杨永琪, 郑火建, 王琴, 等. 基因组测序结合质谱技术挖掘鉴定新型细菌素 BH19[J]. 食品工业科技, 2026, 47(3): 200−206. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025020283

YANG Yongqi, ZHENG Huojian, WANG Qin, et al. Whole-Genome Sequencing Combined with Mass Spectrometry to Identify a Novel Bacteriocin BH19[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(3): 200−206. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025020283

· 生物工程 ·

基因组测序结合质谱技术挖掘鉴定新型细菌素 BH19

杨永琪[1], 郑火建[1,+], 王　琴[2], 郝彦利[1], 李艳艳[1], 齐灿灿[1], 汪立平[1,3,4,*]

（1.上海海洋大学食品学院, 上海 201306;
2.克拉玛依绿成农业开发有限责任公司, 新疆克拉玛依 834000;
3.农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室, 上海 201306;
4.上海海洋大学食品热加工工程技术研究中心, 上海 201306）

摘　要: 以具有抑制副溶血性弧菌作用的枯草芽孢杆菌 H19（*Bacillus subtilis* H19，*B. subtilis* H19）为研究对象，为进一步研究其所产细菌素的性质和活性，将 *B. subtilis* H19 发酵上清液经粗提、层析以及高效液相纯化细菌素，MALDI-TOF 鉴定分子量，并结合第三代分子测序技术，通过 COG 数据库，GO 数据库以及 KEGG 代谢途径注释 *B. subtilis* H19 的功能基因，ARDB 数据库预测耐药基因，antiSMASH 软件分析细菌素合成基因簇。结果显示，细菌素 BH19 最终纯化 460.73 倍，比活性达到 307692.31 AU/mg，分子量为 1042.00 Da。*B. subtilis* H19 基因组总长度为 3595203 bp，基因功能注释发现 H19 具有较强的氨基酸和糖转运代谢能力，并含有多个细菌素关键转运蛋白 ABC 蛋白。经分析，全基因组中不存在抗生素耐药性基因，共获得了 6 个细菌素合成基因簇，其中基因簇 2 为 NRPS 类基因簇，分子量为 1036.34 Da，与质谱结果相似度达到 99.46%，且基因簇 2 与解淀粉芽孢杆菌产生的表面活性素（Surfactin）同源性较低，为 82.00%。综上所述，细菌素 BH19 可能为 *B. subtilis* H19 产生的一种新型细菌素，该研究为 *B. subtilis* H19 及其所产细菌素 BH19 在天然防腐剂领域的开发和应用提供参考。

关键词: 枯草芽孢杆菌, 细菌素, 分离纯化, 质谱, 全基因组测序

中图分类号: TS201.3　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)03−0200−07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025020283

本文网刊:

Whole-Genome Sequencing Combined with Mass Spectrometry to Identify a Novel Bacteriocin BH19

YANG Yongqi[1], ZHENG Huojian[1,+], WANG Qin[2], HAO Yanli[1], LI Yanyan[1], QI Cancan[1], WANG Liping[1,3,4,*]

（1.College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2.Karamay Lvcheng Agricultural Development Co., Ltd., Karamay 834000, China;
3.Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Aquatic Products on Storage and Preservation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306, China;
4.Engineering Research Center of Food Thermal-processing Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China）

Abstract: *Bacillus subtilis* H19, which inhibits *Vibrio parahaemolyticus*, was selected as the research object. In order to

收稿日期: 2025−03−03　　+并列第一作者

基金项目: 2024 年上海海洋大学校企联合示范课程项目（A1-2008-24-300022）; 克拉玛依市 2025 年度科技计划项目-技术创新引导计划项目（2025CA0021）。

作者简介: 杨永琪（2000−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 益生菌及其代谢产物, E-mail: yongkiyang@163.com。
郑火建（1996−）, 男, 硕士研究生, 研究方向: 益生菌及其代谢产物, E-mail: 1747562951@qq.com。

*** 通信作者:** 汪立平（1968−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 益生菌、益生元及传统发酵食品, E-mail: lpwang@shou.edu.cn。

further study the properties and activity of the bacteriocin produced by *B. subtilis* H19, the fermentation supernatant of *B. subtilis* H19 was purified by crude extraction, chromatography and HPLC. MALDI-TOF was used to identify the molecular weight of bacteriocin. Combined with the third generation molecular sequencing technology, the functional genes of *B. subtilis* H19 were annotated by COG database, GO database and KEGG metabolic pathway. The drug resistance genes were predicted by ARDB database. The bacteriocin synthesis gene cluster was analyzed by antiSMASH software. The results showed that the final purification of bacteriocin BH19 was 460.73 times, the specific activity reached 307692.31 AU/mg, and the molecular weight was 1042.00 Da. The total length of *B. subtilis* H19 genome was 3595203 bp. The gene function annotation found that *B. subtilis* H19 had a strong ability in amino acid and sugar transport and metabolism, and contained several key bacteriocin transporter ABC proteins. After analysis, there was no antibiotic resistance gene in the whole genome, and a total of six bacteriocin synthesis gene clusters were obtained. Gene cluster 2 was NRPS gene cluster with a molecular weight of 1036.34 Da, which was 99.46% similar to the results of mass spectrometry, and the homology between gene cluster 2 and surfactin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* was low, which was 82.00%. In conclusion, bacteriocin BH19 may be a new type of bacteriocin produced by *B. subtilis* H19. This study provides a reference for the development and application of *B. subtilis* H19 and its bacteriocin BH19 in the field of natural preservatives.

