产杆菌霉素 D 枯草芽孢杆菌的 ARTP 诱变选育及其对黄曲霉菌的抑制作用

吴　越[1]，张　非[1]，许　锐[1]，陈双喜[1,2]*

（1. 河南大学生命科学学院分析测试中心，河南开封 475004；2. 河南省应用微生物工程研究中心，河南开封 475004）

摘要：利用常压室温等离子体（ARTP）诱变系统对主要产物为表面活性素的菌株 *Bacillus subtilis* SF90-5 进行诱变，得到主要产物为杆菌霉素 D（**1**）的突变菌株，并采用基质辅助激光解吸飞行时间质谱（MALDI-TOF-MS）和超高效液相色谱（UPLC）对 **1** 进行检测。所得的突变菌株 *B. subtilis* BMD-1 将 **1** 的产量从 0.55 g/L 提高到 1.51 g/L，提升了 175%。采用扫描电镜（SEM）和透射电镜（TEM）观察不同浓度 **1** 对黄曲霉菌菌丝和孢子的抑制作用，结果表明，3 mg/L **1** 会对黄曲霉菌的菌丝生长产生影响，12 mg/L **1** 可破坏黄曲霉菌丝和孢子的结构。该研究筛选得到了以 **1** 为主要产物且遗传稳定的突变菌株 *B. subtilis* BMD-1，为研究 **1** 对黄曲霉菌的抑制及其生产应用提供了理论基础。

关键词：枯草芽孢杆菌；杆菌霉素 D；黄曲霉菌；常压室温等离子体诱变；诱变育种

中图分类号：R965　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2023)06-0894-08

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.06.010

Mutation Breeding of *Bacillus subtilis* Producing Bacillomycin D by ARTP and Its Inhibition Effect on *Aspergillus flavus*

WU Yue[1], ZHANG Fei[1], XU Rui[1], CHEN Shuangxi[1,2]*

(*1. Analytical and Testing Center, School of Life Science, Henan University, Kaifeng 475004;*
2. Engineering Research Center for Applied Microbiology of Henan Province, Kaifeng 475004)

ABSTRACT: An atmospheric and room temperature plasma (ARTP) mutagenesis system was used to mutate the *Bacillus subtilis* SF90-5, whose main product was surfactins, into mutant strains mainly producing bacillomycin D (**1**). Matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and ultra performance liquid chromatography (UPLC) were used to analyze **1**. The mutant strain, *B. subtilis* BMD-1, improved the yield of **1** from 0.55 g/L to 1.51 g/L, increasing by 175%. Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) were used to observe the inhibition effect of **1** with different concentrations on the hyphae and spores of *Aspergillus flavus*. The results showed that **1** would affect the hyphal growth of *A. flavus* at 3 mg/L and cause damage to structures of hyphae and spores of *A. flavus* at 12 mg/L. In this study, a genetically stable mutant strain *B. subtilis* BMD-1 mainly producing **1** was obtained, providing a theoretical reference for studying the *A. flavus* inhibition of **1** and its production application.

Key Words: *Bacillus subtilis*; bacillomycin D; *Aspergillus flavus*; ARTP; mutation breeding

黄曲霉菌（*Aspergillus flavus*）是自然界中分布十分广泛的真菌病原菌[1]可通过产生的分生孢子和菌核在粮食和饲料中发生交叉感染，导致农作物减产、牲畜发病，同样也威胁着人类健康[2]。黄曲霉菌产生的黄曲霉毒素被 WHO 癌症研究机构划定为一类天然存在的致癌物，是毒性极强的剧毒物质，具有致突变、致畸性和降低免疫力的作用[3]。

与化学法[4]和物理法[5]不同，生物法防治黄曲霉菌具有低污染、低毒性和可降解的特点。其中，枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）合成的环状脂肽类

收稿日期：2023-05-12

作者简介：吴　越(1997—)，男，硕士研究生，专业方向：生物制药。

通信作者：陈双喜(1973—)，男，教授，从事生物化工研究。

E-mail：csx1231@126.com

抗菌药能对多种细菌及真菌的生长产生抑制作用，特别是杆菌霉素 D(bacillomycin D，**1**，化学结构如图 1A 所示）能对黄曲霉菌 [6]、马拉色菌 [7] 及禾谷镰孢菌 [8] 等的生长产生明显抑制作用，已成为研究热点之一。高效的生产菌株是实现 **1** 工业化生产的前提，常压室温等离子体（atmospheric and room temperature plasma，ARTP）诱变具有操作简单、突变率高且突变株稳定等特点，是筛选高产菌株的有效途径之一。例如，孟兆丽 [9] 采用 ARTP 结合其他方式对枯草芽孢杆菌 HS-A38 进行复合诱变选育，脂肽产率提升 11.55%，达到 0.507 g/L。本实验室前期已得到主要产物为表面活性素（**2**，化学结构如图 1B 所示）的菌株 *B. subtilis* SF90-5[10]，本研究将采用 ARTP 诱变系统对其进行诱变选育，以期获得能高效合成 **1** 的生产菌株，进一步采用电子显微镜上观察不同浓度 **1** 对黄曲霉菌的抑制作用，为其应用提供理论基础。

