

文章编号:1001-6880(2015)7-1176-06

类芽孢杆菌 BD3526 抑菌活性物质的初步分离及性质测定

刘玉娟^{1,2}, 韩 璞¹, 吴 江¹, 刘振民¹, 郭本恒¹, 吴正钧^{1*}¹乳业生物技术国家重点实验室 光明乳业股份有限公司, 上海 200436; ²上海海洋大学食品学院, 上海 201306

摘要:本实验以一株类芽孢杆菌 BD3526 为研究对象,采用丙酮浸提菌体得到抑菌活性粗品,通过 Sephadex LH-20 对样品进行初步纯化,结果表明粗品对藤黄微球菌 CGMCC1. 1848 的最低抑菌浓度(MIC)为 12.5 mg/mL,对金黄色葡萄球菌 CGMCC1. 879 和单增李斯特菌 CGMCC1. 9136 的 MIC 为 25 mg/mL;Sephadex LH-20 纯化样品对藤黄微球 CGMCC1. 1848 的 MIC 为 1 mg/mL,对金黄色葡萄球菌 CGMCC1. 879 和单增李斯特菌 CGMCC1. 9136 的 MIC 为 2 mg/mL。样品经链霉蛋白酶处理后,活性基本消失。经加热、酸碱、胰蛋白酶、胃蛋白酶、脂肪酶、蛋白酶 K 处理后,活性没有明显变化。因此,类芽孢杆菌 BD3526 产生的是一种细菌素类的抑菌物质,该抑菌物质在食品和医疗行业有广阔的应用前景。

关键词:类芽孢杆菌;抑菌活性;分离纯化;最低抑菌浓度

中图分类号:Q939.92

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.07.010

Purification and Characterization of Antimicrobial Components Produced by *Paenibacillus* sp. Strain BD3526

LIU Yu-juan^{1,2}, HAN Jin¹, WU Jiang¹, LIU Zhen-min¹, GUO Ben-heng¹, WU Zheng-jun^{1*}¹State Key Laboratory of Dairy Biotechnology, Bright Dairy & Foods Co. Ltd., Shanghai 200436, China;²College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: The antibacterial activity of a novel bacterial strain, identified as *Paenibacillus* sp. BD3526, was assayed. The antimicrobial component was extracted from *Paenibacillus* sp. BD3526 cells with acetone and purified on Sephadex LH-20 column. The minimum inhibitory concentrations of the crude extracts were 12.5 mg/mL for *Micrococcus luteus* CGMCC1. 1848, 25 mg/mL for *Staphylococcus aureus* CGMCC1. 879 and *Listeria monocytogenes* CGMCC1. 9136, while the minimum inhibitory concentrations of the preliminarily purified fraction were 1 mg/mL for *Micrococcus luteus* CGMCC1. 1848, 2 mg/mL for *Staphylococcus aureus* CGMCC1. 879 and *Listeria monocytogenes* CGMCC1. 9136, respectively. The antimicrobial activity was fairly stable over a wide range of pH values, different heat treatments, but disappeared after digestion by pronase. Therefore, the antimicrobial agent produced by *Paenibacillus* sp. BD3526 is bacteriocin-like, and potentially useful in food and medical industry.

Key words: *Paenibacillus* sp.; antimicrobial activity; isolation and purification; minimum inhibitory concentration

类芽孢杆菌属(*Paenibacillus* sp.)细菌是广泛存在于自然界,好氧或兼性厌氧、产生抗逆性内孢子的杆状细菌,其生理特性丰富多样,是土壤和植物微生态优势种群之一。类芽孢杆菌原属于芽孢杆菌属,1994 年 Ash 等^[1]基于分子生物学的研究结果,将其从芽孢杆菌属中独立出来,成立类芽孢杆菌属。类芽孢杆菌属的菌株在生长过程中,能产生耐热抗逆的芽孢,有利于其在环境中存活、定殖与繁殖,在

