

芽孢杆菌 SC27 胞外代谢产物的 活性与成分分析

刘颖 徐春厚*

(广东海洋大学 广东 湛江 524088)

摘要: 以从红树林土壤分离并经紫外线和亚硝基胍复合诱变获得的 SC27 突变菌株作为目标菌, 对其胞外代谢产物的活性与成分进行分析。结果表明: 芽孢杆菌 SC27 产生乳酸, 产量为 5.04 g/L; 发酵液蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶活力分别为 1 316.6、513.3 和 176.2 U/mL, 未检测出脂肪酶; 胞外代谢产物对革兰氏阳性菌的抑菌活性强, 且抑菌活性物质可耐受高温及木瓜蛋白酶、蛋白酶 K 和胰蛋白酶处理; 发酵液二氯甲烷萃取物的主要化学成分及相对含量为二丁基羟基甲苯(10.28%)、二甲基二氧基硅烷(7.87%)、2,4-二叔丁基苯酚(2.92%)和 2 个未确定化合物(4.47%、2.36%)。

关键词: 芽孢杆菌 SC27, 胞外代谢产物, 抑菌活性, 酶活性

Analysis of activity and components on extracellular metabolites of *Bacillus* SC27

LIU Ying XU Chun-Hou*

(Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088, China)

Abstract: The activities and components of extracellular metabolites of a mutant *Bacillus* SC27 which was isolated from mangrove soil and was mutated via combined nitrosoguanidine (NTG) and UV were analyzed. The results showed that the *Bacillus* SC27 produced lactic acid of 5.04 g/L. The activities of protease, amylase, cellulase in the fermentation fluid were 1 316.59 U/mL, 176.2 U/mL and 513.3 U/mL, respectively, while no lipase activity was detected. The extracellular metabolic products showed higher anti-bacteria activities against Gram-positive bacteria than those against Gram-negative bacteria, and the anti-bacterial products of *Bacillus* SC27 could withstand treatment of high temperature, enzymes of papain, proteinase K and trypsin. Main chemical compositions of fermentation fluid extracted by dichloromethane were hydroxytoluene of 10.28%, dimethoxydimethylsilane of 7.87%, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol of 2.92% and 2 unidentified compounds of 4.47% and 2.36%.

Keywords: *Bacillus* SC27, Extracellular metabolites, Anti-bacterial activity, Enzyme activity

益生菌是一种可通过改变肠道菌群平衡而对动物施加有利影响的活的微生物饲料添加剂, 其中益生芽孢杆菌在不利的环境中可形成芽胞, 能够耐高温、酸碱以及机械挤压等不利因素, 便于加工成饲料, 进入胃肠道后可迅速萌发, 在体内能够进行繁殖代谢并发挥其益生功能, 如分泌和激活蛋白酶, 提高饲料的消化利用率, 促进组织器官生长发育, 提高动物的健康水平^[1-2]。同时, 芽孢杆菌还可通过免疫抑制、竞争性吸附及合成抗菌物质等多方面的作用, 有效地调节动物肠道的微生态环境, 减少肠道疾病的发生, 所以 *Bacillus* 属的许多菌种已被用作饲料添加剂^[3-4]。但目前具有较好抗菌活性、产酶量丰富、酶活性高以及抗逆性强等益生特性的芽孢杆菌菌株较少, 且能产生乳酸的芽孢杆菌菌株更少, 限制了芽孢杆菌类益生菌在饲料工业和畜牧生产中的应用。产乳酸芽孢杆菌 SC27 是作者从红树林土壤中分离、鉴定、诱变和筛选出的一株益生菌^[5-6], 为了将来开发和利用该菌株, 对其胞外代谢产物中酸物质种类、产酶活性、抑菌活性以及主要成分进行了分析, 以期获得有益的试验数据, 为安全、优质、高效的饲料用芽孢杆菌发酵剂及活菌制剂的研制和开发提供理论依据、微生物资源及技术支持。

1 材料与方法

1.1 菌株

供试菌株芽孢杆菌 SC 是从红树林土壤中分离获得, 并通过形态染色特性观察、Biolog 系统鉴定及 16S rRNA 碱基序列分析, 鉴定为芽孢杆菌属(FJ627944-1), 未定出种名^[5]; 通过紫外线和亚硝基胍复合诱变, 筛选出一株芽孢杆菌 SC27 正向突变株^[6]。

指示菌金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)、鸡白痢沙门菌(*Salmonella pullorum*)、多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), 均购于中国兽医药品监察所。

