

# *Pseudomonas simiae* MHR6产胞外多糖条件优化及抗氧化活性

刘晓婷<sup>1</sup>,张琛<sup>1</sup>,韩江茹<sup>1</sup>,李晓林<sup>2</sup>,姚拓<sup>1\*</sup>

(1. 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;2. 金昌市金川区农业技术推广服务中心,甘肃 金昌 737100)

**摘要:**【目的】研究培养条件对*Pseudomonas simiae* MHR6生长及胞外多糖(EPS)产量的影响,并探究其抗氧化活性,为新型农业生物制剂的开发利用提供可靠的理论依据。【方法】以EPS产量为指标,通过单因素试验对菌株MHR6产EPS条件进行优化,并对EPS的羟基自由基(OH<sup>-</sup>)、超氧阴离子(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)和过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)的清除作用进行了研究。【结果】经优化后,MHR6产EPS的最佳培养条件是:培养时间5 d、温度28℃、初始pH值8、接种量3%。当EPS质量浓度为1.0 mg/mL时,其OH<sup>-</sup>、O<sub>2</sub><sup>-</sup>和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的清除率分别为56.94%、64.08%和31.69%。【结论】最佳培养条件下EPS产量达到最大值,为6.16 mg/mL,比优化前提高了24.9%。抗氧化实验结果表明MHR6所产的EPS具有良好的抗氧化活性。

**关键词:**胞外多糖;培养条件优化;自由基清除;抗氧化活性

**中图分类号:**S154.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-5500(2024)04-0189-08

**DOI:**10.13817/j.cnki.cycp.2024.04.021



微生物多糖是由某些细菌、真菌及酵母菌等在生长代谢过程中分泌到细胞外的天然高分子量聚合物,属于微生物的次级代谢产物<sup>[1]</sup>。根据其在细胞中的位置分为胞内多糖、胞壁多糖和胞外多糖(Exopolysaccharides, EPS),其中EPS具有产出效率高、更易与菌体分离等优点,是研究和应用较多的一类微生物多糖<sup>[2]</sup>。据报道,微生物EPS具有多种生物活性,且具有易提取、生产成本低、生产周期短、不受季节影响等独特的优势,目前已被广泛应用于农业、食品、医药、化工等多个领域<sup>[3-4]</sup>。近几十年来,随着糖生物学研究

的深入,人们发现EPS在生物体中绝非仅作为能量来源和支持组织,更重要的是具有抗氧化<sup>[5]</sup>、免疫调节<sup>[6]</sup>、抗肿瘤<sup>[7]</sup>、降血糖<sup>[8]</sup>等功能活性。此外,EPS作为一种新型的天然大分子活性物质,近年来在农业生产中的应用潜力正日益引起人们的关注。

随着全球气候不断变化和人类活动加剧,农业生产中各种生物和非生物胁迫不断增多,严重威胁着农业可持续生产和全球粮食安全。当植物应对不良环境胁迫时,会诱导植物体内产生活性氧,过量活性氧诱导的氧化应激会对植物产生很强的毒害作用,严重时可导致死亡<sup>[9]</sup>。近年来,研究发现植物根际促生菌(Plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)产生的EPS在增强植物抗逆性方面具有潜在应用价值<sup>[10]</sup>,特别是在体外抗氧化系统中,EPS被认为是一种有效的自由基清除剂和抗氧化剂,在保护植物免受胁迫条件下的氧化应激方面起着至关重要的作用<sup>[11]</sup>。Sun等<sup>[12]</sup>对内生细菌*Pantoea alhagi* EPS进行了抗氧化活性研究,结果表明其对羟自由基(Hydroxyl radical, OH<sup>-</sup>)和

**收稿日期:**2022-10-17; **修回日期:**2022-10-29

**基金资助:**甘肃省教育科技创新专项(GSSYLXM-01);甘肃省林业与草原局草原生态修复治理科技支撑项目(GSAU-TSYF-2021-011)

**作者简介:**刘晓婷(1996-),女,甘肃榆中人,博士研究生。

E-mail: 1184877443@qq.com

\*通信作者。E-mail: yaotuo@gsau.edu.cn

超氧阴离子(Superoxide radical,  $O_2^-$ )有一定的清除作用,在增强作物抗性方面具有潜在的应用价值。Meneses等<sup>[5]</sup>发现固氮醋酸杆菌(*Gluconacetobacter diazotrophicus*)EPS作为诱导子,在水稻(*Oryza sativa*)定殖过程中可以保护细胞免受氧化胁迫,促进了水稻幼苗的生长。