产品开发中因较非芽孢杆菌属细菌有效活菌数量高、性能稳定等优势而备受瞩目,是芽孢杆菌中比较具有应用潜力的菌种之一^[2]。其中某些菌株也是重要的植物生防细菌和植物根际促生菌,并且在农业领域已得到广泛的应用^[3]。

类芽孢杆菌中的某些菌株,在代谢过程中可产生如多糖、酶、拮抗蛋白、抗生素、植物激素、絮凝剂等多种生物活性物质^[4],这些活性物质在环境治理、植物病害防治以及畜牧业方面具有诱人的应用前景。在其产生的抑菌物质中,最主要的是多粘菌素(polymyxin),它是由多种氨基酸和脂肪酸组成的碱性脂肽类抗生素,有 A、B、C、D、E 五中类型,分子

量都在 1200 Da 左右,对 G⁻ 菌有明显抑制作用^[5]。目前研究较多的是多粘菌素 B,它除了对 G⁻ 菌有明显杀菌作用外,还能对其产生的内毒素有一定的抑制作用,但由于其本身的肾毒性和神经毒性,一度限制了它在临床上的应用^[6]。还有一类尚未统一命名,它们都含有一个稀有脂肪酸侧链,即 15-氨基-3-羟基十五烷酸(GHPD),这类物质主要包括 gatavalin,fusaricidins A、B、C、D 或 LI-F 系列抗生素^[7],分子量大都是 900 Da 左右,对白色念珠菌、酿酒酵母菌、黑曲霉、米曲霉、尖孢镰刀菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌等具有很好的拮抗作用。

本文对 *Paenibacillus* sp. BD3526 产生的类细菌素抗菌物质进行了研究,为今后该菌在医药、食品和饲料加工等领域的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种

本实验所用拮抗菌为 *Paenibacillus* sp. BD3526 (CGMCC 8333 = DSM 28815),是从西藏地区耗牛奶中分离得到。指示菌为金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) CGMCC1. 879,藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*) CGMCC1. 1848,单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*) CGMCC1. 9136,均由乳业生物技术国家重点实验室提供。

1.1.2 培养基

TYC 培养基(g/L;酪朊水解物 15 g,酵母抽提物 5 g,蔗糖 50 g,无水乙酸钠 20 g,NaCl 1 g,NaHCO₃ 2 g,无水 Na₂SO₄ 0. 1 g,L-胱氨酸 0. 2 g,Na₂HPO₄ · 12H₂O 2 g);营养肉汤(g/L;蛋白胨 10 g,牛肉膏 3 g,氯化钠 5 g),固体培养基加入 1.2% 的琼脂,培养基 121 ℃ 高压灭菌 15 min 后备用。

1.1.3 酶的品种及编号

胰蛋白酶(1800 U/mg,Sigma,CAS:9002-07-7),胃蛋白酶(427 U/mg,Sigma,CAS:9001-75-6),脂肪酶(400 U/mg,Sigma,CAS:9001-62-1),蛋白酶 K(30 U/mg,Sigma,CAS:39450-01-6),链霉蛋白酶(3. 5 U/mg,Sigma,CAS:9036-06-0)。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种的培养

拮抗菌株的培养:将预先保藏的菌种 BD3526 接种至 TYC 固体平板上,30 ℃ 培养 3 d,菌种活化两代备用。指示菌的培养:指示菌接种于 LB 固体平

板上,37 ℃ 培养 24 h,挑取单菌落于 15 mL 营养肉汤中,37 ℃,180 rpm,培养 20 h,菌液稀释备用。

1.2.2 抑菌活性的测定

采用点种法^[8]。培养好的指示菌菌液,与营养琼脂混合均匀,使最终指示菌浓度为 10⁵ cfu/mL,将培养基倒入平板中,待其表面水分蒸发完全后,吸取 10 μL 待测样品滴加在指示菌平板上,37 ℃ 培养 24 h,观察结果。根据抑菌圈的大小判断样品活性强弱。