Key words: *Bacillus subtilis*; bacteriocin; isolation and purification; mass spectrometry; whole genome sequencing

副溶血性弧菌是一种常见于海洋、河口和沿海环境的革兰氏阴性嗜盐细菌[1]，它的极地鞭毛有助于附着在各种表面，包括鱼类、贝类、浮游动物和悬浮颗粒物质。该致病菌可通过生食或未煮熟的海产品传播，引发食源性疾病（如胃肠炎及细菌性食物中毒）[2]，其导致的公共卫生问题已呈现全球化趋势[3]。此外，随着我国水产养殖业的快速发展，副溶血性弧菌也感染着水产养殖动物，导致渔业经济的衰退。目前，针对副溶血性弧菌引起的生物疾病，治疗主要依赖于包括多西环素或喹诺酮在内的抗生素[4]，但抗生素的过度使用和误用导致世界范围内出现越来越多的副溶血性弧菌耐药菌株，抗性基因的水平基因转移（Horizontal gene transfer, HGT）和全球气候变化的加速影响更助长了抗性菌株的扩散[5]。对于受副溶血性弧菌污染的海产品，通常使用的杀菌方法是热处理，但是这种方法影响了食品本身的感官特性[6]，并会造成营养流失。在这种情况下，使用天然或添加的微生物群和/或其抗菌化合物来提高食品安全，其中，芽孢杆菌属产生的细菌素（Antimicrobial peptide, AMP）因其对耐药病原体产生广泛的抗菌作用，被视为抗生素的潜在替代品[7]。

细菌素是存在于自然界中不同生命形式的小蛋白质，可对微生物感染产生防御作用。芽孢杆菌产生的细菌素分为核糖体生物合成肽和非核糖体生物合成肽[8]，核糖体生物合成肽包括 Subtilin、Coagulin、Entomocin 9、Cereulide 和 Bacillopeptidase DJ-2 等，非核糖体生物合成肽包括 Brevibacillin, Brevicillin、Surfactin、Iturins 和 Fengycin 等[9]。关于芽孢杆菌细菌素抗菌机制的研究报告中，膜损伤机制一直是主要理论，人们发现枯草芽孢杆菌脂肽 DSM 10 通过破坏细胞和抑制生物膜形成，对维罗尼气单胞菌 JCM 7375 具有显著的抑制作用[10]。因其广泛且有效的抑菌活性，目前已经应用于制药、环境保护、食品保鲜和农业生物防治等多个领域[11]。虽然国内外对于细菌素的研究众多，然而针对副溶血性弧菌抑制作用的研究仍显不足。随着近年来由该致病菌引发的食源性疾病在全球范围内呈现显著上升趋势，开发具有靶向抑制作用的新型细菌素抑制剂，不仅对保障食品安全具有现实意义，更在控制多重耐药性病原菌传播方面展现出重要科研价值，现已成为食品微生物安全领域亟待解决的重要课题。

本研究以前期筛选得到具有抗副溶血性弧菌的枯草芽孢杆菌 H19 为研究对象，采用溶解性强，成本低的硫酸铵沉淀结合层析法纯化细菌素，通过 MALDI-TOF 鉴定细菌素分子量，结合生物信息学方法研究该菌株的全基因组。从基因水平上了解菌株基因的信息及预测功能，进而挖掘出细菌素合成基因簇，为开发和利用优良芽孢杆菌产细菌素提供科学依据。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

枯草芽孢杆菌 H19（*Bacillus subtilis* H19）　分离自上海浦东新区临港海域海水；副溶血性弧菌 ATCC17802（*Vibrio parahaemolyticus* ATCC17802）　美国典型微生物菌种保藏中心（ATCC）；PBS 缓冲液、NaCl、葡萄糖、酵母浸膏、L-苯丙氨酸、L-谷氨酸、KCl、$MnSO_4$、KH_2PO_4、$CuSO_4·5H_2O$、$FeSO_4·7H_2O$、$MgSO_4·7H_2O$、三氟乙酸　色谱纯，国药集团化学试剂有限公司；Sephadex G-50　GE healthcare 公司；DEAE 纤维素-52　北京索莱宝科技有限公司；乙腈　色谱纯，上海安普科技公司。

MINFACT04 型真空冷冻干燥机　英国 BOC EDWARDS 公司；DHL-A 型恒流泵　上海沪西分析仪器厂有限公司；层析柱（16×500 mm）　上海同兴玻璃仪器商城；Cosmosil $5C_{18}$-AR-II 型 C_{18} 色谱柱　苏州麦可旺志生物技术有限公司；CR21G 型高速冷冻离心机　日立产机系统中国有限公司；LC-15C 型高效液相色谱仪　日本岛津仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细菌素的分离纯化

1.2.1.1 细菌素粗提液的制备 将 *B. subtilis* H19 以 3% 接种于 Landy 液体培养基中, 150 r/min、37 ℃ 摇床培养 24 h。发酵结束后, 将发酵液以 4 ℃、8000 r/min 离心 15 min, 经 0.22 μm 滤膜除菌, 收集无细胞发酵上清液(Cell free supernatants, CFS)。按照 Huang 等[12] 的方法, 向 CFS 中加入硫酸铵, 使饱和度达到 60%, 在 4 ℃ 冰浴中缓慢搅拌 4 h, 于冰箱中静置 12 h。最后在 4 ℃ 下以 10000 r/min 离心 30 min, 将沉淀物悬浮于原菌液的 1/10 的磷酸盐缓冲液(25 mmol/L, pH7.0)中, 得到细菌素粗提液[13]。

