

# ZK-I 菌发酵液中抗真菌活性化合物的纯化与部分特性研究\*

孙雪文<sup>1,2</sup> 周金燕<sup>1</sup> 钟娟<sup>1</sup> 邓洪渊<sup>1,2</sup> 谭红<sup>1\*\*</sup>

(中国科学院成都生物研究所 成都 610041)<sup>1</sup> (中国科学院研究生院 北京 100039)<sup>2</sup>

**摘要:** 芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) 菌株 ZK-I 对甜瓜疫病、棉花枯萎病等多种作物真菌病害以及啤酒酵母都有很强的抑制作用。报道了 ZK-I 菌发酵液中抗真菌化合物的分离纯化及其部分特性。该菌株发酵液经过酸沉淀、正相硅胶层析以及 C<sub>18</sub> 反相硅胶层析等步骤, 得到四个化合物, 经 HPLC 检测均为单峰, 通过质谱测定分子量并结合高效液相色谱检测结果确定它们为同系物, 其中 A 为捷安肽素 A, 并推测其余化合物为捷安肽素 A 的结构类似物。

**关键词:** 抗菌肽, 分离, 纯化, C<sub>18</sub> 反相硅胶

**中图分类号:** Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2007) 01-0088-04

## Studies on Purification and Some Properties of Antifungal Compounds in ZK-I Fermentation\*

SUN Xue-Wen<sup>1,2</sup> ZHOU Jin-Yan<sup>1</sup> ZHONG Juan<sup>1</sup> DENG Hong-Yuan<sup>1,2</sup> TAN Hong<sup>1\*\*</sup>

(Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041)<sup>1</sup>

(Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)<sup>2</sup>

**Abstract:** ZK-I belongs to *Bacillus* sp. and shown strong antagonistic abilities to *Saccharomyces cerevisiae* and several plant pathogens, such as *phytophthora* sp. and *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* etc., in this paper, we reported the purification of the antifungal substances and some properties of antifungal compounds. After acid precipitation, silica gel chromatography, C<sub>18</sub> reversed-phase silica gel chromatography, we obtained four compounds and knew their peaks were all single by HPLC testing. Combined with MS and HPLC, we concluded that they are the homologous series of compounds, A is jian-peptide A and the others were confirmed to the analog of Jian-peptide A in structure.

**Key words:** Antimicrobial peptides, Separation, Purification, C<sub>18</sub> reversed-phase silica gel

多肽类抗菌素是农用抗生素中的一种, 主要来自芽孢杆菌<sup>[1]</sup>。迄今为止, 国内外许多实验室通过分离纯化芽孢杆菌的发酵产物, 得到了一些高分子量蛋白类的抗菌物质和低分子量的抗菌肽<sup>[2,3]</sup>。我们实验室从一株芽孢杆菌的发酵液中提取到了一种具有抗真菌活性的化合物, 命名为捷安肽素 A (Jian-peptide, 简称 JAA-A)。研究表明, 捷安肽素 A 对多种非常顽固的真菌病害如棉花的“枯、黄萎病”、番茄“立枯病”、小麦“白粉病”以及被称作新疆甜瓜绝症的“疫霉病”等这些制约着当地特色农业发展的真菌病害有着非常良好的防治效果, 是一种极具研究和开发价值的新型农用抗生素<sup>[4,5]</sup>。

杆菌产生的抗菌肽种类繁多, 结构复杂, 即使具有同一基本结构的抗菌肽也存在多种结构类似物。由于这些抗菌肽结构相似, 物化性质相近, 从发酵液中分离纯化得到单分子化合物非常困难, 这也给进一步的结构鉴定以及理化性质的研究带来困难。因此, 分离纯化方法的选择就成为一个至关重要的环节。目前国内外对抗菌肽的分离纯化方法不一, 但多是经过粗提后采用高效液相色谱制备高纯度的样品<sup>[6-13]</sup>。经实验摸索, 本文采用酸沉淀等方法对发酵液进行粗提后, 采用 C<sub>18</sub> 反相硅胶柱层析方法分离纯化发酵液粗提物, 得到了四个化合物, (其中 A 为捷安肽素 A)。单次制备量大, 纯度高。经初步鉴定, 这四个化合物为同系物。

