

◆ 生物科学 ◆

微杆菌 XL1 胞外多糖发酵条件优化及其活性研究^{*}吴丹^{1,2},张岩^{1,2},徐海洋^{1,2},徐淋香^{1,2,3**}

(1. 江苏海洋大学,江苏连云港 222005;2. 江苏省海洋生物资源与环境重点实验室,江苏连云港 222005;3. 江苏省海洋生物产业技术协同创新中心,江苏连云港 222005)

摘要:为提高微杆菌 *Microbacterium* XL1 胞外多糖的产量,探究其生理活性功能,本研究采用单因素法优化微杆菌 XL1 发酵产胞外多糖的碳、氮源种类及添加量、温度、初始 pH 和发酵时间,并对微杆菌 XL1 胞外多糖的吸湿保湿性能、抗氧化活性以及酪氨酸酶抑制活性进行测试。结果表明,微杆菌 XL1 产胞外多糖的最佳条件如下:蔗糖为碳源、酵母提取物为氮源,蔗糖添加量为 20%、酵母提取物添加量为 0.3%,温度 20℃,pH 值为 8.0,发酵时间 24 h。在最佳条件下,胞外多糖产量最高达 92 g/L,是优化前的 3.2 倍。同时,微杆菌 XL1 胞外多糖的吸湿、保湿性能与透明质酸相似,其对 DPPH 自由基、羟基自由基和铁离子的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为 1.2,0.8 和 0.3 mg/mL,对酪氨酸酶的抑制率可达 55%。本研究提高了微杆菌 XL1 胞外多糖的产量,并证实微杆菌 XL1 胞外多糖具有优良的生理活性,对丰富微杆菌胞外多糖活性的研究有重要意义,可为其在化妆品和食品行业中的开发应用提供理论依据。

关键词:微杆菌 单因素法 吸湿保湿 抗氧化 酪氨酸酶

中图分类号:TS201.3 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2021)05-0451-09

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20211202.001

0 引言

多糖是由十种或十种以上单糖通过糖苷键连接而成的聚合物,广泛分布于自然界中,具有十分重要的地位。微生物胞外多糖是细菌、真菌和藻类分泌到细胞壁外,且在生命活动中发挥重要作用的天然大分

子^[1]。与动植物多糖相比,微生物胞外多糖不受地理位置、周围环境的影响,可大规模工业化发酵,并具有成本低、易提取、无毒、安全性高等优点^[2,3]。近年来,人们对微生物胞外多糖进行广泛而深入的研究,探索胞外多糖的多种生物学功能,包括去除和吸收重金属离子^[4,5]、抗氧化^[6,7]、抗肿瘤^[8,9]、抗炎^[10]、抑制

收稿日期:2021-08-11

* 江苏省博士后科研资助计划(2019K215),连云港市博士后科研基金项目 and 江苏海洋大学科研基金项目(KQ17019)资助。

【作者简介】

吴丹(1997-),女,在读硕士研究生,主要从事微生物多糖研究。

【**通信作者】

徐淋香(1988-),女,副教授,主要从事海洋微生物研究,E-mail:xulinxiang1988@163.com。

【引用本文】

吴丹,张岩,徐海洋,等.微杆菌 XL1 胞外多糖发酵条件优化及其活性研究[J].广西科学,2021,28(5):451-459.

WU D,ZHANG Y,XU H Y,et al. Study on the Optimization of Fermentation Conditions and Activity of Extracellular Polysaccharide from *Microbacterium* XL1 [J]. Guangxi Sciences,2021,28(5):451-459.

黑色素形成^[11]和益生元活性^[12]等方面。目前,胞外多糖已在医药和食品工业中展现出巨大的应用潜力。在医药领域中,由 *Lactobacillus sakei* Probio 65^[13]产生的胞外多糖可通过抑制酪氨酸酶活性来减少黑色素的生成,进而降低黑色素瘤的发生率^[14,15];胞外多糖还可为抗肿瘤药的制备提供支持,如胶红酵母胞外多糖组分 REPS2-A 能有效抑制肝癌细胞的增殖,诱导肝癌细胞 Hep G2 凋亡^[16]。在食品工业中,经黄单胞杆菌发酵生成的黄胶原是一种应用广泛的胞外多糖,它可作为增稠剂、乳化剂、悬浮剂等添加在乳制品、饮料制品、调味品中,以提高食品稳定性及品质^[17]。目前,有少数学者对微杆菌属(*Microbacterium* sp.)胞外多糖进行研究,例如 *Microbacterium* TL13 产生的胞外多糖能够吸附铬、铜、镍和钴等重金属离子,具有生物修复重金属污染废水和土壤的潜力^[18];产自海洋 *Microbacterium* FSW-25 的胞外多糖具有比黄胶原更高的抗氧化活性,可作为一种潜在的抗氧化剂^[19]。但相对而言,目前对微杆菌属发酵产胞外多糖活性的研究仍然较少。

本研究采用来源于中国连云港水湾湿地的一株微杆菌 XL1 发酵产胞外多糖。首先通过单因素法优化产胞外多糖的培养基成分和发酵条件;然后,探究微杆菌 XL1 胞外多糖的吸湿保湿性能、抗氧化活性以及抑制酪氨酸酶活性。本研究旨在丰富微杆菌胞外多糖活性研究,为微杆菌 XL1 胞外多糖在化妆品和食品行业的应用提供理论依据,并为将来开展胞外多糖的结构表征、功能机制等研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

