

文章编号:1001-5132(2007)04-0451-04

海洋放线菌 XS904 活性代谢产物的初步研究

楼乔明, 杨文鸽*, 竺巧玲, 孙爱飞

(宁波大学 生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 对海洋放线菌 XS904 活性代谢产物理化性质进行初步研究. 以枯草杆菌为指示菌, 以抑菌活性为指标, 测定发酵液最小抑菌浓度; 用不同温度、pH 处理, 了解活性物质的稳定性; 用有机溶剂对活性物质萃取和溶解, 并用纸层析对活性物质进行初步分类. 发酵液抗菌物质的最小抑菌浓度为 0.78%, 对温度敏感, 在酸性和中性条件下稳定, 可被三氯甲烷萃取, 能溶于水、甲醇、乙醇、丙酮、乙醚, 经纸层析初步鉴定为一类碱性抗生素.

关键词: 海洋放线菌; XS904; 活性代谢产物; 抑菌活性

中图分类号: Q939.13⁺²

文献标识码: A

由于海洋环境的特殊性, 海洋微生物表现出生物多样性和代谢多样性, 丰富的代谢产物为新药的开 发研究提供巨大潜力和发展前景, 因此从海洋微生物资源中寻找新型微生物药物将成为研究的必然趋势^[1-3].

本文以枯草杆菌为指示菌, 以抑菌活性为指标, 对筛选到的海洋放线菌 XS904 的发酵产物进行最小抑菌浓度、理化性质等的初步研究, 旨为海洋放线菌的开发利用提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 XS904 菌株和供试细菌

从宁波海域滩涂海泥中分离得到海洋放线菌. 供试细菌——枯草杆菌 *Bacillus subtilis*, 由本院微生物实验室提供.

1.2 培养基^[4]

牛肉膏蛋白胨琼脂培养基.

改良高氏一号培养基: 20 g 可溶性淀粉, 1 g KNO₃, 0.5 g NaCl, 0.5 g K₂HPO₄, 0.5 g MgSO₄, 0.01 g FeSO₄, 15~20 g 琼脂, 30 g 海水晶, 1 000 mL 蒸馏水, pH 7.2~7.4, 121 °C 灭菌 20 min.

黄豆粉培养基: 20 g 可溶性淀粉, 15 g 黄豆粉, 5 g 葡萄糖, 2.5 g 酵母膏, 1 g CaCO₃, 30 g 海水晶, 1 000 mL 蒸馏水, pH 7.5~8.0, 121 °C 灭菌 20 min.

1.3 XS904 菌株发酵及发酵液预处理

菌种经斜面活化后, 将孢子用无菌水洗下, 孢子悬液接种于黄豆粉培养基, 28 °C, 160 rpm 摇床培养 5 d; 发酵结束后经减压抽滤, 上清液于 -20 °C 保存备用.

1.4 指示菌悬液的制备

将供试枯草杆菌斜面用无菌水洗下菌苔, 倒入

收稿日期: 2007-05-16.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://3xb.nbu.edu.cn>

基金项目: 浙江省自然科学基金(402038).

作者简介: 楼乔明(1981-), 男, 浙江宁波人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 海洋生物活性物质. E-mail: louqm2005@163.com

通讯作者: 杨文鸽(1965-), 女, 浙江宁波人, 博士/教授, 主要研究方向: 食品化学. E-mail: yangwenge@nbu.edu.cn

锥形瓶,振荡使菌体分散均匀,调节浓度 $OD_{560} = 0.2$,即成菌悬液,浓度约为 $3.8 \times 10^7 CFU \cdot mL^{-1}$ 。

1.5 发酵液抑菌活性测定

抑菌圈直径测定:采用滤纸片法^[5],将 $\Phi 6$ mm 无菌滤纸片,加入 $5 \mu L$ 发酵液,贴于带菌培养基上,以黄豆粉培养基作对照,细菌 $37^\circ C$ 培养1 d,真菌 $37^\circ C$ 培养2 d,用十字交叉法测量抑菌圈直径。

