

短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 代谢产物活性物质提取方法的优化

黄素芳, 车建美, 刘波, 史怀, 苏明星, 陈峰

(福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福建 福州 350003)

摘要: 为分析短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 代谢产物中的活性物质成分, 对其提取方法进行了优化, 大孔树脂提取法为最佳的提取方法, 其活性物质得率为 $1.593 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 且抑菌活性高于氯仿萃取法所得的活性物质的活性。确定了短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 代谢产物活性物质收集的最佳方案为: 将短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 发酵液常温 $3600 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 取上清液, 按比例与 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 大孔树脂 AmberliteXAD16 混合, 28°C 、 $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡 4 h 后, 填柱, 并用水洗柱后, 采用 3 倍洗脱体积的丙酮洗脱, 收集丙酮洗脱液, 40°C 旋转蒸发进行浓缩, 所得物质即为短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 代谢产物的活性物质。

关键词: 短短芽孢杆菌; 活性物质; 大孔树脂提取法

中图分类号: S 476

文献标识码: A

Optimizing of Extraction for Active Substances from Metabolites of *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX

HUANG Su-fang, CHE Jian-mei, LIU Bo, SHI Huai, SU Ming-xing, CHEN Zheng

(Agricultural Bio-Resources Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China)

Abstract: Different extraction methods were compared in extracting of active substances from metabolites of *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX. It macroporous resin method provided the best effect in extraction with $1.593 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Antibacterial activities of the extract was higher in it by macroporous resin method than it by the chloroform. The optimal procedures applied for extraction of active substances were: centrifuging the fermentation broth of FJAT-0809-GLX at 3600 rpm for 30 min, mixing the supernatant with $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ macroporous resin (AmberliteXAD16) and then vortexing for 4 h at 160 rpm , 28°C ; filling the column with the mixture and eluting it with acetone in the ratio of 3 times in given volum of extraction. The eluent was collected and concentrated rotary evaporation at 40°C .

Key words: *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX; active substance; macroporous resin column

关于不同生防菌活性物质的提取方法有许多种, 包括硫酸铵沉淀法、大孔树脂吸附法以及有机溶剂萃取法等^[1~6]。采用有机溶剂萃取法是根据不同物质成分在不同有机溶剂中的溶解度差异而把不同物质分离出来。杨利珍等研究疣孢青霉菌 YL-52 的发酵液粗提物时发现, 对苹果干腐、苹果腐烂、番茄早疫病菌具有抑菌效果的是该菌株的乙酸乙酯提取部分^[2]。朱立等^[3]发现经氯仿-甲醇提取后得到的链霉菌 YH-UV-2 红褐色抑菌物质粗提物的

MIC 为 $68.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。李一青等采用生物活性追踪结合色谱分离的方法, 从藤黄灰链霉菌 ECO00001 的菌丝体丙酮粗提物中分离得到 2 个活性化合物^[4]。姬生宝等通过大孔树脂吸附等方法对藤黄灰链霉菌 H103 发酵液的抗真菌活性成分进行了分离和纯化, 得到纯度较高的活性物质结晶^[5]。

本研究小组筛选到 1 株短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX (*Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX), 该菌株对不同的病原菌具有很好的抑制作用。

收稿日期: 2011-01-02 初稿; 2011-06-19 修改稿

作者简介: 黄素芳 (1969—), 女, 副研究员, 研究方向: 农业生物防治技术 (E-mail: hsf16170@sina.com)

通讯作者: 刘波 (1957—), 男, 研究员, 博士, 研究方向: 微生物生物技术与农业生物药物 (E-mail: fzliubo@163.com)

基金项目: 农业部“引进国际先进农业科学技术”重点项目 (2011-G25); 公益性行业 (农业) 科研专项 (200903034); 福建省财政专项——福建省农业科学院科技创新团队建设基金 (STIF-Y03); 福建省农科院科技下乡“双百”行动科技计划项目 (sbmn1104-2); 福建省青年创新基金项目 (2011J05053)

用^[7-9], 为了进一步分析短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 代谢产物中活性物质的成分, 本研究对活性物质提取方法进行了优化, 以期为后续活性物质的大量收集和主要功能成分分析奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

菌株: 短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 和大肠杆菌 K88; 培养基均为 NA 培养基; 试剂: 氯仿、丙酮和二甲基亚砜 (DMSO) 均为分析纯。大孔树脂 AmberliteXAD16 购自百迪信 (北京) 科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 短短芽孢杆菌代谢产物中活性物质提取方法的筛选 菌株培养: 挑取 1 环新鲜培养的短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 至 1 000 mL 液体 NA 培养基中, 28~30℃、180 r·min⁻¹ 振荡培养 48 h 后, 用于活性物质的提取。