菌株:微杆菌 XL1 筛选于中国连云港水湾湿地。

试剂:FeSO₄·7H₂O、K₂PO₄、MgCl₂、蔗糖、琼脂粉、酵母提取物、氯仿、正丁醇、葡萄糖、果糖、麦芽糖、胰蛋白胨、尿素、硫酸铵、壳聚糖、甘油、透明质酸、碳酸钾、无水乙醇、H₂O₂、FeCl₂、EDTA、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠购自上海国药集团化学试剂有限公司,维生素 C (Vc)、水杨酸、菲洛嗪、酪氨酸酶、左旋多巴、曲酸购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

仪器:1510 酶标仪(赛默飞世尔科技有限公司),SPX-150B-Z 生化培养箱(上海博讯实业有限公司),M1282-0006 恒温振荡器[艾本德(上海)国际贸易有限公司],JXN-26 高速离心机(美国贝克曼库尔特有限公司),101A-3 数显电热鼓风干燥箱(上海卓爵仪

器有限公司),HH-4 智能数显恒温水浴锅(巩义市予华仪器有限责任公司)。

1.2 方法

1.2.1 种子液制备

将微杆菌 XL1 接种到固体培养基(FeSO₄·7H₂O 0.01 g/L、CaCl₂ 0.1 g/L、K₂PO₄ 1 g/L、MgCl₂ 0.15 g/L、NaNO₃ 3 g/L、蔗糖 20 g/L、琼脂粉 15 g/L,pH 值为 7.0)中,于 30℃ 培养箱培养 2 d,从固体培养基上挑取单菌落接种于种子培养基中(FeSO₄·7H₂O 0.01 g/L、CaCl₂ 0.1 g/L、K₂PO₄ 1 g/L、MgCl₂ 0.15 g/L、酵母提取物 3 g/L、蔗糖 20 g/L,pH 值为 7.0)中,250 r/min,30℃ 培养 24 h。

1.2.2 胞外多糖的制备与提取

将种子液以 4% 的接种量接种于发酵培养基(FeSO₄·7H₂O 0.01 g/L、CaCl₂ 0.1 g/L、K₂PO₄ 1 g/L、MgCl₂ 0.15 g/L、酵母提取物 3 g/L、蔗糖 50 g/L,pH 值为 7.0)中,在 250 r/min、30℃ 条件下发酵 24 h。发酵液于 8 000 r/min 离心 30 min 去除菌体后,加入两倍体积无水乙醇,4℃ 搅拌过夜,再通过 8 000 r/min 离心 15 min 得到胞外多糖,放入鼓风干燥箱中 60℃ 干燥至恒重,称其质量。

1.2.3 胞外多糖中间层蛋白的去除

采用 Sevag 法^[20]对胞外多糖初步提纯,将 Sevag 液(氯仿:正丁醇,V:V=4:1)与 3% 胞外多糖水溶液以体积比 1:1 混合,剧烈振荡 30 min 后,8 000 r/min 离心 15 min,去除中间层蛋白,重复 3-4 遍。使用 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白含量^[21],蛋白标准曲线为 $y = 1.1289x + 0.126$, $R^2 = 0.9981$ 。对纯化后的胞外多糖进行吸湿保湿、抗氧化和抑制酪氨酸酶活性实验。

1.2.4 微杆菌 XL1 胞外多糖发酵的单因素实验

(1)碳源种类

将种子液以 4% 的接种量接种到含有 5% 不同碳源(蔗糖、葡萄糖、果糖、麦芽糖)的发酵培养基中,其他成分不变,在转速为 250 r/min、温度为 30℃、pH 值为 7 的条件下发酵 24 h,进行 3 次生物学重复,按 1.2.2 节的方法制备定量胞外多糖。

(2)氮源种类

将种子液以 4% 的接种量接种到含有 0.3% 不同氮源(酵母提取物、胰蛋白胨、尿素、硝酸钠、硫酸铵)的发酵培养基中,其他成分不变,在转速为 250 r/min、温度为 30℃、pH 值为 7 的条件下发酵 24 h,进行 3 次生物学重复,按 1.2.2 节的方法制备定量胞外

多糖。

(3)碳源含量

将种子液以 4% 的接种量接种到不同蔗糖含量 (5%、10%、15%、20%、25%) 的发酵培养基中,其他成分不变,在转速为 250 r/min、温度为 30℃、pH 值为 7 的条件下发酵 24 h,进行 3 次生物学重复,按 1.2.2 节的方法制备定量胞外多糖。

(4)氮源含量

将种子液以 4% 的接种量接种到不同酵母提取物含量 (0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%) 的发酵培养基中,其他成分不变,在转速为 250 r/min、温度为 30℃、pH 值为 7 的条件下,发酵 24 h,进行 3 次生物学重复,按 1.2.2 节的方法制备定量胞外多糖。

(5)发酵温度

将种子液以 4% 的接种量接种到发酵培养基中,在转速为 250 r/min、不同发酵温度 (10, 15, 20, 25, 30℃)、pH 值为 7 的条件下发酵 24 h,进行 3 次生物学重复,按 1.2.2 节的方法制备定量胞外多糖。

(6)培养基初始 pH

将种子液以 4% 的接种量接种到不同初始 pH (6, 7, 8, 9, 10) 的发酵培养基中,在转速为 250 r/min、温度为 20℃ 条件下,发酵 24 h,进行 3 次生物学重复,按 1.2.2 节的方法制备定量胞外多糖。

