

# 芽孢杆菌 ZYCHH-01 的鉴定与分泌产物

## 纯化及其抑菌机理

蔡巧贤, 彭倩, 李容博, 肖婷, 杨志东,  
高亚惠, 赵逸凡, 吴夏泠, 张玉苍

(集美大学海洋食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021)

[摘要] 对实验室自主分离的芽孢杆菌 ZYCHH-01 进行多相分类和 16S rRNA 测序, 确定其种属; 通过乙酸乙酯萃取法、高效液相色谱纯化、高分辨四极杆飞行时间质谱联用、扫描电子显微镜和碱性磷酸酶泄露等方法, 确定抑菌物质, 探究其抑菌机理。实验结果表明, 芽孢杆菌 ZYCHH-01 纯化产物可以抑制金黄色葡萄球菌、单核增生李斯特菌等革兰氏阳性菌, 大肠杆菌、福氏志贺氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、副溶血弧菌等革兰氏阴性菌, 以及总状毛霉、黑根霉等真菌的生长, 有效抑菌物质的相对分子质量为 1 072.686 2, 1 058.667 2, 1 044.651 1, 1 030.639 5 u 的表面活性素同系物。此外, 实验结果还表明, 芽孢杆菌 ZYCHH-01 的抑菌机理可能是破坏细菌细胞壁。可见, 芽孢杆菌 ZYCHH-01 是一株贝莱斯芽孢杆菌, 有效抑菌物质是 14~16 个碳原子的表面活性素, 能抑制多种革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和真菌的生长。

[关键词] 芽孢杆菌; 分泌物纯化; 表面活性素; 抑菌机理; 多相分类

[中图分类号] Q 939

## Identification, Purification of Secretory Product and Antibacterial Mechanism of *Bacillus* ZYCHH-01

CAI Qiaoxian, PENG Qian, LI Rongbo, XIAO Ting, YANG Zhidong,

GAO Yahui, ZHAO Yifan, WU Xialing, ZHANG Yucang

(College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** The traditional classification method and 16S rRNA gene sequencing were used to identify *Bacillus* ZYCHH-01 strain isolated in our laboratory. The crude bacteriocin extract was obtained by ethyl acetate extraction, and the antibacterial components were confirmed by high performance liquid chromatography and quadrupole time-of flight mass spectrometer. Based on the scanning electron microscope and alkaline phosphatase leakage experiment, the antibacterial mechanism of antibacterial substances was analyzed. The

[收稿日期] 2023-10-17

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目“甲壳素常压催化液化机理及液化产品的应用研究”(21978059); 科技部重点研发计划项目“多源性配料制备及营养设计”(2021YFD210020202)、“馅料类方便主食品质提升及新产品创制关键技术与示范”(2021YFD210020404); 福建省中青年教育科研项目“探究改良果胶酶温度耐受性及其应用”(JAT200280); 集美大学科研启动项目“蛋白质-壳聚糖复合水凝胶的设计和应用”(ZQ2021016)

[作者简介] 通信作者: 吴夏泠(1991—), 讲师, 博士, 从事食品生物资源资源的生物利用研究, E-mail: xlwu@jmu.edu.cn; 张玉苍(1964—), 教授, 博士, 从事多糖资源高值化利用研究, E-mail: yczhang@jmu.edu.cn

fermentation liquid and extraction of *Bacillus* ZYCHH-01 could inhibit the growth of gram-positive bacteria including *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*; Gram-negative bacteria such as *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium* and *Vibrio parahaemolyticus* and fungi containing *Mucor racemosus* and *Rhizopus nigricans*. The mass spectral molecular weight of the effective antibacterial components were 1 072. 686 2, 1 058. 667 2, 1 044. 651 1, 1 030. 639 5 u, respectively. The antibacterial substances produced by *Bacillus* ZYCHH-01 may inhibit bacterial growth by disturbing synthesis of bacterial cell wall. The *Bacillus* ZYCHH-01 was *Bacillus velezensis*, and the antibacterial components were surfactin containing 14-16 carbon atoms and its homologs.

**Keywords:** *Bacillus*; purification of secretory product; surfactin; antibacterial mechanism; polyphase sorting

0 引言

芽孢杆菌 (*Bacillus*) 是一类好氧性或兼性厌氧的革兰氏阳性细菌, 广泛存在于土壤、空气、水体、植物体内及动物肠道等环境中, 易于从土壤和植株中分离获得。1945 年, Johnson 等<sup>[1]</sup>报道了枯草芽孢杆菌能分泌抗菌活性物质, 而后, 研究者们又陆续从不同的芽孢杆菌中发现了 60 多种抗菌物质。随着细菌对抗生素耐药性的提高, 寻找新的抗菌药物日益迫切。芽孢杆菌产生的抑菌物质抑菌谱广泛、作用 pH 值范围大<sup>[2]</sup>。与常规化学抗生素相比, 此类抗菌物质更容易降解, 不会产生有害残留物, 且致病菌对其产生耐药性的难度更大<sup>[3-4]</sup>。芽孢杆菌的代谢产物已被应用于医疗、食品、农业和环境保护等领域, 作为抗生素候选物受到越来越多研究者的关注<sup>[5]</sup>。

芽孢杆菌能够产生肽类<sup>[6]</sup>、脂肽类<sup>[7]</sup>、抗菌蛋白<sup>[8]</sup>和细菌素<sup>[9]</sup>等多种抑菌物质, 这些抑菌物质不仅可以使病原真菌的菌丝发生消融、扭曲, 还能够抑制病原菌菌丝的生长及菌核的形成, 也会破坏细胞结构、抑制其孢子的增生<sup>[10]</sup>。芽孢杆菌最主要的抑菌物质是脂肽类物质<sup>[11]</sup>, 包括表面活性素 (surfactin)、丰源素 (fengycin) 和伊枯草菌素 (iturin), 它们均是由非核糖体途径合成的脂肽类化合物。据报道, 芽孢杆菌发酵产生的具有抑制作用的代谢产物占总基因组的比例可高达 5% ~ 8%<sup>[12]</sup>。环状脂肽 (cyclic lipid peptides, CLPs) 具有抗菌活性好、抗菌谱广、毒性低及在极端条件下仍有高效性等优点, 与常规抗生素相比, CLPs 能通过渗透作用破坏致病菌的细胞膜, 从而对致病菌生长、繁殖产生致命的影响, 而且致病菌对 CLPs 产生耐药性的难度会更大<sup>[3]</sup>, 因此, CLPs 也被认为是常规抗生素的强有力替代品。Meena 等<sup>[13]</sup>发现 *B. velezensis* KLP2016 通过发酵能产生具有抑菌活性作用的 Surfactin, 能对发动机机油进行降解, 解决发动机油污染问题。生防芽孢杆菌的研究开发与应用目前已经取得了许多成果, 但其发展过程仍然存在着不少问题, 如目前大多数研究都是集中在讨论生防菌产生的抑菌物质分类及鉴定, 很少讨论该类抑菌物质的抑菌机理、应用价值及应用的可行性。因此, 本文利用实验室自主筛选的芽孢杆菌 ZYCHH-01 进行多相分类, 确定其具体种属, 通过对其发酵、纯化并表征分析, 得到有效抑菌物质为含有 14 ~ 16 个碳原子的表面活性素, 同时测量芽孢杆菌 ZYCHH-01 的抑菌谱, 探究有效抑菌物质的抑菌机理, 为芽孢杆菌在食品工业、水产品饲料及医疗卫生等领域的应用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌种、试剂与培养基

