

产酶溶杆菌 L-43 的筛选及其抑菌物质的初步鉴定

贾紫伟, 刘洋, 刘丹丹, 封成玲, 宁亚维, 王志新*

(河北科技大学食品与生物学院, 河北石家庄 050018)

摘要: 采用透明圈法和琼脂扩散法筛选具有抑菌活性的菌株, 通过形态观察、理化分析及 16S rDNA 序列比对鉴定菌株, 采用胞外酶活测定、蛋白酶水解、硫酸铵沉淀与膜分析、稳定性研究鉴定菌株所产抑菌物质。结果表明, 从农田土壤中获得一株抑菌活性较好且没有溶血性的产酶溶杆菌 (*Lysobacter enzymogenes*) L-43。该菌所产抑菌物质抑菌谱较广, 对 G⁺细菌具有良好的抑制作用, 抑菌圈直径大于 10 mm。对抑菌物质进行分析, 其不具有溶菌酶活性、不含过氧化氢; 对蛋白酶 E、蛋白酶 K、胃蛋白酶、胰蛋白酶敏感, 抑菌活性回收率为 73.43%~79.00%; 经过膜分析, 透析袋截留分子量为 3 500 u 和 10 000 u 时, 抑菌活性回收率分别为 93.43% 和 59.82%, 初步判定抑菌物质主要是分子量在 3 500~10 000 u 之间的多肽类物质; 抑菌物质具有良好的热、酸碱、金属离子、化学试剂和储存稳定性, 121 °C 处理 30 min 活性回收率为 85.66%, pH 值 2~10 时活性回收率高于 80%, 进一步确定抑菌物质为多肽。综上, *L. enzymogenes* L-43 所产抑菌物质为抑菌谱广且稳定性好的多肽。该研究为抗菌菌株及其代谢物的开发奠定了基础。

关键词: 产酶溶杆菌; 筛选; 抑菌物质; 鉴定

文章编号: 1673-9078(2023)03-138-146

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.3.0340

Screening of *Lysobacter enzymogenes* L-43 and Preliminary Identification of the Antibacterial Substances

JIA Ziwei, LIU Yang, LIU Dandan, FENG Chengling, NING Yawei, WANG Zhixin *

(College of Food Science and Biology, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China)

Abstract: A bacterial strain exhibiting antimicrobial activity was identified in farmland soil and screened using the transparent circle and agar diffusion methods. The strain was identified through morphological observation, physical and chemical analysis, and 16S rDNA sequence alignment, and the antimicrobial substances produced by the strain were identified using extracellular enzyme activity assay, protease hydrolysis, ammonium sulfate precipitation, membrane analysis, and stability analysis. The results showed that the identified strain was *Lysobacter enzymogenes* L-43, which demonstrated good antibacterial activity and no hemolysis. The antibacterial substances produced by *L. enzymogenes* L-43 had a broad antimicrobial spectrum and maintained a good inhibitory effect on Gram-positive bacteria. The diameter of the inhibition zone exceeded 10 mm. The antibacterial substances had no lysozyme activity and did not contain hydrogen peroxide. They were sensitive to protease E, protease K, pepsin, and trypsin, and the antibacterial activity recovery rate was 73.43%~79.00%. After membrane analysis, when the molecular weight cut-off of the dialysis bag was 3 500 u and 10 000 u, the antibacterial activity recovery rates were 93.43% and 59.82%, respectively. It was preliminarily determined that the antibacterial substances were mainly polypeptides with molecular weights between 3 500~10 000 u. The substances showed good thermal, acid-base, metal ion, chemical reagent, and storage stability, and the antibacterial activity recovery rate was 85.66% after treatment at 121 °C for 30 min. The antibacterial recovery rate was higher than 80% at pH 2~10, further confirming that the antibacterial substance was a polypeptide. In conclusion, the antibacterial substances produced by *L. enzymogenes* L-43 are stable peptides with a broad antibacterial spectrum. The findings of this study provide a foundation for the development of antibacterial strains and their metabolites.

引文格式:

贾紫伟,刘洋,刘丹丹,等.产酶溶杆菌 L-43 的筛选及其抑菌物质的初步鉴定[J].现代食品科技,2023,39(3):138-146.

JIA Ziwei, LIU Yang, LIU Dandan, et al. Screening of *Lysobacter enzymogenes* L-43 and preliminary identification of the antibacterial substances [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(3): 138-146.

收稿日期: 2022-03-25

基金项目: 河北省自然科学基金项目 (C2020208014); 河北省省级科技计划资助 (22327107D)

作者简介: 贾紫伟 (1995-), 女, 研究生, 研究方向: 发酵工程, E-mail: jiaziwei1221@163.com

通讯作者: 王志新 (1980-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 生物工程, E-mail: zhxwang0311@163.com

Key words: *Lysobacter enzymogenes*; screening; antibacterial substances; identification

近年,食品防腐剂、化学农药和抗生素的不恰当使用已经对环境造成了不可逆的污染,而且对人们的健康也有着不可忽视的不良影响。随着生物技术的发展,利用微生物或其代谢产物开发天然抑菌物质的研究越来越多,这些天然抑菌物质具有低毒、高效、无残留且生产周期短、成本低等特点,引起了国内外学者的密切关注^[1]。