(7)发酵时间

将种子液以 4% 的接种量接种到发酵培养基中,在转速为 250 r/min、发酵温度为 20℃、pH 值为 8 的条件下,发酵不同时间 (8, 16, 24, 32, 40 h),进行 3 次生物学重复,按 1.2.2 节的方法制备定量胞外多糖。

1.2.5 吸湿、保湿性能测定

(1)样品预处理

将 1.2.3 节制得的胞外多糖研成粉末,与壳聚糖、甘油和透明质酸一同放入鼓风干燥箱中 60℃ 烘干至恒重,备用。

(2)吸湿性试验

分别称取 0.2 g 胞外多糖、壳聚糖、甘油和透明质酸,每种物品各 6 份,其中 3 份样品放入有饱和碳酸钾溶液 (相对湿度为 43%) 的密闭容器中,另外 3 份样品放入有饱和硫酸铵溶液 (相对湿度为 81%) 的密闭容器中,分别称取 0, 1, 2, 4, 8, 16, 24 h 时的样品重量。根据公式计算吸湿率:

$$\text{吸湿率}(\%) = \frac{M_1 - M_0}{M_0} \times 100\%$$

式中, M_0 为放入 0 h 样品质量 (g), M_1 为放入不同

时间后样品质量 (g)。

(3)保湿性试验

分别称取 0.2 g 胞外多糖、壳聚糖、甘油和透明质酸,每种物品各 3 份,先放置于有去离子水溶液的密闭容器中 24 h,然后将样品放入有饱和碳酸钾溶液的密闭容器中,分别称取 0, 1, 2, 4, 6, 8 h 时的样品重量。根据公式计算保湿率:

$$\text{保湿率}(\%) = \left(1 - \frac{N_1 - N_2}{N_1 - N_0}\right) \times 100\%$$

式中, N_0 为样品最初质量 (g), N_1 为放置在去离子水中 24 h 后样品质量 (g), N_2 为放置在饱和碳酸钾溶液中不同时间的样品质量 (g)。

1.2.6 抗氧化活性测定

(1)清除 DPPH 自由基能力测定

取 100 μL 不同浓度 (0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 10 mg/mL) 胞外多糖与 100 μL 0.5 mmol/L 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 溶液 (无水乙醇配制) 混匀,室温避光反应 30 min 后,取 100 μL 反应液于 96 孔板中,在 517 nm 处测定吸光度值,平行测定 3 次^[20],使用去离子水、Vc 分别作为空白和阳性对照。根据公式计算 DPPH 清除率:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{(A_0 + A_j) - A_i}{A_0} \times 100\%$$

式中, A_0 为空白对照吸光度值, A_i 为样品溶液加 DPPH 溶液吸光度值, A_j 为样品溶液加无水乙醇吸光度值。

(2)清除羟基自由基能力的测定

测定方法参考文献 [22]。将 9 mmol/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、9 mmol/L 水杨酸 (无水乙醇配制)、样品溶液、8.8 mmol/L H_2O_2 按体积比 1 : 1 : 1 : 1 的比例混合,于 37℃ 水浴 15 min,取 100 μL 反应液于 96 孔板中,在 510 nm 处测定吸光度值,平行测定 3 次,使用去离子水、Vc 分别作为空白和阳性对照。样品溶液为不同浓度 (0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 10 mg/mL) 的胞外多糖溶液。根据公式计算羟基自由基清除率:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{(B_0 + B_j) - B_i}{B_0} \times 100\%$$

式中, B_0 为空白对照吸光度值, B_i 为样品吸光度值, B_j 为去离子水代替 H_2O_2 溶液的吸光度值。

(3)铁离子螯合能力测定

测定方法参考文献 [23]。向 1 mL 不同浓度 (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/mL) 的胞外多糖溶液中加入 0.1 mL 2 mmol/L 的 FeCl_2 溶液和 0.2

mL 5 mmol/L 的非洛嗪试剂, 室温反应 15 min 后于 562 nm 处测定吸光度值, 平行测定 3 次, 使用去离子水、EDTA 分别作为空白和阳性对照。根据公式计算整合率:

$$\text{整合率}(\%) = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100\%,$$

式中, C_0 为空白对照吸光度值, C_1 为样品吸光度值。

1.2.7 酪氨酸酶抑制活性的测定

测定方法参考文献[24]。取 0.5 mL 左旋多巴溶液 (2 mmol/L) 与 0.4 mL 磷酸盐缓冲液 (25 mmol/L, pH 值为 6.8) 混合, 加入不同浓度 (0, 2, 4, 6, 8, 10 mg/mL) 的胞外多糖溶液, 37°C 孵育 10 min 后, 加入 0.05 mL 酪氨酸酶液 (500 U/mL), 37°C 孵育 30 min 后, 于 475 nm 处记录吸光值, 平行测定 3 次, 使用去离子水、曲酸分别作为空白和阳性对照。根据抑制率公式计算:

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{X_1 - X_2}{X_3 - X_4}\right) \times 100\%,$$

