

海洋侧孢短芽孢杆菌 Lh-1 抗菌活性物质的分离及特性研究

任召珍², 郑 媛¹, 孙 谧^{1*}, 刘均忠¹, 王跃军¹

(¹中国水产科学院黄海水产研究所海洋酶与酶工程实验室 青岛 266071)

(²上海水产大学食品学院 上海 200090)

摘 要 采用超滤、DEAE-Sephadex A25 和 CM-Sephadex FF 离子交换层析及 HPLC 反相层析等步骤得到了海洋侧孢短芽孢杆菌(*Brevibacillus laterosporus*) Lh-1 的抗菌活性物质,命名为 R-1。HPLC 纯化出的抗菌物质经质谱测定其分子量为 1608.023 Da, BIO-RAD 等电聚焦测得其 pI 为 8.55。氨基酸分析表明该物质由 Leu、Tyr、Val、Ile、Lys、Gly、Met、Ser、Ala 9 种氨基酸组成。该抗菌物质具有极强的耐热、耐酸碱特性,在 pH 11.0~12.0 条件下,121℃ 处理 1h,其活力保持在 75% 以上。经 3 种蛋白酶(碱性蛋白酶、胰酶、胃蛋白酶)处理后,活性保持在 80% 以上。茚三酮反应阳性。推测 R-1 可能是低分子量的脂肽。抑菌试验表明对食品腐败菌、致病性革兰氏阴性、阳性菌及少数真菌均有抑菌活性。

关键词: 海洋侧孢短芽孢杆菌 Lh-1; 抗菌活性物质; 分离纯化; 性质

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)06-0997-05

随着陆栖微生物在抗生素、酶、酶抑制剂、多糖等生物活性物质方面的大量开发和应用,通过寻找新种属的微生物或特殊性状的微生物来开发新型微生物天然活性物质的难度越来越大,于是人们把目光转向具有更大开发前景的海洋微生物^[1]。海洋面积不仅占地球面积的 70%,而且其区域环境具有多样性和特殊性,高盐、高压、低温、低营养和无光照等特殊区域生态环境共同造就了海洋微生物种类的丰富多样性和特殊性。这不仅使海洋微生物具有独特的代谢途径和遗传背景,而且能产生有特殊结构和功能的活性物质。已报道的海洋微生物活性物质有 100 多种,其中很多具有化学结构和生物活性多样化的特点^[2],但由于其含量较低,生物量有限,使得许多研究成果的应用推广受到一定的限制。因此,目前人们把注意力转向海洋微生物的培养与发酵技术以及其代谢产物的研究上^[3]。

本实验室从海泥中分离出了一株有抑菌效果的芽孢杆菌,经鉴定为侧孢短芽孢杆菌(*Brevibacillus laterosporus*)。该菌的代谢产物对多种细菌有抑菌作用,在此基础上,我们进一步对该菌的代谢产物进行分离,并对其性质进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: ① 指示菌: 溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*) ATCC No.4698 购自 Sigma 公司。② 检测菌: 大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*) 变形链球菌(*Streptococcus mutans*) 白色念珠菌(*Candida albicans*) 蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) 均由中国生物制品检定所提供; 粪链球菌(*Enterococcus faecalis*) 肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*) 副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) 等临床分离致病菌由青岛大学医学院提供; 肉毒梭状芽孢杆菌(*Clostridium botulinum*) 巴氏固氮梭状芽孢杆菌(*Clostridium pasteurianum*) 酪酸梭状芽孢杆菌(*Clostridium butyricum*) 腐败假单胞菌(*Pseudomonas putrefaciens*) 热解糖梭状芽孢杆菌(*Clostridium thermosaccharolyticum*) 致黑梭状芽孢杆菌(*Clostridium nigrificans*) 等食品常见腐败菌株由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器: SCM 杯式超滤系统(中科

基金项目: 国家自然科学基金(30571429); 国家“863”计划(2006AA10Z349); 青岛市科技计划(05-2-JC-81)

