

# 枯草芽孢杆菌 CF-3 抑菌蛋白的分离与鉴定

徐新星<sup>1,2</sup>, 曾轩<sup>1,2</sup>, 李培中<sup>1,2</sup>, 曾晴<sup>1,2</sup>, 尹京苑<sup>3</sup>, 高海燕<sup>1,2</sup>

(1. 上海大学生命科学学院, 上海 200444) (2. 上海市能源作物育种及应用重点实验室, 上海 200444)

(3. 上海大学计算机学院, 上海 200444)

**摘要:** 本研究采用硫酸铵分级盐析、交联葡聚糖凝胶分子层析 (Sephadex G-75)、聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 等方法对生防菌枯草芽孢杆菌 CF-3 无菌发酵液对复端孢霉 F 中的主要抑菌蛋白进行了分离与鉴定。结果表明: CF-3 无菌发酵液中抑菌蛋白的硫酸铵最佳沉淀饱和度为 60%~70%, 蛋白质沉淀量为 149.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 极显著高于其他浓度 ( $p \leq 0.01$ ); 利用 60%~70% 饱和度的硫酸铵提取的粗蛋白质经 Sephadex G-75 凝胶柱层析后获得 2 个吸收峰, 8 管收集液, 其中第 2 管峰收集液抑菌活性显著高于其他管 ( $p \leq 0.05$ ); 将流分 2 收集液进一步分离纯化后, 将抑菌效果最好的 2.3 号流分的两条蛋白条带割胶回收, 利用生物质谱技术鉴定为  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶和胞内丝氨酸蛋白酶, 分子量分别约为 42.5 ku 和 33.9 ku。以上结果可为该菌株及其抑菌蛋白的开发应用奠定基础。

**关键词:** 枯草芽孢杆菌; 抑菌蛋白; 分离纯化; 凝胶过滤层析

文章编号: 1673-9078(2016)12-145-150

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.12.023

## Purification and Identification of Fungistatic Protein from *Bacillus subtilis* CF-3

XU Xin-xing<sup>1,2</sup>, ZENG Xuan<sup>1,2</sup>, LI Pei-zhong<sup>1,2</sup>, ZENG Qing<sup>1,2</sup>, YIN Jing-yuan<sup>3</sup>, GAO Hai-yan<sup>1,2</sup>

(1.School of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China)

(2.Shanghai Key Laboratory of Bio-energy Crops, Shanghai 200444, China)

(3.School of Computer Engineering and Science, Shanghai University, Shanghai 200444, China)

**Abstract:** Ammonium sulfate precipitation, Sephadex G-75 gel column chromatography, and sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) were used to purify and identify the primary fungistatic proteins in *Cephalothecium* fungi that act on the biocontrol agent *Bacillus subtilis* CF-3. The results demonstrated that the active protein could be optimally precipitated with 60~70% ammonium sulfate with a content of 149.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , which was significantly higher than the yield obtained from other ammonium sulfate concentrations ( $p \leq 0.01$ ). Crude proteins separated by ammonium sulfate at a saturation of 60~70% were further purified by Sephadex G-75 gel column chromatography, yielding two absorption peaks and eight fractions. The second fraction had a significantly greater fungistatic effect than the other fractions ( $p \leq 0.05$ ) and was further purified. Band 2.3 of the flowthrough had the highest fungistatic activity and was cut from the gel for collection. Biological mass spectrometry was used to identify the bands as  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase and intracellular serine protease, with molecular masses of 42.5 ku and 33.9 ku, respectively. These results laid the foundation for the application of this bacterial strain and these fungistatic proteins.

**Key words:** *Bacillus subtilis*; fungistatic protein; separation and purification; gel filtration chromatography

果蔬采后因病原微生物侵染引起的腐烂造成了严重的经济损失。为控制采后果蔬病害的发生, 长期以来主要采用化学药剂的方法, 但由此引起的病原菌抗药性增强、食品安全性下降和环境污染等问题已不容

收稿日期: 2015-11-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31401539); “十二五” 国家科技支撑计划项目 (2015BAD16B02)

作者简介: 徐新星 (1989-), 女, 硕士, 研究方向: 食品微生物

通讯作者: 高海燕 (1975-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 果蔬采后生物防治方法及食品中生物活性物质开发

