌;胞外多糖;培养条件优化

中图分类号:S541.9 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-5500(2024)01-0138-12

DOI:10.13817/j.cnki.cyycp.2024.01.016



紫花苜蓿(*Medicago sativa*)种带桃色欧文氏菌(*Erwinia persicina*)Cp2 属革兰氏阴性菌,杆状,产粉红色水溶性色素,有鞭毛^[1]。该菌可从番茄(*Lycopersicon esculentum*)、黄瓜(*Cucumis sativus*)^[2]、大麦(*Hordeum vulgare*)^[3]、小菜蛾(*Plutella xylostella*)^[4]和古壁画岩石等动植物寄主及环境中分离得到,其重要的生物特性之一是能向环境中大量分泌一种酸性物质胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)^[5]。它是该菌

形成生物膜的重要成分,可显著增强菌体对各种逆境胁迫的抗性^[6-7]。细菌胞外多糖具备培养周期短、成本低、安全无毒且易与菌体分离等优点^[8],在化工、食品、制药、农业等多个领域中都具有良好的发展前景^[9-10]。另外,大量的研究证实胞外多糖不仅可以提高动植物的抗氧化能力^[11]、调节动植物的生长,且多糖大分子还可以降低重金属的迁移性和毒害性^[7];也能够提升作物在不同逆境胁迫下的抗逆性,如高粱(*Sorghum bicolor*)^[12]、小麦(*Triticum aestivum*)^[13]等粮食作物。

当前对微生物胞外多糖的含量检测方法普遍为传统的苯酚硫酸法和蒽酮硫酸法,但是二者是否适用于检测桃色欧文氏菌(*Erwinia persicina*)Cp2 EPS 的含量尚不明确,与此同时,提升 EPS 产量的科学研究多集中于细菌适宜的培养条件、培养基组分和提取条件等工艺优化,其中最为成熟的是乳酸菌胞外多糖的提取优化工艺。乳酸菌可产生杂多糖(heteropolysaccharides, HePSs)和同多糖(homopolysaccharides,

收稿日期:2023-05-24; **修回日期:**2023-06-10

基金项目:国家自然科学基金项目(32060369);兰州市人才创新创业项目(2019-RC-116);甘肃农业大学青年导师基金项目(GAU-QDFC-2019-08);甘肃省杰出青年基金(20JR10RA562);甘肃省大学生创新创业训练计划项目(S202110733009)

作者简介:贾倩英(1997-),女,甘肃榆中人,硕士研究生。

E-mail:3112754226@qq.com

*通信作者。E-mail:zhangzf@gsau.edu.cn

HoPSs)两种胞外多糖^[14],且杂多糖的生产水平普遍低于同多糖。杂多糖的合成与细菌的生长、代谢有关,其产糖量受介质组成(如碳、氮源和微量元素)、生长条件(如温度、pH值和氧气)和培养时间等多种因素影响^[15];同多糖与杂多糖生产类似,都需要经过优化培养基组成和培养条件以获得最大的EPS产量^[16];Ismail和Nampoothiri^[17]采用优化的培养条件从1株乳杆菌中获得了高达1.2 g/L杂多糖。Kiessling等^[5]提取纯化并鉴定发现桃色欧文氏菌的胞外多糖是由葡萄糖和半乳糖等组成的一种杂多糖,但是它的提取工艺仍属空白,所以优化胞外多糖的培养条件对提高EPS的产量尤为重要。

表 1 培养基配方表

Table 1 Formula table of culture medium

培养基名称	试剂	用途
营养琼脂培养基(NA)	牛肉膏 3.0 g、蛋白胨 10.0 g、NaCl 5.0 g、琼脂 18.0 g、水 1.0 L、pH 值 7.0~7.2、121 °C 灭菌 20 min	活化培养 Cp2 菌株
金氏 B 培养基(KB)	蛋白胨 20.0 g、K ₂ HPO ₄ 1.5 g、硫酸镁 1.5 g、丙三醇 15.0 mL、蒸馏水 1.0 L、pH 值 7.0~7.2、121 °C 灭菌 15 min	富集菌体收集 EPS

1.1.2 试剂 苯酚、蒽酮、无水乙醇、浓硫酸均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 桃色欧文氏菌 Cp2 胞外多糖的提取 将-80 °C低温保存的Cp2活化接种至NA,在恒温培养箱中28 °C倒置培养48 h,用无菌水配制菌悬液,并接种至装有金氏B培养液的250 mL锥形瓶中,30 °C恒温震荡(200 r/min)培养2 d得到Cp2菌悬液。取适量菌悬液4 °C,12 000 r/min离心20 min,留上清液,加入乙醇(3倍体积95%冰冻乙醇)静置12 h,离心收集沉淀并溶解,4 °C保存备用^[18]。

1.2.2 桃色欧文氏菌 Cp2 胞外多糖测定方法的优化 参照文献[19]的方法使用酶标仪在200~900 nm波长范围内进行扫描,确定苯酚硫酸法和蒽酮硫酸法测定Cp2 EPS溶液时最大的吸收波长。

按上述方法分别测定不同条件下(水浴时间、水浴温度、苯酚质量分数、苯酚体积、浓硫酸体积、蒽酮硫酸体积)Cp2 EPS溶液的吸光度值,确定最佳试剂用量并优化2种测定方法。

Cp2 EPS测定方法的评价:称取恒重的无水葡萄

本试验以紫花苜蓿种带桃色欧文氏菌 Cp2 EPS 为研究对象,采用单因素试验优化苯酚和蒽酮硫酸法测定 Cp2 EPS 含量的方法,并筛选出适宜培养 Cp2 EPS 的碳、氮源、微量元素、培养温度和提取条件,还在此基础上利用响应面试验优化培养基组分,明确了 Cp2 EPS 的测定方法及培养条件,为后续对胞外多糖的功能研究及开发利用提供实践和理论基础。

1 材料和方法

1.1 试验和材料

1.1.1 菌株、培养基 桃色欧文氏菌 Cp2 菌株由甘肃农业大学草业学院牧草病理学实验室提供。培养基见表1。

糖0.1 g定容至100 mL的容量瓶中,配制成1 mg/mL的标准葡萄糖溶液,再精密量取0、10、20、30、40和50 mL标准溶液至100 mL容量瓶中定容,最终配制成系列标准葡萄糖溶液,终浓度为0、0.1、0.2、0.3、0.4和0.5 mg/mL,并以等量蒸馏水为空白对照绘制葡萄糖标准曲线,并比较苯酚硫酸法和蒽酮硫酸法测定Cp2 EPS产量时的稳定性、回收率、精密度和重现性。将提取到的Cp2 EPS溶液按照优化后的最佳测定条件进行测定,Cp2 EPS产量的计算方法参照杨勤等^[20]的方法,取最大吸收波长处的OD值代入葡萄糖标准曲线的线性回归方程中,计算Cp2 EPS含量。