* 通讯作者。Tel/Fax: 86-532-85819525; Email: sunmi@ysfri.ac.cn

作者简介: 任召珍(1981-),女,山东人,硕士研究生,主要从事海洋微生物活性产物的分离纯化和性质研究。E-mail: zren1012@126.com

其他作者: 郝建华¹

收稿日期: 2007-03-19; 接受日期: 2007-05-14; 修回日期: 2007-07-12

院上海应用物理研究所); LKB2021 恒温层析冷柜(瑞典 LKB 公司); 高速冷冻离心(HITACH 20PR-52D); FPLC(Amersham); HPLC(Waters 2690); 制备型等电聚焦仪(BIO-RAD); 氨基酸自动分析仪(HITACHI 835); 薄层层析板(海洋化工研究院); CM-Sephadrose FF、DEAE-Sephadex A25(Pharmacia); 胰酶(Difco 产品分装), 胃蛋白酶(Sigma), 碱性蛋白酶系本实验室制备纯化。

1.1.3 培养基: 营养肉汤培养基、真菌培养基及庖肉培养基按常规方法配制。

1.2 测活方法

采用管碟法^[4]进行测定。

1.3 抗菌物质的分离纯化

1.3.1 粗样品的制备: 将离心除菌的发酵上清液经 SCM 杯式超滤系统超滤, 用截流分子量 10kDa 的滤膜超滤, 再以 4kDa 膜浓缩。

1.3.2 FPLC 离子交换层析: 将超滤浓缩液上样于 0.05mol/L KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲液(pH 6.8)充分平衡的 DEAE Sephadex A25 层析柱(17mm × 85mm), 用含 0 ~ 1.0mol/L NaCl 的缓冲液梯度洗脱, 流速 1.0mL/min, 收集活性峰。得到活性样品再经 CM-Sephadrose FF(17mm × 90mm)柱层析, 处理方法与上面的相同, 收集到样品超滤脱盐。

1.3.3 高压液相色谱(HPLC)反相分析: 用超纯水平衡 Waters HPLC C18 Columns(3.9mm × 150mm), 将经 CM-Sephadrose FF 层析后收集的脱盐活性样品进行分离, 用 0 ~ 100% 的乙腈梯度洗脱, 流速为 0.4mL/min, 收集活性峰。

1.4 性质研究

1.4.1 抗菌物质分子量测定: HPLC 分离后冻干的样品委托中科院生物化学研究所使用 MALDI-TOF-MS 测定。

1.4.2 等电点分析: 使用 Rotofor Cell 制备型等电聚焦(BIO-RAD)进行分析。

1.4.3 氨基酸组成分析: 委托中国海洋大学药物所使用日立 835 型氨基酸分析仪测定。

1.4.4 温度和 pH 稳定性研究: 在 0.05mol/L, pH 2.6 ~ 12.0 的广泛范围缓冲液^[5]中, 分别在 40°C、60°C、80°C、100°C、121°C 下保温 1h, 测定活性。

1.4.5 对蛋白酶敏感性研究: 3 种蛋白酶活性如下: 碱性蛋白酶 (> 10000U/mg), 胰酶 (> 1000U/mg), 胃蛋白酶 (1:3000), 用 Tris-HCl(pH 8.0)缓冲液配制碱性蛋白酶(2mg/mL)和胰酶(5mg/mL), 同时用 KCl-HCl(pH 2.0)溶液配制胃蛋白酶(5mg/mL), 与抗菌物

质反应 4h 后, 终止蛋白酶活性, 测定抗菌物质活力保持情况。

1.4.6 抑菌谱测定: 取对数生长期的各菌株分别涂布平板, 菌体浓度为 10^5 个/mL, 使用管碟法检测 R-1 抗菌物质对指示菌是否有抑菌活性。

1.4.7 茚三酮反应性试验: 参照文献[6]进行。

2 结果和分析

2.1 抗菌物质的分离纯化

2.1.1 FPLC 离子交换层析: 将超滤浓缩样品经 FPLC DEAE-Sephadex A25 分离, 得到 4 个透过峰, 经测定透过峰 1 中有活性(图 1)。将此样品再经 FPLC CM-Sephadrose FF 分离, 进行梯度洗脱, 得到两个洗脱峰, 经活性检测峰 2 有抑菌活性(图 2)。

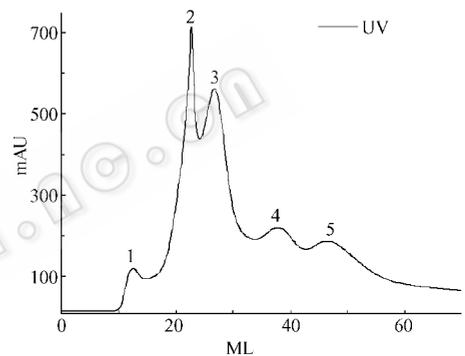


图 1 R-1 抗菌物质 DEAE-Sephadex A25 层析图

Fig.1 Purification of antimicrobial substance on DEAE-Sephadex A25.