忽视, 因此高效低毒低残留且与环境相容性好的生物保鲜方法逐渐受到重视<sup>[1]</sup>。枯草芽孢杆菌 (*Bacillus Subtilis*) 是一种嗜温性的好氧革兰氏阳性杆状细菌, 能够产生耐热、耐旱、抗紫外线和有机溶剂的芽孢, 其芽孢可以制成粉剂和可湿性粉剂等剂型应用于医药、农牧和生物科技产业中, 且对人畜安全, 对环境友好, 是一种理想的生防菌。目前, 对枯草芽孢杆菌尤其是对其产生的抗菌物质, 如抗菌蛋白<sup>[2]</sup>、脂肽类<sup>[3]</sup>及挥发性抑菌物质<sup>[4]</sup>等的分离提取及抑菌机理的研究已成为热点。

对枯草芽孢杆菌所产生的抑菌蛋白的研究主要集中在对其进行分离纯化及抑菌机理研究, 抑菌蛋白, 是一类具有抗微生物活性的蛋白质(酶)或小分子短肽, 其广泛存在于细菌、植物、脊椎和无脊椎动物中, 相比其他抑菌物质, 其功能基因更容易在后续的基因工程方面进行操作, 对拮抗菌所产生的抑菌蛋白的研究不仅有助于了解拮抗菌的生防作用机制, 更有利于开发新的抗病基因资源, 有研究表明, 枯草芽孢杆菌在代谢过程中能产生几丁质酶和 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶等酶类, 降解真菌细胞壁几丁质和葡聚糖等组分, 从而破坏真菌菌丝, 抑制其生长<sup>[5]</sup>。王益民等<sup>[6]</sup>已将几丁质酶基因和 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因双价基因导入野生枯草芽孢杆菌中, 并将此转基因工程菌株用作生产新型生防菌剂。

枯草芽孢杆菌CF-3是本实验室从豆腐乳中分离鉴定出的一株能够有效防治荔枝采后腐烂的生防细菌, 本文以水蜜桃中分离所得的致病菌复端孢霉(*Cephalothecium*) F为指示菌, 通过对CF-3产生的进行梯度硫酸铵沉淀和凝胶柱层析法分离, 并且结合SDS-PAGE电泳的条带结果, 分离鉴定出CF-3无菌发酵液中起主要抑菌作用的蛋白质, 为进一步纯化到编码的功能基因, 合成新型高效的生物杀菌剂奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

供试菌种: 枯草芽孢杆菌 CF-3 及复端孢霉 F 由上海大学食品质量与安全控制实验室提供。

培养基: (1) 普通培养基: 鱼粉蛋白胨 10 g, 牛肉浸膏 5 g, 酵母浸膏 5 g, NaCl 5 g, H<sub>2</sub>O 1000 mL, pH 为 7.0~7.2, 用于菌株 CF-3 的培养; (2) PDA 培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, H<sub>2</sub>O 1000 mL, 用于复端孢霉 F 的培养。

仪器: 高速离心机 Avanti J-30I (Beckman Coulter 贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司); 智能编程层析柜 (上海嘉鹏科技有限公司); HD-3000 型电脑核酸蛋白检测仪 (上海嘉鹏科技有限公司); DHL-A 电脑数显恒流泵 (上海沪西分析仪器厂有限公司); 752 紫外光栅分光光度计 (上海第三分析仪器厂)。

### 1.2 枯草芽孢杆菌 CF-3 无菌发酵液的制备

将枯草芽孢杆菌 CF-3 在普通培养基上 37 °C 活化培养 24 h, 取一环, 置于种子培养基中 160 r/min, 37 °C 恒温振荡培养 24 h (浓度约 10<sup>8</sup> cfu/mL), 培养结束后, 按 5% 的接种量接种至发酵培养基中进行发酵培养,

160 r/min, 23 °C 恒温振荡培养 8 d。发酵结束后, 4 °C, 10000 r/min, 离心 20 min, 取上清液, 用直径 3.5 cm, 孔径 0.22  $\mu$ m 的细菌过滤器除去菌体, 即得枯草芽孢杆菌 CF-3 无菌发酵液。

### 1.3 枯草芽孢杆菌 CF-3 抑菌蛋白的分离纯化

#### 1.3.1 硫酸铵盐析法沉淀 0~70%粗蛋白

无菌发酵液中直接加入硫酸铵粉末至 70%饱和度, 4 °C 静置过夜, 4 °C 下 10000 r/min 离心 20 min, 得到 0~70%粗蛋白沉淀, 透析脱盐后用于测定 0~70%粗蛋白抑菌效果的实验。