1 仪器与试药

1.1 仪器与设备

1290- Ⅱ型超高效液相色谱（UPLC）仪（美国 Agilent 公司）；New ultrafleXtreme™ 型基质辅助激光解吸飞行时间质谱（MALDI-TOF-MS，德国 Bruker 公司）；JSM-7610F Plus 型场发射扫描电镜（SEM）、JEM-F200 型场发射透射电镜（TEM）（日本电子株式会社）；EM UC7 型超薄切片机、Leica CPD300 型 CO_2 临界点干燥器（德国 Leica 公司）；ARTP- Ⅱ型 ARTP 诱变系统（北京思清源生物科技有限公司）。

1.2 培养基与试剂

多聚甲醛、戊二醛、乙酸铀酰、枸橼酸铅均购自美国 Sigma-Aldrich 公司；α- 氰基 -4- 羟基肉桂酸（HCCA）基质购自德国 Bruker 公司；其余试剂购自国药集团化学试剂有限公司，均为分析纯。

斜面及平板培养基 /(g·L^{-1})：蛋白胨 10，酵母膏 5，NaCl 10，琼脂 20；pH 7.0。

种子培养基 /(g·L^{-1})：葡萄糖 20，酵母膏 5，谷氨酸钠 10，K_2HPO_4 2，$MgSO_4$ 0.25；pH 7.0。

摇瓶发酵培养基 /(g·L^{-1})：蔗糖 30，酵母膏 1，尿素 4，Na_2HPO_4 4，KH_2PO_4 10，$MgSO_4$ 0.3，NaCl 5；pH 8.0。

马铃薯琼脂培养基 /(g·L^{-1})：马铃薯 200，葡萄糖 20，琼脂 20；pH 7.0。马铃薯液体培养基不加琼脂。

1.3 试验菌种

枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* SF90-5、黄曲霉菌由河南大学

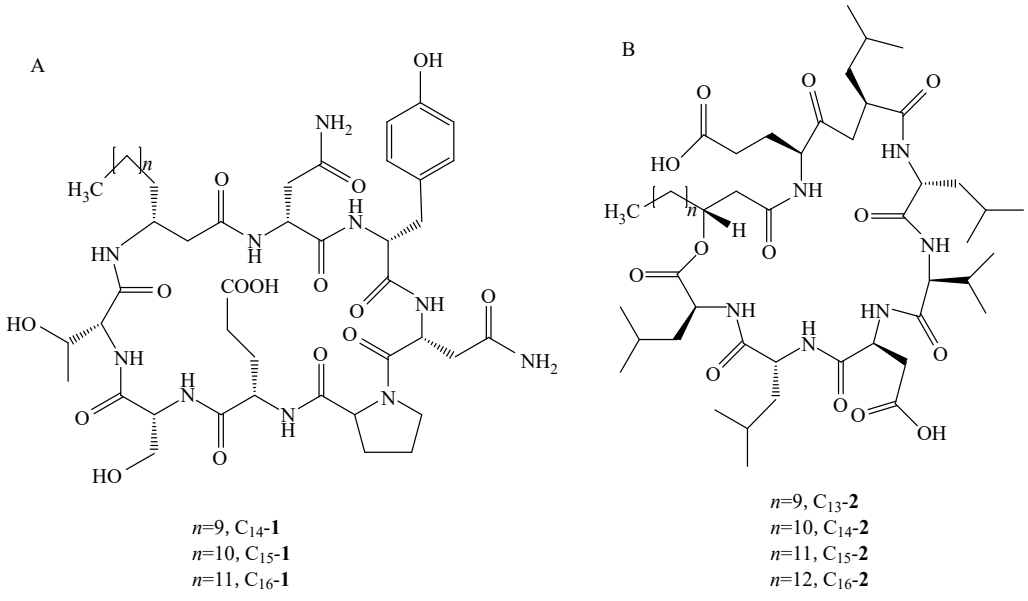


图 1 1（A）与 **2**（B）的化学结构

Fig.1 Chemical Structures of **1**（A）and **2**（B）

生物工程实验室筛选保藏。

2　方法与结果

2.1　培养方法

枯草芽孢杆菌斜面及平板培养：37 ℃培养 18 h。

枯草芽孢杆菌种子培养：250 mL 三角瓶中种子培养基装量 25 mL，取斜面活化菌种一环，接种于种子培养基中，37 ℃振荡（140 r/min）培养 9 h。

枯草芽孢杆菌摇瓶发酵培养：250 mL 三角瓶中摇瓶发酵培养基装量 40 mL，接入种子培养液 1.2 mL，37 ℃振荡（140 r/min）培养 48 h。

黄曲霉菌平板培养：34 ℃培养 48 h。

黄曲霉菌摇瓶发酵培养：250 mL 三角瓶中马铃薯液体培养基装量 25 mL，接入黄曲霉孢子悬浮液 0.5 mL，34 ℃振荡（150 r/min）培养 72 h。