式中, X_1 为样品吸光值, X_2 为样品背景吸光值, X_3 为空白对照吸光值, X_4 为空白对照的背景吸光值。

1.3 数据处理

采用 OriginPro 2018 软件进行数据处理和作图。

2 结果与分析

2.1 多糖发酵的单因素实验结果

不同发酵条件对微杆菌 XL1 胞外多糖产量的影响如图 1 所示。从图 1a 可以看出, 几种碳源中蔗糖对胞外多糖产量影响最为显著, 达到 28 g/L, 是以果糖 (1.5 g/L) 作为碳源的 18 倍, 因此, 蔗糖为最佳碳源。从图 1b 可以看出, 以酵母提取物、胰蛋白胨、尿素、硝酸钠、硫酸铵为氮源的多糖产量分别为 26, 21.5, 22.5, 22, 22 g/L, 选择产量最高的氮源, 即酵母提取物为最佳氮源。接着分别优化了培养基中最佳碳氮源, 即蔗糖和酵母提取物的最适添加量, 分别为 20% 和 0.3% (图 1c, d), 蔗糖含量为 20% 时产量达到最高 75 g/L。但此后随蔗糖含量继续增加, 胞外多糖产量反而下降, 这可能是由于培养基中蔗糖含量过高, 导致菌体内外渗透压失衡, 其生长受到抑制。后续又优化了培养基的发酵温度、初始 pH 以及发酵

时间, 微杆菌 XL1 在温度为 15 - 25°C (图 1e) 时, 多糖产量较高, 其中在 20°C 条件下产量达到最高值 80 g/L; 该菌适合在中性偏碱的环境中大量产糖, 在 pH 值为 8 (图 1f) 时达到最高, 为 91 g/L; 发酵培养基中多糖产量随发酵时间增加而增多 (图 1g), 在 24 h 达到最高值 92 g/L, 之后随着发酵时间增加, 多糖产量变化不大。因此, 经过对发酵条件单因素优化后, 得到最佳培养条件如下: 蔗糖为碳源、酵母提取物为氮源、20% 蔗糖、0.3% 酵母提取物、温度 20°C、pH 值为 8.0、发酵时间 24 h。

2.2 吸湿保湿性能测定

在一定相对湿度 (43% 和 81%) 的密闭环境中, 所有样品的吸湿率都随着时间增加而增大, 但是, 相对湿度越大, 样品在相同时间达到的吸湿率越高。在相对湿度为 81% 时, 甘油吸湿率随处理时间增加一直上升, 并在 24 h 时达到 73.16%, 远高于胞外多糖的 25.38%; 但此时胞外多糖的吸湿率比透明质酸、壳聚糖分别高出 2.61%、10.18% (图 2a, b)。因此, 虽然微杆菌 XL1 胞外多糖的吸湿性能比甘油差, 但与透明质酸、甘油相比, 仍具有良好的吸湿性能。

在保湿性能实验中, 利用相对湿度由高到低的变化, 观察样品的保湿性能。在前 2 h, 胞外多糖、壳聚糖和透明质酸的保湿率均有一定幅度下降, 其中, 甘油的保湿率大幅度下降, 失水速率远超其他 3 种样品; 在 2 h 之后, 各样品的保湿率基本保持稳定 (图 2c)。相比较而言, 这 4 种样品的保湿性能排序为壳聚糖 > 胞外多糖 > 透明质酸 > 甘油。因此, 微杆菌 XL1 胞外多糖同样具有较好的保湿性能, 在化妆品行业具有广泛的应用前景。

2.3 抗氧化活性

2.3.1 DPPH 自由基的清除能力

如图 3 所示, 在一定范围内, 随着浓度增大, 微杆菌 XL1 胞外多糖和 Vc 对 DPPH 自由基的清除率越高。其中, 阳性对照 Vc 浓度为 1 mg/mL 时, 清除率即可达到最大值 96%, 且在此后保持稳定。胞外多糖对 DPPH 自由基的清除作用在 8 mg/mL 时达到最大, 清除率达到 72%, 其 IC_{50} 值为 1.2 mg/mL。因此, 微杆菌 XL1 胞外多糖对 DPPH 自由基具有一定的清除效果。

