

文章编号: 1004 - 7271(2001)04 - 0333 - 05

## 一种微生物制剂中抑菌物质的分离与鉴定

陈有容, 李淑侠, 齐凤兰

(上海水产大学食品学院, 上海 200090)

**摘要:**植物乳杆菌发酵产生的抑菌物质经乙醇浸提、Sephadex G-15层析、氨基酸组成分析、反相液相色谱分离及鉴定,发现该植物乳杆菌产生的抑菌物质为一类分子量较小(小于1000Da),且比较接近,极性不同的多肽。

**关键词:**抑菌物质;植物乳杆菌;凝胶色谱;反相色谱

中图分类号:TS201.3 文献标识码:A

## Purification and identification of antibacterial substance in a kind of microecological modulator

CHEN You-rong, LI Shu-xia, QI Feng-lan

(College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** The *Lactobacillus plantarum* studied was previously found to produce wide-spectrum antibacterial substance. Purification methods of the antibacterial substance were studied in this paper. Ethanol extraction, sephadex G-15 gel chromatography and reverse phase chromatography were used to purify the antibacterial substance. Amino acid composition of the antibacterial substance was detected. According to the result, it could be concluded that the *L. Plantarum* produced several kinds of low-weight molecular, polypeptide-like antibacterial substance

**Key words:** antibacterial substance; *L. plantarum*; gel chromatography; reverse phase chromatography

乳酸菌是一类可发酵利用碳水化合物而产生大量乳酸的细菌的总称,乳酸菌产生的有机酸、过氧化氢、细菌素等活性物质,可阻止或杀灭病原微生物在体内的定植,因而乳酸菌制品对人体具有良好保健作用。很多乳酸菌都能产生细菌素,细菌素(bacteriocin)是某些细菌在代谢过程中产生的一类具有抑菌活性的多肽,抑菌范围不是仅局限于同源的几种细菌,产生菌对其细菌素有自身免疫性。提取及分离纯化是关系到细菌素的功效评价和结构鉴定的非常关键的一环。细菌素一般为多肽或蛋白质,蛋白质的分离纯化方法常用来分离提纯细菌素。已经发现本文所研究的植物乳杆菌能够产生广谱的抑菌物质<sup>[1]</sup>。根据其性质推测该抑菌物质可能为乳酸菌细菌素类抑菌物质,本试验在已有的研究基础上,对抑菌物质进行分离纯化并进行组成鉴定。

收稿日期:2001-06-25

第一作者:陈有容(1943-),男,上海人,教授,主要从事食品发酵工程研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

Sephadex G-15,pharmacia 原产;透析袋,8000Da,1000 Da,华美生物工程公司;600 Da 超滤膜,购自上海医药工业研究院亚东核级树脂有限公司。

指示菌为 *Bacillus cereus*,由本校微生物教研室提供;植物乳杆菌发酵液冻干粉,自制。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 抑菌活性检测方法

抑菌活性检测采用杯碟法见文献[2]。

#### 1.2.2 抑菌物质的初步分离

发酵液冻干粉用 95% 乙醇浸泡后离心,收集上清液,37℃ 水浴条件下使乙醇完全挥发,残留物用水(加入水的体积为原发酵液体积的 1/50)溶解,离心收集上清液(以后简称为 S1)。用 Folin 酚法<sup>[3]</sup> 来检测 S1 中是否含有肽类物质。

#### 1.2.3 抑菌物质分子量范围的确定

S1 用截留值为 1000Da 透析袋和截留值为 600 Da 的超滤膜进行处理<sup>[3]</sup>,对比处理前后其活性变化。

#### 1.2.4 凝胶柱层析法分离抑菌物质

S1 经 Sephadex G-15 柱(16mm×60cm)分离<sup>[4,5]</sup>,洗脱液为 pH 4.0 的磷酸缓冲液,流速 0.4mL/min,用核酸蛋白检测仪在 280nm 处检测,每 10min 收集一管。将各峰的组分合并,检测其抑菌活性。

#### 1.2.5 抑菌物质的氨基酸组成分析

凝胶柱层析法分离出的活性组分经酸水解(6mol/L HCl,110℃ 水解 18h),水解前后分别用氨基酸分析仪分析氨基酸的组成及含量的变化。

#### 1.2.6 反相色谱法分离抑菌物质

凝胶柱层析法分离出的活性组分用反相色谱法进行分离,色谱柱为 ODS 柱,检测波长 280nm;用 A、B 两种缓冲液进行梯度洗脱,A 液为 pH4.4 的甲酸铵缓冲液,B 液由 80% 甲醇,20% A 液组成;流速为 1.00mL/min。时间程序为 B 液在前 30min 的含量为 5%,在 30min 内 B 由 5% 上升到 95%,维持 80min,接着在两分钟内 B 液由 95% 降至 5%,然后维持 30min。