2.2　枯草芽孢杆菌的 ARTP 诱变选育

ARTP 诱变条件：处理距离 2 mm；通气量 10 L/min（即 10 SLM）；功率 120 W；诱变时间 100 ～ 300 s；样品添加量 10 μL；工作气体 氦气（99.999%）。共得到了 8 种菌落形态（图 2）的突变体，突变体形态特征描述如表 1 所示。

2.3　抗真菌活性测定

突变体的选育采用血平板法初筛[10]，然后选取溶血圈直径大的突变株，以对黄曲霉菌的抑菌圈直径作为指标进行复筛。

将经 121 ℃、20 min 灭菌的平板培养基倒入平板中，作为底层培养基，冷凝后待用；将经 115 ℃、

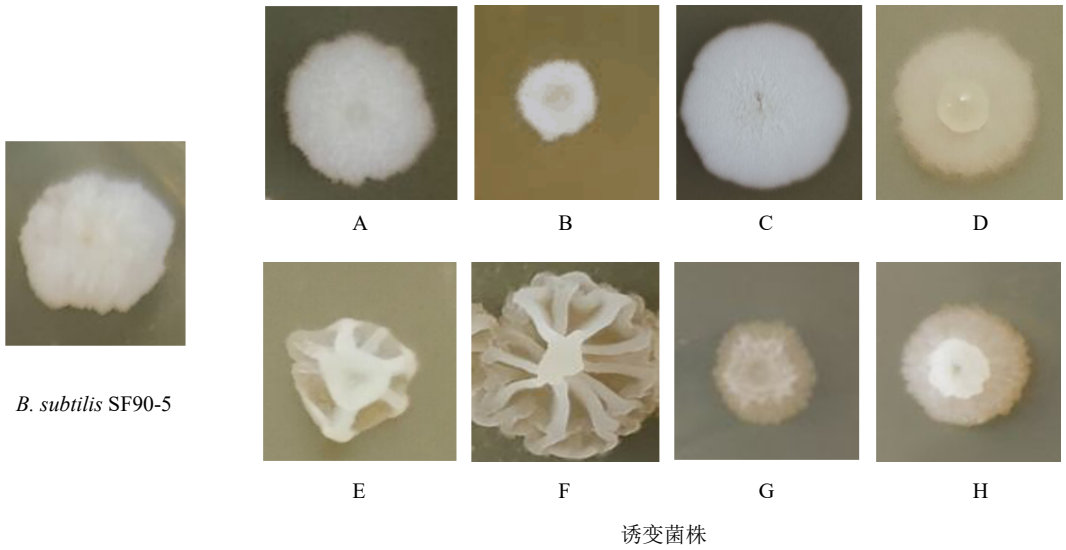


图 2　出发菌株和诱变菌株的菌落形态

Fig.2　Plate Colony Morphology of Starting Strain and Mutant Strains

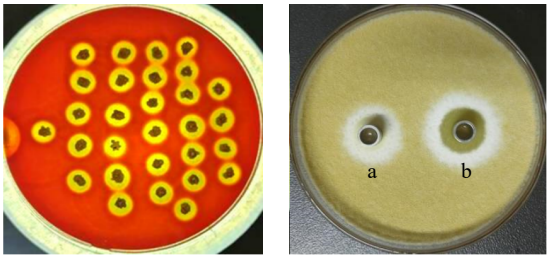
表 1　出发菌株 *B. subtilis* SF90-5 和诱变菌株的平板菌落形态的比较

Tab.1　Comparison of Plate Colony Morphology between the Starting Strain *B. subtilis* SF90-5 and Mutant Strains

菌株	大小	形状	颜色	隆起	边缘	表面	内部
B. subtilis SF90-5	大	圆形	白色不透明	凸起	圆滑	干	不拉丝
A	大	圆形	白色不透明	扁平	圆滑	干	不拉丝
B	小	圆形	白色不透明	扁平	圆滑	干	不拉丝
C	大	圆形	白色不透明	扁平	圆滑	干	不拉丝
D	较大	圆形	白色不透明	凸起	圆滑	湿	拉丝
E	较大	圆形	白色不透明	凹陷	褶皱	湿	拉丝
F	大	圆形	白色不透明	凸起	褶皱	湿	拉丝
G	较大	圆形	白色不透明	凸起	圆滑	湿	拉丝
H	较大	圆形	白色不透明	凸起	圆滑	湿	拉丝

15 min 灭菌的马铃薯琼脂培养基于 60 ℃水浴，防止凝固，加入黄曲霉孢子悬液 1.5 mL，摇匀，倒入平板，凝固后放入经 121 ℃、20 min 灭菌的牛津杯，并加入枯草芽孢杆菌发酵上清液 200 μL，于 34 ℃培养箱培养 72 h。利用游标卡尺测量抑菌圈大小，每次试验重复 3 次，结果如图 3 所示。

