

研究报告

纳豆芽孢杆菌 Bna05 菌株产抗霉脂肽的鉴定

王青云^{1,2*} 林亲录^{1,2} 彭宽³ 屈璐璐^{1,2} 任嘉瑜^{1,2} 曹建中^{1,2}

(1. 中南林业科技大学食品科学与工程学院 湖南 长沙 410004)

(2. 稻谷及副产物深加工国家工程实验室 湖南 长沙 410004)

(3. 中南林业科技大学 林业生物技术湖南省重点实验室 湖南 长沙 410004)

摘要: 【目的】分析枯草芽孢杆菌纳豆菌亚种 Bna05 菌株代谢产物中脂肽类物质的存在情况,并探讨它们在抗霉功能中所发挥的作用。【方法】利用特异性引物对 Bna05 菌株进行脂肽合成酶类基因片段扩增、测序和 BLAST 比对分析;通过平板抑菌圈区域取样法获得 Bna05 菌株的高抗霉活性代谢产物,对该产物进行反相高效液相色谱(RP-HPLC)分离;用琼脂微稀释法测定分离物的抗霉活性,并对活性分离物进行质谱鉴定。【结果】Bna05 菌株含有 *sfp* 和 *srfAA* 基因,未检测到 *ituC*、*ituD*、*fenD*、*fenACE*、*bymB*、*bymC* 基因;RP-HPLC 分离得到 3 组抗霉活性物质 F₂、F₃ 和 F₄, F₂ 中未检测到脂肽类物质,从 F₃ 和 F₄ 中分别鉴定出两类 Surfactin 同系物: V₇-surfactin 和 I/L₇-surfactin。两类 Surfactin 分别与 F₂ 组合使用时,均表现出抗霉协同作用;此外,与 Surfactin 单独使用相比,两类 Surfactin 混合物与 F₂ 组合后的协同抗霉活性得到进一步增强。【结论】Bna05 菌株所产脂肽类物质主要是 V₇-surfactin 和 I/L₇-surfactin, Surfactin 与 Bna05 菌株所产其它活性物质之间存在抗霉协同作用,而 V₇-surfactin 和 I/L₇-surfactin 的同时存在,对于增强这种协同抗霉作用是有利的。

关键词: 纳豆芽孢杆菌, 脂肽, 抗霉, 表面活性素

Identification of antifungal lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* natto Bna05

WANG Qing-Yun^{1,2*} LIN Qin-Lu^{1,2} PENG Kuan³ QU Lu-Lu^{1,2}
REN Jia-Yu^{1,2} CAO Jian-Zhong^{1,2}

(1. College of Food Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004, China)

(2. National Engineering Laboratory for Rice and By-product Deep Processing, Changsha, Hunan 410004, China)

(3. Hunan Provincial Key Laboratory of Forestry Biotechnology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004, China)

Abstract: [Objective] To isolate and identify lipopeptides in metabolites of *Bacillus subtilis* subsp.

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31440070, 31571874); Outstanding Youth Project of Education Department of Hunan Province (No. 15B250)

*Corresponding authors: Tel/Fax: 86-731-85623240; E-mail: qingyun0406@163.com

Received: February 13, 2017; Accepted: April 26, 2017; Published online (www.cnki.net): May 09, 2017

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31440070, 31571874); 湖南省教育厅优秀青年基金项目(No. 15B250)

*通讯作者: Tel/Fax: 86-731-85623240; E-mail: qingyun0406@163.com

收稿日期: 2017-02-13; 接受日期: 2017-04-26; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-05-09

natto Bna05 and to assess antifungal activity of the identified lipopeptides. **[Methods]** Primers specific for lipopeptide synthetases were used to amplify DNA fragments from strain Bna05 by PCR. The amplified DNA fragments were sequenced and analyzed using BLAST against GenBank database. The antifungal metabolites were obtained from the inhibition zone formed between Bna05 and *Aspergillus niger* on modified PDA plate and separated by RP-HPLC. Antifungal activity of fractions separated by RP-HPLC was determined by micro-dilution method and the active molecules were identified by mass spectrum analysis. **[Results]** Genes for *srfAA* and *sfp* were identified in strain Bna05. However, genes encoding for *ituC*, *ituD*, *fenD*, *fenACE*, *bymB* and *bymC* were not detected. Three active fractions F₂, F₃ and F₄ were isolated by RP-HPLC. Lipopeptide was not detected in F₂. Two kinds of surfactin variants were identified from F₃ and F₄: V₇-surfactin variants in F₃ and I/L₇-surfactin variants in F₄. Synergistic effect against *Aspergillus niger* was observed when F₂ was used together with either V₇-surfactins or I/L₇-surfactins. The best antifungal activity was obtained when all three fractions were used together. **[Conclusion]** V₇-surfactins and I/L₇-surfactins were the main lipopeptides secreted by *B. subtilis natto* Bna05. Synergistic antifungal effect was found against *Aspergillus niger* when surfactins were used together with other active compounds such as F₂. The greatest synergistic effect was obtained when both V₇-surfactins and I/L₇-surfactins were used together with F₂.