1.2 培养基

1.2.1 GYP 培养基(g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 10, 酵母膏 5, pH 6.8-7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.2.2 酶发酵培养基: 蛋白酶发酵培养基(g/L): 玉米粉 40, 豆粕粉 30, 蛋白胨 2, 葡萄糖 5, K_2HPO_4 1.5, $(NH_4)_2SO_4$ 1.5, $CaCl_2$ 0.3, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.6, $MnSO_4$ 0.1, NaCl 2.0, 吐温-80 0.3 mL/L, pH 8.0; 纤维素酶发酵培养基(g/L): 玉米粉 40, 麸皮 30, 豆粕粉 20, 蛋白胨 3, NaCl 5.0, KH_2PO_4 1.0, Na_2HPO_4 1.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, pH 7.0; 淀粉酶发酵培养基(g/L): 玉米粉 40, 豆粕粉 30, $CaCl_2$ 0.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, NaCl 2.5, K_2HPO_4 2.0, 柠檬酸钠 2.0, $(NH_4)_2SO_4$ 0.75, Na_2HPO_4 2.0, pH 7.0; 脂肪酶发酵培养基(g/L): 玉米粉 30, 豆粕粉 20, 橄榄油 50 mL/L, K_2HPO_4 10.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0, $(NH_4)_2SO_4$ 1.0, NaCl 5.0, pH 7.5。

1.3 胞外代谢产物酸性物质测定

以色谱纯的乳酸标准品作为对照, 采用高效液相色谱仪(日本岛津, LC-20A)测定芽孢杆菌 SC27 培养物上清液。

1.4 胞外代谢产物酶活性测定

1.4.1 待测粗酶液的制备: 将芽孢杆菌 SC27 接种到 GYP 培养基上, 37 °C、130 r/min 振荡培养 24 h, 将该培养物按 3%接种到不同的酶发酵培养基中, 37 °C、130 r/min 振荡培养 24 h 后静置培养 24 h, 将培养物 4 000 r/min 离心 30 min, 收集上清液, 用滤纸过滤即为待测粗酶液。

1.4.2 酶活力测定: 待测粗酶液中的蛋白酶活力测定采用 Folin 酚法^[7]; 淀粉酶活力测定采用 3,5-二硝基水杨酸法^[7]; 纤维素酶活力测定采用 CMCA-DNS 法^[7]; 脂肪酶活力测定采用指示剂滴定法^[8]。

1.5 胞外代谢产物不同处理的抑菌活性

1.5.1 指示菌及指示菌液的制备: 将 5 种指示菌, 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)、鸡白痢沙门菌(*Salmonella pullorum*)、多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)分别接种到营养肉

汤培养基, 37 °C 培养 18 h, 配制成 10^6 CFU/mL 的菌悬液即为指示菌液。

1.5.2 代谢产物不同处理样品的制备: 将芽孢杆菌 SC27 接种到 GYP 培养基中, 37 °C、130 r/min 振荡培养 24 h 后静置培养 24 h, 将培养物离心, 上清液即为待测样品 1, 编号为 No.1; 将上清液置于 100 °C 处理 30 min, 即为待测样品 2, 编号为 No.2; 将上清液分别置于木瓜蛋白酶溶液(1.0 g/L)、蛋白酶 K 溶液(1.0 g/L)和胰蛋白酶溶液(1.0 g/L)中, 37 °C 孵育 1 h, 即分别为待测样品 3、4、5, 编号分别为 No. 3、No. 4、No. 5。

1.5.3 抑菌活性测定: 采用杯碟法^[9]测定抑菌活性, 用抑菌圈直径的大小表示抑菌活性的高低; 同时, 用空白培养基同上处理作为对照。

1.6 胞外代谢产物成分分析

1.6.1 菌株培养: 芽孢杆菌 SC27 经活化后, 按 3% 接种到 GYP 培养基中, 37 °C、130 r/min 振荡培养 24 h 后静置培养 24 h, 将培养物 4 000 r/min 离心 30 min, 取上清液过滤, 即得菌株培养液。

1.6.2 胞外代谢产物的萃取: 取菌株培养液, 用二氯甲烷在中性、酸性、碱性条件下萃取, 共萃取 3 次, 即为菌株液; GYP 培养基的二氯甲烷萃取物作为空白对照液。