平板培养的黄曲霉菌为黄色，出发菌株对黄曲霉菌没有形成明显透明的抑菌圈，但出现了白色的抑菌圈，说明出发菌株不能完全抑制黄曲霉菌的生长；选育得到的突变株能够形成透明的抑菌圈，表明突变株比出发菌株抑制黄曲霉生长的能力更强。在获得的 8 种菌落形态突变株中发现，A 形态突变株对黄曲霉菌的抑制作用相对较强，可作为目标菌株进一步提高其抑菌性。经过多轮选育，在 500 多个突变株中筛选得到了一株对黄曲霉菌具有明显抑制作用的诱变菌株，抑菌圈直径达到 18.34 mm，命名为 *B. subtilis* BMD-1。



A B

图 3 诱变菌株的溶血圈（A）及出发菌株（a）与诱变菌株（b）对黄曲霉菌的抑制作用（B）

Fig.3 Hemolytic Circle of Mutant Strains (A) and Inhibitory Effect of Starting Strain (a) and Mutant Strains (b) on *A. flavus* (B)

2.4 定性分析

在 MALDI-TOF-MS 系统上用反射模式分析 *B. subtilis* BMD-1 和出发菌株 *B. subtilis* SF90-5 发酵上清液中的抗真菌脂肽[11]，基质采用 HCCA，样品与基质的量均为 0.5 μL，激光强度为 45%，激光频率为 1 000 Hz。

结果如图 4 所示，*B. subtilis* SF90-5 发酵上清液中 C_{13}～C_{16} **2** 的 Na 和 K 加合物相对较多（*m*/*z* 为 1 016、1 030、1 044、1 046、1 058、1 060 和 1 074）[11]，**1** 相对较少（*m*/*z* 为 1 053、1 067 和 1 081 等）[12]。相反，*B. subtilis* BMD-1 发酵上清液中 C_{14}～C_{16} **1** 的 Na 和 K 的加合物相对较多（*m*/*z* 为 1 053、1 067、1 069、1 081、1 083 和 1 097），**2** 相对较少（*m*/*z* 为 1 030、1 044、1 060 等），表明菌株经诱变后产生的发酵产物组成发生了显著变化，**1** 成为突变株 *B. subtilis* BMD-1 的主要产物。

2.5 定量分析

1 测定方法：将枯草芽孢杆菌发酵上清液过 0.22 μm 水系滤膜，利用 UPLC 仪进行定量分析，以色谱响应值为纵坐标。质量浓度为横坐标对 **1** 的 3 种不同同系物分别绘制标准曲线。色谱条件：色谱柱 InfinityLab Poroshell 120 EC-C_{18} 柱（4.6 mm×100 mm，2.7 μm）；流动相 A 为 0.05%三氟乙酸（TFA）水溶液，B 为乙腈，梯度洗脱（0—15 min，A 70 %—55 %；15—40 min，A 55 %—45 %；40—41 min，A 45 %—70 %；41—45 min，A 70%）；检测波长 207 nm；柱温 30 ℃；流速 0.6 mL/min；进样量 10 μL。

2 测定方法：样品进样前过 0.22 μm 水系滤膜。色谱条件：色谱柱 同上；流动相 A 为 0.05%三氟乙酸（TFA）水溶液，B 为甲醇，等度洗脱（0—35 min，A 10%）；检测波长 205 nm；柱温 40 ℃；流速 0.3 mL/min；进样量 10 μL。

1 与 **2** 对照品（本实验室分离、纯化获得，**1** 含量为 98%，**2** 含量为 90%）的液相色谱图如图 5 所示。诱变后菌株发酵上清液中 **2** 的含量明显降低（图 6）。测量发酵上清液中 **1** 的含量，结果显示，相较于 *B. subtilis* SF90-5 发酵上清液中 **1** 含量（0.55 g/L），*B. subtilis* BMD-1 发酵上清液中 **1** 含量（1.51 g/L）明显增加，增加了 172%。综上所述，ARTP 诱变获得的突变菌株 *B. subtilis* BMD-1 发酵上清液中 **1** 的含量显著增加，从而提高了对黄曲霉菌生长的抑制能力，与文献[6]结果一致。连续传代试验结果表明该菌株遗传特性稳定，可用于 **1** 的高效合成（图 7）。