Keywords: *Bacillus subtilis natto*, Lipopeptide, Antifungal, Surfactin

芽孢杆菌(*Bacillus*)因其能产生广谱抗菌活性的脂肽类物质,在食品、环境、医药等多个领域中具有重要应用价值。报道较多的产抗菌脂肽的芽孢杆菌主要有枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)^[1-2]、蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)^[3-4]、解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)^[5-6]、地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)^[7-8]等,它们所产抗菌脂肽的种类主要有表面活性素类(Surfactins)^[2,9-10]、丰原素类(Fengycins)^[11-12]、伊枯草菌素类(Iturins)^[2,9]及一些结构类似物如抗霉枯草菌素(Mycosubtilin)^[13]、杆菌抗霉素(Bacillomycin)^[14-15]、地衣素(Lichenysin)^[7-8]等。关于这些脂肽类物质的分子结构、功能特性及应用等已引起众多研究者的广泛关注,并逐渐成为近年来的研究热点。

枯草芽孢杆菌纳豆菌亚种(*B. subtilis* subsp. *natto*)常简称纳豆芽孢杆菌或纳豆菌,其代谢产物具有较强的抗菌活性。由于该菌来源于传统发酵食品纳豆,因而在安全性方面比其它芽孢杆菌更加值得信赖,近年来,已被用于新型食品防腐保鲜剂^[16-18]及抗菌药物^[19]的研发。研究^[20-21]认为,纳豆芽孢杆菌之所以具有较强的抗菌活性,与其代谢产物中含有脂肽类物质有关,然而,关于纳豆芽孢杆菌所产

脂肽的种类及分子结构,至今未见有确凿的资料报道。

在前期研究工作中,我们从市售的纳豆中分离到具有高抗霉活性的Bna05菌株,该菌株在改良马铃薯葡萄糖琼脂(Potato dextrose agar, PDA)平板上对黑曲霉(*Aspergillus niger*)、黄曲霉(*Aspergillus flavus*)、烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)等都具有良好的抑制作用,并且对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)等多种细菌也有明显的抑制效果(数据未报道)。本文利用特异性引物对该菌DNA进行脂肽合成酶类相关基因片段扩增、测序和BLAST比对分析;同时,对该菌的高抗霉活性代谢产物进行反相高效液相色谱(Reversed phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC)分离和质谱鉴定,旨在分析该菌所产抗菌脂肽的种类并探讨它们在抗霉活性中所发挥的作用,为开发新型、安全、高效的食品防腐剂或抗霉药物提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 菌种及培养基

Bna05菌株:采用常规平板划线分离法从市售纳豆中分离得到。16S rRNA基因序列分析及生理

生化鉴定的结果表明(数据未报道), 该菌株为枯草芽孢杆菌纳豆菌亚种。

黑曲霉: 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC 3.6469)。

改良 PDA 培养基(g/L): 新鲜的去皮马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 20.0, 酵母浸出粉 3.0, Na_2HPO_4 1.5, KH_2PO_4 1.0, 丙氨酸 0.3, 谷氨酸 0.3 g, 天冬氨酸 0.3, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

改良 MM 培养基(g/L): NaNO_3 20.0, 葡萄糖 20.0, Na_2HPO_4 1.5, KH_2PO_4 1.0, 酵母浸出粉 3.0, 琼脂 15.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min; 葡萄糖单独灭菌。

1.2 其他材料、主要试剂和仪器

96 孔 PCR 产物纯化板, Millipore 公司; 12 孔平底细胞培养板, 美国 Corning 公司。脂肽合成酶类基因片段特异性引物由北京六合华大基因科技股份有限公司武汉分公司合成; 乙腈、甲醇和三氟

乙酸为 Tedia 色谱纯试剂; 酵母浸出粉为国产生物试剂; 其它试剂均为国产或进口分析纯试剂。LYNX6000 型高速冷冻离心机、LTQ Velos Pro 质谱仪, 美国 Thermo Scientific 公司; 9700 型 PCR 扩增仪、3730XL 型 DNA 测序仪, 美国 Applied Biosystems 公司; 冷冻干燥机, 美国 GOLD-SIM 公司; 20A 半制备型 HPLC 系统, 日本 Shimadzu 公司。

1.3 抗菌脂肽合成酶类基因片段的检测方法

Bna05 菌株在 LB 培养基中培养过夜, 4°C 、10 000 r/min 条件下离心 10 min 得菌体, 参考 Athukorala 等^[22]报道的方法提取菌体 DNA。所检测的抗菌脂肽合成酶类基因片段及对应的特异性引物如表 1 所示。PCR 过程及条件按照 Mora 等^[23]报道的方法。PCR 产物经 96 孔纯化板纯化和 DNA 测序仪测序, 在 NCBI (National Center for Biotechnology Information)中通过 BLAST 将所测得序列与文库中现有序列进行相似性比对分析。

表 1 所检测的脂肽合成酶类基因片段及其引物
Table 1 The primers for biosynthetic genes of several antibiotic lipopeptides synthetases

脂肽名称 Lipopeptide	基因 Gene	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	产物长度 Product length (bp)	参考文献 References
Iturin A	<i>ituC</i>	ITUCF	GGCTGCTGCAGATGCTTTAT	423	[23-24]
		ITUCR	TCGCAGATAATCGCAGTGAG		
	<i>ituD</i>	ITUDF	ATGAACAATCTTGCTTTTTTA	1 203	[25-26]
		ITUDR	TTATTTTAAAATCCGCAATT		
Fengycin	<i>fenD</i>	FEND1F	TTTGGCAGCAGGAGAAGTTT	964	[27]
		FEND1R	GCTGTCCGTTCTGCTTTTTTC		
	<i>fenACE</i>	FENACEF	CCCATCCGACYGTAGAAG	820	[28]
		FENACER	GTGTAAGCRGCAAGYAGCAC		
Surfactin	<i>sfp</i>	Sfp-f	ATGAAGATTACGGAATTTA	675	[28-29]
		Sfp-r	TTATAAAAAGCTCTTCGTACG		
		SRFAF	TCGGGACAGGAAGACATCAT	201	
SRFAR	CCACTCAAACGGATAATCCTGA				
Bacillomycin	<i>bymB</i>	BYMBF	GAATCCCGTTGTTCTCCAAA	370	[23]
		BYMBR	GCGGGTATTGAATGCTTGTT		
	<i>bymC</i>	BACC1F	GAAGGACACGGCAGAGAGTC	875	[27]
BACC1R	CGCTGATGACTGTTTCATGCT				