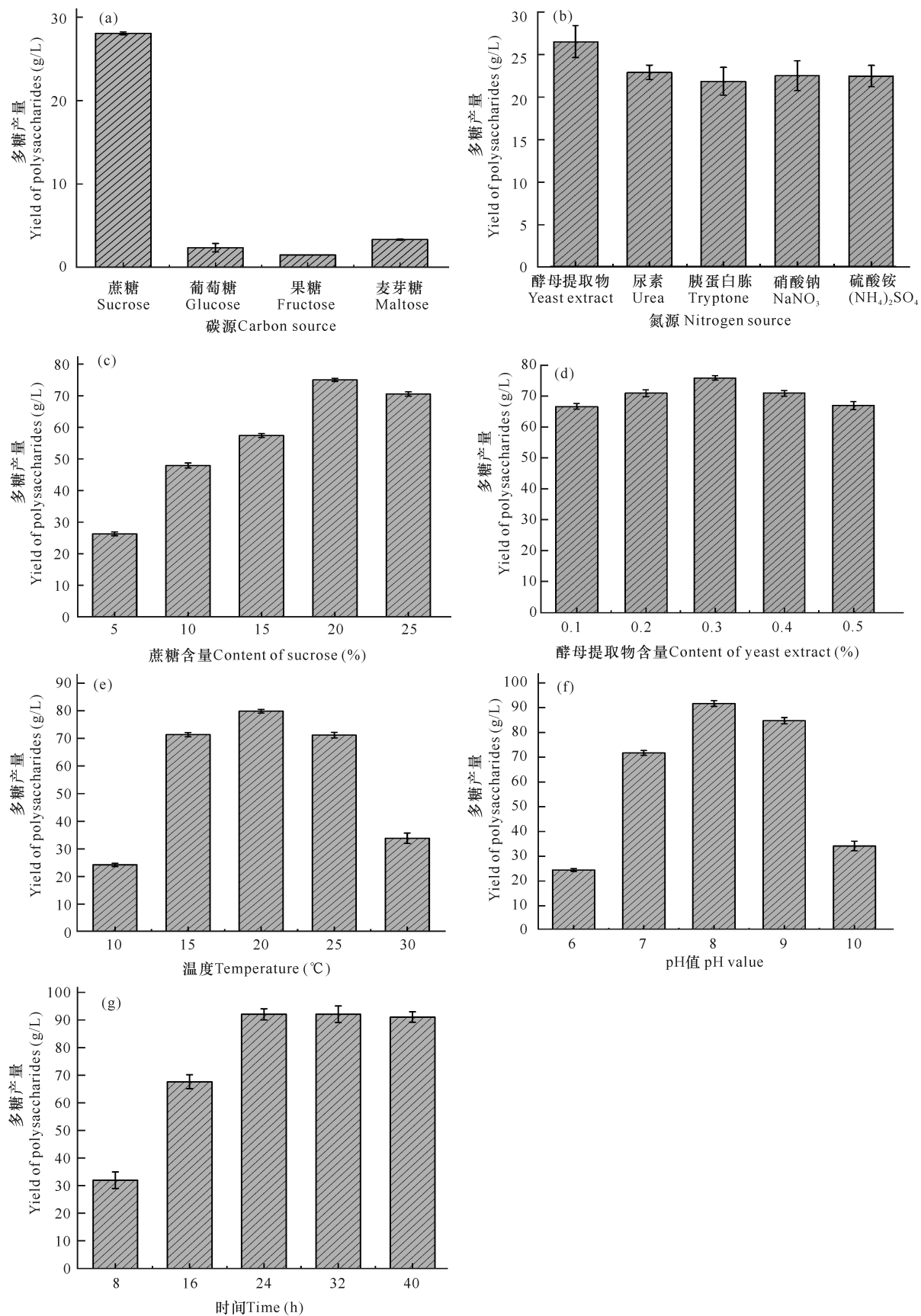


图1 微杆菌 XL1 胞外多糖产量的单因素优化结果

Fig. 1 Single factor optimization results of extracellular polysaccharides yield from *Microbacterium* XL1

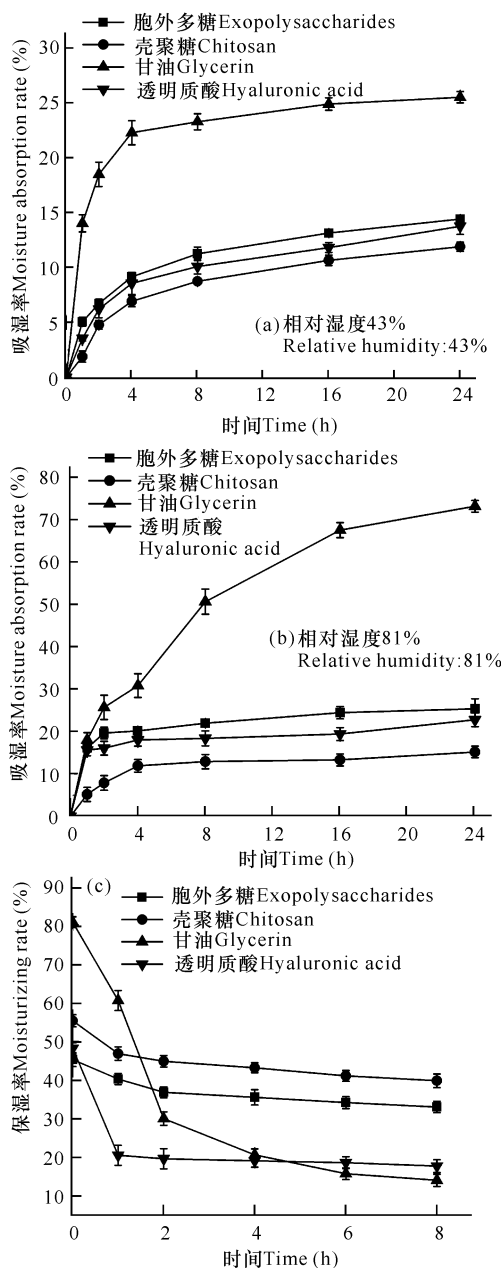


图2 胞外多糖吸湿率(a,b)、保湿率(c)与时间变化曲线

Fig. 2 Curve of exopolysaccharide moisture absorption rate (a,b) and moisturizing rate (c) with time

2.3.2 羟基自由基的清除能力

如图4所示,微杆菌XL1胞外多糖和Vc随着浓度增大,对羟基自由基的清除率均呈现逐渐升高再趋于稳定的趋势。阳性对照Vc浓度为1 mg/mL时,清除率即可达到最高值97%。胞外多糖在8 mg/mL时,对羟基自由基清除率达到最高,为93%,比Vc仅低5%,其 IC_{50} 值为0.8 mg/mL。因此,微杆菌XL1胞外多糖对羟基自由基具有较好的清除效果。

