



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115851498 A

(43) 申请公布日 2023. 03. 28

(21) 申请号 202211130248.0

(22) 申请日 2022.09.16

(83) 生物保藏信息

CGMCC No.25552 2022.08.19

(71) 申请人 河南牧业经济学院

地址 450046 河南省郑州市郑东新区龙子湖北路6号

(72) 发明人 张晓峰 王蕴哲 余海尤 李学思 潘春梅

(74) 专利代理机构 北京盛询知识产权代理有限公司 11901

专利代理师 莫兆忠

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C07K 14/32 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

A61K 35/742 (2015.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

C12R 1/125 (2006.01)

权利要求书1页 说明书9页

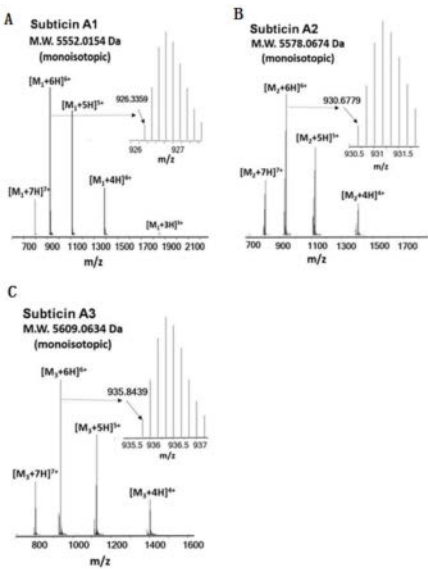
序列表(电子公布) 附图2页

(54) 发明名称

一种产无前导肽细菌素的枯草芽孢杆菌及制备方法与应用

(57) 摘要

本发明公开了一种产无前导肽细菌素的枯草芽孢杆菌及制备方法与应用,属于医药应用领域。本发明公开的枯草芽孢杆菌的保藏编号为CGMCC No.25552。利用所述的枯草芽孢杆菌发酵培养,得到发酵液;分离所述发酵液收集上清液,利用离子交换树脂、高相液相色谱分离纯化所述上清液,得到细菌素制品。经实验验证,所得细菌制品具有较好的抑制多种病原菌的作用,在动物养殖、食品防腐、医药健康领域,制备菌剂、抗菌药物等方面具有广泛的应用前景。



1. 一种枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 其特征在于, 所述枯草芽孢杆菌的保藏编号为CGMCC No.25552。
2. 由权利要求1所述的枯草芽孢杆菌产生的细菌素。
3. 如权利要求2所述的细菌素, 其特征在于, 所述细菌素为无前导肽细菌素。
4. 一种权利要求1所述的枯草芽孢杆菌的发酵培养方法, 其特征在于, 将枯草芽孢杆菌接种于LB液体培养基, 在37℃, 220rpm振摇培养8h, 得到发酵液。
5. 一种细菌素的生产方法, 其特征在于, 包括以下步骤:
 - (1) 利用权利要求1所述的枯草芽孢杆菌发酵培养, 得到发酵液;
 - (2) 分离所述发酵液收集上清液, 利用离子交换树脂、高相液相色谱分离纯化所述上清液, 经冷冻干燥得到细菌素制品。
6. 如权利要求5所述的生产方法, 其特征在于, 步骤(1)中, 利用权利要求4所述的方法发酵培养所述枯草芽孢杆菌。
7. 如权利要求5所述的生产方法, 其特征在于, 步骤(2)中, 将所述上清液经所述离子交换树脂Amberlite XAD7HP交换, 分别用蒸馏水、30%乙醇、80%乙醇洗脱, 获取活性组分。
8. 如权利要求7所述的生产方法, 其特征在于, 所述活性组分经低温旋蒸浓缩后, 再用所述高相液相色谱分离纯化; 其中, 分离纯化的色谱条件为: 色谱柱TC-C18; 流动相乙腈, 流速1mL/min, 梯度洗脱程序为乙腈浓度由10%增加到80%洗脱55min, 分别收集具有活性的馏分, 得到所述细菌素制品。
9. 一种产品, 其特征在于, 包括权利要求1所述的枯草芽孢杆菌或者权利要求2-3任一项所述的细菌素。
10. 一种权利要求1所述的枯草芽孢杆菌或者权利要求2-3任一项所述的细菌素在制备菌剂或者抗菌药物中的应用。

一种产无前导肽细菌素的枯草芽孢杆菌及制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及医药应用领域,特别是涉及一种产无前导肽细菌素的枯草芽孢杆菌及制备方法与应用。