1.4 Bna05 菌株高抗霉活性代谢产物的制备方法

采用平板抑菌带区域取样法制备 Bna05 菌株的高抗霉活性代谢产物。具体方法为: 在直径 15 cm 的无菌培养皿中倒入灭菌后冷却至 45 °C 左右的改良 PDA 培养基 20 mL, 待其冷却凝固后, 将活化好的 Bna05 菌株点接于平板上距边缘约 2.5 cm 的圆周区域, 28±1 °C 倒置培养 24 h, 再在平板中心部位接入 10⁶ CFU/mL 的黑曲霉孢子悬液 10 μL, 静置待干后, 继续倒置于 28±1 °C 培养 4–6 d, 可观察到在 Bna05 菌株的菌落周围形成了对黑曲霉生长有明显抑制作用的抑菌带(图 1)。以相同条件下只接种黑曲霉的平板为对照。用无菌刀片将图 1 所示抑菌带区域及对照区域的培养基取下, 分别以 50% (体积比) 的甲醇为溶剂浸提 30 min (溶剂用量与所取培养基重量相同), 所得浸提液经 0.22 μm 超滤膜过滤, 供 RP-HPLC 分离使用。

1.5 RP-HPLC 分离方法

采用 Waters Symmetry C18 4.6 mm×150 mm、粒径 5 μm 色谱柱。流动相 A 为超纯水, 流动相 B 为乙腈:甲醇=5:1 (体积比)的混合溶液, A、B 中均含 0.04% (体积比)三氟乙酸; 洗脱梯度为: 0–8 min, 10% B; 8–48 min, 10%–96% B; 48–55 min, 96% B; 55–56 min, 96%–10% B。比较样品组和对照组的 HPLC 图谱, 收集样品中与对照组不同的各洗脱峰, 冻干, 供抗霉活性分析和质谱鉴定使用。

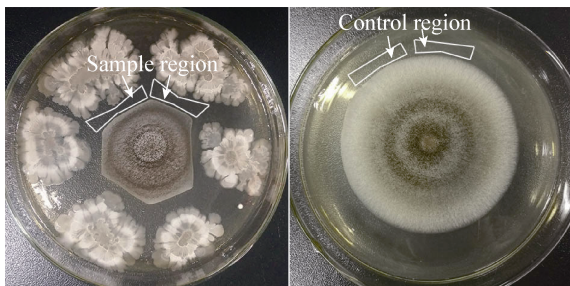


图 1 Bna05 菌株在改良 PDA 平板上对黑曲霉形成的抑菌区域

Figure 1 The inhibition zone formed between strain Bna05 and *A. niger* on modified PDA plate

1.6 琼脂微稀释法(Agar micro-dilution method)测定 RP-HPLC 分离物的抗霉活性

传统的琼脂稀释法是测定抗霉活性的一种准确和有效的方法, 然而该方法需要的试剂量大, 不适用于待测试剂量较少的情况。因此, 采用琼脂微稀释法^[30]测定 RP-HPLC 分离物的抗霉活性: 在平底 12 孔板的各孔中依次加入经 2 倍连续稀释的待测物水溶液 20 μL 和 980 μL 改良 MM 培养基, 使第一个孔中待测物的浓度为 200 μg/mL, 其它孔中的待测物浓度依次两倍递减, 以待测物浓度为 0 的孔作为对照。待培养基冷却凝固后, 在各孔的中心点加入浓度为 10⁶ CFU/mL 的黑曲霉孢子悬液 5 μL, 静置待干, 倒置于 28±1 °C 恒温培养箱中培养 48 h, 测定各孔中黑曲霉的菌落直径, 按下式计算霉菌生长抑制率 (Fungal inhibition rate, FIR):

$$\text{FIR}\% = [(d_c - d_x) / d_c] \times 100$$

d_c : 对照孔中霉菌菌落直径(mm); d_x : 样品孔中霉菌菌落直径(mm)。

FIR%≥50%时所对应的样品浓度中的最低值即为该样品的 MIC₅₀, 实验重复 3 次。

1.7 抗霉活性成分的鉴定方法

具有抗霉活性的 RP-HPLC 各分离物经质谱鉴定以确定其成分。采用配置 HESI-II 探针的 LTQ Velos Pro 质谱仪对 RP-HPLC 分离得到的抗霉活性物质进行鉴定。分析程序设置、上样和数据收集通过 LTQ Tune 软件实现。通过 Xcalibur 软件进行实验数据分析。

对于质谱分析无法直接鉴定出其成分的 RP-HPLC 分离物, 则通过 LC-MS/MS 进行鉴定。液相分离采用 Acclaim PepMap RSLC C18 柱, 液相及串联质谱分析均参考刘静等^[31]的方法。所得串联质谱数据通过 MASCOT 搜索 Uniprot 数据库。搜索条件: Trypsin 消化, 遗漏酶切位点 1 个, 一级质谱误差 5×10⁻⁶, 二级质谱误差 0.25 Da, 固定修饰 Carbamidomethyl (C), 可变修饰 Oxidation (M), 显著性阈值 0.05。