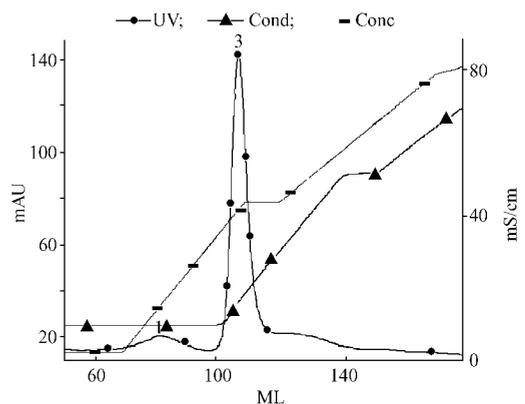


图 2 R-1 抗菌物质 CM-Sephadrose FF 层析图

Fig.2 Purification of antimicrobial substance on CM-Sephadrose FF.

2.1.2 HPLC 反相色谱: 经 FPLC CM-Sephadrose FF 层析所得的除盐样品进行 HPLC 反相色谱分析(图 3), 得到 4 个洗脱峰, 经活性检测, 在洗脱浓度 70% 左右(峰 2)得到活性。收集峰 2 样品, 冷冻干燥, 得到高压液相纯的样品, 该样品呈白色粉末状, 水溶性差。

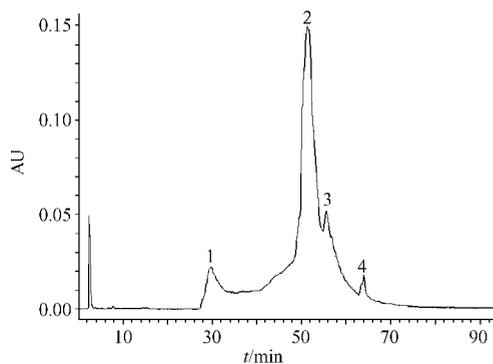


图3 R-1 抗菌物质 HPLC 层析图

Fig.3 Purification of antimicrobial substance on C₁₈ HPLC column.

2.2 R-1 抗菌物质的性质研究

2.2.1 抗菌物质分子量测定 :HPLC 分离得到的样品经 MALDI-TOF-MS 测定后,结果见图 4,可见 R-1 抗菌物质经 HPLC 分离后纯度较高,推测其分子量为 1608.023Da。

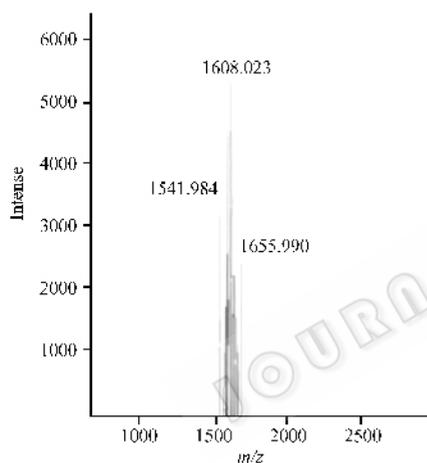


图4 R-1 抗菌物质的质谱分析结果

Fig.4 MALDI-TOF-MS profile of R-1.