实验室自主筛选的芽孢杆菌 ZYCHH-01<sup>[14]</sup>, 专利保藏号为 CGMCC No. 26758。革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) CMCC (B) 26003、单核增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) ATCC 14028, 革兰氏阴性菌大肠杆菌 (*Escherichia coli*) ATCC 25922、福氏志贺氏菌 (*Shigella flexneri*) CMCC (B) 51572、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) ATCC 19430 购自上海鲁维科技有限公司; 革兰氏阴性菌副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 5205 由集美大学鄢庆枇教授惠赠; 真菌黑根霉 (*Rhizopus*

*nigricans*) AS3.31 和总状毛霉 (*Mucor racemosus*) CICC3116 购自上海鲁维科技有限公司。

氯化钠、胰蛋白胨、酵母提取物、牛肉浸膏购自上海生工生物工程有限公司; 乙酸乙酯、无水乙醇购自西陇化工; 豆粕粉、碘化丙啶 (PI) 购自北京索莱宝科技有限公司; 碱性蛋白酶 (AKP) 活性检测试剂盒购自南京建成生物工厂研究所; 琼脂购自白鲨生物科技有限公司; PDA 琼脂粉购自北京陆桥技术股份有限公司; 二氯甲烷、甲醇购自上海星可高纯溶剂有限公司; 戊二醛购自上海麦克林生化科技有限公司。

LB 培养基: 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 氯化钠 10 g, 定容至 1 000 mL, 调 pH 值为 7.0~7.2; 发酵培养基: 牛肉浸膏 3 g, 蛋白胨 10 g, 氯化钠 5 g, 葡萄糖 4 g, 豆粕粉 4 g, 定容至 1 000 mL; LB 固体培养基: 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 氯化钠 10 g, 琼脂 15 g, 定容至 1 000 mL, 调 pH 值为 7.0~7.2; 牛肉膏蛋白胨固体培养基: 牛肉浸膏 3 g, 蛋白胨 10 g, 氯化钠 5 g, 琼脂 15 g, 定容至 1 000 mL。

## 1.2 仪器与设备

NU-543-400s 型生物安全柜 (Nuire (美国) 有限公司); ZQPZ-17 型摇床 (天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司); Velocity14R 型台式高速离心机 (天美集团); SCIENTZ-IIID 型超声破碎仪 (新芝生物有限公司); N-1300V-W 型旋转蒸发仪 (埃朗科技国际贸易 (上海) 有限公司); Seq3050 型制备型高效液相色谱 (上海通微分析技术有限公司); 1290-6545-XT 型超高效液相色谱高分辨四极杆飞行时间质谱联用仪 (安捷伦 (美国) 科技有限公司); FDU-1200 型冷冻干燥机 (埃朗科技国际贸易 (上海) 有限公司); Synergy HMF 型多功能酶标仪 (伯腾 (美国) 仪器有限公司); RVL-100 型正置倒置一体荧光显微镜 (ECHO (美国) 有限公司)。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 多相分类

在 LB 固体培养基上对保存的 ZYCHH-01 进行划线, 37 °C 培养 12 h, 观察其菌落形态特征。培养菌株多相分类测试参考《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[15]</sup> 和文献 [16] 报道的研究方法并稍作修改, 将方法中的固体斜面试管改为液体培养基或平板培养基培养: 对于液体培养基, 进行 1% 接种并用 LB 培养基培养; 对于平板培养基, 进行穿刺接种培养, 并进行形态学观察及生化特征的研究。

挑取 LB 固体培养基上的 ZYCHH-01 单菌落, 送至生工生物工程 (上海) 有限公司, 采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 进行测序。测得的序列在 NCBI 网站进行比对, 使用 MEGA 11 软件, 采用邻近法进行系统发育树构建, 判断 ZYCHH-01 的种属类型。

### 1.3.2 芽孢杆菌 ZYCHH-01 抑菌成分来源的制备

#### 1.3.2.1 发酵液的制备

参考文献 [14] 的方法, 取 LB 培养基进行平板划线, 活化芽孢杆菌 ZYCHH-01 菌种。取 LB 培养基制取种子液于 37 °C、200 r/min 条件下培养 24 h。接种 1% 芽孢杆菌 ZYCHH-01 种子液至发酵培养基中, 37 °C、190 r/min 条件下培养 27.5 h, 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min 分离沉淀和上清液, 上清液用 0.22 μm 滤膜过滤制备发酵液, 备用。

#### 1.3.2.2 菌体胞内可溶物溶液的制备

参照大肠杆菌表达重组蛋白的纯化流程<sup>[17]</sup>, 收集节 1.3.2.1 的菌体沉淀, 每 1 g 湿重的菌体加入 5 mL 的 1 × PBS 溶液重悬。在超声破碎仪作用下 (200 W, 60 min) 破碎细胞, 离心 (4 °C, 8 000 r/min, 10 min) 收集上清液, 获得胞内可溶物溶液, 备用。

### 1.3.3 抑菌物质的纯化

#### 1.3.3.1 发酵液纯化

参考文献 [18] 的方法, 取 400 mL 发酵液, 加入等体积乙酸乙酯溶液, 振荡萃取并重复 3 次,

合并3次萃取液,旋转蒸发浓缩至20 mL,得到乙酸乙酯萃取液。

### 1.3.3.2 纯化及抑菌物质的测定

采用制备型高效液相色谱进行分泌物的制备纯化。色谱柱:Z-40 硅胶柱(40  $\mu\text{m}$ , 30 mm  $\times$  250 mm);流动相为V(二氯甲烷):V(甲醇)=8:2;流速为5 mL/min;检测波长为254 nm。收集不同洗脱时间的样品进行抑菌圈的测定。

有抑菌作用的成分用超高效液相色谱高分辨四极杆飞行时间质谱联用仪(UPLC Q-TOF MS)进行检测,并对目标峰进行二级质谱检测,解析抑菌物质的结构。

### 1.3.4 抑菌物质的性质表征

取100  $\mu\text{L}$ 的指示菌液涂布于相应培养基平板,轻置牛津杯于平板表面。加入100  $\mu\text{L}$ 待测液、生理盐水或卡那霉素 $\text{K}^+$ (33 mg/L),4  $^{\circ}\text{C}$ 静置4 h后,37  $^{\circ}\text{C}$ 静置培养8 h<sup>[16]</sup>,测量并记录抑菌圈大小。采用牛津杯法测定芽孢杆菌ZYCHH-01提取物对细菌的抑菌活性。将各保存的细菌菌株甘油管按1%浓度接种到相应的培养基中,其中:大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、单核增生李斯特菌用LB培养基37  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min培养24 h;副溶血弧菌、鼠伤寒沙门氏菌、福氏志贺氏菌用牛肉膏蛋白胨培养基37  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min培养24 h。取各细菌菌株的菌液涂布于相应的固体培养基上,并在牛津杯中加入100  $\mu\text{L}$ 的待测液,在37  $^{\circ}\text{C}$ 下培养12 h。观察是否出现抑菌圈,并测量抑菌圈的直径。