\* 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (No. KSCXZ-SW-301-05)

\*\* 通讯作者 Tel: 028-85219314, E-mail: abath@ib.ac.cn

收稿日期: 2006-04-13, 修回日期: 2006-06-22

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) 菌株 ZK-I, 由本实验室从产自新疆阿克苏的棉株上分离纯化获得。疫霉菌 C1 (*Phytophthora* sp.)、辣椒炭疽病菌 (*Colletotrichum gossypii* Southw)、棉花枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)、啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 均为本实验室保藏菌株。

### 1.2 主要仪器和试剂

仪器: 反相硅胶载体 ODS-A 型  $C_{18}$  硅胶 (50 $\mu$ m, 120Å, 日本 YMC 化学公司), 玻璃色谱柱 (25cm $\times$ 10mm), SBS-100 型数控计滴自动部分收集器 (上海青浦沪西仪器厂), SHIMADZU (岛津) 高效液相色谱系统: LC-10AT 型输液泵, SPD-10A 紫外检测器, 7725i 进样阀; ZORBAZ SB- $C_{18}$  柱 (4.6mm $\times$ 150mm, 安捷伦公司); N3000 色谱工作站 (浙江大学智能信息研究所); MILLI-Q Labo 超纯水制备器 (MILLI PORE 公司)。

试剂: 甲醇为国产分析纯, 水为超纯水 (18.2 兆欧)。

### 1.3 培养基

见参考文献 [14]。

### 1.4 发酵液的制备

将 ZK-I 接入种子培养基, 30℃, 150 r/min 震荡培养 24 h, 按 5% 的接种量接入发酵培养基中, 30℃, 150 r/min 震荡培养 72 h。

### 1.5 抗真菌化合物的分离与纯化

1.5.1 抗真菌化合物粗提: 将 4,000 mL 的 ZK-I 菌发酵液调 pH 至 3.5, 6,000 r/min 离心, 沉淀用 pH 3.5 的蒸馏水洗, 离心, 在沉淀中加入少量蒸馏水后用 NaOH 调 pH 到 7.5, 再用 pH 7.5 的水洗, 离心, 将收集的上清液用 HCl 调 pH 至 3.5, 6,000 r/min 离心, 收集的沉淀中加入少量蒸馏水后再用 NaOH 调 pH 至 7.5, 与 14 g 硅胶搅拌均匀, 置于通风橱里干燥, 得到干燥的拌样硅胶 19 g。

1.5.2 正相硅胶层析: 称取 70 g 硅胶, 用氯仿: 甲醇 (6: 4) 的缓冲液平衡柱子, 将得到的硅胶拌料上柱, 并用相同的洗脱液洗脱柱子, 待色素带走到柱子底端时开始用自动部分收集器收集, 每 30min 收集一管, 硅胶薄层层析检测。(展层剂

为正丁醇: 冰乙酸: 水 = 10: 5: 2)。将检测到样品的管合并, 旋转蒸发, 真空干燥。

1.5.3 反相硅胶层析: 称取 12g  $C_{18}$  反相硅胶制成反相层析柱, 再称取经正相硅胶后得到的干燥样品 50 mg 进行层析, 用甲醇/水溶液洗脱 (甲醇浓度为 20% ~ 100% 逐渐提高), 流速为 5.5 min/每管, 每管 2 mL, 硅胶薄层层析检测。

1.5.4 HPLC 检测: 将硅胶薄层层析检测到样品的洗脱溶液进一步用 HPLC 检测相对纯度 (面积外标法), 并对每个单峰进行定性检测。检测条件: 波长: 280nm; 流动相: 甲醇/水 (8: 2); 流速: 0.5 mL/min, 柱温: 30℃。将收集到的高纯度单峰分别合并, 浓缩干燥, 称重。

