

链霉菌 HMJ-7 的鉴定及其抗菌物质稳定性分析

孙会刚¹, 高兆建¹, 何美娟¹, 蒋继志², 郑进¹

(1. 徐州工程学院 食品(生物)工程学院, 江苏 徐州 221000; 2. 河北大学 生命科学学院, 河北 保定 071002)

摘要: 为获得新型抗菌活性物质并应用于食品防腐, 用土壤溶液悬浮法从江苏徐州奎河边上土壤样品中分离到了一株链霉菌菌株, 命名为 HMJ-7。采用打孔法验证其产生的抗菌物质的抗菌能力, 结果表明: 该菌株对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、藤黄微球菌、蜡样芽孢杆菌等细菌以及酵母菌都有良好的抑制作用, 抑菌圈直径都在 2 cm 以上。对黑曲霉、黄曲霉、米曲霉等霉菌没有抑菌活性; 通过对 HMJ-7 菌株形态特征、培养特性、生理生化性状以及 16S rDNA 序列分析, 初步将该菌株鉴定为链霉菌属灰红紫类群灰红链霉菌 (*Streptomyces griseoruber*); 采用不同的温度、pH、有机溶剂、紫外线条件处理该菌株产生的抑菌活性物质, 并分别通过打孔法测定其对蜡样芽孢杆菌的抑制活性。结果显示, 这些条件对抑制活性没有明显影响, 说明该抗菌物质比较稳定。上述结果表明, HMJ-7 菌株有较大的利用潜力, 也为进一步分离纯化其抑菌物质提供了依据。

关键词: 链霉菌; 抗菌活性物质; 稳定性; 筛选; 鉴定

中图分类号: Q 935 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)11—1183—05

Identifying of *Streptomyce* HMJ-7 Producing Antibacterial Substance and Analysis of the Antibacterial Substance Stability

SUN Hui-gang¹, GAO Zhao-jian¹, HE Mei-juan¹, JIANG Ji-zhi², ZHENG Jin¹

(1. College of Food Engineering, Xuzhou Institute of Technology, Xuzhou 221000, China; 2. College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract: For obtaining new antibiotics and applying it to food preservation, A *Streptomyce* producing high antibacterial substance was screened from a sample obtained from Xuzhou kui river of Jiangsu. This strain was identified through it's morphological, physiological and biochemical properties. 16S rDNA sequence analysis of HMJ-7 showed this strain was closely to *Streptomyces griseoruber* to 99%, So, it was identified as *Griseorubro violaceus*. The antibacterial experiment result showed that the antibacterial substance can obviously inhibit the growth of *E. coli*, *Staphylococcus aureus* Rosenbach, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus* and yeast. But can't inhibit the growth of *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae* and other fungi. The following experiment result indicated that the antibacterial substance produced by this strain was stable at differen temperature, pH, ultraviolet light and organic solvent condition.

Keywords: *Streptomyce*, antibacterial substance, stability, screen, identify

收稿日期: 2012-12-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(31270577); 河北省自然科学基金项目(C2011201003); 江苏省高校自然科学基金项目(11KJD550002)。

作者简介: 孙会刚(1978—), 男, 河北内丘人, 工学博士, 讲师, 主要从事生物技术等方面的研究。E-mail: shg1022@163.com

链霉菌(*Streptomyces*)属于放线菌目链霉菌科链霉菌属,是一类存在于土壤中的好氧、丝状、产孢子的革兰氏阳性菌^[1]。链霉菌是微生物中产抗生素最多的种属,链霉菌产生的抗生素种类较多,如生物碱类^[2]、环肽和多肽类^[3]、聚酮类^[4]、大环内酯类^[5]、萜环类^[6]、萜类^[7]等,并且有多种生物学功能,如很多抗生素有抗菌、抗真菌和抗肿瘤活性的活性。还能应用于医药、植保等行业^[1]。

