

文章编号:1001-6880(2014)7-0994-06

# 冷泉细菌 *Paenibacillus algorifonticola* 产抑菌活性物质提取分离工艺的研究

刘振华<sup>1\*</sup>, 聂永芳<sup>2</sup>, 周晨妍<sup>1</sup>, 剧 飞<sup>1</sup>, 康 静<sup>1</sup><sup>1</sup>新乡医学院生命科学技术学院, 河南省医学遗传学与分子靶向药物  
高校重点实验室培育基地; <sup>2</sup>河南科技学院机电学院, 新乡 453003

**摘要:**本文对冷泉细菌——*Paenibacillus algorifonticola* 的代谢产物的提取分离进行了研究。*P. algorifonticola* 可产生抑制白色念珠菌的水溶性物质。大孔树脂 D101 和 XAD7HP 串联使用脱除 *P. algorifonticola* 发酵液中的色素, 树脂与发酵液比例为 1:10 (g/mL) 为佳。脱色后发酵液中的活性物质可被强酸性阳离子交换树脂 FPC22H 吸附, 0.5 mol/L 的氨水可将活性物质洗脱下来, 每 10 g FPC22H 可以吸附 120 mL 发酵液中的活性物质。本文研究结果为进一步分离纯化 *P. algorifonticola* 产抗白色念珠菌物质奠定了基础。

**关键词:***Paenibacillus algorifonticola*; 离子交换; 大孔树脂; 脱色

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

## Extraction and Purification of Antibacterial-Active Constituents Produced by *Paenibacillus algorifonticola*

LIU Zhen-hua<sup>1\*</sup>, NIE Yong-fang<sup>2</sup>, ZHOU Chen-yan<sup>1</sup>, JU Fei<sup>1</sup>, KANG Jing<sup>1</sup><sup>1</sup>College of Life Science and Technology, Xinxiang Medical University, The Henan Province Key  
Laboratory of Medical Genetics and Molecular Targeting Drugs; <sup>2</sup>Henan Institute of  
Science and Technology, College of mechanical and electrical, Xinxiang 453003, China

**Abstract:** This study focused on the extraction and purification of active constituents from a bacterium, namely *Paenibacillus algorifonticola*. *P. algorifonticola* can produce water-soluble constituents which showed inhibitory activity against *Candida albicans*. Macroporous resin D101 coupled with XAD7HP was used to absorb pigments from the fermentation broth of *P. algorifonticola*. The suitable ratio of resin (either D101 or XAD7HP) to fermentation broth was 10 g of resin to 100 mL of fermentation broth. No active constituents were adsorbed by the two resins. The active constituents were strongly adsorbed by acidic cation exchange resin FPC22H and eluted by 0.5 mol/L ammonia. 10 g FPC22H resin adsorbed 120 mL fermentation broth. The results of this study can be used for further purification of antibacterial-active constituents of *P. algorifonticola*.

**Key words:***Paenibacillus algorifonticola*; ion exchange; macroporous resin; decolorize

从微生物代谢产物中寻找新的抗生素一直是研究热点, 然而随着陆地微生物的研究越来越多, 人们把目光投向一些新的极端环境微生物。芽孢细菌 *Paenibacillus algorifonticola* 是一株分离自新疆冷泉的新近发现的极端耐冷细菌<sup>[1]</sup>, 其代谢产物未被研究过。本课题组前期研究结果表明此菌可产生抗白色念珠菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌等人体病原菌的活性物质, 本文主要针对该菌产生的抗白色念

珠菌物质进行提取分离。

很多的微生物活性代谢产物均为脂溶性物质, 脂溶性物质的分离纯化路线较为成熟。然而, 也有一些微生物产生的活性物质为水溶性物质<sup>[2-5]</sup>。水溶性物质, 尤其是小分子水溶性物质的分离纯化要比脂溶性物质困难, 相关报道较少。

水溶性物质纯化的方法主要有离子交换、大孔树脂和反相硅胶等柱色谱分离。本文主要研究了几种大孔树脂对 *P. algorifonticola* 发酵液的脱色工艺, 并考察了离子交换树脂对 *P. algorifonticola* 活性物质的提取分离, 为后续研究奠定基础。

