

Bacillus subtilis fmbJ 脂肽类抗菌物质的分离和鉴定

Isolation and Identification of Lipopeptides Produced by *Bacillus subtilis* fmbJ

别小妹,吕凤霞,陆兆新*,黄现青,沈娟

BIE Xiao-Mei, LÜ Feng-Xia, LU Zhao-Xin*, HUANG Xian-Qing and SHEN Juan

南京农业大学食品科技学院,南京 210095

College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

摘 要 对 *Bacillus subtilis* fmbJ 脂肽类抗菌物质的分离和鉴定进行了系统研究。通过 HPLC 层析确定 *Bacillus subtilis* fmbJ 抗菌物质由多种组分构成,其中含有保留时间与 surfactin 相似的成分。通过 TLC 层析和原位酸解确定 *Bacillus subtilis* fmbJ 抗菌物质含有两个具有闭合肽键类的物质,其中之一为迁移率 Rf 与标样 surfactin 非常相近的组分。通过 ESI-MS 分析检测到 *Bacillus subtilis* fmbJ 抗菌物质含有分子量与 fengycin 相同的 m/z 1449.9、 m/z 1463.8、 m/z 1477.8、 m/z 1491.9 和 m/z 1505.9 五种同系物,和分子量与 surfactin 相同的 m/z 1008.8、 m/z 1022.8 和 m/z 1036.8 三种同系物。

关键词 *Bacillus subtilis* fmbJ, 脂肽, 分离, 纯化

中图分类号 Q939.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)04-0644-06

Abstract Isolation and identification of lipopeptides from *Bacillus subtilis* fmbJ was carried out in this paper. With HPLC method, it was determined that the antimicrobial substance was composed of many components, and one of them had the similar retention time similar to surfactin. In addition, the antimicrobial substance was proved to include the closed cycle peptide bind by TLC, and one of them had the migrating rate similar to surfactin. Furthermore, ESI-MS analysis showed that the antimicrobial substance contained five homologues of fengycin, such as m/z 1449.9, m/z 1463.8, m/z 1477.8, m/z 1491.9 and m/z 1505.9, and three homologues of surfactin, such as m/z 1008.8, m/z 1022.8 and m/z 1036.8.

Key words *Bacillus subtilis* fmbJ, lipopeptides, isolation, purification

Bacillus subtilis 在生长代谢过程中能够产生不同种类的抗菌物质,包括非核糖体合成的脂肽类抗生素(lipopeptide antibiotics)^[1,2]和核糖体合成的细菌素(bacteriocin)^[3,4],以及 *Bacillus subtilis* 抗菌蛋白^[5,6]。*Bacillus subtilis* 脂肽类物质是由 7~10 个氨基酸和一个 C13~17 脂肪酸链构成的环形化合物。例如 surfactin 和 fengycin 在脂肪酸链上具有 β -OH 形

成环形内酯结构^[7,8], iturin、mycosubtilin 和 bacillomycin 在脂肪酸链上具有 β -NH₂, 通常形成环肽结构^[2,9]。脂肽类物质通常由多种同系物组成,例如 iturin A 含有分子量分别为 1043D、1057D 和 1071D 的 3 种同系物; surfactin 有分子量分别为 1008D、1022D 和 1036D 的 3 种同系物; fengycin 则有分子量分别为 1435D、1449D、1463D、1477D、1491D 和

Received: January 27, 2006; Accepted: March 31, 2006.

The work was supported by a grant from High-Technol of Jiangsu (No. BG2003311).