1978年,溶杆菌属(*Lysobacter*)首次由Christens和Cook提出并命名,是一种新型的生物防治细菌^[2],具有很强的溶菌和抗菌作用。产酶溶杆菌(*Lysobacter enzymogenes*)是该属四大典型种中的一种,研究较多的产酶溶杆菌有产酶溶杆菌C3、产酶溶杆菌3.1T8、产酶溶杆菌OH11,其中产酶溶杆菌OH11是我国分离到的第一株产酶溶杆菌菌株^[3-7]。产酶溶杆菌所产抑菌代谢物质主要有胞外酶(如几丁质酶、蛋白酶、脂肪酶、 β -1,3-葡聚糖酶、磷酸酶、溶菌酶等)、热稳定抗真菌因子(HSAF)和小分子脂肽类化合物(如WAP-8294A、*Lysobactins*、*Tripropeptins*等)^[8-12]。*L. enzymogenes* 3.1T8、*L. enzymogenes* OH11可以分泌葡聚糖酶、蛋白酶等胞外酶,以水解腐皮镰刀菌、黄瓜枯萎病菌等病原真菌的细胞壁,从而抑制菌体生长^[13,14]。HSAF是一类大环内酰胺类抗生素,由*L. enzymogenes* OH11和*L. enzymogenes* C3产生,可以抑制真菌中神经酰胺合成酶的活性,从而引起真菌菌丝细胞膜中鞘脂类化合物组成的改变,导致病原真菌菌丝去极化^[15,16]。研究发现,产酶溶杆菌除了分泌水解酶和HSAF两类代谢物外,还产生一类环脂肽,最早发现的环脂肽是11个氨基酸,开环后活性丧失,此后又得到了2个脂基环脂肽,命名为WAP-8294A,WAP-8294A包含12个氨基酸和 β -羟基脂肪酸链,对大多数革兰氏阳性细菌均具有拮抗作用,但该化合物热稳定性差^[17-19]。目前研究的产酶溶杆菌主要用于抑制植物病害真菌,抑制细菌的较少,可见,开发广谱、高效的产酶溶杆菌具有较好的应用前景。

本研究通过透明圈法和琼脂扩散法从土壤中分离得到具有抑菌特性、且安全性较高的菌株,并进行了菌株鉴定以及菌株所产抑菌代谢物质的抑菌谱和抑菌特性分析,并进一步通过酶敏感性、硫酸铵沉淀、膜分离、稳定性等研究对抑菌物质进行初步分析与鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 样品

分别从河北省曲周县、海兴县、威县、藁城市和江苏省泰兴市的农田土壤中采集土壤样品40个。

1.1.2 指示菌

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 25923)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* ATCC 6051)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus* ATCC 11778)、单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes* ATCC 10403s)、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus* ATCC 10240)、大肠杆菌(*Escherichia coli* ATCC 44752)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium* ATCC 14028)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens* ATCC 13575)、产黄青霉(*Penicillium chrysogenum* ATCC 10106)、黑曲霉(*Aspergillus niger* ATCC 16404)、毛霉(*Mucor* ATCC 22364)、白假丝酵母(*Candida albicans* ATCC10231)、胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa* CICC 33374)。上述菌株均为河北科技大学酶工程实验室保存。

1.1.3 培养基

营养肉汤(NB)培养基:蛋白胨10 g/L,牛肉膏15 g/L,氯化钠25 g/L,pH值7.2~7.4,121℃灭菌15 min。

营养琼脂(NA)培养基:蛋白胨10 g/L,牛肉膏15 g/L,氯化钠25 g/L,琼脂粉15 g/L,pH值7.2~7.4,121℃灭菌15 min。

马铃薯琼脂培养基(PDA):37 g/L,煮沸,pH自然,分装,121℃灭菌15 min。

1.2 仪器与设备

Evolution 220紫外可见分光光度计,美国Thermo公司;LABDANCERS25旋涡振荡器,广州仪科实验室技术有限公司;SHP-250生化培养箱,上海一恒科技有限公司;3-18K高速冷冻离心机,德国SIGMA公司;CX31显微镜,日本奥林巴斯株式会社;PHS-3C pH计,梅特勒-托利多仪器上海有限公司;Scan1200全自动菌落计数仪,法国Interscience公司。

1.3 方法

1.3.1 初筛

参照文献^[20]制备指示菌平板。将土壤样品按采集顺序编号,用无菌生理盐水进行系列梯度稀释,并分别涂布于含有指示菌(金黄色葡萄球菌)的NB平板,37℃恒温培养24 h,挑取透明圈大的菌落,进一步进行菌株纯化和保藏。

1.3.2 复筛

1.3.2.1 广谱抑菌菌株筛选

将初筛获得的具有抑菌活性的菌株在 NB 培养基中进行摇瓶发酵,接种量为 3%, 37 °C, 200 r/min 培养 18~24 h。发酵液于 8 000 r/min 离心 20 min, 得到发酵上清液。分别以蜡样芽孢杆菌、单核细胞增生李斯特菌、鼠伤寒沙门氏菌为指示菌, 采用牛津杯琼脂扩散法^[21]进行菌株的复筛, 筛选出抑菌谱较广的菌株。

1.3.2.2 溶血性测定

菌株溶血性: 分别将菌株划线于 5% 绵羊血琼脂平板, 37 °C 培养 24 h, 观察是否出现溶血环。

菌株发酵上清液溶血性: 取体积分数为 8% 的健康小鼠的血红细胞悬浮液, 与发酵上清液等量混合, 37 °C 培养 1 h, 1 500 r/min 离心 5 min, 取上清, 在波长为 540 nm 下检测吸光值, 按照公式 1 计算溶血率。以终浓度为 0.1% (V/V) 的 Triton X-100 为阳性对照, PBS 缓冲液为阴性对照。每组实验设 3 个平行。

$$A = \frac{OD_{540(\text{样品})} - OD_{540(\text{PBS})}}{OD_{540(\text{TritonX-100})} - OD_{540(\text{PBS})}} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

A——溶血率, %;

$OD_{540(\text{样品})}$ ——波长 540 nm 下样品的吸光值;

$OD_{540(\text{PBS})}$ ——波长 540 nm 下 PBS 缓冲液的吸光值;