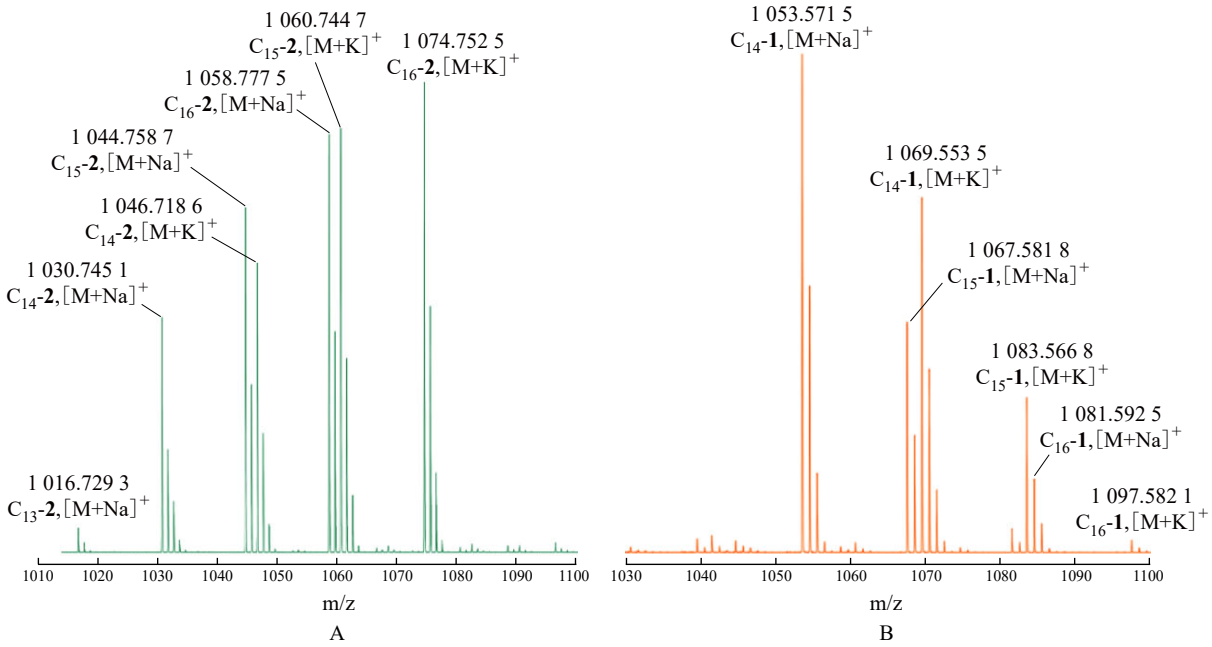


图 4　出发菌株（A）和诱变菌株（B）发酵上清液的质谱图

Fig.4　Mass Spectra of Fermentation Supernatant of Starting Strain (A) and Mutant Strain (B)

