

文章编号: 1000-1573(2010)02-0074-05

## 侧孢短芽孢杆菌 S62-9 产抗菌物质的 分离纯化及部分特性的研究

杨倩<sup>1</sup>, 于宏伟<sup>1</sup>, 郭润芳<sup>1</sup>, 贾英民<sup>2</sup>

(1. 河北农业大学 食品科技学院, 河北 保定 071001; 2. 河北科技大学 生物科学与工程学院, 河北 石家庄 050018)

**摘要:** 为开发新型天然抗菌物质, 本研究采用硫酸铵盐析、DEAE-cellulose 52 离子交换层析、Sephacryl S-100 分子筛层析等步骤对侧孢短芽孢杆菌 (*Brevibacillus laterosporus*) S62-9 产的抗菌物质进行分离纯化, 并对其部分特性进行研究。结果表明: 该抗菌物质对热和 pH 值稳定性高, 且抑菌谱广, 可抑制多种革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和真菌, 显示出该抗菌物质具有良好的应用前景。

**关键词:** 侧孢短芽孢杆菌; 抗菌物质; 抑菌谱

中图分类号: Q 93

文献标志码: A

### Study on purification and partial properties of antimicrobial substance from *Brevibacillus laterosporus* S62-9

YANG Qian<sup>1</sup>, YU Hong-wei<sup>1</sup>, GUO Run-fang<sup>1</sup>, JIA Ying-min<sup>2</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China;

2. College of Bioscience and Bioengineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China)

**Abstract:** In order to explore new natural antimicrobial substance, we purified a kind of antimicrobial substance from a strain of *Brevibacillus laterosporus* S62-9 by using ammonium sulphate precipitation, DEAE-52 column and SephacrylTMS-100 column, etc. Furthermore, the partial properties of the purified substance were studied. The antimicrobial substance was shown thermostable, resistant to pH variation, and a broad spectrum of antagonistic activity against various species of Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria and fungi. All these show that it has a good potential for future development and utilization.

**Key words:** *Brevibacillus laterosporus*; antibacterial substance; inhibitory spectrum

近年来,随着微生物产抗菌物质理论与研究的逐步深入,发现其具有抑菌谱广、水溶性好、热稳定性好、安全无毒等优点,先后有 Magainin, Nisin 和 Cecropins 等在医药、工业、食品和农业中应用,抗菌物质以其独特的性质展示出广阔的应用潜力<sup>[1]</sup>。

侧孢短芽孢杆菌 (*Brevibacillus laterosporus*)

最初由 White 等于 1912 年发现,人们对该菌的研究迄今已有 100 多年的历史。近几年来,随着对侧孢芽孢杆菌的深入研究,发现其能产生多种有应用潜力的代谢产物,如抗菌物质、杀虫蛋白等。黎定军等<sup>[2]</sup>对侧孢芽孢杆菌 (*Brevibacillus laterosporus*) 2-Q-9 研究时发现其分泌的抑菌物质对青枯病菌有

收稿日期: 2009-12-10

基金项目: 河北省十一五科技计划项目 (06220106D-1)。

作者简介: 杨倩 (1986-), 女, 河北省保定人, 在读硕士生, 研究方向为微生物酶资源开发。

通讯作者: 贾英民 (1961-), 男, 河北省保定人, 教授, 博士生导师, 从事食品微生物研究。

E-mail: ymjia0311@hebust.edu.cn.

强烈的抑制作用,并进一步对该抑菌物质的性质进行了研究。Mari 等研究发现短小芽孢杆菌对某些真菌及病菌具有拮抗作用,是一种有开发潜力的生防菌<sup>[3-4]</sup>。

Shoji 等<sup>[5]</sup>从侧孢短芽孢杆菌 340-19 的发酵液中分离得到一种新型的抗菌素,被称为芽孢菌胺,对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都有不同的抑制作用。

本研究以实验室前期分离出的一株侧孢短芽孢杆菌 S62-9 (*B. laterosporus* S62-9)<sup>[6]</sup>为出发菌株,已知其有抑菌效果,在此基础上进一步对该菌的代谢产物进行分离纯化,并对其特性进行了研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与试剂