* Corresponding author. Tel: 86-25-84396583; E-mail: fmb@njau.edu.cn

江苏省高新技术资助项目(No. BG2003311)

1505D的6种同系物;这些同系物具有相同的氨基酸序列,只是脂肪酸链长度依次相差-CH₂。

我们比较早地开展了 *Bacillus subtilis* 抗菌物质对食品腐败菌和致病菌的研究,筛选得到 *Bacillus subtilis* fmbJ 菌株,研究了 *Bacillus subtilis* 抗菌物质的抑菌谱;对菌株进行了 N⁺ 束诱变;对 *Bacillus subtilis* 抗菌物质发酵条件和提取条件进行了优化^[10-13],并且研究了 *Bacillus subtilis* 抗菌物质的应用效果。本文报道对 *Bacillus subtilis* fmbJ 抗菌物质进行了分离和鉴定研究。

1 材料和方法

1.1 材料

Bacillus subtilis fmbJ 菌株为南京农业大学酶工程实验室分离和鉴定,并已注册(CGMCCNo.0943)。三氟乙酸和乙氰为 MERK 公司产品。surfactin 标准样品购于美国 SIGMA 公司。

1.2 方法

1.2.1 *Bacillus subtilis* fmbJ 抗菌物质的发酵和提取:参考文献^[10]操作。

1.2.2 *Bacillus subtilis* fmbJ 抗菌物质全波长扫描:将 *Bacillus subtilis* fmbJ 抗菌粗提物在 190~1100nm 范围进行扫描,确定其最大吸收波长,采用紫外-可见分光光度计(日本 SHIMADZU UV-2450)检测。

1.2.3 *Bacillus subtilis* fmbJ 抗菌物质高效液相色谱(HPLC)分析:将 *Bacillus subtilis* fmbJ 粗提物采用 RP-C₁₈ 柱(4.6 mm φ×250 mm, 5μm)进行 HPLC(美国 AGILENT 1100 series)分离纯化。流动相为水和乙氰(含 3.8mmol 三氟乙酸),流速为 0.5mL/min,梯度洗脱。检测波长分别为 230nm 和 210nm。surfactin 标准样品也在相同条件下进行层析。

1.2.4 *Bacillus subtilis* fmbJ 抗菌物质薄层色谱(TLC)分析:TLC 分析采用硅胶板(Silica Gel 60, 20cm×10cm),层析试剂为三氯甲烷:甲醇:水=65:25:4。首先将抗菌粗提物以及 surfactin 标准样品点样于硅胶板上,*Bacillus subtilis* fmbJ 粗提物各点样两块板,在层析试剂中展开 4h,挥发干试剂后,其中一块以茚三酮(0.4%)显色,另一块板放在耐高温的密闭瓶中,瓶内以小杯盛约 2mL 浓盐酸,将密闭瓶放入 110℃烘箱中熏蒸 3h 进行原位酸水解,然后冷却、吹去盐酸,以茚三酮显色。

1.2.5 *Bacillus subtilis* fmbJ 抗菌物质电喷雾电离质谱(ESI-MS)分析:ESI-MS 采用配备了电喷雾离子源

的 LCQDECA XP PLUS Thermo Finnigan 液质联用(LS-MS)设备(Thermo Corporation, USA)。采用 MS 柱(2.6 mm φ×250 mm, 2μm)进行分析,HPLC 条件中流动相和比例与 1.2.3 相同,检测波长为 230nm,流速为 0.2mL/min。电喷雾源操作电压为 4.5kV,操作温度为 300℃,操作压力为 2100Pa。

2 结果

2.1 *Bacillus subtilis* fmbJ 抗菌物质全波长扫描

Bacillus subtilis fmbJ 抗菌粗提物从 190nm 到 1000nm 全波长扫描结果见图 1。结果表明:fmbJ 粗提物有 3 个吸收峰,分别为 206nm、230nm 和 275nm,其中 230nm 吸收峰最高,其次为 206nm,275nm 最低。

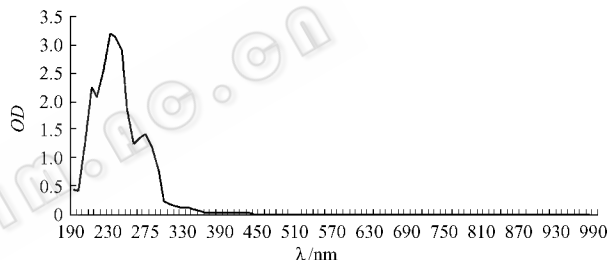


图 1 *Bacillus subtilis* fmbJ 抗菌物质全波长扫描图谱

Fig.1 The scanning spectrum of the antimicrobial substance from *Bacillus subtilis* fmbJ