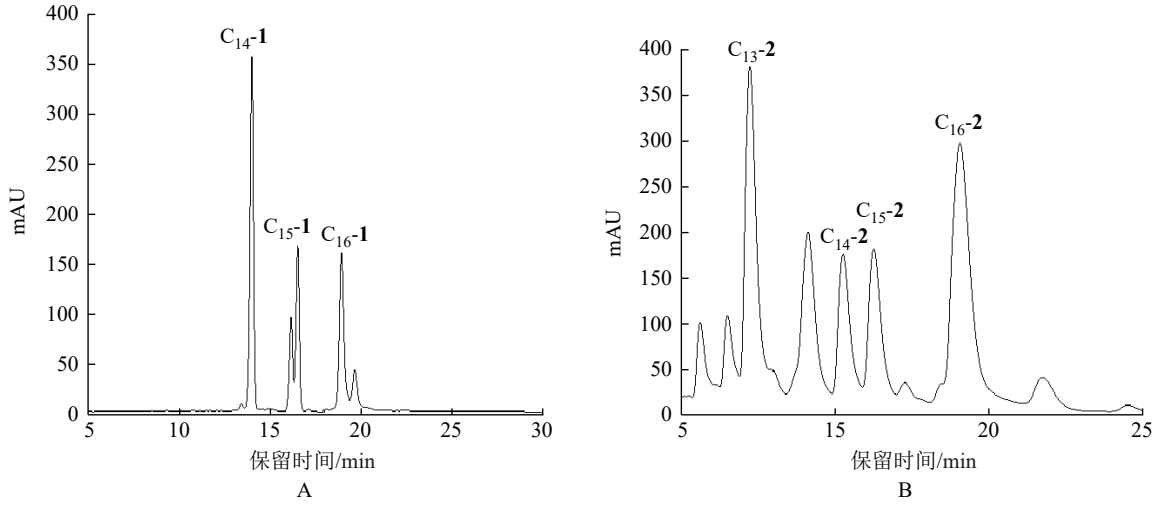


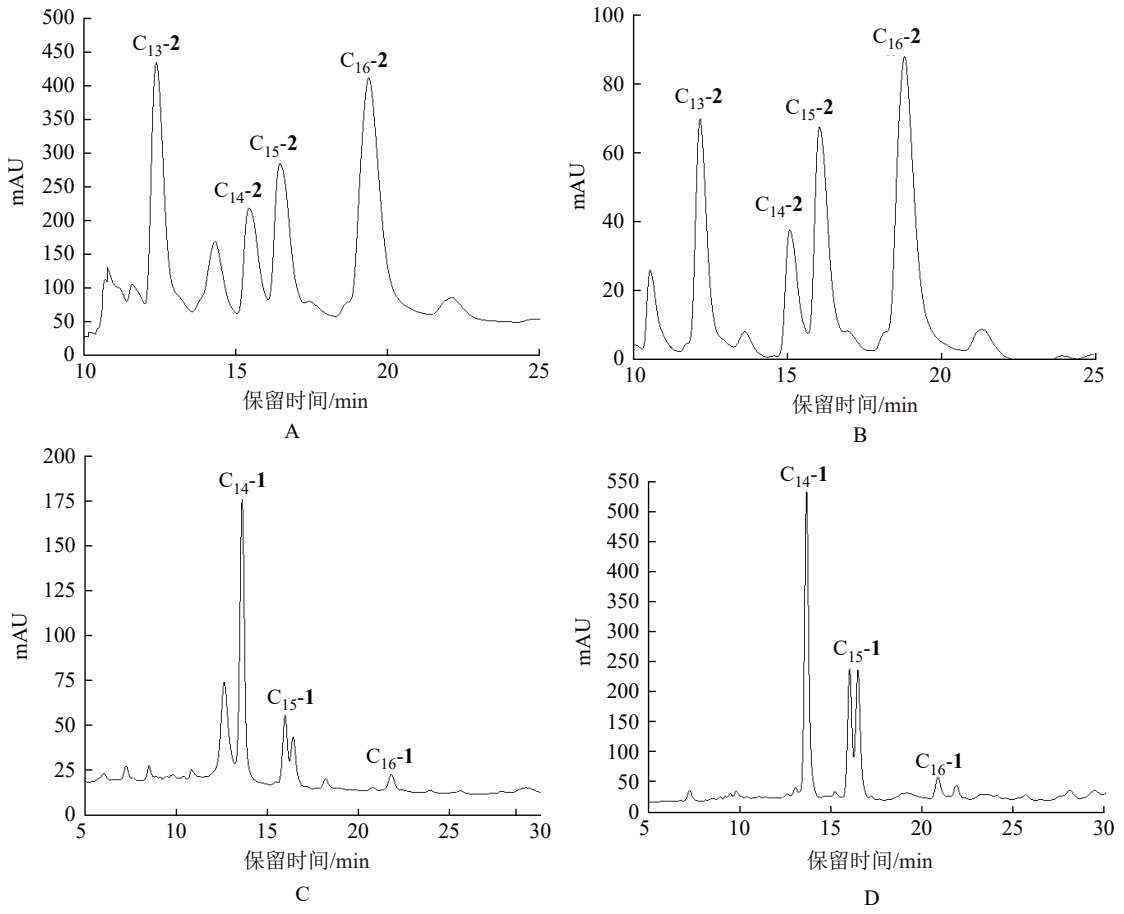
图 5　对照品 1（A）和 2（B）的色谱图

Fig.5　Chromatograms of Reference Standards **1** (A) and **2** (B)

2.6　SEM 和 TEM 表征

取黄曲霉孢子悬浮液（每 1 mL 1×10^7 个）0.5 mL 到马铃薯液体培养基 25 mL 中，于 34 ℃、150 r/min 摇床培养 24 h，再分别加入经 0.22 μm 水系滤膜过滤后的 *B. subtilis* BMD-1 发酵上清液 50、100、150、200、250 μL，继续培养 48 h，过 3 层滤布收集菌丝和孢子。采用 SEM 和 TEM 对其进行表征，样品的制备方法参考文献[13]。

经不同质量浓度 **1** 处理后，黄曲霉菌丝和孢子的形貌及内部结构如图 8 所示，形态描述如表 2 所示。3 mg/L **1** 会影响黄曲霉菌菌丝和孢子生长产生，12 mg/L **1** 会溶解黄曲霉菌丝和孢子结构。随 **1** 浓度的增加，黄曲霉菌丝的形态由粗壮逐渐干瘪，最终变为镂空的絮状；孢子的形态由圆形饱满，逐渐



A—出发菌株 *B. subtilis* SF90-5 发酵上清液中的 **2**；B—突变菌株 *B. subtilis* BMD-1 发酵上清液中的 **2**；C—出发菌株 *B. subtilis* SF90-5 发酵上清液中的 **1**；D—突变菌株 *B. subtilis* BMD-1 发酵上清液中的 **1**。

图 6 出发菌株与突变菌株发酵上清液中 1 和 2 的色谱图

Fig.6 Chromatogram of **1** and **2** in Fermentation Supernatant of Starting Strain and Mutant Strain