近年来,人们生活水平大大提高,对食品防腐的要求也越来越高,人们对食品保质保鲜要求更高,迫切需要开发新型绿色、安全的新型抗生素^[8]来进行食品防腐,从而提高食品的保质期和货架期。同时,我国微生物自然资源十分丰富,筛选产抗菌活性物质产量较高的菌种,开发天然、安全、稳定性较好的微生物抗菌活性物质用于食品防腐,具有很大潜力,也将具有更好的经济效益^[9]。作者从江苏徐州奎河边土壤中筛选到一株抑制食品腐败细菌活性较好的链霉菌菌株,对其进行形态学特征分析、生理生化及 16SrDNA 分子鉴定确定了其生物学地位,进而研究了该菌株产生的抗菌活性物质的生物学特性,对开发新型绿色安全的抗生素具有一定的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株 土样:采自徐州;蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)指示菌株:作者所在实验室保存;pMD19-T载体:购于大连宝生物有限公司。

1.1.2 培养基与抗生素 高氏培养基, LB 培养基, 氨苄青霉素质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 。

1.1.3 主要试剂 Taq 酶等分子生物学试剂:购自上海生物工程技术服务有限公司;DNA Marker:购自金斯瑞生物科技有限公司。

1.2 抑菌活性的测定

对筛选到的链霉菌于 37 $^{\circ}\text{C}$ 发酵 24 h, 3 500 r/min 离心 10min, 获得含有抗菌活性物质的上清液,采用打孔法^[10]测定抑菌物质活性。

1.3 菌株的鉴定

1.3.1 菌株的形态学特征及生理生化反应 通过平板划线观察菌落形态,生理生化实验参照瓦克斯曼的方法^[11]。

1.3.2 16SrDNA 分子鉴定及系统发育树的构建 基因组提取采用微波法^[12]。16S rDNA 序列由生海生

物工程有限公司测定,测定结果通过 NCBI 网站 blast 比对,根据同源性确定该菌株。以 Clustal X 软件进行多重序列比对,再用 MEGA4.0 软件以邻接法(neighbourjoining, NJ)构建系统发育树^[13]。

1.4 抑菌活性物质稳定性研究

1.4.1 抑菌活性物质温度稳定性研究 发酵液分别在在 60、80、100 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中处理 20 min (121 $^{\circ}\text{C}$ 为在高压灭菌锅中灭菌 20 min),测抑菌活性。

1.4.2 抑菌活性物质 pH 稳定性研究 将含有抗菌活性物质的上清液分别用盐酸和氢氧化钠溶液调 pH 为 3、7、9、12,放置过夜。用蜡样芽孢杆菌作为指示菌,用打孔法测经过处理样品的抑菌活性。

1.4.3 抑菌活性物质在有机溶剂中的溶解性 菌株 HMJ-7 的发酵液通过旋转蒸发仪蒸干,干物质用不同的有机溶剂抽提,测活性。

2 结果与分析

2.1 菌株 HMJ-7 形态特征观察

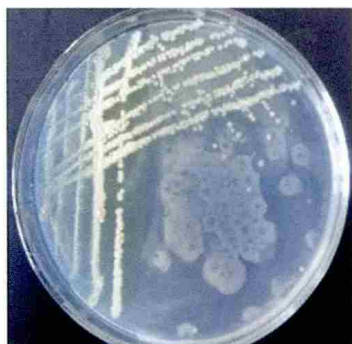
在高氏培养基上 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养,2 d 后出现灰白色致密、表面干燥的菌落,并且产黄色色素。气生菌丝灰色,基内菌丝浅橙红,见图 1a;在 PDA 培养基上出现黄色菌落,产生黄褐色色素,见图 1b;在察氏培养基上培养 2 d 后出现白色致密、表面干燥的菌落,产浅黄色色素,见图 1c。