2.2 *Bacillus subtilis* fmbJ 抗菌物质高效液相色谱(HPLC)分析

为了鉴定 *Bacillus subtilis* fmbJ 抗菌物质中是否含有脂肽类物质 surfactin,首先将 surfactin 标准样品进行 HPLC 层析,结果见图 2。图 2 表明,surfactin 标准样品并不是单一物质,而是由 4 个组分构成,保留时间分别为 67.766min、69.741min、73.919min 和 74.567min。这是由于脂肽类抗生素通常以同系物形式存在,很难获得单一物质。

图 3 为 *Bacillus subtilis* fmbJ 抗菌物质的 HPLC 层析图谱,结果表明,*Bacillus subtilis* fmbJ 抗菌物质在 230nm 下检测包含多个组分。其中保留时间为 23.147min 的峰值最高,在保留时间为 16.831min、19.562min、28.679min、49.753min 处也有较高的峰。此外在 65.817min、67.539min 和 69.245min 有明显的峰,其中后两个峰与标准样品 surfactin 中保留时间为 67.766min 和 69.741min 的峰很接近。

据报道,surfactin 最大吸收峰在 206~210nm,为
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

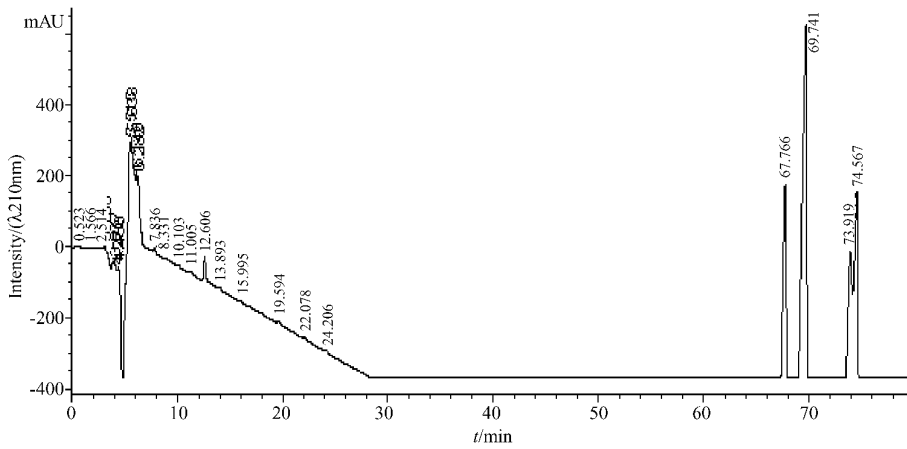


图2 Surfactin 标准样品的 HPLC 层析图谱

Fig.2 HPLC chromatograms of standard Surfactin sample

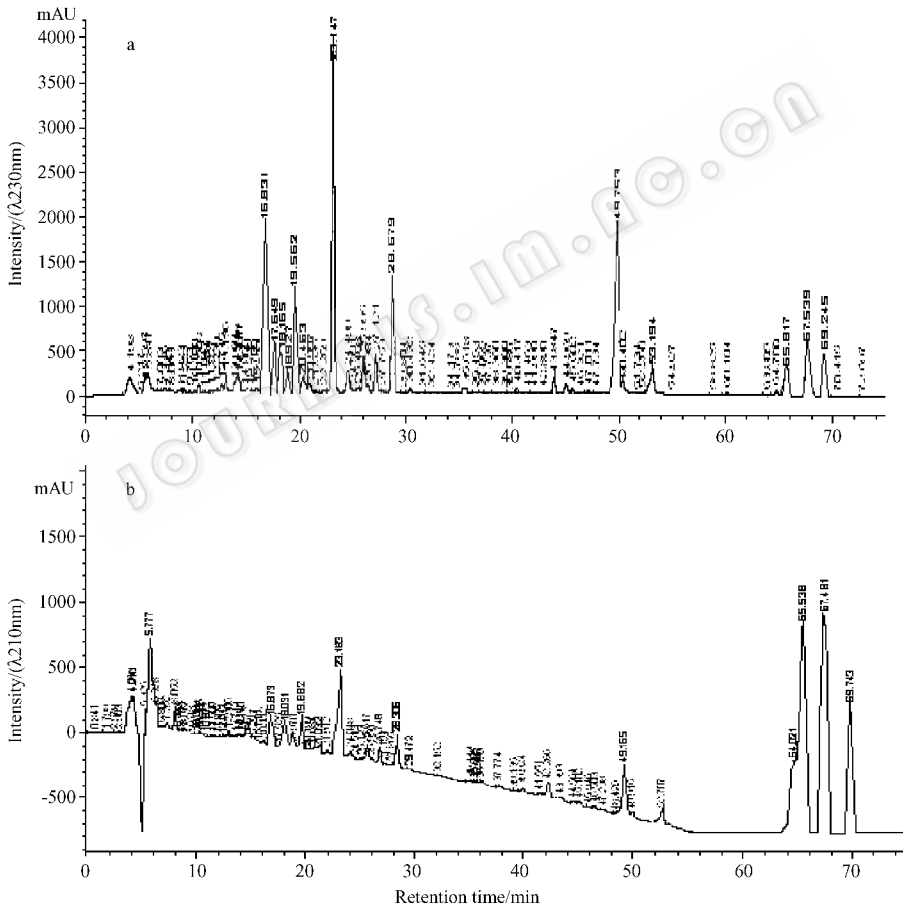


图3 Bacillus subtilis fmbJ 抗菌物质 HPLC 层析图谱

Fig.3 HPLC chromatograms of the antimicrobial substance produced by Bacillus subtilis fmbJ

