

一种芽孢杆菌广谱细菌素的分离纯化及其性质研究*

张海林 刘占燕 张梦宇 谭可心 张礼丛 张玉然[△]

(济宁医学院生物科学学院,日照 276826)

摘要 **目的** 筛选产细菌素的芽孢杆菌,研究纯化后的细菌素的性质。**方法** 首先采用双层琼脂牛津杯法,从高温酒曲中筛选产细菌素的芽孢杆菌;然后利用加热法、pH 沉淀法、盐析法等纯化细菌素;最后使用不同 pH、温度、蛋白酶等条件处理细菌素,测定抑菌活性,分析其 pH 稳定性、热稳定性、抗酶解性及抗菌谱特性。**结果** 分离得到一株产细菌素的芽孢杆菌菌株 PL-2,经 16S rDNA 序列比对鉴定为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)。纯化后的细菌素,在 Tricine-SDS-PAGE 电泳中得到的单一条带,分子量约为 10kDa。该细菌素在 pH 2.0~14.0 处理 4h,抑菌活力最大降幅为 5%;经 120℃ 保温 30min,抑菌活力仅降低 18%;能抵抗蛋白酶 K、胃蛋白酶等多种蛋白酶水解;对革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌、真菌均有较强的抑制能力。**结论** *Bacillus velezensis* PL-2 产生的细菌素具有优良的特性,可进一步开展其在食品加工、生物防治以及医疗领域等方面的应用研究。

关键词 细菌素;贝莱斯芽孢杆菌;抗酶解

中图分类号:TS201.3 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2020)10-321-05

Purification and characterization of broad-spectrum bacteriocin from *Bacillus*

ZHANG Hailin, LIU Zhanyan, ZHANG Mengyu, TAN Kexin, ZHANG Licong, ZHANG Yuran[△]

(College of Life Sciences, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

Abstract: Objective To screen the strain of *Bacillus* producing bacteriocin and research the characteristics of the purified bacteriocin. **Methods** First, a strain producing bacteriocin was screened from a high temperature koji by the method of Oxford cup double agar diffusion. Second, the bacteriocin was purified by thermal treatment, pH precipitation and salting-out method. Finally, stabilities of the purified bacteriocin were studied at different pH, temperatures and proteases. **Results** The screened strain producing bacteriocin was identified by the 16S rDNA sequence alignment and named as *Bacillus velezensis* PL-2. After purification, a single band with a molecular weight of ~10 kDa was obtained in the Tricine-SDS-PAGE electrophoresis. After treatment for 4 h at pH 2.0-14.0, the maximum reduction of bacteriocin activity was 5%. In addition, the reduction of bacteriocin activity was only 18% at 120℃ for 30 min. The bacteriocin had an ability of resisting the hydrolysis of protease K, pepsin and other proteases. It was a strong inhibitor on gram-negative bacteria, gram-positive bacteria and fungi. **Conclusion** The bacteriocin produced by *Bacillus velezensis* PL-2 has excellent characteristics and a potential application in the fields of food processing, biological control and medicine.

Keywords: Bacteriocin; *Bacillus velezensis* PL-2; Antiprotease

细菌素是一类由细菌核糖体编码合成,对同种亲缘的微生物具有高效抑制的一类多肽或前体多

肽^[1],绿色环保、安全高效,被视为抗生素的理想替代品。乳酸链球菌素(Nisin)是唯一通过 FDA/WHO 双认证,商业化应用于食品领域的细菌素。Nisin 在碱性条件下不稳定,以及仅能抑制革兰氏阳性菌,对革兰氏阴性菌和真菌等抑制作用效果较差^[2]等因素,限制了其应用范围。芽孢杆菌可以

* [基金项目] 山东省自然科学基金博士基金项目(ZR2017BC044);山东省中医药科技发展计划项目(2017-270)