1.6.3 气相色谱条件: 采用 CMS-QP2010 气相色谱质谱仪进行测定。石英毛细管柱 DB-5 (30 m×0.25 mm×0.25 μm), 色谱柱程序升温条件: 初始温度 60 °C, 保持 4 min 后, 以 5 °C/min 的速率升温至 300 °C 并保持 5 min; 载体: 氮气, 不分流; 柱前压: 123.3 kPa; 进样口温度 310 °C。质谱条件: EI 源电子轰击能, 70 eV; 离子源温度: 320 °C; 扫描质量范围: 100–400 amu; 扫描间隔: 0.5 s。

2 结果与分析

2.1 酸性物质测定

如图 1 所示, 芽孢杆菌 SC27 高效液相色谱图谱中一峰值的保留时间为 2.633 min, 与色标乳酸的保留时间(2.628 min)相近, 判断该物质为乳酸, 产乳酸量为 5.04 g/L, 该菌株为一株能产生乳酸的芽孢杆菌。

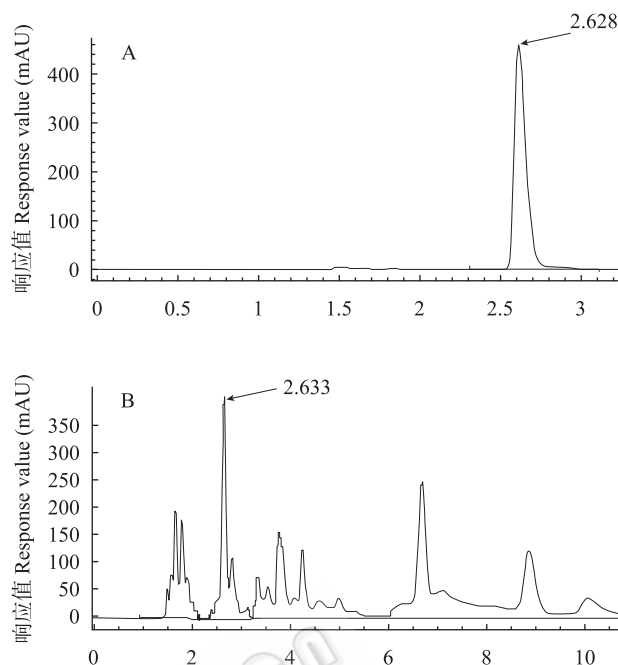


图 1 乳酸标准液(A)与菌株 SC27 发酵液(B)的高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of lactic acid (A) and bacterial strain SC27 fermented liquid (B)

2.2 活性测定

2.2.1 酶活性测定: 芽孢杆菌 SC27 在 37 °C 培养 48 h 时, 蛋白酶活力为 1 316.6 U/mL, 淀粉酶活力为 513.3 U/mL, 纤维素酶活力为 176.2 U/mL, 未检测出脂肪酶, 说明该菌株能产生多种酶, 并且产生的蛋白酶活力较高。

2.2.2 抑菌活性测定: 由表 1 可见, 芽孢杆菌 SC27 胞外代谢产物对 5 种指示菌均有一定的抑菌活性, 其中对 2 种革兰氏阳性菌的抑菌活性明显高于 3 种革兰氏阴性菌; 发酵上清液经高温处理后除对鸡白痢沙门菌的抑菌圈直径稍有提高外, 对其它 4 种指示菌抑制均有所下降, 但抑菌圈直径下降幅度最大的大肠埃希氏菌也只有 5.5%, 说明该菌株代谢物的抑菌活性物质可耐受一定程度的高温处理; 上清液经木瓜蛋白酶溶液处理后, 对 5 种指示菌抑菌圈直径依次下降了 5.6%、1.2%、1.6%、3.0%、0.9%; 经蛋白酶 K 溶液处理后, 对 5 种指示菌抑菌圈直径依次下降了 4.7%、2.4%、4.1%、0%、0.9%; 经胰蛋白酶溶液处理后, 对 5 种指示菌抑菌活性依次下降

表 1 菌株 SC27 发酵液不同处理的抑菌活性(抑菌圈直径, mm)					
Table 1 Anti-bacterial activity of strain SC27 different treated culture (Diameter of inhibition zone, mm)					
样品编号 Sample No.	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	大肠埃氏菌 <i>E. coli</i>	鸡白痢沙门菌 <i>S. pullorum</i>	多杀性巴氏杆菌 <i>P. multocide</i>	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>
No 1	23.2	16.5	12.3	13.5	21.4
No 2	22.6	15.6	12.5	12.9	20.5
No 3	21.9	16.3	12.1	13.1	21.2
No 4	22.1	16.1	11.8	13.5	21.2
No 5	22.3	16.2	12.3	12.5	20.7