短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 代谢产物中活性物质的大孔树脂提取法: 将短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 发酵液常温 3 600 r·min⁻¹ 离心 30 min, 取上清液, 与 30 g 大孔树脂 AmberliteXAD16 混合, 28℃、160 r·min⁻¹ 振荡 4 h 后, 填柱, 丙酮洗脱, 收集丙酮洗脱液, 40℃ 旋转蒸发进行浓缩。

短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 代谢产物中活性物质的萃取法: 将短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 发酵液常温 3 600 r·min⁻¹ 离心 30 min, 取上清液, 加入等体积的氯仿萃取 3 次, 合并所有萃取液, 浓缩。

短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 代谢产物中活性物质的抑菌活性检测: 采用抑菌圈法。将大孔树脂法和氯仿萃取法提取的活性物质分别用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解成不同浓度 (500、250 和 100 mg·mL⁻¹) 备用。将在 NA 培养基培养的大肠杆菌 K88 目标菌株单菌落挑至装在 250 mL 三角瓶中的 25 mL NA 培养液中, 30℃、160 r·min⁻¹, 培养 24 h, 吸取培养液 1 mL, 加入到熔化并冷却到 50℃ 的 6 mL 0.7% 琼脂的 NA 培养基内, 混合均匀后, 作为上层培养基, 倾覆在预先已凝固的 NA 平板上。待上层培养基凝固后, 在每块平板上打孔, 用移液器分别向每个孔中加入 50 μL 提取物, 然后将平板放置在 30℃ 培养箱培养 48 h 后, 测定抑菌圈直径。阳性对照为 100 mg·mL⁻¹ 硫酸链霉素。

1.2.2 短短芽孢杆菌代谢产物中活性物质大孔树脂提取法的优化 不同振荡时间对短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 代谢产物中活性物质得率的影响: 将 2 L 短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 发酵液常温 3 600 r·min⁻¹ 离心 30 min, 取上清液, 与 60 g·L⁻¹ 大孔树脂 AmberliteXAD16 混合, 28℃、静置 4 h、160 r·min⁻¹ 振荡 2、4、8 和 16 h 后, 填柱, 并用水洗柱后, 丙酮洗脱, 收集丙酮洗脱液, 40℃ 旋转蒸发进行浓缩, 测定所得物质的重量, 比较提取条件特点。

不同洗脱体积对短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 代谢产物中活性物质得率的影响: 将 2 L 短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 发酵液常温 3 600 r·min⁻¹ 离心 30 min, 取上清液, 与 60 g·L⁻¹ 大孔树脂 AmberliteXAD16 混合, 28℃、160 r·min⁻¹ 振荡 4 h 后, 填柱, 并用水洗柱后, 采用 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍和 5 倍洗脱体积的丙酮进行洗脱, 收集丙酮洗脱液, 40℃ 旋转蒸发进行浓缩, 测定所得物质重量, 比较提取条件的特点。

不同大孔树脂量对短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 代谢产物中活性物质得率的影响: 将 2 L 短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 发酵液常温 3 600 r·min⁻¹ 离心 30 min, 取上清液, 按比例与 20、40、60、80 和 100 g·L⁻¹ 大孔树脂 AmberliteXAD16 混合, 28℃、160 r·min⁻¹ 振荡 4 h 后, 填柱, 并用水洗柱后, 采用 4 倍洗脱体积的丙酮洗脱, 收集丙酮洗脱液, 40℃ 旋转蒸发进行浓缩。短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 代谢产物中活性物质得率=所得物质重量 (g) / [发酵液体积 (L) × 大孔树脂用量 (g·L⁻¹)]。

2 结果与分析

2.1 短短芽孢杆菌代谢产物中活性物质提取方法的筛选

2 种方法提取的短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 代谢产物中活性物质的得率有所不同, 大孔树脂法提取的物质得率较高, 为 1.59 g·L⁻¹, 氯仿萃取法提取的物质得率为 0.27 g·L⁻¹ (图 1)。

从对大肠杆菌 K88 的抑菌效果来看, 大孔树脂提取法提取的物质抑菌效果大于氯仿萃取法, 100 mg·mL⁻¹ 大孔树脂提取法提取的活性物质抑菌圈直径为 27.33 mm, 而氯仿萃取法提取的相同浓度的活性物质抑菌圈直径则为 15.00 mm, 由于氯仿萃取后的水相也具有较大的抑菌活性, 抑菌圈直径为 25.96 mm (图 2、图 3、表 1), 推测采用