微生物发酵是一个复杂的生化反应过程,如果要提高EPS产量,就必须保证微生物有一个适宜的生长和代谢环境,在此基础上进一步对营养和环境参数进行优化。研究表明,EPS的合成是在细胞内进行,然后分泌到细胞外的,其生产水平不仅与菌株本身的遗传特性密切相关,同时也会由于营养条件及发酵条件的不同致使其产量大幅改变<sup>[13-14]</sup>。Saranya等<sup>[1]</sup>以EPS产量为依据,研究了碳源种类,培养时间及pH对*Enterobacter soli* EPS产量的影响,结果表明,在1%蔗糖为碳源、pH值为6.0、培养72 h的条件下,可获得最大产量,其产量较优化前提高了0.53倍。目前,已有不少学者对源于PGPR的EPS进行研究,对*Pseudomonas simiae* EPS的研究可以丰富人们对胞外多糖的认识,并进一步拓展它在农业领域的应用,而提高EPS产量是进行深入研究的基础,也是它在农业领域应用的必要前提。

本研究以一株产EPS的猴假单胞菌(*Pseudomonas simiae* MHR6)为研究对象,利用苯酚-硫酸法测定其EPS产量,通过优化培养条件以进一步提高EPS的产量,并对EPS的抗氧化能力进行分析,为EPS在农业领域的研究应用提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试菌株

*P. simiae* MHR6是本课题组前期从毛稈羊茅(*Festuca kirilowii*)根际分离的一株优良植物根际促生菌,现保藏于甘肃农业大学草业学院草地微生物多样性实验室。

### 1.2 培养基

LB培养基(Luria-Bertani, LB):胰蛋白胨10.0 g,酵母提取物5.0 g,NaCl 5.0 g,琼脂20.0 g(液体培养基不加),蒸馏水1 000 mL,pH值7.0~7.2。基础产糖培养基:蛋白胨20.0 g,  $K_2HPO_4$  1.15 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.5 g,丙三醇15 mL,蒸馏水1 000 mL。牛肉膏蛋白胨培

养基:胰蛋白胨10.0 g,牛肉膏3.0 g,NaCl 5.0 g,蒸馏水1 000 mL,pH值7.0~7.2。TB培养基(Terrific Broth, TB):胰蛋白胨12.0 g,酵母提取物24.0 g,丙三醇4 mL,  $K_2HPO_4$  12.54 g,  $KH_2PO_4$  2.31 g,蒸馏水1 000 mL,pH值7.0~7.2。

### 1.3 菌株活化

将保存于-80℃冰箱的*P. simiae* MHR6菌株接种于LB固体培养基上,28℃培养箱培养48 h后,挑选生长良好的菌落转接于LB液体培养基中,28℃、180 r/min摇床中培养24 h,连续培养两代后备用。

### 1.4 EPS的提取与测定

采用乙醇沉淀法<sup>[15]</sup>提取菌株培养液中的粗多糖。将活化后的菌株接种于100 mL基础产糖培养基中,28℃、180 r/min振荡培养4 d。将培养结束后的菌株培养液10 000 r/min,4℃离心15 min,弃去菌体收集上清液,加入三氯乙酸至终浓度10%(m/v),低温静置12 h。静置后10 000 r/min,4℃离心15 min除去蛋白,取上清液加入3倍体积预冷的95%的乙醇溶液混匀,4℃冰箱中静置24 h后10 000 r/min,4℃离心15 min得到粗多糖沉淀。

采用苯酚-硫酸法<sup>[16]</sup>测定菌株培养液中的EPS含量。将上述粗多糖适当稀释后取1 mL加入1 mL体积分数为6%的苯酚溶液,再缓慢加入5 mL浓硫酸混匀,冷却至室温后于波长490 nm处测定吸光度值。以葡萄糖为标准品绘制葡萄糖标准曲线,根据标准曲线计算培养液中的EPS含量。

### 1.5 菌株产EPS培养条件的优化

1.5.1 不同培养基对菌株产EPS的影响 将菌株按1%的接种量接种于LB培养基、基础产糖培养基、牛肉膏蛋白胨培养基、TB培养基中,28℃、180 r/min振荡培养4 d,分别测定不同培养液中EPS含量,筛选出有利于菌株产EPS的最适培养基,作为后续实验的基础发酵培养基。

1.5.2 培养时间对菌株EPS产量及生长的影响 将菌株种子液按1%的接种量接种于初始pH值为7的基础产糖培养基中,在28℃、180 r/min的恒温摇床中振荡培养,分别在1、2、3、4、5和6 d后按照1.4方法测定EPS含量。