1.2.3 桃色欧文氏菌 Cp2 胞外多糖培养及提取条件的优化 Cp2 EPS培养基组分的优化:在金氏B培养基的基础上,分别依次考察6种不同的碳源(葡萄糖、蔗糖、甘油、麦芽糖、淀粉、乳糖)及不同浓度(5.0~25.0 g/L)、5种不同的氮源(蛋白胨、牛肉膏、酵母膏、大豆蛋白胨、硫酸铵)及不同浓度(5.0~35.0 g/L)、4种不同的微量元素(MgSO₄、MnSO₄、FeSO₄、CaCl₂)及不同浓度(0.5~2.5 g/L)条件下Cp2 EPS产量的变化,筛选出最佳培养基组分。

在上述试验的基础上,考察不同培养温度(25、28、30、33和35℃)、不同乙醇浓度(50%、75%、80%、95%)和乙醇体积(1~5倍)处理下Cp2 EPS的产量,确定最优Cp2 EPS的培养及提取条件。

1.2.4 桃色欧文氏菌Cp2胞外多糖培养基组分的响应面优化试验 在上述单因素试验的基础上,选择碳源浓度(A)、氮源浓度(B)和微量元素浓度(C)为响应因素,EPS产量(Y)为响应值,采用Box-Benhken设计3因素3水平的响应面试验对Cp2 EPS的培养基组分进行优化(表2)。

表2 桃色欧文氏菌Cp2胞外多糖培养基组分的响应面优化试验因素与水平

因素	水平		
	-1	0	1
A 碳源浓度/(g·L ⁻¹)	15	20	25
B 氮源浓度/(g·L ⁻¹)	20	25	30
C 微量元素浓度/(g·L ⁻¹)	1.5	2	2.5

最优条件的验证:利用上述优化的最佳培养基、最适培养温度 and 最优提取条件再次培养提取Cp2 EPS,使用1.2.2中的测定方法和计算方法得出优化后Cp2 EPS的产量。

1.3 数据分析

本试验使用Excel 2019进行数据汇总和整理,采用Design-Expert 11.0软件对Box-Benhknen的试验结果进行分析,用SPSS 26.0统计分析软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA),其结果以平均值±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 桃色欧文氏菌Cp2胞外多糖测定方法的优化

2.1.1 最大吸收波长的确定 由图1可知,在200~900 nm波长范围内进行扫描,显示苯酚硫酸法和蒽酮硫酸法测定Cp2 EPS溶液的最大吸收峰值分别出现在490 nm和620 nm处。

2.1.2 桃色欧文氏菌Cp2胞外多糖测定方法的优化 采用苯酚硫酸法测定Cp2 EPS溶液时,随着显色时间的延长,吸光度值呈现先升后降的趋势,在20 min

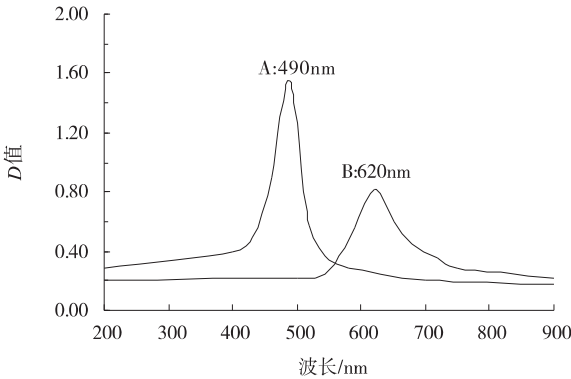


图1 2种不同方法测定Cp2 EPS溶液的吸收光谱图
Fig. 1 Absorption spectra of Cp2 EPS solution determined by two methods

时吸光度值达到最高,随后平缓下降(图2-A);随着显色温度的增高其吸光度呈现持续上升的趋势,在100℃时吸光值达到最大且显著高于其余温度($P<0.05$)(图2-B);苯酚质量分数在5%以下,吸光度会随着苯酚质量分数的增加而上升,5%时吸光度值最大,随后下降(图2-C);苯酚用量在0.4~1.2 mL范围内,随着苯酚用量的增加,Cp2 EPS溶液的吸光度值呈现先升后降的趋势,且在0.8 mL时达到最大(图2-D);浓硫酸体积在5.0 mL之内,吸光度会呈现显著增高($P<0.05$),5.0 mL用量时达到顶峰,随后缓慢增高但不显著(图2-E)。

蒽酮硫酸法测定Cp2 EPS溶液时,在40 min内随着显色时间的加长吸光度会呈现出先上升后下降的趋势,并在10 min时吸光度值显著高于其余时长($P<0.05$)(图3-A);不同温度梯度处理下,吸光度值会随温度升高呈先升后降趋势,在60℃出现最高峰,显著高于其他4个温度处理($P<0.05$)(图3-B);蒽酮硫酸法体积在1.0~3.0 mL内,吸光度会随着用量的增加呈现显著增长趋势($P<0.05$),并在3.0 mL时达到最大吸光值 0.90 ± 0.10 ,随后缓慢下降(图3-C)。

2.1.3 Cp2 EPS测定方法的评价 苯酚硫酸法(图4-A)和蒽酮硫酸法(图4-B)绘制标准曲线得出的线性回归方程分别为: $y=6.4336x+0.0287(R^2=0.9993)$, $y=7.1143x+0.0634(R^2=0.9964)$ 。

由图5可知,这种测定方法的准确度及精密度存在一定差异。稳定性结果显示苯酚硫酸法与蒽酮硫酸法在60 min内的变异系数分别为2.88和24.32,所以蒽酮硫酸法的波动较苯酚硫酸法大,稳定性较差。