1.8 抗霉活性成分间的抗霉协同作用测定

将 RP-HPLC 所分离到的各抗霉活性成分, 参考它们在抑菌带区域中的含量之比(约等于各分离物冻干后的质量比)进行组合, 按照上文中的琼脂微稀释法测定各组合的 MIC₅₀, 分析各组间的抗霉协同作用。

2 结果与分析

2.1 脂肽合成酶类基因片段检测结果

8 对引物中, 只有 Sfp-f/Sfp-r 和 SRFAF/SRFAR 两对引物的 PCR 产物出现了预期的条带, 纯化、测序后, 在 NCBI 中通过 BLASTx 进行相似性分析, 结果表明, 这两对引物的扩增产物与 *Bacillus* 来源的多个不同登录号的相应序列都具有很高的相似性(表 2)。BACC1F/BACC1R 和 FENACEF/FENACER 两对引物的扩增产物为非特异性条带, BMYBF/BMYBR、FEND1F/FEND1R、ITUCF/ITUCR 和 ITUDF/ITUDR 四对引物的 PCR 产物电泳检测结果无条带显示。因此, 可以判断 Bna05 菌株含有 Surfactin 合成的相关基因, 未检测到 IturinA、Fengycin 及 Bacillomycin 合成相关基因片段的存在。

2.2 RP-HPLC 分离物及其抗霉活性

采用抑菌圈区域取样法制得的 Bna05 菌株代谢产物经 RP-HPLC 分离后, 依次得到 F₁、F₂、F₃、F₄ 共四组峰。其中 F₁ 为样品组和对照组的共有峰, 因此仅收集后三组峰, 冻干, 用于抗霉活性测定和

质谱分析。

采用琼脂微稀释法测得 F₂、F₃、F₄ 对黑曲霉的 MIC₅₀ 分别为 22.3±3.5、172.7±12.6 和 136.2±10.7 μg/mL。

2.3 抗霉活性物质的质谱鉴定结果

质谱检测的结果, 未发现 F₂ 中存在已知的抗菌脂肽, 也未鉴定出 F₂ 中的其它抗霉活性物质。在 F₃ 中检测到 M/Z 为 1 008.65 的两种 V₇-surfactins, 分别为 C₁₄-V₇-surfactin 和 C₁₃-E₁(CH₃)-V₇-surfactin (图 2)。在 F₄ 中检测到了 *m/z* 分别为 1 008.65、1 022.65 和 1 036.68 的 3 种 I/L₇-surfactin 同系物 (图 3)。所鉴定出的 Surfactin 同系物的种类及氨基酸序列见表 3。

2.4 LC-MS/MS 检测结果

采用 LC-MS/MS 对样品 F₂ 进行了进一步的检测。MASCOT 检索的结果表明: F₂ 中含有与 Nattokinase、Subtilisin、Fibrinolytic enzyme 等多种活性蛋白相匹配的成分, 其中, 可能与抗霉活性有关的成分见表 4。表 4 所列活性物质中, Subtilisin 通常是由芽孢杆菌产生的一种蛋白酶, 有研究证实其结构类似物具有抗霉活性^[32], Serine alkaline protease 对多种病原真菌具有良好的抑制作用^[33], Fibrinolytic enzyme 也已被证实可能与抗霉活性有关^[34]。这些抗霉蛋白的存在, 可能是样品 F₂ 表现出较强抗霉活性的原因。F₂ 中抗霉蛋白的分离纯化和抗霉活性测定, 有待于进一步的研究。

表 2 脂肽合成酶类基因片段特异性引物 PCR 扩增产物序列的 BLAST 结果

Table 2 Blast results of the sequenced products obtained from PCR amplification using specific primers for biosynthetic genes of lipopeptides synthetases

引物 Primer	扩增产物长度 Product length (bp)	匹配酶类 Obtained match	NCBI 登录号 Accession No.	一致性 Identities (%)	E 值 E-value
Sfp-f	675	Sfp [<i>Bacillus subtilis</i>]	AEK64474.1	97	1e-144
Sfp-r		Sfp [<i>Bacillus subtilis</i>]	ACN67521.1	99	8e-140
		Sfp [<i>Bacillus subtilis</i>]	ACN67523.1	97	2e-134
		Sfp [<i>Bacillus subtilis</i>]	ACN67522.1	98	4e-128
		Sfp [<i>Bacillus subtilis</i>]	ACN67522.1	98	4e-128
SRFAF	201	Surfactin synthase subunit1 [<i>Bacillus</i>]	WP_010886402.1	100	3e-25
SRFAR		Surfactin synthetase [<i>Bacillus subtilis</i>]	BAA02522.1	100	3e-25
		srfA1 [<i>Bacillus subtilis</i>]	CAA49816.1	100	3e-25
		Surfactin family lipopeptide synthetase A [<i>Bacillus subtilis</i>]	SEN92599.1	96	7e-24