1.5.3 培养温度对菌株EPS产量及生长的影响 将菌株种子液按1%的接种量接种于初始pH值为7的

基础产糖培养基中,设置温度梯度为16、20、24、28和32℃,180 r/min的摇床中振荡培养5 d,按照1.4方法测定EPS含量。

1.5.4 pH对菌株EPS产量及生长的影响 将菌株种子液按1%的接种量接种于初始pH值分别为5、6、7、8和9的基础产糖培养基中,在28℃、180 r/min的恒温摇床中振荡培养5 d,按照1.4方法测定EPS含量。

1.5.5 接种量对菌株EPS产量及生长的影响 将菌株种子液分别按0.5%、1%、2%、3%和4%的接种量接种于初始pH值为8的基础产糖培养基中,在28℃、180 r/min的恒温摇床中振荡培养5 d,按照1.4方法测定EPS含量。

## 1.6 抗氧化活性测定

1.6.1 OH<sup>-</sup>清除能力测定 参考徐勇亮等<sup>[17]</sup>的方法进行测定并略作修改。准确吸取质量浓度为0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL的多糖样品溶液1 mL于试管中,依次加入6 mmol/L Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液1 mL、6 mmol/L水杨酸-乙醇溶液1 mL、8 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液1 mL,充分混匀后置于37℃水浴中反应60 min,于510 nm波长处测定吸光度,记为A<sub>1</sub>;A<sub>2</sub>为用无水乙醇代替水杨酸-无水乙醇溶液的吸光度;A<sub>3</sub>为用去离子水代替多糖样品溶液的吸光度。以相同质量浓度的抗坏血酸(VC)作为阳性对照。每组进行3次平行试验,按下述公式计算OH<sup>-</sup>清除率:

$$\text{OH}^- \text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3}\right) \times 100\%$$

1.6.2 O<sub>2</sub><sup>-</sup>清除能力测定 参考李尧等<sup>[18]</sup>的方法进行测定并略作修改。准确吸取质量浓度为0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL的多糖样品溶液0.5 mL于试管中,加入1.5 mL Tris-HCl(pH值8.2),置于30℃水浴中反应20 min,冷却至室温后加入7 mmol/L焦性没食子酸1.5 mL,充分混匀后加入0.5 mL浓盐酸停止反应,于320 nm波长处测定吸光度,记为A<sub>1</sub>;A<sub>2</sub>为用去离子水代替焦性没食子酸的吸光度;A<sub>3</sub>为用去离子水代替多糖样品溶液的吸光度。以相同质量浓度的VC作为阳性对照。每组进行3次平行试验,按下述公式计算O<sub>2</sub><sup>-</sup>清除率:

$$\text{O}_2^- \text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3}\right) \times 100\%$$

1.6.3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>清除能力测定 参考单承莺等<sup>[19]</sup>的方法

进行测定并略作修改。准确吸取质量浓度为0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL的多糖样品溶液0.4 mL于试管中,加入2.8 mL由50 mmol/L磷酸缓冲液(pH值=7.4)配制的0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液,反应10 min后在230 nm波长处测定吸光度,记为A<sub>1</sub>;A<sub>2</sub>为用去离子水代替H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液的吸光度;A<sub>3</sub>为用去离子水代替多糖样品溶液的吸光度。以相同质量浓度的VC作为阳性对照。每组进行3次平行试验,按下述公式计算H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>清除率:

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3}\right) \times 100\%$$

## 1.7 数据分析

采用Excel 2010、SPSS 22.0软件进行数据统计和分析,使用Origin 2022软件绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株MHR6产EPS培养条件的优化

2.1.1 不同培养基对菌株MHR6产EPS的影响 微生物生长的营养条件会对EPS的生理功能以及产量产生重要影响。菌株MHR6在4种培养基中均能产生EPS,但EPS产量各异,其中基础产糖培养基中EPS产量最高,为4.93 mg/mL,其次分别为TB培养基和牛肉膏蛋白胨培养基,LB培养基最低,因此选择基础产糖培养基作为MHR6合成EPS的最佳培养基(图1)。