#### 1.3.2 硫酸铵盐析法粗提各级沉淀

无菌发酵液中加入硫酸铵粉末至 10%饱和度, 4 °C 静置过夜, 4 °C 下 10000 r/min 离心 20 min, 收集粗蛋白, 得到 0~10%盐析沉淀物, 取上清液, 继续加入硫酸铵粉末至 20%饱和度, 制备得到 10%~20%的盐析沉淀物, 重复以上步骤, 递增硫酸铵饱和度直至 100%, 依次得到 20%~30%、30%~40%、40%~50%、50%~60%、60%~70%、70%~80%、80%~90% 和 90%~100% 等各级蛋白粗提物<sup>[7]</sup>。

#### 1.3.3 各级沉淀物透析脱盐

以 1/10 原发酵液体积的 Tris-HCl (pH=8.6) 缓冲液溶解各级沉淀, 置透析袋中 4 °C 透析 20 h (截留分子量为 8.0 ku), 透析液用细菌过滤器 ( $\phi$ =0.22  $\mu$ m) 过滤, 得到各级蛋白脱盐浓缩液, 测定其抑菌活性。

#### 1.3.4 Sephadex G-75 凝胶分子层析

将抑菌效果最佳的蛋白粗提液过葡聚糖凝胶 G75 层析柱 (1.6 $\times$ 70 cm), 上样量为 2 mL, 层析柱采用梯度层析, 流速 0.3 mL/min, 缓冲液为 0.025 M Tris-HCl (pH=8.6), 紫外光 280 nm 下收集流分, 装入透析袋中扎紧后用聚乙二醇 (PEG-6000) 包埋数小时浓缩蛋白, 每管 1.5 mL, 集到的各管流分进行吸光度值、抑菌活性检测及 SDS-PAGE 电泳分析。

#### 1.3.5 SDS-PAGE 电泳

配置 12%分离胶和 5%浓缩胶, 取 5  $\mu$ L 样品与 20  $\mu$ L 5 $\times$ loading buffer 混合后, 煮沸 5 min, 每孔取 20  $\mu$ L 上样。浓缩胶电压 80 V, 分离胶电压 120 V, 电泳结束后, 剥胶, 用考马斯亮蓝 R-250 染色 30 min, 置于脱色液中振荡脱色, 直到蛋白条带清晰可见。将过柱得到的各阶段液体进行抑菌性测定后, 对比 SDS-PAGE 的电泳图, 得出抑菌效果最佳的条带, 送到生工生物工程(上海)股份有限公司利用 Nano LC-MS 进行蛋白质谱测序。

### 1.4 硫酸铵分级沉淀物的抑菌活性测定

采用平板打孔法,以 PDA 平板培养基上活化的病原菌 F 菌为靶标菌,在 PDA 平板中央接种直径 7 mm 的菌饼,在距离中心 2.5 cm 处打四个孔(直径 7 mm),加入 50 μL 待测各级粗蛋白溶液,以无菌水及无菌 Tris-HCl 为 CK 对照,将平板置 28 °C 恒温培养 4 d,观察统计抑菌圈大小。

### 1.5 抑菌蛋白浓度的测定

蛋白浓度的测定参照 Bradford 的方法<sup>[8]</sup>,制作牛血清白蛋白标准曲线,将 0.5 mL 待测蛋白溶液加入到 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 染液中,混匀,使用紫外可见分光光度计和微量石英比色杯测定其在 595 nm 下的光密度值,根据标准曲线计算蛋白浓度。

### 1.6 数据分析

数据分析用 SPSS 19.0 软件进行,实验均设三次重复,结果的表达采用平均值±标准偏差,数据采用单因素 ANOVA Duncan 新复极差法进行数据差异显著性检测。

## 2 结果与讨论

### 2.1 CF-3 无菌发酵液及 0~70%粗蛋白对病原

菌 F 菌丝生长的影响

表 1 CF-3 无菌发酵液及其 0~70%粗蛋白对病原菌 F 的抑菌效果

Table 1 Fungistatic effect against the pathogen F of sterile fermentation broth of CF-3 and the crude protein

物质名称	抑菌圈大小/mm
CF-3 无菌发酵液	18.00±1.00 <sup>a</sup>
CF-3 粗蛋白	11.00±0.40 <sup>b</sup>
无菌水	7.00±0 <sup>c</sup>
无菌 Tris-HCl	7.00±0 <sup>c</sup>