了 3.9%、1.8%、0%、7.4%、3.3%; 从 3 种蛋白酶处理后活性下降情况分析, 芽孢杆菌 SC27 代谢物中的抑菌活性物质可耐受蛋白酶的处理。

2.3 胞外代谢产物成分分析

2.3.1 对照液与菌株液二氯甲烷萃取物的 GC-MS 分析: 采用二氯甲烷分别对空白培养基及菌株发酵液进行萃取, 其萃取物用 GC-MS 分析得总离子流图(图 2)和主要化学成分(表 2)。经计算机内存的标准质谱库检索, 如表 2 所示, 确定出对照液有 40 种成分, 其中相对含量在 2.0 以上的成分有 13 种, 相似度在 80%以上的成分有 13 种; 菌株液的成分有 30 种, 其中相对含量在 2.0 以上的成分有 12 种, 相似度在 80%以上的成分有 10 种。

2.3.2 菌株液与对照液 GC-MS 检测的主要成分比较: 比较表 2 中菌株液与对照液化合物的相对含量可以看出, 由于菌株的生长与代谢作用, 空白培养基的部分成分消失或相对含量降低了, 而菌株液中有的化合物含量较对照液大幅度增加, 并且出现了一些对照液中没有的化合物。经比较发现, 菌株发酵液中的主要化合物二丁基羟甲基苯、二甲基二甲氧基硅烷经发酵后含量大幅度增加, 分别增加了 634.6%与 610.1%, 同时表 2 中序号为 18 与 19 的 2 种化合物对照液中没有, 它们分别与已知化合物贝美格、4-氯-2-硝基苯甲醇最近似, 其相似度分别是 78%、75%, 确定它们是何种物质尚有待于进一步鉴定。

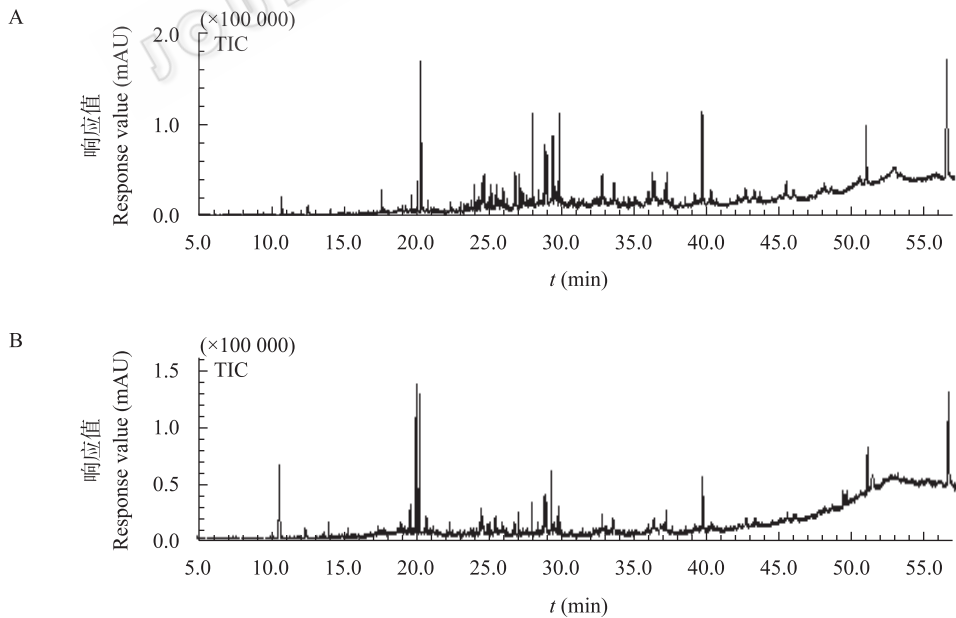


图 2 对照液(A)与菌株液(B)的 GC-MS 总离子流图
Fig. 2 GC-MS total ion chromatogram on contrast liquid (A) and strain SC27 fermented liquid (B)

表 2 菌株液与对照液 GC-MS 检测的主要成分与含量比较
Table 2 Comparison of main constituents and contents between strain SC27 and contrast liquid by GC-MS