最小抑菌浓度测定^[6-8]:以原发酵液浓度作为100%,用3%海水晶溶液进行倍比稀释2、4、8、16、32倍后的浓度分别为50%、25%、12.5%、6.25%、3.13%,依次类推。用滤纸片法测定不同浓度发酵液的抑菌情况。

发酵液抑菌活性物质对温度和pH的稳定性测定^[9]:取发酵液30 mL分别在 $30^\circ C$, $40^\circ C$, $50^\circ C$, $60^\circ C$, $70^\circ C$, $80^\circ C$, $90^\circ C$, $100^\circ C$ 水浴中放置30 min,冰浴冷却至室温,测定不同温度处理后发酵液的抑菌情况。取发酵液30 mL,用稀酸或稀碱将其pH分别调至3.0,4.0,5.0,6.0,7.0,8.0,9.0,10.0,静置24 h后,调至原始pH值,并测定不同pH处理后发酵液的抑菌情况。

1.6 抑菌物质萃取和溶解性测定

发酵液用等体积的三氯甲烷、乙酸乙酯、石油醚、正丁醇进行萃取,搅拌4 h后于分液漏斗中静置过夜,分别取上、下层进行抑菌活性测定。

发酵液用等体积三氯甲烷萃取,有机相用无水硫酸钠干燥, $30^\circ C$ 减压浓缩。所得初提物分别用与原发酵液体积相等的水、甲醇、乙醇、丙酮、乙醚充分振荡静置过夜,进行抑菌活性测定。

1.7 发酵液抑菌活性成分层析

1.7.1 pH纸层析^[10]

将样品点于分别用pH 2.2,3.0,4.0,5.0,6.0,7.0,8.0,9.0,10.0的缓冲溶液处理干燥后的9条滤纸条上,在水饱和乙酸乙酯的展层溶剂中进行上行展层。展层结束后,将滤纸条晾干进行生物显影。

1.7.2 捷克八溶剂系统纸层析^[10]

捷克八溶剂系统:(1)水饱和的正丁醇;(2)水

饱和的正丁醇,内含2%的对甲基苯磺酸;(3)正丁醇:乙酸:水=2:1:1;(4)水饱和的正丁醇,内含2%的六氢吡啶;(5)正丁醇饱和的 $0.5 mol \cdot L^{-1}$,pH 7.0的磷酸缓冲溶液;(6)正丁醇饱和的水,内含2%的对甲基苯磺酸;(7)苯:甲醇=4:1,本系统所用滤纸先用 $0.5 mol \cdot L^{-1}$,pH 7.0的磷酸缓冲溶液处理后晾干;(8)甲醇:水=3:1,水内含3%NaCl,本系统所用滤纸先用5% Na_2SO_4 处理晾干后使用。将样品点于各滤纸条上,并在对应的溶剂中进行上行展层。展层结束后,将滤纸条晾干进行生物显影。

1.7.3 硅胶G板薄层层析^[10]

将样品点于活化冷却后的硅胶G板,用 $V_{正丁醇}:V_{乙酸}:V_{水}=3:1:1$ 为展开剂进行展层,展层后在凝胶成像系统的紫外光下观察活性物质的发光情况,并进行生物显影。

2 结果与分析

2.1 发酵液最小抑菌浓度

原发酵液倍比稀释后得到一系列不同浓度的发酵液,采用滤纸片法测定不同浓度发酵液对枯草杆菌的抑菌效果(表1)。从表1可知,发酵液对枯草杆菌的抑制活性随着发酵液浓度的降低而逐渐减弱。当发酵液浓度为0.78%时,对枯草杆菌仍具有抑菌效果;但稀释至0.39%时,抑菌圈不明显。因此发酵液对枯草杆菌的最小抑菌浓度为原发酵液浓度的0.78%,即对发酵液进行了128倍稀释。

表1 不同浓度发酵液对枯草杆菌的抑菌作用($n=5$)

