

海洋枯草芽孢杆菌 Bs-1 产生多种抗真菌活性物质^{*}

谢海平¹, 黄 晖², 黄登峰¹, 汪 丽², 陆勇军¹

(1. 中山大学生命科学院 // 生物防治国家重点实验室, 广东 广州 510275;

2. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 从香港清水湾海域中分离到一株能产生抗酵母样真菌和革兰氏阳性菌抗生素的枯草芽孢杆菌菌株 Bs-1。对 Bs-1 产生抗生素条件的研究表明, Bs-1 在多种培养基中生长迅速, 但只在 PDB (马铃薯葡萄糖液体) 中产生抗真菌活性物质; 活性物质粗提液具有良好的耐热性和酸碱度, 121 °C 加热 15 min 及在 pH 2 和 pH 10 处理 24 h 仍有相当高的活性; 对 Bs-1 产抗生素的营养条件和影响的理化因子进行了分析; 最后用吸附、萃取、离子交换层析和 RP HPLC 等技术对此菌的抗菌代谢产物进行纯化, 结果发现 Bs-1 在 PDB 培养基中发酵时至少产生 3 种亲水性的抗真菌活性化合物, 三者在 C18 反相层析柱上的保留时间差别不大, 对 HPLC 纯化后的其中一种化合物结构的初步分析表明, 该化合物含有共轭双键但无任何氨基酸残基, 与目前已知的枯草芽孢杆菌产生的抗生素都不相同, 很可能是一种新的非肽类抗真菌化合物。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 抗真菌活性物质

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) 03-0122-02

近年来随着免疫缺陷病人 (如艾滋病) 的迅速增加及广谱抗菌药和糖皮质激素类药物在治疗上的使用, 侵入性真菌感染正逐渐成为临床上重要的致死原因之一。各种真菌感染的上升导致了抗真菌药物使用的增长, 但目前所使用的抗全身感染类真菌药物都有较严重的副作用。另一方面, 如何有效地防治植物真菌病害 (占植物病害的 80%) 一直是农业生产上亟待解决的问题。因此, 寻找新一代广谱、高效、低毒的抗真菌药物已成为当前抗生素研究的一个热点^[1]。

目前, 从陆地微生物菌种中筛选新的抗生素已经变得越来越困难, 而从海洋微生物中寻找新的抗生素已经成为开发抗生素资源的重要策略之一^[2]。芽孢杆菌由于能产生独特的抗生素类型以及其抗逆性强、繁殖快、营养要求简单的特点, 近年来, 从芽孢杆菌中开发新的抗真菌药物的研究已经引起人们的重视^[3]。本文报道对一株分离自香港清水湾海域的枯草芽孢杆菌 Bs-1 (*Bacillus subtilis*, Bs-1) 产生抗真菌活性物质的特性进行初步研究的结果。

研究表明 Bs-1 对营养条件、理化因子要求简单, 能够在各种培养基中非常迅速地生长。与标准的枯草芽孢杆菌菌株比较, Bs-1 具有更高的耐热温度和更好的耐盐性, 在 pH 在 4.5~9.5 范围和 15

~50 °C 的温度范围内, 及在含 $w=10\%$ NaCl 的培养基中, Bs-1 均能生长。Bs-1 在 PDB (马铃薯葡萄糖液体) 培养基中培养 6 h 后, 开始产生抗真菌活性物质。Bs-1 在人工海水培养基、LB、YPD 及 BPY 等培养基中发酵均不产生抗真菌活性物质。另外, 向培养基添加促芽孢生成成份、采用贫营养培养基和饥饿细胞均不能促进抗生素的产生。

将 Bs-1 在 PDB 培养基中发酵, 对发酵后抗真菌代谢产物的研究表明, 该抗真菌代谢产物对温度、pH、变性剂及蛋白酶 K 具有很好的抗性。100 °C 沸水浴 30 min 及 121 °C 高压蒸汽处理 15 min 均不影响其活性, 将发酵液分别调成 pH 2、pH 10 静置过夜, 仍保持活性。