参考王小娟等<sup>[18]</sup>的方法测定芽孢杆菌ZYCHH-01提取物对真菌的抑菌率。黑根霉、总状毛霉用点种法接种在PDA固体培养基。在点种点两侧1.5 cm处放置牛津杯,牛津杯中加入100  $\mu\text{L}$ 的待测液。黑根霉点种后在28  $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养2 d,总状毛霉点种后在28  $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养5 d,并观察菌落生长情况,计算抑菌率。抑菌率的计算公式为

$$\text{抑菌率}/\% = [(\text{对照组菌落直径} - \text{实验组菌落直径})/\text{对照组菌落直径}] \times 100. \quad (1)$$

### 1.3.5 电镜表征

参照高亚惠等<sup>[19]</sup>报道的方法,10  $\mu\text{L}$ 指示菌加入10 mL相应培养基中培养12 h后,实验组加入1 mL液相色谱纯化后的流出峰溶液,对照组加入1 mL液相色谱流动相(V(二氯甲烷):V(甲醇)=8:2),培养12 h。菌液4  $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min离心10 min,沉淀加入20 mL质量分数为2.5%的戊二醛溶液,4  $^{\circ}\text{C}$ 固定12 h。4  $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min离心10 min,去除戊二醛溶液。用超纯水洗涤沉淀物3次,依次加入8 mL不同体积分数的乙醇水溶液(30%, 50%, 80%, 95%, 100%)。细菌脱水后,在-40  $^{\circ}\text{C}$ 下冻干2 d,喷金涂层100 s,用扫描电子显微镜进行形貌表征。

### 1.3.6 细胞膜渗透性的测定

根据Li等<sup>[20]</sup>报道的方法,用液相色谱纯化后的乙酸乙酯萃取液处理金黄色葡萄球菌、单核增生李斯特菌、大肠杆菌、沙门氏菌、副溶血弧菌和福氏志贺氏菌。用碘化丙啶染色进一步证实孢杆菌ZYCHH-01代谢产物对指示菌细胞膜的损伤。芽孢杆菌ZYCHH-01萃取液与指示菌混合培养8 h,然后使用碘化丙啶染料(1 mg/L)在黑暗中对指示菌染色20 min。洗涤和离心后,在荧光显微镜下观察。

### 1.3.7 细胞壁渗透性的测定

参照Wang等<sup>[21]</sup>报道的方法。取1 mL  $1 \times 10^7$  CFU/mL指示菌悬浮液,处理组加入100  $\mu\text{L}$ 液相色谱纯化后的流出峰溶液,分别处理指示菌0, 4, 8 h,对照组加入等体积的流动相,8 000 r/min离心15 min,取上清液用AKP试剂盒测定AKP酶活性。

## 1.4 统计学处理

所有实验测定均做3个平行,测定结果以平均值 $\pm$ 标准差表示。使用Origin 2022软件进行图像处理。实验组和对照组用SPSS统计软件处理,采用Tukey s-b检验或独立 $t$ 值检验进行分析, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。

2 实验结果与分析

2.1 菌株的生理生化特征鉴定

形态观察发现，菌株 ZYCHH-01 菌落呈圆形，凸起，表面较湿润光滑（见图 1a）。革兰氏染色阳性，短杆状，两侧钝圆，有芽孢。长  $0.39 \sim 0.60 \mu\text{m}$ ，宽  $0.12 \mu\text{m}$ （见图 1b）。对菌株 ZYCHH-01 进行 16S rRNA 基因序列测序，在 NCBI 网站进行比对，选择相应模式菌株的 16S rRNA 基因序列使用 MEGA 11 构建系统发育树，结果显示，菌株 ZYCHH-01 类聚到一个分支上（见图 2），与 *Bacillus* sp. strain y2 相似，相似度达到 99.57%。将上述 16S rRNA 基因序列数据上传到国家微生物科学数据中心（national microbiology data center, NMDC），获得序列号为 NMDCN0001CQH。

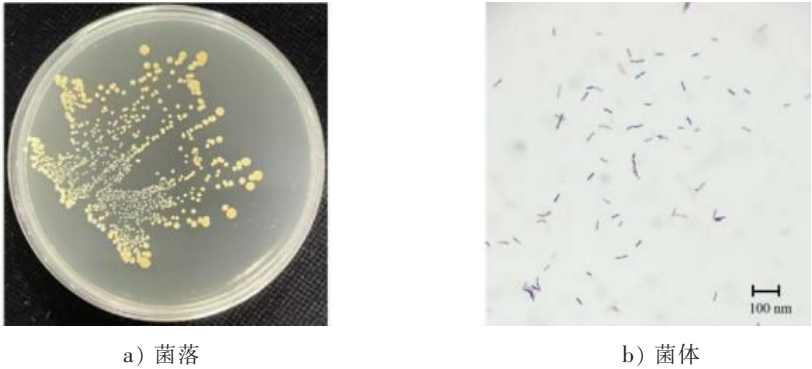


图 1 菌株 ZYCHH-01 的菌落和菌体的形态特征  
Fig.1 Colonial and cellular morphology of ZYCHH-01 strain

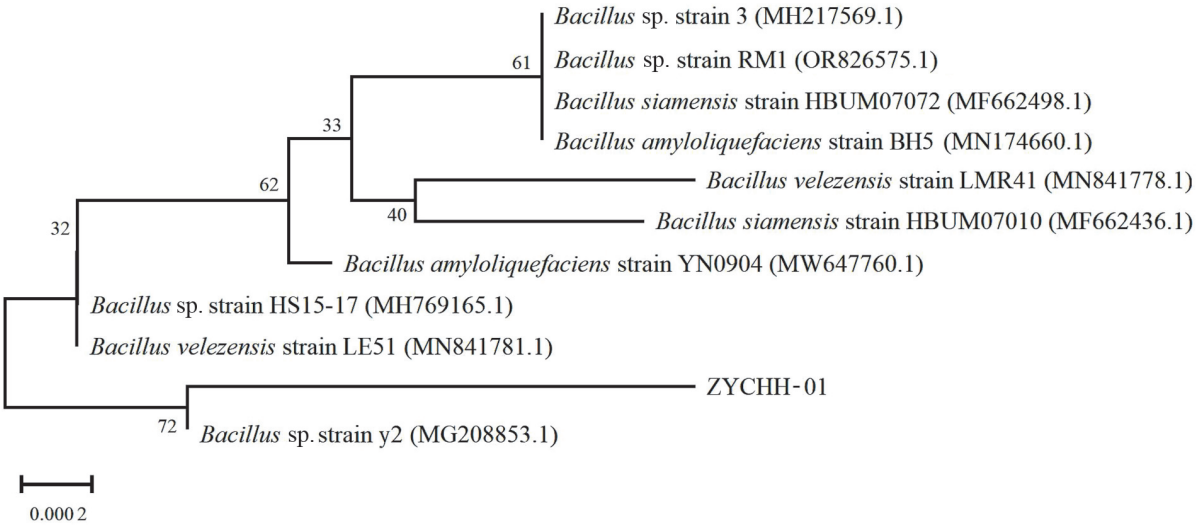


图 2 菌株 ZYCHH-01 的系统发育树  
Fig.2 Phylogenetic tree of ZYCHH-01 strain

实验结果显示，菌株 ZYCHH-01 可以利用糖原、蔗糖、*D*-海藻糖、乳糖、山梨醇、*D*-甘露醇和肌醇作为碳源，耐受 0% ~ 10% NaCl 和 20 ~ 40 ℃ 环境，耐受 pH 值为 6 ~ 9（见表 1）。与对照组相比，菌株 ZYCHH-01 能使明胶液化，利用硝酸盐、牛奶、柠檬酸和吡啶，M. R. 实验结果为阳性。以上结果与文献[22 – 23]报道的 *B. velezensis* 生理生化特性相似，因此判断菌株 ZYCHH-01 为 *B. velezensis*。