[△] [通信作者] 张玉然, E-mail: todzhang666@163.com

代谢产生多种细菌素,与 Nisin 相比,大部分芽孢杆菌细菌素具有耐高温、耐酸碱、广谱抑菌的特性^[3-4],具有较高的应用前景。

本文拟从高温酒曲中筛选产细菌素的芽孢杆菌,研究其生物学特性,拟开发一种在食品、医药领域具有应用价值的细菌素。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

1.1.1 样品来源 高温酒曲,由山东梁山县儒匠酒曲有限公司提供。

1.1.2 菌株 指示菌:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* CMCC 26112)。实验菌:大肠杆菌(*Escherichia coli* ATCC25922),铜绿假单胞杆菌(*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853),白色念珠菌(*Candida albicans* ATCC14053),痢疾志贺氏菌(*Shigella dysenteriae* CMCC 51252),黑曲霉 ATCC16404。以上菌株均由济宁医学院生物科学实验中心提供。

1.1.3 主要仪器与试剂 全温叠加式摇床(天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司);PCR 仪(BIO-RAD 公司);电泳仪(北京六一公司);全自动免染凝胶成像分析系统(BIO-RAD 公司)。

LB 培养基(上海生工生物工程有限公司);细菌基因组 DNA 抽提试剂盒(北京天根生化科技有限公司);TaqDNA 聚合酶(北京宝日医生物技术有限公司);蛋白酶 K(北京索莱宝科技有限公司);胰蛋白酶(北京索莱宝科技有限公司);PageRuler 预染蛋白分子(上海赛默飞世尔科技有限公司);其它试剂均为日照国药分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 产细菌素芽孢杆菌的筛选 将 10ml 无菌水中加入 1g 高温酒曲,于 70℃ 保温 30min,取 5ml 悬浮液于 LB 培养基中,37℃、200rpm 振荡培养 24h。稀释适当倍数涂布于 LB 平板,于 37℃ 培养 24h。挑选单菌落菌株接种于 LB 培养基中,37℃、200rpm 振荡培养 24h。 8×10^3 rpm 离心去菌体,发酵上清液中缓慢加入固体硫酸铵,至其终浓度为 60%,并置于 4℃ 冰箱中隔夜处理,再经 1×10^4 rpm 离心 10min,获得盐析沉淀,并将其溶于原体积 1/50 的 0.02mol/L pH 7.0 磷酸钠缓冲液中,制成细菌素溶液,进行抑菌活性测定。

1.2.2 产细菌素芽孢杆菌的种属鉴定 参考文献

方法^[5-6],以细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取的菌株基因组 DNA 为模板,采用 16S 区通用引物 27F/1492R,进行 PCR 扩增。PCR 体系:细菌基因组 DNA 提取物 0.5μl,10×PCR 缓冲液 2.5μl, dNTP Mixture 2μl,引物 27F/1492R 对各 1μl, TaqDNA 聚合酶 0.5μl,补无菌水至 25μl。PCR 反应条件:94℃ 预变性 3min;94℃ 变性 45s,53℃ 退火 45s,72℃ 延伸 90s,循环扩增 34 个循环;72℃ 延伸 7min;PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳验证后,送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序,将测得的 16S rDNA 基因序列在 NCBI 网站上进行同源性比对,鉴定菌株种属。

1.2.3 细菌素的分离纯化 将发酵液加热至 100℃,保温 5min, 1×10^4 rpm 离心 10min,留上清,调节 pH 为 2.0 使蛋白絮凝沉淀, 1×10^4 rpm 离心 10min。将获得的蛋白沉淀溶于原体积 1/50 的 0.02mol/L pH 7.0 磷酸钠盐缓冲液中,而后加入固体硫酸铵,至其终浓度为 8%,4℃ 冰箱静置 2h, 1×10^4 rpm 离心 10min,将获得的蛋白沉淀溶于等体积 0.02mol/L pH 7.0 磷酸钠缓冲液中。重复上述盐析步骤 2 次,将得到的细菌素溶液按 1.3.2 中 Tricine-SDS-PAGE 方法进行电泳。