1.2.3 MIC 的测定

最低抑菌浓度是衡量抑菌物质性能的一个关键指标。本实验采用倍半稀释法对待测样品进行稀释,将样品稀释到原溶液浓度的 1/2、1/4、1/8、1/16、1/32,分别滴加到指示菌平板上,观察抑菌圈的出现情况,能抑制培养基内指示菌生长的最低浓度则为该样品的 MIC 值^[9]。

1.2.4 抑菌率的测定

无菌 96 孔板中依次加入 50 μL 初步纯化样品、180 μL LB 培养基、20 μL 指示菌菌液,使最终样品孔中菌浓为 10⁵ cfu/mL,以无菌水代替样品作为对照。混匀后置于 37 ℃ 恒温培养箱中培养,每隔 1 h 用酶标仪(Spectra M5,Molecular Devices)测定 OD₆₀₀ 值^[10],共测量 18 h。抑菌率按下式计算:

$$\text{抑菌率} = \frac{A - A_1}{A} \times 100\%$$

式中,A 为对照组 OD₆₀₀ 值,A₁ 为样品组 OD₆₀₀ 值。

1.2.5 样品的纯化

将平板上菌体刮下,加入丙酮浸提 1 h,连续浸提 3 次,将 3 次浸提液合并,9000 rpm,10 min,4 ℃ 离心取上清,去除有机溶剂,真空冻干,得到含有抑菌活性物的粗品。冻干后的粗品用甲醇复溶配成浓度为 100 mg/mL 的溶液,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后,通过 Sephadex LH-20 分离,甲醇洗脱,流速为 0.6 mL/min,每 150 s 收集一管,共收集 2 个柱体积。分别检测各管抑菌活性,收集活性组分。

1.2.6 热稳定性测定

将初步纯化的样品用纯水配成 2 mg/mL 溶液,分别吸取 0.5 mL 样品,置于 50、60、70、80、90 ℃ 水浴中保温 2 h,沸水浴 15 min,121 ℃ 条件下处理 5 min,以未经热处理的样品作对照,检测抑菌活性。实验设三个平行,并比较组间差异性大小。

1.2.7 pH 适用范围的测定

称取初步纯化样品 0.5 mg, 分别溶解在 pH 3、pH 4、pH 5、pH 6、pH 7、pH 8、pH 9、pH 10 的磷酸盐缓冲溶液中, 配成浓度为 2 mg/mL 的溶液, 检测抑菌活性, 以 pH 7 样品作对照, 比较不同 pH 条件下抑菌圈大小。实验设三个平行, 取平均值比较差异性大小。

1.2.8 蛋白酶敏感性测定

4 mg/mL 样品溶液分别调节至各酶的最适 pH, 以 1:3 的比例将酶与样品溶液混合, 使酶最终浓度为 1 mg/mL, 将混合液在 37 °C 水浴中保温 2 h, 调节 pH 至中性, 以加入同等体积的磷酸盐缓冲溶液样品作为对照, 检测抑菌活性^[11]。

1.2.9 统计学分析

采用 SPSS 21.0 统计软件处理实验数据, 单因素方差分析进行显著性实验, 并用 LSD-t 进行组间差异性比较, $P < 0.05$ 表示差异显著具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 样品的纯化

微生物代谢产物大部分是分泌到周围环境中, 但也有少数物质是粘附在菌体表面^[12]。*Paenibacillus* sp. BD3526 在发酵过程中, 已经证实其产生的抑菌活性物质, 既粘附在菌体表面, 也分泌到周围环境中。实验初期阶段, 以菌体发酵液为研究对象, 对抑菌物质进行分离纯化, 由于在发酵过程中, 受温度、时间、通氧量等影响, 检测到抑菌活性不稳定。所以粗提物的制备直接选用菌体, 经有机溶剂浸提, 再减压去除溶剂后, 冷冻干燥, 得到抑菌活性物质粗品 C。

粗品 C 甲醇复溶通过 Sephadex LH-20 分离, 洗脱曲线见图 1, 其中第 72 管至 78 管, 即洗脱体积为

柱体积的 3/5 ~ 4/5 时, 活性组分流出。为了尽量减少杂质的带入, 获得较高纯度的目的物质, 选择 73、74、75、76、77 五管合并, 作为初步纯化后活性组分 P。