### 1.6 抗真菌物质的部分特性研究

1.6.1 化合物的分子量测定: 用美国 Bruker daltonics 公司的 BioTOF Q 型质谱仪测定。

1.6.2 溶解性实验: 将经过酸沉淀后获得的 0.05g 干燥粗粉, 分别单独用水、甲醇、乙醇、丙酮、苯、乙醚、三氯甲烷各 1mL 浸提, 滤纸片法生测, 以疫霉菌为指示菌。

1.6.3 抑菌活性测定: 取纯化后的化合物进行生物学活性测定, 选取疫霉菌、棉花枯萎病菌、辣椒炭疽病菌、啤酒酵母菌为指示菌。滤纸片法测定。

1.6.4 抗真菌化合物 B 对 pH 的稳定性及回复实验: 将抗真菌化合物 B 的水溶液 pH 分别调到 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 作用 2h 后将 pH 回调回对照 (即原 pH, 约 6 左右), 将未处理样品的抑菌活性定为 100%, 管碟法生测, 以疫霉菌为指示菌。

1.6.5 抗真菌化合物 B 对温度的稳定性实验: 将抗真菌化合物 B 分别在 40℃、60℃、80℃、100℃ 处理 30min, 0.1MPa 灭菌 30min, 将未处理的样品抑菌活性定为 100%, 管碟法生测, 以疫霉菌为指示菌。

1.6.6 抗真菌化合物 B 对蛋白酶的稳定性实验: 在 37℃ 水浴条件下, 将抗真菌化合物 B 用反应浓度均为 1mg/mL 的蛋白酶 K 和胰蛋白酶处理 60min, 以不加酶处理的抗真菌物活性为对照, 抑菌活性定为 100%。

## 2 结果

### 2.1 抗真菌物质的分离纯化

发酵液经过酸沉淀后得到了抗菌物的粗品,

通过正相硅胶得到了进一步的纯化,反相硅胶层析后,经 HPLC 检测得到 4 个单峰,分别编号为 A、B、C、D。面积外标法测定相对含量最高可达 98.6%,重量为 12.5mg,即单次制备就能够满足结构分析的量,且总回收率达 61.9%。结果见表 1。

表 1 C<sub>18</sub>反相硅胶层析结果及回收率

	Content (%)	Weight (mg)	Total yield
A	98.6	12.5	61.9%
B	95.7	6.0	
C	86.8	0.6	
D	73.9	0.8	

表 2 粗提物在不同溶剂中的抗真菌活性

溶剂 Solvent	水 Water	甲醇 Methanol	乙醇 Ethanol	丙酮 Acetone	乙醚 Ethyl ether	苯 Benzene	三氯甲烷 Chloroform
抑菌圈直径 (mm) Inhibition ring	19.0	24.0	18.3	12.6	0	0	0

2.2.3 抑菌活性测定:结果表明纯化后的 4 个化合物对几种供试病原真菌均有不同程度的抑制作用

2.2 抗真菌化合物的部分特性研究

2.2.1 分子量的测定:经 HR-ESI-MS 测定这 4 个化合物的分子量分别为 A, m/z 1065.5323 [M + Na]<sup>+</sup>; B, m/z 1079.5446 [M + Na]<sup>+</sup>; C, m/z 1079.5441 [M + Na]<sup>+</sup>; D, m/z 1093.5687 [M + Na]<sup>+</sup>。可知化合物 A 为抗真菌多肽捷安肽素 A。

2.2.2 抗真菌化合物的溶解性实验:甲醇浸提物对疫霉菌的抑制效果最好,抑菌圈达到 24mm,说明抗真菌物质在甲醇中的溶解性最大,其次是水和乙醇,丙酮次之,在脂溶性溶剂乙醚、苯和三氯甲烷中无抑菌活性(表 2),说明这种抗菌物质在极性溶剂中的溶解性大。