$OD_{540(\text{TritonX-100})}$ ——波长 540 nm 下 TritonX-100 溶液的吸光值。

1.3.3 菌株鉴定

参考文献^[22,23]对菌株进行形态特征观察和生理生化鉴定。菌株的 16S rDNA 序列测定由上海生物工程有限公司完成。测序结果上传至 NCBI 上进行 BLAST 分析, 使用 MEGA 7.0.26 软件 ClustalX 进行多序列同源性比对分析, 采用 Neighbor-Joining 构建系统发育树。

1.3.4 菌株抑菌谱的测定

选取金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特菌、蜡样芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、藤黄微球菌、大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、荧光假单胞杆菌为细菌指示菌, 按照 1.3.1 的方法制备指示菌平板, 采用牛津杯琼脂扩散法测定 *L. enzymogenes* L-43 发酵上清液的抑菌谱。

选取产黄青霉、黑曲霉、毛霉、白假丝酵母、胶红酵母作为真菌指示菌。获取上述真菌的孢子悬浮液, 用生理盐水调整浓度为每毫升 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个, 以 1% (V/V) 的添加量加入 PDA 培养基中, 制成含有真菌的指示菌平板。采用牛津杯琼脂扩散法测定 *L. enzymogenes* L-43 发酵上清液的抑菌谱。

1.3.5 抑菌物质的初步鉴定

1.3.5.1 溶菌酶活力测定

在 25 °C、pH 值 6.2 的溶菌酶最适反应条件下, 以 *L. enzymogenes* L-43 发酵上清液与藤黄微球菌的反应溶液体系在 450 nm 下每一分钟内吸光度下降 0.001 为一个活力单位, 测定 *L. enzymogenes* L-43 发酵上清液的溶菌酶活性^[24]。

1.3.5.2 酶处理

将胰蛋白酶、蛋白酶 K、蛋白酶 E、胃蛋白酶、过氧化氢酶用相应的缓冲溶液溶解, 与 *L. enzymogenes* L-43 发酵上清液等量混合, 酶液终浓度为 10 mg/mL, 置于 37 °C 水浴反应 2 h, 沸水处理 5 min 终止酶反应, 以去离子水为空白对照, 测定抑菌活性变化。

1.3.5.3 硫酸铵沉淀与膜分离

取 100 mL 发酵上清液, 添加硫酸铵至饱和度为 60%, 4 °C 静置过夜, 将沉淀溶于 5 mL 的 PBS (pH 值 7.0) 中, 同时用饱和度 $m=60\%$ 的硫酸铵和 PBS 作对照, 采用牛津杯琼脂扩散法测其抑菌活性。将复溶于 PBS 中的沉淀物质, 用透析袋进行透析, 测定透析前后抑菌物质活性的大小, 初步判定抑菌物质的分子量。

1.3.6 抑菌物质稳定性研究

1.3.6.1 热稳定性

将 *L. enzymogenes* L-43 发酵上清液分别在 40、60、80、100、121 °C 热处理 30 min, 以未经热处理的发酵上清液为对照, 分别测定其抑菌活性。

1.3.6.2 pH 稳定性

将菌株的发酵上清液用 0.1 mol/L HCl 和 0.1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值分别为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 和 12.0, 37 °C 水浴 2 h, 调回至发酵上清液初始 pH 值, 测其抑菌活性。

1.3.6.3 金属离子稳定性

将发酵上清液与 NaCl、KCl、CaCl₂、MgSO₄、MnSO₄、CuSO₄、FeCl₃ 和 ZnSO₄ 混匀, 金属离子终浓度为 0.01 mol/L, 37 °C 恒温水浴 2 h, 以发酵上清液为阳性对照, 以金属离子溶液为阴性对照, 测定其抑菌活性。

1.3.6.4 储存稳定性

将发酵上清液在 4 °C 条件下分别储存 30、60、90、120、160 和 180 d, 测定其抑菌活性。

1.3.6.5 化学试剂稳定性

氯仿、甲醇、乙醇、异丙醇、丙酮、三氯甲烷、乙酸乙酯、DMSO 和甘油与发酵上清液按 1:1 混合, Tween-20、Tween-80、冰乙酸与发酵上清液按 1:9 混合。37 °C 恒温水浴 2 h, 以发酵上清液为阳性对照, 有机溶剂为阴性对照, 测定其抑菌活性。

1.3.7 数据分析

每组实验进行 3 次平行, 并取其平均值, 采用 IBM

SPSS 26.0 进行数据分析, 沃勒-邓肯进行显著性分析, $P < 0.05$ 。采用 Origin 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 抑菌菌株的筛选

以金黄色葡萄球菌为指示菌, 经过筛选, 从 40 个农田土壤样品中获得 45 株具有抑菌圈的菌株。初筛中部分菌株抑制金黄色葡萄球菌的平板如图 1 所示。

对抑菌圈明显的菌株进一步进行复筛, 获得 4 株抑菌范围较广且抑菌活性较好的菌株, 编号为 L-18、L-22、L-42 和 L-43, 其对指示菌的抑菌结果见表 1。菌株 L-18、L-22、L-42 对表 1 中的指示菌株均具有抑制作用, 菌株 L-43 虽然对大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌没有抑制效果, 但对其他 3 株革兰氏阳性指示菌均表现出较强的抑制效果。

选取抑菌性较好的菌株 L-18、L-22、L-42 和 L-43, 进一步进行溶血性研究。

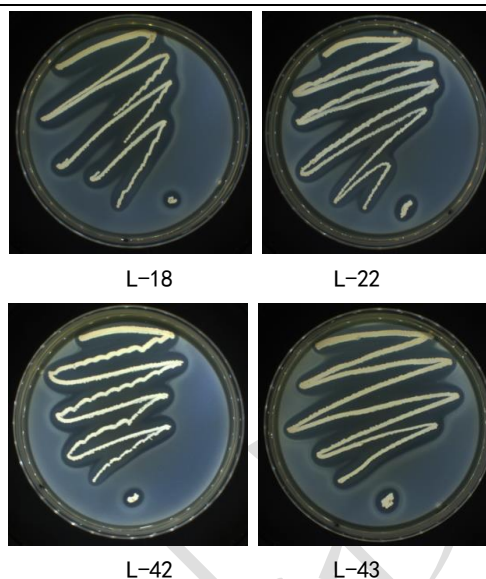


图 1 菌株 L-18、L-22、L-42、L-43 抑制金黄色葡萄球菌的平板图

Fig.1 Antimicrobial activities of the strains of L-18, L-22, L-42, L-43 against of *Staphylococcus aureus*