# 1 材料与方法

## 1.1 材料

实验菌株:芽孢细菌(*Paenibacillus algorifonticola*),购于中国科学院微生物研究所暨中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC)。其发酵液经过絮凝(数据未发表)预处理除去菌体后用于本文研究。白色念珠菌(*Candida albicans*)为本实验室保存。

大孔吸附树脂:D101(天津市瑞金特化学品有限公司)、XAD18 和 XAD7HP(美国陶氏化学公司)。离子交换树脂:FPC22H、FPC3500、FPA90CL 和 FPA51,均为美国陶氏化学公司产品。

仪器:电子天平(YP102N,上海青海仪器有限公司)、pH 计(PHS-3C,上海雷磁仪器厂)、恒流泵(BT1-100,上海琪特分析仪器有限公司)。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 大孔树脂脱色

#### 1.2.1.1 大孔树脂的筛选

取发酵液絮凝过滤液 30 mL 于三角瓶(250 mL)中,按 pH 3.0、7.0、10.0 分为三组,每组 3 瓶。分别称取经预处理并抽干的大孔树脂 D101、XAD18、XAD7HP 各 10.0 g,分别加至每组的 3 只瓶中。将 9 个三角瓶置于 30 °C、110 rpm 摆床振荡 3 h,保温静置 30 min。将树脂抽滤干,测定吸附后发酵液的活性。

将上述抽干树脂依次用 30 mL 的 50% 乙醇、100% 乙醇和丙酮浸泡,于 30 °C、110 rpm 振荡 3 h,保温静置 30 min。分别测定不同洗脱液的活性。

#### 1.2.1.2 树脂动态吸附活性物质的最大吸附量测定

取 10 g D101 和 XAD7HP 树脂装入色谱柱中,分别将 90 mL 的发酵絮凝液通过树脂,以 30 mL 为单位收集流出的液体并测定其活性。吸附后的树脂分别用 90 mL 水、50% 乙醇和 100% 乙醇洗脱,测定洗脱液的抑菌活性(以 30 mL 为单位收集洗脱液)。

#### 1.2.1.3 树脂动态吸附色素的最大吸附量测定

分别取 20 g D101 和 XAD7HP 树脂装入色谱柱中,将 1.0 L 的发酵絮凝液通过树脂,以 100 mL 为单位接收流出的液体,观察流出液体的色素变化情况。

#### 1.2.1.4 大孔树脂串联动态吸附色素能力测定

取 D101 和 XAD7HP 树脂各 100 g,装入两个色谱柱中,将 1.0 L 的发酵液通过 D101,流出液直接

进入 XAD7HP 色谱柱中。以 100 mL 为单位接收流出液体,观察流出液体的色素变化情况。发酵液全部通过树脂以后,用 1.0 L 蒸馏水冲洗树脂。然后用 1.0 L 无水乙醇冲洗两种树脂,以 300 mL 为单位收集流出的洗脱液并观察洗脱液的色素变化情况。

### 1.2.2 离子交换树脂层析

#### 1.2.2.1 离子交换树脂的筛选

取 20 份发酵絮凝清液,每份 30 mL,每 5 瓶一组,每组中的发酵液分别调 pH 为 3.0、5.0、7.0、9.0 和 11.0。

在上述 4 组瓶中分别加入 4 种不同的经过预处理的离子交换树脂(10 g)。震荡 30 min,静置 5 h,测定吸附余液的抑菌活性。

#### 1.2.2.2 洗脱剂的选择

选择可以完全吸附活性物质的离子交换树脂,用 30 mL 去离子水冲洗。分别加入 30 mL 0.5 mol/L 氨水溶液和 0.5 mol/L HCl 作为洗脱剂,震荡 30 min,静置 30 min,测定洗脱液的抑菌活性,对照为洗脱剂。