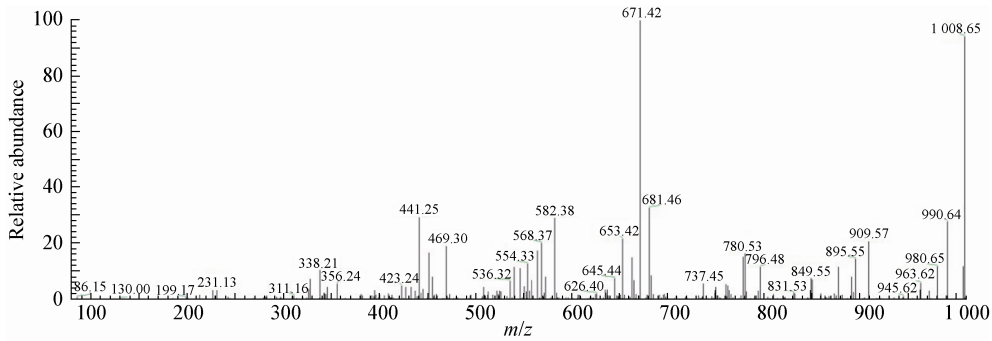


图 2 F₃ 中 V₇-surfactins 的二级质谱图
Figure 2 MS² spectrum of V₇-surfactins in F₃

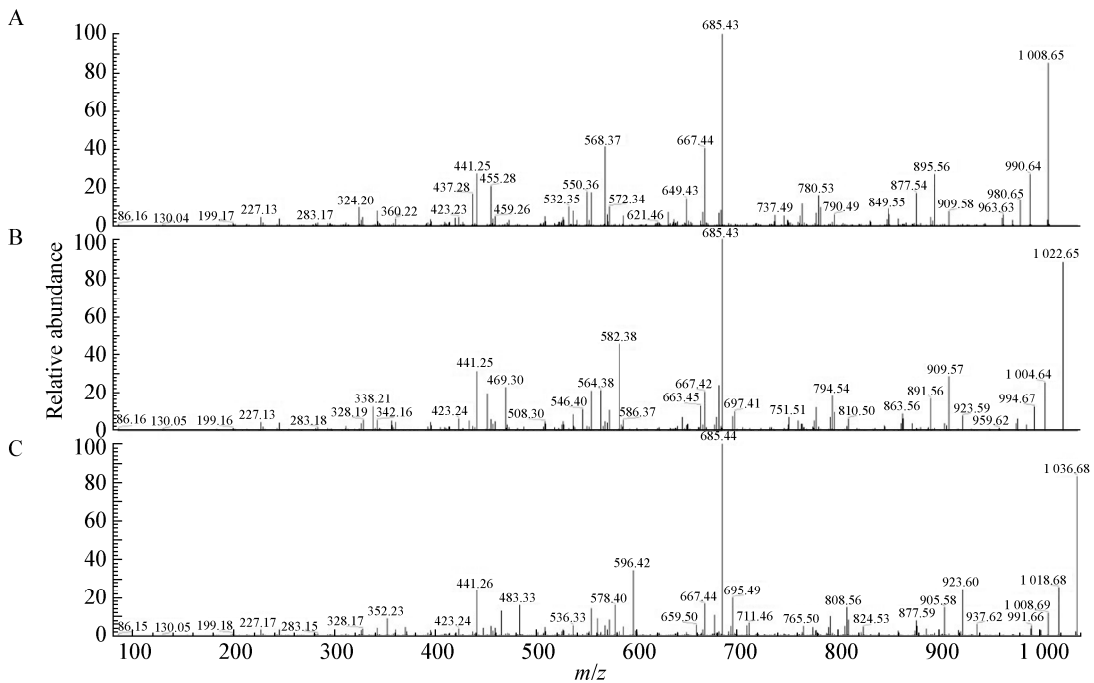


图 3 F₄ 中 I/L₇-surfactins 的二级质谱图
Figure 3 MS² spectrum of I/L₇-surfactins in F₄

注: A: C₁₃-I/L₇-surfactin 的二级质谱图; B: C₁₃-E₁(CH₃)-I/L₇-surfactin 的二级质谱图。
Note: A: MS² spectrum of C₁₃-I/L₇-surfactin; B: MS² spectrum of C₁₃-E₁(CH₃)-I/L₇-surfactin; C: MS² spectrum of C₁₄-E₁(CH₃)-I/L₇-surfactin.

表 3 Bna05 菌株所产 Surfactin 同系物
Table 3 The identified surfactin variants secreted by strain Bna05

质荷比 [M+H] ⁺ (m/z)	结构 Structure	表面活性素 Surfactins
1 008.65	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{E}_1-\text{I}/\text{L}_2-\text{I}/\text{L}_3-\text{V}_4-\text{D}_5-\text{I}/\text{L}_6-\text{V}_7$	C ₁₄ -V ₇ -surfactin
1 008.65	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_9-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{E}_1(\text{CH}_3)-\text{I}/\text{L}_2-\text{I}/\text{L}_3-\text{V}_4-\text{D}_5-\text{I}/\text{L}_6-\text{V}_7$	C ₁₃ -E ₁ (CH ₃)-V ₇ -surfactin
1 008.65	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_9-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{E}_1-\text{I}/\text{L}_2-\text{I}/\text{L}_3-\text{V}_4-\text{D}_5-\text{I}/\text{L}_6-\text{I}/\text{L}_7$	C ₁₃ -I/L ₇ -surfactin
1 022.65	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_9-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{E}_1(\text{CH}_3)-\text{I}/\text{L}_2-\text{I}/\text{L}_3-\text{V}_4-\text{D}_5-\text{I}/\text{L}_6-\text{I}/\text{L}_7$	C ₁₃ -E ₁ (CH ₃)-I/L ₇ -surfactin
1 036.68	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{E}_1(\text{CH}_3)-\text{I}/\text{L}_2-\text{I}/\text{L}_3-\text{V}_4-\text{D}_5-\text{I}/\text{L}_6-\text{I}/\text{L}_7$	C ₁₄ -E ₁ (CH ₃)-I/L ₇ -surfactin

表4 LC-MS/MS 检测到的样品 F₂ 中可能与抗霉活性有关的蛋白质
Table 4 The antifungal activity related proteins identified by LC-MS/MS in sample F₂