发酵液浓度 /%	抑菌圈 /mm	发酵液浓度 /%	抑菌圈 /mm
100	21.58	3.13	12.82
50	19.36	1.56	9.72
25	18.16	0.78	8.40
12.5	16.66	0.39	6.00
6.25	14.48		

2.2 温度和pH对发酵液抑菌活性的影响

由图1,图2可见,发酵液中活性物质对温度

的耐受性较弱,其抑菌圈随处理温度上升呈现明显的下降趋势,经 70℃ 处理 30 min 后,抑菌圈降为 11 mm,之后抑菌圈略有上升,维持在 14 mm 左右. 发酵液经不同 pH 处理后,其抑菌圈在酸性条件下较大,在碱性条件下相对较小,整个 pH 范围内,变化幅度不大,表明发酵液中活性物质对 pH 的耐受性较强.

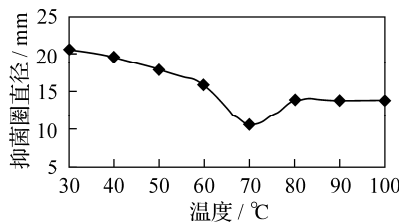


图 1 温度对发酵液抑菌活性的影响

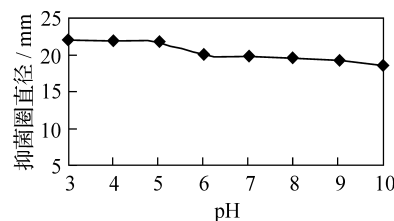


图 2 pH 对发酵液抑菌活性的影响

2.3 发酵液抑菌物质萃取及溶解性

萃取结果(表 2) 活性物质在原始 pH 条件下能被三氯甲烷和正丁醇大部分萃取,乙酸乙酯和石油醚的萃取效果相对较弱. 活性物质对不同溶剂溶解性见表 3,说明活性物质在水、甲醇、乙醇、丙酮、乙醚中都能较好地溶解. 萃取和溶解性试验表明发酵液中抗菌活性物质是一种中高度极性的抗生素. 以上试验用各纯溶剂对照均无抑菌圈出现.

表 2 有机溶剂对活性物质的萃取

萃取溶剂	三氯甲烷		乙酸乙酯	
	水相	有机相	水相	有机相
抑菌圈/mm	10.93	19.92	21.04	10.18
萃取溶剂	石油醚		正丁醇	
	水相	有机相	水相	有机相
抑菌圈/mm	21.00	11.67	14.53	20.68

表 3 有机溶剂对活性物质的溶解性

溶剂	水	甲醇	乙醇	丙酮	乙醚
溶液颜色	淡棕黄色	棕褐色	棕褐色	棕黄色	棕黄色
抑菌圈/mm	22.18	23.77	24.97	22.63	22.24

2.4 XS904 菌株发酵液抑菌活性物质的纸层析

pH 纸层析结果见图 3. pH 纸层析色谱图表明:以水饱和和正丁醇、水饱和和乙酸乙酯、水饱和和乙酸丁酯为展开剂时,活性物质的 Rf 值都随着 pH 的增大而上升,其曲线的最大值在碱性部分,呈现经典的 S 型. 参照各类抗生素纸色谱图,推定活性物质为一类碱性抗生素.

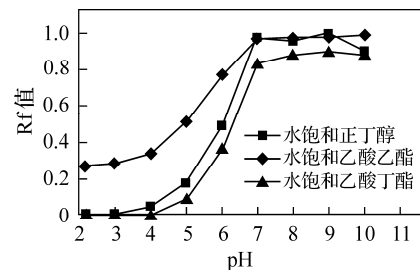


图 3 不同展层剂的 pH 纸层析图

活性物质在捷克八溶剂系统中的纸色谱如图 4 所示,可以看出活性物质在溶剂系统中均有较大移动,Rf 值呈现出中间高两端略低趋势. 参照各类抗生素纸色谱图,初步推定 XS904 菌株所产活性物质可能是一类新型抗生素.