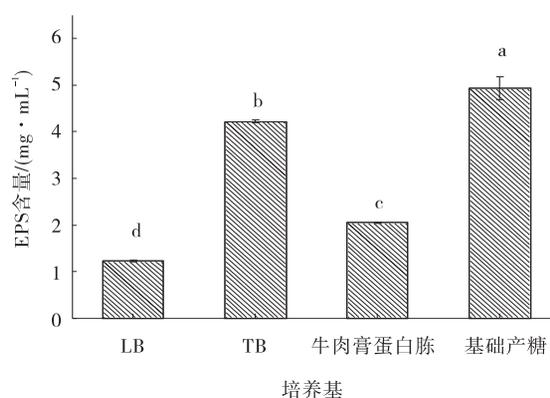


图1 不同培养基对菌株MHR6产EPS的影响

Fig. 1 Effects of different media on EPS production by strain MHR6

注:不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ ),下同。

2.1.2 培养时间对菌株MHR6 EPS产量及生长的影响 培养时间是影响微生物EPS产生和积累的一个重要因素。同一菌株培养时间不同,EPS产量也有明

显差异。菌株 MHR6 EPS 产量随着培养时间增加逐渐增大,在培养时间为 5 d 时, EPS 产量达到最大值,随着培养时间继续延长, EPS 产量开始出现下降趋势(图 2),因此,菌株 MHR6 合成 EPS 的最佳培养时间为 5 d。

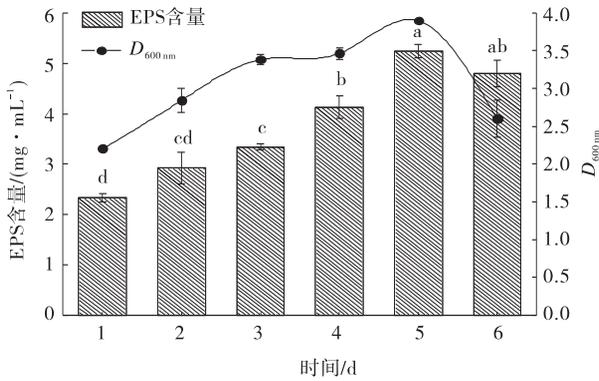


图 2 不同培养时间对菌株 EPS 产量及生长的影响

Fig. 2 Effects of different culture time on the yield of EPS and the growth of strain

2.1.3 培养温度对菌株 MHR6 EPS 产量及生长的影响 培养温度与微生物生长代谢之间密切相关,当温度为 16~24 °C 时, EPS 产量逐渐增加,但不明显;当温度为 28 °C 时,菌株 MHR6 产 EPS 能力最强, EPS 产量为 5.03 mg/mL。随着温度继续升高时, EPS 产量出现下降趋势(图 3),因此,菌株 MHR6 合成 EPS 的最佳温度为 28 °C。

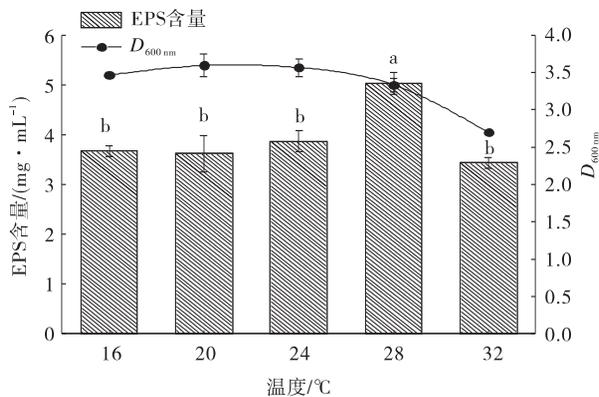


图 3 不同温度对菌株 EPS 产量及生长的影响

Fig. 3 Effects of different temperature on the yield of EPS and the growth of strain

2.1.4 初始 pH 对菌株 MHR6 EPS 产量及生长的影响 培养基的 pH 值与微生物的生命活动密切相关,直接或间接影响其吸收营养物质的能力以及代谢途径的变化,从而影响 EPS 等次生代谢产物的合成能力。当初始 pH 值为 5 和 6 时菌株生长受到抑制,从而使菌株产 EPS 能力减弱;而 MHR6 在 7~9 的 pH 值范

围内生长良好。当初始 pH 值为 8 时, EPS 产量达到最大(图 4),因此,菌株 MHR6 合成 EPS 的最佳初始 pH 值为 8。

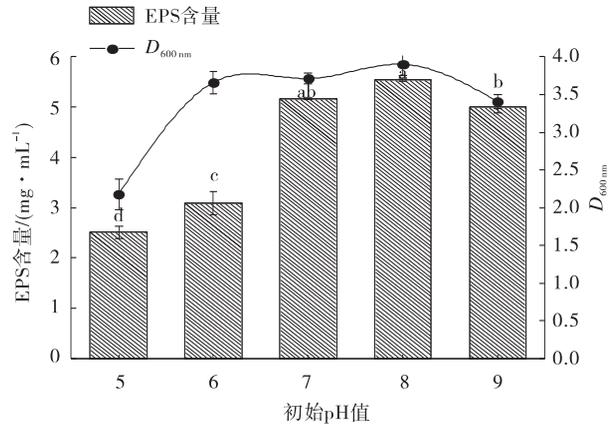


图 4 不同初始 pH 值对菌株 EPS 产量及生长的影响

Fig. 4 Effects of different initial pH value on the yield of EPS and the growth of strain