#### 1.2.2.3 动态吸附最大吸附量的测定

确定了离子交换树脂种类和洗脱剂后,取 10 g 树脂装入色谱柱中,将 600 mL 的发酵絮凝液通过树脂,以 60 mL 为单位接收流出的液体并测定其抑菌活性。

#### 1.2.2.4 洗脱剂浓度的选择

取 10 g 离子交换树脂 FPC22H,将 120 mL 发酵絮凝液通过树脂,用 100 mL 去离子水洗涤,然后分别用 100 mL 0.0005、0.005、0.05、0.5 和 14 mol/L 氨水洗脱,测定洗脱液的抑菌活性,没有抑菌活性的洗脱液浓缩后再次测定其抑菌活性。

### 1.2.3 大孔树脂和离子交换树脂大规模串联吸附测试

1) 大孔树脂和离子交换树脂各取 500 g 装入色谱柱中,将 5 L 的发酵液依次通过大孔树脂和离子交换树脂,以 500 mL 为单位接收流出的液体并观察其颜色;2) 用 2.5 L 的蒸馏水冲洗大孔树脂,流出的液体仍然通过离子交换树脂;3) 用 1.0 L 去离子水冲洗离子交换树脂;4) 用 800 mL 0.5 mol/L 氨水对离子交换树脂进行洗脱,以 100 mL 为单位收集流出的液体直到没有颜色为止,测定其抑菌活性,其中没有活性的旋转蒸发浓缩以后再次测定抑菌活性。

### 1.2.4 粗提物的有机溶剂处理

将 5 L 发酵液处理后得到的粗提液浓缩至 100

mL, 取 7 份, 每份 10 mL, 使用旋转蒸发仪蒸干, 分别加入 10 mL 甲醇、乙醇、丙酮、乙腈、乙酸乙酯、正丁醇和氯仿, 充分摇匀, 吸出有机相, 不溶于有机相的部分用水溶解, 分别测定两部分的抑菌活性, 对照组蒸干后用水溶解。

表 1 *P. algorifonticola* 絮凝液大孔树脂吸附余液和洗脱液对白色念珠菌的抑菌活性

Table 1 Inhibitory activity of *P. algorifonticola* fermentation broth against *C. albicans* after macroporous resin adsorption and elution

不同处理液 Treatments	树脂 Resin	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone (mm)		
		pH 3.0	pH 7.0	pH 10.0
吸附后絮凝液 Liquid after absorption	D101	20.0	21.25	24.0
	XAD18	0	0	0
	XAD7HP	15.25	14.0	15.0
水洗脱液 Elution by water	D101	29.0	29.0	33.0
	XAD18	29.0	24.5	25.0
	XAD7HP	24.5	26.5	25.5
50% 乙醇洗脱液 Elution by 50% ethanol	D101	17.75	23.25	20.25
	XAD18	15.75	18.50	14.25
	XAD7HP	13.50	17.75	14.00
100% 乙醇洗脱液 Elution by ethanol	D101	16.5	17.5	12.25
	XAD18	0	12.25	0
	XAD7HP	0	12.25	0
丙酮洗脱液 Elution by acetone	D101	0	0	0
	XAD18	0	0	0
	XAD7HP	0	0	0

由上表可以看出, 被 D101 和 XAD7HP 吸附后的发酵絮凝液仍具有较强的抗白色念珠菌活性, 表明这两种树脂对抗白色念珠菌物质吸附很弱, 吸附后树脂用水和乙醇仍可以洗下一部分活性物质, 这可能是由于相比于发酵絮凝液, 树脂量较大的原因。这两种树脂吸附活性物质过程中, pH 影响不大。

XAD18 对抗白色念珠菌物质具有一定吸附, 并且 pH 影响不大。水和乙醇可以洗下活性物质, 但

## 2 实验结果

### 2.1 大孔树脂实验

#### 2.1.1 大孔树脂的筛选

被大孔树脂吸附后的发酵液和各种洗脱液对白色念珠菌的抑菌活性如下表所示。

Table 1 Inhibitory activity of *P. algorifonticola* fermentation broth against *C. albicans* after macroporous resin adsorption and elution