2.2.2 等电点分析 :使用 Rotofor Cell 制备型等电聚焦(BIO-RAD)和 pH 3.0~10.0 与 pH 8.0~10.0 的两性电介质测定的 R-1 抗菌物质的等电点为 8.55。

2.2.3 氨基酸组成分析 :委托中国海洋大学药物所进行测定。氨基酸组成表明(表1),R-1 含有 9 种氨基酸。其中疏水氨基酸居多,这对其与细胞膜的脂质双分子层结合提供了条件;同时,其中多数为中性氨基酸,仅 Lys 为碱性氨基酸,这与测定的等电点偏

表1 R-1 抗菌物质的氨基酸分析结果

Table 1 Amino acid component of R-1

Amino acid	Relative content/%	Amino acid	Relative content/%
Leu	22.23	Gly	8.36
Tyr	15.39	Met	7.05
Val	14.76	Ser	5.18
Ile	11.31	Ala	5.17
Lys	10.24		

碱性相符合。**2.2.4 温度和 pH 稳定性研究** :抗菌物质 R-1 的温度和 pH 稳定性试验表明 :R-1 抗菌物质随着处理温度的提高,抑菌能力变化不大,即使高温至 121℃ 保温 1h,活性仍保持在 95% 以上,在 pH 2.6 下,121℃ 处理 1h,抑菌活性保持在 90% 以上,在 pH 11.0~12.0 时,121℃ 处理 1h,其活力保持在 75% 以上,表明该物质对温度、pH 具有良好的稳定性。

2.2.5 抗菌物质对蛋白酶敏感性 结果显示(图5),XR-1 抗菌物质经 3 种蛋白酶作用后,其抑菌活性均保持在 80% 以上,说明该抗菌物质对蛋白酶具有一定的耐受性。

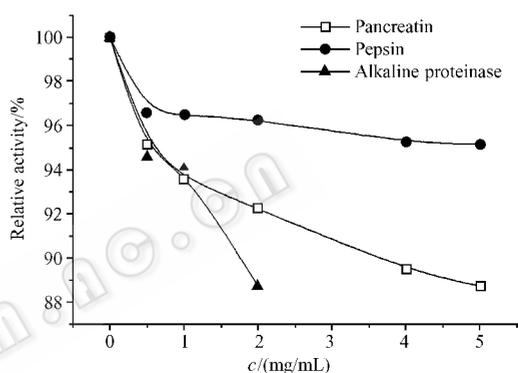


图5 胰酶、胃蛋白酶、碱性蛋白酶对 R-1 活性影响结果

Fig.5 Effect of Pancreatin, Pepsin and Alkaline Proteinase on activity of the antimicrobial substance R-1.

2.2.6 抑菌谱测定 :取对数生长期的各菌株分别涂布平板,菌体浓度为 10⁵ 个/mL,使用管碟法检测 R-1 抗菌物质,在牛津杯内注入 20μL 经 FPLC CM-Sepharose FF 分离除盐的抗菌物质,检测其对指示菌是否有抑菌活性。结果表明(表2),该抗菌物质溶

表2 抗菌物质 R-1 的抑菌谱结果

Table 2 Antimicrobial spectrum of R-1

Strains	Width of zone inhibition/mm
<i>Staphylococcus aureus</i>	18.3
<i>Bacillus subtilis</i>	16.2
<i>Streptococcus mutans</i>	14.6
<i>Enterococcus faecalis</i>	14.7
<i>Escherichia coli</i>	17.5
<i>Clostridium botulinum</i>	12.3
<i>Clostridium butyricum</i>	14.5
<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>	15.6
<i>Bacillus pumilus</i>	13.5
<i>Bacillus cereus</i>	16.8
<i>Streptococcus penamoniae</i>	17.4
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	15.9
<i>Candida albicans</i>	17.8
<i>Clostridium pasteurianum</i>	15.9
<i>Pseudomonas putrefaciens</i>	17.3
<i>Clostridium nigrificans</i>	17.2

菌谱广泛,对溶壁微球菌、金黄色葡萄球菌、梭菌等革兰氏阳性菌和大肠杆菌、腐败假单胞菌等 γ 变形细菌具有抑菌活性,并且对白假丝酵母菌具有抑制作用。具有广泛的应用前景。