1.2.1.2 凝胶过滤层析 凝胶过滤层析根据 Li 等[14] 的方法, 将清洗后的 Sephadex G-50 填料加入 1.6 cm×50 cm 的玻璃柱中, 使用 25 mmol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.0)平衡 3 h。将细菌素粗提液用适量超纯水溶出, 用 0.22 μm 滤膜过滤, 加载到层析柱上。流动相采用 25 mmol/L, pH7.0 的磷酸盐缓冲液, 以 0.5 min/mL 的流速进行洗脱, 2 min/管收集, 并在 220 nm 处用紫外检测器检测洗脱峰, 将有抑菌活性的组分真空冷冻干燥备用[15]。

1.2.1.3 阴离子交换层析 根据 Yi 等[16] 的方法, 将清洗后的 DEAE-52 填料加入到 1.6 cm×50 cm 的玻璃柱中, 使用 25 mmol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.0)平衡 3 h。将凝胶过滤的活性峰, 用 0.22 μm 滤膜过滤, 加载到层析柱上。以 1 min/mL 的流速进行 NaCl(0、0.16、0.3、0.6 mol/L)洗脱, 以 2 min/管收集, 并在 220 nm 处用紫外检测器检测洗脱峰, 活性组分冷冻干燥后用于下一步纯化。

1.2.1.4 HPLC 精细纯化 参考 Li 等[17] 的方法并稍作修改, 将经离子层析获得的活性组分经 0.22 μm 滤膜过滤后, 用色谱柱 Cos-mosil $5C_{18}$-AR-II(4.6 mm I.D.×250 mm, 100 Å)加载到高效液相色谱(HPLC)中。样品用流动相 A(Milli-Q 纯水, 含 0.1% TFA)和流动相 B(纯乙腈, 含 0.1% TFA), 以 0~5 min 70%A 和 30%B, 5~20 min 40%A 和 60%B, 20~25 min 0%A 和 100%B 梯度洗脱, 流速设为 1 mL/min, 柱温 30 ℃; 波长 210 nm 下检测。离子层析样液通过与 C_{18} 固定相的强烈作用, 使用增加有机相的方法进行选择性洗脱, 洗脱出的各峰组分收集于离心管中, 琼脂打孔法检测各组分的抑菌活性, 具有抑菌活性的组分即为目标细菌素, 从而实现最终纯化。

1.2.1.5 纯化阶段相关计算 在细菌素各纯化阶段中, 以 *V. parahaemolyticus* ATCC17802 为指示菌, 采用琼脂打孔法[18] 测量抑菌圈直径(mm), 用公式(1)计算抑菌活性(AU/mL)。使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度(mg/mL), 总蛋白(mg)由公式(2)计算。总活性(AU)、比活性(AU/mg)、纯化倍数和回收率(%)分别见公式(3~6)。

$$X_1 = \frac{D \times 1000}{V_1} \quad \text{式(1)}$$

$$M = C \times V_2 \quad \text{式(2)}$$

$$X_2 = X_1 \times V_2 \quad \text{式(3)}$$

$$X_3 = \frac{X_2}{M} \quad \text{式(4)}$$

$$\text{纯化倍数} = \frac{X_3}{A_0} \quad \text{式(5)}$$

$$\text{回收率}(\%) = \frac{X_2}{B_0} \times 100 \quad \text{式(6)}$$

式中: X_1 为抑菌活性, AU/mL; D 为抑菌圈直径, mm; V_1 为打孔时加入无细胞发酵上清液的体积, μL; M 为总蛋白的质量, mg; C 为蛋白浓度, mg/mL; V_2 为纯化过程中的收集液体积, mL; X_2 为总活性, AU; X_3 为比活性, AU/mg; A_0 为培养上清液中细菌素初始比活性, AU/mg; B_0 为培养上清液中细菌素初始总活性, AU。

1.2.2 细菌素分子量的测定 将通过 HPLC 分离纯化获得的活性单峰样品送至上海复旦大学进行基质辅助激光解吸电离串联飞行时间质谱(MALDI-TOF-TOF/MS)鉴定与分析[19]。具体操作为: 将 1 μL 活性峰收集液滴加到 MALDI 靶板上, 待其自然干燥后, 再在其上点 1 μL *α*-氰基-4-羟基肉桂酸基质溶液, 随后在正离子模式下进行光谱分析[20−21]。将获得的肽段分子量与全基因组测序所预测的细菌素分子量进行对比分析, 从而鉴定出 *B. subtilis* H19 产生的细菌素。

1.2.3 *B. subtilis* H19 全基因组测序

1.2.3.1 基因组 DNA 的提取与测序 将 *B. subtilis* H19 接种于种子培养基, 150 r/min, 37 ℃ 培养至生长对数期, 将发酵液以 4 ℃, 10000 r/min, 离心 20 min 后取菌泥, 确保 DNA 总量≥3 μg, 浓度≥20 ng/nL, $OD_{260/280}$=1.8~2.0, $OD_{260/230}$=1.6~2.4。菌泥送往上海美吉生物医药科技有限公司进行全基因组测序[22]。