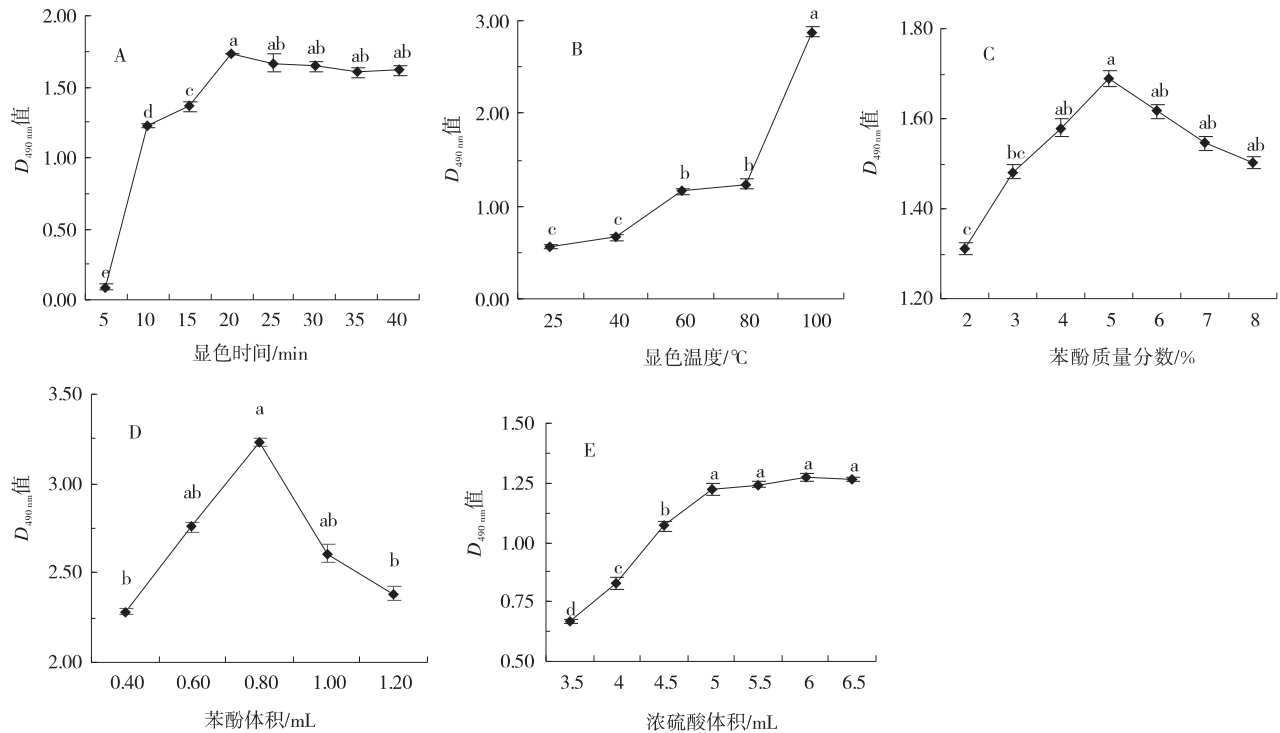


图 2 苯酚硫酸法中不同测定条件下 Cp2 EPS 溶液的吸光度值

Fig. 2 Absorbance value of Cp2 EPS solution under different determination conditions in phenol sulfuric acid method

注:不同小写字母表示在不同处理间差异显著($P < 0.05$)。下同

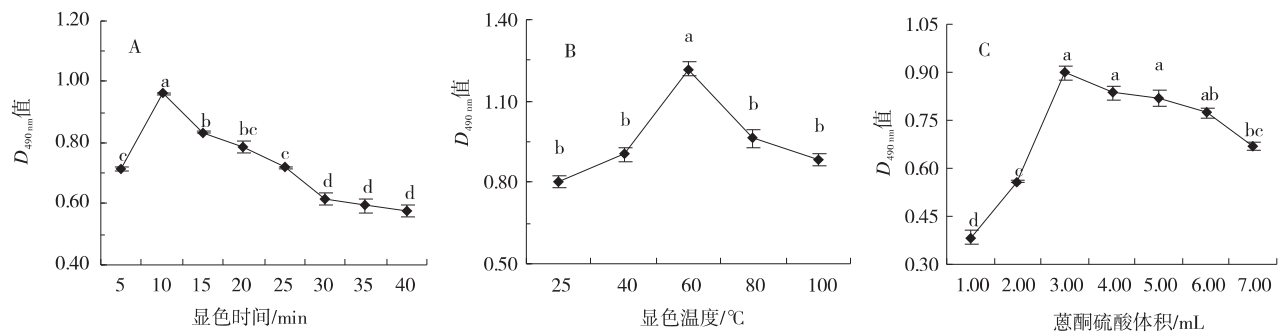


图 3 蒽酮硫酸法中不同测定条件下 Cp2 EPS 溶液的吸光度值

Fig. 3 Absorbance value of Cp2 EPS solution under different determination conditions in anthrone sulfuric acid method

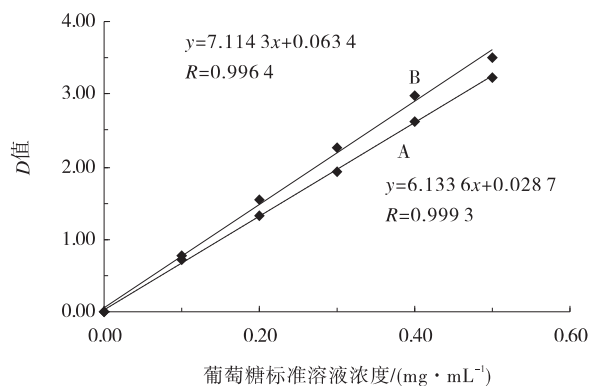


图 4 葡萄糖标准曲线

Fig. 4 Glucose standard curve

精密度和重现性试验中苯酚硫酸法测定 Cp2 EPS 的精密度和重现性相对标准偏差(RSD)1.16%

小于蒽酮硫酸法的测定结果(RSD) 1.89%(表 3)。

苯酚硫酸法测定 Cp2 EPS 的平均加标回收率为 100.13%, 大于蒽酮硫酸法测定的结果(RSD) 99.87%, 并且苯酚硫酸法测定 Cp2 EPS 的加标回收率相对偏差(RSD) 0.37% 小于蒽酮硫酸法的试验结果(RSD) 0.71%(表 4)。

2.2 桃色欧文氏菌 Cp2 胞外多糖培养及提取条件的优化

2.2.1 Cp2 EPS 培养基组分的优化 培养组分中的碳源为淀粉时 Cp2 EPS 产量可达 $(1.20 \pm 0.05) \text{ g/L}$, 显著($P < 0.05$)高于其他碳源(图 6-A); Cp2 EPS 产量会随着淀粉浓度的增加而显著升高($P < 0.05$), 但当

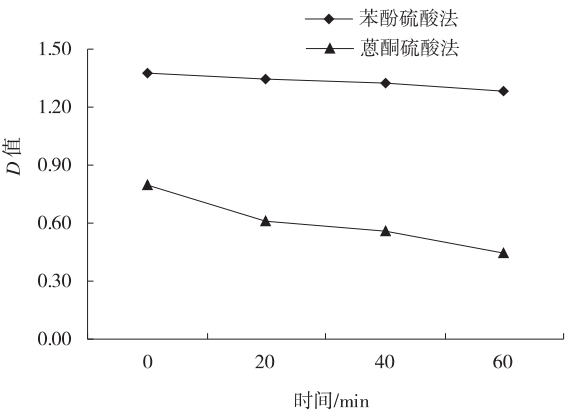


图5 苯酚硫酸法与蒽酮硫酸法测定 Cp2 EPS 稳定性的比较

Fig. 5 Comparison between phenol-sulfuric acid method and anthrone-sulfuric acid method for the determination of Cp2 EPS stability

淀粉浓度为 20 g/L 时, EPS 产量达到 (1.79 ± 0.10) g/L, 之后产糖量增长趋势不显著(图 6-B); 所以 20 g/L 为最适宜的淀粉浓度。