洗脱液中含有一定色素。

由于 D101 和 XAD7HP 对活性物质吸附弱, 而且对色素有很大的吸附, 因此选择这两种树脂进行后续实验。

#### 2.1.2 大孔树脂动态吸附最大吸附量测定

D101 和 XAD7HP 对发酵絮凝液中活性物质吸附量见表 2。

表 2 D101 和 XAD7HP 动态吸附最大吸附量测定(g)

Table 2 Active substances adsorption ability of D101 and XAD7HP resin for *P. algorifonticola* fermentation broth

吸附体积 Absorption volume (mL)	不同树脂处理液活性 Inhibitory activity of treatments from different resins							
	吸附后的絮凝液 Liquid after absorption		水洗脱液 Elution by water		50% 乙醇洗脱液 Elution by 50% ethanol		100% 乙醇洗脱液 Elution by ethanol	
	D101	XAD7HP	D101	XAD7HP	D101	XAD7HP	D101	XAD7HP
30	6.0	6.1	7.1	6.0	0	0	0	0
60	6.0	6.0	2.2	6.1	0	0	0	0
90	6.2	6.0	0	0	0	0	0	0

由上述表 2 可以看出, D101 和 XAD7HP 动态吸附过程中吸附活性物质的能力都很弱, 而且用 60 mL 水即可将活性物质洗脱下来, 10 g D101 和 XAD7HP 处理 100 mL 发酵液较为合适。目测发现两种树脂都有一定的吸附色素的能力, 其中 D101 吸附色素能力强于 XAD7HP, 选择此两种树脂进一步考察其色素吸附能力。

### 2.1.3 大孔树脂动态吸附对色素最大吸附量测定

由表 3 可知, 在发酵液不调整 pH(6.3~6.8)的情况下, D101 和 XAD7HP 都有一定的色素吸附能力, 但是 D101 的色素吸附能力较强, 远远大于 XAD7HP。每 10 g D101 可以吸附 100 mL 发酵液中的色素, 每 10 g XAD7HP 也可以吸附 100 mL 发酵

表 3 D101 和 XAD7HP 对色素的最大动态吸附量测定

Table 3 Decolorization ability of D101 and XAD7HP against *P. algorifonticola* fermentation broth

洗脱液 收集体积 Elution volume (mL)	颜色 Colour		
	D101	XAD7HP	Tandem D101 and XAD7HP
100	--	++	--
200	--	++	--
300	+	+++	+
400	++	+++	++
500	++++	++++	++++
600	+++++	+++++	+++++
700	+++++	+++++	+++++
800	+++++	+++++	+++++
900	+++++	+++++	+++++
1000	+++++	+++++	+++++
絮凝液 Flocculation liquid	+++++	+++++	+++++

注: 表中使用“+”来表示液体的偏黄程度, 使用“--”表示无色素。

Note: “+” indicated the degree of yellow, “--” indicated colorless.

液中的色素, 但吸附能力弱于 D101。D101 属于非极性树脂, XAD7HP 为中等极性树脂, 两种树脂吸附的色素属于不同物质, 故后续实验中将两种树脂串联使用。

### 2.1.4 大孔树脂串联动态吸附色素测定

扩大规模的串联树脂吸附(100 g D101 吸附 1 L 发酵液)后, 洗脱液的颜色(表 4)显示, 经 D101 吸附后的液体, 仍有一部分浅绿色的物质被 XAD7HP 吸附。因此, 使用 D101 和 XAD7HP 串联吸附发酵液去除色素的方法是可行的。此外, 小规模研究结果显示 10 g D101 可以吸附 100 mL 发酵液中的色素, 但扩大规模, 100 g D101 吸附 1 L 发酵液的色素后, 余液颜色仍较深, 故脱色工艺需进一步优化, 但就树脂与发酵液体积比例而言, 10 g 树脂吸附 100 mL 发酵液比较合适, 否则树脂用量过大将导致实验操作不方便。

表 4 D101 和 XAD7HP 乙醇洗脱液的色素变化

Table 4 Color of alcohol eluent from D101 and XAD7HP

洗脱量 Elution volume (mL)	洗脱液颜色 Elution color	
	D101	XAD7HP
300	+++	+
600	++++++	+
900	--	--

注: 表中使用“+”来表示液体的偏绿程度, 使用“--”表示无色素。

Note: “+” indicated the degree of green, “--” indicated colorless.