## 2 结果与讨论

### 2.1 抑菌物质的初步分离

发酵液冻干粉经乙醇浸提后,活性成份存留在 S1 中,Folin 酚法检测结果表明 S1 中含有蛋白类物质。

### 2.2 抑菌物质分子量范围的确定

膜过滤试验结果表明,截留值为 1000Da 的透析袋和截留值为 600Da 的超滤膜未能将抑菌物质阻留。因为膜对不同分子量大小的分子截留情况不同,因此可以推断待测抑菌物质的分子量很小,可能小于 1000Da,以此为依据,选用 Sephadex G-15 对抑菌物质进行分离。

### 2.3 凝胶层析法分离抑菌物质

试样经 Sephadex G-15 凝胶层析后,共有五个峰出现,如图-1 所示;洗脱时间分别为 129,192,224,266,335min,按先后顺序分别将其表示为:1,2,3,4,5。收集各组分浓缩 10 倍后测其抑菌活性,抑菌试验结果见图-2 所示,其中的数字分别代表相应峰的组分,6 为 pH4.0 的磷酸缓冲液。结果表明 2,3 组分(分别用 A、B 表示)表现出抑菌活性。显示活性的的两种组分的洗脱时间比较接近,A 为 192min,B 为 224min。

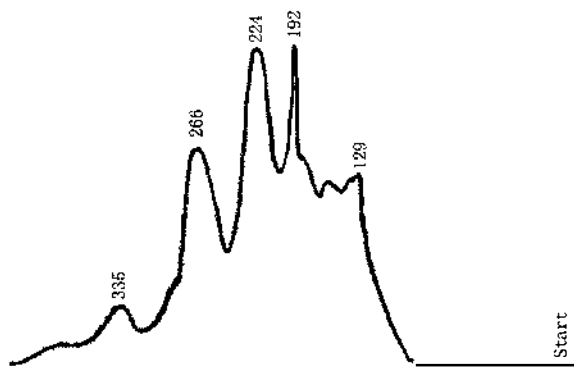


图 1 S1 的 Sephadex G-15 凝胶层析图

Fig.1 Gel chromatogram of S1 by Sephadex G-15. 五个组分的洗脱时间(单位:min)如上图所示, 按先后次序分别用 1,2,3,4,5 表示。

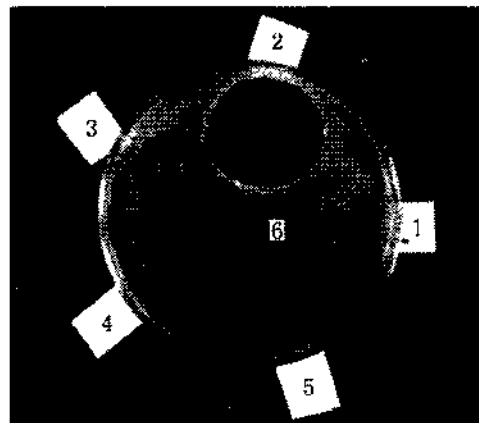


图 2 S1 的 Sephadex G-15 层析各组分抑菌试验结果

Fig.2 Inhibitory activity of five peaks eluted by Sephadex G-15 chromatography. 其中 1,2,3,4,5 分别代表相应峰的组分, 6 代表相应浓度的磷酸缓冲液。

### 2.4 两种抑菌物质的氨基酸组成分析

#### 2.4.1 A 组分氨基酸分析

A 组分氨基酸分析结果见图-3、图-4 及表-1。A 组分经水解后氨基酸组成有非常明显的变化。其中,丝氨酸,谷氨酸,脯氨酸,甘氨酸,丙氨酸,鸟氨酸,胱氨酸,缬氨酸,组氨酸九种氨基酸的含量明显增加,且水解后样品的抑菌活性完全消失。由此可以推断 A 组分中的抑菌物质主要是由以上九种氨基酸组成的多肽类物质。