Cp2 EPS 培养基组分的最适氮源为大豆蛋白胨且产量为 (0.60 ± 0.03) g/L, 显著高于其他氮源 ($P < 0.05$) (图 7-A); 随着大豆蛋白胨浓度的升高, Cp2 EPS 产量呈现先升后降的趋势, 在 25 g/L 时达到最大值 (0.71 ± 0.09) g/L (图 7-B), 所以 25 g/L 为最适宜的大豆蛋白胨浓度。

添加 4 种不同微量元素 (MgSO_4 、 MnSO_4 、 FeSO_4 、 CaCl_2) 的条件下, Cp2 EPS 均能得到较好的产量, 其中 MgSO_4 显著高于其余 3 种微量元素 ($P < 0.05$) (图 8-A); 且当 MgSO_4 浓度为 2.0 g/L 时 EPS 产量达到最高

表 3 苯酚硫酸法与蒽酮硫酸法测定 Cp2 EPS 精密度和重现性的比较

Table 3 Comparison of precision and reproducibility between phenol-sulfuric acid method and anthrone-sulfuric acid method for the determination of Cp2 EPS

方法	EPS 含量/(g·L ⁻¹)						平均值	相对标准偏差/%
苯酚硫酸法	0.222	0.222	0.217	0.219	0.218	0.216	$(0.219 \pm 1.03) \times 10^{-3}$	1.16
蒽酮硫酸法	0.094	0.096	0.099	0.098	0.098	0.098	$(0.097 \pm 0.75) \times 10^{-3}$	1.89

表 4 苯酚硫酸法与蒽酮硫酸法测定 Cp2 EPS 回收率的比较

Table 4 Comparison between phenol-sulfuric acid method and anthrone-sulfuric acid method for determining the recovery of Cp2 EPS

方法	平行	样品中糖含量/mg	加标量/mg	检测量/mg	回收率/%	平均回收率/%	相对标准偏差/%
苯酚硫酸法	1	0.17	10.00	10.20	100.29	100.13 ± 0.21	0.37
	2	0.17	10.00	10.14	99.71		
	3	0.17	10.00	10.21	100.39		
蒽酮硫酸法	1	0.17	10.00	10.11	99.41	99.87 ± 0.41	0.71
	2	0.17	10.00	10.12	99.51		
	3	0.17	10.00	10.24	100.69		

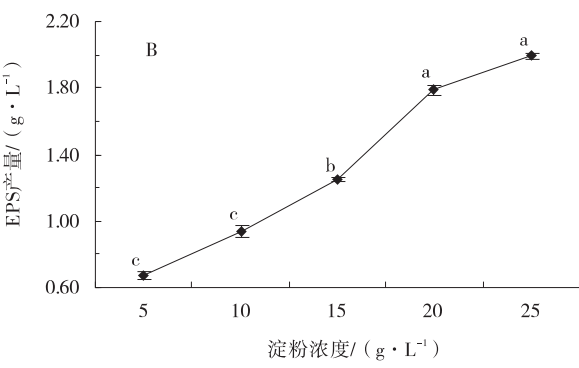
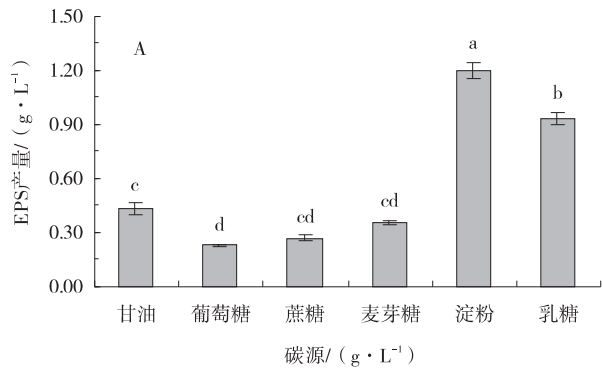


图6 不同碳源及其浓度条件下 Cp2 EPS 的产量

Fig. 6 Yield of Cp2 EPS under different carbon sources and their concentrations

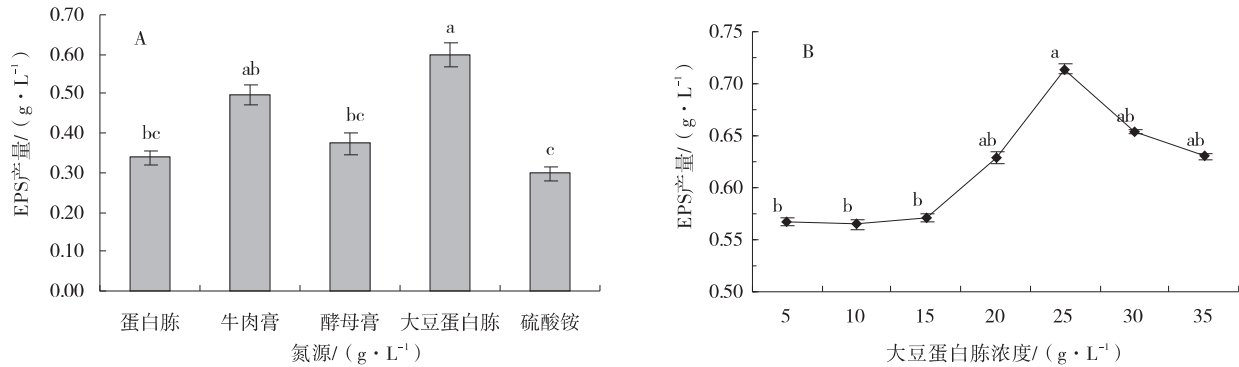


图 7 不同氮源及其浓度条件下 Cp2 EPS 的产量

Fig. 7 Yield of Cp2 EPS under different nitrogen sources and concentrations

值(0.61 ± 0.01) g/L, 显著高于其他 4 个浓度条件($P < 0.05$)(图 8-B)。

2.2.2 Cp2 EPS 培养及提取条件的优化 培养温度在 25~30 °C 时, Cp2 EPS 的产量表现出逐渐增加的趋势, 但是增加趋势不显著, 在 30 °C 达到最大值($0.52 \pm$

0.05) g/L; 当温度超过 30 °C, Cp2 EPS 的产量开始降低, 在 35 °C 时产糖量显著下降为(0.32 ± 0.14) g/L($P < 0.05$), 因此 30 °C 为 Cp2 EPS 最适宜培养的温度(图 9)。