1.2.3.2 基因组装 利用单分子测序技术建库, G-tubes 将基因组 DNA 片段化, 再连接环状单链, 获得 SMRT Bell 结构, 上机测序。原始数据质控, 经低质量读数过滤、除去多个 N 碱基、适配器污染的 reads 后, 得到高质量的测序 reads。采用 short-read 基因组装软件 SOAPdenovo 2.04[23] 对整理后的数据从头组装, 以获得最佳的组装结果。

1.2.4 *B. subtilis* H19 生物信息学分析 使用原核生物基因预测软件 Glimmer 3.02 预测 *B.subtilis* H19 的基因。对蛋白序列功能注释的数据库主要包括: COG 数据库、GO 数据库和 KEGG 数据库, 从而获得蛋白家族类别、进化谱系、分子功能、生物过程以及代谢途径等的基因注释信息[24]。ARDB 数据库用于注释 *B. subtilis* H19 耐药性相关基因信息。

antiSMASH 软件用于挖掘序列中潜在的细菌素基因簇[25−26]。

1.3 数据处理

使用 Origin 9.0 生成图表, 所有实验均重复三次, 结果表示为平均值±标准差。使用方差分析 SPSS Version 22.0 检验, $P<0.05$ 被认为具有显著性。

2 结果与分析

2.1 细菌素的分离纯化结果

2.1.1 Sephadex G-50 纯化　将通过硫酸铵沉淀法得到的细菌素粗提液加样于 Sephadex G-50 凝胶过滤层析柱上进行分离纯化, 在 UV220 nm 检测下, 共得到 2 个洗脱峰(图 1)。以 *V. parahaemolyticus* ATCC17802 为指示菌, 琼脂打孔显示第 46~54 管的 F2 峰具有抑菌活性, 比活性为 7922.62 AU/mg, 与培养上清液中的细菌素初始比活性相比, 纯化 11.87 倍, 将此峰冻干浓缩后用于下一步纯化。

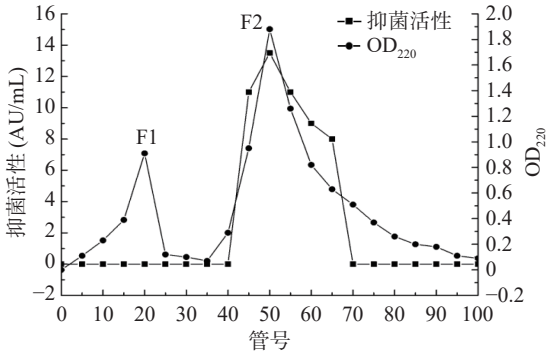


图 1　细菌素粗提液的凝胶层析图

Fig.1　Gel chromatography of crude extract of bacteriocin

2.1.2 DEAE-52 纯化　用 Sephadex G-50 层析后的活性组分 F2, 装载到 DEAE-52 离子交换层析柱上洗脱(图 2), 在 UV220 nm 检测下, 收集到 3 个洗脱峰, 抑菌结果显示峰 F2-2 对 *V. parahaemolyticus* ATCC17802 有抑制作用, 比活性为 27629.63 AU/mg, 与培养上清液中的细菌素初始比活性相比, 纯化 41.37 倍, 将此峰冻干用于下一步纯化。OD 值和抑菌活性不呈现完全的对应关系, 高 OD 值峰 F2-3 可能由其他杂蛋白与细菌素共洗脱引起, 这些杂质可能在 220 nm 处有较强吸光度, 但缺乏抑菌活性。

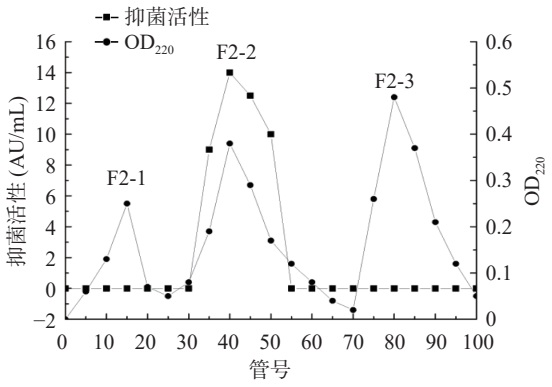


图 2　F2 组分的 DEAE-52 离子层析图

Fig.2　DEAE-52 ion chromatography of F2 component

2.1.3 HPLC 纯化　阴离子交换层析后的活性组分 F2-2 浓缩后采用 HPLC 进行高度纯化。如图 3, 共得到 4 个洗脱峰, 抑菌结果显示峰 F2-2-3 对 *V. parahaemolyticus* ATCC17802 有抑菌活性, 比活性为 307692.31 AU/mg, 纯化 460.73 倍, 整体回收率达 21.16%, 将此活性组分命名为细菌素 BH19。