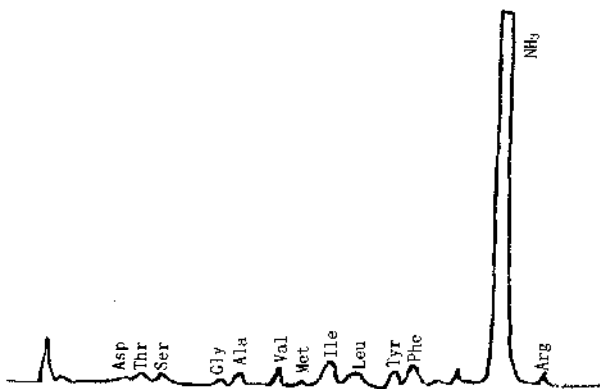


图 3 A 组分酸水解前氨基酸分析图

Fig.3 Chromatogram of amino acid in A before acid hydrolysis

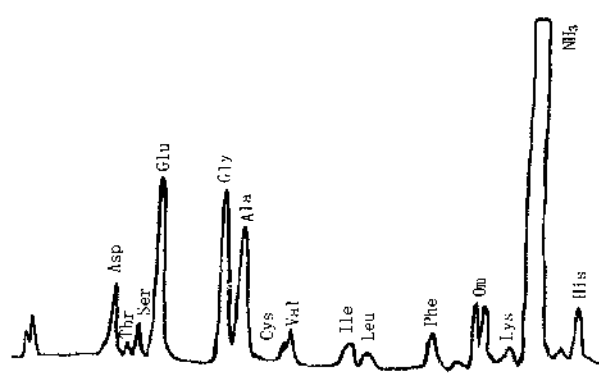


图 4 A 组分酸水解后氨基酸分析图

Fig.3 Chromatogram of amino acid in A after acid hydrolysis

#### 2.4.2 B 组分氨基酸分析

B 组分氨基酸分析结果见图-5 和图-6 及表-2。B 组分水解后谷氨酸,甘氨酸,丙氨酸,胱氨酸,缬氨酸,苯丙氨酸,组氨酸七种氨基酸的含量明显增加。推断 B 组分的抑菌物质主要是由以上七种氨基酸组成的多肽类物质。

表 1 A 组分水解前后各类氨基酸含量的变化  
Tab.1 Changes of the concentration of amino acid in a after hydrolysis (mg/mL)

氨基酸	水解前	水解后	氨基酸增加量	氨基酸	水解前	水解后	氨基酸增加量
天冬氨酸	0.00047	0.028	0.02753	甲硫氨酸	0.0010	0.0010	0
苏氨酸	0.0020	0.0043	0.0023	异亮氨酸	0.0076	0.010	0.0024
丝氨酸	0	0.0064	0.0064	亮氨酸	0.0039	0.004	0
谷氨酸	0.00073	0.082	0.08127	苯丙氨酸	0.0080	0.010	0.002
脯氨酸	0	0.032	0.032	鸟氨酸	0	0.011	0.011
甘氨酸	0.00056	0.032	0.03144	赖氨酸	0	0.002	0.002
丙氨酸	0.0020	0.045	0.043	组氨酸	0	0.012	0.012
胱氨酸	0	0.0086	0.0086	精氨酸	0.00086	0.003	0.00214
缬氨酸	0.0026	0.0086	0.0060				
游离氨基酸总量					0.0328		
水解后的氨基酸总量					0.350		
氨基酸增加量					0.32		

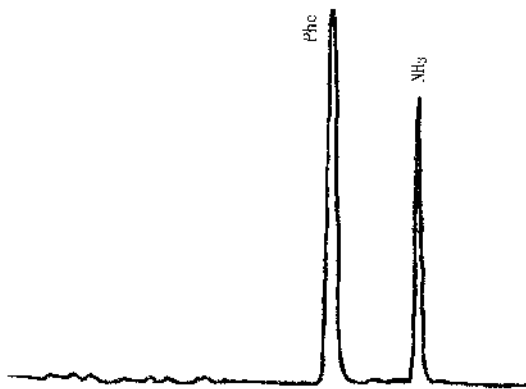


图 5 B 组分酸水解前氨基酸分析图  
Fig.5 Chromatogram of amino acid in B before acid hydrolysis

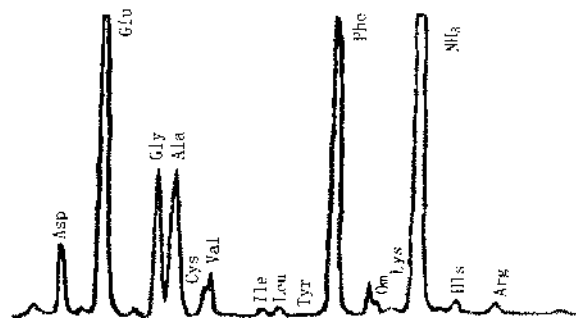


图 6 A 组分酸水解后氨基酸分析图  
Fig.6 Chromatogram of amino acid in B after acid hydrolysis

表 2 B 组分水解前后各类氨基酸含量的变化  
Tab.2 Changes of the concentration of amino acids in B after hydrolysis (mg/mL)