2.2.7 茛三酮反应性试验:抗菌活性物质 R-1 的茛三酮反应呈现阳性,推测有 α -氨基的存在。

3 讨论

乳酸链球菌素是目前国内食品防腐研究的热点,它是一种多肽抗菌素类物质,但是它只对革兰氏阳性菌有作用,对革兰氏阴性菌及真菌无抑制作用^[7]。蜡样芽孢杆菌 QNO3323 产生的 YM-266183 和 YM-266184,对包括耐药菌株在内的葡萄球菌和肠球菌有抗菌活性,但对革兰氏阴性菌没有活性^[8]。富含次生代谢物的海洋细菌 *Marinomonas mediterranea* 产生的抗菌蛋白 marinocine,具有相对热稳定性,对许多水解酶(如糖苷酶、脂肪酶、蛋白酶)有抵抗力。其抗菌谱包括革兰氏阴性菌和阳性菌,但对真菌无抑制作用^[9]。本实验室从海洋细菌侧孢短芽孢杆菌 Lh-1 代谢产物中分离得到的抗菌物质 R-1 对革兰氏阴性、阳性菌及白假丝酵母均有抑菌作用,推测该抗菌物质为一新的天然抗菌活性物质。

国内外许多实验室通过分离纯化芽孢杆菌的发酵产物,得到了一些高分子量蛋白类的抗菌物质和低分子量的抗菌肽。如 Yetrib 等^[10]从苏云金芽孢杆菌的发酵液中纯化得到一类新的多肽 Kurstakins,主链是由 6 种不同的氨基酸组成。刘颖等^[11]从一株芽孢杆菌中分离到了抗真菌的肽 LP-1,由 5 种氨基酸组成,对热稳定。刘静等^[12]从枯草芽孢杆菌 JA 分离得到的抗菌肽由 7 种氨基酸组成,对热和蛋白酶均有一定的耐受性。R-1 抗菌物质具有极强的温度及 pH 稳定性,分子量小,而且仅有 9 种氨基酸组成,推测 R-1 是一种肽类物质。

环肽研究起源于人们对天然产物组分的研究,1944 年 1 种环十肽短杆菌肽 gramicidin S 被从细菌中分离出来,这是一种对 G^+ 细菌有很强的拮抗作用的环肽。2003 年 Rosa 等^[13]通过培养海绵共生细菌获得了一类具有生物活性的环二肽类化合物。同年 Yang 等^[14]从海洋微生物 *halobacillus lioralis* YS3106 的代谢物中提取出一系列环二肽和环六肽,具有温和的抗真菌和抗肿瘤活性。在已发现的天然环二肽中,只有约 10 种氨基酸或其衍生物。按出现频率高低,他们依次是 Pro、Leu、Val、Ala、Ile、Tyr、Phe、Gly、Gln、Met 和 His 等^[15]。R-1 抗菌物质含有九

种氨基酸,而且其组成中有 Leu、Tyr、Val、Ile、Gly、Met、Ala 7 种氨基酸与上面的相同,由其性质稳定性及氨基酸组成与环肽的相似性推测该物质有环状结构的存在。

脂肽多由芽孢杆菌产生,芽孢杆菌因能形成芽孢而具有很高的抗逆境能力,常能耐较高的温度等极端环境。文献报道的芬枯草菌肽 A^[16](Fengycin A)不溶于水,含有脂链,分子量为 1447Da。海洋侧孢短芽孢杆菌 Lh-1 代谢产物经 HPLC 分离时,当乙睛浓度达 70% 时才能被洗脱,说明 R-1 具有强疏水性。R-1 冻干后水溶性较差。推测 R-1 的强疏水性及弱的水溶性可能与存在脂链有关。R-1 是否为新的抗菌物质还需要通过元素分析、质谱、核磁共振等综合分析进行确定。