(a) 菌株HMJ-7在高氏培养基上菌落形态



(b) 菌株HMJ-7在PDA培养基上菌落形态



(c) 菌株HMJ-7在察氏培养基上菌落形态

图 1 菌株 HMJ-7 菌落形态特征

Fig. 1 Morphological properties of strain HMJ-7

2.2 菌株生理生化特征

1HMJ-7 菌株的生理生化实验结果见表 1。该菌株能够以多种物质为惟一碳源生长,如葡萄糖、棉子糖、鼠李糖、阿拉伯糖和果糖、蔗糖。液化明胶缓慢,产酸,水解淀粉,不能在纤维素培养基上生长,不产硫化氢,但具有牛奶凝固和牛奶凝化的特性。

表 1 链霉菌 HMJ-7 生理生化特征

Table 1 Morphological,physiological and biochemical properties of *Streptomyce* HMJ-7

生理生化	结果	生理生化	结果
葡萄糖	+	明胶液化	+
蔗糖	+	产生硫化氢	-
棉子糖	+	纤维素上生长	-
鼠李糖	+	牛奶凝化	+
果糖	+	牛奶固化	+
阿拉伯糖	+	淀粉水解	+
硝酸盐还原反应	+	甲基红试验	+

注:“+”表示阳性;“-”表示阴性。

2.3 菌株分子生物学鉴定

PCR 扩增菌株 HMJ-7 的 16S rDNA 序列在 NCBI 的 GenBank 进行 Blast,与其同源性较高的菌株均属于链霉菌属,选取 13 株模式菌株进行系统发育分析,用 Clustal X 软件包 M EGA 3.1 软件构建系统进化树,见图 2。可以看出,菌株 HMJ-7 与 *Streptomyces griseoruber* (NR041086.1) 在同一进化地位上,其相似性达到 99%。

2.4 HMJ-7 菌株抑菌活性物质特性研究

2.4.1 抑菌活性物质温度稳定性 该菌株产生的抑菌物质活性具有较好的温度稳定性,经过 60~121℃高温处理仍然有很好的抑菌活性(直径能够达到 20 mm),见图 3。

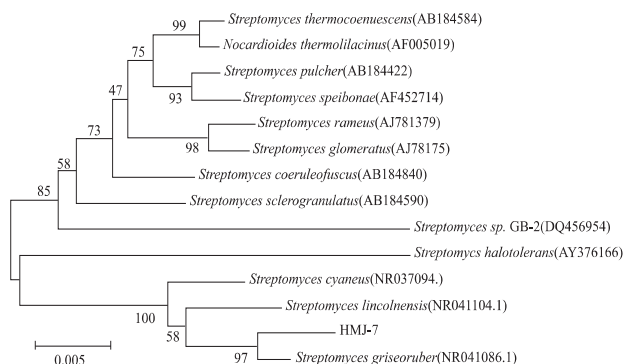
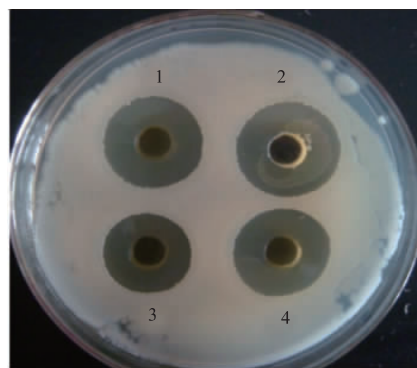