试验菌株:侧孢短芽孢杆菌 S62-9 (*B. laterosporus* S62-9)。

指示菌:金黄色葡萄球菌 14458,蜡样芽孢杆菌 63302,枯草芽孢杆菌,保加利亚乳杆菌,植物乳杆菌,大肠杆菌,福氏志贺 51571,鼠伤寒沙门氏菌 50115,单核增生李斯特氏菌,变形肠杆菌,溶杆菌 S2-6b,假单胞杆菌,黑曲霉,白色念珠菌,克鲁维酵母,毕赤酵母,疏棉状嗜热丝孢菌,放线菌均由本实验室保存。其中溶杆菌 S2-6b,白色念珠菌,克鲁维酵母,毕赤酵母,放线菌在 28 °C,200 r/min 下培养;假单胞杆菌在 20 °C,200 r/min 下培养;黑曲霉在 29 °C 培养箱中培养;疏棉状嗜热丝孢菌在 45 °C 培养箱中培养;其余菌株在 37 °C,200 r/min 下培养。

培养基:乳酸菌选用 MRS 培养基,酵母和霉菌选用马铃薯蔗糖培养基,其他指示菌选用营养琼脂培养基。

试剂:牛血清蛋白(上海长阳试剂厂),

DEAE-cellulose 52 (Pharmacia), PEG-20000 (日本进口分装),

Sephacryl S-100 (Whatman),其他试剂均为分析纯和化学纯。

### 1.2 主要仪器

GL-20G-II 冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);SP-756 P 紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司);Freeze Dry System Freezone 4.5 Liter Benchtop 77500 (Labconco Corporation);Beckman P/ACE MDQ 型毛细管电泳仪(美国 Beckman-Coulter 公司,二极管阵列紫外检测器)。

### 1.3 主要方法

#### 1.3.1 抗菌物质分离纯化

(1)粗发酵液制备。挑取几环斜面保存菌株接

入液体种子培养基(营养肉汤培养基,300 mL 摇瓶装液量 50 mL),37 °C,200 r/min 条件下振荡培养 9~12 h,得到种子菌悬液,将种子菌悬液以 3% 转接于液体发酵培养基(1%糊精、2%蛋白胨、0.15% CaCl<sub>2</sub>、1.5% Tween-20),37 °C,250 r/min 条件下振荡培养 22 h。发酵液 4 °C 10 000 r/min 离心 20 min,弃菌体收集上清液备用。

取发酵液上清用旋转蒸发器进行减压浓缩,60 °C,0.1 MPa。

(2)硫酸铵盐析。减压浓缩液在 4 °C 条件下,用 60% 饱和硫酸铵盐析 12 h,10 000 r/min 离心除上清,沉淀用尽量少的 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0, 0.05 mol/L)溶解。

(3)脱盐。将盐析得到的抗菌物质粗提液装入截留分子量为 3 500 Da 的透析袋内,于 500 mL 的烧杯中用 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0, 0.05 mol/L)透析。4 °C 下静置,每隔 30 min 换缓冲液 1 次,进行多次操作,用饱和 BaCl<sub>2</sub> 溶液检查至硫酸根除净为止。将透析袋中的液体倒入容量瓶中定容,即为初步纯化的抗菌物质粗提液。

(4)离子交换层析。将脱盐后得到的粗提液加到预先用 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0, 0.05 mol/L)平衡的 DEAE-cellulose 52 层析柱(Φ1.6 cm × 30 cm),用 0~0.8 mol/L NaCl(同样缓冲液配制)进行线性梯度洗脱,在 280 nm 测紫外吸光度,收集含蛋白各管,测定各管抑菌活性。用 PEG-20000 浓缩抑菌活性部分。

(5)分子筛层析。所得浓缩液加到预先用 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0, 0.05 mol/L)平衡的 Sephacryl S-100 层析柱(Φ1.6 cm × 80 cm),用同样的缓冲液洗脱,分步收集每管 4 mL,洗脱液在 280 nm 测紫外吸光度,收集含蛋白各管,测定抑菌活性,收集冷藏,并进行纯度鉴定。

#### 1.3.2 分析测定方法

(1)高效毛细管电泳鉴定。分离缓冲溶液为 pH=6.5 的 50 mmol/L 磷酸,5% 乙腈,0.5 psi 下进样 5 s,分离电压-20 kV,检测波长 225 nm,柱温 25 °C。石英毛细管柱(内径 75 μm,总长 50 cm,有效长度 40 cm)。

(2)抑菌活性测定。抑菌活性测定采用琼脂扩散法<sup>[7]</sup>。以金黄色葡萄球菌为指示菌,用生理盐水将其稀释为 10<sup>7</sup> CFU/mL 的菌悬液,取 1 mL 菌悬液与冷却至 50 °C 左右的营养琼脂混板,待凝固后用打孔器在混有指示菌的培养基上打孔,孔直径为 6 mm;在孔中加入 50 μL 无细胞发酵上清液,超净