注:不同字母表示经邓肯氏新复极差法检测差异显著(p≤0.05)。

0~70%粗蛋白沉淀对复端孢霉 F 菌丝生长的影响见表 1。从表 1 可看出,CF-3 的无菌发酵液具有抑制荔枝病原菌 F 的作用,抑菌圈达到 18.00 mm,显著大于 0~70%蛋白粗提液,CF-3 无菌发酵液中可能存在抑菌蛋白、脂肽类物质、挥发性物质等具有抑菌活性的代谢产物,其对病原菌的拮抗作用可能是多种物质共同作用的结果<sup>[9]</sup>。翟茹环等研究表明枯草芽孢杆菌 G8 抑菌粗蛋白液对黄瓜菌核病菌具有抑制作用<sup>[10]</sup>,本实验结果表明,0~70%蛋白粗提液抑菌圈直径显著大于

无菌水及无菌 Tris-HCl,可见通过 70%饱和度的硫酸铵沉淀出的枯草芽孢杆菌 CF-3 的 0~70%蛋白粗提液,与空白对照相比,对复端孢霉 F 菌丝的生长具有良好的抑菌效果。可见,对生防菌代谢产物抑菌蛋白进行分离纯化并鉴定,对其开发利用具有一定意义。

### 2.2 抑菌蛋白的初步分离

#### 2.2.1 无菌发酵液各分级沉淀蛋白含量的测定

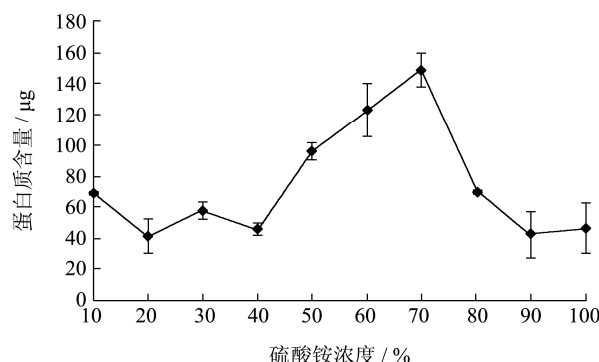


图 1 各级沉淀蛋白质含量

Fig.1 Concentration of protein precipitated with different concentrations of ammonium sulfate

注:图中横坐标依次代表 0~10%、10%~20%、20%~30%、30%~40%、40%~50%、50%~60%、60%~70%、70%~80%、80%~90%和 90%~100%等不同硫酸铵浓度沉淀出的各级蛋白粗提物。

蛋白含量标准曲线线性关系式为:  $Y=0.00062x+0.0057$ ,  $R^2=0.9995$ ,线性相关性较好,可作为蛋白质浓度测定的标准曲线。中性盐对蛋白质的溶解度有显著影响,将大量盐加到蛋白质溶液中时,高浓度的盐离子(如硫酸铵的  $SO_4^{2-}$ 和  $NH_4^+$ )有很强的水化力,可夺取蛋白质分子的水化层,使之“失水”,蛋白质胶粒凝结并沉淀析出。由于各种蛋白质分子颗粒大小、亲水程度不同,故盐析所需的盐浓度也不一样,因此调节混合蛋白质溶液中的中性盐浓度可使各种蛋白质分段沉淀。由图 1 可知,实验所获得的 0~10%、10%~20%、20%~30%、30%~40%、40%~50%、50%~60%、60%~70%、70%~80%、80%~90%和 90%~100%等不同硫酸铵浓度沉淀出的各级蛋白粗提物含量不同,采用 30%~40%、40%~50%、50%~60%和 60%~70%饱和度的硫酸铵沉淀蛋白含量呈逐渐增多的趋势,硫酸铵饱和度在 60%~70%时,蛋白质沉淀量最大,100 mL 无菌滤液中蛋白沉淀量为 149.03 μg,极显著高于其他各级沉淀量( $p\leq 0.01$ )。