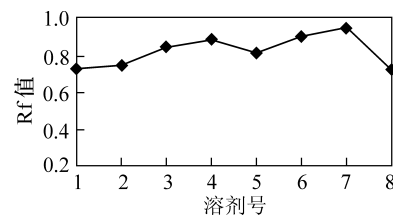


图 4 捷克八溶剂系统层析图

活性物质经硅胶 G 板薄层层析展开后在凝胶成像系统下观察无荧光出现,经生物显影发现只有 1 个抑菌圈,其 Rf 值为 0.13,说明该活性物质没有共轭双键和特殊发色团的存在,且为单一组分.

3 小结

从天然资源中寻找活性物质代替化学农药和使用天然抗菌化合物保护作物已成为当前研究的重点. 放线菌资源在天然资源中占相当大的比例,其活性产物抗生素是微生物农药的重要来源之一. 本文研究了从宁波地区海洋滩涂中筛选的 XS904

菌株发酵液, 其对供试G⁺细菌具有很强的抑制作用, 稳定性实验显示XS904 菌株发酵液抑菌活性物质在酸、中性情况下稳定, 对温度比较敏感, 且活性物质易被三氯甲烷萃取, 能溶于水、甲醇、乙醇、丙酮、乙醚, 纸层析初步鉴定为一类碱性抗生素, 这为XS904 菌株发酵液抑菌活性物质的进一步深入研究提供了有利依据. 有关该菌株抑菌活性物质的分离纯化、结构鉴定、抑菌作用机理等研究工作正在进行中.

参考文献:

- [1] Federica S, Linda C, Ameriga L, et al. Biodiversity and potentials of marine-derived microorganisms[J]. *Biotechnology*, 1999, 70:65-69.
- [2] Ingo H, Paul R J, William F. Neomarinone and new cytotoxic marinone derivatives, produced by a marine filamentous bacterium (actinomycetales)[J]. *Tetrahedron Letters*, 2000, 41:2 073-2 076.
- [3] 林永成, 周世宁. 海洋微生物及其代谢产物[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [4] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [5] 饶本强, 李福荣, 张海宾. 乳香对几种病原微生物抗性作用的初步研究[J]. *信阳师范学院学报: 自然科学版*, 2005, 18(1):54-56.
- [6] 李义奎. 中药药理实验[M]. 上海: 上海科技出版社, 1991.
- [7] 陈文伟, 肖丽英. 8 种中草药对耐药金葡菌的最小抑菌浓度检测[J]. *广东药学*, 2005, 15(3):72-73.
- [8] 石玉新, 马艳丽, 齐树亭. 柠檬酸对三种常见水产病原菌的抑菌作用[J]. *饲料工业*, 2005, 2(6):57-59.
- [9] 韩斯琴, 徐美, 白震, 等. D2-4 放线菌抗真菌病害活性成分研究[J]. *微生物学杂志*, 2004, 24(1):8-10.
- [10] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1996.

Preliminary Study on Bioactive Metabolite of Marine Actinomyces XS904

LOU Qiao-ming, YANG Wen-ge*, ZHU Qiao-ling, SUN Ai-fei

(Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Bioactive metabolite produced by marine actinomyces XS904 is primarily investigated. Using anti-*Bacillus subtilis* activity as index, the minimal inhibitory concentration (MIC) of metabolite is measured, the stability of bioactive metabolite treated with different temperatures and pH is observed, the bioactive ingredients are extracted and dissolved by organic solvent, and sorted by paper chromatography. The MIC of metabolite is 0.78%. The antimicrobial substances are sensitive to the temperature, and stable under the acidic as well as neutral pH. It can be extracted by chloroform, and is soluble in water, methanol, ethanol, acetone and aether. The antimicrobial substances are primarily identified as a kind of basic antibiotic by paper chromatography. Low concentration of the metabolites from marine actinomyces XS904 has strong restraint against *Bacillus subtilis*, and the antimicrobial substance is a kind of basic antibiotic with strong polarity.

Key words: marine actinomyces; XS904; bioactive metabolite; antimicrobial activity

CLC number: Q939.13⁺2

Document code: A

(责任编辑 史小丽)