了进一步确定 *Bacillus subtilis* fmbJ 抗菌物质中是否含有 surfactin, 将检测波长设为 210nm, 在相同条件下对 *Bacillus subtilis* fmbJ 进行 HPLC 层析, 结果见图 3(b)。从图 4 可以看出, *Bacillus subtilis* fmbJ 各组分与在 230nm 下 HPLC 检测的结果一致, 各组分保留时间基本相对应, 但是峰值发生了很大变化。图 3

(b)中保留时间为 16.873min、19.862min、23.183min 和 49.165min 等峰值明显减小, 说明这些组分在 230nm 下吸收峰比 210nm 高, 而 65.583min、67.481min 和 69.743min 等峰值显著增大, 说明这些组分在 210nm 有更高的吸收峰。图 3(b)再次证明 *Bacillus subtilis* fmbJ 抗菌物质中含有保留时间与 surfactin 相

似的成分。

2.3 *Bacillus subtilis* fmbJ 抗菌物质薄层色谱 (TLC)分析

薄层色谱(TLC)层析是许多混合物分离和定性鉴定的重要手段之一,为了进一步确定 *Bacillus subtilis* fmbJ 抗菌物质的组成和种类,本研究对两种菌株抗菌粗提物进行了 TLC 层析,结果见图 4。

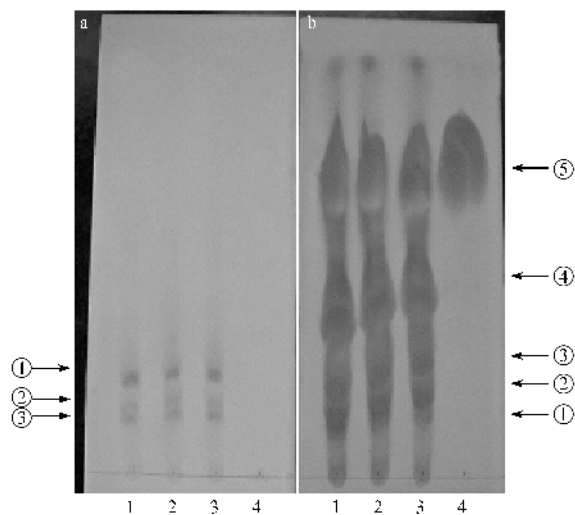


图 4 *Bacillus subtilis* fmbJ 抗菌物质 TLC 层析

Fig.4 TLC chromatograms of the antimicrobial substance produced by *Bacillus subtilis* fmbJ

a :un-acidized ; b :acidized ; 1 ~ 3 :the antimicrobial substance ;4 :the standard surfactin .