序号 No.	保留时间		化合物 Compound	分子式 Molecular formula	相对含量		相似度	
	Retention time (min)				Relative content (%)		Comparability (%)	
	菌株液 Strain	对照液 Contrast			菌株液 strain	对照液 contrast	菌株液 strain	对照液 contrast
1	10.60	10.62	二甲基二甲氧基硅烷 Dimethoxydimethylsilane	C ₄ H ₁₂ O ₂ Si	9.09	1.28	97	97
2	19.99	19.99	二丁基羟基甲苯 Butylated hydroxytoluene	C ₁₅ H ₂₄ O	11.90	1.62	97	97
3	20.21	20.22	2,4-二叔丁基苯酚 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol	C ₁₄ H ₂₂ O	11.96	9.04	95	97
4	27.90	27.91	邻苯二甲酸二异丁酯 1,2-benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	C ₁₆ H ₂₂ O	2.64	5.66	96	95
5	28.89	28.93	六氢-2-氢下半吡啶(1,2-a)-3-四氢吡嗪 Hexahydro-2H-pyrido(1,2-a)pyrazin-3(4H)-one	C ₈ H ₁₄ N ₂ O	3.66	3.35	92	92
6	29.27	29.30	六氢-3-(2-甲基丙基)-吡咯并[1,2-α 吡嗪-1,4 二酮 [1,2-a]pyrazine-1,4-dione,hexahydro-3-(2-methyl propyl)-pyrrolo	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	5.13	4.89	88	92
7	29.78	29.79	邻苯二甲酸二丁酯 Dibutyl phthalate	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	2.72	5.36	93	97
8	37.14	37.16	六氢-3-(苯甲基)-吡咯并[1,2-α] 吡嗪-1,4 二酮 [1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(phenylmethyl)-Pyrrolo	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂	1.56	1.60	94	94
9	39.61	39.62	邻苯二甲酸二异辛酯 1,2-benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	5.40	6.33	97	96
10	50.91	50.92	2,3-二氢-1-甲基-1-丙基-1-氢茛 2,3-dihydro-1-methyl-1-propyl-1H-1-silaindene	C ₁₂ H ₁₈ Si	4.54	4.38	73	73
11	56.44	56.46	3-氨基地弗他酮 3-aminodiftalone	C ₁₆ H ₁₃ N ₃ O ₂	15.72	14.22	70	70
12	—	24.53	2-乙基苯 (2-iodoethyl)-benzene	C ₈ H ₉ I	—	2.56	—	89
13	—	24.63	2,2',5,5'-四甲基-1,1'-联苯 2,2',5,5'-tetramethyl-1,1'-biphenyl	C ₁₆ H ₁₈	—	2.13	—	85
14	—	26.73	(1-甲基十一烷基)-苯 (1-methylundecyl)-benzene	C ₁₈ H ₃ O	—	2.64	—	94
15	—	27.03	3,5-二甲基苯酚 3,5-dimethoxy-phenol	C ₈ H ₁₀ O ₃	—	2.31	—	91
16	—	28.80	3,4-二氯双环(3.2.1)辛二烯 3,4-dichlorobicyclo[3.2.1]oct-2-ene	C ₈ H ₁₀ Cl ₂	—	5.79	—	71
17	19.58	—	贝美格 Bemegride	C ₁₂ H ₁₃ NO ₂	2.36	—	78	—
18	28.78	—	4-氯-2-硝基苯甲醇 4-chloro-2-nitrobenzyl alcohol	C ₇ H ₆ ClNO ₃	4.47	—	75	—

注: —: 相应数据没有检测出.
Note: —: Corresponding compound had been not detected.

3 讨论

芽孢杆菌 SC27 能产生乳酸, 亦能形成芽孢, 故具有乳酸菌和芽孢菌的特性。Ohara 报道了芽孢杆菌 SHO-1、蜡样芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、苏云金

芽孢杆菌等不仅可以产生保护性内生孢子, 还可以在厌氧条件下产生更多的乳酸^[10]。从印度东北部的阿萨姆邦土壤中分离到一株碱性纤溶蛋白酶生产菌 (AS-S20), 经多相分类方法鉴定为芽孢杆菌^[11]。一株能产生 5 种碱性且耐热性淀粉酶的分离株也被鉴