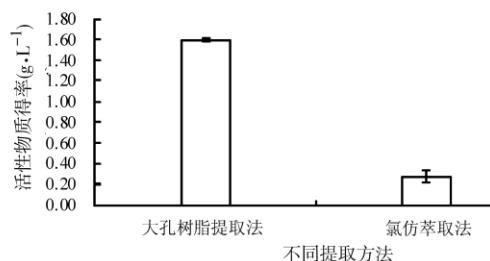


图 1 不同提取方法提取的短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 代谢产物中活性物质得率比较

Fig. 1 Extraction rates of active substance from metabolites of *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX with different extraction methods

氯仿萃取法不能将短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 活性物质全部提取出来, 因而采用大孔树脂提取法更为合适。

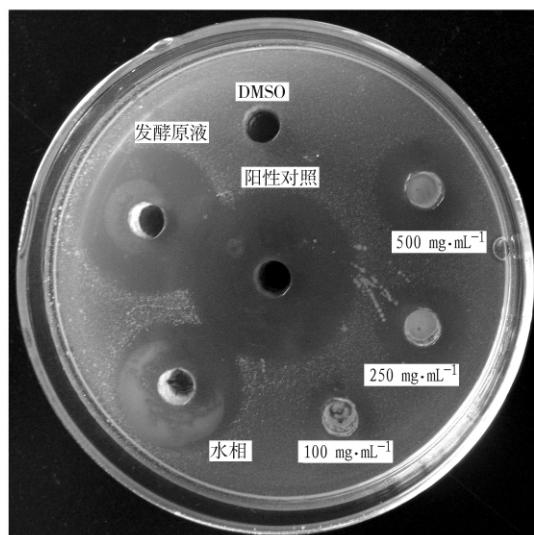


图 2 氯仿萃取法提取的短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 代谢产物中粗提物的抑菌活性

Fig. 2 Antibacterial activity of extract from metabolites of *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX with chloroform extraction

2.2 短短芽孢杆菌代谢产物中活性物质大孔树脂提取方法的优化

2.2.1 不同振荡时间对短短芽孢杆菌代谢产物中活性物质得率的影响 不同振荡时间对短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 代谢产物中活性物质得率的影响不同 ($P < 0.05$), 随着振荡时间的延长, 活性物质得率呈现先增加后减少的趋势。振荡 4 h, 得率最高, 为 $1.65 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 当振荡 0 h(静置 4 h)时, 得率最少, 为 $1.07 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 4)。当延长振荡时间时, 由于上清液比较容易污染其他细菌, 从

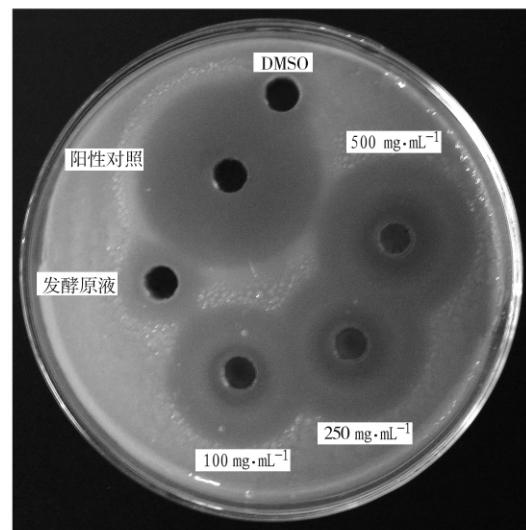


图 3 大孔树脂提取法提取的短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 代谢产物中粗提物的抑菌活性

Fig. 3 Antibacterial activity of extract from metabolites of *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX with macroporous resin column

而导致大孔树脂成团而不容易洗脱。因而, 在进行短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 代谢产物中活性物质收集时, 最佳振荡时间为 4 h。

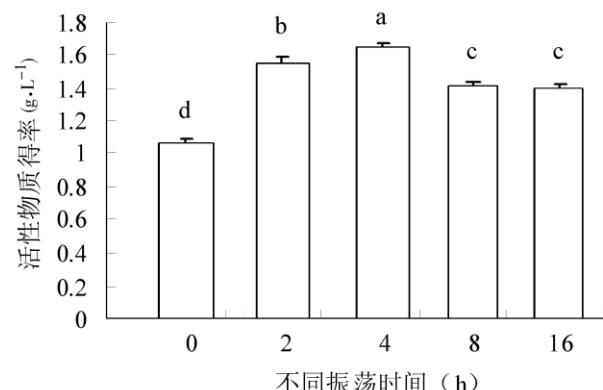


图 4 不同振荡时间对短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 代谢产物中活性物质得率的影响

Fig. 4 Effect of shaking time in extraction rates of active substance from metabolites of *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX

2.2.2 不同洗脱体积对短短芽孢杆菌代谢产物中活性物质得率的影响 不同洗脱体积对短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 代谢产物中活性物质得率的影响有所不同, 随着洗脱体积的增加, 活性物质得率呈先增加后减少的趋势。当采用 1 倍洗脱体积时, 得率最低, 为 $1.45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 当采用 3 倍洗脱体积时, 活性物质得率最高, 为 $1.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 当洗脱

体积增加到 5 倍时, 活性物质得率有所减少, 为 $1.57 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 5), 但采用 3、4 和 5 倍洗脱体积时, 活性物质得率差异不大 ($P < 0.05$)。因而, 在进行短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 代谢产物中活性物质收集时, 最佳丙酮洗脱体积为 3 倍洗脱体积。

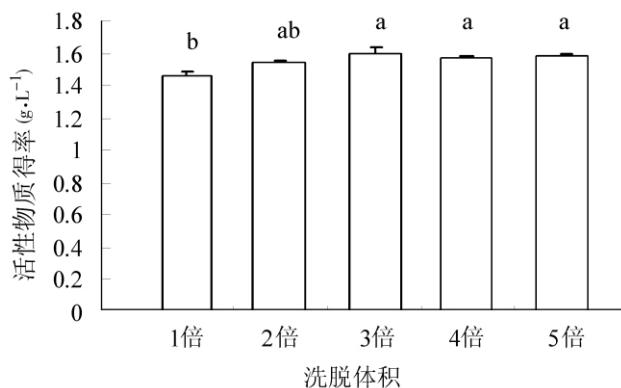


图 5 不同洗脱体积对短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 代谢产物中活性物质得率的影响

Fig. 5 Effect of elution volume in extraction rates of active substance from metabolites of *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX

2.2.3 不同大孔树脂量对短短芽孢杆菌代谢产物中活性物质得率的影响 不同大孔树脂量对短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 代谢产物中活性物质得率影响有所不同, 随着大孔树脂量的增加, 活性物质

得率先增加后减少。大孔树脂量为 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 得率为每克大孔树脂吸附得到 0.023 g 活性物质, 大孔树脂量为 20 、 60 和 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的得率差异不显著 ($P > 0.05$)。大孔树脂量为 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 得率最大, 与其他处理差异显著 ($P < 0.05$), 为每克大孔树脂吸附得到 0.031 g 活性物质 (图 6)。因而, 在进行短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 代谢产物中活性物质收集时, 最佳大孔树脂用量为 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

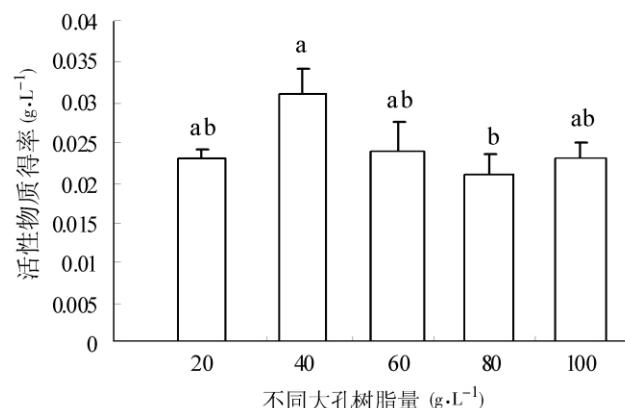


图 6 不同大孔树脂量对短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 代谢产物中活性物质得率的影响

Fig. 6 Effect of macroporous resin amount in extraction rates of active substance from metabolites of *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX

表 1 不同提取方法提取的短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 代谢产物中粗提物的抑菌效果

Table 1 Antibacterial activity of extract from metabolites of *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX with different extraction methods (mm)

提取方法	($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	水相
大孔树脂提取法	27.33	29.33	30.33	—
氯仿萃取法	15.00	18.02	20.45	25.96

3 讨 论

大孔树脂是一种有机高分子聚合物, 不溶于有机溶剂, 应用大孔树脂进行不同物质的分离技术是继离子交换树脂后的主要分离新技术之一^[10]。大孔树脂具有吸附容量大、物理化学稳定性高、选择性好、吸附速度快、使用周期长和用量节省等诸多优点^[11]。大孔树脂纯化技术作为医药、食品等工业中极具发展前景的实用新技术之一, 在生物碱类、黄酮类和微生物药物等主要活性成分的提取与分离中得到广泛应用^[12-15]。