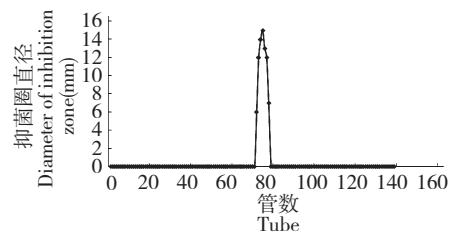


图 1 Sephadex LH-20 洗脱曲线

Fig. 1 Elution chromatogram of the antimicrobial components of BD3526 on Sephadex LH20

2.2 MIC 的测定

抑菌物质粗品 C 纯水复溶, 倍半稀释法配成以下浓度: 200、100、50、25、12.5、6.25 mg/mL; Sephadex LH-20 初步纯化后的抑菌物质活性组分 P 纯水复溶, 倍半稀释法配成以下浓度: 8、4、2、1、0.5、0.25 mg/mL, 以金黄色葡萄球菌 CGMCC1.879, 藤黄微球菌 CGMCC1.1848, 单增李斯特菌 CGMCC1.9136 为指示菌检测抑菌活性, 结果见表 1 和表 2。由表 1 和表 2 可知, 粗品浓度为 12.5 mg/mL, Sephadex LH-20 纯化样品浓度为 1 mg/mL 时, 藤黄微球菌 CGMCC1.1848 未有长出; 粗品浓度为 25 mg/mL, Sephadex LH-20 纯化样品浓度为 2 mg/mL 时, 金黄色葡萄球菌 CGMCC1.879 和单增李斯特菌 CGMCC1.9136 未有长出, 由此得出, 粗品对藤黄微球菌 CGMCC1.1848 的 MIC 是 12.5 mg/mL, 对金黄色葡萄球菌 CGMCC1.879 和单增李斯特菌 CGMCC1.9136 的 MIC 值为 25 mg/mL; Sephadex LH-20 纯化样品对藤黄微球菌 CGMCC1.1848 的 MIC 是 1 mg/mL, 对金黄色葡萄球菌 CGMCC1.879 和单增李斯特菌 CGMCC1.9136 的 MIC 值为 2 mg/mL。经过 Sephadex LH-20 分离, 样品的 MIC 值缩小了 12.5 倍, 表明样品得

表 1 粗品各浓度抑菌活性

Table 1 Antimicrobial activity of crude extracts with different concentrations

指示菌 Indicator bacteria	样品浓度 Concentration of crude extracts (mg/mL)					
	200	100	50	25	12.5	6.25
<i>M. luteus</i> CGMCC1.1848	-	-	-	-	-	+
<i>S. aureus</i> CGMCC1.879	-	-	-	-	+	+
<i>L. monocytogenes</i> CGMCC1.9136	-	-	-	-	+	+

注: “+”表示有菌长出, “-”表示未有菌长出。

Note: “+” bacteria grow, “-” no bacteria grow.

表 2 Sephadex LH-20 纯化样品各浓度抑菌活性

Table 2 Antimicrobial activity of purified fraction in different concentrations

指示菌 Indicator bacteria	样品浓度 Concentration of purified fraction (mg/mL)					
	8	4	2	1	0.5	0.25
<i>M. luteus</i> CGMCC1. 1848	-	-	-	-	+	+
<i>S. aureus</i> CGMCC1. 879	-	-	-	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i> CGMCC1. 9136	-	-	-	+	+	+

注:“+”表示有菌长出,“-”表示未有菌长出。

Note: “+” bacteria grow, “-” no bacteria grow.