## 2.2 离子交换

### 2.2.1 离子交换树脂的筛选

由表 5 可以看出, 4 种树脂中只有 FPC22H 能够将发酵液中的活性物质全部吸附, 而 FPC22H 属于强酸性离子交换树脂, 所以, 吸附过程几乎不受发酵液 pH 的影响, 且交换速度极快。因此, 选用 FPC22H 作为分离该活性物质的离子交换树脂。

表 5 离子交换树脂的筛选

Table 5 Screening of ion exchange resin

树脂 Resin	不同 pH 下被吸附絮凝液活性(mm) Inhibition zone diameter when <i>P. algorifonticola</i> fermentation broth was absorbed by different resins				
	3.0	5.0	7.0	9.0	11.0
FPC3500	21.5	19.5	20.4	23.6	19.8
FPC22H	0	0	0	0	0
FPA51	18.6	19.2	21.3	21.4	20.5
FPA90Cl	18.6	19.5	18.7	21.6	19.4

### 2.2.2 洗脱剂的选择

用 0.5 mol/L HCl 做洗脱液时, 洗脱下来的液

体没有抑菌活性。使用 0.5 mol/L 氨水做洗脱剂不仅能够很快将活性物质(抑菌圈直径为 22 mm)全

部洗脱,而且使用旋转蒸发的方法能够很容易将溶液中的氨全部除去。因此,应使用氨水作为FPC22H的洗脱剂。

### 2.2.3 离子交换动态吸附最大吸附量的测定

使用过量的发酵液通过10 g的FPC22H,流出液每60 mL收集一次。当发酵液流出60 mL和120 mL时都没有活性,但流出180 mL的时候开始出现活性物质(抑菌圈直径为21.5 mm),说明此时树脂已经吸附饱和。因此,每10 g树脂可以吸附120 mL的发酵液。

### 2.2.4 洗脱剂浓度的选择

使用0.05 mol/L和0.5 mol/L浓度的氨水都可以将活性物质从树脂上洗脱下来(表6),但是0.05 mol/L的氨水洗脱能力太弱,使用0.5 mol/L的氨水能够很容易的将全部的物质从树脂上洗脱下来,且洗脱液体积明显小于发酵液体积,起到了浓缩作用,洗脱液还可以直接旋转蒸发浓缩去除溶液中的氨,从而得到发酵液中活性物质的粗提液。

表6 洗脱剂浓度的选择

Table 6 Effect of solute concentration on elution

氨水浓度 Concentration of ammonia water (mol/L)	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter (mm)	浓缩后的抑菌圈直径 Inhibition zone diameter after condensation (mm)
0.0005	0	0
0.005	0	0
0.05	0	12.0
0.5L	22.0	-
14	0	0

注:“-”表示洗脱液未浓缩。

Note: “-” indicated the elution was not concentrated.

## 2.3 大孔树脂和离子交换树脂大规模串联吸附测试

使用500 g D101、500 g XAD7HP和500 g

FPC22H对5 L的发酵絮凝液进行吸附,前期流出的被吸附发酵液为无色透明液体,吸附了大约2 L以后,颜色开始变为浅黄色(表7),随后颜色逐渐加深,慢慢接近发酵絮凝液的颜色,但始终要比发酵絮凝液的颜色浅的多。

在对FPC22H上吸附的活性物质进行洗脱时,由于洗脱液拥有非常明显的颜色变化,只有颜色较重的洗脱液才有抑菌活性,因此很容易根据颜色来判断洗脱终点。洗脱液洗至无颜色即可停止洗脱。

表7 经串联大孔树脂吸附后的发酵絮凝液颜色

Table 7 The colour of fermentation broth after absorption by tandem D101 and XAD 7HP

吸附后流出树脂的体积 Elution volume (mL)	颜色 Color
500	--
1000	--
1500	--
2000	--
2500	+
3000	++
3500	+++
4000	++++
4500	++++
5000	++++
原絮凝液	++++++

注:表中使用“+”来表示液体的偏黄程度,使用“--”表示无色素。

Note: “+” indicated the degree of yellow, “--” indicated colorless.