氨基酸	水解前	水解后	氨基酸增加量	氨基酸	水解前	水解后	氨基酸增加量
天冬氨酸	0	0.014	0.014	缬氨酸	0	0.0062	0.0062
谷氨酸	0	0.14	0.14	酪氨酸	0	0.0031	0.0031
甘氨酸	0	0.016	0.016	苯丙氨酸	0.062	0.012	0.012
丙氨酸	0	0.026	0.026	组氨酸	0	0.031	0.031
胱氨酸	0	0.013	0.013	精氨酸	0	0.002	0.002
游离氨基酸总量	0.062						
水解后的氨基酸总量	0.350						
氨基酸增加量	0.029						

综合以上试验结果可知,虽然用 Sephadex G-15 对抑菌物质进行分离时, A、B 两组分洗脱时间非常接近,即它们的分子量比较接近,但它们的组成却有较大差异,并可推测 A、B 中的抑菌物质均为多肽,即它们为乳酸菌细菌素类抑菌物质。

### 2.5 反相色谱法分离抑菌物质

经 Sephadex G-15 分离得到的 A、B 两组分以相同的洗脱条件经过 ODS 柱进行分离,色谱图见图-7,

图-8。A 经 ODS 分离后分别在 2.45, 57.402, 63.965min 处出现 3 个较为明显的吸收峰; B 经 ODS 分离后在 59.443 和 66.035min 处出现 2 个较为明显的吸收峰。这表明, A、B 组分是分子量相近 但极性不同, 且氨基酸组成也不同的寡肽类物质。

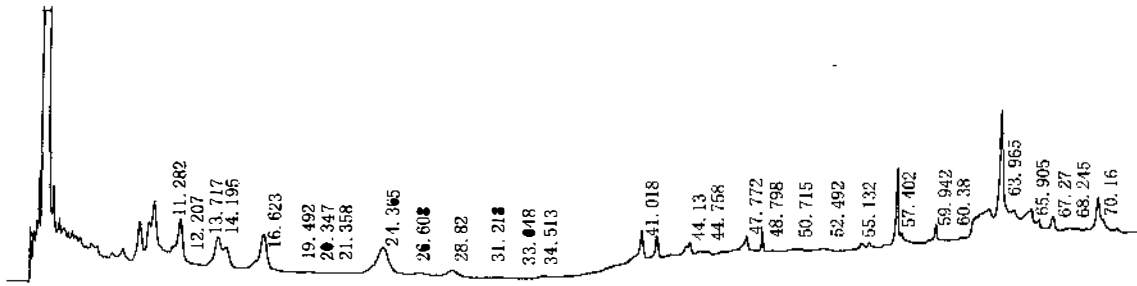


图 7 A 组分反相色谱图

Fig. 7 Reverse chromatogram of A

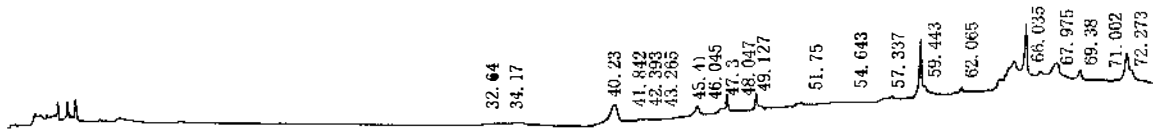


图 8 B 组分反相色谱图

Fig. 8 Reverse chromatogram of B

### 3 结论

经乙醇浸提, Sephadex G-15 层析, 水解前后的氨基酸分析及反相液相色谱分离对抑菌物质进行分离及鉴定, 推测该植物乳杆菌产生的抑菌物质为一类分子量较小(小于 1000Da), 且分子量接近, 而极性不同的多肽, 即细菌素类物质。对该类抑菌物质的结构进行进一步深入研究, 将有利于阐明其活性功能与结构的关系。

#### 参考文献:

- [1] 李淑侠, 齐凤兰, 陈有容, 等. 微生态制剂中抑菌物质的分析[J]. 上海水产大学学报, 2000(4), 329 - 333.
- [2] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1983. 35 - 88.
- [3] 苏拔贤. 生物化学制备技术[M]. 北京: 科学出版社, 1986. 189 - 218.
- [4] 李建武, 陈丽蓉, 陈雅惠, 等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994. 47 - 56.
- [5] 吴冠芸, 潘华珍. 生物化学与分子生物学实验常用数据手册[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 51 - 62.