表 1 复筛菌株的抑菌性

Table 1 Antimicrobial activities of there-screened strains

菌株编号	对金黄色葡萄球菌的抑菌圈/mm	对蜡样芽孢杆菌的抑菌圈/mm	对单核细胞增生李斯特菌的抑菌圈/mm	对大肠杆菌的抑菌圈/mm	对鼠伤寒沙门氏菌的抑菌圈/mm
L-18	15.28±0.24	9.85±0.11	7.50±0.02	16.30±0.20	7.70±0.02
L-22	11.48±0.17	13.10±0.23	7.50±0.05	0	0
L-42	13.75±0.32	13.35±0.18	11.90±0.12	17.05±0.26	11.70±0.13
L-43	17.45±0.44	16.55±0.47	17.78±0.25	0	0

2.2 菌株的溶血活性分析

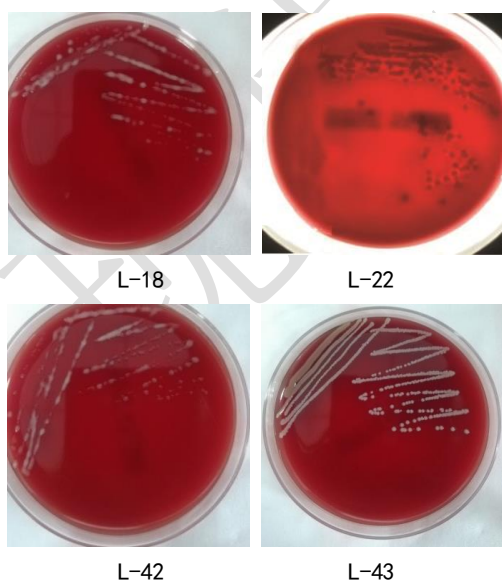


图 2 菌株在血琼脂平板上的溶血图

Fig.2 Hemolysis of the strains on blood agar plates

参照郝彦利等^[23]和闫肃等^[25]方法对 2.1 筛选出的菌

株 L-18、L-22、L-42、L-43 分别进行菌株及其发酵上清液溶血性分析。菌株在血琼脂平板上的溶血情况见图 2, 结果显示, 菌株 L-18、L-42、L-43 均不溶血, 属于无毒的 γ -溶血, 不会引发败血症; 而菌株 L-22 的菌落周围形成界限分明、完全透明的溶血环, 属于 β -型溶血, 其分泌的溶血素能够溶解细胞, 引发机体内红细胞内在缺陷等生理反应, 从而导致机理罹患败血症^[26]。

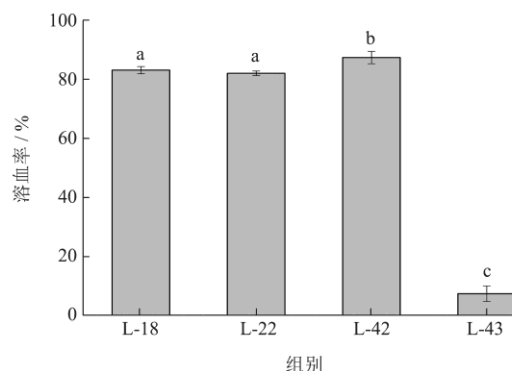


图 3 菌株发酵液的溶血性

Fig.3 Hemolytic properties of the fermentation broth of the strains

进一步研究菌株发酵上清液的溶血率,图3显示,菌株 L-18、L-22、L-42 发酵上清液的溶血率均高于80%,而菌株 L-43 发酵上清液的溶血率仅为7.13%。

综合上述,结合抑菌特性和溶血性分析,本研究选择菌株 L-43 作为后续的研究菌株。

2.3 菌株鉴定

2.3.1 菌落形态与生理生化鉴定

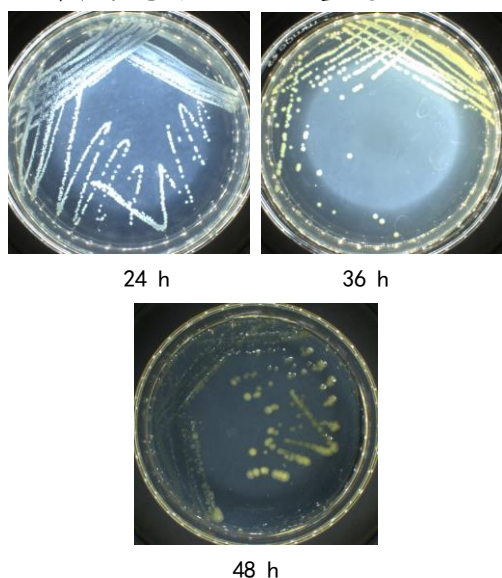


图4 菌株 L-43 在营养琼脂平板上的菌落形态

Fig.4 Colony morphology of the strain L-43 on nutrient agar plate

菌株 L-43 在 NA 平板上的菌落形态如图4所示,培养24h后菌落呈现圆形白色,36h后菌落呈现微黄色,48h后菌落边缘出现轮廓清晰的扩散边缘,属于细菌滑行运动,是溶杆菌属细菌的重要特征。菌株 L-43 经革兰氏染色后的显微形态如图5所示,为革兰