背景技术

[0002] 细菌素是细菌在代谢过程中由核糖体合成的、对产生菌具有自身免疫性的一类具有抗菌活性的多肽类物质。细菌素在生物合成、作用模式、抗性机制及抗菌活性方面与抗生素存在明显不同,被认为是抗生素的最佳替代品,目前研究最多最深入的是羊毛硫细菌素。细菌素在食品防腐、动物养殖及医药治疗等方面有广泛应用。然而,产量较低,规模化生产较难,成本较高等因素制约了细菌素的大范围应用。与大多数细菌素不同,无前导肽细菌素是一类由核糖体合成、翻译后不进行任何修饰即具有活性的细菌素,该类细菌素遗传结构简单,易在其它微生物细胞中表达,便于通过生物工程进行规模化生产,抗菌机制独特,有巨大的商业应用潜能。而该类细菌素到鉴定和报道的很少,到目前为止仅有19种来自不同种属细菌的无前导肽细菌素获得鉴定。

[0003] 首次报道的无前导肽细菌素是1998年由菌株*E. faecium* L50产生的含有两条肽链的细菌素Enterocin L50 (EntL50)。除此之外,有来自屎肠球菌的EntQ、Enterocin K1 (EntK1),来自粪肠球菌的Enterocin EJ97 (EntEJ97)、Enterocin 7 (Ent7,与报道的Enterocin MR10相同),来自金黄色葡萄球菌的Aureocin A53 (Aur53)、Aureocin A70 (Aur70),来源于表皮葡萄球菌的Epidermicin NI01 (EpiNI01),来自于乳酸乳球菌的Lacticin Q (LnqQ)、Lacticin Z ((LnqZ)、LsbB、Lactolisterin BU (LliBU),来源于鼠链球菌的BHT-B,来源于希腊魏氏杆菌的Weisselicin Y (WeLY)、Weisselicin M (WeLM),来源于格氏乳球菌的GarKS,来源于蜡样芽孢杆菌的Cereucin X (CerX)、Cereucin H (CerH)、Cereucin V (CerV)。由于不同的无前导肽细菌素具有不同的抗菌机制和抗菌谱,因此新型无前导肽细菌素产生菌的筛选对新型细菌素的开发和应用具有重要意义。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种产无前导肽细菌素的枯草芽孢杆菌及制备方法与应用,以解决上述现有技术存在的问题,该枯草芽孢杆菌能够产生无前导肽细菌素,并且该无前导肽细菌素具有较好的抑制多种病原菌的作用,在动物养殖、食品防腐、医药健康领域,制备菌剂、抗菌药物等方面具有广泛的应用前景。

[0005] 为实现上述目的,本发明提供了如下方案:

[0006] 本发明提供一种枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*),所述枯草芽孢杆菌的保藏编号为CGMCC No.25552;保藏时间为2022年8月19日;保藏单位为中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC);保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

[0007] 本发明还提供由所述的枯草芽孢杆菌产生的细菌素。

[0008] 优选的是,所述细菌素为无前导肽细菌素。更优选的是,所述无前导肽细菌素为细

菌素sucitin A1、细菌素sucitin A2、细菌素sucitin A3,细菌素subticin A1的氨基酸序列为MIAFLRIVAQLGARAARWAWANKDRVLGWIRGMAIDWIINKINDMVS;subticin A2的氨基酸序列为MITFLRIVAQLGARAARKWAWANKDRVLNWKNGVAIDWIIDKINDMVN;subticin A3的氨基酸序列为MVTFLRIVAQLGARAARWAWANKDRILGWIRGMAIDWIINKINDMVN。更优选的是,细菌素sucitin A1、细菌素sucitin A2、细菌素sucitin A3的氨基酸序列中第一个氨基酸甲酰化为甲酰甲硫氨酸。

[0009] 本发明还提供一种所述的枯草芽孢杆菌的发酵培养方法,将枯草芽孢杆菌接种于LB液体培养基,在37℃,220rpm振摇培养8h,得到发酵液。

[0010] 本发明还提供一种细菌素的生产方法,包括以下步骤:

[0011] (1) 利用所述的枯草芽孢杆菌发酵培养,得到发酵液;

[0012] (2) 分离所述发酵液收集上清液,利用离子交换树脂、高相液相色谱分离纯化所述上清液,得到细菌素制品。

[0013] 优选的是,步骤(1)中,利用上述的方法发酵培养所述枯草芽孢杆菌。

[0014] 优选的是,步骤(2)中,将所述上清液经所述离子交换树脂Amberlite XAD7HP交换,分别用蒸馏水、30%乙醇、80%乙醇洗脱,获取活性组分。

[0015] 优选的是,所述活性组分经低温旋蒸浓缩后,再用所述高相液相色谱分离纯化;其中,分离纯化的色谱条件为:色谱柱TC-C18;流动相乙腈,流速1mL/min,梯度洗脱程序为乙腈浓度由10%增加到80%洗脱55min,分别收集保留时间为49min、50min及51min的馏分,得到所述细菌素制品。

[0016] 本发明还提供一种产品,包括所述的枯草芽孢杆菌或者所述的细菌素。

[0017] 本发明还提供一种所述的枯草芽孢杆菌或者所述的细菌素在制备菌剂或者抗菌药物中的应用。

[0018] 本发明公开了以下技术效果:

[0019] 本发明通过在土壤中分离纯化获取一株能够产生无前导肽细菌素的枯草芽孢杆菌,通过分离枯草芽孢杆菌发酵液得到三种细菌素,经质谱分析,这三种细菌素的氨基酸序列和现有的细菌素不同,因此,均为为新型细菌素。在经过实验验证发现,无前导肽细菌素subticin A1对肉毒梭菌等多种食源性病原菌有较好的抗菌活性;无前导肽细菌素subticin A2和subticin A3对猪链球菌、乙型溶血链球菌有较好的抗菌活性。因此,本发明新分离的枯草芽孢杆菌以及新分离的细菌素在动物养殖、食品防腐、医药健康领域,制备菌剂、抗菌药物等方面具有广泛的应用前景。

附图说明

[0020] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0021] 图1为枯草芽孢杆菌Bacillus subtilis ZXF04所产细菌素一级质谱分析;A:subticin A1;B:subticin A2;C:subticin A3;

[0022] 图2为细菌素subticin A1、A2、A3的HPLC分离纯化结果。

具体实施方式

[0023] 现详细说明本发明的多种示例性实施方式,该详细说明不应认为是对本发明的限制,而应理解为是对本发明的某些方面、特性和实施方案的更详细的描述。

[0024] 应理解本发明中所述的术语仅仅是为描述特别的实施方式,并非用于限制本发明。另外,对于本发明中的数值范围,应理解为还具体公开了该范围的上限和下限之间的每个中间值。在任何陈述值或陈述范围内的中间值以及任何其他陈述值或在所述范围内的中间值之间的每个较小的范围也包括在本发明内。这些较小范围的上限和下限可独立地包括或排除在范围内。

[0025] 除非另有说明,否则本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所述领域的常规技术人员通常理解的相同含义。虽然本发明仅描述了优选的方法和材料,但是在本发明的实施或测试中也可以使用与本文所述相似或等同的任何方法和材料。本说明书中提到的所有文献通过引用并入,用以公开和描述与所述文献相关的方法和/或材料。在与任何并入的文献冲突时,以本说明书的内容为准。

[0026] 在不背离本发明的范围或精神的情况下,可对本发明说明书的具体实施方式做多种改进和变化,这对本领域技术人员而言是显而易见的。由本发明的说明书得到的其他实施方式对技术人员而言是显而易见的。本申请说明书和实施例仅是示例性的。

[0027] 关于本文中所使用的“包含”、“包括”、“具有”、“含有”等等,均为开放性的用语,即意指包含但不限于。

[0028] 实施例1枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilis* ZXF04的筛选与鉴定

[0029] 1、土壤采集自河南省开封市兰考县某耕地,风干粉碎过40目筛,取1g置于装100mL 无菌水的三角瓶中振摇20min,80℃水浴15min,然后采用涂布法涂布于LB固体平板,30℃培养15h,挑取单菌落。

[0030] 2、培养特征

[0031] 菌落形态:菌落灰白,粗制不透明,表明有褶皱,边缘不整齐(LB平板)。

[0032] 菌体细胞:LB液体培养基中37℃,220rpm培养20h后,显微镜观察有明显的芽孢产生。

[0033] 在LB液体培养基中培养特征:接种后37℃、220rpm振荡培养,8h开始产生抗菌物质,其发酵上清液对蜡样芽孢杆菌、单增李斯特菌、猪链球菌等病原菌有抗菌活性。

[0034] 3、基因鉴定

[0035] 以该菌株的基因组为模板,采用鉴定细菌通用引物27F和1541R进行PCR扩增,27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',1541R:5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3';扩增体系及扩增程序见表1:

[0036] 表1:PCR扩增体系及扩增程序

[0037]	PCR 反应体系 (40μL)		PCR 条件	
	Mix	20μL	94℃	4min
	ddH ₂ O	16μL	94℃	1 min
	27F	1μL	55℃	1 min
	1541R	1μL	72℃	1 min
	DNA 模板	2μL	72℃	10 min
28 cycles				

[0038] PCR扩增产物送生物测序公司进行测序,结果显示,该菌株的16srDNA序列(SEQ ID NO:4)为:

[0039] cgagcggacagatgggagcttgctccctgatgttagcggcggacgggtgagtaacacgtgggtaacct
gcctgtaagactgggataactccgggaaccggggctaataccggatgggttgtttgaaccgcatgggtcaaacata
aaaggtggcttcggctaccacttacagatggacccgcggcgcattagctagttggtaggtaacggctcaccaagg
caacgatgcgtagccgacctgagaggggtgatcgggccacactgggactgagacacggcccagactcctacgggagggc
agcagtagggaatcttccgcaatggacgaaagtctgacggagcaacgccgcgtgagtgtgaaggttttcggatcg
taaagctctgtttgttaggaagaacaagtaccgttcgaatagggcggtaccttgacggtacctaaccagaaagcca
cggctaactacgtgccagcagccgcggtaatacgttaggtggcaagcgttgcgggaattattgggcgtaaagggt
cgcaggcggtttcttaagtctgatgtgaaagccccgggtcaaccggggagggtcattggaaactggggaacttga
gtgcagaagaggagagtgggaattccacgtgtagcgggtgaaatgcgtagagatgtggaggaaacaccagtggcgaagg
cgactctctggtctgtaactgacgtgaggagcgaagcgtggggagcgaacaggattagataccctggtagtcca
cgccgtaaaccgatgagtgttaagtgttagggggtttccgccccttagtgctgcagctaaccgattaagcactccgc
ctgggggagtacggtcgcaagactgaaactcaaaggaattgacggggggccgcacaagcgggtggagcatgtggttta
attcgaagcaacgcgaagaaccttaccaggtcttgacatcctctgacaatcctagagataggacgtcccccttcggg
ggcagagtgcaggtgggtgcatggttgcgtcagctcgtgctgtagatgttgggttaagtcccgcaacgagcgca
acccttgatcttagttgccagcattcagttgggcactctaaggtgactgccggtgacaaaccggaggaaggtgggg
atgacgtcaaatacatcatgcccccttatgacctgggctacacacgtgctacaatggacagaacaaagggcagcgaaa
ccgcgaggttaagccaatcccacaaatctgttctcagttcggatcgagctctgcaactcgactgcgtgaagctgga
atcgctagtaatcgcgatcagcatgccgcggtgaatacgttcccgggccttgtagacacaccgcccgtcacaccag
agagtttgttaacacccgaagtcggtgaggttaa。

[0040] 序列比对显示,该菌株16srDNA序列与枯草芽孢杆菌模式菌株*Bacillus subtilis* NCIB 3610 (T) (NCBI登录号为ABQL01000001)的16srDNA序列一致性为99.86%。根据其菌落形态、细胞形态及16srDNA序列比对情况,确认该菌株为枯草芽孢杆菌。

[0041] 该菌株命名为枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilis* ZXF04,保藏编号为CGMCC No.25552;保藏时间为2022年8月19日;保藏单位为中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC);保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

[0042] 经鉴定,该菌株含有细菌素生物合成基因簇,其序列如下SEQ ID NO:5所示:

[0043] ttaatttaag atgatgtcgt actttctctt ctaattgagg tccatattga tgaacccaac
gcataatggt ggtgtgagcc attgataatc ctctttcctc catcatctt accaggttac ggaagctcaa
attgtaccgt aggtaccacc ttaccgttaa taagattagt tcaggctgat aatgtttcca tttaaacaaa
ttttcctttt ccatactgat cacacctttt ttagattcat actatcagta tgtccaagtt taggagatta
cttgcaagag ccttgaattt tttgcaccag aaccggaata tttgttcatg taatggttat actaagaatt
tgagaacgta tcaaatatca aactacact ttaacagagt ttaatctttt aaataaaatt aaaataaaaa
tcaattttta ttaaaataaa gttgattttt attttaatta tgttaaaatt caattaaagg agctgaagtt
tatgaatttt aaagacattc cgaattggct attaaattta gagagtgaag acattgagtt tattaaaaat
tttattttac actctggatc tttgaaagaa atagcaaaaa ttatgatgt ttcttctcct acagtgaggg
tacgggtaga taagctaatt caaaaaatta aagtgaatga tactgatgaa gatgaagagt tcattacttt
tattaaaaaa ctctccatcg aagatcgtat taatttagaa gatgcaaaat tgataattga aaaatataaa