对发酵后抗真菌代谢产物的抗菌谱进行了系统研究。结果表明, Bs-1 在 PDB 中产生的抗真菌代谢产物对酵母样真菌, 如临床上常见的致病茵白假丝酵母、新型隐球酵母等以及革兰氏阳性菌如金黄色葡萄球菌都有明显的抑菌效果, 但对大肠杆菌等革兰氏阴性菌没有抑制活性。最后, 我们应用吸附、萃取、DEAE Sephadex A-25 离子交换层析和 RP HPLC 等技术对 Bs-1 发酵后的抗真菌代谢产物进行纯化。结果发现 Bs-1 在 PDB 培养基中发酵时至少产生 3 种亲水性的抗真菌活性化合物, 三者在

^{*} 收稿日期: 2003-01-03

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (994119)

作者简介: 谢海平 (1974 年生), 男, 硕士研究生, 现在广东省海洋与渔业环境检测中心工作; 通讯联系人: 陆勇军, E-mail: ls69@zsu.edu.cn

C18 反相层析柱上的保留时间差别不大, 因此很可能是一类结构和功能相似的化合物。对其中纯化的化合物 II 的结构特征进行了初步分析。化合物 II 在 214 nm 和 254 nm 处各有一个吸收峰, 提示其分子结构中含有共轭双键; 该化合物酸水解前后对茚三酮显色均为阴性, 表明分子中不含氨基酸残基, 这与枯草芽孢杆菌抗生素绝大部分是肽类或带有氨基酸残基的现象不同, 也与目前我们所知的枯草芽孢杆菌非氨基酸类抗生素不同, 因此该化合物可能是一种新的抗真菌化合物。以上化合物的结构确定及作用机理的研究正在进行之中。

致谢: 中山大学 99 级生物技术专业的廖贵标同学参与了部分纯化工作; 感谢中山大学化学与化学工程学院天然产物研究室的林永成教授给予本工作的指导和建议。

参考文献:

- [1] WEBZEL R P, GENNINGS C, EDMOND M B. Antifungal antibiotics and breakthrough bacteremias [J]. Clin Infect Dis 2001, 32(11): 1538—1539.
- [2] AUSTIN B. Novel pharmaceutical compounds from marine bacteria [J]. J Appl Bacteriol, 1989, 67(5): 461—470.
- [3] POTERA C. From bacteria: a new weapon against fungal infection [J]. Science, 1998, 265: 605.

Antifungal Metabolites from a Marine derived *Bacillus subtilis* Bs-1: Production and Partial Characterization

XIE Hai ping¹, HUANG Hui², HUANG Deng feng¹, WANG Li², LU Yong jun¹

(1. State Key Laboratory for Biological Control //

School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The antifungal substances secreted from a marine derived *Bacillus subtilis* Bs-1 was studied in the present short report. Bs-1 was isolated from sea water samples of Clear Water Bay of Hong Kong and the PDB culture broth extract of Bs-1 can strongly inhibit the growth of yeast-like fungi and G^+ bacteria. The study of antibiotic producing condition of Bs-1 demonstrated that the growth of Bs-1 in PDB is very rapid and the antibiotic production was detected at the time point of 6 h. Surprisingly, Bs-1 did not produce any antifungal metabolites in artificial sea water medium, LB, YPD and BPY. The activity of the crude extract was very stable after had been heated to 121 °C for 15 min, and pH values from 2 to 10 for 24 h. A procedure was performed to purify the antifungal metabolites using orderly adsorption, DEAE Sephadex A-25 ion exchange chromatography and HPLC. The result showed that Bs-1 can at least produce three kinds of antifungal component in PDB. The structure of purified component II was preliminary characterized. The results demonstrated that this component contained 2 conjugated bonds but did not contain any amino acid residue, and was resistance to detergent and digestion of proteinase K, which is different from the known metabolites from other strains of *B. subtilis*, suggesting that it probably is a novel antibiotic.

Key words: *Bacillus subtilis*; antifungal metabolites