氏阴性菌,菌体为细小杆状,无芽孢产生。本研究与陈丹梅^[27]筛选到的 *Lysobacter enzymogenes* LE16 菌落形态和显微形态一致。

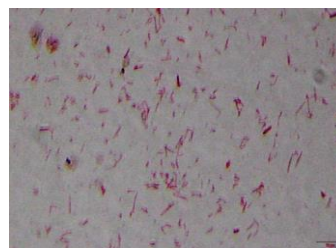


图5 菌株 L-43 革兰氏染色的显微形态

Fig.5 Micromorphology of the strain L-43 by Gram staining

菌株 L-43 的生理生化特征见表2。菌株 L-43 的氧化酶和过氧化氢酶阳性;可以水解蛋白、几丁质、明胶,不可水解淀粉和纤维素;可以利用柠檬酸盐。

表2 菌株 L-43 的生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of the strain L-43

生理生化实验指标	实验结果
氧化酶反应	+
过氧化氢酶	+
蛋白水解	+
几丁质水解	+
淀粉水解	-
纤维素水解	-
柠檬酸盐利用	+
M.R 试验	-
V.P 试验	-
明胶液化试验	+

注: +, 阳性; -, 阴性

2.3.2 菌株的分子鉴定

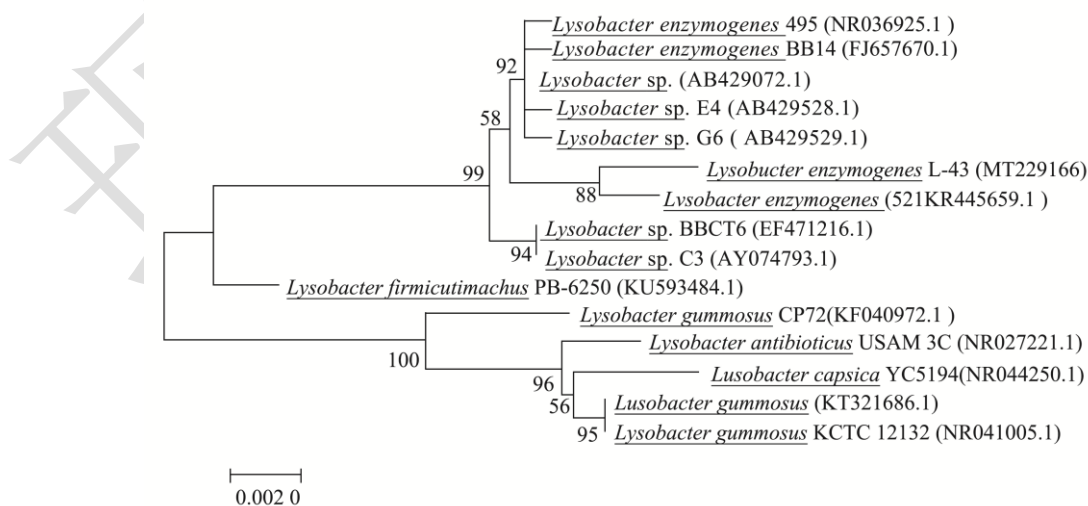


图6 菌株 L-43 的系统发育树

Fig.6 Phylogenetic tree of the strain L-43

为了进一步确定菌株 L-43 的种属, 经 16S rDNA 分子测序, 菌株 L-43 的 16S rDNA 序列长为 1 481 bp, 将菌株 L-43 的 16S rDNA 序列上传至 GeneBank, 获得序列号为 MT229166。

构建菌株 L-43 的系统发育树, 其与产酶溶杆菌同源性高, 进一步将菌株 L-43 的 16S rDNA 序列与产酶溶杆菌的标准菌株进行比对, 结果显示菌株 L-43 与 *Lysobacter enzymogenes* DSM2043^T (AJ298291) 的同源性为 99.19%, 进一步确定菌株 L-43 属于产酶溶杆

菌, 命名为 *Lysobacter enzymogenes* L-43。

2.4 *L. enzymogenes* L-43 抑菌物质的抑菌谱

指示菌选用 5 株 G⁺阳性细菌、3 株 G⁻阴性细菌和 5 株真菌, 进行 *L. enzymogenes* L-43 抑菌物质抑菌谱的测定, 结果见表 3。由表 3 可知, *L. enzymogenes* L-43 所产抑菌物质对革兰氏阳性细菌具有良好的抑制效果, 对部分真菌也具有较好的抑制作用。

表 3 *L. enzymogenes* L-43 所产抑菌物质的抑菌谱

Table 3 Antimicrobial spectrum of antimicrobial substances produced by *L. enzymogenes* L-43

指示菌类型	指示菌名称	抑菌圈直径/mm
G ⁺ 细菌	金黄色葡萄球菌 ATCC 25923	17.45±0.55
	蜡样芽孢杆菌 ATCC 11778	14.55±0.30
	枯草芽孢杆菌 ATCC 6051	21.30±0.26
	单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC 10403s	16.65±0.38
	藤黄微球菌 ATCC 10240	18.93±0.78
G ⁻ 细菌	大肠杆菌 ATCC 44752	0
	鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 14028	0
	荧光假单胞菌 ATCC 13575	0
丝状真菌	产黄青霉 ATCC 10106	0
	黑曲霉 ATCC 16404	13.20±0.13
	毛霉 ATCC 22364	0
酵母菌	白假丝酵母 ATCC 10231	0
	胶红酵母 CICC 33374	14.15±0.13

