

研究报告



植物乳杆菌 CCFM8724 抑制双菌生物膜的成分初探

李佳珣 张秋香* 郭敏 赵建新

江南大学食品学院 江苏 无锡 214122

摘要:【背景】植物乳杆菌是一种重要的益生菌,本实验室前期研究表明植物乳杆菌 CCFM8724 发酵液可抑制变异链球菌和白色念珠菌双菌生物膜,但植物乳杆菌发酵液中起作用的具体物质尚不清楚。【目的】评价植物乳杆菌 CCFM8724 发酵液抑菌成分的特性,初步探究其物质基础。【方法】探索温度、pH 等因素对抑菌物质的影响,采用气相色谱-质谱(Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS)联用技术分析植物乳杆菌代谢物的组成,进一步通过有机溶剂萃取、超滤等方法初步分离纯化发酵液中抑制双菌生物膜的成分,并采用液相色谱-质谱(Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS)联用技术进行鉴定。【结果】通过多元统计分析,发现植物乳杆菌发酵液的主要差异标志物为有机酸(如苯乳酸、乙酸、羟基己酸和甘油酸等),经过初步提取鉴定并进行功能验证,其中有效成分主要为有机酸和环肽类化合物。【结论】植物乳杆菌 CCFM8724 发酵液主要通过多种有机酸和环肽类的协同作用抑制变异链球菌和白色念珠菌生物膜,该研究为植物乳杆菌发酵液进一步的分离纯化和有效成分的生产应用提供理论依据。

关键词: 植物乳杆菌, 代谢组学, 物质基础, 有机酸, 环肽类化合物

Identification of metabolites secreted by *Lactobacillus plantarum* CCFM8724 on inhibiting dual-species biofilm

LI Jiaxun ZHANG Qiuxiang* GUO Min ZHAO Jianxin

School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

Abstract: [Background] *Lactobacillus plantarum* is a kind of important probiotic. Our previous study suggested that *L. plantarum* CCFM8724 could inhibit the double species biofilm of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. However, the specific contributing substances remain unclear. [Objective] To evaluate the characteristics of the antibacterial components and explore the material basis of *L. plantarum* CCFM8724. [Methods] The influence of temperature, pH and other factors on metabolites were measured. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was performed to analyze the composition of *L. plantarum* metabolites. Organic solvent extraction and ultrafiltration were further applied to initially separate and purify the fermentation supernatant. The metabolites inhibiting the double species biofilms were then identified by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). [Results] Through multivariate statistical analysis, the main difference metabolites of *L. plantarum* fermentation supernatant

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (32072197)

*Corresponding author: E-mail: zhangqx@jiangnan.edu.cn

Received: 21-05-2021; Accepted: 10-07-2021; Published online: 21-10-2021

基金项目: 国家自然科学基金(32072197)

*通信作者: E-mail: zhangqx@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2021-05-21; 接受日期: 2021-07-10; 网络首发日期: 2021-10-21

were organic acids (such as phenyllactic acid, acetic acid, hydroxyhexanoic acid and glyceric acid, etc.). After preliminary extraction, identification and function verification, the active ingredients were mainly organic acids and cyclic peptide compounds. **[Conclusion]** The supernatant of *L. plantarum* CCFM8724 can inhibit the mixed-biofilm through the synergistic effect of organic acids and cyclic peptides. This study provides a theoretical basis for the further production and application of *L. plantarum* effective components.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*, metabolism, material basis, organic acids, cyclic peptides

龋齿是最常见的口腔细菌感染性疾病之一,不仅困扰着成人,也困扰着低龄儿童。低龄儿童龋(Early Childhood Caries, ECC)严重危害学龄前儿童的健康,其发病率位居儿童疾病的首位,起因是牙菌斑生物膜的形成^[1]。近年的临床研究表明,患 ECC 儿童口腔的菌斑生物膜中存在大量的白色念珠菌和变异链球菌^[2]。变异链球菌是主要的致龋菌,其利用蔗糖快速产酸,创造局部低 pH 环境协助其他致龋菌的定殖,形成致龋性生物膜,进而引起龋齿^[3],而白色念珠菌可以在牙齿表面与变异链球菌相互作用并形成致龋性更强的生物膜^[4]。本实验室前期筛选到一株具有良好益生特性的植物乳杆菌 CCFM8724,在体外可以显著减少变异链球菌和白色念珠菌双菌生物膜量,在体内能显著降低龋齿模型大鼠龋齿的得分和牙齿脱矿情况^[5-6],但其有效成分尚不清楚。

通常,乳酸菌发酵过程中可以分泌有机酸^[7]、过氧化氢^[8]、细菌素^[9]等抑菌物质到胞外,但发酵液的抑菌效果通常会受到环境因素如温度、pH 等的影响^[10]。因此,了解发酵液中抑制生物膜的有效成分及其特性有利于其恰当地保存,也为后续的分离纯化和有效成分的生产应用提供理论依据。

本研究以一株具有显著抑制双菌生物膜效果的益生菌植物乳杆菌 CCFM8724 为研究对象,分析该菌株产生的能抑制双菌生物膜的有效成分的理化特性,采用基于气相色谱-质谱(Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS)联用技术的非靶向代谢组学寻找差异代谢物,采用有机溶剂提取的方法对发酵液进行初步分离,并结合液相色谱-质谱联用技术(Liquid Chromatography-Mass Spectrometry,