表 1 芽孢杆菌 ZYCHH-01 的生理生化特征							
Tab. 1 Physiological and biochemical characteristics of ZYCHH-01 strain							
组别	检测项目	$A_{600}$	阴阳性	组别	检测项目	$A_{600}$	阴阳性
A1	空白(阴性对照)	$0.12 \pm 0.02$	—	C10	4 ℃	$0.03 \pm 0.01$	—
A2	D-葡萄糖	$1.90 \pm 0.10$	W	D1	10 ℃	$0.08 \pm 0.07$	—
A3	D-纤维二糖	$1.78 \pm 0.03$	W	D2	20 ℃	$2.80 \pm 0.01$	+
A4	糖原	$2.99 \pm 0.05$	+	D3	25 ℃	$2.83 \pm 0.01$	+
A5	D-棉籽糖	$1.34 \pm 0.02$	W	D4	28 ℃	$2.83 \pm 0.00$	+
A6	L-鼠李糖	$0.17 \pm 0.07$	—	D5	37 ℃	$2.60 \pm 0.18$	+
A7	蔗糖	$1.99 \pm 0.14$	W	D6	40 ℃	$2.23 \pm 0.08$	+
A8	D-核糖	$1.24 \pm 0.71$	W	D7	45 ℃	$1.98 \pm 0.73$	W
A9	L-山梨糖	$0.09 \pm 0.01$	—	D8	50 ℃	$0.02 \pm 0.01$	—
A10	D-木糖	$0.88 \pm 0.16$	—	D9	pH = 6	$2.81 \pm 0.01$	+
B1	D-半乳糖	$1.51 \pm 0.85$	W	D10	pH = 8	$2.77 \pm 0.00$	+
B2	D-海藻糖	$2.71 \pm 0.04$	+	E1	pH = 10	$0.01 \pm 0.01$	—
B3	乳糖	$2.59 \pm 0.11$	+	E2	氧化酶	—	+
B4	麦芽糖	$1.80 \pm 0.36$	W	E3	过氧化氢酶	—	+
B5	甘露糖	$2.65 \pm 0.01$	+	E4	脲酶	—	—
B6	赤藓糖醇	$0.07 \pm 0.05$	—	E5	吐温-20	—	+
B7	山梨醇	$2.62 \pm 0.06$	+	E6	吐温- 40	—	+
B8	D-甘露醇	$2.55 \pm 0.15$	+	E7	吐温-80	—	+
B9	甘油	$1.71 \pm 0.18$	W	E8	明胶	—	+
B10	淀粉	$0.42 \pm 0.00$	—	E9	淀粉酶	—	+
C1	肌醇	$2.25 \pm 0.04$	+	E10	纤维素酶	—	—
C2	L-丙氨酸	$1.09 \pm 0.32$	W	F1	硝酸盐	—	+
C3	L-半胱氨酸	$2.23 \pm 0.80$	—	F2	硫化氢	—	+
C4	0% NaCl	$2.80 \pm 0.01$	+	F3	黑色素	—	—
C5	2% NaCl	$2.43 \pm 0.37$	+	F4	V-P	—	+
C6	4% NaCl	$2.82 \pm 0.04$	+	F5	M. R.	—	—
C7	6% NaCl	$2.82 \pm 0.02$	+	F6	牛奶分解	—	+
C8	8% NaCl	$2.79 \pm 0.01$	+	F7	柠檬酸利用	—	+
C9	10% NaCl	$2.62 \pm 0.12$	+	F8	吲哚	—	+

说明: 定义  $A_{600} > 2$  为阳性 ( + );  $1 < A_{600} < 2$  为弱阳性 ( W );  $A_{600} < 1$  为阴性 ( — )。

2.2 芽孢杆菌 ZYCHH-01 抑菌成分来源的测定

用卡那霉素作为阳性对照，生理盐水作为阴性对照，测试其胞内、胞外物质对李斯特菌的拮抗效果。用胞内可溶物作李斯特菌抑菌圈实验，结果（见表 2）表明，芽孢杆菌胞内可溶物不含抑菌物质。芽孢杆菌 ZYCHH-01 发酵液的抑菌圈明显，表明发酵液即胞外液中含有浓度较高的抑菌物质。用乙酸乙酯萃取细胞发酵上清液获得萃取液，该萃取液为抑菌圈实验组，乙酸乙酯为对照组。抑菌圈实验结果表明，乙酸乙酯对照组无抑菌圈，萃取液抑菌圈直径较发酵液组更大，说明乙酸乙酯无抑菌效果，且浓缩萃取后抑菌效果更强。因此，选取发酵液进行下一步纯化。

2.3 抑菌物质的纯化、鉴定及抑菌谱

2.3.1 抑菌物质的纯化

将乙酸乙酯萃取液旋蒸浓缩后用硅胶柱制备型液相色谱进行纯化，纯化结果如图 3 所示。由图 3 可见，保留时间为 25，29，32，34 min 左右有流出峰。分别收集峰流出物进行抑菌圈实验，确认有效抑菌物质所在的峰位置。抑菌圈实验结果（见表 3）表明，保留时间为 29，32 min 的峰有明显的抑菌效果，所以，取保留时间为 29，32 min 的峰流出物溶液进行质谱表征。

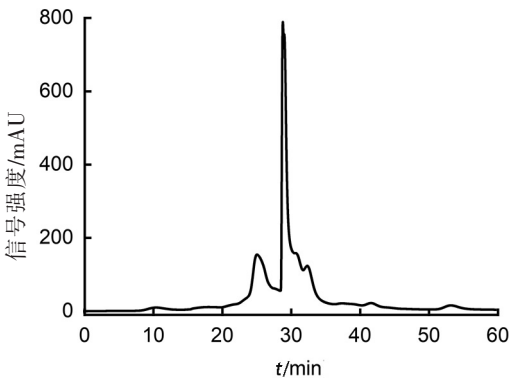


图 3 硅胶柱纯化乙酸乙酯萃取液色谱图  
Fig.3 The chromatography of ethyl acetate extraction purified by silica gel column

2.3.2 抑菌物质的鉴定

将保留时间为 29，32 min 的峰流出物进行质谱检测，一级质谱图结果（见图 4）表明，有 1 072.686 2，1 058.667 2，1 044.651 1，1 030.639 5 u 4 个特征峰，4 个特征峰相对分子质量相差约 14 u，可能是相差 -CH<sub>2</sub> 的同系物。保留时间为 29 min 的一级质谱图还有 1 036.686 9，1 022.673 8 u 2 个特征峰，2 个特征峰相对分子质量相差 14 u。根据已有报道，1 036.686 9，1 022.673 8 u 可能是表面活性素异构体的同系物<sup>[24-25]</sup>。对 5 个特征峰进行二级质谱鉴定，结果见图 5。由图 5 可见，5 个特征峰作为母离子得到的碎片规律类似，都含有 4 个亮氨酸（Leu）、1 个缬氨酸（Val）、1 个天冬氨酸（Asp）和 1 个谷氨酸（Glu），这 7 个氨基酸组成环状结构，尾部有 14 ~ 16 个碳原子组成的脂肪链（FA）。该质谱结果、分析结构与研究发现的 *Bacillus pumilus* 分泌的次级代谢产物类似，并与表面活性素标准品的质谱进行对照，可以确认芽孢杆菌 ZYCHH-01 的有效抑菌成分是表面活性素及其异构体。表面活性素是一类脂肽化合物，由亲水的环状或寡肽及疏水的长链脂肪酸组成，是由非核糖体途