用,形成不同直径的抑菌圈,其中对疫霉菌的抑制效果最明显。结果见表 3。

表 3 抗真菌物对几种病原真菌及啤酒酵母的抑制作用

	疫霉菌 <i>phytophthora</i> sp.	棉花枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	辣椒炭疽病菌 <i>Colletotrichum gossypii</i> Southw	啤酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisie</i>
A	+++	+++	++	++
B	++	++	+	+
C	+	±	±	±
D	+	±	±	±

注:+++表示抑菌活性强,抑菌圈大而明显,++表示抑菌活性比较强,抑菌圈比较大且明显,+表示抑菌活性较弱,抑菌圈小但明显,±表示抑菌活性弱,抑菌圈小且不明显

2.2.4 抗真菌化合物 B 对 pH 的稳定性:结果表明,抗真菌化合物 B 在 pH3-9 的范围内活性变化不大,均具有良好的抑菌性能,在 pH 大于 9 的强碱性环境中丧失抑菌活性,这可能与化合物在强碱性环境下的空间结构变化有关。在酸性或碱性条件下(pH3-12)保存两个小时后回调回 pH 后,活性基本可以回复,说明抗真菌化合物 B 具有良好的酸碱稳定性。见图 1。

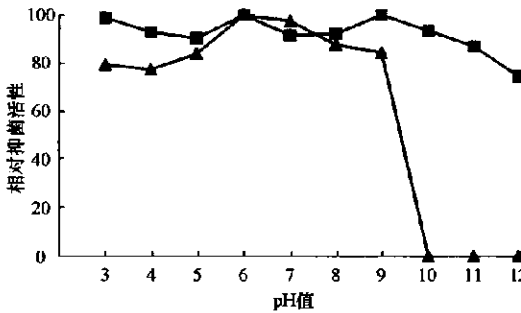


图 1 抗真菌物 B 对 pH 的稳定性实验

▲ pH 3~12 范围内 B 的活性, ■ 将 pH 回调后对照后 B 的活性

2.2.5 抗真菌化合物 B 对温度的稳定性实验:结果表明,抗真菌化合物 B 经过 40℃、60℃、80℃、100℃ 分别处理 30min 后,活性基本很稳定,无明显下降;0.1MPa 灭菌处理 30min,活性下降了约 30%。说明抗真菌物对高温具有一定的耐受性。见图 2。

2.2.6 抗真菌化合物 B 对蛋白酶的稳定性实验:抗真菌化合物 B 用两种蛋白酶处理后,抑菌活性几乎没有降低,说明其对蛋白酶 K 和胰蛋白酶均

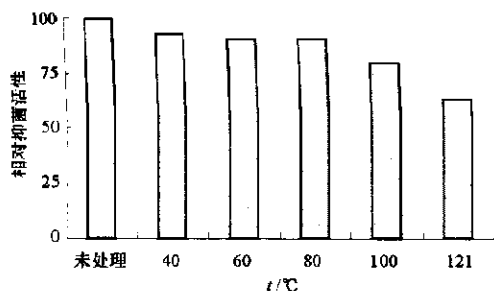


图2 抗真菌物 B 对温度的稳定性实验

具有良好的耐受性。

### 3 讨论

近年来微生物来源的生物抗菌物质已经逐步得到开发和利用,这些抗菌物主要来源于细菌、真菌及放线菌。在芽孢杆菌产生的抗菌肽中,多呈闭合环状,少数为线形,多数抗细菌,仅少数抗真菌;且多数抑菌活性不强,抗菌谱窄,不能同时抑制丝状真菌和酵母菌<sup>[15]</sup>。我们从芽孢杆菌 ZK-1 的发酵液中纯化出的抗真菌物,抑菌谱广、活性强、能同时对丝状真菌和酵母起作用,并且具有耐高温和耐强酸碱的特性,具有良好的药用开发前景。