工作台上放置 2 h;置于 37 ℃ 下进行培养 12 h,用游标卡尺测量抑菌圈直径(mm)。

1.3.3 抗菌物质部分特性的研究

(1)抗菌物质的温度敏感性。取等量样品,分别在 20、60、80、100 和 121 ℃ 保持 20 min,用冰冷却后做抑菌试验,按 1.3.2 方法检测活性。

(2) pH 稳定性研究:取等量样品,分别用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 分别调 pH 值 2~12, 37 ℃ 下温育 1 h,做抑菌试验,按 1.3.2 方法检测活性。

(3)抑菌谱的研究。选取有代表性的革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和真菌做指示菌,取样品按 1.3.2 方法进行抑菌试验。

2 结果与分析

2.1 抗菌物质的浓缩与初步提纯

抗菌物质发酵液经旋转蒸发器减压分馏浓缩后,抑菌直径为 20.41 mm,比初始发酵的上清液的抑菌圈直径扩大了 19.5%。之后经硫酸铵沉淀,除去的主要是杂蛋白。

2.2 柱层析及纯度鉴定

经减压分馏浓缩,硫酸铵盐析,脱盐后,用 DEAE-cellulose 52 纤维素离子交换柱层析进行分离,结果显示,第 1 个蛋白峰表现出抑菌活性,其他蛋白峰无抑菌活性(见图 1)。抗菌物质的洗脱离子强度在 0.1~0.18 mol/L NaCl 范围,所得活性部分进一步经 Sephacryl S-100 分子筛层析,得到 1 个蛋白吸收峰(见图 2),抑菌活性峰与蛋白峰有较好的重合。浓缩后,经毛细管电泳鉴定其纯度,为单一吸收峰(见图 3)。对初始发酵的上清液,减压分馏浓缩液,盐析沉淀液,离子交换层析活性部分,分子筛层析活性部分,分别测定总活力,结果见图 4。

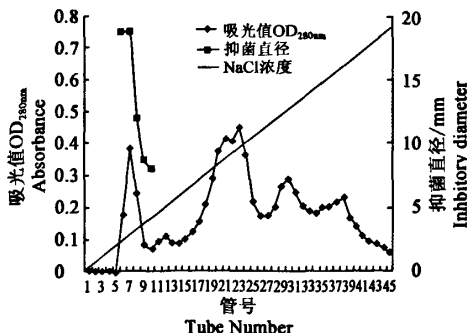


图 1 S62-9 产抗菌物质的 DEAE-cellulose52 层析图谱  
Fig. 1 DEAE-cellulose chromatography pattern of antimicrobial substance produced by S62-9

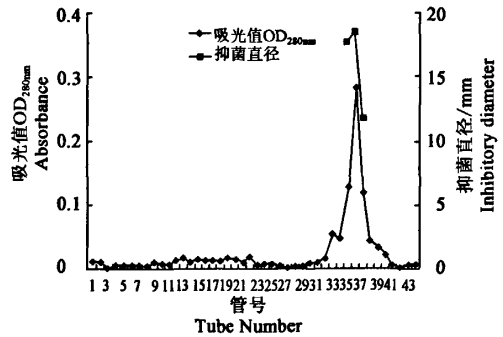


图 2 S62-9 产抗菌物质的 Sephacryl S-100 层析图谱  
Fig. 2 Sephacryl S-100 chromatography pattern of antimicrobial substance produced by S62-9

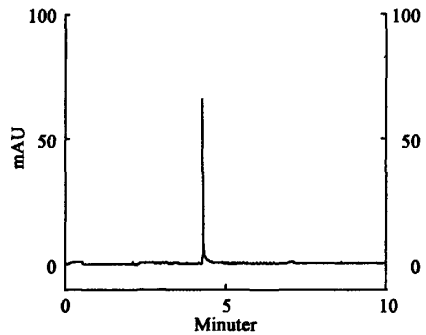
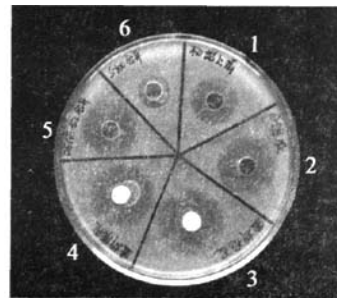


图 3 S62-9 产抗菌物质毛细管区带电泳鉴定图谱  
Fig. 3 Identification pattern of antibacterial substance produced by S62-9 by using capillary