Bacillus subtilis fmbJ 抗菌粗提物 TLC 层析包括 a 和 b 两块板,在相同条件下同时进行 TLC 层析,层析结束后 a 板直接用茚三酮显色,而 b 板层析后再进行原位酸解,然后用茚三酮显色。从图 4(a)可以看出,a 板上 1~3 样品条带完全一致,都有 3 个明显红色斑点①、②和③,表明这 3 个组分含有游离氨基;

而 b 板上,除了与 a 板对应的位置上有 3 个橙红色的斑点,还有两个较大的橙红色的斑点④和⑤。这 2 个大斑点在未进行原位酸解前是没有显色的,说明这两个点所代表的成分在未酸解前不含有游离氨基,在酸解后带有游离氨基从而显色。通常脂肽类物质为环型结构,不带有游离氨基,酸解后环型结构被打开,游离氨基会暴露出来。本实验可以初步推测 *Bacillus subtilis* fmbJ 抗菌粗提物中斑点④和⑤具有闭合的肽键。

图 4(a)和(b)中的第 4 个点样位置为 surfactin 标样,可以看出 surfactin 在酸解前没有显色,而原位酸解后再显色出现明显的橙红色斑点⑤。这一斑点的迁移率 R_f 与 b 板 1~3 样品中斑点⑤的 R_f 基本一致(见表 1),因此可以证明 *Bacillus subtilis* fmbJ 抗菌粗提物中含有脂肽物质 surfactin 成分。

表 1 *Bacillus subtilis* fmbJ 抗菌粗物质主要组分的迁移率
Table 1 The migrating rate of the main components from the antimicrobial substance produced by *Bacillus subtilis* fmbJ

The main components	The moving rat(R _f)
①	0.136
②	0.190
③	0.242
④	0.446
⑤	0.752
surfactin	0.764

2.4 *Bacillus subtilis* fmbJ 抗菌物质 ESI-MS 分析

从 *Bacillus subtilis* fmbJ 抗菌物质电喷雾阳离子流图中(图 5),获得保留时间(RT)为 3.82min、4.38min、4.78min 和 5.50min 的抗菌物质电喷雾质谱图(图 6)。

图 6(a)呈现出 [M + H]⁺ 为 m/z1449.9 和 m/z1477.7 的信号;图 6(b)呈现出 [M + H]⁺ 为 m/z

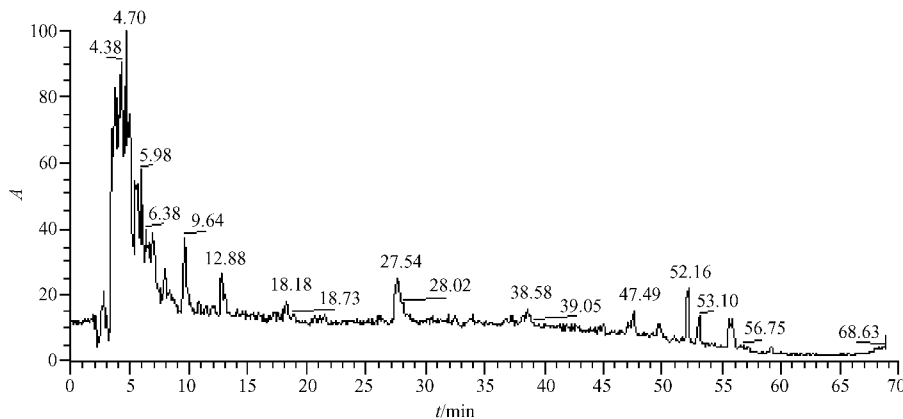


图 5 *Bacillus subtilis* fmbJ 抗菌物质电喷雾阳离子流图

Fig.5 The positive ion flow spectra of ESI-MS for the antimicrobial substance produced by *Bacillus subtilis* fmbJ