#### 2.2.2 无菌发酵液各分级沉淀蛋白 SDS-PAGE 检测

将离心后的发酵上清液采用硫酸铵分级沉淀后,

分别将各个饱和度沉淀的蛋白粗提物装入透析袋内，于 Tris-HCl 缓冲液中脱盐浓缩，并进行 SDS-PAGE 检测，各种蛋白质在同一 pH 条件下，因分子量和电荷数量不同而在电场中的迁移率不同而得以分开，如图 2 所示，Marker 泳道的条带清晰，与标准图谱基本相符；代表 0~10%、10%~20%、20%~30%和 30%~40% 硫酸铵饱和度沉淀出的粗蛋白泳道出现的条带较少，分子量在 40 ku 到 50 ku 之间；40%~50%、50%~60% 和 60%~70%硫酸铵饱和度沉淀出的蛋白粗提物经脱盐浓缩后，泳道中出现的蛋白质条带较多，分子量在 20 ku 到 85 ku 之间；代表 50%~60%的硫酸铵沉淀出的蛋白的泳道条带最多，与 60%~70%的硫酸铵沉淀出的蛋白相比，多出的条带分子量在 50 ku 到 85 ku 之间，60%~70%饱和度的硫酸铵沉淀出的分子量小于 35 ku 的蛋白条带没有分开；当硫酸铵饱和度在 70%~80% 及 80%~90%时，已基本无明显条带。

在蛋白浓度的测定实验中，结果显示硫酸铵饱和度在 60%~70%时，蛋白质沉淀量最大，电泳实验泳道跑出的条带数量显示，60%~70%泳道清晰条带少于 50%~60%泳道，可能是由于 60%~70%饱和度的硫酸铵蛋白质粗提物在进行脱盐浓缩时，小分子量的蛋白流失严重，同时分子量小于 35 ku 的蛋白条带未完全分离开，进一步的蛋白分离纯化实验需结合抑菌实验的结果，验证要分离鉴定起主要抑菌作用的活性蛋白所需的硫酸铵饱和度的范围。

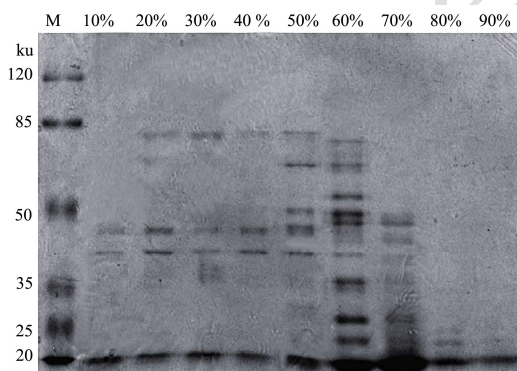


图 2 各级硫酸铵沉淀蛋白的 SDS-PAGE

Fig.2 SDS-PAGE image of crude protein fractions precipitated in different concentrations of ammonium sulfate

### 2.2.3 无菌发酵液各分级沉淀抑菌活性的测定

各级沉淀粗蛋白脱盐浓缩后平板抑菌活性检测的结果如图 3 所示，不同饱和度沉淀的各级蛋白粗提液均有抑菌活性，硫酸铵饱和度在 60%~70%间所沉淀出的蛋白粗提物抑菌活性达到最高值，抑菌圈直径为 19.00±1.00 mm，极显著高于其他浓度 ( $p \leq 0.01$ )，结合电泳实验结果可表明主要抑菌蛋白的分子量在 50 ku 以下，0~10%和 10%~20%硫酸铵饱和度沉淀物也

有较好的抑菌活性，抑菌圈直径分别为 14.67±1.15 mm 和 13.33±0.58 mm，但是在电泳实验中硫酸铵饱和度为 0~10%和 10%~20%的泳道中仅在分子量为 40 ku 到 50 ku 之间出现两条蛋白条带，活性蛋白也可能是一些小分子的拮抗物质或无法被考马斯亮蓝染色的大分子。当进一步提高盐浓度时，抑菌活性没有显著变化，饱和度在 70%~80%、80%~90%和 90%~100%所沉淀出的粗蛋白电泳实验显示蛋白条带数目也无明显变化，表明饱和度为 60%~70%的硫酸铵可以较好地回收抑菌活性蛋白，后续进一步分离纯化抑菌蛋白将挑选 60%~70%饱和度的硫酸铵沉淀蛋白粗提液进行。

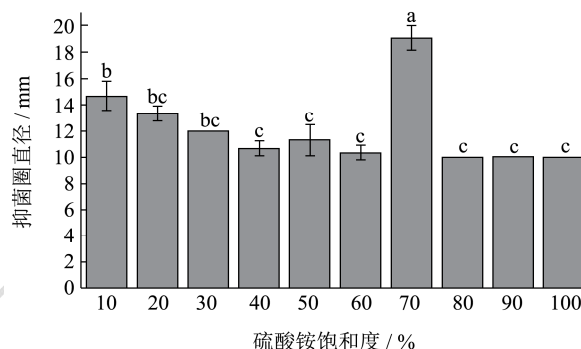


图 3 各级沉淀的抑菌圈大小

Fig.3 Size of fungistatic zone of crude protein fractions precipitated in different concentrations of ammonium sulfate