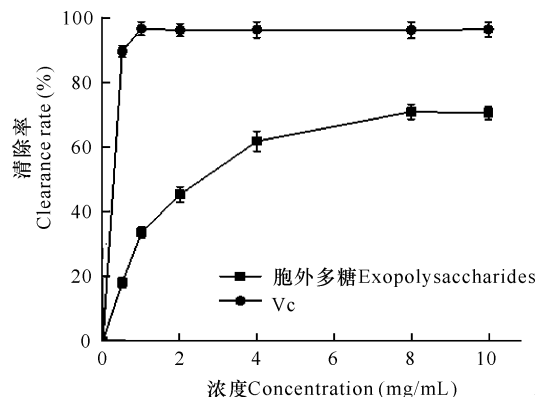


图3 胞外多糖的DPPH自由基清除活性

Fig. 3 DPPH radical scavenging activity of extracellular polysaccharide

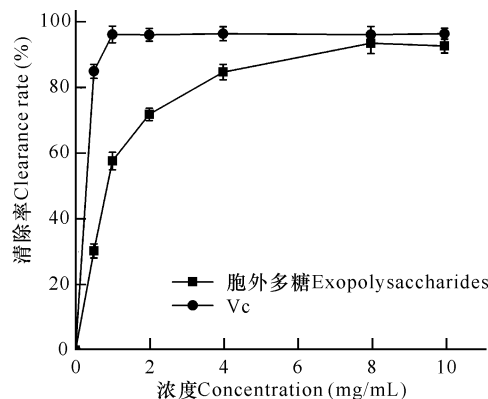


图4 胞外多糖的羟基自由基清除活性

Fig. 4 Hydroxyl radical scavenging activity of extracellular polysaccharide

2.3.3 铁离子螯合能力

通过与EDTA比较,评价微杆菌XL1胞外多糖对铁离子的螯合作用,结果发现阳性对照EDTA在0.1 mg/mL时,对铁离子的螯合率达到最大值99%;胞外多糖在浓度为0.6 mg/mL时,对铁离子的螯合率达到最大值96%,其 IC_{50} 值为0.3 mg/mL比阳性对照EDTA仅低3%(图5)。因此,微杆菌XL1胞外多糖对铁离子具有较好的螯合作用。

2.4 酪氨酸酶活性的抑制效果

酪氨酸酶是黑色素形成的主要原因,研究其酶活性抑制具有重要意义。如图6所示,曲酸和微杆菌XL1胞外多糖对酪氨酸酶的抑制率都具有剂量依赖关系,随着浓度增加抑制速率变缓。阳性对照曲酸在10 mg/mL时,对酪氨酸酶抑制活性达到最大值80%;胞外多糖浓度为60 mg/mL时,酪氨酸酶抑制活性达到55%,胞外多糖的 IC_{50} 值为14 mg/mL。

虽然胞外多糖对酪氨酸酶活性的抑制性能与曲酸仍然有一定差距,但是胞外多糖作为纯天然产物,具有安全、绿色无污染等优点。因此,微杆菌 XL1 胞外多糖在抑制黑色素形成方面仍具有应用潜力。

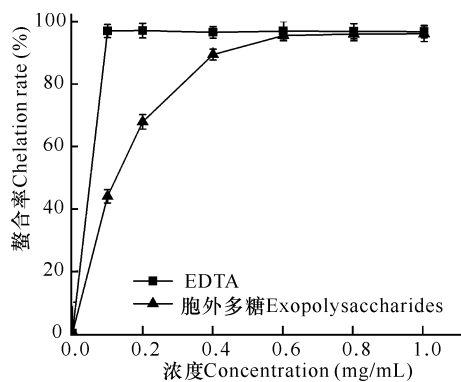


图5 胞外多糖的铁离子螯合能力

Fig. 5 Iron chelating capacity of extracellular polysaccharide

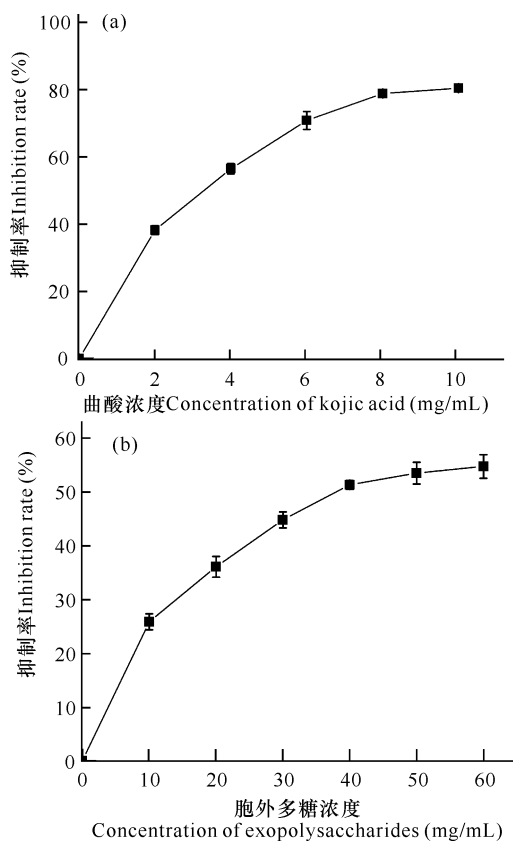


图6 曲酸(a)和胞外多糖(b)的酪氨酸酶抑制活性

Fig. 6 Tyrosinase inhibitory activity of kojic acid (a) and exopolysaccharides (b)