2.1.5 接种量对菌株 MHR6 EPS 产量及生长的影响 当接种量为 0.5% 时,菌株繁殖速率较慢, EPS 积累较少;当接种量为 1%~3% 时,培养基营养物质丰富,菌株繁殖速度较快, EPS 产量也逐渐增加,在接种量为 3% 时 EPS 产量达到最大,为 6.16 mg/mL。在此基础上,接种量的进一步增加会导致 EPS 合成能力下降(图 5),因此,选择 3% 的接种量,有利于菌株 EPS 的积累。

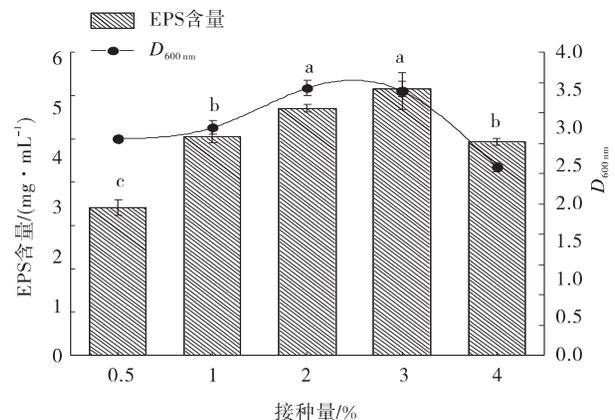


图 5 不同接种量对菌株 EPS 产量及生长的影响

Fig. 5 Effects of different inoculation amount on the yield of EPS and the growth of strain

## 2.2 菌株 MHR6 EPS 抗氧化性评价

2.2.1 OH<sup>-</sup> 清除能力 OH<sup>-</sup> 是生物体内最活跃的自由基,它具有极强的攻击性,可以与大多数生物大分子快速反应,引起细胞损伤。通过探究 MHR6 EPS 对 OH<sup>-</sup> 的清除能力,结果表明 EPS 对 OH<sup>-</sup> 具有一定的清

除效果,在0.1~1.0 mg/mL的质量浓度范围内最大清除率达56.94%,但在相同质量浓度范围内其清除率低于阳性对照VC(图6)。

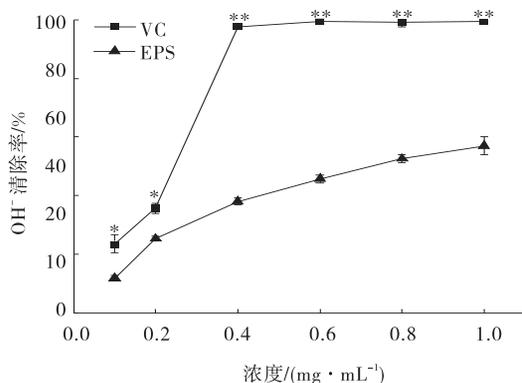


图6 MHR6 EPS对OH<sup>·</sup>的清除活性

Fig. 6 Scavenging activities of MHR6 EPS on hydroxyl radical

注:\*表示同一浓度下VC与EPS间差异显著( $P<0.05$ ), \*\*表示同一浓度下VC与EPS间差异极显著( $P<0.01$ ),下同。

2.2.2 O<sub>2</sub><sup>-</sup>清除能力 O<sub>2</sub><sup>-</sup>通常也是评价多糖样品抗氧化活性的重要指标之一。在0.1~1.0 mg/mL的质量浓度范围内,EPS对O<sub>2</sub><sup>-</sup>的清除率随质量浓度的升高逐渐升高,在1.0 mg/mL时,EPS对O<sub>2</sub><sup>-</sup>的清除率接近于65%,表明其具有良好的抗氧化性。当质量浓度为0.6~1.0 mg/mL时,清除效果增幅减缓,在相同质量浓度范围内其清除率低于阳性对照VC(图7)。