蛋白名称 Protein name	Uniprot 登录号 Uniprot accession No.	分子量 Mass (Da)	Mascot 分值 Mascot score	序列覆盖率 Sequence coverage (%)	来源微生物 Origin organism
Subtilisin	Q7WVA6	39 547	271	29	<i>Bacillus subtilis</i>
Fibrinolytic enzyme	A4USB1	37 115	220	32	<i>Bacillus subtilis</i>
Thermostable serine alkaline protease	L8AEF2	39 479	258	26	<i>Bacillus subtilis</i> BEST7613

2.5 活性成分间的抗霉协同作用

将 F₂、F₃、F₄ 参照它们在平板抗霉区域中的含量之比(约等于它们冻干后的质量比 3:1:1), 进行组合, F₂:F₃、F₂:F₄ 的质量比均为 3:1, F₃:F₄ 的质量比为 1:1。为了比较在 Surfactins 总量不变的情况下, 两类 Surfactins 共存时的协同抗霉活性有无变化, 将组合 F₂:F₃:F₄ 的比例设定为 3:0.5:0.5。所测得各组合的 MIC₅₀ 值如表 5 所示, 由表 5 可见, F₂:F₃、F₂:F₄、F₂:F₃:F₄ 三个组合的 MIC₅₀ 值与它们各自的 MIC₅₀ 相比, 降低幅度均在 50% 以上。方差分析($P < 0.05$)表明, F₂:F₃ 与 F₂:F₄ 的 MIC₅₀ 值之间差异不显著, F₂:F₃:F₄ 的 MIC₅₀ 值分别与 F₂:F₃ 和 F₂:F₄ 的 MIC₅₀ 值相比, 均有显著的降低。说明 V₇-surfactins 与 F₂、I/L₇-surfactins 与 F₂ 之间都有一定的抗霉协同作用, 而两类 Surfactins 共同存在时能有效增强其抗霉协同作用。F₃:F₄ 组合的 MIC₅₀ 值无明显变化, 说明两类 Surfactins 之间无协同作用。

3 讨论

芽孢杆菌抗菌脂肽的制备和分离通常是以发酵上清液为原料, 采用加酸沉淀法^[35-36]实现的。然

表5 各活性分离物组合对黑曲霉的 MIC₅₀ 值
Table 5 The MIC₅₀ of different combinations of the active fractions against *A. niger*

组合 Combinations	比例 Ratio (m/m)	MIC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$, total concentration)
F ₂ :F ₃	3:1	10.2 \pm 2.1
F ₂ :F ₄	3:1	11.1 \pm 3.5
F ₃ :F ₄	1:1	>100
F ₂ :F ₃ :F ₄	3:0.5:0.5	8.9 \pm 2.7

而纳豆芽孢杆菌发酵上清液中高分子蛋白类物质的含量较高, 因此所得酸沉淀物中大部分是蛋白类物质, 不利于脂肽的分离纯化。本研究采用抑菌圈区域取样法, 既保证了样品中含有有效的抗霉活性物质, 同时也避免了与抗霉活性无关的大分子代谢产物的干扰, 有利于样品的后期分离和成分鉴定。

分子鉴定的结果表明, Bna05 菌株含有 *srfAA* 和 *sfp* 基因, 两者都是 Surfactin 合成所不可缺少的。其中 *srfAA* 是 *srfA* 操纵子中的结构基因之一。*srfA* 操纵子通常在对数生长期的后期依赖于 ComA-ComP 复合物的调节作用启动^[37], *comA* 是早期发现的一种与细菌竞争性发展有关的基因^[38], 其产物 ComA 的活性受蛋白激酶 ComP 作用下的磷酸化调节。磷酸化后的 ComA 能与 ComP 形成复合物并作为正向调节因子结合到 *srfA* 操纵子上, 从而使转录启动^[39]。*srfA* 操纵子的表达同时还受培养基中葡萄糖浓度和谷氨酰胺浓度的调节^[37,39], 当培养基中葡萄糖含量过高时, *srfA* 操纵子会通过另一种不依赖于 ComP 的方式表达^[37], 而培养基中谷氨酰胺过量时, 会对表达产生抑制作用^[39]。*sfp* 是位于 *srfA* 操纵子下游 4 kb 处与 Surfactin 合成相关的另一个基因^[37], 负责编码磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶 (Phosphopantetheinyl transferase), 该酶可激活参与 Surfactin 合成的多酶复合体^[40], 因而对于 Surfactin 的生物合成具有重要意义。

在 Uniprot 和 NCBI 数据库中对纳豆芽孢杆菌的多个菌株, 如 BEST195 菌株等的蛋白质库及基因文库进行检索的结果表明: 这些菌株也只含有 Surfactin 合成酶类及相关基因, 未检索到 Iturin、Fengycin 合成酶类或基因。这说明只合成 Surfactin 而不能合成

Iturin 和 Fengycin 并不是 Bna05 菌株的独有特性,很可能是多数纳豆芽孢杆菌菌株的共同特征。

与抗菌脂肽 Iturin 和 Fengycin 相比, Surfactin 本身的抗菌活性通常较弱,但它能与 Iturin、Enrofloxacin 等多种抗霉活性物质一起表现出较强的协同作用^[41-42],这与本研究中发现 F₃、F₄ 均与 F₂ 存在抗霉协同作用的结果是一致的。Surfactin 因其两性分子特性,很容易与蛋白、脂类等多种物质相结合。Maget-Dana 等^[42]在研究 Surfactin 与 Iturin 协同作用时发现, Iturin 能结合到 Surfactin 形成的单分子膜上,并借助 Surfactin 极强的表面活性,从而可以更容易靠近目标细胞并破坏其细胞膜。本研究中 Surfactin 与 F₂ 协同作用的机理虽然还不明确,但 Surfactin 的特性决定了它能与 F₂ 中的抗霉活性蛋白结合,从而增强抗霉活性蛋白与霉菌细胞的亲和力,更加容易接近和进入霉菌细胞,这可能是 Surfactin 与 F₂ 之间协同效应的一个主要原因。至于 V₇-surfactin 和 I/L₇-surfactin 同时存在时可增强 Surfactin 抗霉协同作用的原因,可能与 V₇-surfactin 相对较好的亲水性及利于在水相中的分散有关,具体原因有待进一步的深入研究。