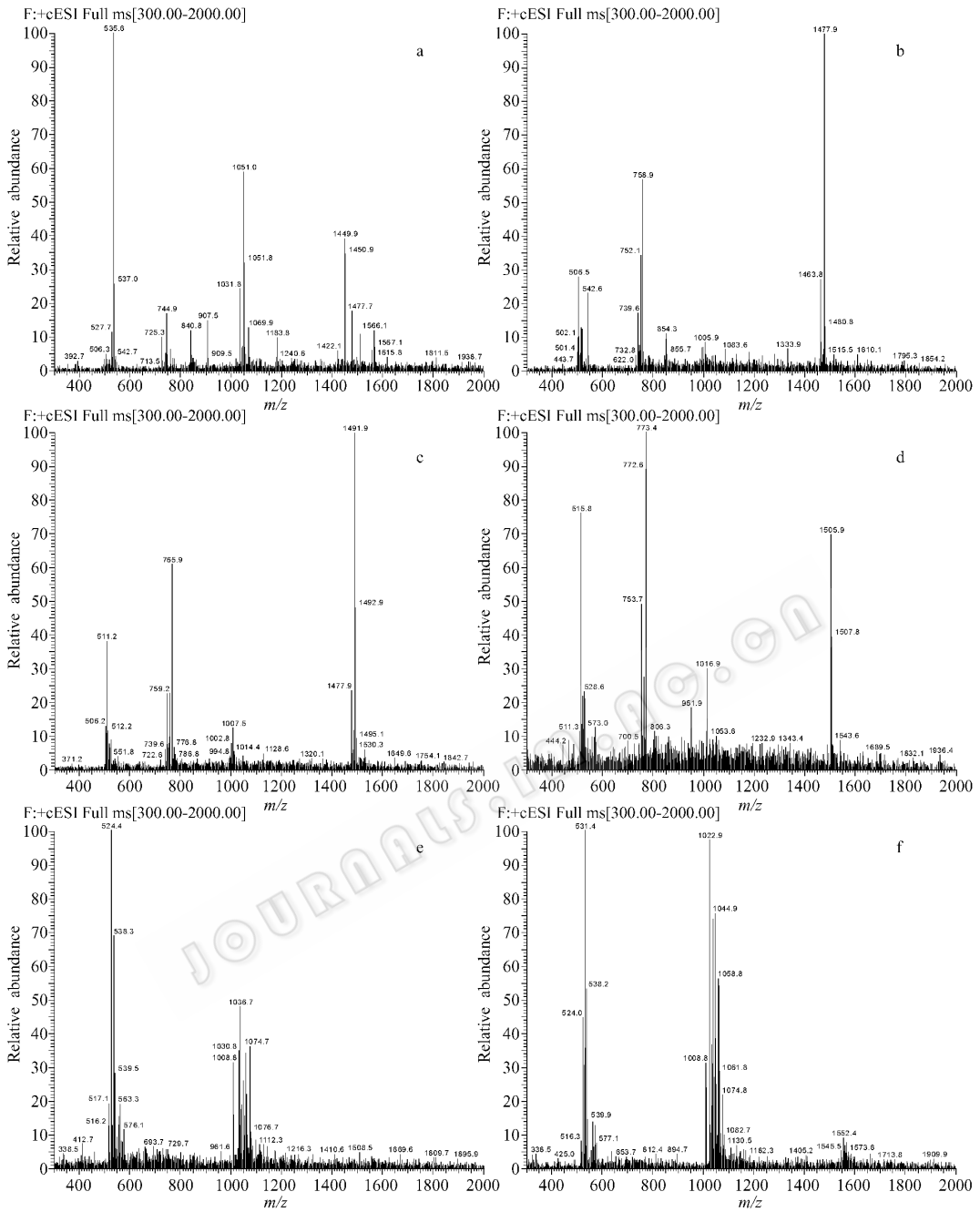


图 6 *Bacillus subtilis* fmbJ 抗菌物质 ESI-MS 图

Fig.6 ESI mass spectra of the antimicrobial substance produced by *Bacillus subtilis* fmbJ