1.2.4 细菌素对 pH、温度、蛋白酶耐受性的测定

将纯化的细菌素溶液 pH 分别调节为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0、13.0、14.0,然后置于 37℃ 处理 4h,再将 pH 调至 7.0,按 1.3.1 方法测定抑菌活性。

将纯化的细菌素溶液,分别置于 40℃、50℃、60℃、70℃、80℃、90℃、100℃ 条件下处理 30min,以及 100℃、110℃、120℃ 分别处理 10min、20min、30min,按 1.3.1 方法测定抑菌活性。

向 0.2ml 纯化的细菌素溶液中(预先调整至各个酶的最适合 pH,胃蛋白酶样品 pH 2.5),分别加入 0.05ml 浓度为 5mg/ml 的蛋白酶溶液(胃蛋白酶、酸性蛋白酶、碱性蛋白酶、胰蛋白酶),然后置于 37℃ 处理 6h,再将 pH 调至 7.0,按 1.3.1 方法测定抑菌活性。以未加蛋白酶处理的样品为对照。

1.3 检测方法

1.3.1 细菌素抗菌活性的测定 采用双层琼脂牛津杯法^[7],指示菌(金黄色葡萄球菌)菌浓为 1×10^6 CFU/mL。通过测定抑菌圈直径大小(mm),表观细菌素抑菌活性。

1.3.2 凝胶原位电泳活性检测 参考 Schagger 的 Tricine-SDS-PAGE 方法^[8],在凝胶两侧平行上样,电泳结束后,将凝胶一分为二。一半用于染色,另一半置于 1% Triton X-100 溶液中,振荡 20min,并水洗 2 次,去除凝胶中 SDS,再以 0.1mol/L pH 7.0 磷酸钠缓冲液浸泡平衡 10min,然后转移至无菌培养皿中,加入 20ml 含指示菌(菌浓为 1×10^6)LB 培养基(含 0.7% 琼脂,45℃),待其完全凝固后,于 37℃ 培养 24h,观察抑菌圈位置。

2 结果和讨论

2.1 菌株的鉴定

从高温酒曲中分离得到一株芽孢杆菌 PL-2,其发酵液经 60% 硫酸铵盐析得到的蛋白质溶液,经双层琼脂牛津杯法检测,可显著抑制指示菌生长。PL-2 菌株 16S rDNA 序列比对结果见表 1。

表 1 基于菌株 PL-2 16S rDNA 序列的比对分析

菌株名称	相似度/%
PL-2	100
Bacillus velezensis strain SRCM102747	100
Bacillus velezensis strain LPL-K103	100
Bacillus velezensis strain LB002	100
Bacillus velezensis strain L-1	100
Bacillus velezensis strain TB1501	100
Bacillus velezensis strain DB-1	100
Bacillus velezensis strain HAB-2	100

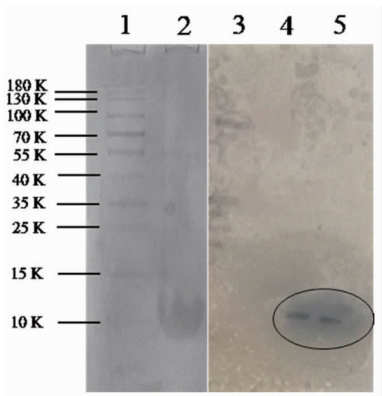
经 16S rDNA 序列比对,LP-2 菌株鉴定为 *Bacillus velezensis*,命名为 *Bacillus velezensis* PL-2。