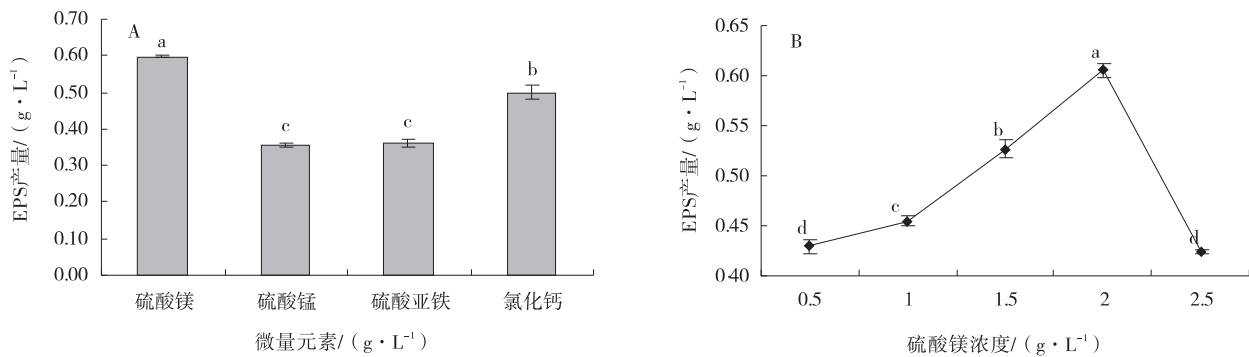


图 8 不同微量元素及其浓度条件下 Cp2 EPS 的产量

Fig. 8 Yield of Cp2 EPS under different trace elements and their concentrations

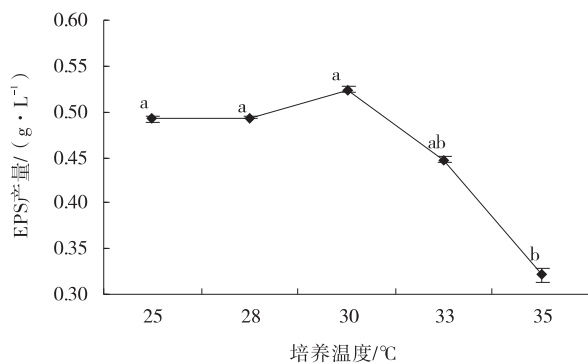


图 9 不同培养温度条件下 Cp2 EPS 的产量

Fig. 9 Yield of Cp2 EPS under different culture temperatures

在 4 种乙醇浓度梯度处理下, 随着乙醇浓度的上升, Cp2 EPS 含量也在提升, 且在 95% 时显著高于其余浓度($P < 0.05$)(图 10-A); 随着乙醇体积的增加 EPS 的产量逐渐增加, 加入 ≥ 2 倍体积的乙醇后, Cp2 EPS 含量显著增加($P < 0.05$), 而后趋于平稳(图 10-

B); 综合成本因素分析, 2 倍体积 95% 乙醇最适于沉淀 Cp2 EPS。

2.3 桃色欧文氏菌 Cp2 胞外多糖培养基组分的响应面优化试验

2.3.1 响应面 Box-Behnken 试验结果 响应面试验的数据测定结果见表 5, 由表 5 可知:

采用 Design - Expert 11 进行响应面 Box-Behnken 试验, 得到的桃色欧文氏菌 Cp2 胞外多糖产量对响应因素的二次多项回归方程为:

$$\text{多糖产量 (Y)} = 1.48 + 0.2055A - 0.0137B + 0.0475C - 0.1071AB - 0.0324AC + 0.1324BC - 0.0321A^2 + 0.1578B^2 - 0.0254C^2.$$

响应面方程模型的 P 值 < 0.0001 (极显著), 表明建模成功; 失拟项 P 值 $0.1016 > 0.05$ (不显著), 表明试验误差较小; 决定系数 $R^2 = 0.9847$, 表明模型中

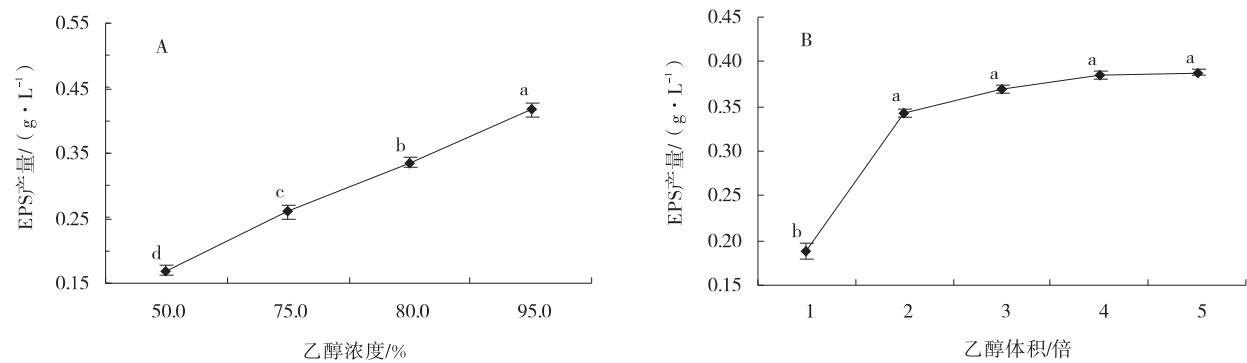


图 10 不同乙醇浓度及体积条件下 Cp2 EPS 的产量

Fig. 10 Yield of CP2 EPS under different ethanol concentration and volume

表 5 桃色欧文氏菌 Cp2胞外多糖培养基组分的响应面优化试验设计及结果

Table 5 Response surface optimization design and results of <i>Erwinia persicina</i> Cp2 exopolysaccharides medium components				
试验号	A:碳源浓度/(g·L ⁻¹)	B:氮源浓度/(g·L ⁻¹)	C:微量元素浓度/(g·L ⁻¹)	EPS 产量/(g·L ⁻¹)
1	15.00	20.00	2.00	1.27
2	25.00	20.00	2.00	1.90
3	15.00	30.00	2.00	1.52
4	25.00	30.00	2.00	1.72
5	15.00	25.00	1.50	1.13
6	25.00	25.00	1.50	1.61
7	15.00	25.00	2.50	1.30
8	25.00	25.00	2.50	1.64
9	20.00	20.00	1.50	1.74
10	20.00	30.00	1.50	1.39
11	20.00	20.00	2.50	1.56
12	20.00	30.00	2.50	1.74
13	20.00	25.00	2.00	1.51
14	20.00	25.00	2.00	1.47
15	20.00	25.00	2.00	1.46
16	20.00	25.00	2.00	1.49
17	20.00	25.00	2.00	1.45

98.47%的试验数据可由模型解释;变异系数(CV)为2.36%,表明试验中误差小。一次项A、C,交互性AB、BC和二次项B²对试验结果具有极显著影响($P<0.01$),其余项对试验结果影响不显著。由 F 值得出,培养基组分中影响桃色欧文氏菌Cp2胞外多糖产量的因素顺序为碳源浓度>微量元素浓度>氮源浓度。

2.3.2 响应面 Box-Benhnken 试验结果分析 使用 Design-Expert 11.0 绘制三维响应面图和等高线图,发现响应面均有向下的开口,交互作用较明显(图 11—13)。通过模型和拟合方程得出最佳培养基组分为:碳源浓度 25.00 g/L、氮源浓度 20.00 g/L 和微量元素浓度 1.50 g/L,且预测多糖产量为 2.021 g/L。