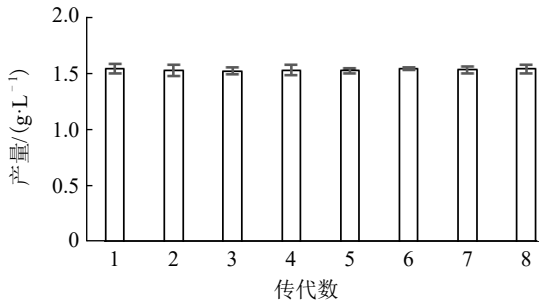


图 7 菌株 *B. subtilis* BMD-1 产 1 的遗传稳定性结果（*n*=3）

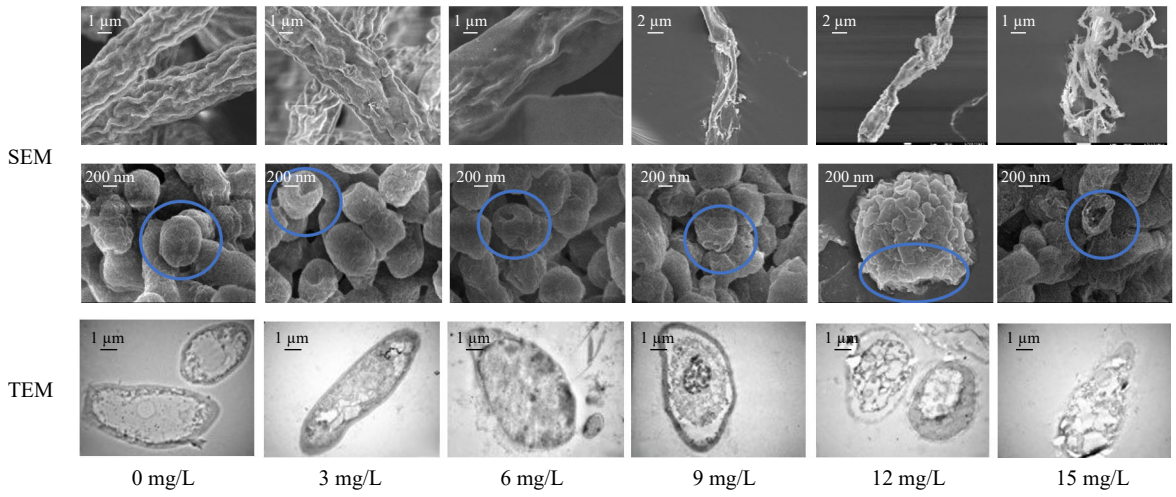
Fig.7 Genetic Stability Results of Strain *B. subtilis* BMD-1 Producing **1** (*n*=3)

出现凹陷，最终变成不规则的空壳状。结果表明，**1** 可通过影响黄曲霉菌菌丝和孢子的形态及结构，抑制其生长。

2.7 1 抑制黄曲霉菌的最低抑菌浓度（MIC）

将经 115 ℃、15 min 灭菌的马铃薯琼脂培养基于 60 ℃水浴，防止凝固，每 50 mL 马铃薯琼脂培养基中加入黄曲霉孢子悬浮液（每 1 mL 1×10^7 个）200 μL，并加入 **1**，使 **1** 终质量浓度为 1 ～ 7 mg/L 系列浓度，放入 34 ℃培养箱培养 48 h，观察其生长状况；以不加 **1** 为对照。

结果如图 9 所示。3 mg/L **1** 即可使黄曲霉菌生



上排—菌丝的 SEM 照片；中排—孢子的 SEM 照片；下排—孢子的 TEM 照片。

图 8　不同质量浓度 1 对黄曲霉菌菌丝与孢子抑制作用

Fig.8　Inhibitory Effect of **1** with Different Mass Concentrations on Hyphae and Spores of *A. flavus*

表 2　不同质量浓度 1 对黄曲霉菌丝和孢子抑制作用

Tab.2　Inhibitory Effect of **1** with Different Mass Concentrations on Hyphae and Spores of *A. flavus*

浓度/(mg·L^{-1})	菌丝形貌(SEM)	孢子形貌(SEM)	菌丝形貌(TEM)
0	粗壮，有纹路，外层有绒毛	圆形，饱满，具有纹路	细胞器完整，细胞膜与细胞壁贴合紧密
3	收缩，有纹路，较为粗壮	椭圆，凹陷，未破损	细胞器完整，细胞壁与细胞膜部分模糊
6	表面光滑，无绒毛，褶皱，干瘪	椭圆，两端凹陷，未破损	细胞壁与细胞膜开始分离，细胞器破坏
9	整体光滑，无绒毛且干瘪严重	凹陷严重，部分细胞壁破损	细胞壁与细胞膜完全分离，内部收缩在一起
12	表面粗糙，干瘪，部分溶解，	细胞壁破损，形状不规则	细胞壁轮廓淡化，细胞器破损，内容物减少
15	溶解严重，絮状，整体轮廓消失	破损严重，形成空壳	细胞壁轮廓消失，细胞器破损严重，形成空洞