到了有效的纯化。

同时,由以上数据可知,藤黄微球菌 CGMCC1. 1848 的 MIC 值明显低于金黄色葡萄球菌 CGMCC1. 879 和单增李斯特菌 CGMCC1. 9136 的 MIC 值,故在测定抑菌物质的性质时,选择敏感性较高的藤黄微球菌 CGMCC1. 1848 作为指示菌。

2.3 热稳定性测定

初步纯化样品 P 经不同温度处理后,样品抑菌圈直径平均值见图 2。经 SPSS 21.0 分析,组间比较,与未经热处理的样品相比,50、60、70、80、90、100、121 ℃ 处理后样品活性均没有显著性差异($P > 0.05$),结果表明该样品有良好的热稳定性。

2.4 pH 适用范围的测定

不同 pH 值条件下,样品抑菌圈直径平均值见表 3。选择 pH7 条件下抑菌圈直径做对照,以其他 pH 值条件下抑菌圈直径和其差值为纵坐标作图,结

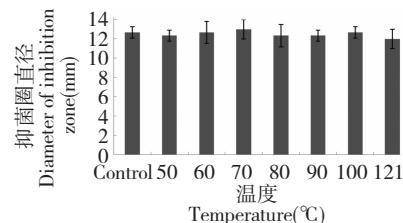


图 2 不同温度处理后样品抑菌圈直径

Fig. 2 Diameter of inhibition zone with different heat treatments

果见图 3,由图可知,在 pH 小于 7 的情况下,抑菌圈的直径随着酸性的增强而减小,表明在酸性条件下,抑菌活性会受到一定抑制,pH 在 7~9 范围内,抑菌圈直径增大,说明抑菌物质活性增强,pH 大于 9 时,与对照组相比,抑菌圈直径减小,活性有所减弱。由此可见,该抑菌活性物质在偏碱性条件下,抑菌作用最强。

表 3 不同 pH 条件下样品抑菌圈直径

Table 3 Inhibition diameter with different pH values

指标 Indices	不同 pH 值 pH values							
	3	4	5	6	7	8	9	10
抑菌圈直径 Inhibition Diameter (mm)	10.0	10.3	10.7	11.0	11.3	12.3	12.0	11.0

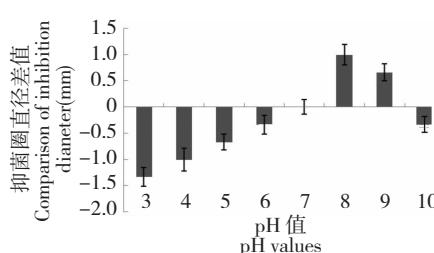


图 3 不同 pH 条件下抑菌圈直径的比较

Fig. 3 Comparison of inhibition diameter with different pH values

2.5 蛋白酶敏感性测定

初步纯化样品 P,经不同酶处理后各样品活性见下图,由图 4 可知,样品经胰蛋白酶、胃蛋白酶、脂肪酶、蛋白酶 K 处理后,活性没有明显变化,而经链霉蛋白酶处理后,活性基本消失。依据上述结果,进一步分析初步纯化样品 P 在液体培养状态下,对藤黄微球菌 CGMCC1. 1848 的抑菌作用,结果见图 5。在 1 mg/mL 浓度下,初步纯化样品 P 经链霉蛋白酶处理后,抑菌活性明显下降,在 0~18 h 内,未经酶

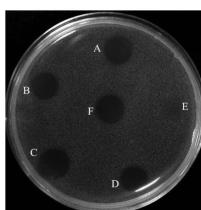


图 4 胰蛋白酶(A)、胃蛋白酶(B)、脂肪酶(C)、蛋白酶K(D)、链霉蛋白酶(E)处理后样品及对照组(F)的抑菌活性

Fig. 4 Antimicrobial activities of control (F) and samples digested by trypsin (A), pepsin (B), lipase (C), protease K (D), pronase (E)

处理的初步纯化样品 P 对藤黄微球菌 CGMCC1.1848 的最高抑菌率为 90.43%，而经链霉蛋白酶处理后样品最高抑菌率为 17.45%。与链霉蛋白酶相比，其它酶类作用专一性强，有特异性水解位点，而链霉蛋白酶是一种肽酶，对作用位点肽键的氨基酸组成没有特定的选择性，结果表明活性组分可能是肽类物质。