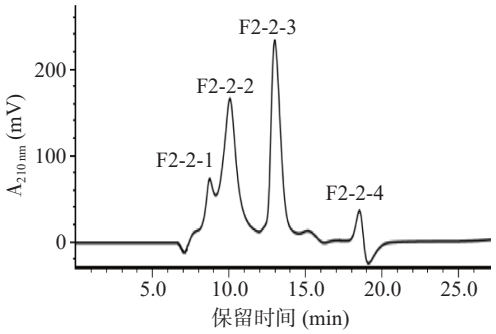


图 3　F2-2 组分的 HPLC 图

Fig.3　HPLC diagram of F2-2 component

2.1.4 纯化阶段相关计算结果　表 1 为 *B. subtilis* H19 所产细菌素的四步纯化结果。初始培养上清液的总蛋白为 2830.00 mg, 总活性为 1.89×10^6 AU, 比活性为 667.84 AU/mg。经硫酸铵沉淀、Sephadex G-50 柱层析、DEAE-52 柱层析和 HPLC 纯化后, 最终总蛋白剩余 1.30 mg, 回收率 21.16%, 比活性高达 307692.31 AU/mg, 纯化倍数提升至 460.73 倍。整个流程在逐步去除杂蛋白的同时, 总活性和回收率逐级下降, 但比活性的指数级增长表明纯化效果显著, 最终获得高纯度细菌素 BH19。

表 1　枯草芽孢杆菌 H19 所产细菌素的纯化结果

Table 1　Purification of bacteriocin produced by *B. subtilis* H19

纯化步骤	体积 (mL)	总蛋白 (mg)	总活性 (AU)	比活性 (AU/mg)	纯化倍数	回收率 (%)
培养上清液	1000.00	2830.00	1.89×10^6	667.84	1.00	100
硫酸铵沉淀	200.00	496.40	1.62×10^6	3264.50	4.89	85.71
Sephadex G-50 柱层析	92.00	118.90	9.42×10^5	7922.62	11.87	49.84
DEAE-52 柱层析	33.00	27.00	7.46×10^5	27629.63	41.37	39.47
C_{18}反相高效液相色谱法	5.00	1.30	4.00×10^5	307692.31	460.73	21.16

2.2 细菌素的分子量测定

细菌素 BH19 在 MALDI 的激光照射下将质子转移到生物分子或从生物分子得到质子, 使细菌素电离, 离子在电场作用下加速飞过飞行管道, 结果如图 4, TOF 检测到目标峰即细菌素 BH19 的分子量为 1042 Da。1042 Da 的分子量表明 BH19 为小分子肽类细菌素[27], 如 Class II bacteriocin, 可能通过膜穿孔或酶抑制发挥抑菌作用。质谱验证了其实际存在的分子量, 后续进行的全基因组测序可以提供候选分子的理论信息, 两者结合能够显著提升新型细菌素鉴定的准确性。

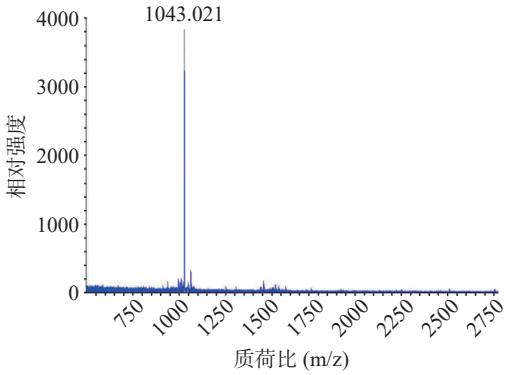


图 4 细菌素 BH19 的 MALDI-TOF 图

Fig.4 MALDI-TOF mass spectrometry of bacteriocin BH19

2.3 基因组概况

根据全基因组测序结果，*B. subtilis* H19 的总基因长度为 3595203 bp，包含 4217 个基因，平均长度为 852.55 bp，基因密度为 1.04 kp，基因区 GC 含量占总 DNA 的 44.58%。此外，串联重复序列有 25 个，总长为 6474 bp，占总 DNA 的 0.16%。*B. subtilis* H19 全基因组 GenBank 登录号为：QEQU00000000。

2.4 基因功能注释结果分析

2.4.1 COG 功能注释 利用 COG 数据库对蛋白序列进行基因家族分类，并获得相应家族的功能描述信息。在该数据库中，共对 *B. subtilis* H19 的 3124 个基因进行了注释（见图 5）。这些基因被分为 22 种功能类别，其中氨基酸代谢与转运相关基因数量最多，达到 305 个，占比 9.8%；其次为碳水化合物转运与代谢基因，共 278 个，占比 8.9%；无机离子转运与代谢基因有 192 个，占比 6.1%。值得注意的是，H19 具有较强的氨基酸和糖转运代谢能力，根据研究这可能会有助于细菌素合成前体物质[27]。

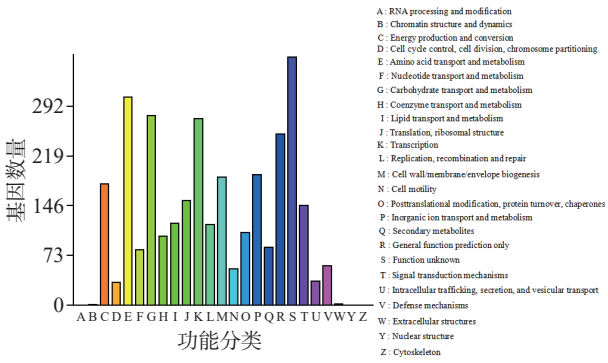


图 5 枯草芽孢杆菌 H19 的 COG 注释

Fig.5 COG annotation of *B. subtilis* H19

2.4.2 GO 功能注释 GO 注释涵盖生物过程、细胞组分和分子功能三个方面，有助于揭示基因所代表的生物学功能。在该数据库中，共对 *B. subtilis* H19 的 2711 个基因进行了注释（见图 6）。在生物过程（Biological process）方面，大量基因参与细胞过程和代谢过程；在细胞组分（Cellular component）方面，大多基因功能与组成细胞和细胞部分相关；在分子功能（Molecular function）方面，多数基因涉及结合和催化活性。此外，GO 数据库还注释到跨膜转运蛋白以及与细菌素相关的 ABC 转运蛋白，这表明 H19 可能含有多种可通过跨膜运输的物质，包括细菌素。