表 2 胞内、胞外物质抑菌成分来源的抑菌圈实验结果

Tab.2 The inhibition zone of extraction from intracellular and extracellular substances

项目	抑菌圈直径/mm
生理盐水	0 <sup>d</sup>
卡那霉素	18.66 ± 0.37 <sup>e</sup>
胞内可溶物	0 <sup>d</sup>
发酵液	10.53 ± 0.79 <sup>b</sup>
乙酸乙酯	0 <sup>d</sup>
乙酸乙酯萃取液	17.90 ± 0.93 <sup>e</sup>

表 3 不同保留时间峰流出物抑菌成分来源的抑菌圈实验结果

Tab.3 The inhibition zone of extraction from peak effluent of different retention time

保留时间/min	抑菌圈直径/mm
25	24.11 ± 1.24 <sup>b</sup>
29	32.91 ± 4.84 <sup>a</sup>
32	32.41 ± 2.57 <sup>a</sup>
34	27.76 ± 1.52 <sup>ab</sup>

径合成的抑菌物质<sup>[26]</sup>。肽环中的氨基酸顺序为：*L*-Glu – *L*-Leu – *D*-Leu – *L*-Val – *L*-Asp – *D*-Leu – *L*-Leu，首位的 *L*-Glu 和第 7 位的 *L*-Leu 连接形成七肽环<sup>[27]</sup>。根据实验结果并结合已有的文献报道，芽孢杆菌 ZYCHH-01 的抑菌作用应为表面活性素及其异构体的协同抑菌作用。

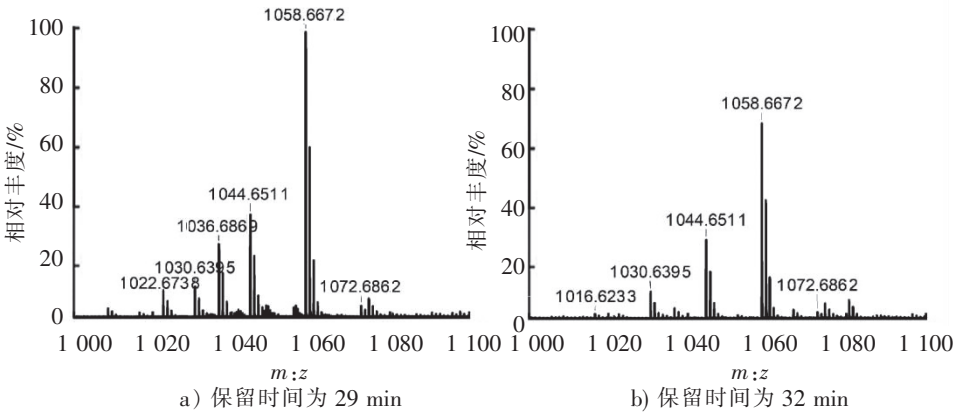


图 4 乙酸乙酯提取物的一级质谱图

Fig.4 The MS of ethyl acetate extraction

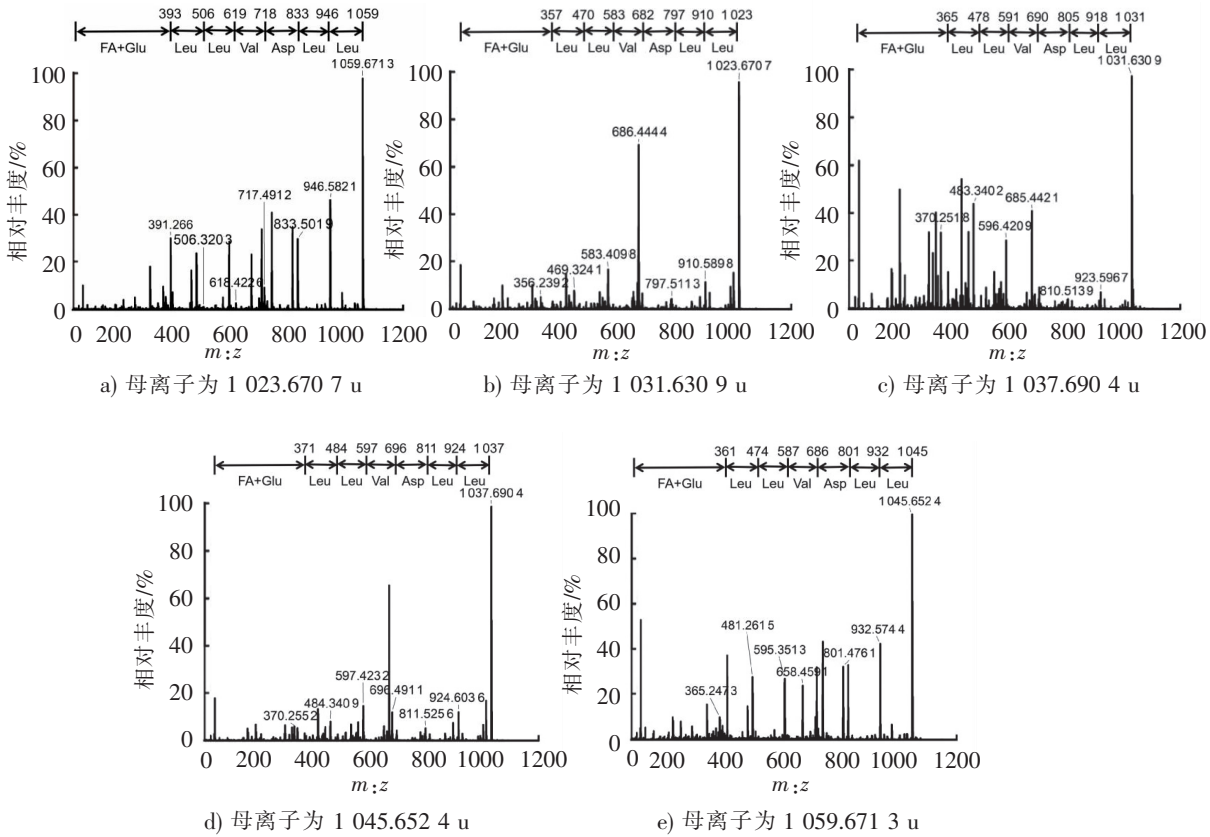


图 5 乙酸乙酯提取物的二级质谱图

Fig.5 The MS-MS of ethyl acetate extraction

2. 3. 3 抑菌谱

将医疗卫生、食品工业和水产养殖等行业主要的致病菌作为指示菌测试提取物质的抑菌谱，其中包括 2 株革兰氏阳性菌（*G*<sup>+</sup>）、4 株革兰氏阴性菌（*G*<sup>-</sup>）和 2 株真菌。实验结果（见图 6 ~ 7）表明，提取物对革兰氏阴性菌的抑菌作用优于对革兰氏阳性菌的抑菌作用，这与细菌细胞壁的结构有