注：不同字母表示经邓肯氏新复极差法检测差异显著 ( $p \leq 0.05$ )。

## 2.3 抑菌蛋白的二次分离纯化

### 2.3.1 SephadexG-75 凝胶分子层析

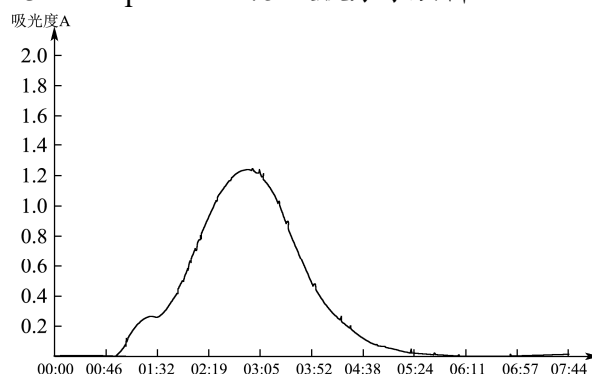


图 4 60%~70%粗蛋白的凝胶柱层析分离图

Fig.4 Gel column chromatogram of crude protein precipitated with 60~70% ammonium sulfate

将用 60%~70%饱和度的硫酸铵沉淀出的蛋白粗提物经过 Sephadex G-75 凝胶层析进一步提纯分离，如图 4 所示，洗脱曲线中出现两个蛋白峰，但未得到更好的分离，洗脱曲线表明粗提蛋白中至少含有两种不同的抑菌蛋白，这和相关研究表明枯草芽孢杆菌可



以产生多种抑菌蛋白的结论是相似的<sup>[11]</sup>，将洗脱液进行收集，前一小时无物质峰为一个流分，然后每 40 min 收集一次，共收集到 8 个洗脱流分，依次标记为 1~8 号，将收集的洗脱液进行 SDS-PAGE 电泳检测及抑菌活性检测。

### 2.3.2 SDS-PAGE 电泳检测蛋白质

从图 5 可以看出 60%~70%硫酸铵浓度沉淀后所得粗蛋白经过第一次凝胶柱层析分离后，分离所得蛋白的种类随着时间的增加而逐步减少，1 号、2 号及 3 号流分所在的泳道蛋白条带较多，分子量在 50 ku 以下，4 号到 8 号流分所在的泳道基本无条带出现，需要进一步结合平板对峙抑菌实验结果，选取抑菌活性最佳的流分继续进行分离纯化。

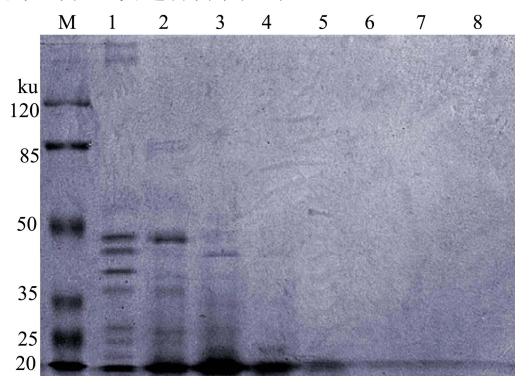


图 5 60%~70%沉淀所得粗蛋白过柱后各管 SDS-PAGE 结果图

Fig.5 SDS-PAGE image of each fraction after separating crude protein precipitated with 60~70% ammonium sulfate

### 2.3.3 凝胶柱层析分离所得各流分抑菌活性的测定

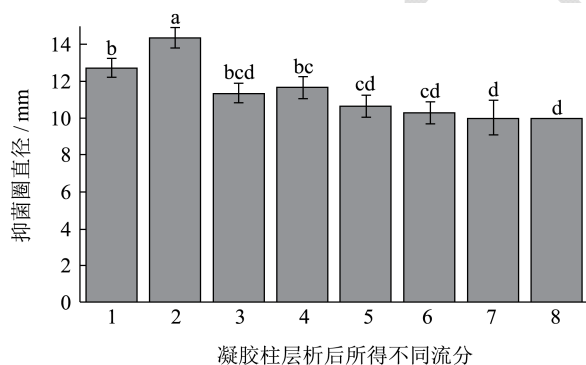


图 6 60%~70%蛋白质过柱分离所得各流分的抑菌圈大小

Fig.6 Size of fungistatic zone of each fraction after separating crude protein precipitated with 60~70% ammonium sulfate