2.5 *L. enzymogenes* L-43 抑菌物质的初步鉴定

2.5.1 水解酶活性测定

产酶溶杆菌可以通过分泌胞外酶水解细胞壁来达到抑菌的目的。陈丹梅^[27]筛选的 *Lysobacter enzymogenes* LE16, 其发酵液中的蛋白酶、磷酸酶、溶菌酶、铁载体以及次级代谢产物均能够有效拮抗植物病原真菌和卵菌。张子玉等^[28]使用 Stonie 双层培养法从白菜根际土壤中分离得到一株对白菜黑腐病菌具有显著拮抗作用的产酶溶杆菌 CX03, 同时菌株在代谢过程中产生的纤维素酶、蛋白酶、几丁质酶, 使其具有广谱的抑菌特性。本研究中的 *L. enzymogenes* L-43 主要抑制细菌, 因此测定其溶菌酶活性。通过测定, *L. enzymogenes* L-43 发酵上清液不具有酶活性, 排除其抑菌物质为溶菌酶的可能。

2.5.2 蛋白酶水解

表 4 显示, *L. Enzymogenes* L-43 发酵上清液采用过氧化氢酶处理后活性没有损失, 说明发酵液中不含有过氧化氢。经过胰蛋白酶、胃蛋白酶、蛋白酶 K、蛋白酶 E 处理后, *L. enzymogenes* L-43 发酵上清液的

抑菌活性均有所损失, 说明 *L. enzymogenes* L-43 所产抑菌物质含有蛋白质或多肽类物质。武昌俊等^[29]报道, 经胰蛋白酶、胃蛋白酶和蛋白酶 K 处理后的抑菌物质抑菌活性明显下降, 并初步判定抑菌物质为蛋白质。

表 4 酶处理后 *L. enzymogenes* L-43 发酵上清液的抑菌活性回收率

Table 4 Recovery rate of antimicrobial activity of fermentation broth produced by *L. enzymogenes* L-43 after treatment with enzymes

酶名称	抑菌活性回收率/%
胰蛋白酶	79.00±2.07
胃蛋白酶	77.05±2.65
蛋白酶 K	78.74±0.45
蛋白酶 E	73.43±1.13
过氧化氢酶	100.00±0.96

2.5.3 硫酸铵沉淀与膜分析

在 *L. enzymogenes* L-43 发酵上清液中加入饱和度为 60% 的硫酸铵溶液, 静置过夜后产生明显的沉淀, 将沉淀用 PBS 复溶后进行膜透析分析。表 5 显示, 当透析袋截留分子量为 500~3 500 u 时, 活性回收率均高于

90%，说明所产抑菌物质的分子量大于 3 500 u；当透析袋截留分子量为 10 000 u 时，活性回收率降低为 59.82%，说明一部分物质被透析出去了，一部分被截留下来，因此，初步鉴定 *L. enzymogenes* L-43 发酵产生的抑菌物质为分子质量在 3 500~10 000 u 以及大于 10 000 u 的蛋白或多肽。罗曼^[30]报道，枯草芽孢杆菌 JYM35 产生的具有抑菌特性的发酵液经过硫酸铵沉淀和膜透析，初步判断抑菌物质属于蛋白类。郝彦利等^[23]用同样的方法初步鉴定枯草芽孢杆菌所产的抑菌物质为蛋白质，其分子质量为 2 类，一类 7~8 ku，一类大于 8 ku。

表 5 透析前后 *L. enzymogenes* L-43 发酵上清液的抑菌活性回收率

Table 5 Recovery rate of antimicrobial activity of fermentation broth produced by *L. enzymogenes* L-43 before and after dialysis

透析袋截留分子量/u	抑菌活性回收率/%
500	98.08±0.25
1 000	98.33±0.66
2 000	95.46±0.35
3 500	93.43±1.08
10 000	59.82±1.87

2.6 *L. enzymogenes* L-43 抑菌物质的稳定性研究

L. Enzymogenes L-43 发酵上清液经不同温度处理后，其抑菌活性回收率如图 7a 所示，*L. enzymogenes* L-43 所产抑菌物质具有较好的热稳定性，40 °C~100 °C 处理其活性没有损失，121 °C 处理后活性稍有下降。陈丹梅^[27]报道产酶溶杆菌 LE16 的发酵抑菌物质经 100 °C 处理 30 min，其抑菌活性无显著变化，本实验结果与已报道结果相比，热稳定性结果一致。综合分析，*L. enzymogenes* L-43 所产抑菌物质为耐热性较好的多肽物质。

探究 *L. enzymogenes* L-43 所产抑菌物质对酸碱的耐受性。由图 7b 可知，pH 值在 2~10 之间，发酵上清液抑菌活性回收率均在 80% 以上，其中 pH 值为 9 时活性回收率为 100%，pH 值超过 11 后，活性回收率显著下降，pH 值为 12 时活性回收率仅为 55.7%，相比于碱性环境，*L. enzymogenes* L-43 所产抑菌物质在非强碱环境下更稳定。该结果与朱润杰^[31]报道的变棕溶杆菌 OH23 产生的抑菌物质的抑菌活性稳定性结果一致，抑菌物质在高温和非强碱条件下抑菌活性较稳定。

在 *L. enzymogenes* L-43 发酵上清液中分别加入 Mg²⁺、Fe³⁺、Ca²⁺、Mn²⁺、Na⁺、K⁺、Cu²⁺、Zn²⁺，研究金属离子对抑菌活性的影响，结果如图 7c。由结果可知，Ca²⁺、Mn²⁺、Na⁺、K⁺、Cu²⁺对抑菌活性均没有影响；

加入 Mg²⁺、Fe³⁺后抑菌活性分别损失了 10% 和 30% 左右，加入 Zn²⁺后抑菌活性提升约 20%，刘婷^[32]的研究结果表明，金属离子会影响抑菌物质的抑菌活性，枯草芽孢杆菌 H5 产生的抑菌物质同样会受到 Mg²⁺ 的抑制，且 Zn²⁺ 会提高其抑菌活性，与本研究的結果一致。