Surfactin 与其它抗菌药物的协同作用能降低药物的有效使用浓度,缓解病原菌逐年增加的抗药性问题,具有较大的研究价值。目前,关于 Surfactin 协同抗菌活性的研究多是以常见的 I/L₇-surfactin 为研究对象,而关于 V₇-surfactin 及两类 Surfactin 共同存在时与其它抗菌药物协同作用的研究还未见有文献报道。本研究发现 V₇-surfactin 具有与 I/L₇-surfactin 相似的协同抗霉活性,且两类 Surfactins 共同存在时能增强 Surfactin 的协同抗霉作用。这对于 Surfactin 在抗菌药物中的应用具有理论指导意义。

参 考 文 献

- [1] Dunlap CA, Schisler DA, Price NP, et al. Cyclic lipopeptide profile of three *Bacillus subtilis* strains; antagonists of *Fusarium* head blight[J]. The Journal of Microbiology, 2011, 49(4): 603-609
- [2] Pathak KV, Keharia H. Identification of surfactins and iturins produced by potent fungal antagonist, *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) tree using mass spectrometry[J]. 3 Biotech, 2014, 4(3): 283-295
- [3] Sadfi N, Cherif M, Hajlaoui MR, et al. Isolation and partial purification of antifungal metabolites produced by *Bacillus cereus*[J]. Annals of Microbiology, 2002, 52(3): 323-337
- [4] Deng JL, Liu HY, Liu YX, et al. Identification of the antifungal substances from *Bacillus amyloliquefaciens* strain YN-1[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2010, 40(2): 202-209 (in Chinese)
邓建良, 刘红彦, 刘玉霞, 等. 解淀粉芽孢杆菌 YN-1 抑制植物病原真菌活性物质鉴定[J]. 植物病理学报, 2010, 40(2): 202-209
- [5] Benitez LB, Velho RV, Lisboa MP, et al. Isolation and characterization of antifungal peptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LBM5006[J]. The Journal of Microbiology, 2010, 48(6): 791-797
- [6] Yu GY, Sinclair JB, Hartman GL, et al. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2002, 34(7): 955-963
- [7] Joshi S, Yadav S, Desai AJ. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum medium components for the enhanced production of lichenysin by *Bacillus licheniformis* R2[J]. Biochemical Engineering Journal, 2008, 41(2): 122-127
- [8] Yakimov MM, Fredrickson HL, Timmis KN. Effect of heterogeneity of hydrophobic moieties on surface activity of lichenysin A, a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus licheniformis* BAS50[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 1996, 23(1): 13-18
- [9] Bonmatin JM, Lapr votte O, Peypoux F. Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents[J]. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, 2003, 6(6): 541-556
- [10] Shaligram NS, Singhal RS. Surfactin—a review on biosynthesis, fermentation, purification and applications[J]. Food Technology and Biotechnology, 2010, 48(2): 119-134
- [11] de Faria AF, St fani D, Vaz BG, et al. Purification and structural characterization of fengycin homologues produced by *Bacillus subtilis* LSFM-05 grown on raw glycerol[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2011, 38(7): 863-871
- [12] Deleu M, Paquot M, Nylander T. Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes[J]. Biophysical Journal, 2008, 94(7): 2667-2679
- [13] Lecl re V, B chet M, Adam A, et al. Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(8): 4577-4584
- [14] Moyne AL, Shelby R, Cleveland TE, et al. Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2001, 90(4): 622-629
- [15] Xu ZH, Shao JH, Li B, et al. Contribution of Bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(3): 808-815
- [16] Pu YH, Sun LJ, Wang YL, et al. Inhibitory activity of a novel antibacterial peptide AMPNT-6 from *Bacillus subtilis* against *Listeria monocytogenes* in shrimp[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(13): 94-98 (in Chinese)
蒲月华, 孙力军, 王雅玲, 等. 纳豆菌抗菌肽对对虾中单核细胞增生李斯特菌的抑菌效应[J]. 食品工业科技, 2013,