2.2 细菌素的纯化及活性鉴定

经高温煮沸、pH 沉淀、盐析等步骤,得到纯度较高的蛋白质溶液,然后利用 Tricine-SDS-PAGE 电泳以及凝胶原位电泳抑菌活性检测方法,检测其纯度和抑菌活性。与 Tricine-SDS-PAGE 电泳条带相对应的位置处出现指示菌抑菌圈,证明该条带蛋白具有抑菌能力,可初步确定 *Bacillus. velezensis* PL-2 产生的抑菌物质为细菌素(蛋白类物质),分子量约 10kDa,而非有机酸、过氧化氢等。*B. velezensis* PL-2 发酵液只需经过简单的纯化步骤,即可获得纯度较高的细菌素,有利于后续规模化提取。见图 1。

2.3 细菌素的 pH 稳定性

分别调整细菌素溶液 pH 并于 37℃ 条件下维持 4h,采用双层琼脂牛津杯法,分析其抑菌活性的变化。在 pH 3.0~14.0 范围内,抑菌活性变化均很小,最大降幅为 5%。当 pH 为 2.0 时,细菌素发生絮凝沉淀,但沉淀复溶后仍能完全保留其抑菌活性。*B. velezensis* PL-2 生产的细菌素具有宽泛的 pH 耐受性。见图 2。



注:泳道,1,3-marker,2,4,5-纯化的细菌素
 图 1 细菌素的 Tricine-SDS-PAGE 电泳图和凝胶原位电泳抑菌活性检测图

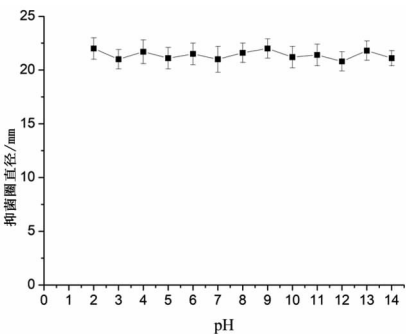


图 2 细菌素的 pH 稳定性

2.4 细菌素的热稳定性

pH 7.0 条件下,分别以不同温度对细菌素进行处理,分析其抑菌活性的变化。分别以 30℃~100℃ 温度处理细菌素溶液,其抑菌活性基本维持不变;110℃、120℃ 处理 30min,均未见蛋白絮凝析出,其抑菌活性仅分别降低 10% 和 18%。*B. velezensis* PL-2 生产的细菌素具有很强的温度耐受性,为其在食品、医药等领域的应用奠定基础。见图 3。

2.5 细菌素的蛋白酶稳定性

分别以不同的蛋白酶处理细菌素,以未加蛋白

酶的细菌素样品为空白对照,分析蛋白酶对其抑菌活性的影响。目前报道的细菌素中,大部分因不能抵抗蛋白酶 K、胃蛋白酶的降解而丧失抑菌活性,而 *B. velezensis* PL-2 产的细菌素均能抵御蛋白酶 K、胃蛋白酶等 5 种蛋白酶的水解,保持较高的抑菌活性。因其具有较强的蛋白酶稳定性,可初步判断为一种抗酶解细菌素。见图 4。