由于芽孢杆菌发酵液产生的抗菌物质往往是由几种结构和功能相似的化合物组成的,从而给分离纯化带来了很大的困难,进而影响后面的结构鉴定工作。目前国内外多是对抗菌物进行萃取等初步提纯后,继而采用 HPLC 进行纯化和制备,若抗菌化合物是蛋白和肽类物质,有机溶剂就有可能影响化合物的活性。所以初步提纯采用什么样的方法对于能否得到活性目标物质非常重要,本文经过酸沉淀及正相硅胶层析后,去除了大量杂质,得到了活性目标物质。然后根据 HPLC 分离制备的原理,采用 C<sub>18</sub> 反相硅胶层析,仅经过一次反相层析就得到了高纯度的抗真菌化合物,液相检测含量最高可达 98.6%,反相层析总回收率达 60% 以上,且单次制备量大。经过质谱测定分子量得知 A 和 B 仅相差 14D, C 和 D 也只相差 14D,这正好相当于一个亚甲基的分子量, B 和 C 分子量相同,并且根据它们在 HPLC 上的保留时间,推测他们为同系物。通过对抗真菌物 B 的理化性质的研究,发现它与捷安肽素 A 具有极其相似的性质,又由于捷安肽素 A 的分子量与 B 之间

也相差 14D<sup>[16]</sup>,所以推测捷安肽素 A 与这些抗真菌物为同系物,为芽孢杆菌产生的系列抗真菌物,且都具有相似的结构和理化性质。

应用 C<sub>18</sub> 反相硅胶分离抗菌肽,由于它是基于 HPLC 分离的原理,所以同样具有高分辨率,高灵敏度的优势;同时,填料的量可以根据实际需要而调整,更具灵活性,既可以应用在实验室,也为今后不同规模的制备提供了数据依据,且提高了制备的工作效率;另外填料还可以重复利用,相对经济实惠。而普通的硅胶是无达到这种分离效果的。

综上,本文所用的分离纯化方法是一种简单快捷、高效率的方法;分离纯化得到的化合物是一系列抗菌谱广、稳定性好的极具开发价值的抗真菌化合物,在农牧业中有很好的应用前景;并有望应用在水果保鲜及其他相关方面,有关研究工作正在进行中。

### 参考文献

- [1] John R W, Helen L. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2004, 10: 73 ~ 90.
- [2] Regine M D. *Toxicology*, 1994, 87: 151 ~ 174.
- [3] 刘 静,王 军,姚建明,等. *微生物学报*, 2004, 44 (4): 511 ~ 514.
- [4] 钟 娟,周金燕,谭 红. *应用与环境生物学报*, 2004, 10 (1): 104 ~ 107.
- [5] 赖晓娜,谭 红. *应用与环境生物学报*, 2004, 10 (2): 231 ~ 235.
- [6] Yatrib H, Yen P H, Victor R, et al. *Nat Prod*, 2002, 63: 1492 ~ 1496.
- [7] Michil M Y, Wolf-Rainer A. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, 1438: 273 ~ 280.
- [8] Yoshio K, Masanori S, Miyuki K. *The Journal of Antibiotics*, 1995, 48 (10): 1095 ~ 1103.
- [9] 金哲东,王玉书,金京玲,等. *中国生化药物杂志*, 2001, 22 (1): 13 ~ 15.
- [10] 刘 颖,徐 庆,陈章良. *微生物学报*, 1999, 39 (5): 441 ~ 444.
- [11] 谢 炼,彭 微,王津红,等. *微生物学报*, 1998, 38 (1): 13 ~ 19.
- [12] 刘伊强,王雅平. *植物学报*, 1994, 36 (3): 197 ~ 203.
- [13] 胡 剑,赵永岐,王岳五. *微生物学通报*, 1997, 24 (1): 3 ~ 7.
- [14] 钟 娟,周金燕,冯 言,等. *天然产研究与开发*, 2003, 15 (6): 504 ~ 507.
- [15] 裴 炎,李先碧,彭红卫,等. *微生物学报*, 1999, 39 (4): 344 ~ 349.
- [16] 代富英,周金燕,钟 娟,等. *中国抗生素杂志*, 2005, 30 (9): 512 ~ 520.