关。革兰氏阳性菌的细胞壁较厚，且肽聚糖成分含量较高，不利于芽孢杆菌 ZYCHH-01 的提取物进入细菌内部，使得抑菌圈较商业抗生素小。但细菌抑菌谱结果（见表 4）表明，提取物的抑菌性和商业抗生素硫酸卡那霉素相当，甚至对于部分水产致病菌效果优于商业抗生素。对于选取的 2 株真菌菌株，芽孢杆菌 ZYCHH-01 的提取物有明显的抑菌效果（见表 5），说明该提取物的抑菌范围广，可以作为潜在的抗生素替代物。

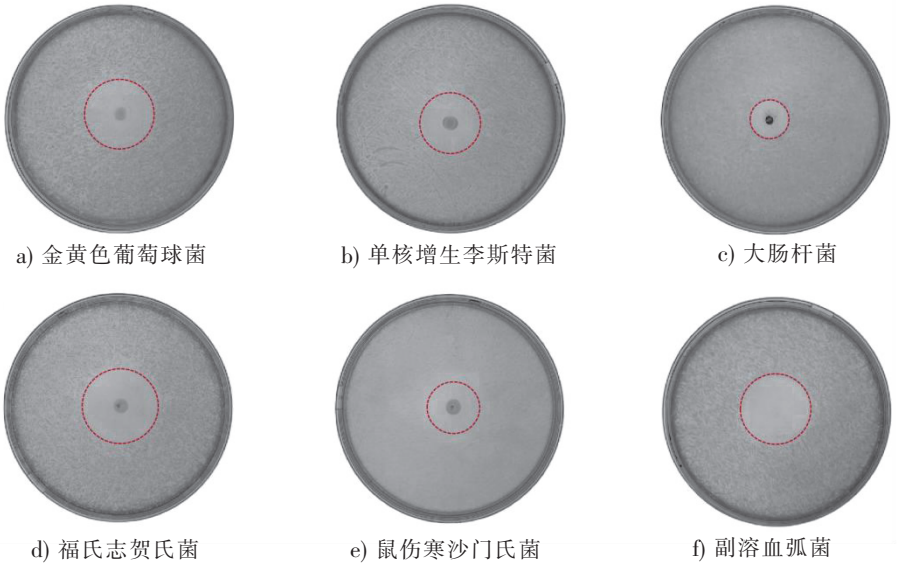


图 6 提取物的抑菌圈实验结果  
Fig.6 The results of antibacterial zone

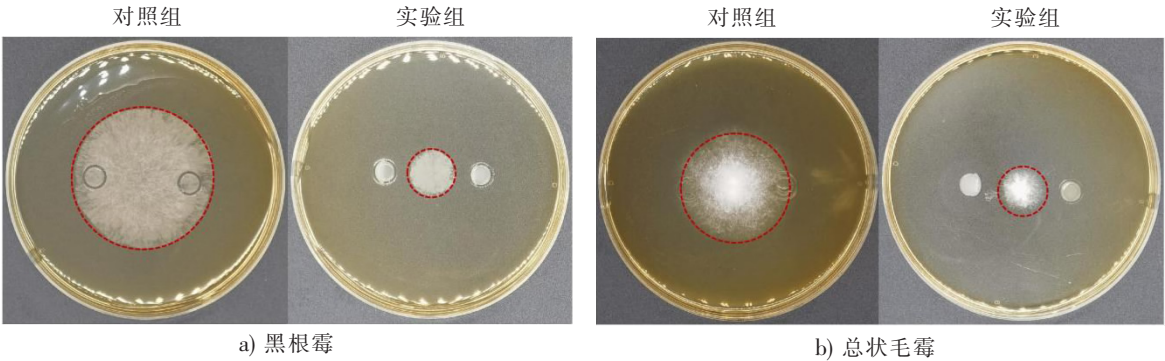


图 7 提取物的抑菌率实验结果  
Fig.7 The results of antifungus rate

表 4 提取物的细菌抑菌谱  
Tab. 4 The antibacterial activity of purified extraction

菌株	抑菌圈直径/mm		
	提取物	K <sup>+</sup> 硫酸卡那霉素	生理盐水
金黄色葡萄球菌	13. 01 ± 1. 16 <sup>b</sup>	17. 91 ± 1. 32 <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup>
单核增生李斯特菌	14. 94 ± 2. 94 <sup>b</sup>	18. 66 ± 0. 37 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>
大肠杆菌	15. 00 ± 1. 06 <sup>b</sup>	16. 12 ± 0. 64 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>
福氏志贺氏菌	25. 09 ± 2. 31 <sup>b</sup>	22. 91 ± 0. 82 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>
鼠伤寒沙门氏菌	14. 88 ± 1. 23 <sup>b</sup>	16. 42 ± 0. 59 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>
副溶血弧菌	28. 08 ± 2. 48 <sup>a</sup>	21. 05 ± 1. 35 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>

表 5 提取物的真菌抑菌谱  
Tab. 5 The antifungus activity of purified extraction

菌株	菌落直径/mm		抑菌率/%	
	提取物	生理盐水	提取物	生理盐水
黑根霉	18. 05 ± 3. 71 **	45. 13 ± 4. 23 **	60. 0	—
总状毛霉	10. 36 ± 0. 68 **	29. 19 ± 3. 20 **	64. 5	—

说明:\*\*表示  $P<0.001$ 。

2. 4 抑菌机理探究

2. 4. 1 扫描电子显微镜表征指示菌

6 种指示菌在对照组（只加生理盐水）和实验组（加提取物）的电镜结果见图 8。由图 8 可见，对照组的指示菌菌株较为饱满且分散均匀，实验组的指示菌菌株发生皱缩现象，且培养 24 h 后菌液较为澄清，离心后的菌体沉淀很少。结合实验结果和文献[28]报道，推测可能的抑菌机理是，提取物与细菌的细胞壁相互作用使菌体裂解，导致细菌死亡。具体提取物如何与细菌细胞壁相互作用，还需进行更深层次的研究。