图 2 菌株 HMJ-7 的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain HMJ-7

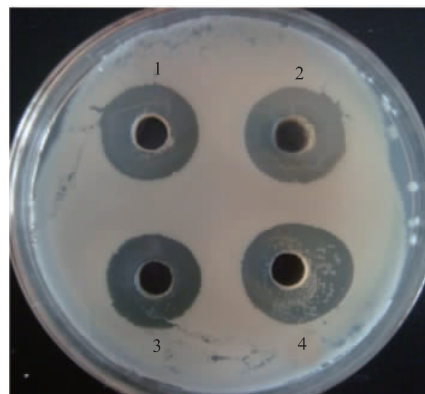


1. 60 ℃; 2. 80 ℃; 3. 100 ℃; 4. 121 ℃

图 3 温度对抑菌活性物质稳定性的影响

Fig. 3 Impact of temperature in antibiotics stability

2.4.2 HMJ-7 菌株抑菌活性物质 pH 稳定性 由图 4 可以看出,pH 值对该菌株产生的抑菌物质的影响较小,随着 pH 值的提高,抑菌物质活性基本没有发生变化,抑菌圈直径没有明显的变化,抗菌物质在 pH 3、pH 7、pH 9、pH 12 条件下处理 30 min,抑菌圈直径分别为 22、23、22、21 mm。

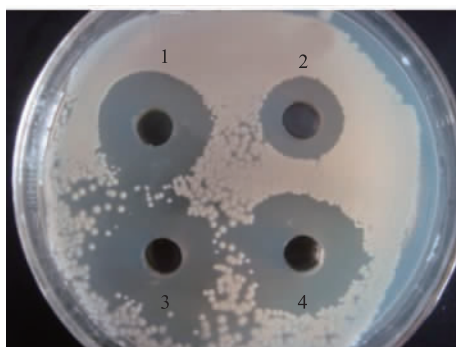


1. pH 3; 2. pH 7; 3. pH 9; 4. pH 12

图 4 pH 对抑菌活性物质稳定性的影响

Fig. 4 Impact of pH in antibiotics stability

2.4.3 HMJ-7 菌株抑菌活性物质有机溶剂稳定性
菌株 HMJ-7 产生的抑菌活性物质经不同有机溶剂抽提,结果证明该抑菌活性物质能溶解于多种有机溶剂中,且总体稳定性较好。但在极性较强的有机溶剂如氯仿、乙醇中溶解性较好,在极性较差的有机溶剂如正己烷中溶解性稍差,见图 5。

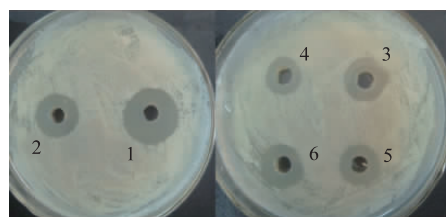


1. 甲醇; 2. 正己烷; 3. 氯仿; 4. 乙醇

图 5 不同有机溶剂对抑菌活性物质的溶解性

Fig.5 Impact of deferent organic solvent in antibiotics stability

2.4.4 HMJ-7 菌株抑菌活性物质紫外稳定性
菌株 HMJ-7 产生的抑菌活性物质经不同时间的紫外线照射。结果证明,该抑菌活性物质在紫外线照射 2 h 后抑菌活性有所降低,但此后一直经过 12 h 的紫外线照射,抑菌活性基本保持稳定。说明紫外线对该抗菌物质有一定影响,可能抗菌物质是多种组成,其中某些组分对紫外线敏感,见图 6。



1. 2 h; 2. 4 h; 3. 6 h; 4. 8 h; 5. 10 h; 6. 12 h

图 6 紫外线对抑菌活性稳定性影响

Fig. 6 Impact of ultraviolet rays in antibiotics stability

3 结 语

放线菌的传统分类方法以形态、培养特征为主,生理生化特性为辅,通常只能初步鉴定到属。16S rDNA 鉴定已经被广泛应用到放线菌的系统分类与进化研究^[14]。菌株 HMJ-7 与链霉菌中的灰红链霉菌 NBRC 12873 的同源性达到 99%,形态与培养特征、生理生化特性等也与灰红链霉菌非常相似,但也存在个别不同之处,如有报到灰红链霉菌不能利用蔗糖。最终,菌株 HMJ-7 被初步鉴定为灰红链霉菌。