2.3.3 验证试验 利用优化后的条件重新培养提取

Cp2 EPS,通过计算其产量为(2.05±0.38)g/L,比优化前的(0.44±0.03) g/L 增长了 365.91%,与预测值的误差为 1.43%,说明此模型能较好预测 Cp2 EPS 的产量。

3 讨论

3.1 2 种方法测定 EPS 的对比分析

本试验采用苯酚硫酸法在流程不变的基础上,改进了材料的使用量和反应条件,探明了 Cp2 EPS 的最佳测定条件为 5% 苯酚 0.8 mL、浓硫酸 5.0 mL、显色时间 20 min 和显色温度 100 ℃。该研究结果与张洁媛等^[21]测定的苦瓜多糖含量相比,苯酚的质量分数和用量保持一致,反应温度和浓硫酸用量不同。据以往研

表 6 响应面试验结果方差分析

Table 6 Analysis of variance of response surface test results

方差来源	平方和	自由度 df	均方根误差	F 值	P 值
模型	0.586 4	9	0.065 2	50.19	< 0.000 1**
A	0.337 9	1	0.337 9	260.33	< 0.000 1**
B	0.001 5	1	0.001 5	1.15	0.318 3
C	0.018	1	0.018	13.89	0.007 4**
AB	0.045 9	1	0.045 9	35.37	0.000 6**
AC	0.004 2	1	0.004 2	3.24	0.115 1
BC	0.070 2	1	0.070 2	54.05	0.000 2**
A ²	0.004 3	1	0.004 3	3.35	0.11
B ²	0.104 8	1	0.104 8	80.73	< 0.000 1**
C ²	0.002 7	1	0.002 7	2.1	0.190 8
残差	0.009 1	7	0.001 3		
失拟项	0.006 9	3	0.002 3	4.15	0.101 6
纯误差	0.002 2	4	0.000 6		
总离差	0.595 5	16			
R ²			0.984 7		
变异系数			2.36%		

注:**表示差异极显著($P<0.01$)。

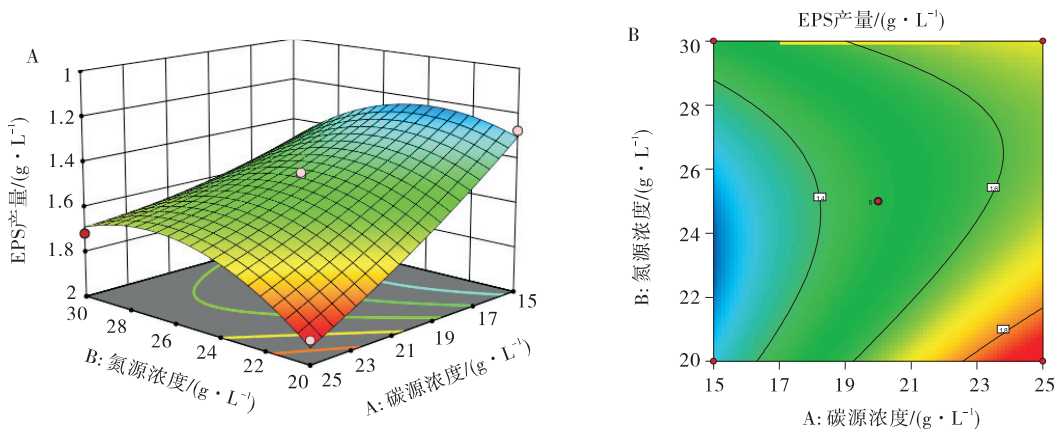


图 11 碳源浓度和氮源浓度对 EPS 产量交互影响的三维曲面(A)和相应等高线图(B)

Fig. 11 Three dimensional surface (A) and corresponding contour map (B) of the interaction between carbon source concentration and nitrogen source concentration on EPS yield

究显示,胞外多糖测定工艺流程中反应温度过高时会破坏底物多糖,苯酚用量和浓硫酸用量与原料本身、多糖结构有关,但本研究发现温度并未对Cp2 EPS的测定产生影响,反而过量的苯酚会增加反应底物,过量的浓硫酸会使多糖碳化严重^[22],且加入方式也会影响显色效果,所以本试验与文献[23]一样使用注射器控制了加入浓硫酸的体积和方式以保证试验的准确性,同时溶液长时间在高温下反应水分容易蒸发,吸光值波动较大易产生误差,25 min时试验结果偏差稍大,可能是外在因素导致的,反而20 min时显色充分且误差小。

改进后蒽酮硫酸法的最佳测定条件为反应时间10 min、反应温度60 ℃和蒽酮硫酸溶液用量3.0 mL。其试验结果与申希峰等^[24]测定榛花EPS的含量相比反应时间相同,显色温度和蒽酮硫酸用量不同。蒽酮硫酸溶液可与多糖发生水解反应,过量的蒽酮硫酸溶液会导致多糖水解严重并对实验结果造成影响,同时蒽酮硫酸溶液与多糖发生水解反应本身就是一个放热的过程,不需要太高的温度即可完成整个显色过程^[25]。

综上所述,优化后的2种方法平均回收率都较高,且试验结果接近100%,所以二者都可以准确测定

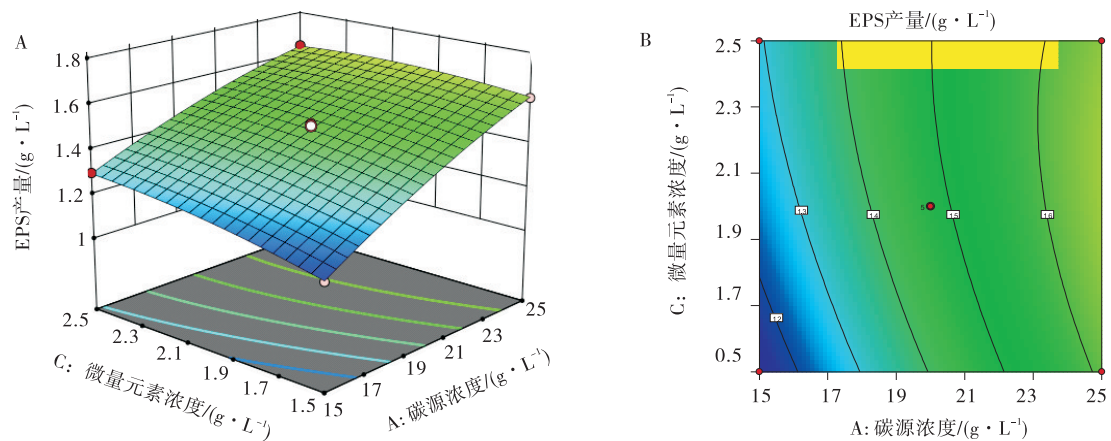


图 12 碳源浓度和微量元素浓度对 EPS 产量交互影响的三维曲面(A)和相应等高线图(B)