aatgaaagag gggataatta atgtttcgtc tatacggatt ttttaattgca cttttattaa ttgggcttca
atacttttttg tcaagaagag aaaatgttta tttgggaatg ggtttacctg ttttatatgt ggtaacacta
ctatatctat ggatgtctga gactttaatt gtcaaaggga atacacttat cttcattatt attattttag
gtggattagc tattttatta ggaatttgga ttaaaggaag agaagaacta aaaaataaac agaaaaaaga
attagaaaaa atgaaaacca aggatatgaa gtaatcgatt agagataaaa agcattagct tctatcgact
tgtgactgag tttgagtaca atactcattg atttttaaat ttttgttatg aagggaatat atatcataca
cattgcctta taataattgg gatgaacttt taaaaatata attattgctc tataatgttct ttttttaaat
aaggaaggat gttataatgt ctctaattgct aatgggcttt tagaggatgg tgtaagagta aacggtttat
agaagtaagg tatgaaaatt aataatcatt atataaaaaa ggatagaact gcagatccta tcctttttaga
attaattggg ttagattatg taattacacc aattagctta ccatgtcatt aattttattg ataatccagt
caatagccat accatctcta atccagccta aaactctatc tttgttagcc caagcccatc tagcagctct
agctccta at tgagccacga ttcttaaaaa tgcaatcatg ttatataacct cctaatatag taattgtaaa
attaaaaatt cttagtttac catgtcatta attttatcaa taatccagtc gattgccaca ccgtttttta
tccaatttaa aactctatct ttgttagccc aagcccatct agcagctcta gctcctagtt gagctacgat
tcttaaaaa at gtaatcatgt tatatactc ctaatatagt aattgtaaaa ttaaaaattc ttagtttacc
atgtcattaa ttttattaat aatccagtca atagccatac catctcta at ccagcctaaa attctatctt
tgtttagccca agcccatcta gcagctctag ctctagttg agctacgatt cttaaaaatg taaccataat
atacctcctt ttgaattttt tggatgaatgc ttttgcgatt ataaatatat ctgaatcttc aaattgtgtc
aacttaattt ttagaaaaa atttatatta agttttttta tattttattc caaaaaatc tatacatgga
tatattttta agtataatta ttaagaggat ctttattgaa aatttagaat tgatagattg ttaatatgat
ttaattatca aaaaagggga ttgagattga aatgataaaa gaaccacaac aaaaaatctc accaaatgca
gtaaaagtat ggaggataag tgatgcaatt acttatacta ctgcactttg tgtattagga attcctttgt
ttttacagca ttattatgat tggaaaagct ggataagtat ttttgttat atcattattg ctttactcat
tatttcttcc atattcgaac tatccataat acctatttat cgacagcgaa catggcgta tgaaattgat
gaaaattata ttcaattaaa acatggagga gcattaatga gaaagcatct aataataccg atgacgaaag
tacaatatgt aaatacaaat caaggaccaa tattacgaaa atttggtttg tctacgttaa caataggtac
aatggcttca gaacatgaaa taccggctat ttctgaaaag aaagcaacag aattaagagc gaacattgca
tatttagctg gaatcaatga aataaatgaa taaaatagga gggctatcat acaatgaagc aagaattagc
atatgaccaa atagctcagc gaatgcaccc gttatggatg ctcttttcca tggttaaatc tataaaagaa
cttattcttt ggattgtttt ttttctatt tttataagtt caaattctaa tcctattttt ctgattgtag
gtgtagtagc aggagtgtt tatctaattt ataattttgt ttcaatattt cttgattgga aacattttta
gtatgtattt actgataaag aatgtacat ttatgaggga cgttttatta aagaaaatcg ttttattcca
ttagaacgta tccaaggtat tagtcaaaat acacactttt ttcacgctt atttgacta acatcacttt
tattagaac tggttccaat gaaaaaaaat cctctattaa acttgaaatg ataacttatg aagaagctgc
acggatacaa gaacatttag gacatattgg ttttattcca aaaaaagaga atgaatcaga tatacagcaa
gtagagttaa tagaatctaa agatatttca agggacaaac attataaaat ggcgccataa gaaatattgg
ttaaactact tatgtcactt aaattacttt tattgatccc attaatcaa gagatttatt ctaatataaa
tgattttatt tccatagacg gttatataaa tgaaattacc tcttttttc aaaaatcatg gtttctaag
actcttgga ttcttattct ttttaaatg tcattagctt atgggataat taagacttat attcaatatg