目前链霉菌产生的抗菌物质已经应用到食品方面的有 ϵ -聚赖氨酸^[15-16]、纳他霉素等^[17-20]。 ϵ -聚赖氨酸做为食品防腐剂已经在日本广泛生产,但我国尚处于试验阶段。如莫树平等研究了 ϵ -聚赖氨酸在广式腊肠中的防腐效果,结果显示其防腐效果明显^[21]。目前,纳他霉素作为一种天然生物防腐剂已被批准用于某些乳制品、肉类、饮料、水果等许多食品的生产与保藏之中^[22]。菌株 HMJ-7 产生的抗菌活性物质是否是一种新型物质以及其能否被应用到食品防腐方面还需要进一步的研究。

参考文献:

- [1] 郎晓萌,林文翰,季宇彬,等. 海洋链霉菌生物活性物质的研究[J]. 哈尔滨商业大学学报,2010,26(2):136-141.
LANG Xiao-meng, LIN Wen-han, JI Yu-bin, et al. Advance in research of bioactive substance derived from marine *Streptomyces*[J]. *Journal of Harbin University of Commerce*, 2010, 26(2):136-141. (in Chinese)
- [2] Bugn I T S, Woolery M, Kauffman C A, et al. Bohemamines from a marine-derived *Streptomyces* sp [J]. *Journal of Natural Products*, 2006, 69(1):1626-1628.
- [3] 秦小萍,林壁润,王振中. 灰色变异链霉菌抗菌肽的分离及鉴定[J]. 农药,2008,47(11):805-809.
QIN Xiao-ping, LIN Bi-run, WANG Zhen-zhong. Isolation and identification of antimicrobial peptide produced by *Streptomyces griseovariabilis*[J]. *Agrochemicals*, 2008, 47(11):805-809. (in Chinese)
- [4] 陈敏捷,王广华,戴世鲲,等. 链霉菌聚酮类次生代谢产物及其生物合成基因簇[J]. 微生物学报,2009,49(12):1555-1563.
CHEN Min-jie, WANG Guang-hua, DAI Shi-kun, et al. Polyketide antibiotics produced by polyketide synthase in *Streptomyces*-a review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(12):1555-1563. (in Chinese)
- [5] 黄曦,邓子新. 多烯大环内酯类抗生素-链霉菌 FR-008 代谢产物的研究[J]. 中国抗生素杂志,1999,24(5):329-333.