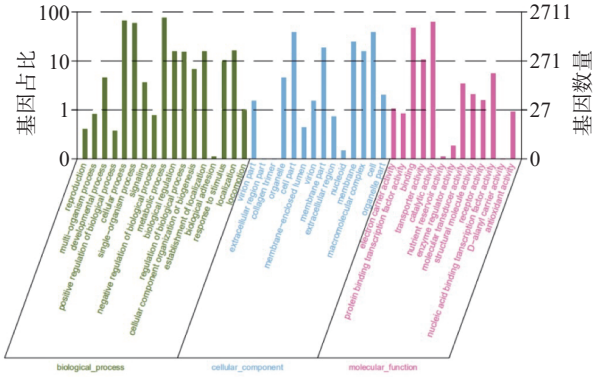


图 6 枯草芽孢杆菌 H19 的 GO 注释

Fig.6 GO annotation of *B. subtilis* H19

2.4.3 KEGG 代谢途径分析 通过 KEGG 数据库揭示 *B. subtilis* H19 的生物系统（如细胞、生物和生态系统）以及其基因的高级功能（如代谢途径、遗传信息传递）。在该数据库中共注释到了 3431 个基因，通过比对基因组序列与 KEGG 数据库中的参考基因，确定每个基因可能参与的生物通路，并按功能分类统计，结果如图 7，共注释到 178 条 KEGG 通路，其中参与遗传信息处理（Genetic information processing）、人类疾病（Human diseases）、有机体系（Organismal systems）、细胞过程（Cellular processes）和代谢（Metabolism）的通路分别为 25 条、23 条、17 条、5 条和 108 条。在次级代谢产物的生物合成代谢途径中，产生铁载体的非核糖体肽合成途径总计 6 个基因得到注释，为 *entA*、*entB*、*entC*、*entE*、*menF* 和 *dhbF*，非核糖体肽结构途径总计 9 个基因得到注释，为 *srfAA*、*srfAB*、*srfAC*、*fenB*、*fenA*、*fenE*、*fenD*、*fenC* 和 E5.1.1.13。在 ABC 转运蛋白代谢途径中和

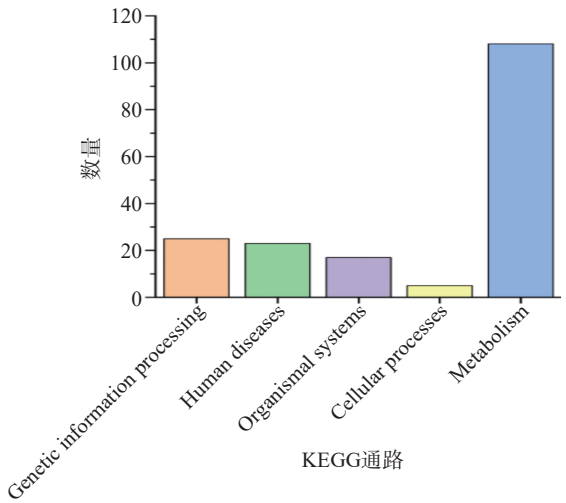


图 7 枯草芽孢杆菌 H19 的 KEGG 功能分类图

Fig.7 KEGG functional classification map of *B. subtilis* H19

氨基酸生物合成代谢途径中，分别注释到了 138 个和 119 个基因，这为细菌素生产、转运和释放提供了基础。上述结果表明，*B. subtilis* H19 可能具有细菌素的合成与分泌能力，具备作为产细菌素菌株的潜在能力[25,27]。

2.4.4　抗性基因预测分析　根据 *B. subtilis* H19 基因组与综合抗生素耐药性 ARDB 数据库比对，获得与耐药性分子基础相关的基因。结果发现，在 *B. subtilis* H19 的全基因组序列中，未发现与 ARDB 数据库中已收录的抗性基因有相似性的基因序列。这表明 *B. subtilis* H19 的全基因组中不存在抗生素抗性基因，可以作为抗生素的优良替代品。

2.4.5　细菌素合成基因簇分析　antiSMASH 软件分析了 *B. subtilis* H19 的 scaffold 序列，预测出 6 个细菌素相关的合成基因簇（见表 2），具体包括 2 个核糖体合成和翻译后修饰肽（Sactipeptide）类型和 4 个非核糖体多肽合成酶（NRPS）类型，占总预测基因簇的 22.2%，这些类型符合已报道[28] 枯草芽孢杆菌产生的细菌素类型。在 *B. subtilis* H19 基因组编码的 6 个细菌素基因簇中，Cluster 1 与枯草芽孢杆菌的孢子杀伤因子（Sporulation killing factor skfA）基因簇具有 100% 的同源性；Cluster 2 与解淀粉芽孢杆菌的表面活性素（Surfactin）[29] 合成基因簇同源性为 82%；Cluster 11 与解淀粉芽孢杆菌的 Bacillaene 合成基因簇同源性为 100%；Cluster 12 与解淀粉芽孢杆菌的丰原素（Fengycin）[30] 合成基因簇同源性为 100%；Cluster 19 与枯草芽孢杆菌的杆菌素（Bacillibactin）合成基因簇同源性为 100%；Cluster 24 与枯草芽孢杆菌的 Subtilosin A 合成基因簇同源性为 100%。