ggaactttga agtcacttct gaccaacatc gaatttttgt tagaacaggt gtatttaatg aaactgaatt
ttcaattcca aaggagaaaa tccaagctat taatattaat actaatctat taaaaagatg gtttggttta
gtacaagtaa aaattataag tattactgat atggaagata aggaaatgag aactgctaaa gtactctttc
cacttataga taaaaataga gctttatcac taattcctga gattctacca acatttaaaa ttgatacaag
aatgattagt attccaaaat atacaatttt tataaagatg gtacgattaa gttatatttg gatcataagt
acgatactta cttattattt ttggtcagag ttttggtata tccaataat attattcgta cttgttaaca
catcacaaat attaaactgt ttttatagtg gttacaaact taatggggaa ttcattcaat tgcaacgggg
aggattttca acaaatttat tcataacaaa ccgaaagaat attgaagagt tgaaaataat agaatcaggg
atacaaagtc catttggcct tgttactctt caaacttcaa cacgtgctaa accagttaag aaaacaaaga
ttttagatat cccaaaggat gtagctgtac attattatca ttggtatgga agtaacaaga aacatataaa
agcaaaaaaa atctagtatt aaagaaatga gatgcaatca catatttgat taaataagta tttgtattca
aactttattt tatatttttg aatcctttaa attcgaaata aagactatgc aaaaaagga gaacaatttc
catgctaaca aatttagata caaaaaaag gaaaacaaaa aaatggatta tcctcggggg tattgcgtta
attgctatcg ttgcagctat taatattttc gtgatgcaag ggaagaagaa agaaacggcg aaaacagatg
ctgtaagttt tgagaaggta acagagcgta agctaaataa tacaaaatta atttcgggac aagtaaaacc
aggaaatatt gaaagcttct actcagatcc gactaaagga aaagtgaag atattgcggt gaaagaagga
caagaggtag aaaaaggaac aaaattattc tcttatgata atgaagaagt caatttacag ataaagcaag
ctgatcttga tcaaaagatg gcagatatgc gttacgatca aggaaaaaag aaaatagatt cattgaaaac
agaaattaag aaggcgaaag atagcgggtc tacgaaagaa gtaatagatt caatggaaga gcaagtaaat
gaactagaaa ttcagcaaaa gacaacggac cttgagaaag aaaaaagcaa attacaagca gaagaattaa
agaaaaaaca gaaagaactt acgatttata gtaatttcgc tgggtgttga cagaagttag ataaagatgc
agcacaaagt tcctcacaag taataggtgg acaaggaaaa tcatttttac aaattgcttc taaagatcca
ttccaaattc aaggacatt aacggaactt cagaagtcac aaattcaaaa agaccaaaca tttactgtaa
ctgcaaaagc gaataataag aagaaatgga caggtaaaat tacagaagta agtgaattcc caacgagcgc
agaaatggat caaactgcag gtgcaggtgc aggtgaggga actcaaaata tgtctcatta tacatataaa
gcaagtcttg atgggcaaga aggtttatct ccaggctatc atgtttcttt acaagtaaac ttagagaata
agacgatgat tgctgttcct agtaagagca ttgtagaaaa ggataatgat gcatttgttt acatagaagg
aaatggtaaa cttcaaaaac aaaatgtaaa aaaaggtgct actgatggag attggacaga gattgttgag
ggtgtaacag ttgggcaaaa ggttgtaaaa aatccttccg acaacgtgta tgatggaatg gaagtgaag
aaaaatgatt acgttaaatc atatttctaa aacatattat caaggtaaac tagcagtgcc aattttacac
ggtattagtt taaagattcg aaatggtgag tttattttcca ttatgggacc atctggttcg gggaaatcaa
cgtaaatgaa tattattggt tgcctagatc gtccaacaga aggtgaatat acgttgaatg gtgtaaatat
cttaacagca gacgaggcaa aacttgctct tattegtaat gaataccttg gttttgtatt ccagcacttt
aattttattac cgcgactttc agcgggtgga aacgttgaac ttccgctcat ctacggtggc gtgaagaaag
cagagcgtcg tcaaagagcg cttgaagcac ttagtaaagt tggattatcg gacagggttc atcatttacc
tagtgaatta tccggtgggc aaaagcagcg tgtagegatt gcaagatcaa tcgccaataa tccaacattt
attatggcag atgagccgac aggcgtctt gatacgaagt ctggtgaaca agttatgaat atcttcacga
agttaaatgc agaaggtacg acaattgtta tggttacaca tgaagaagaa gtagctgcct attcctcccg
tcgtatcgtg ttacgagatg ggaaaattac agaagataga aggtgtgcag tatgagtta ctagatagta