1. 初始上清液; 2. 分馏液; 3. 盐析沉淀; 4. 透析脱盐; 5. DEAE-cellulose52 合并液; 6. S-100 合并液。

图 4 各纯化步骤抑菌效果

Fig. 4 Inhibitory effect of every purification phase

2.3 抗菌物质的温度敏感性

由图 5 可知,在 20~100 ℃ 条件下保温 20 min 抗菌物质的抑菌活性没有太大变化,在 100 ℃ 以上其活性略有下降,121 ℃ 时抑菌直径与 20 ℃ 时的相比仅下降了 11.08%,结果表明该抑菌物质热稳定性强,在微生物学上常用的杀菌温度是 121 ℃,在这个温度下该抗菌物质仍能保持良好的抑菌活性。

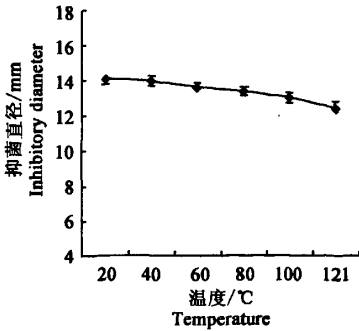


图5 温度对抗菌物质的影响  
Fig. 5 Influence of temperature on the antibacterial substance

2.4 pH 稳定性研究

将抗菌物质在 pH 3~12 的条件下 20 °C 处理 1 h, 调回中性后抑菌试验结果见图 6。从图 6 可知, pH 4~6 抑菌活性略有下降, pH 3~12 的碱性范围内有较强的抑菌活性, 且抑菌效果稳定, 结果表明抗菌物质耐酸碱的性质良好, 可在酸性、中性或碱性环境中保持稳定的活性。

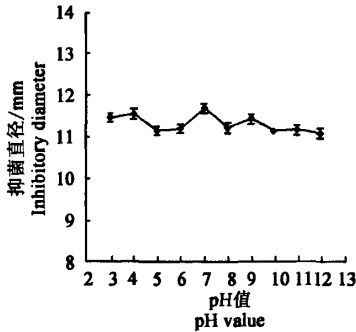


图6 pH 对抗菌物质的影响  
Fig. 6 Influence of pH on the antibacterial substance

2.5 抑菌谱的研究

从表 1 可知, 在供试的 7 株革兰氏阳性菌中, 抗菌物质对金黄色葡萄球菌, 蜡样芽孢杆菌, 枯草芽孢杆菌, 保加利亚乳杆菌, 单核增生李斯特氏菌有较强的抑制作用, 对溶杆菌和植物乳杆菌也有较好的抑制作用。在供试的 5 株革兰氏阴性菌中, 除对假单胞菌没有抑制作用外, 对其他 4 株菌均有抑制作用。此外, 该抗菌物质对供试的 5 株真菌和放线菌也有不同程度的抑制作用, 说明该物质是一种广谱的抗菌物质。

表 1 侧孢短芽孢杆菌产抗菌物质的抑菌谱  
Table 1 Antimicrobial spectrum of antibacterial substance produced by *B. laterosporus*

指示菌 Indicator organism	培养基-培养温度/°C Incubation temperature	抑菌直径/mm Inhibitory diameter
金黄色葡萄球菌 ATCC 14458	NB-37	19.89±0.01
蜡样芽孢杆菌	NB-37	14.49±0.03
枯草芽孢杆菌	NB-37	22.62±0.16
保加利亚乳杆菌	MRS-37	17.73±0.01
植物乳杆菌	MRS-37	13.35±0.09
溶杆菌 S2-6b	NB-28	15.97±0.03
单增李斯特氏菌	NB-37	19.57±0.03
沙门氏菌	NB-37	7.33±0.01
大肠杆菌	LB-37	12.55±0.19
福氏志贺菌	NB-37	12.01±0.07
假单胞菌	LB-20	0
变形肠杆菌	NB-37	7.05±0.03
黑曲霉	PDA-29	10.28±0.08
疏棉状嗜热丝孢菌	PDA-45	14.82±0.02
白色念珠菌	YPD-28	7.31±0.09
毕赤酵母	YPD-28	7.23±0.07
克鲁维酵母	YPD-28	7.20±0.06
放线菌	NB-28	15.64±0.06

注: NB; Nutrient Broth; LB; Luria Broth; MRS; De Man, Rogosa and Sharp medium; YPD; Yeast Extract Peptone Dextrose; PDA; Potato Dextrose Agar.