参 考 文 献

- [1] 方金瑞. 海洋微生物:开发海洋药物的重要资源. 中国海洋药物, 1998, 6(3): 53-56.
- [2] Faulkner DJ. Marine natural products. *Nat Prod Rep*, 1996, 13(2): 75.
- [3] Kobayashi J, Ishibashi M, walchi MR, et al. Amphidinode C: The first 25-membered macrocyclic Lactone with Potent and plastic activity from the cultured dinoflagellate Amphidinium S P. *J Am Chem Soc*, 1988, 110: 490.
- [4] 徐积恩, 朱明珍. 抗生素. 北京: 科学出版社, 1982, 152.
- [5] 王重庆. 高级生物化学试验教程. 北京: 北京大学出版社, 1994, 174-175.
- [6] 李建武, 肖能广, 余瑞元, 等. 生物化学实验原理和方法. 北京: 北京大学出版社, 1994, 150-155.
- [7] Cleveland J, Montcille TJ, Nes IF, et al. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Food Microbiol*, 2001, 71: 1-20.
- [8] Nagai K, Kamigiri Arao N. YM-266183 and YM-266184, novel thiopeptide antibiotics produced by *Bacillus cereus* isolated from a marine sponge. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)*, 2003, 56(2): 123.
- [9] Lucas-Elio P, Hernandez P, Sanchez-Amat, et al. Purification and partial characterization of marinocine, a new broad-spectrum antibacterial protein produced by *Marinomonas mediterranea*. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1721(1-3): 193.
- [10] Hathout Y, Ho YP, Ryzhov Y, et al. Kurstakins: A New Class of Lipopeptides Isolated from *Bacillus huringiensis*. *Nat Prod*, 2002, 63: 1492-1496.
- [11] 刘颖, 徐庆. 抗真菌肽 LP-1 的分离纯化及特性分析. 微生物学报, 1999, 39(5): 441-447.
- [12] 刘静, 王军. 枯草芽孢杆菌 JA 抗菌物质特性的研究及抗菌肽的分离纯化. 微生物学报, 2004, 44(4): 511-514.

- [13] Rosa SD ,Maya M ,Tommonaro G ,et al. Marine bacteria associated with sponge as source of cyclic peptide. *Biomolecular Engineering* , 2003 **20** :311 – 316.
- [14] Yang L , Tan RX , Wang Q. Antifungal cyclopeptides from halobacillus litoralis YS3106 of marine origin ,*Tetrahedron Letters* , 2002 **43** :6545 – 6548.
- [15] 周世宁 林永成.海洋真菌与细菌发酵物中的环二肽.微生物学通报 2002 **29**(3):59 – 62.
- [16] Vanittanakom N , Loeffler W , Koch U , et al. Fengycin-A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *J Antibiotics* ,1986 **39**(7):888 – 901.

Purification and properties of an antimicrobial substance from marine *Brevibacillus laterosporus* Lh-1

REN Zhao-zhen² ,ZHENG Yuan¹ ,SUN Mi^{1*} ,LIU Jun-zhong¹ ,WANG Yue-jun¹

(¹ Laboratory of Marine Enzyme and Enzyme Engineering ,Yellow Sea Fisheries Research Institute ,Qingdao 266071 ,China)

(² College of Food Science ,Shanghai Fisheries University ,Shanghai 200090 ,China)

Abstract :An antimicrobial substance produced by *Brevibacillus laterosporus* isolated from the sea sediment was purified and characterized. The antimicrobial substance was purified by ultrafiltration ,DEAE-Sepharose Fast flow chromatography ,CM-Sepharose Fast flow chromatography and HPLC reversed phase column chromatography ,and after the final purification step ,one active fraction was obtained ,designated R-1. The molecular weight (MW) was accurately determined by MALDI-TOF-MS as 1608.023 Da. And its pI was determined with Rotofor Cell BIO-RAD to be 8.55. Amino acid analysis of the purified R-1 showed that it was composed of Leu ,Tyr ,Val ,Ile ,Lys ,Gly ,Met ,Ser and Ala. Most of them were hydrophobic and neutral amino acid except Lys which was a basic amino acid. And this accorded with pI of R-1. R-1 remained active over a wide temperature range and it also was active over a broad pH rang. R-1 was insusceptible to pancreatin ,pepsin and alkaline proteinase. Agar radial diffusion assay showed that R-1 had low minimum bactericidal concentration against Gram-Positive Bacteria such as *Streptococcus mutans* ,*Staphylococcus aureus* ,*Clostridium* and Gram- Negative Bacteria such as *Escherichia coli* ,*Pseudomonas putrefaciens* . And R-1 had antibacterial activities against *Candida albicans* .

Keywords : *Brevibacillus laterosporus* Lh-1 ; antimicrobial substance ; purification ; properties

Foundation item : National Natural Science Foundation of China (30571429) ; National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA10Z349) ; Qingdao Programs for High Technology Research and Development (05-2-JC-81)

* Corresponding author. Tel/ Fax : 86-532-85819525 ; Email : sunmi@ysfri. ac. cn

Other author : HAO Jian-hua¹

Received : 19 March 2007/ Accepted : 14 May 2007/ Revised : 12 July 2007 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals. im. ac. cn>