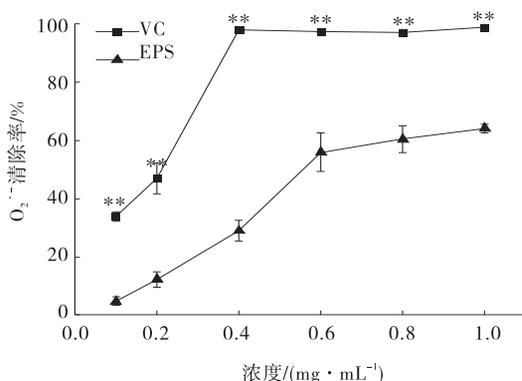


图7 MHR6 EPS对O<sub>2</sub><sup>-</sup>的清除活性

Fig. 7 Scavenging activities of MHR6 EPS on superoxide radical

2.2.3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>清除能力 通过测定MHR6 EPS对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的清除效果,结果显示EPS对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>具有一定的清除能力并与其质量浓度呈正相关,但清除能力远低于阳性对照VC。当多糖样品质量浓度为1.0 mg/mL

时,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>清除率为31.69%,其清除能力明显低于OH<sup>-</sup>与O<sub>2</sub><sup>-</sup>(图8)。

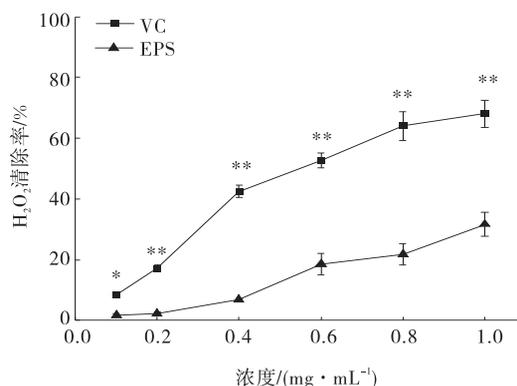


图8 MHR6 EPS对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的清除活性

Fig. 8 Scavenging activities of MHR6 EPS on hydrogen peroxide

### 3 讨论

在植物生长发育过程中,复杂多变的自然环境所产生的胁迫效应一直是困扰当今农业发展的主要问题。不良环境变化不仅会造成农产品产量下降,还会对其质量安全造成严重的威胁。近年来的研究已证实,优良PGPR产生的EPS在促进植物生长发育、改良土壤结构、提高植物抗逆性方面发挥着重要作用,是一种具有良好应用前景的天然大分子活性物质<sup>[9]</sup>。

EPS产量是制约其大规模应用于农业生产的重要原因。研究报道,除了菌株自身遗传因素外,微生物的培养基种类、培养条件与其生长及合成EPS的能力密切相关。适宜的培养条件可以提高微生物的繁殖速率,从而提高EPS产量<sup>[20]</sup>。本研究也发现EPS的产生受时间、温度、pH及接种量的变化影响较大。在本研究中EPS产量随着培养时间的增加而增加,当培养至第5天时产量最大,但第6天开始产量开始下降,这可能是由于生长后期营养物质消耗和有毒有害代谢产物的积累,发生菌体衰亡,影响了产糖效率;也可能是培养时间过长,环境中存在的多糖水解酶分解了EPS,因而产量呈下降趋势<sup>[21]</sup>。陈海燕<sup>[22]</sup>研究表明,培养过程中适宜的温度有利于菌株的生长,但温度过高或过低会降低菌株活力从而影响其产EPS能力,这与本研究结果一致。合适的pH可使微生物的相关酶系保持较高活性,有利于微生物次级代谢产物的产生和积累。本研究通过对培养基中设定不同的初始pH发现,在pH值为8时EPS产量最高,说明该菌株更适

宜在弱碱性条件下合成EPS和生长。本研究发现在接种量较低时,*P. simiae* MHR6 EPS产量随接种量增加而增加,但接种量持续增加,其产量又开始下降,可能是由于接种量过高导致菌株间出现营养竞争,在有限的营养条件下无法满足菌株正常的代谢活动<sup>[23]</sup>,因此,合适的接种量有利于EPS的积累,这与Raza等<sup>[24]</sup>取得的研究结果一致。