表 2　枯草芽孢杆菌 H19 细菌素合成基因簇
Table 2　*B. subtilis* H19 bacteriocin synthesis gene cluster

基因簇名称	基因簇类型	基因数量	最相似的已知基因簇	分子量（Da）	同源性（%）
Cluster 1	Sactipeptide-Head_to_tail	25	Sporulation killing factor skfA	2150.00	100
Cluster 2	NRPS	46	Surfactin	1036.34	82
Cluster 11	Nrps-Transatpks-Otherks	53	Bacillaene	582.50	100
Cluster 12	NRPS	42	Fengycin	1463.71	100
Cluster 19	NRPS	45	Bacillibactin	882.78	100
Cluster 24	Sactipeptide-Head_to_tail	21	Subtilosin A	3398.90	100

值得注意的是，Cluster 2 的分子量为 1036.34 Da，与 MALDI-TOF 结果基本一致，相似率为 99.46%，与纯化后唯一具有抑菌活性的峰对应，但其与 Surfactin[31] 的同源性较低，表明 *B. subtilis* H19 可能产生了一种新型的细菌素 BH19，未来可通过基因敲除等手段进一步验证。其余挖掘到的细菌素基因簇，可能由于处在沉默状态而未被表达，在纯化阶段没有体现抑菌活性。

3　结论

本研究通过硫酸铵沉淀结合多步层析技术，成功纯化出一种新型细菌素 BH19，其比活性达 307692.31 AU/mg，纯化倍数达 460.73 倍，展现出显著抑菌性能，MALDI-TOF 鉴定了该细菌素的分子量为 1042.00 Da。结合全基因组测序分析，*B. subtilis* H19 中共发现 6 个抗细菌素基因簇，其中 Cluster 2 的分子量与质谱鉴定结果基本一致，且与 Surfactin 家族同源性较低，表明其可能产生了一种新型细菌素。然而，Cluster 2 与 BH19 合成的直接关系仍需通过基因敲除或异源表达等实验进一步验证。此外，ARDB 数据库比对显示该菌株无已知抗生素耐药基因，证明其生物安全性。综上，BH19 的抑菌效能与安全性为其在食品防腐及抗生素替代领域的应用提供了初步依据，后续还需明确其完整结构、氨基酸序列及合成机制，以推动开发进程。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] PAZHANI G P, CHOWDHURY G, RAMAMURTHY T. Adaptations of *Vibrio parahaemolyticus* to stress during environmental survival, host colonization, and infection[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 737299.

[2] BAKER-AUSTIN C, OLIVER J D, ALAM M, et al. *Vibrio* spp. infections[J]. Nature Reviews Disease Primers, 2018, 4(1): 5.

[3] WANG Dan, FLINT S H, PALMER J S, et al. Global expansion of *Vibrio parahaemolyticus* threatens the seafood industry: Perspective on controlling its biofilm formation[J]. LWT, 2022, 158: 113182.

[4] DUTTA D, KAUSHIK A, KUMAR D, et al. Foodborne pathogenic vibrios: Antimicrobial resistance[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 638331.

[5] LI Yingpeng, LIN Gongshi, PENGSAKUL T, et al. Antibiotic resistance in *Vibrio parahaemolyticus*: Mechanisms, dissemination, and global public health challenges: A comprehensive review[J]. Reviews in Aquaculture, 2025, 17(1): e13010.

[6] NDRAHA N, HUANG Lihan, WU V C, et al. *Vibrio parahaemolyticus* in seafood: Recent progress in understanding influential factors at harvest and food-safety intervention approaches[J]. Current Opinion in Food Science, 2022, 48: 100927.

[7] JI-YOUNG L, DAE-OOK K. Biochemical properties and application of bacteriocins derived from genus *Bacillus*[J]. Journal of Life Science, 2023, 33(1): 91−101.

[8] PUAN S L, ERRIAH P, BAHARUDIN M M A, et al. Antimicrobial peptides from *Bacillus* spp. and strategies to enhance their yield[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2023, 107(18): 5569−5593.

[9] ZHANG Jiaqi, YANG Xinmiao, QIU Jiajia, et al. The characterization, biological activities, and potential applications of the antimicrobial peptides derived from *Bacillus* spp. A comprehensive review[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2025, 17(3): 1624−1647.