注：不同字母表示经邓肯氏新复极差法检测差异显著 ( $p \leq 0.05$ )。

由图6可知，凝胶柱层析获得的8管蛋白的抑菌效果基本呈现先升后降的趋势，其中抑菌效果最好的是2号流分，抑菌圈直径达到了  $14.33 \pm 0.58$  mm，显著性高于其他浓度 ( $p \leq 0.01$ )。结合2号流分的SDS-PAGE电泳

图，蛋白质分子量在20 ku到50 ku之间存在多个蛋白质条带，需采用凝胶柱层析对2号流分进行进一步分离纯化。

### 2.4 抑菌蛋白的进一步分离纯化鉴定

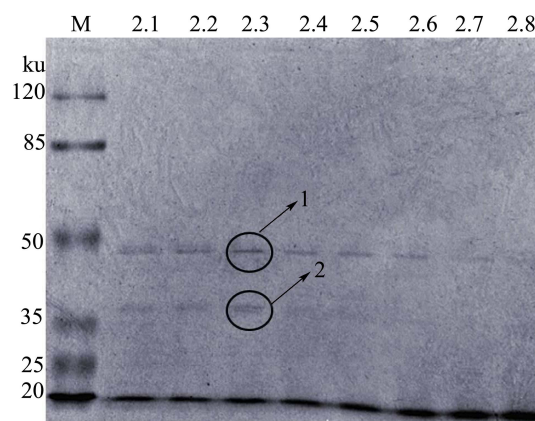


图 7 2 号管粗蛋白过柱后各分管 SDS-PAGE 图

Fig.7 SDS-PAGE of each fraction after separating fraction 2

将 2 号流分以上样量 2 mL，流速为 0.1 mL/min，30 min/管的速度进行凝胶柱层析，再次收集得到 8 管分流液，标记为 2.1~2.8，将这 8 管流分分别包埋浓缩为 1 mL，进行抑菌活性测定实验。实验结果表明，仅 2.2 号和 2.3 号流分出现抑菌圈，直径分别为  $8.33 \pm 0.58$  mm 和  $8.67 \pm 0.58$  mm，两者不具有显著性差异，图 7 为 2 号流分二次过柱后所得各流分的 SDS-PAGE 图，由图可知，经过二次分离后，各泳道蛋白条带数目减少，结合抑菌实验结果，蛋白质抑菌活性有明显下降，可能与蛋白多次脱盐浓缩效果欠佳，蛋白浓度较低，抑菌物质的极性情况比较复杂有关。SDS-PAGE 图中显示，2.1 流分中也有不清晰的两个条带，分子量与 2.2 流分与 2.3 流分出现的两个条带相近，但多次重复抑菌实验显示 2.1 流分对复端孢霉 F 并没有显著的抑菌活性，推测是在抑菌实验过程中，可能由于相同条带的蛋白浓度过低未表现出明显的抑菌作用，也可能存在相同的蛋白条带由于微环境的不同导致抑菌效果的差异性。

综合对复端孢霉 F 抑菌活性实验结果，将抑菌效果较好的 2.3 号流分的 1 和 2 两条条带割胶回收，由生工生物工程(上海)股份有限公司采用 Nano LC-MS 进行测序，结果如表 2 所示，经鉴定，抑菌蛋白为  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶和胞内丝氨酸蛋白酶，资料显示，前者是广泛存在于生物体内，参与谷胱甘肽循环和氨基酸跨膜转运的异二聚体酶，是谷胱甘肽 (GSH) 代谢的关键酶之一，是引起溃疡的致病因素之一<sup>[12]</sup>，可以抑制幽门螺旋菌的感染<sup>[13]</sup>。丝氨酸蛋白酶超家族为全  $\beta$  蛋白，它的核心结构有  $\beta$  折叠构成。研究表明胞内丝

氨酸蛋白酶是捕食线虫真菌在侵染的过程中产生的生化性质相近的具有降解线虫体壁作用的酶,在黄瓜叶片衰老中起着重要的作用<sup>[14]</sup>。由此推测 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶可能是通过改变氨基酸的转运方式及过程,从而导致病原菌的营养供给不足,造成病原微生物的生长缓

慢;而胞内丝氨酸蛋白酶可以分解病原微生物的细胞壁等组织结构,造成细胞破裂,内容物的流出,最终导致细胞的死亡,起到抑菌作用,枯草芽孢杆菌 CF-3 抑菌蛋白的具体抑菌机理需进一步的实验研究。

表 2 纯化蛋白的质谱鉴定比对结果 (2.3 号管)