氧自由基反应在植物的生理代谢过程中起重要作用,过量的活性氧致使植物处于氧化应激状态,而氧化应激常常会破坏细胞结构与功能,加速其衰老甚至导致死亡<sup>[25]</sup>。EPS的抗氧化能力已被广泛认可,并得到了广泛的研究<sup>[12]</sup>。在本研究中,我们通过测定 $\text{OH}^-$ 、 $\text{O}_2^-$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的清除活性,对MHR6 EPS的抗氧化活性进行了评估。研究表明,MHR6 EPS对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的清除率偏低,最高仅为30%左右,但对 $\text{OH}^-$ 和 $\text{O}_2^-$ 清除能力较强,具有良好的抗氧化活性。本研究还发现抗氧化能力与EPS质量浓度呈正相关,这说明抗氧化活性与多糖浓度具有明显的剂量效应。黎善铭等<sup>[26]</sup>测定了毛薯多糖对 $\text{O}_2^-$ 、 $\text{OH}^-$ 和DPPH自由基的清除能力,结果表明毛薯多糖具有抗氧化活性,且具有剂量依赖性。Yang等<sup>[27]</sup>的研究结果也证实了这一结果。EPS作为一种天然抗氧化剂,其清除自由基的作用机理可能是多糖与自由基直接发生作用,如多糖可提供氢原子与 $\text{OH}^-$ 结合生成水,起到清除作用;也可能通过螯合金属离子来抑制自由基的产生;此外,多糖还能通过提高植物体内抗氧化酶活性,从而间接地发挥其抗氧化作用<sup>[28]</sup>。

## 4 结论

*P. simiae* MHR6产EPS的最佳培养条件为时间5 d、温度28℃、初始pH值8、接种量3%,在此条件下,MHR6 EPS产量达到6.16 mg/mL,比优化前提高了24.9%。同时,抗氧化实验结果表明MHR6所产的EPS对 $\text{OH}^-$ 、 $\text{O}_2^-$ 的清除效果较好,也具有一定的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 清除能力,具有良好的抗氧化活性。因此,MHR6所产的EPS在新型农业生物制剂的开发应用等领域具有潜在的应用价值。

### 参考文献:

[1] Saranya K, Arumugam S, Kanimozhi B, *et al.* Adsorption

of chromium by exopolysaccharides extracted from lignolytic phosphate solubilizing bacteria[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 206: 788—798.

- [2] 李彬,陈向楠,张建法,等. 产胞外多糖菌株的筛选及胞外多糖结构分析[J]. *生物技术通报*, 2016, 32(5): 165—171.
- [3] Sun M L, Zhao F, Zhang X K, *et al.* Improvement of the production of an Arctic bacterial exopolysaccharide with protective effect on human skin cells against UV—induced oxidative stress[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(11): 4863—4875.
- [4] 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.
- [5] Meneses C, Gonçalves T, Alquéres S, *et al.* *Gluconacetobacter diazotrophicus* exopolysaccharide protects bacterial cells against oxidative stress in vitro and during rice plant colonization [J]. *Plant and Soil*, 2017, 416 (1/2): 133—147.
- [6] Kook S Y, Lee Y, Jeong E C, *et al.* Immunomodulatory effects of exopolysaccharides produced by *Bacillus licheniformis* and *Leuconostoc mesenteroides* isolated from Korean kimchi [J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 54: 211—219.
- [7] Setare K, Amirhossein R, Masoud H, *et al.* Evaluation of anti—tumor effect of the exopolysaccharide from new cold—adapted yeast, *Rhodotorula mucilaginosa* sp. GUMS16 on chronic myeloid leukemia K562 cell line[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 206: 21—28.
- [8] Wu H Q, Ma Z L, Zhang D X, *et al.* Sequential extraction, characterization, and analysis of pumpkin polysaccharides for their hypoglycemic activities and effects on cut microbiota in mice[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2021, 8: 769181.
- [9] 祁伟亮,孙万仓,马骊. 活性氧参与调控植物生长发育和胁迫应激响应机理的研究进展[J]. *干旱地区农业研究*, 2021, 39(3): 69—81.
- [10] 魏宏宇,李怡,彭帅英,等. 胞外多糖促进胁迫条件下农作物生长的研究与展望[J]. *江苏农业学报*, 2022, 38(4): 1123—1134.
- [11] Wang J Q, Hu S Z, Nie S P, *et al.* Reviews on mechanisms of in vitro antioxidant activity of polysaccharides [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016: 5692852.