定为芽孢杆菌属^[12]。芽孢杆菌 SC27 是从红树林特殊的生态环境中分离到的, 并经人工反复诱变后选育出的一株芽孢杆菌突变株, 它不仅能产生乳酸, 而且也能产生蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶和抑菌活性物质, 且活性物质能抵抗高温和蛋白酶的处理, 这些生物特性在开发微生态制剂方面具有一定的优势, 该菌株的出发菌株在和其它 2 种芽孢杆菌制成的益生素进行一系列研究时, 发现能够显著提高三黄鸡的平均日增质量, 对三黄鸡的血清钙、磷、球蛋白等指示均有提高, 同时也能不同程度地提高脾脏、胸腺和法氏囊指数^[5], 但要真正成为能够安全使用的益生菌, 还需对菌株在体内定居状态、是否产毒、遗传毒性等进行相关的生物安全评价的研究^[13-14]。

经 GC-MS 分析, 测定出芽孢杆菌 SC27 的胞外代谢产物主要成分是二丁基羟基甲苯、二甲基二甲氧基硅烷, 且与计算机内存的标准质谱库比较相似度在 95% 以上。其中二丁基羟基甲苯用于药剂、化妆品、食品中油和脂肪的抗氧化剂, 可延迟或防止油、脂肪氧化酸败, 并能防止脂溶性维生素失活。二甲基二甲氧基硅烷可用作结构控制剂、扩链剂, 改善机械加工性能, 延长混炼胶的储存时间^[15]。没有测出已知的抗菌化合物, 但 GC-MS 测出 2 种化合物分别与贝美格和 4-氯-2-硝基苯甲醇相似, 相似度为 78% 和 75%, 其中 4-氯-2-硝基苯甲醇有抑菌作用, 可用于防腐剂。该菌的胞外代谢产物的抑菌作用是否与这两种物质有关, 并且它们是何种物质尚有待于进一步研究与鉴定。

参 考 文 献

- [1] Fuller R. Probiotics in man and animals[J]. J Appl Bacteriol, 1989, 66(5): 365-378.
- [2] Benyacoub J, Czarnecki-Maulden GL, Cavadini C, et al. Supplementation food with *Enterococcus faecium* (SF68) stimulates immune functions in young dogs[J]. J Nutr, 2003, 133(4): 1158-1162.
- [3] 李君丰, 吴垠. 不同种类微生态制剂在水产养殖中使用的有效性[J]. 中国微生态学杂志, 2010, 22(12): 1147-1149.
- [4] Abriouel H, Maqueda M, Gálvez A, et al. Inhibition of bacterial growth, enterotoxin production, and spore outgrowth in strains of *Bacillus cereus* by bacteriocin AS-48[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(3): 1473-1477.
- [5] 徐春厚, 潘俊福, 相菲, 等. 3 株乳酸芽孢杆菌的筛选、初步鉴定及应用试验[J]. 华南农业大学学报, 2010, 31(2): 117-120.
- [6] 刘颖, 潘俊福, 谢为天, 等. 乳酸芽孢杆菌 SC 复合诱变与选育[J]. 中国酿造, 2010(1): 58-60.
- [7] 王振华. 高产酶活芽孢杆菌筛选及对奶牛生产性能影响的研究[D]. 雅安: 四川农业大学博士毕业论文, 2006.
- [8] 姜锡瑞. 酶制剂应用手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [9] 何宁, 王昌禄, 顾晓波, 等. 杯碟法检测乳酸菌素活性优化条件的研究[J]. 天津轻工业学院学报, 1999(2): 17-20.
- [10] Ohara H, Yahata M. L-Lactic acid production by *Bacillus* sp. in anaerobic and aerobic culture[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1996, 81(3): 272-274.
- [11] Mukherjee AK, Rai SK. A statistical approach for the enhanced production of alkaline protease showing fibrinolytic activity from a newly isolated Gram-negative *Bacillus* sp. strain AS-S20-I[J]. N Biotechnol, 2011, 28(2): 182-189.
- [12] Murakami S, Nagasaki K, Nishimoto H, et al. Purification and characterization of five alkaline, thermotolerant, and maltotetraose-producing α -amylases from *Bacillus halodurans* MS-2-5, and production of recombinant enzymes in *Escherichia coli*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2008, 43(4/5): 321-328.
- [13] Vesterlund S, Vankerckhoven V, Saxelin M, et al. Safety assessment of *Lactobacillus* strains: presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 116(3): 325-331.
- [14] Anadón A, Martínez-Larrañaga MR, Aranzazu Martínez M. Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2006, 45(1): 91-95.
- [15] 王江波, 辛忠, 陆馨. 微米级共聚有机硅球的制备工艺[J]. 华东理工大学学报: 自然科学版, 2008, 34(5): 694-698.