3 讨论

微杆菌 XL1 胞外多糖发酵优化后产量达到 92 g/L,是未优化前的 2.3 倍。比较而言,*Microbacte-*

rium TL13 多糖产量为 36.25 g/L^[18],*Microbacterium* FSW-25 多糖产量为 34.64 g/L^[19],微杆菌 XL1 是一株高产胞外多糖的菌株。在优化发酵条件过程中,蔗糖及蔗糖添加量对胞外多糖产量的提升至关重要,以蔗糖作为碳源的产量是果糖的 18 倍。Han 等^[25]也是以蔗糖作为唯一碳源来优化微生物发酵产胞外多糖,使产量得到大幅度提升。后续的研究发现微生物在发酵过程中分泌出特定水解蔗糖合成果聚糖的蔗糖果糖酶^[26]。因此,推测微杆菌 XL1 在发酵过程中分泌蔗糖果糖酶合成果聚糖,而且蔗糖含量越高酶活越高,故下一步可对发酵培养基中多糖合成酶及胞外多糖组分进行研究。

透明质酸吸湿保湿性能优良,被广泛应用于化妆品、医疗美容中,而胞外多糖的吸湿保湿性能与透明质酸相似,在化妆品行业应用前景广泛。微杆菌 XL1 胞外多糖具有较强的抗氧化活性,对羟基自由基的清除率和铁离子的螯合率分别达到 93% 和 96%,与 Vc 抗氧化效果几乎一致,与 *Microbacterium* FSW-25^[19] 胞外多糖相比具有更好的抗氧化效果,可作为抗氧化剂应用于食品行业中。目前国内对微生物胞外多糖的酪氨酸酶抑制活性研究较少,微杆菌 XL1 胞外多糖对酪氨酸酶的抑制率可达 55%,虽然与 EDTA 的酪氨酸酶抑制效果有一定差距,但是微生物胞外多糖作为天然生物大分子,具有安全无毒、绿色环保等优点。此外,为满足实际应用的需求,通过化学修饰可以改变多糖官能团,如硫酸化、羧甲基化、乙酰基化等方法,从而获得具有更高或新的生物活性的多糖衍生物^[27]。因此,后续实验有望通过对微杆菌 XL1 胞外多糖进行化学修饰,增强其酪氨酸酶抑制活性。

4 结论

单因素法优化结果显示:微杆菌 XL1 发酵产胞外多糖的最佳培养基成分为 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L、 CaCl_2 0.1 g/L、 K_2PO_4 1 g/L、 MgCl_2 0.15 g/L、酵母提取物 3 g/L、蔗糖 200 g/L,pH 值 8.0;最佳培养条件为接种量 4%,20℃ 摇床培养 24 h。微杆菌 XL1 胞外多糖产量最高可达 92 g/L,该胞外多糖具有优良的吸湿保湿性能、抗氧化活性以及抑制酪氨酸酶活性,可作为一种天然活性物质在化妆品、食品行业进一步开发利用,并有望扩大规模进行工业化生产。