- [12] Sun L, Yang Y B, Lei P, *et al.* Structure characterization, antioxidant and emulsifying capacities of exopolysaccharide derived from *Pantoeaalhagi* NX-11 [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 261: 117872.
- [13] 乔新荣, 王泽夏, 叶润, 等. 猫爪草内生真菌胞外多糖的抗氧化活性及培养条件优化研究[J]. 粮食与油脂, 2022, 35(8): 131-136.
- [14] 张文平. 植物乳杆菌 LPC-1 胞外多糖发酵、结构解析及诱导水稻抗逆性研究[D]. 南昌: 江西农业大学, 2019.
- [15] Verhoef R, Waard P D, Schols H A, *et al.* *Methylobacterium* sp. isolated from a Finnish paper machine produces highly pyruvated galactan exopolysaccharides [J]. Carbohydrate Research, 2003, 338(18): 1851-1859.
- [16] Kazy S K, Sar P, Singh S P, *et al.* Extracellular polysaccharides of a copper-sensitive and a copper-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain: synthesis, chemical nature and copper binding [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2002, 18(6): 583-588.
- [17] 徐勇亮, 徐军伟. 灵芝不同菌株胞外多糖的单糖组成和抗氧化活性分析[J]. 菌物学报, 2022, 41(5): 792-801.
- [18] 李尧, 卢承蓉, 刘丹, 等. 乳酸片球菌胞外多糖的分离纯化、结构分析及抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(19): 35-42.
- [19] 单承莺, 任红荣, 何海玲, 等. 毛胶薯蕈多糖的体外抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(12): 86-89.
- [20] Mata J A, Béjar V, Bressollier P, *et al.* Characterization of exopolysaccharides produced by three moderately halophilic bacteria belonging to the family *Alteromonadaceae* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 105(2): 521-528.
- [21] 邝嘉华, 黄燕燕, 胡金双, 等. 解淀粉芽孢杆菌 DMBA-K4 高产胞外多糖的发酵条件优化及其抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(22): 28-35.
- [22] 陈海燕. 高产胞外多糖嗜热链球菌的筛选、培养条件的优化及多糖的结构分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2020.
- [23] Kumar M, Kumar M, Pandey A, *et al.* Genomic analysis of carbon dioxide sequestering bacterium for exopolysaccharides production [J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 1-12.
- [24] Raza W, Makeen K, Wang Y, *et al.* Optimization, purification, characterization and antioxidant activity of an extracellular polysaccharide produced by *Paenibacillus polymyxa* SQR-21 [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(10): 6095-6103.
- [25] 李格, 孟小庆, 蔡敬, 等. 活性氧在植物非生物胁迫响应中功能的研究进展[J]. 植物生理学报, 2018, 54(6): 951-959.
- [26] 黎善铭, 桂海霞, 梅朋飞, 等. 毛薯多糖提取分离工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 热带作物学报, 2022, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1019.S.20211026.2212.002.html>.
- [27] Yang F R, Chen J L, Ye S H, *et al.* Characterization of antioxidant activity of exopolysaccharides from endophytic *Lysinibacillus sphaericus* Ya6 under osmotic stress conditions [J]. Process Biochemistry, 2021, 113, 87-96.
- [28] 蔡国林. 解淀粉芽孢杆菌胞外多糖的结构及其益生作用机制[D]. 无锡: 江南大学, 2020.

## Optimization of culture conditions and antioxidant activity of exopolysaccharides produced by *Pseudomonas simiae* MHR6

LIU Xiao-ting<sup>1</sup>, ZHANG Chen<sup>1</sup>, HAN Jang-ru<sup>1</sup>, LI Xiao-lin<sup>2</sup>, YAO Tuo<sup>1\*</sup>

(1. College of Grassland Science, Gansu Agricultural University, Key Laboratory for Grassland Ecosystem, Ministry of Education, Grassland Engineering Laboratory of Gansu Province, Sino-U. S. Centers for Grazing Land Ecosystem Sustainability, Lanzhou 730070, China; 2. Agricultural Technology Extension Service Center of Jinchuan District, Jinchang City, Jinchang 737100, China)

**Abstract:** 【Objective】 In this paper, the effects of culture conditions on the growth of *Pseudomonas simiae* MHR6 and the production of exopolysaccharides (EPS) were studied, and the antioxidant activity of *P. simiae* MHR6 was investigated, providing a reliable theoretical basis for the development and utilization of new agricultural biological agents. 【Method】 With the yield of EPS as the index, the EPS production conditions by MHR6 was optimized by the single factor test. Subsequently, the antioxidant activity was determined by  $\text{OH}^-$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  scavenging rate of EPS. 【Result】 The results showed that after optimization, the optimal culture conditions for MHR6 to produce EPS were as follows: culture time 5 d, temperature 28 °C, initial pH value 8, inoculation amount 3%. When the mass concentration of EPS was 1.0 mg/mL, the scavenging rates of  $\text{OH}^-$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  were 56.94%, 64.08% and 31.69% respectively. 【Conclusion】 Under the optimal culture conditions, EPS yield reached the maximum value of 6.16 mg/mL, which was 24.9% higher than that before. Antioxidant activity results showed that EPS had strong antioxidant activity.

**Key words:** exopolysaccharides (EPS); optimization of culture conditions; radical scavenging; antioxidant activity

(责任编辑 刘建荣)