Table 2 Mass spectrometry and sequence alignment of purified proteins (tube No 2.3)

	1 号条带	2 号条带
编号	gi 290789907	gi 63146095
名称	$\gamma$ -谷氨酰转肽酶	胞内丝氨酸蛋白酶
英文名	Chain A, Crystal structure of glutamate complex of halotolerant & gamma; -Glutamyltranspeptidase from <i>Bacillus subtilis</i> intracellular serine protease [ <i>Bacillus subtilis</i> ]	
分子量	42489 u	33904 u

### 3 结论

枯草芽孢杆菌胞外蛋白质组成丰富,本文以复端孢霉 F 为目标菌,研究结果表明,CF-3 无菌发酵液中抑菌蛋白盐析的最佳硫酸铵饱和度是 60%~70%,通过多次凝胶柱层析、SDS-PAGE 实验及平板对峙实验对枯草芽孢杆菌 CF-3 无菌发酵液中蛋白质的分离纯化,最终从 CF-3 无菌发酵液中分离出两种主要的抑菌蛋白,经 LC-MS 鉴定为 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶和胞内丝氨酸蛋白酶,分子量分别约为 42.5 ku 和 33.9 ku,为进一步研究该拮抗菌株的抑菌蛋白编码基因奠定了基础,为改良该菌株使其更好地在果蔬采后生物防治中作为生防菌剂进行工业化发酵生产提供了方向。

### 参考文献

- [1] Carla A N. Biological control of postharvest diseases of fruit [J]. European Journal of Plant Pathology, 2012, 133(1): 181-196
- [2] Yang L R, Quan X, Xue B G, et al. Isolation and identification of *Bacillus subtilis* strain YB-05 and its antifungal substances showing antagonism against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* [J]. Biological Control, 2015, 85: 52-58
- [3] Moyne A L, Cleveand T E, Tuzun S. Molecular characterization and analysis of operon encoding the antifungal lipopeptide bacillomycin [J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 234(1): 43-49
- [4] Chen H, Xiao X, Wang J, et al. Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea* [J]. Biotechnology Letters, 2008, 30(5): 919-923
- [5] 陈青. 枯草芽孢杆菌 B2 中果胶酶和木聚糖酶的酶学性质研究[J]. 现代食品科技, 2010, 26(5): 466-469  
CHEN Qing. Enzymatic properties of pectinase and xylanase of *Bacillus subtilis* B2 [J]. Modern Food Science and Technology, 2010, 26(5): 466-469
- [6] Wang Y M. Cloning of chitinase gene and  $\beta$ -1,3-glucanase gene and expression in *Bacillus subtilis* B-908 [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1998, 28(3): 288
- [7] Wen C, Guo W B, Chen X H. Purification and identification of a novel antifungal protein secreted by *Penicillium citrinum* from the southwest indian ocean [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 24(10): 1337-1345
- [8] Liu B, Qiao H P, Huang L L, et al. Biological control of take-all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* E1R-j and potential mode of action [J]. Biological Control, 2009, 49(3): 277-285
- [9] Jiang C, Shi J, Liu Y, et al. Inhibition of *Aspergillus carbonarius* and fungal contamination in table grapes using *Bacillus subtilis* [J]. Food Control, 2014, 35(1): 41-48
- [10] 翟茹环, 尚玉珂, 刘峰. 枯草芽孢杆菌 G8 抗菌蛋白的理化性质和抑菌作用[J]. 植物保护学报, 2007, 34(6): 592-596  
ZHAI Ru-huan, SHANG Yu-ke, LIU Feng. Characteristics and inhibitory action of antifungal protein produced by *Bacillus subtilis* strain G8 [J]. Acta Phytophylacica, 2007, 34(6): 592-596
- [11] Zheng G, Slavik M F. Isolation, partial purification and characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain [J]. Letter Applied Microbiology, 1999, 28(5): 363-367
- [12] Gong M, Ling S S M, Lui S Y, et al. *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase is a pathogenic factor in the

- development of peptic ulcer disease [J]. *Gastroenterology*, 2010, 139(139): 564-573
- [13] Rimbara E, Mori S, Kim H, et al. Role of g-glutamyl transpeptidase in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection [J]. *Microbiology and Immunology*, 2013, 57(10): 665-673
- [14] Zhang P, Wang F, Zhang L F, et al. The role of serine endopeptidase in cucumber leaf senescence [J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2006, 32(5): 593-599

现代食品科技