对大孔树脂提取方法的优化可为微生物药物和中药材等主要活性成分的工业化生产提供理论依据。徐清萍等以吸附量、吸附率、解吸量和解吸率为指标, 确定了大孔树脂 XAD-16 对甘草黄酮的最佳分离工艺条件^[16]。在本研究中, 为了确定短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 代谢产物中活性物质的成分, 对其活性物质提取方法进行了优化, 结果表明其代谢产物中活性物质收集的最佳方案为: 将短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 发酵液常温 $3600 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min , 取上清液, 按比例与 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 大孔树脂 Amberlite XAD16 混合, 28°C 、

160 $r \cdot min^{-1}$ 振荡 4 h 后, 填柱, 并用水洗柱后, 采用 3 倍洗脱体积的丙酮洗脱, 收集丙酮洗脱液, 40℃ 旋转蒸发进行浓缩, 所得物质即为短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 代谢产物中的活性物质。

对于短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 代谢产物中的活性物质提取方法的优化, 可为进行活性物质的工业化生产提供一定的依据, 当然在进行大规模生产时, 还需要进一步对其更为详细的工艺参数进行优化。

参考文献:

- [1] MOHAMMED S H M, SAEDY A E, ENAN M R, et al. Biocontrol efficiency of *Bacillus thuringiensis* toxins against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* [J]. *Journal of cell and molecular biology*, 2008, 7 (1): 57—66.
- [2] 杨利珍, 周乐, 徐虹, 等. 一株青霉菌的分离鉴定及抑菌活性成分研究 [J]. 西北农业学报, 2009, 18 (4): 98—102.
- [3] 朱立, 叶明, 刘冬, 等. 一株链霉菌菌株选育及其抑菌粗提物研究 [J]. 合肥工业大学学报: 自然科学版, 2010, 33 (2): 289—292.
- [4] 李一青, 刘树芳, 李铭刚, 等. 藤黄灰链霉菌 ECO00001 菌株中寡霉素 A 和 C 的分离鉴定及其活性 [J]. 植物保护学报, 2008, 35 (1): 47—50.
- [5] 姬生宝, 范晋勇, 元英进. 藤黄灰链霉菌-H103 发酵液中抗真菌活性成分的分离纯化 [J]. 微生物学通报, 2005, 32 (3): 77—81.
- [6] 王伟, 李术娜, 李红亚, 等. 大丽轮枝菌拮抗细菌菌株 12-51 的筛选鉴定与抗菌物性质分析 [J]. 中国农学通报, 2009, (19): 14—19.
- [7] 葛慈斌, 刘波, 蓝江林, 等. 生防菌 JK-2 对尖孢镰刀菌抑制特性的研究 [J]. 福建农业学报, 2009, 24 (1): 29—34.
- [8] 黄素芳, 肖荣凤, 杨述省, 等. 短短芽孢杆菌 JK-2 胞外物质抗香蕉枯萎病菌的稳定性 [J]. 中国农学通报, 2010, 26 (18): 284—288.
- [9] 陈璐, 苏明星, 刘波, 等. 动物饲用益生菌 LPF-2 对大肠杆菌抑制作用的培养条件优化 [J]. 中国农学通报, 2009, (16): 13—16.
- [10] 高彦宇, 滕林, 马育轩, 等. 大孔吸附树脂法分离纯化乌腺金丝桃总黄酮的研究 [J]. 中医药学报, 2010, 38 (4): 46—47.
- [11] 张英, 李卫民, 高英. 大孔树脂 AB-8 吸附盐酸小檗碱的动力学研究 [J]. 广东药学院学报, 2010, 26 (2): 145—148.
- [12] 蔡寅, 张芳, 顾觉奋. 大孔吸附树脂在微生物制药分离纯化应用上的最新进展 [J]. 离子交换与吸附, 2008, 24 (5): 473—480.
- [13] 李倩霞, 蒋林, 杨得坡, 等. 大孔吸附树脂分离岩黄连总生物碱的研究 [J]. 中国医药工业杂志, 2009, 40 (10): 750—754.
- [14] 周欣, 范国荣. 短瓣金莲花总黄酮大孔树脂纯化工艺研究 [J]. 中药材, 2009, 3 (9): 1450—1454.
- [15] 王大红, 陶文沂. 粘细菌 *Stigmatella WXNXJ-B* 产生抗肿瘤物质的研究 [J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29 (1): 104—109.
- [16] 徐清萍, 朱广存. XAD-16 大孔树脂分离甘草黄酮的研究 [J]. 河北工业大学学报: 自然科学版, 2010, 31(1): 49—52.

(责任编辑: 柯文辉)