参考文献

- [1] CASILLO A, LANZETTA R, PARRILLI M, et al. Ex-

- opolysaccharides from marine and marine extremophilic bacteria; Structures, properties, ecological roles and applications [J]. *Marine Drugs*, 2018, 16(2): 69.
- [2] BARCELOS M C S, VESPERMANN K A C, PELISSARI F M, et al. Current status of biotechnological production and applications of microbial exopolysaccharides [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 60(9): 1475-1495.
- [3] ATES O. Systems biology of microbial exopolysaccharides production [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2015, 3: 200.
- [4] BHUNIA B, PRASAD U, OINAM G, et al. Characterization, genetic regulation and production of cyanobacterial exopolysaccharides and its applicability for heavy metal removal [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 179: 228-243.
- [5] MOHITE B V, KOLI S H, NARKHEDE C P, et al. Prospective of microbial exopolysaccharide for heavy metal exclusion [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2017, 183(2): 582-600.
- [6] ZHANG L, ZHAO B, LIU C J, et al. Optimization of biosynthesis conditions for the production of exopolysaccharides by *Lactobacillus plantarum* SP8 and the exopolysaccharides antioxidant activity test [J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2020, 60(3): 334-345.
- [7] CHENG X, HUANG L, LI K. Antioxidant activity changes of exopolysaccharides with different carbon sources from *Lactobacillus plantarum* LPC-1 and its metabolomic analysis [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 35(5): 1-13.
- [8] WU J, ZHANG Y, YE L, et al. The anti-cancer effects and mechanisms of lactic acid bacteria exopolysaccharides in vitro: A review [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 253: 117308.
- [9] 耿晓琦, 范冰冰, 丁钦然, 等. 透明颤菌胞外多糖发酵优化及抗肿瘤活性评价[J]. *中国新药杂志*, 2020, 29(19): 2229-2238.
- [10] 常相娜, 陈雪峰, 龚频, 等. 盐胁迫环境下发菜胞外多糖抗氧化作用及镇痛抗炎活性[J]. *食品科学*, 2020, 41(17): 133-138.
- [11] JIN J, NGUYEN T T H, KIM C, et al. Antimelanogenesis effects of fungal exopolysaccharides prepared from submerged culture of *Fomitopsis castanea* mycelia [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 29(8): 1204-1211.
- [12] 石塔拉, 赵慧娟, 宓伟, 等. 发酵乳杆菌产胞外多糖的益生元样作用研究[J]. *营养学报*, 2018, 40(6): 568-573.
- [13] VIVEK K B, RATHER I R, PARK Y H. Partially purified exopolysaccharide from *Lactobacillus sakei* probio 65 with antioxidant, α -glucosidase and tyrosinase inhibitory potential [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2016, 40(3): 264-274.
- [14] CHEN B J, SHI M J, CUI S, et al. Improved antioxidant and anti-tyrosinase activity of polysaccharide from *Sargassum fusiforme* by degradation [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 92: 715-722.
- [15] FAWOLE O A, MAKUNGA N P, OPARA U L. Antibacterial, antioxidant and tyrosinase-inhibition activities of pomegranate fruit peel methanolic extract [J]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 12(1): 1-11.
- [16] 马文锦, 李梅林, 王博, 等. 胶红酵母 CICC 33013 胞外多糖抑制肝癌细胞活性研究[J]. *食品与机械*, 2020, 36(2): 159-164.
- [17] 王蓓蓓, 张伟, 周晓伦. 微生物胞外多糖的提取与应用研究进展[J]. *安徽农学通报*, 2021, 27(18): 21-23.
- [18] OUERTANI R, OUERTANI A, MAHJOUBI M, et al. New plant growth-promoting, chromium-detoxifying *Microbacterium* species isolated from a tannery wastewater: Performance and genomic insights [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 521.
- [19] SRAN K S, BISHT B, MAYILRAJ S, et al. Structural characterization and antioxidant potential of a novel anionic exopolysaccharide produced by marine *Microbacterium aurantiacum* FSW-25 [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 131: 343-352.
- [20] 孙柘, 邱涛, 袁如月, 等. 粒毛盘菌多糖脱蛋白方法及其条件优化[J]. *浙江大学学报*, 2012, 38(4): 519-523.
- [21] 毕士媛. 枫香拟茎点霉菌 NJUSTb1 胞外多糖的结构鉴定、化学修饰及活性研究[D]. 南京: 南京理工大学, 2019.
- [22] XIONG Y W, JU X Y, LI X W, et al. Fermentation conditions optimization, purification, and antioxidant activity of exopolysaccharides obtained from the plant growth-promoting endophytic actinobacterium *Glutamicibacter halophytocola* KLBMF 5180 [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 153: 1176-1185.
- [23] 刁欢, 张娟娟, 赵红, 等. 微生物多糖与 Fe 离子螯合试验研究[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(20): 115-118, 136.
- [24] TANG M, HOU F, WU Y, et al. Purification, characterization and tyrosinase inhibition activity of polysaccharides from chestnut (*Castanea mollissima* Bl.) kernel [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 131: 309-314.
- [25] HAN J, FENG H, WANG X, et al. Levan from *Leuconostoc citreum* BD1707: Production optimization and changes in molecular weight distribution during cultivation [J]. *BMC Biotechnology*, 2021, 21(1): 1-14.
- [26] SRIKANTH R, REDDY C H, SIDDARTHA G, et al. Review on production, characterization and applications of microbial levan [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 120: 102-114.

[27] XIE L, SHEN M, HONG Y, et al. Chemical modifications of polysaccharides and their anti-tumor activities

[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 229: 115436.

Study on the Optimization of Fermentation Conditions and Activity of Extracellular Polysaccharide from *Microbacterium* XL1

WU Dan^{1,2}, ZHANG Yan^{1,2}, XU Haiyang^{1,2}, XU Linxiang^{1,2,3}

(1. Jiangsu Ocean University, Lianyungang, Jiangsu, 222005, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Marine Bioresources and Environment, Lianyungang, Jiangsu, 222005, China; 3. Co-Innovation Center of Jiangsu Marine Bio-industry Technology, Lianyungang, Jiangsu, 222005, China)

Abstract: In order to improve the yield of extracellular polysaccharide from *Microbacterium* XL1 and explore its physiological activity function, a single factor method was used to optimize the types of carbon and nitrogen sources and the amount of addition, temperature, initial pH, and fermentation time for the production of extracellular polysaccharides by *Microbacterium* XL1 in this study. The moisture absorption and moisturizing performance, antioxidant activity and tyrosinase inhibitory activity of *Microbacterium* XL1 extracellular polysaccharide were tested. The results showed that the optimal conditions for the production of extracellular polysaccharides by *Microbacterium* XL1 were that sucrose was the carbon source, yeast extract was the nitrogen source, the sucrose addition was 20%, the yeast extract was 0.3%, the temperature was 20°C, and the pH value was 8.0, and the fermentation time was 24 h. Under the optimal conditions, the yield of extracellular polysaccharide reached 92 g/L, which was 3.2 times higher than that before optimization. At the same time, the moisture absorption and moisturizing properties of *Microbacterium* XL1 extracellular polysaccharide were similar to that of hyaluronic acid. The half inhibitory concentration (IC₅₀) of DPPH free radicals, hydroxyl free radicals and iron ions were 1.2, 0.8 and 0.3 mg/mL, respectively. The inhibition rate on tyrosinase could reach 55%. This research have improved the yield of *Microbacterium* XL1 extracellular polysaccharides and confirmed that *Microbacterium* XL1 extracellular polysaccharides have excellent physiological activity, which is of great significance to enrich the study of the activity of extracellular polysaccharide of *Microbacterium*, and provide a theoretical basis for its development and application in cosmetics and food industries.

Key words: *Microbacterium*, single factor method, moisture absorption and moisturizing, antioxidation, tyrosinase

责任编辑:米慧芝



微信公众号投稿更便捷

联系电话:0771-2503923

邮箱:gxkx@gxas.cn

投稿系统网址: <http://gxkx.ijournal.cn/gxkx/ch>