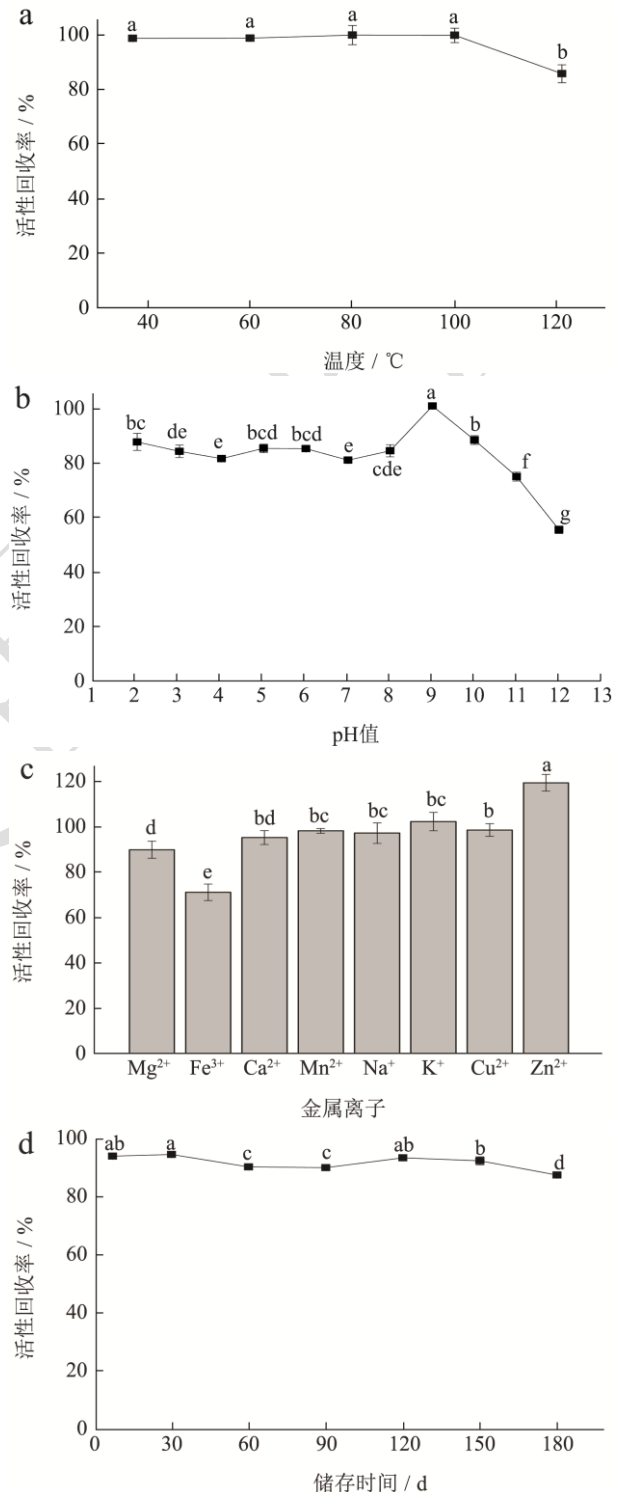


图 7 *L. enzymogenes* L-43 抑菌物质的稳定性

Fig.7 Stability of antimicrobial substances produced by *L. enzymogenes* L-43

注：显著性差异 $P < 0.05$ 。

L. Enzymogenes L-43 发酵上清液储存 150 d 内活性回收率都保持在 90% 以上, 到 180 d 回收率才有所下降, 约为 87.32% (图 7d), 表明 *L. enzymogenes* L-43 所产抑菌物质具有良好的储存稳定性。

如表 6 所示, *L. enzymogenes* L-43 所产抑菌物质对各种化学试剂都具有良好的稳定性, 但是 Tween-20 和 Tween-80 和发酵上清液混合后对抑菌物质活性造成一定损失。

表 6 *L. enzymogenes* L-43 抑菌物质的化学试剂稳定性

Table 6 Chemical stability of antimicrobial substances

produced by <i>L. enzymogenes</i> L-43		
有机溶剂	终体积分数(V/V)/%	活性回收率/%
氯仿	50	100.00±0.15
甲醇	50	100.00±0.31
乙醇	50	100.00±0.63
异丙醇	50	95.73±0.60
丙酮	50	100.00±0.96
三氯甲烷	50	100.00±0.32
乙酸乙酯	50	100.00±0.76
Tween-20	10	86.80±0.82
Tween-80	10	84.92±0.50
冰乙酸	10	100.00±0.52
DMSO	50	100.00±0.68
甘油	50	95.96±0.28

3 结论

本研究从土壤样品中筛选到一株具有广谱抑菌作用且不具有溶血性的菌株, 经过鉴定, 该菌株为产酶溶杆菌, 命名为 *L. enzymogenes* L-43。 *L. enzymogenes* L-43 所产抑菌物质对金黄色葡萄球菌、藤黄微球菌、蜡样芽孢杆菌、单核细胞增生李斯特氏菌等革兰氏阳性菌, 以及黑曲霉、胶红酵母等真菌具有较好的抑制作用, 抑菌圈直径大于 10 mm。初步鉴定 *L. enzymogenes* L-43 所产抑菌物质为多肽, 且具有良好的热稳定性、pH 稳定性、金属离子稳定性、储存稳定性及化学试剂稳定性。 *L. enzymogenes* L-43 具有无溶血性、抑菌谱广和抑菌物质稳定性高的特性与优势, 为抗菌肽的资源开发和应用奠定了基础。

参考文献

[1] 宁扬. 产酶溶杆菌双组分系统 PiIS-PiIR 调控抗菌物质 HSAF 生物合成的机制研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2019.

[2] Christensen P, Cook F D. *Lysobacter*, a new genus of nonfruiting, gliding bacteria with a high base ratio [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1978, 28(3):

367-393.

[3] Giesler L J, Yuen G Y. Evaluation of *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 for biocontrol of brown patch disease [J]. Crop Protection, 1998, 17(6): 509-513.