- HUANG Xi,DENG Zi-xin. Characterization of the hepaene macrolide antibiotic produced by *Streptomyces* sp. FR-008[J]. **Chinese J of Antibiot**,1999,24(5):329-333.(in Chinese)
- [6] 贺建武,陈奇辉,刘祝祥,等. 波赛链霉菌合成蒽环类抗肿瘤抗生素研究进展[J]. **中国抗生素杂志**,2011,36(3):161-164.
HE Jian-wu,CHEN Qi-hui,LIU Zhu-xiang,et al. Advances on biosynthesis of anthracycline antibiotics by *Streptomyces peucetius*[J]. **Chinese J of Antibiot**,2011,36(3):161-164.(in Chinese)
- [7] Xing C C,Paulr J,William F,et al. Luisols A and B,new aromatic tetraols produced by an estuarine marine bacterium of the genus *Streptomyces*(*Actinomycetales*)[J]. **Journal of Natural Products**,2009,3(1):11-17.
- [8] 惠秋沙. 食品防腐剂的研究现状[J]. **中国食物与营养**,2011,17(8):8-10.
HUI Qiu-sha. Research progress of food antiseptic[J]. **Food and Nutrition in China**,2011,17(8):8-10.(in Chinese)
- [9] 王世强. 打孔法测定抗生素的效价[J]. **生物学通报**,2001,40(3):2.
WANG Shi-qiang. Admeasurement of antibiotic titer with punching method[J]. **Bulletin of Biology**,2001,40(3):2.(in Chinese)
- [11] 阎逊初. 放线菌的分类和鉴定[M]. 北京:科学出版社,1992:268-1048.
- [12] 徐平,李文均,徐丽华,等. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA[J]. **微生物学通报**,2003,30(4):82-84.
XU Ping,LI Wen-jun,XU Li-hua ,et al. A microwave-based method for geneomic DNA extraction from actinomycetes[J]. **Microbiology China**,2003,30(4):82-84.(in Chinese)
- [13] Tamura K,Dudley J,Nei M,et al. MEGA4:Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. **Molecular Biology and Evolution**,2007,24(8):1596-1599.
- [14] 赵辉,闫华晓,王霞,等. 一株产天然蓝色素海洋链霉菌的筛选鉴定[J]. **生物学杂志**,2011,28(3):63-65.
ZHAO Hui,YAN Hua-xiao,WANG Xia,et al. Isolation and characterization of one strain of marine *Streptomyces* producing natural blue pigment[J]. **Journal of Biology**,2011,28(3):63-65.(in Chinese)
- [15] 李昆仑,李江阔,张鹏,等. ϵ -聚赖氨酸在食品中应用的研究进展[J]. **保鲜与加工**,2010,10(1):11-15.
LI Kun-lun,LI Jiang-kuo,ZHANG Peng,et al. Advancein research on antimicrobial property and application of ϵ -PL[J]. **Storage & Process**,2010,10(1):11-15.(in Chinese)
- [16] 李树,陈旭升,廖莉娟,等. ϵ -聚赖氨酸产生菌的筛选方法改进[J]. **食品与生物技术学报**,2010,29(2):282-287.
LI Shu,CHEN Xu-sheng,LIAO Li-juan,et al. A protocol for screening of ϵ -polylysine producing strains [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2010,29(2):282-287.(in Chinese)
- [17] 阎永贞,周绪霞,李卫芬,等. 纳他霉素抑菌机理及其在食品中的应用[J]. **食品工业科技**,2010,31(4):365-367.
YAN Yong-zhen,ZHOU Xu-Xia,LI Wei-fen,et al. Antimicrobial mechanism and the application of natamycin in food[J]. **Science and Technology of Food Industry**,2010,31(4):365-367.(in Chinese)
- [18] 崔旭海. 纳他霉素在食品工业中的最新研究现状[J]. **肉类研究**,2009(12):35-38.
CUI Xu-hai. Present research status of natamycin in food industry[J]. **Meat Research**,2009(12):35-38.(in Chinese)
- [19] 高玉荣,王雪平. 天然抗真菌食品生物防腐剂-纳他霉素的性质及在食品中的应用[J]. **农产品加工·学刊**,2009(5):7-9.
GAO Yu-rong,WANG Xue-ping. Property of natamycin;a natural anti-epiphyte bio-preservative [J]. **Academic Periodical of Farm Products Processing**,2009(5):7-9.(in Chinese)
- [20] 魏宝东,林雨舒. 纳他霉素高产菌株发酵罐发酵条件研究[J]. **食品与生物技术学报**,2010,29(3):448-452.
WEI Bao-dong,LIN Yu-shu. Study of natamycin high-yield strains fermenter fermentation condition [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2010,29(3):448-452.(in Chinese)
- [21] 莫树平,张菊梅,吴清平,等. ϵ -聚赖氨酸复合生物防腐剂对广式腊肠的防腐效果研究[J]. **食品研究与开发**,2010,31(12):224-228.
MO Shu-ping,ZHANG Ju-mei,WU Qing-ping,et al. Study on the effect of the ϵ -polylysine complex preservative applied to cantonese sausage[J]. **Food Research and Develop**,2010,31(12):224-228.(in Chinese)
- [22] 徐金辉,刘树文,董新,等. 纳他霉素对葡萄酒酵母抑制效果的研究[J]. **中外葡萄与葡萄酒**,2008(5):19-21.
XU Jin-hui,LIU Shu-wen,DONG Xin-ping,et al. Study on the inhibition of natamycin on the growth of wine yeast [J]. **Sino-Overseas Grapevine & Wine**,2008(5):19-21.(in Chinese)