taaaaattgc cttgtcttct attttagctc ataaactgcg ctcagccctg acgatgcttg ggattgttat
cgggtgtagct tctatcatta ccgttggtgc aattggacag ggtggggaag cgacgttaaa gtcattat
gctggtaagg gaaataacgt tgttcctatt cattataccc cagatattaa tgattcattt gatacagaaa
accctaagct aactgaggag gacatttatg aagtacaaaa gattccagaa gtagcatatg ttcttacaac
aaactctagt atggagcctc ttgatatcga agataaaaaa gaaatgggtca gtattacagg attagataag
gaatatTTTT aagttaatca agtgaatgta ttaaaaggac ggtcattaca agagtctgat attatccaag
gaaataacgt agtcatgggt agtacaggga tgaaagagaa agtattttaaa aagcaaaatc ctattgataa
aattattgaa attagaggtc aaccaatgca aattattggt gtatataaat cagataatga ttttatggga
atggaatctt cagaggctct aattccaatt acattatggc caacgttata tggaaaagat gaaattcaaa
atatttctgt gcaagcaaaa aatgttgata acttagaagt agctggaaaa aaagcagttg aagtattaaa
tagccgcaaa tcaagcgagt ttacaggtaa atatgaagta acgaacttaa aagaacttca agatgggtatt
tctcaaatga caaatatcat gactatgatt atcgggtggca tcgctggcat ttccttagtt gttgggtggca
ttggggttat gaatattatg cttgtatctg taacagagcg cacacgcgaa attggagtac gtaaagcact
tgagagcaacg cgcagtaaaa tattattaca attcttaatt gaagcgggtta tggtaacgct tcttggtgga
ttaattggaa ttggtcttgg ttacgcgggc gcttatgttg tatctattta tgcgaaatgg ccaccacttg
tttctgtggga agttgttgtg ggagcggtat tattctctat gacgcttggg attatctttg gattaattcc
tgcaaacaaa gcagcaaaat tggatccaat tgaagcactt cgttatgaat aggtttcatg tatagtaaag
atattctctt tactgtacgt gattctatta gacaaaacgt tggtttttga gagataatac gaattgacta
atagaacgta gtatataaac acaagggggc tatcaaaatg gaattaaatg ttgataaaca agaggttatt
ggagagaaac cgtcattatt aggaatgatt acatctccaa gtttacaatt tgaaagaatg aagaatagta
atgtcatttg gagaggcttt ttgctattag caatcttaac ggggtattgta tatctaatta atacatatgc
gtatgttctg tctccagaag gtaaaaaagc aaatgcagag tttgggttag atgtctcttt aaattggcaa
ttagggagtg gtttttttac aggagctatt ggttttatgg taggtgcttt tattactgca gctttttata
aaatattaat gatgtttatg aataacgata cgtcttataa aaaattatta gcaatttctg tttatggaag
tattattaca acacttggtt tacttataaa tagtcttttg gctattatca ttgaaggaa cggacaagaa
atgtatacag gtttggttgc tttgttttct tcatctaatt atgttttgca tgggtttatg agatcatttg
aaatttttac aatttggtca ttagttatat ctgcgttagg attacatatt acagccggat taagtaaaaa
acaggcaaca gtggttgtaa tcatcttctt tattttatca ttagctcttg gggcacttg tggtatgatg
ccaaaatttt aagtgtagat gctagtgtta aaaggctaga tatttaagtt tttttacctt tttccagtag
aaaatatctt ccttcaaaat gtgaagggtg ggaatctctc cattggctgg gagaagattg ttgataagta
taaataaaca tatttaaaag gatgtacctt aattaatate ttgcaaaaat aacactaaca agtataaaga
gaactggaat gaccaatga aataagacaa ggaataaaaa cctccgtata ttcgtattta aattaaatac
gaatatacgg aggtttttat tccttgcttg atatttcaaa tttccccata tctaattagg attggagaat
taaaagaatc tctttttcgg tggcatttaa attttttata tcatttataa atttatcaac caactctttt
atcatttttg tacgaagttc tttgattttt tcttctctat tggttatata tcttctatt cctctacgtg
tcacactaac ctcttcttc tctaactctt ggaatgtacg ttgaatcgta ttttgattta cttctaattc
attagctaata gcacgtacag taggaatttt atctcttatt gccaaacgac cgtttgcgat ttctatttta
ataaattcta ttacttgaat atattattgg atattagggtg aaaaatcaat tctcatttcc ttaccctca
aaattaattt gttaactata taatatactg gttctggtgc aaaggtaaaa taggttctgt tgcaaagatt

tctaaactga gataacctgt agaaaaagtg tgagcgggag aatgatatat ggggtatattt aaagggaaac
agtttaaaaa ggatattatt ttggtaaccg tcggctacta ttgtcgtttt tctttaagtt atcgtgatgt
atctgaaatc ttgaaagagc gtggtgtttc ggttcaccca acaaccatca tgcgctgggt tcatgaatat
ggaaatctta tctatcaaat ttggaagaag aaaaataaaa acgttcaatt atcttgaaa ctagatgaaa
cctatataaa agtcaaagga aaatggtgtt atttatatcg tgcaattgat aaagacgggc acacattgga
tattcaactt cgtaaaaaac gggatcaaca ggctgcctat gcctttatga aaagattggt caaaatcttt
ggagaaccag cggttctcac tacagacaaa gcaccag。

[0044] 实施例2枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilis* ZXF04发酵产物鉴定

[0045] 将实施例1分离纯化的枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilis* ZXF04按照接种量5%接种于LB培养基,于30℃,220rpm振摇培养8h,获取该菌株的LB发酵上清液。

[0046] 将LB发酵上清液,经高分辨率液质联用仪Agilent Technologies 6540UDH Accurate-Mass Q-TOF LC/MS可检测到三种细菌素subticin A1、subticin A2、subticin A3。

[0047] 其中,质谱检测条件为:毛细管电压:3500V;喷雾压力:35lb/in²;Q-TOF扫描范围:500-2,000m/z;干燥气流速:9liters/min;温度:300℃;数据采集速率:1spectrum/s。

[0048] 使用靶向MS/MS模式,在40V的电压下将目标离子进一步碎裂,通过对碎片离子的分析可确定抗菌物质的详细序列信息。

[0049] 上述三种细菌素的一级质谱分析图如图1所示。

[0050] 二级质谱分析显示,细菌素subticin A1的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)为MIAFLRI VAQLGARAARWAWANKDRVLGWIRDGMAIDWIINKINDMVS;

[0051] subticin A2的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)为MITFLRIVAQLGARAARKWAWANKDRVLNWI KNGVAIDWIIDKINDMVN;

[0052] subticin A3的氨基酸序列(SEQ ID NO:3)为MVTFLRIVAQLGARAARWAWANKDRILGWI RDGMAIDWIINKINDMVN。