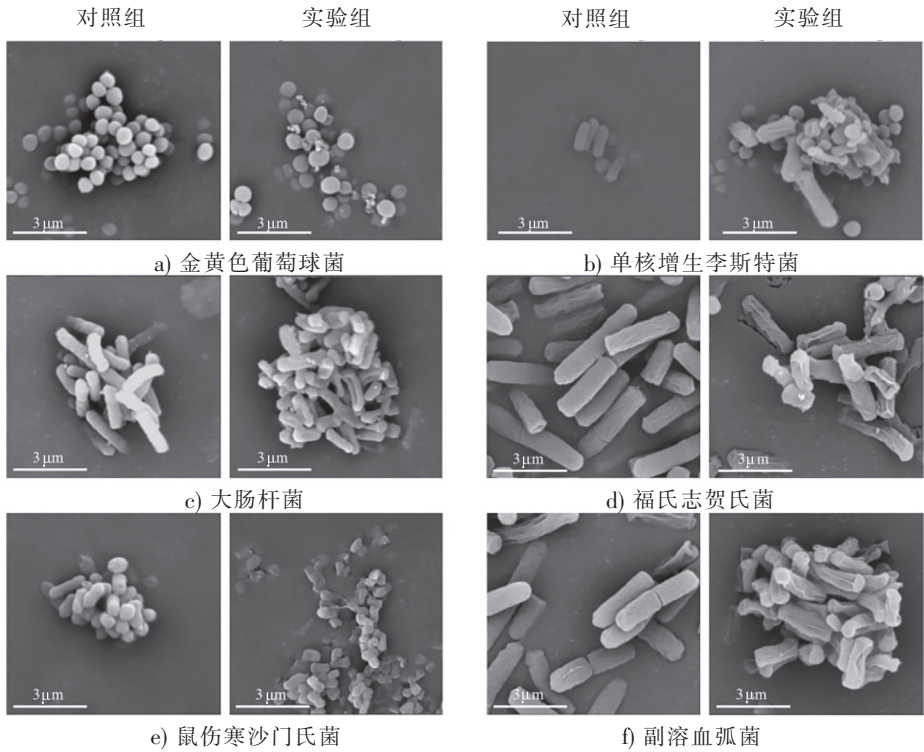


图 8 各种指示菌的电镜实验结果

Fig.8 Scanning electron microscope of indicator bacteria

2. 4. 2 代谢产物中抑菌物质对细菌细胞膜的影响

碘化丙啶是一种荧光 DNA 嵌入染料，不能进入具有完整质膜的细胞，通常用作质膜破裂的检测指标。碘化丙啶染色实验结果如图 9 所示。可见，革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌在纯化物处理后观察到红色荧光，表明纯化物会破坏细菌细胞膜完整性，碘化丙啶进入细胞内与 DNA 结合染色；而 4 种革兰氏阴性菌大肠杆菌、福氏志贺氏菌、鼠伤寒沙门氏菌和副溶血弧菌在纯化物处理后没有观察到红色荧光，说明纯化物并没有破坏其细胞膜。

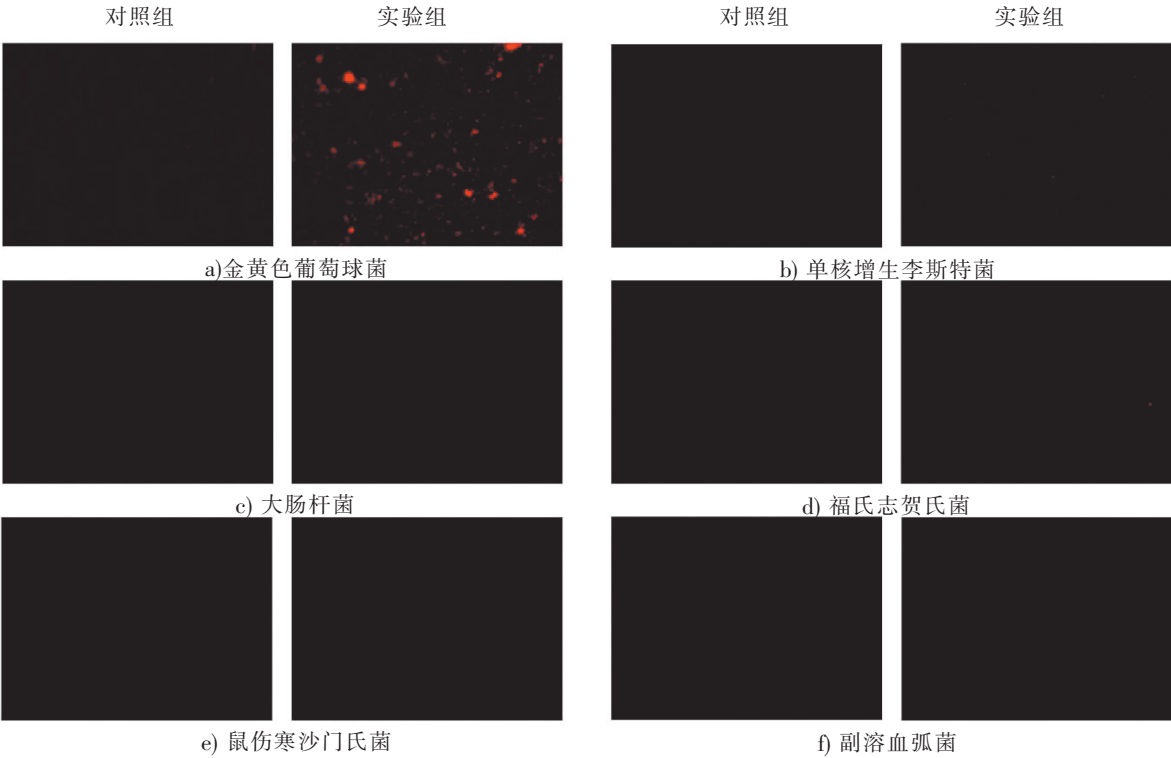


图 9 各种指示菌的碘化丙啶染色结果

Fig.9 The results of PI staining of indicator bacteria

2. 4. 3 代谢产物中抑菌物质对细菌细胞壁的影响

AKP 是一种存在于细菌细胞壁和细胞膜之间的酶，若细菌细胞壁完整性遭到破坏，AKP 会发生泄露，通过检测其活力可探究 ZYCHH-01 代谢产物中抑菌物质对细菌细胞壁的影响。AKP 泄露实验结果如图 10 所示。可见，随着培养时间的延长，大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、副溶血弧菌和福氏志贺氏菌中测得的 AKP 活力显著增加 ( $P < 0.05$ )，证实 ZYCHH-01 代谢产物中的抑菌物质可以有效破坏这 4 种细菌的细胞壁。

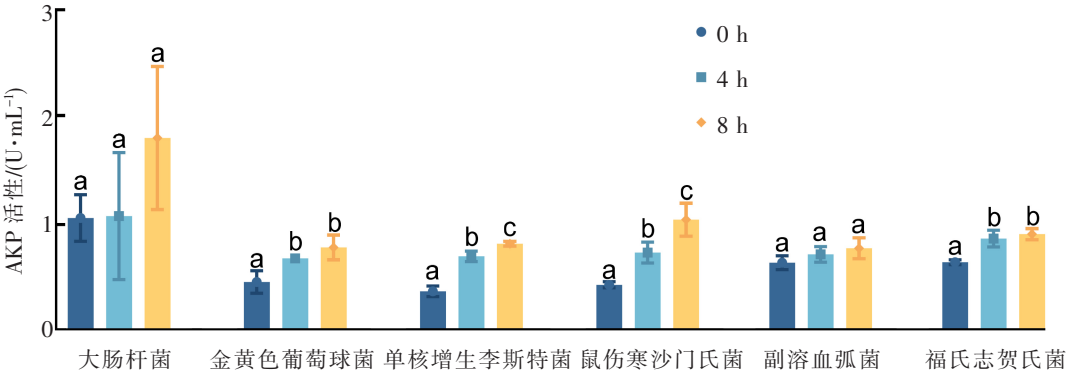


图 10 各种指示菌的 AKP 测试结果

Fig.10 AKP test results of various indicator bacteria

3 结论

对实验室自主筛选的芽孢杆菌 ZYCHH-01 进行多相分类，结果表明，适合芽孢杆菌增殖代谢的碳

源有糖原、蔗糖、*D*-海藻糖、乳糖、山梨醇、*D*-甘露醇和肌醇,适合芽孢杆菌增殖代谢的氮源有 *L*-半胱氨酸,最佳 NaCl 质量浓度为 1%,最佳发酵温度为 28 ℃,最佳发酵 pH=7。通过乙酸乙酯萃取、制备型高效液相色谱和质谱等表征方法,确定 ZYCHH-01 的有效抑菌物质主要为含有 14~16 个碳原子的表面活性素。抑菌谱结果表明,ZYCHH-01 的分泌物对常见的革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和真菌有一定的抑菌作用。扫描电子显微镜、碘化丙啶染色和 AKP 泄露实验结果表明,提取物作用后的大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、副溶血弧菌和福氏志贺氏菌细胞壁破裂,对于革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌,分泌物还可使其细胞膜受损。可见,表面活性素在生物医药、食品工业和水产饲料等方面具有一定的应用前景。