3 讨论

至今人们发现的芽孢杆菌产生的抗菌物质主要有细菌素、细胞壁降解酶类和其它抗菌蛋白等<sup>[8]</sup>, 由于其特性各不相同, 所以采用的分离方法也很大的差别。任召珍等<sup>[9]</sup>采用超滤、DEAE-Sephadex A25 离子交换层析等方法从海洋侧孢短芽孢杆菌 Lh21 (*B. laterosporus* Lh21) 中分离出抗菌物质 R21。本试验将发酵液经减压分馏浓缩, 在除去一部分杂蛋白的同时, 减少了硫酸铵盐析的处理量。与传统的采用超滤方法相比, 节约了成本而且缩短了处理时间。纯化过程中, 脱盐洗脱液与离子交换洗脱液使用同一种缓冲液 (pH 8.0、0.05 mol/L)<sup>[10]</sup>, 以利于活性物质在离子交换层析过程中样品的平衡。

本研究表明, 经浓缩、盐析和脱盐之后, 发酵液还有 5 个蛋白吸收峰, 第 1 个蛋白峰表现出抑菌活性, 其他蛋白峰无抑菌活性。经过分子筛层析之后, 活性峰与蛋白峰仍然能有较好的重合, 将活性部分收集, 经过毛细管电泳鉴定为单一吸收峰, 为下一步进行结构的鉴定奠定了基础。

通过初步特性研究,发现该抗菌物质具有良好的热和酸碱稳定性,此外,该抗菌物质具有广泛的抑菌谱,为侧孢短芽孢杆菌 S62-9 用于商业化生产提供了理论依据。

#### 参考文献:

- [1] 崔艳红,黄现青. 抗菌肽的抗菌机理及其应用[J]. 中国兽医杂志,2006,42(9):51-52.
- [2] 黎定军,陈武,罗宽. 侧孢芽孢杆菌 2-Q-9 外泌抑菌物质性质[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2007,33(4):471-474.
- [3] Mari M,Guizzardi M,Pratella G C. Biological control of gray mold in pears by antagonistic bacteria[J]. Biological Control,1996,7(1):3-37.
- [4] 于婷,尚玉珂,李艳芳,等. 短小芽孢杆菌 BSH24 抗菌物质的提取及其特性[J]. 植物保护学报,2009,36(1):65-69.
- [5] Shoji J,Sakazaki R,Wakisaka Y, et al. Isolation of a new antibiotic, laterosporamine. Studies on antibiotics from the genus *Bacillus* XIII[J]. Antibiot(Tokyo), 1976,29(4):390-393.
- [6] 尉建格,于宏伟,韩军,等. 广谱高效抑菌物质产生菌的筛选及鉴定[J]. 微生物学通报,2009,36(5):689-693.
- [7] Tudor-nelson S M,Minsavage G V,Stall R E, et al. Bacteriocin-like substances from tomato race 3 strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*[J]. Phytopathology,2003,93(11):1415.
- [8] 陈中义,张杰,黄大昉,等. 植物病害生防芽孢杆菌抗菌机制与遗传改良研究[J]. 植物病理学报,2003,33(2):97-103.
- [9] 任召珍,郑媛,孙溢,等. 海洋侧孢短芽孢杆菌 Lh21 抗菌活性物质的分离及特性研究[J]. 微生物学报,2007,47(6):997-1001.
- [10] 于宏伟,贾英民,桑亚新,等. 黑曲霉 U $\gamma$ -2 胞外葡聚糖酶的分离纯化[J]. 河北农业大学学报,2005,28(1):59-61.

(编辑:李川)

(上接第 65 页)

- [6] 于飞,李朝东,王秀伶,等. 菌 *Enterococcus hirae* AUH-HM195 对黄豆苷原的开环转化[J]. 微生物学报,2009,49(4):479-484.
- [7] 王明兹,施巧琴,周晓兰,等. 提高酵母菌原生质体制备与再生的方法研究[J]. 微生物学杂志,2005,25(3):10-11.
- [8] Manisha V C,Mukund V D. Isolation and regeneration of protoplasts from the yeast and mycelial form of the dimorphic zygomycete[J]. Microbiological Research,2002,157:29-37.
- [9] Balasubramanian N,Juliet G A,Srikal Aivani P, et al. Release and regeneration of protoplasts from the fungus *Trichothecium roseum*[J]. Canadian Journal of Microbiology,2003,49(4):263-268.
- [10] 徐继初. 生物统计及试验设计[M]. 北京:中国农业出版社,1990:182-185.
- [11] Gabriele S,Annette H,Anna K, et al. Effects of nutrients cell density and culture techniques on protoplast regeneration and early protonema development in a moss *Physcomitrella patens*[J]. Journal of Plant Physiology,2003,160(2):209-213.

(编辑:宗淑萍)