1463.8 和 m/z 1477.9 的信号;图 6(c) 呈现出 $[M + H]^+$ 为 m/z 1477.8 和 m/z 1491.9 的信号;图 6(d) 呈现出 m/z 1505.9 信号。可以看出, m/z 1449.9、 m/z 1463.8、 m/z 1477.8、 m/z 1491.9 和 m/z 1505.9 分别与 C15 ~ C19 的 fengicinA 或者与 C13 ~ C17 的 fengicinB 的分子量相同(图 8)。此外 5 种物质之间分子量依次相差 14D, 恰好为脂肪酸链长度- CH_2 。因此推测 *Bacillus subtilis* fmbJ 抗菌物质中含有 5 种脂肽类物质 fengicin 同系物。

从 *Bacillus subtilis* fmbJ 抗菌物质电喷雾图谱中, 还获得保留时间(RT)为 50.91min 和 54.42min 的抗菌物质电喷雾质谱图, 即图 6(e)和图 6(f)。图 6(e)呈现出 $[M + H]^+$ 为 m/z 1008.8 和 m/z 1036.7 的信号;图 6(f)呈现出 $[M + H]^+$ 为 m/z 1022.9 的信号, 可以看出, m/z 1008.8、 m/z 1022.8 和 m/z 1036.8 等 3 种物质之间分子量依次相差 14D, 恰好为脂肪酸链长度- CH_2 , 分别与 C13 ~ C15 的 surfactin 分子量相同。因此推测 *Bacillus subtilis* fmbJ 抗菌物质中含

有 3 种脂肽类物质 surfactin 同系物(图 7)。

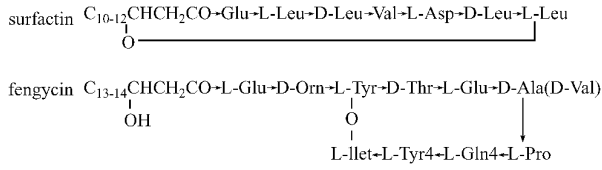


图 7 脂肽类物质 surfactin 和 fengycin 的分子结构

Fig.7 Primary structure of surfactin and fengycin

3 讨论

多年来,国内对 *Bacillus subtilis* 对植物病原菌的生物防治作用报道很多,并且对 *Bacillus subtilis* 抗菌蛋白的分离纯化进行了较多研究^[5-6,14],而事实上 *Bacillus subtilis* 还能够产生抗菌效果很强的脂肽类和细菌素等物质。据 Martin Kowall 等^[7]报道, *Bacillus subtilis* OKB 105 能够产生多种 C13~C15 的 surfactin 的同系物;Soo-Jin Cho 等^[15]研究发现 *Bacillus subtilis* KS03 能够产生 3 种 C11~C13 的 iturinA 的同系物;Laurent Volpon 等^[16]报道了 *Bacillus subtilis* NCIB8872 可以产生 plipastatins(fengycins) A 和 B。其中, *Bacillus subtilis* 168 是在国外被研究得最深入的菌株,该菌株能够产生 3 种核糖体合成的细菌素(TasA, subtilosin, sublancin), 2 种非核糖体合成脂肽类抗生素(surfactin 和 bacilycin)和一种新的磷脂类抗生素(bacilysocin),这也是目前发现的产生抗菌物质种类最多的 *Bacillus subtilis* 菌株。与已有报道的主要区别在于,本文立足于对食品腐败菌和致病菌具有抗菌作用的 *Bacillus subtilis* fmbJ 的研究,通过 ESI-MS 分析初步验证 *Bacillus subtilis* fmbJ 产生两种脂肽类抗菌物质 fengycin 和 surfactin,同系物数量繁多,与前人报道的均不相同。

REFERENCES(参考文献)