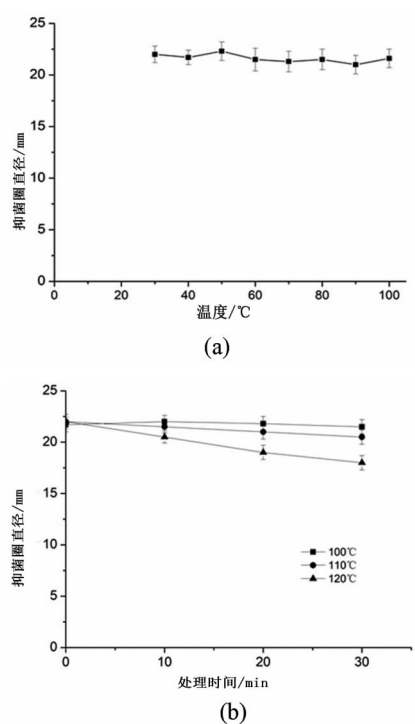


图 3 细菌素的热稳定性

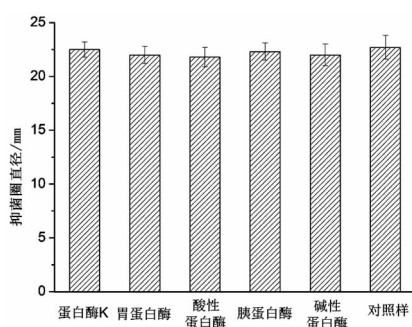


图 4 细菌素的蛋白酶稳定性

2.6 细菌素的抑菌菌谱

采用双层琼脂牛津杯法,分析 *B. velezensis* PL-2 生产的细菌素对不同菌属菌株的抑制活性。*B. velezensis* PL-2 生产的细菌素具有广谱抑菌特性,即可抑制革兰氏阴性菌,也可抑制革兰氏阳性菌,对真菌(白色念珠菌、黑曲霉)也具有较强抑制活性,但对大肠杆菌没有抑制作用,有待进一步研究。

见表 2。

表 2 细菌素抑菌菌谱

指示菌	抑制活性	菌属类别
金黄色葡萄球菌	+++	革兰氏阳性菌
大肠杆菌	-	革兰氏阴性菌
铜绿假单胞杆菌	+++	革兰氏阴性菌
痢疾志贺氏菌	+++	革兰氏阴性菌
白色念珠菌	+++	真菌-酵母
黑曲霉	++	真菌

注: +表示有抑制; -表示无抑制

3 结论

B. velezensis 是芽孢杆菌属一个新种,直至 2005 年才被报道和正式命名,但其在抑制病原菌和生物防治方面具有显著的优点,已成为关注的焦点。本文中 *B. velezensis* PL-2 菌株产生的细菌素分子量约为 10kDa,具有贝莱斯芽孢杆菌细菌素共有特性(广谱抗菌特性)。相对于文献报道的 *B. velezensis* 菌株产生的细菌素^[9-10],该细菌素具有较强的热稳定,可耐受 100℃ 高温,即使在 120℃ 高温下处理 30min,其抑菌活性也仅降低 18%。此外,该细菌素既可耐受强酸环境,也可耐受强碱的环境,宽泛的 pH 耐受性也优于目前文献报道的贝莱斯芽孢杆菌细菌素。后续可对该细菌素的生理毒性进行研究,开发其在食品加工、生物医药领域的应用。

志谢:在研究过程中,山东梁山县儒匠酒曲有限公司提供高温酒曲,济宁医学院生物科学实验中心提供实验场所及相关设备,保障了本研究的顺利进行,特此表示感谢。

参考文献:

- [1] Cotter PD, Ross RP, Hill C, et al. Bacteriocin production: a probiotic trait? [J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 78(1): 1-6. DOI: 10.1128/AEM.05576-11.
- [2] Ahmad V, Khan MS, Jamal, et al. Antimicrobial potential of bacteriocins; in therapy, agriculture and food preservation [J]. Int J Antimicrob Agents, 2017, 49(1): 1-11. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2016.08.016.
- [3] 贾丽艳,郝林,段先瑶. 枯草芽孢杆菌 HJD. A32 产细菌素的生物学特性研究 [J]. 中国食品学报, 2013, 13(4): 74-79.
- [4] Lee SG, Chang HC. Purification and characterization of