Fig. 12 Three dimensional curved surface (A) and corresponding contour map (B) of the interaction between carbon source concentration and trace element concentration on EPS yield

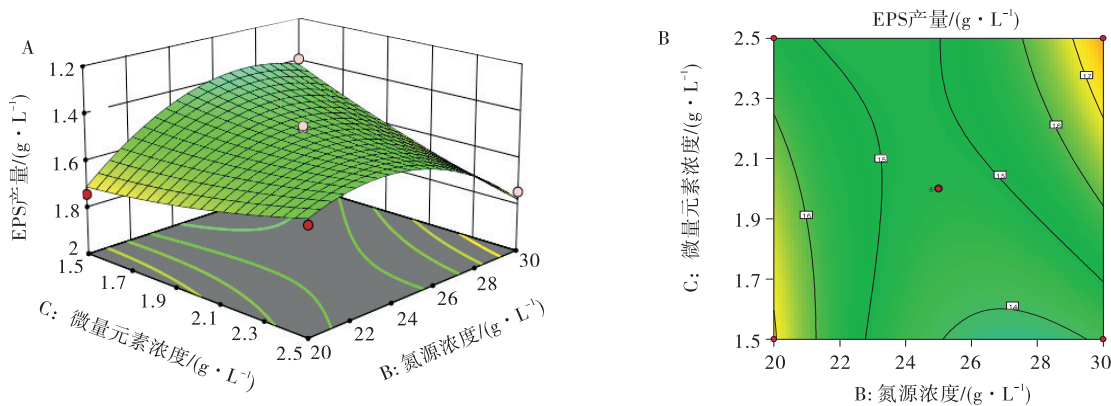


图 13 氮源浓度和微量元素浓度对 EPS 产量交互影响的三维曲面(A)和相应等高线图(B)

Fig. 13 Three dimensional curved surface (A) and corresponding contour map (B) of the interaction between nitrogen source concentration and trace element concentration on EPS yield

Cp2 EPS,且操作相对简单,不需要多糖的纯产物,在实验室即可完成^[23]。但是本试验中苯酚硫酸法测定 Cp2 EPS 的稳定性、精密度和重现性都比蒽酮硫酸法高,且试验结果中相对偏差数值也较小,所以苯酚硫酸法比蒽酮硫酸法更适于测定 Cp2 EPS。

3.2 培养基组分和培养提取条件对 EPS 产量的对比分析

培养基中各组分的变化都会对 EPS 产量产生影响,还会在一定程度上影响多糖的结构^[26]。不同来源的碳水化合物会导致胞外多糖产量的不同^[18],本试验中碳源筛选结果与张泽生^[27]的试验结果较为相似,认为淀粉能促进胞外多糖积累,但当淀粉的浓度超过 20 g/L 时积累速度减缓可能是淀粉浓度过高,菌体细胞渗透压太大所致^[28],这与 Abedi 等^[29]的研究结果相同,过高的碳源浓度可通过高渗作用抑制乳酸菌的生长。氮源及其浓度同样可以影响胞外多糖最终的产量^[26],

本试验选出的氮源与冯美琴^[30]和曹永强等^[31]对胞外多糖培养条件优化的研究结果一致,认为最佳氮源为大豆蛋白胨且其添加量能显著影响 EPS 的产量,本研究中的氮源添加量结果与钟华晨等^[32]保持一致。微量元素是限制菌体生长的重要因素,其中硫酸镁及其浓度是影响 EPS 产量的主要因子之一^[33],本试验中硫酸镁的用量与杨静等^[34]优化苏云金芽孢杆菌 EPS 的发酵条件相同。

培养条件是制约胞外多糖产量的重要因素之一。本研究的 Cp2 EPS 最适培养温度为 30℃,与 Kiessling 等^[5]和姜云芸等^[35]研究结果一致,除此之外,在胞外多糖提取过程中乙醇浓度与用量也会影响多糖产量,本试验的乙醇浓度与冯美琴^[36]的研究一致,但与 Kiessling 等^[5]和胡彦营^[37]试验结果不同,乙醇用量与 Marwa 等^[6]和胡彦营^[37]对胞外多糖提取工艺优化结果相似。以往研究证实,菌株、培养基组分和胞外多糖

结构的异质性,致使胞外多糖提取过程中乙醇浓度和用量的差异^[6]。

4 结论

通过单因素试验最终得出:苯酚硫酸法比蒽酮硫酸法更适合于测定 Cp2 EPS 的含量;通过优化碳源、氮源、微量元素、培养温度、乙醇体积及其浓度等条件,Cp2 EPS 的产量达到了 (2.35 ± 0.38) g/L,比优化之前增加了 4.34 倍。

参考文献:

- [1] Brenner D J, Krieg N R, Staley J T. Bergey Manual of Systematic Bacteriology (Second Edition, Volum 2 Part B, C) [M]. New York: Springer Publication, 2005.
- [2] Tsuji M, Kadota I, Takikawa Y. Genetic and phenotypic characterization of bacterial strains isolated in Japan that resemble *Erwinia rhapontici* and *E. persicinus* [J]. Journal of General Plant Pathology, 2020, 86: 24—33.
- [3] Kawaguchi A, Abe D, Saito T, et al. Pink seed of barley caused by *Erwinia persicina* [J]. Journal of General Plant Pathology, 2021, 87: 106—109.
- [4] 李文红, 金道超, 金剑雪, 等. 基于幼虫粪便的小菜蛾肠道细菌分离鉴定及其抗生素敏感性分析 [J]. 昆虫学报, 2015, 58(5): 546—552.
- [5] Kiessling P, Senchenkova S N, Ramm M, et al. Structural studies on the exopolysaccharide from *Erwinia persicina* [J]. Carbohydrate Research, 2005, 340(11): 1761—1765.
- [6] Marwa D, Jihen E, Hajer B H, et al. Optimization of exopolysaccharides production by *porphyridiumsordidum* and their potential to induce defense responses in *Arabidopsis thaliana* against *Fusarium oxysporum* [J]. Biomolecules, 2021, 11(2): 282—282.
- [7] Nocelli N, Bogino P C, Banchio E, et al. Roles of extracellular polysaccharides and biofilm formation in heavy metal resistance of rhizobia [J]. Materials, 2016, 9(6): 418.
- [8] 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(2): 25—28.
- [9] Rodriguez S, Torres F G, Lopez D. Preparation and characterization of polysaccharide films from the *Cyanobacteria nostoc commune* [J]. Polymers from Renewable Resources, 2017, 8(4): 133—150.
- [10] He P X, Geng L J, Mao D B, et al. Production, preliminary characterization, and bioactivities of exopolysaccharides from *Pleurotus geesteranus* [J]. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 2013, 43(1): 108—122.
- [11] Seow S L—S, Naidu M, David P, et al. Potentiation of neuritogenic activity of medicinal mushrooms in rat pheochromocytoma cells [J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2013, 13(1): 157—157.
- [12] 马纯艳, 卜宁, 马连菊. 褐藻胶寡糖对高粱种子萌发及幼苗生理特性的影响 [J]. 沈阳师范大学学报(自然科学版), 2010, 28(1): 79—82.
- [13] 闫亚南. 产胞外多糖植物促生菌对小麦高效利用钾肥的影响及机制研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [14] Badel S, Bernardi T, Michaud P. New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides [J]. Biotechnology Advances, 2010, 29(1): 54—66.
- [15] Vuyst L D, Degeest B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria [J]. FEMS Microbiology Reviews, 1999, 23(2): 153—177.
- [16] Mende S, Krzyzanowski L, Weber J, et al. Growth and exopolysaccharide yield of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* DSM in batch and continuous bioreactor experiments at constant pH [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2012, 113(2): 185—191.
- [17] Ismail B, Nampoothiri K M. Production, purification and structural characterization of an exopolysaccharide produced by a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC [J]. Arch Microbiol, 2010, 192: 1049—1057.
- [18] Ye S H, Ma Z Y, Liu Z F, et al. Effects of carbohydrate sources on biosorption properties of the novel exopolysaccharides produced by *Arthrobacter ps-5* [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 112: 615—621.
- [19] 张媛媛, 张彬. 苯酚—硫酸法与蒽酮—硫酸法测定绿茶茶多糖的比较研究 [J]. 食品科学, 2016, 37(4): 158—163.
- [20] 杨勤, 谷文超, 周浓, 等. 苯酚—硫酸法与蒽酮—硫酸法测定地参多糖的比较研究 [J]. 食品科技, 2020, 45(1): 343—350.
- [21] 张洁媛, 张丽, 宁恩创. 蒽酮—硫酸法与苯酚—硫酸法测定苦瓜多糖的比较 [J]. 现代食品, 2018(22): 80—83.
- [22] 王彦平, 娄芳慧, 陈月英, 等. 苯酚—硫酸法测定紫山药多糖含量的条件优化 [J]. 食品研究与开发, 2021, 42(4): 170—174.
- [23] Su X T, Meng F L. Determination of polysaccharides in *Ginseng* stem leaves by phenol-sulfuric acid method [J].