[10] LI Yali, WANGJIANG T, SUN Zhida, et al. Inhibition mechanism of crude lipopeptide from *Bacillus subtilis* against *Aeromonas veronii* growth, biofilm formation, and spoilage of channel catfish

flesh[J]. Food Microbiology, 2024, 120: 104489.
[11] BASI-CHIPALU S, STHAPIT P, DHITAL S. A review on characterization, applications and structure-activity relationships of *Bacillus* species-produced-produced bacteriocins[J]. Drug Discoveries & Therapeutics, 2022, 16(2): 55−62.
[12] HUANG Tianpei, ZHANG Xiaojuan, PAN Jieru, et al. Purification and characterization of a novel cold shock protein-like bacteriocin synthesized by *Bacillus thuringiensis*[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 35560.
[13] 张海林, 刘占燕, 张梦宇, 等. 一种芽孢杆菌广谱细菌素的分离纯化及其性质研究[J]. 济宁医学院学报, 2020, 43(5): 321−325. [ZHANG Hailin, LIU Zhanyan, ZHANG Mengyu, et al. Purification and characterization of broad-spectrum bacteriocin from *Bacillus*[J]. Journal of Jining Medical University, 2020, 43(5): 321−325.]
[14] LI Hongbiao, ZHANG Xiuqin, ZOU Wenhao, et al. Hyaluronidase from *Paenibacillus aquistagni* SH-7-A: Identification and characterization[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2024, 187: 105708.
[15] 李梦洋, 车晓雪, 孙庆申. 植物乳植杆菌素 2-1 纯化、鉴定及抑菌机理研究[J]. 食品工业科技, 2025, 46(4): 136−146. [LI Mengyang, CHE Xiaoxue, SUN Qingshen. Purification, characterization and antibacterial mechanism of plantaricin 2-1[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(4): 136−146.]
[16] YI Lanhua, DANG Jing, ZHANG Lihui, et al. Purification, characterization and bactericidal mechanism of a broad spectrum bacteriocin with antimicrobial activity against multidrug-resistant strains produced by *Lactobacillus coryniformis* XN8[J]. Food Control, 2016, 67: 53−62.
[17] LI Hongbiao, YANG Yongqi, LI Lanxin, et al. Genome-based identification and characterization of bacteriocins selectively inhibiting *Staphylococcus aureus* in fermented sausages[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2025, 17(5): 2878−2893.
[18] BHATTACHARYA D, NANDA P K, PATEIRO M, et al. Lactic acid bacteria and bacteriocins: Novel biotechnological approach for biopreservation of meat and meat products[J]. Microorganisms, 2022, 10(10): 2058.
[19] LI Hongbiao, GUO Lidan, ZHANG Xiaoyan, et al. Whole-genome sequencing combined with mass spectrometry to identify bacteriocin and mine silent genes[J]. LWT, 2022, 169: 113975.
[20] OVCHINNIKOV K V, OFTEDAL T F, REICH S J, et al. Genome-assisted identification, purification, and characterization of bacteriocins[J]. Bio-protocol, 2022, 12(14): e4477.
[21] CASTILLO-RUIZ M, DAILLE L K, MACHUCA P, et al. Antibacterial activity of a complex bacteriocin secreted by *Staphylococcus epidermidis* against *Porphyromonas gingivalis*[J]. Archives of Oral Biology, 2023, 152: 105730.
[22] LI Hongbiao, LIU Ting, ZHANG Xiuqin, et al. Whole-genome sequencing and bacteriocin purification of Lactiplantibacillus plantarum HY41 confirms bactericidal and probiotic potential[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2023, 185: 105685.
[23] LI Ruiqiang, ZHU Hongmei, RUAN Jue, et al. *De novo* assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing[J]. Genome Research, 2010, 20(2): 265−272.
[24] STERGIOU O S, TEGOPOULOS K, KIOUSI D E, et al. Whole-genome sequencing, phylogenetic and genomic analysis of lactiplantibacillus pentosus L33, a potential probiotic strain isolated from fermented sausages[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 746659.
[25] 郭丽丹, 何文倩, 李洪彪, 等. 植物乳杆菌 WUH3 细菌素合成基因分析及其特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(24): 195−202. [GUO Lidan, HE Wenqian, LI Hongbiao, et al. Analysis of bacteriocin synthesis gene and bacteriocin properties of *Lactobacillus* plantarum WUH3[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(24): 195−202.]
[26] SINGH S S, SHARMA D, BAINDARA P, et al. Characterization and antimicrobial studies of iturin-like and bogorol-like lipopeptides from *Brevibacillus* spp. strains GI9 and SKDU10[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 729026.
[27] 章检明, 张兰威, 易华西, 等. 乳酸菌Ⅱ类细菌素生物合成及其代谢调控策略[J]. 中国酿造, 2019, 38(2): 1−6. [ZHANG Jianming, ZHANG Lanwei, YI Huaxi, et al. Biosynthesis and strategies of metabolism regulation for class Ⅱ bacteriocins produced by lactic acid bacteria[J]. China Brewing, 2019, 38(2): 1−6.]
[28] IQBAL S, BEGUM F, RABAAN A A, et al. Classification and multifaceted potential of secondary metabolites produced by *Bacillus subtilis* group: A comprehensive review[J]. Molecules, 2023, 28(3): 927.
[29] TSAN P, VOLPON L, BESSON F, et al. Structure and dynamics of surfactin studied by NMR in micellar media[J]. Journal of the American Chemical Society, 2007, 129(7): 1968−1977.
[30] SAMEL S A, WAGNER B, MARAHIEL M A, et al. The thioesterase domain of the fengycin biosynthesis cluster: A structural base for the macrocyclization of a non-ribosomal lipopeptide[J]. Journal of Molecular Biology, 2006, 359(4): 876−889.
[31] CHEN Xiaoyu, LU Yajun, SHAN Mengyuan, et al. A mini-review: Mechanism of antimicrobial action and application of surfactin[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2022, 38(8): 143.