- mejucin, a new bacteriocin produced by *Bacillus subtilis* SN7[J]. LWT, 2018, 87: 8-15. DOI: 10. 1016/ j. lwt. 2017. 08. 044.
- [5] 钱鑫磊, 周珊珊, 张冬乐, 等. 梨树胶孢炭疽病生防菌筛选及其抑菌活性初步评价[J]. 生物学通报, 2017, 52(12): 54-57.
- [6] 张玉然, 李文平, 郭兰英, 等. 2 株酒用酵母的分子鉴定及耐受性研究[J]. 济宁医学院学报, 2016, 39(6): 387-390. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-9760. 2016. 06. 002.
- [7] 赵玲艳, 邓放明, 杨细平, 等. 生物防腐剂—乳酸菌素[J]. 中国食物与营养, 2005(2): 27-29. DOI: 10. 3969/j. issn. 1006-9577. 2005. 02. 009.
- [8] Schagger H, Jagow GV. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa[J]. Anal Biochem, 1987, 166(2): 368-379. DOI: 10. 1016/0003-2697(87)90587-2.
- [9] Perumal V, Yao Z, Kim JA, et al. Purification and characterization of a bacteriocin, BacBS2, produced by *Bacillus velezensis* BS2 isolated from Meong-ge Jeotgal[J]. J Microbiol Biotechnol, 2019, 29(7): 1033-1042. DOI: 10. 4014/jmb. 1903. 03065.
- [10] Ye M, Tang X, Yang R, et al. Characteristics and application of a novel species of *Bacillus*: *Bacillus velezensis* [J]. ACS Chem Biol, 2018, 13(3): 500-505. DOI: 10. 1021/acscchembio. 7b00874.

(收稿日期 2020-07-09)

(本文编辑:石俊强)

(上接第 320 页)展历史上占有重要位置。

金元时期河北籍医家针灸临床学术思想及其特点对针灸学的发展有着极其深远的影响,深入研究金元时期河北籍医家针灸的学术思想和临床应用经验,可不断促进当代针灸学术思想的传承和创新发展。

参考文献:

- [1] 李成文. 宋金元时期中医学发展创新因素研究[D]. 郑州:河南中医药大学;河南中医学院, 2007.
- [2] 陈霏璇, 莫炜维. 窦汉卿与《标幽赋》要文刍议[J]. 环球中医药, 2019, 12(7): 1064-1066. DOI: 10. 3969/j. issn. 1674-1749. 2019. 07. 020.
- [3] 袁青, 靳瑞. 脾胃学说与针灸论治[J]. 中医药通报, 2004, 3(5): 5-9. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-2749. 2004. 05. 002.
- [4] 谭高峰. 李东垣《脾胃论》的学术思想[J]. 中国社区医师, 2014(31): 71-71, 73. DOI: 10. 3969/j. issn. 1007-614x. 2014. 31. 44.
- [5] 白建英, 张秀芬, 杨贵真, 等. 李东垣《脾胃论》“阴火”理论探讨[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(10): 4586-4588.
- [6] 李文华, 江涛, 刘桂荣. 议罗天益论治脾胃之特点[J]. 中国医药导报, 2011, 8(9): 89-90. DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-7210. 2011. 09. 043.
- [7] 孙钰, 王雨, 张钰欣, 等. 罗天益对东垣脾胃内伤理论的创新与临证应用[J]. 陕西中医, 2019, 40(6): 784-786. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-7369. 2019. 06. 029.
- [8] 郭太品, 刘自力. 古代刺络理论的历史演变[J]. 中国中医基础医学杂志, 2017, 23(8): 1126-1128.
- [9] 王聪, 于冰, 张永臣. 李东垣对刺络放血法的贡献[J]. 长春中医药大学学报, 2016, 32(3): 441-443. DOI: 10. 13463/j. cnki. cczyy. 2016. 03. 001.
- [10] 宋金元时期轻灸重针转折因素浅析[J]. 中国针灸, 2009, 29(9): 759-762.
- [11] 张弘, 秦玉龙. 罗天益灸药并用治验[J]. 江西中医药, 2009, 40(5): 19-20. DOI: 10. 3969/j. issn. 0411-9584. 2009. 05. 010.
- [12] 殷振瑾, 郭长青. 从《卫生宝鉴》一书探讨罗天益的针药并用思想[J]. 云南中医中药杂志, 2008, 29(4): 2-4. DOI: 10. 3969/j. issn. 1007-2349. 2008. 04. 002.

(收稿日期 2020-08-31)

(本文编辑:石俊强)