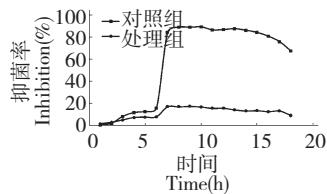


图 5 链霉蛋白酶处理前后样品抑菌率

Fig. 5 Inhibition rate of samples before and after digestion by pronase

3 结论

本实验以一株类芽孢杆菌 BD3526 为研究对象，采用有机溶剂浸提菌体的方法，分离得到对 G⁺ 菌有明显抑制作用的活性组分，并对其进行了初步的性质测定。经不同温度处理后，样品活性基本保持不变。酸碱适用范围实验表明，样品在酸性条件下，活性会受到些许抑制，在中性偏碱条件下，样品活性最高。样品经链霉蛋白酶处理后活性基本消失，表明该活性物质可能是肽类物质，这与文献报道基本一致^[13,14]。

鉴于微生物在发酵过程中，受到影响因素较多，活性不稳定等问题，抑菌物质的提取可以以菌体作为介质，直接破碎细胞得到。经过实验证，以菌体为介质，重现性较好，但样品组分较为复杂，为分离

纯化增加了困难。本实验主要采用了凝胶层析获得了初步纯化的样品，但若想得到纯度较高的样品，作进一步的结构分析，则还需对样品进行纯化。

目前，乳酸链球菌素(Nisin)是唯一被批准应用在食品中的细菌素^[15]，但其抑菌谱较窄，只对 G⁺ 菌和部分芽孢菌有抑制作用，对 G⁻ 菌没有作用，而且 Nisin 只有在低酸条件下，才能发挥作用，在中性及偏碱性条件下，几乎全部失活^[16]。本实验所用供试菌株 BD3526，是从西藏耗牛奶中分离得到，该菌在血平板上未见溶血(数据未公开)，同时，目前已有多株类芽孢作为益生菌在医药和畜牧养殖上应用，保证了菌种的安全性。因此，在食品、医药、环境工程等方面具有很高的应用潜力。

参考文献

- Piuri M, Sanchez RC, Ruzal SM. A novel antimicrobial activity of a *Paenibacillus polymyxa* strain isolated from regional fermented sausages. *Lett Appl Microbiol*, 1998, 27: 9-13.
- Wang ZW (王智文), Yuan ST (袁士涛), He L (何亮), et al. Extraction and properties of antifungal active substances produced by *Paenibacillus polymyxa* Cp-S316. *J Agro-Environ Sci* (农业环境科学学报), 2007, 26: 1464-1468.
- Zhao S (赵爽), Liu WC (刘伟成), Qiu JY (裘季燕), et al. Research progress of antimicrobial compounds and disease resistant mechanism of *Paenibacillus polymyxa*. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), 2008, 7: 347-350.
- Yang SB (杨少波), Liu XL (刘训理). Research advances in *Paenibacillus polymyxa* and their bioactive Substances. *Microbiol China* (微生物学通报), 2008, 35: 1621-1625.
- Deng Y, Lu Z, Bi H, et al. Isolation and characterization of peptide antibiotics LI-F04 and polymyxin B6 produced by *Paenibacillus polymyxa* strain JSa-9. *Peptides*, 2011, 32: 1917-1923.
- Fortes TO, Alviano DS, Tupin MG, et al. Production of an antimicrobial substance against *Cryptococcus neoformans* by *Paenibacillus brasiliensis* Sa3 isolated from the rhizosphere of *Kalanchoe brasiliensis*. *Microbiol Res*, 2008, 163: 200-207.
- Raza W, Hong SW, Qirong S. Use of response surface methodology to evaluate the effect of metal ions (Ca²⁺, Ni²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺) on production of antifungal compounds by *Paenibacillus polymyxa*. *Biores Technol*, 2010, 101: 1904-1912.
- Maldo NA, Jimenes ZR, Ruizbarba JL. Induction of plantaricin production in *Lactobacillus plantarum* NC8 after coculture with specific Gram-positive bacteria is mediated by an auto-induction mechanism. *J Bacteriol*, 2004, 186: 1556-1564.

(下转第 1209 页)