- 34(13): 94-98
- [17] Yang JX. *Bacillus subtilis* natto the preservation effect of media of edible fungi[D]. Nanchang: Master's Thesis of Jiangxi Agricultural University, 2012 (in Chinese)
杨激心. 纳豆芽孢杆菌对食用菌保鲜作用的研究[D]. 南昌: 江西农业大学硕士学位论文, 2012
- [18] Zhang LJ, Qi LL, Yang Y. Study on bacteriostasis effect of *Bacillus natto* and its application in soymilk[J]. Food Science and Technology, 2008, 33(12): 17-19 (in Chinese)
张丽靖, 齐莉莉, 杨郁. 纳豆菌的抑菌效果及在豆浆保鲜中应用研究[J]. 食品科技, 2008, 33(12): 17-19
- [19] Cao XH, Liao ZY, Wang CL, et al. Evaluation of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus natto* TK-1 as a potential source of anti-adhesive, antimicrobial and antitumor activities[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2009, 40(2): 373-379
- [20] Liu HM, Sun LJ, Wang YL, et al. Antibacterial mechanism of lipopeptide from *Bacillus natto* against *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Food Science, 2012, 33(15): 201-205 (in Chinese)
刘唤明, 孙力军, 王雅玲, 等. 纳豆菌抗菌脂肽对副溶血弧菌的抑菌机理探讨[J]. 食品科学, 2012, 33(15): 201-205
- [21] Liu HM, Wang YL, Sun LJ, et al. Study on inhibitory effect of lipopeptides from *Bacillus natto* on *Fusarium* isolated from shrimp culture environment producing T-2 toxin[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(5): 784-789 (in Chinese)
刘唤明, 王雅玲, 孙力军, 等. 纳豆菌脂肽对分离于对虾养殖环境中产 T-2 毒素镰孢菌抑制效应的研究[J]. 水产学报, 2013, 37(5): 784-789
- [22] Athukorala SNP, Fernando WGD, Rashid KY. Identification of antifungal antibiotics of *Bacillus* species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometry[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2009, 55(9): 1021-1032
- [23] Mora I, Cabrefiga J, Montesinos E. Antimicrobial peptide genes in *Bacillus* strains from plant environments[J]. International Microbiology, 2011, 14(4): 213-223
- [24] Mora I, Cabrefiga J, Montesinos E. Cyclic lipopeptide biosynthetic genes and products, and inhibitory activity of plant-associated *Bacillus* against phytopathogenic bacteria[J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0127738
- [25] Grover M, Nain L, Singh SB, et al. Molecular and biochemical approaches for characterization of antifungal trait of a potent biocontrol agent *Bacillus subtilis* RP24[J]. Current Microbiology, 2010, 60(2): 99-106
- [26] Hsieh FC, Lin TC, Meng M, et al. Comparing methods for identifying *Bacillus* strains capable of producing the antifungal lipopeptide iturin A[J]. Current Microbiology, 2008, 56(1): 1-5
- [27] Ramarathnam R, Bo S, Chen Y, et al. Molecular and biochemical detection of fengycin- and bacillomycin D-producing *Bacillus* spp., antagonistic to fungal pathogens of canola and wheat[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2007, 53(7): 901-911
- [28] Wang Z. Purification and identification of effective components extracted from antiaflatoxic Hitwh-B05 strain[D]. Harbin: Doctoral Dissertation of Harbin Institute of Technology, 2013 (in Chinese)
王琢. 抑黄曲霉毒素的 Hitwh-B05 菌株有效成分的分离纯化与鉴定[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学博士学位论文, 2013
- [29] Porob S, Nayak S, Fernandes A, et al. PCR screening for the surfactin (*sfp*) gene in marine *Bacillus* strains and its molecular characterization from *Bacillus tequilensis* NIOS11[J]. Turkish Journal of Biology, 2013, 37(2): 212-221
- [30] Lu SE, Novak J, Austin FW, et al. Occidiofungin, a unique antifungal glycopeptide produced by a strain of *Burkholderia contaminans*[J]. Biochemistry, 2009, 48(35): 8312-8321
- [31] Liu J, Pan YH, Xu Q, et al. Separation and analysis of wheat leaf proteome by combination of 2D-LC and Nano LC-MS/MS[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2009, 42(3): 772-780 (in Chinese)
刘静, 潘映红, 徐琴, 等. 小麦叶片蛋白质组的 2D-LC 分离及 Nano LC-MS/MS 分析[J]. 中国农业科学, 2009, 42(3): 772-780
- [32] Yan L, Qian Y. Cloning and heterologous expression of SS10, a subtilisin-like protease displaying antifungal activity from *Trichoderma harzianum*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2009, 290(1): 54-61
- [33] Zhang DP, Spadaro D, Valente S, et al. Cloning, characterization, expression and antifungal activity of an alkaline serine protease of *Aureobasidium pullulans* PL5 involved in the biological control of postharvest pathogens[J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 153(3): 453-464
- [34] Lee HA, Kim JH. Isolation of *Bacillus amyloliquefaciens* strains with antifungal activities from Meju[J]. Preventive Nutrition and Food Science, 2012, 17(1): 64-70
- [35] Yang H, Li X, Li X, et al. Identification of lipopeptide isoforms by MALDI-TOF-MS/MS based on the simultaneous purification of iturin, fengycin, and surfactin by RP-HPLC[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2015, 407(9): 2529-2542
- [36] Han YZ, Zhang B, Shen Q, et al. Purification and identification of two antifungal cyclic peptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* L-H15[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 176(8): 2202-2212
- [37] Marahier MA, Nakano MM, Zuber P. Regulation of peptide antibiotic production in *Bacillus*[J]. Molecular Microbiology, 1993, 7(5): 631-636
- [38] Nakano MM, Zuber P. Cloning and characterization of *srfB*, a regulatory gene involved in surfactin production and competence in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 1989, 171(10): 5347-5353
- [39] Peypoux F, Bonmatin JM, Wallach J. Recent trends in the biochemistry of surfactin[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 51(5): 553-563
- [40] Lambalot RH, Gehring AM, Flugel RS, et al. A new enzyme superfamily—the phosphopantetheinyl transferases[J]. Chemistry & Biology, 1996, 3(11): 923-936
- [41] Fehri LF, Wróblewski H, Blanchard A. Activities of antimicrobial peptides and synergy with enrofloxacin against *Mycoplasma pulmonis*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2007, 51(2): 468-474
- [42] Maget-Dana R, Thimon L, Peypoux F, et al. Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A[J]. Biochimie, 1992, 74(12): 1047-1051