[0053] 经鉴定,上述细菌素A1、A2、A3第一个氨基酸均甲酰化为甲酰甲硫氨酸。BlastP分析显示:subticin A1、A2、A3的氨基酸序列与目前已报道并鉴定的细菌素的氨基酸序列均不相同,说明上述细菌素均为新型的无前导肽细菌素,为发明人首次研究、鉴定并报道。

[0054] 实施例3分离鉴定枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilis* ZXF04发酵产物

[0055] 按照实施例2的方法获取LB发酵上清液,经离子交换树脂Amberlite XAD7HP交换,分别用蒸馏水、30%、80%乙醇(pH=2)洗脱,以*Bacillus cereus* ATCC 14579为指示菌,采用琼脂扩散法测定其抗菌活性,活性组分(80%乙醇洗脱液)经低温旋蒸浓缩即为细菌素粗制品。

[0056] 细菌素粗制品经高效液相色谱(HPLC)TC-C18色谱柱进一步分离。色谱条件为:流动相乙腈,上样量10μL,流速1mL/min,梯度洗脱程序为乙腈浓度由10%增加到80%洗脱55min,检测波长210nm,多次分别收集保留时间49、50、51min的馏分(其中subticin A2、subticin A3收集峰尖部分),然后进行旋转蒸发,冷冻干燥,可获得纯度大于95%的细菌素制品subticin A1,subticin A2、subticin A3(如图2所示)。

[0057] 细菌素对病原菌的抑菌实验:其中subticin A2、subticin A3对病原菌的抑菌活性相似。

[0058] 表2细菌素Subticin A1对多种食源性病原菌的最小抑菌浓度

	指示菌	培养基	Subticin A1
			MIC (μM)
[0059]	<i>C.botulinum</i> ATCC 25763	卵黄琼脂培养基	0.47
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	LB	1.88
	<i>Bacillus cereus</i> UW85	LB	1.88
	<i>Listeria monocytogenes</i> LM201	LB	0.47
	<i>Listeria monocytogenes</i> LM605	LB	0.47
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	LB	15.00

[0060] 表3细菌素subticin A3对猪链球菌及部分病原微生物的最小抑菌浓度

	指示菌	培养基	Subticin A3
			MIC (μM)
[0061]	<i>Streptococcus suis</i> ATCC43765	BHI	0.94
	<i>Streptococcus suis</i> strain JZH01	BHI	0.94
	<i>Streptococcus suis</i> strain JZH03	BHI	0.94
	<i>Streptococcus suis</i> strain JZH04	BHI	0.94
	β -Hemolytic streptococcus CMCC(B)32210	BHI	1.88

[0062] 注菌株Streptococcus suis strain JZH01、JZH03、JZH04分离自仔猪病料,并经16srDNA序列鉴定;ATCC表示American Type Culture Collection;CMCC表示中国医学细菌菌种保藏管理中心,其它指示菌来源于实验室保藏。

[0063] 以上所述的实施例仅是对本发明的优选方式进行描述,并非对本发明的范围进行限定,在不脱离本发明设计精神的前提下,本领域普通技术人员对本发明的技术方案做出的各种变形和改进,均应落入本发明权利要求书确定的保护范围内。

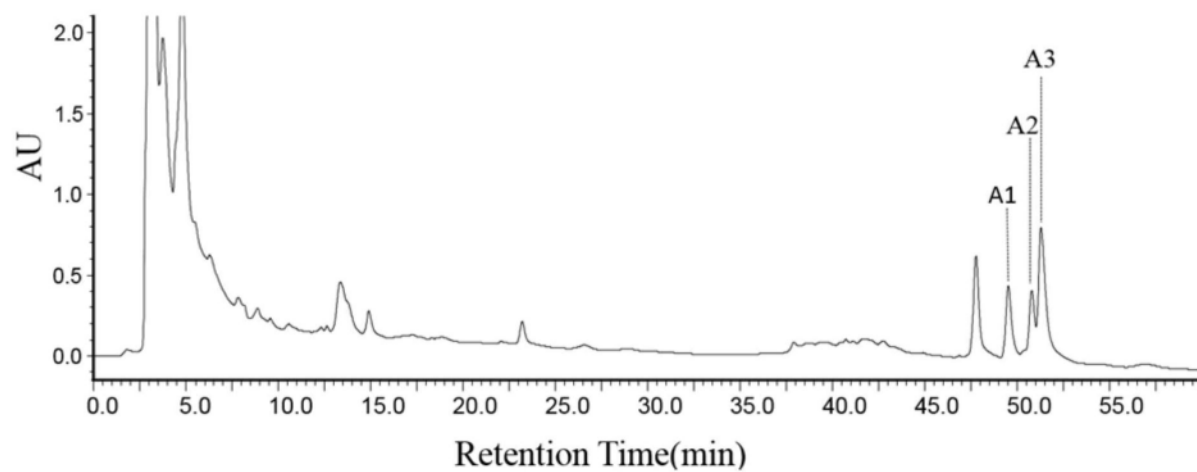


图2