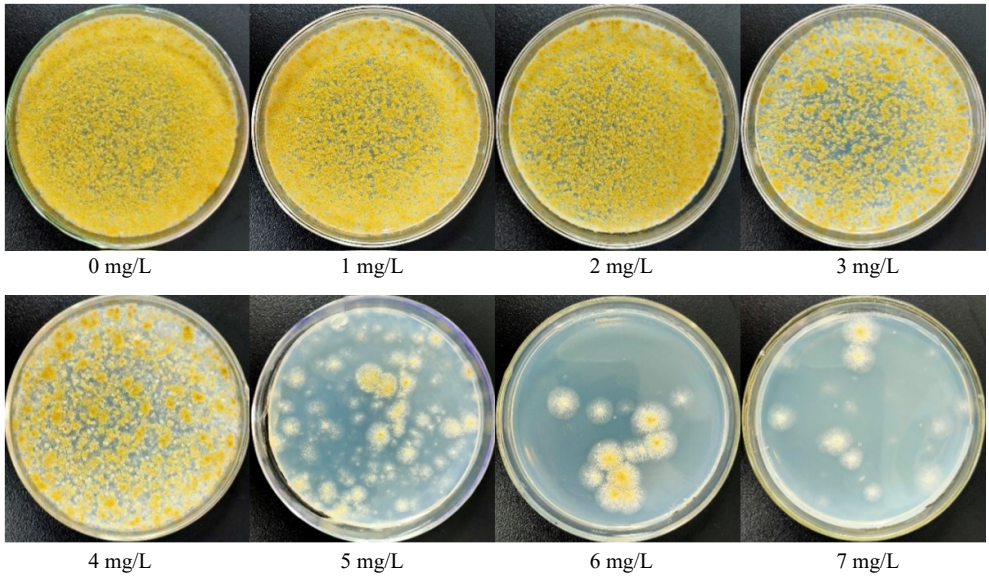


图 9　不同质量浓度 1 对黄曲霉菌生长的抑制作用

Fig.9　Inhibitory Effect of **1** with Different Mass Concentrations on the Growth of *A. flavus*

长的速度变慢，且生长抑制作用呈浓度依赖性。**1** 抑制黄曲霉菌的 MIC 约为 3 mg/L。

3 总结

1 对黄曲霉菌生长具有显著的抑制作用，而筛选得到高效的 **1** 生产菌株是实现其工业化生产的前提。本研究利用 ARTP 诱变系统对主要产物为 **2** 菌株 *B. subtilis* SF90-5 进行诱变选育，得到了以 **1** 为主要产物且遗传稳定的突变菌株 *B. subtilis* BMD-1，将 **1** 的摇瓶发酵产量从 0.55 g/L 提高到 1.51 g/L，提升了 175 %。并采用 SEM 和 TEM 探究了 *B. subtilis* BMD-1 发酵液对黄曲霉菌生长的抑制作用，结果显示，**1** 可通过影响黄曲霉菌菌丝和孢子的形态及结构，抑制其生长，MIC 约为 3 mg/L。本课题为研究 **1** 对黄曲霉菌的抑制及生产应用提供了理论基础。

参考文献：

[1] AMAIKE S, KELLER N P. *Aspergillus flavus* [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 2011, **49**: 107-133.

[2] UKA V, CARY J W, LEBAR M D, *et al*. Chemical repertoire and biosynthetic machinery of the *Aspergillus flavus* secondary metabolome: a review [J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2020, **19**(6): 2797-2842.

[3] MARCHESE S, POLO A, ARIANO A, *et al*. Aflatoxin B1 and M1: biological properties and their involvement in cancer development [J]. *Toxins* (Basel), 2018, **10**(6): 214.

[4] LI S F, ZHANG S B, ZHAI H C, *et al*. Hexanal induces early apoptosis of *Aspergillus flavus* conidia by disrupting mitochondrial function and expression of key genes [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2021, **105**(18): 6871-6886.

[5] KHALIL O A A, HAMMAD A A, SEBAEI A S. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus* inhibition and reduction of aflatoxins and ochratoxin A in maize by irradiation [J]. *Toxicon*, 2021, **198**: 111-120.

[6] MOYNE A L, SHELBY R, CLEVELAND T E, *et al*. Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus* [J]. *J Appl Microbiol*, 2001, **90**(4): 622-629.

[7] WU T, CHEN M R, ZHOU L B, *et al*. Bacillomycin D effectively controls growth of *Malassezia* globosa by disrupting the cell membrane [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, **104**(8): 3529-3540.

[8] GU Q, YANG Y, YUAN Q, *et al*. Bacillomycin D produced by *Bacillus amyloliquefaciens* is involved in the antagonistic interaction with the plant-pathogenic fungus fusarium graminearum [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2017, **83**(19): e01075-17.

[9] 孟兆丽. 枯草芽孢杆菌HS-A38高产抗菌肽突变株筛选及抑菌机理的研究[D]. 大连工业大学硕士学位研究论文, 2018.

[10] 李 光, 唐小玲, 朱学亮, 等. Surfactin高产菌株的等离子体诱变及其高通量筛选[J]. 食品与发酵工业, 2017, **43**(2): 67-72.

[11] VATER J, KABLITZ B, WILDE C, *et al*. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(12): 6210-6219.

[12] PEYPOUX F, POMMIER M T, DAS B C, *et al*. Structures of bacillomycin D and bacillomycin L peptidolipid antibiotics from *Bacillus subtilis* [J]. *J Antibiot* (Tokyo), 1984, **37**(12): 1600-1604.

[13] LI X, REN Y Y, JING J R, *et al*. The inhibitory mechanism of methyl jasmonate on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin biosynthesis and two novel transcription factors are involved in this action [J]. *Food Res Int*, 2021, **140**: 110051.