## [ 参 考 文 献 ]

- [1] JOHNSON F H, CAMPBELL D H. The retardation of protein denaturation by hydrostatic pressure[J]. Journal of Cellular and Comparative Physiology, 1945, 26(1): 43-46. DOI:10. 1046/j. 1365-2710. 2001. 00314. x.
- [2] 张宝. 解淀粉芽孢杆菌抗菌脂肽 bacillomycin L 的纯化鉴定及抑菌机理研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2014.
- [3] GALICA T, HROUZEK P, MAREŠ J. Genome mining reveals high incidence of putative lipopeptide biosynthesis NRPS/PKS clusters containing fatty ac-AMP ligase genes in biofilm-forming cyanobacteria[J]. Journal of Phycology, 2017, 53(5): 985-998. DOI:10. 1111/jpy. 12555.
- [4] MNIF I, HAMMAMI I, TRIKI M A, et al. Antifungal efficiency of a lipopeptide biosurfactant derived from *Bacillus subtilis* SPB1 versus the phytopathogenic fungus, *Fusarium solani*[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2015, 22: 18137-18147. DOI:10. 1007/s11356-015-5005-6.
- [5] LEE M, LEE J, NAM Y, et al. Characterization of antimicrobial lipopeptides produced by *Bacillus* sp. LM7 isolated from chungkookjang, a Korean traditional fermented soybean food[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 221: 12-18. DOI:10. 1016/j. ijfoodmicro. 2015. 12. 010.
- [6] 赵朋超, 王建华, 权春善, 等. 枯草芽孢杆菌抗菌肽生物合成的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(10): 108-113.
- [7] COCHRANE S A, VEDERAS J C. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: a gold mine of antibiotic candidates[J]. Medicinal Research Reviews, 2016, 36(1): 4-31. DOI:10. 1002/med. 21321.
- [8] WANG N N, YAN X, GAO X N, et al. Purification and characterization of a potential antifungal protein from *Bacillus subtilis* E1R-J against *Valsa mali*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 32: 1-10. DOI:10. 1007/s11274-016-2024-5.
- [9] LEITE J A, TULINI F L, REIS-TEIXEIRA F B D, et al. Bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Bacillus cereus*: preliminary characterization and application of partially purified extract containing BLIS for inhibiting *Listeria monocytogenes* in pineapple pulp[J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 72: 261-266. DOI:10. 1016/j. lwt. 2016. 04. 058.
- [10] CRUZ MARTÍN M, LEYVA L, ACOSTA SUÁREZ M, et al. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* against *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 1[J]. Agronomía Mesoamericana, 2021, 2(32): 466-478. DOI:10. 15517/am. v32i2. 39720.
- [11] 王皓楠, 靳鹏飞, 康迅, 等. 解淀粉芽孢杆菌 HAB-6 抑菌物质及其相关基因的分析[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(4): 79-83.
- [12] FIRA D, DIMKI I, BERI T, et al. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species[J]. Journal of Biotechnology, 2018, 285: 44-55. DOI:10. 1016/j. jbiotec. 2018. 07. 044.
- [13] MEENA K R, DHIMAN R, SINGH K, et al. Purification and identification of a surfactin biosurfactant and engine oil degradation by *Bacillus velezensis* KLP2016[J]. Microbial Cell Factories, 2021, 20: 1-12. DOI:10. 1186/s12934-021-01519-0.
- [14] 韩旭东, 张玉苍, 李瑞松, 等. 芽孢杆菌 ZYCHH-01 发酵条件优化及其抑菌物质的研究[J]. 中国酿造, 2020, 39(2): 38-43.
- [15] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 364-387.
- [16] 韩帅波. 盐环境来源微生物多相分类及嗜盐古菌基因组适应性及演化研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2021.

- [17] VERA A M, GALERA-PRAT A, WOJCIECHOWSKI M, et al. Cohesin-dockerin code in cellulosomal dual binding modes and its allosteric regulation by proline isomerization[J]. *Structure*, 2021, 29(6):587-597. DOI:10.1016/j.str.2021.01.006.
- [18] 王小娟, 任莉, 张铃玉, 等. 解淀粉芽孢杆菌发酵液的抑菌活性及抗氧化作用[J]. *集美大学学报(自然科学版)*, 2022, 27(2):122-132.
- [19] 高亚惠, 吴夏玲, 杨丹敏, 等. 芽孢杆菌 ZYCHH-01 发酵液提取物的抗菌抗氧化性能评价及应用[J]. *精细化工*, 2023, 40(11):2445-2453.
- [20] LI Q, ZHU X M. Vanillin and its derivatives, potential promising antifungal agents, inhibit *Aspergillus flavus* spores via destroying the integrity of cell membrane rather than cell wall[J]. *Grain & Oil Science and Technology*, 2021, 4(2):54-61. DOI:10.1016/j.gaost.2021.03.002.
- [21] WANG F, WEI F Y, SONG C X, et al. *Dodartia orientalis* L. essential oil exerts antibacterial activity by mechanisms of disrupting cell structure and resisting biofilm[J]. *Industrial Crops and Products*, 2017, 109:358-366. DOI:10.1016/j.indcrop.2017.08.058.
- [22] 张军, 张良, 汤伟, 等. 贝莱斯芽孢杆菌 1-3 产表面活性素的纯化、鉴定及表征[J]. *食品科学*, 2023, 44(4):177-184.
- [23] 高艳侠. 一株贝莱斯芽孢杆菌 LF01 的分离、鉴定及其应用研究[D]. 上海:上海海洋大学, 2019.
- [24] HONG S Y, LEE D H, LEE J H, et al. Five surfactin isomers produced during *Cheonggukjang* fermentation by *Bacillus pumilus* HY1 and their properties[J]. *Molecules*, 2021, 26(15):1-13. DOI:10.3390/molecules26154478.
- [25] WANG Y Y, ZHANG C Y, LIANG J, et al. Surfactin and fengycin B extracted from *Bacillus pumilus* W-7 provide protection against potato late blight via distinct and synergistic mechanisms[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(17):7467-7481. DOI:10.1007/s00253-020-10773-y.
- [26] 侯正杰, 孙慧中, 白松, 等. 环脂肽生物合成的研究进展[J]. *合成生物学*, 2021, 2(4):577-597.
- [27] KRAAS F I, HELMETAG V, WITTMANN M, et al. Functional dissection of surfactin synthetase initiation module reveals insights into the mechanism of lipoinitiation[J]. *Chemistry & Biology*, 2010, 17(8):872-880. DOI:10.1016/j.chembiol.2010.06.015.
- [28] KOHANSKI M A, DWYER D J, COLLINS J J. How antibiotics kill bacteria:from targets to networks[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(6):423-435. DOI:10.1038/nrmicro2333.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)