[1] Ramkrishna S , Swaminathan T . Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin. *Process Biochemistry* , 2005 , 40 : 2953 - 2958

[2] Francisco J , Aranda JA , Teruel AO . Further aspects on the emolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. *Biochemical Biophysical Acta* , 2005 , 1713 : 51 - 56

[3] Carsten C , Torsten S , Stefanie , D . Activation of subtilin precursors by *Bacillus subtilis* extracellular aerine proteases subtilin (AprE) , WprA , and Vpr. *Biochemical and Biophysical Research*

Communications , 2004 , 304 : 48 - 54

- [4] Raimund M , Torsten S , Karl-Dieter E , Steffen , JG . Structure of the *Bacillus subtilis* peptide antibiotic subtilosin A determined by 1H-Nmr and Matrix Assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Protein Chemistry* , 2001 , 20(6) : 501 - 506
- [5] Tong YR(童有仁) , Ma ZQ(马志超) , Chen WL(陈卫良) , Li DB(李德葆) . Purification and partial characterization of antagonistic proteins from *Bacillus subtilis* B034. *Acta Microbiological Sinica* (微生物学报) , 1999 , 39(4) : 339 - 343
- [6] Xie IX(谢栋) , Peng X(彭憬) , Wang JH(王津红) , Hu X(胡剑) . Purification and partial characterization of the antimicrobial protein X98 from *Bacillus subtilis*. *Acta Microbiological Sinica* (微生物学报) , 1998 , 38(1) : 13 - 19
- [7] Martin K , Joachim V , Britta K , Torsten S . Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. *Journal of Colloid and Interface Science* , 1998 , 204 : 1 - 8
- [8] Miyuki K , Yoshio K . New antifungal antibiotics , bacillopeptins and fusaricidins. *The Pharmaceutical Society of Japan* , 2002 , 122(9) : 651 - 671
- [9] Kenji T , Takahashi A , Makoto S . Isolation of a gene essential for biosynthesis of the lipopeptide antibiotics plipastatin B1 and surfactin in *Bacillus subtilis* YB8. *Archiv Microbiology* , 1996 , 165 : 243 - 251
- [10] Bie Xiaomei , Lu Zhaoxin , Lu Fengxia , Zeng Xiaoxiong . Screening the main factors affecting extraction of the antimicrobial substance from *Bacillus* sp. fmbJ using the Plackett - Burman method. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* , 2005 , 21 : 925 - 928
- [11] Shen X(沈娟) , Lu ZX(陆兆新) , Bie XM(别小妹) , Li FX(吕凤霞) . The fermentation conditions optimization for the novel antimicrobial peptide by *Bacillus* sp. fmbJ224. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报) , 2005 , 21(4) : 609 - 614
- [12] Huang XQ(黄现青) , Lu ZX(陆兆新) , Cui BA(崔保安) , Bie XM(别小妹) , Li FX(吕凤霞) . Activity analysis of the novel antimicrobial substance produced by *Bacillus* sp. FmbJ against NDV and IBDV. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报) , 2006 , 22(2) : 328 - 333
- [13] Bie XM(别小妹) , Lu ZX(陆兆新) . The main factors affecting extraction of the antimicrobial substance from *Bacillus subtilis* fmbR using the Plackett-Burman method. *Journal of Nanjing Agricultural University*(南京农业大学学报) 2005 , 4 : 126 - 129
- [14] Liu Y(刘颖) , Xu Q(徐庆) , Chen ZL(陈章良) . Purification and characterization of antifungal peptide. *Acta Microbiological Sinica* (微生物学报) , 1999 , 39(5) : 441 - 447
- [15] Nakayma S , Takahashi M , Hirai M . Isolation of new variants of surfactin by a recombinant *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiol Biotechnol* , 1997 , 48 : 80 - 82
- [16] Laurent Volpon , Françoise Besson , Jen-Marc Lancelin . NMR structure of antibiotics plipastatins A and B from *Bacillus subtilis* inhibitors of phospholipase A2. *FEBS Letters* , 2000 , 485 : 76 - 80