- Medicinal Plant, 2012, 3(12):33—35.
- [24] 申希峰,黄杰涛,张莲姬. 蒽酮—硫酸法测定榛花多糖含量条件的优化[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(18): 150—154.
- [25] 王文洁,唐炜,俞玲娜,等. 蒽酮—硫酸法与苯酚—硫酸法测定凉粉草多糖的比较[J]. 食品科技, 2017, 42(9): 274—279.
- [26] Fraga I, Coutinho J, Bezerra R M, *et al.* Influence of culture medium growth variables on *Ganoderma lucidum* exopolysaccharides structural features [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 111:936—946.
- [27] 张泽生,史佳宁,张婕,等. 响应面法优化桦褐孔菌胞外多糖发酵条件[J]. 现代食品科技, 2009, 25(3): 298—301.
- [28] 胡红伟,段明房,闫凌鹏,等. 一株枯草芽孢杆菌的鉴定及液体发酵工艺优化[J]. 中国饲料, 2017(5):13—19.
- [29] Abedi S Z, Yeganeh S, Moradian F, *et al.* Isolation and identification of *Lactobacillus* strains from dairy products and evaluation of carbon sources effects on bacterial growth and phytase activity: Supplement for fish feed[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2019, 21(4):845—855.
- [30] 冯美琴. 植物乳杆菌胞外多糖发酵、结构鉴定及其功能特性研究[D]. 南京:南京农业大学, 2012.
- [31] 曹永强,王辑,赵笑,等. 植物乳杆菌 YW11 生产胞外多糖的发酵条件研究[J]. 食品科学技术学报, 2016, 34(1):42—49.
- [32] 钟华晨,张悦,顾悦,等. 高产生物膜乳酸菌的筛选、鉴定及胞外多糖分泌条件的研究[J]. 中国食品学报, 2021, 21(7):76—86.
- [33] Gu D, Jiao Y C, Wu J, *et al.* Optimization of EPS Production and Characterization by a Halophilic Bacterium, *Kocuriarosea* ZJUQH from Chaka Salt Lake with Response Surface Methodology [J]. Molecules, 2017, 22(5): 814—814.
- [34] 杨静,高泽鑫,朱莉,等. 产胞外多糖的苏云金芽孢杆菌的筛选及发酵工艺优化[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(24):124—131.
- [35] 姜云芸,蔡森,邵淑娟,等. 植物乳杆菌 K25 发酵产胞外多糖的影响因素及其应用[J]. 食品科学技术学报, 2018, 36(1):25—34.
- [36] 冯美琴,邱远,张琦,等. 响应曲面法优化植物乳杆菌胞外多糖的醇沉工艺[J]. 食品科学, 2011, 32(19): 188—192.
- [37] 胡彦营. 羊肚菌多糖发酵、提取及抗疲劳作用研究[D]. 济南:山东大学, 2010.

Optimization of the method for determining exopolysaccharides and culture conditions of *Erwinia persicina* Cp2

JIA Qian-ying, ZHU Huan, LI Yi-juan, ZHANG Feng-qi, ZHANG Zhen-fen*

(College of Grassland Science, Gansu Agricultural University Key Laboratory of Grassland Ecosystem, Ministry of Education/Pratacultural Engineering Laboratory of Gansu Province/Sino-U. S. Center for Grassland Ecosystem Sustainability, Lanzhou 730070, China)

Abstract:【Objective】To determine the content of exopolysaccharides(EPS) in seed—borne *Erwinia persicina* Cp2 present in alfalfa and identify its optimum culture conditions for achieving higher yield of EPS. 【Method】A single—factor test was employed to optimize the determination method and culture conditions of Cp2 EPS. 【Result】The optimized conditions for the phenol—sulfuric acid method were determined as follows: maximum absorption wavelength of 490 nm, color development time of 20 min, color development temperature of 100 °C, phenol mass fraction of 5%, phenol dosage 0.80 mL, and concentrated sulfuric acid dosage of 5.00 mL. The optimized medium for Cp2 EPS production included soy peptone (20.00 g), dipotassium hydrogen phosphate (1.50 g), magnesium sulfate

(1.50 g), starch (25.00 g), distilled water (1.00 L) maintained at pH 7.0~7.2, sterilization at 121 °C for 15 min, and the enrichment culture temperature of 30 °C. 【Conclusion】 The results revealed that the phenol—sulfuric acid method was superior to anthrone—sulfuric acid in determining the Cp2 EPS content, resulting in 365.91% increase in Cp2 EPS production compared to the previous method. This study provides a theoretical basis for the functional research and product development of *Erwinia persicina* strain Cp2 exopolysaccharides.

Key words: *Erwinia persicina*; exopolysaccharides; optimization of culture conditions

(责任编辑 靳奇峰)