[4] Folman L B, Postma J, Veen J A V. Characterisation of *Lysobacter enzymogenes* (Christensen and Cook 1978) strain 3.1T8, a powerful antagonist of fungal diseases of cucumber [J]. Microbiological Research, 2003, 158: 107-115.

[5] 胡白石, 刘凤权. 植物土传病原菌拮抗细菌的筛选与鉴定[J]. 中国生物防治, 2005, 4: 54-58.

[6] Nian J, Yu M, Bradley C A, et al. *Lysobacter enzymogenes* strain C3 suppresses mycelium growth and spore germination of eight soybean fungal and oomycete pathogens and decreases disease incidences [J]. Biological Control, 2021, 152: 1-9.

[7] 林龙, 葛程程, 蒋建东, 等. 产酶溶杆菌 OH11 中 LysR 和 GntR 家族基因的功能分析[J]. 中国生物防治学报, 2021, 37: 130-138.

[8] 王纯婷. 产酶溶杆菌抗菌活性物质产率促进及其应用[D]. 南京: 南京农业大学, 2014.

[9] S L, C J C, F Y, et al. An antibiotic complex from *Lysobacter enzymogenes* strain C3: antimicrobial activity and role in plant disease control [J]. Phytopathology, 2008, 98: 695-701.

[10] Yangsheng W, Yuxin Z, Juan Z, et al. Transcriptomic analysis reveals new regulatory roles of Clp signaling in secondary metabolite biosynthesis and surface motility in *Lysobacter enzymogenes* OH11 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98: 9009-9020.

[11] 桑茉莉. 溶杆菌中新脂肽的定向发掘及其与吩嗪和吩噻嗪的相关性研究[D]. 济南: 山东大学, 2020.

[12] 黎昱. 产酶溶杆菌 C3 菌株的抗真菌化学成分研究[D]. 济南: 山东大学, 2012.

[13] 姜英华. 一种新型生防菌菌株 OH11 的鉴定和生防效果研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2006.

[14] Jochum C C, Osborne L E, Yuen G Y. Fusarium head blight biological control with *Lysobacter enzymogenes* strain C3 [J]. Biological Control, 2006, 39: 336-344.

[15] 丁艳娇. 产酶溶杆菌 C3 菌株多环四胺酸大环内酰胺类化合物的分离与抗真菌作用机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2016.

[16] 程超, 赵延存, 李红旭, 等. 产酶溶杆菌 OH11 代谢产物 HSAF 对梨树腐烂病的防治效果[J]. 中国生物防治学报, 2017, 33: 114-120.

[17] Kato A, Nakaya S, Ohashi Y, et al. WAP-8294A2, anovel anti-MRSA antibiotic produced by *Lysobacter* sp. - Journal of

- the American Chemical Society (ACS Publications) [J]. *Jamchemsoc*, 1997, 119(28): 6680-6681.
- [18] Xusheng C, Shanren L, Lingjun Y, et al. Systematic optimization for production of the anti-MRSA antibiotics WAP-8294A in an engineered strain of *Lysobacter enzymogenes* [J]. *Microbial Biotechnology*, 2019, 12(6): 1430-1440.
- [19] Haotong C, S O A, Wei S, et al. Fatty acyl incorporation in the biosynthesis of WAP-8294A, a group of potent anti-MRSA cyclic lipopeptides [J]. *RSC Advances*, 2015, 5: 105753-105759.
- [20] 王志新,韩烁培,王雨,等.植物乳杆菌的筛选、鉴定及其抑菌物质研究[J].*食品工业科技*,2019,40:133-139,146.
- [21] 王志新,宏丹,刘洋,等.琼脂扩散法定量测定多黏菌素对霉菌的抑菌活力[J].*现代食品科技*,2019,35:251-257.
- [22] 田囡.产酶溶杆菌 C3 产生热稳定性抗真菌因子(HSAF)的研究[D].济南:山东轻工业学院,2011.
- [23] 郝彦利,汪立平,黄宇良,等.副溶血性弧菌拮抗菌的筛选鉴定及抑菌物质特性研究[J].*食品与机械*,2018,34(6):39-45, 191.
- [24] 王艺颖.产生物活性物质及溶菌酶的海洋微生物筛选和鉴定[D].大连:大连工业大学,2017.
- [25] 闫肃,李慧敏,张晓冬,等.不同食物来源乳酸细菌的安全性评价[J].*食品与发酵工业*,2018,44(5):82-89.
- [26] 林杨,顾美英,孙建,等.阿克苏地区传统乳中乳酸菌筛选及安全性初步评价[J].*微生物学杂志*,2022,42(1):26-33.
- [27] 陈丹梅.产酶溶杆菌新株 *Lysobacter enzymogenes* LE16 的促生防病作用及机理[D].重庆:西南大学,2020.
- [28] 张子玉,谢学文,石延霞,等.白菜黑腐病拮抗菌 *Lysobacter enzymogenes* CX03 的分离鉴定及生防效果研究[J].*中国生物防治学报*,2021,37:1221-1230.
- [29] 武昌俊,戴陈伟,蔡标,等.一株安徽传统酸奶中产抑菌物质的乳酸菌的筛选与鉴定[J].*食品安全质量检测学报*,2019, 10(17):5779-5785.
- [30] 罗曼,万婧惊,黄仕新,等.南极沉积物来源抗菌细菌的筛选及抑菌物质的鉴定[J].*微生物学通报*,2020,47(6): 1787-1794.
- [31] 朱润杰,赵延存,凌军,等.变棕溶杆菌 OH23 次生代谢产物抗菌活性的分析及其发酵培养基优化[J].*中国生物防治学报*,2019,35:426-436.
- [32] 刘婷,尹启蒙,周滢晴,等.一株副溶血性弧菌拮抗菌的筛选、鉴定及其抑菌物质特性研究[J].*食品与发酵工业*,2022,48 (1):76-83.