## 2.4 粗提物的有机溶剂处理

由表8可知,用于处理样品的有机溶剂中,只有甲醇能够部分溶解活性物质,但操作麻烦且效率低下,因此不宜采用有机溶剂处理的方法进一步提取分离活性物质。但是从这个实验结果可以看出,该活性物质极性较大,很难溶于有机溶剂中。

表8 粗提物有机溶剂处理后的活性

Table 8 The inhibitory activity of crude extract of *P. algorifonticola* broth after treated by organic solvent

有机溶剂 Organic solvent	有机溶剂溶解部分 Solute in organic solvent			水溶部分 Solute in water	
	颜色 Color	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter (mm)	颜色 Color	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter (mm)	
甲醇 Methanol	淡黄色 Faint yellow	16.5	浅棕色 Light brown	13.5	
乙醇 Ethanol	无色 Colorless	0	Brown	16.0	
丙酮 Acetone	无色 Colorless	0	Brown	17.0	

乙腈 Acetonitrile	无色 Colorless	0	Brown	15. 5
乙酸乙酯 Ethyl acetate	无色 Colorless	0	Brown	15. 5
氯仿 Chloroform	无色 Colorless	0	Brown	16. 0
正丁醇 n-butyl alcohol	无色 Colorless	0	Brown	16. 0

### 3 讨论

本文主要探索了使用大孔树脂和离子交换树脂对 *P. algorifonticola* 发酵液中抑菌活性物质的粗提工艺。

絮凝后的发酵液用大孔树脂进行脱色处理: 使用 D101 和 XAD7HP, 无需调整发酵液的 pH 直接上柱即可去除大部分色素, 然后使用发酵液体积一半的水就能够把树脂上残留的活性物质全部洗脱下来。吸附能力为: 每 10 g D101 可以吸附 200 mL 的发酵液中的色素, 而每 10 g XAD7HP 可以吸附 100 mL 发酵液中的色素。实际应用过程中, 可以将两种树脂与发酵液的比例定为 10 g : 100 mL, 并且可以将两种大孔树脂串联使用(先 D101 后 XAD7HP)。

选择强酸性阳离子交换树脂 FPC22H 进一步分离提纯, 直接将大孔树脂中流出的液体上样至 FPC22H 中, 吸附完毕后使用 0.5 mol/L 的氨水洗脱, 减压蒸除溶液中的氨以后即得活性物质粗提液。FPC22H 的吸附能力为: 每 10 g FPC22H 可以吸附 120 mL 的发酵液中的活性物质。

微生物代谢产物的水溶性物质的分离是一个难点。本文综合运用大孔树脂脱色和离子交换对 *P.*

*algorifonticola* 发酵液中抗白色念珠菌的水溶性物质进行了分离, 这为后期分离纯化单体化合物提供了基础。

### 参考文献

- 1 Tang QY, Yang N, Wang J, et al. *Paenibacillus algorifonticola* sp. nov., isolated from a cold spring. *Int J Syst Evol Micr*, 2011, 61:2167-2172.
- 2 Liang XQ(梁雪琴). Purification of pyrimidine nucleoside antibiotics and their antifungal activity. Hangzhou: Zhejiang University(浙江大学), MSc. 2010.
- 3 Lin QX(林亲雄), Xi T(奚涛), Liu CH(刘纯慧), et al. Preliminary research of bioactive metabolite produced by marine actinomycetes M326. *Chin J Marine Drugs*(中国海洋药物), 2006, 25:44-47.
- 4 Yang ZZ(杨臻峰), Xing YY(邢莹莹), Xi T(奚涛), et al. Preliminary study on the antibiotic active metabolites produced by marine actinomycetes M324. *Pharm Biotechnol*(药物生物技术), 2008, 15:375-379.
- 5 Liu QY(刘全永), Hu JC(胡江春), Xue DL(薛德林), et al. Study on fermentation conditions and characteristics of bioactive substance producing marine bacterium LU-B02. *J Microbiol*(微生物学杂志), 2001, 21:10-12.