LC-MS)对得到的有效成分进行鉴定,初步探索植物乳杆菌 CCFM8724 发酵液抑制双菌生物膜的物质基础。

1 材料

1.1 菌株

植物乳杆菌 CCFM8724,保藏于江南大学食品生物技术中心;变异链球菌 ATCC25175、白色念珠菌 ATCC18804 购于中国普通微生物菌种保藏管理中心,现保藏于江南大学食品生物技术中心。

1.2 主要试剂与仪器

甲醇(HPLC 级)和乙腈(HPLC 级),Merck KGaA 公司;吡啶溶液(99%)、N-甲基-N-(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺、1%三甲基氯硅烷(MSTFA+1%TMCS)和甲氧胺盐酸盐(MeOX),Sigma 公司;结晶紫、甲醇、无水乙醇、石油醚、正己烷、乙酸乙酯和二氯甲烷,国药沪试公司。

TSB 培养基(g/L):胰蛋白胨 17.0,酵母粉 6.0,氯化钠 5.0,大豆蛋白胨 3.0,葡萄糖 2.5,磷酸氢二钾 2.5, pH 7.0-7.4;YPD 培养基(g/L):蛋白胨 20.0,葡萄糖 20.0,酵母粉 10.0;MRS 培养基(g/L):葡萄糖 20.00,牛肉膏 10.00,胰蛋白胨 10.00,酵母粉 5.00,无水乙酸钠 5.00,柠檬酸氢二铵 2.00,磷酸氢二钾 2.00,硫酸镁 0.58,硫酸锰 0.25,吐温-80 1.00 mL, pH 调整至 6.2-6.4。以上培养基均在 1×10^5 Pa 高压灭菌 20 min。

气质联用仪、真空干燥机, Thermo 公司;高通量组织破碎仪,新芝公司;酶标仪, ThermoFisher 公司;干式恒温金属浴,杭州瑞诚仪器有限公司。

2 方法

2.1 菌株的培养

取出-80 °C 保藏的植物乳杆菌 CCFM8724 及变异链球菌 ATCC25175, 以 2% 的接种量分别接种于 5 mL MRS 液体培养基和 TSB 液体培养基中, 37 °C 静置培养 18 h。白色念珠菌 ATCC18804 接种于 YPD 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 摇床培养 18 h。活化 3 代后可用于实验。

2.2 植物乳杆菌发酵上清液的制备

植物乳杆菌 CCFM8724 培养过夜后于 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min, 上清液用 0.22 μ m 的滤膜过滤除菌后置于 4 °C 冰箱备用。

2.3 生物膜量的测定

在 96 孔板中分别加入变异链球菌、白色念珠菌菌悬液各 75 μ L, 随后加入过滤除菌的乳杆菌上清液 50 μ L, 37 °C 静置培养 24 h。阴性对照组以同等体积的 MRS 培养基代替。培养结束后去除培养液, 用 PBS 小心清洗生物膜 2 遍, 室温静置晾干。向每孔中加入 100 μ L 甲醇以固定生物膜, 10 min 后除去甲醇, 自然晾干, 加入 100 μ L 质量分数为 0.1% 的结晶紫溶液, 将生物膜染色 30 min。染色结束后用 PBS 清洗 2 遍, 每孔以 100 μ L 33% 的冰醋酸溶解, 用酶标仪读取 OD_{600} 吸光度值^[11]。每组设置 6 个平行。

2.4 发酵液有效成分的理化特性

2.4.1 温度稳定性

将发酵上清液分别在 50、60、70、80、90、100 °C 干式恒温金属浴处理 30 min, 比较经过不同温度处理后的发酵液抑制双菌生物膜形成的活性变化^[12]。

2.4.2 pH 稳定性

用 1 mol/L 的 HCl 和 NaOH 将发酵上清液调至 pH 值为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、8.0, 保持 1 h 后再调整至发酵液初始 pH 值(3.7)^[13], 比较经过不同 pH 处理的发酵液抑制双菌生物膜形成的活性变化。

2.4.3 酶解稳定性

向发酵上清液添加蛋白酶 K 和过氧化氢酶溶液, 使酶溶液终浓度为 0.5 mg/mL, 50 °C 酶解 2 h 后将酶热灭活^[14], 测定酶处理对发酵液抑制双菌生物膜形成的活性变化, 以未经过酶处理的发酵液作为对照。

2.5 GC-MS 分析发酵液代谢物

2.5.1 代谢物的提取

取 300 μ L 的发酵液加入 700 μ L 预冷的提取剂(甲醇:乙腈:水, 体积比为 2:2:1), 在冰浴上沉淀 30 min, 于 4 °C、12 000 $\times$ g 离心 15 min, 取上清液放入真空浓缩仪, 于 45 °C、0.1 kPa 干燥 1.5 h, 得到干燥不含水的代谢组样品^[15]。以空白 MRS 培养基作为对照做上述同样处理。为确保实验的准确性, 每组设置 6 个平行。

2.5.2 代谢物的衍生化

加入 100 μ L 的 0.1 mg/mL 甲氧胺盐酸吡啶溶液, 涡旋振荡 30 s, 于 37 °C 干式恒温金属浴 90 min, 然后加入 40 μ L 的 MSTFA 试剂(含 1% TMCS), 37 °C 金属浴 30 min^[16]。室温下 12 000 $\times$ g 离心 15 min, 吸取 100 μ L 上清液至内衬管中, 进行 GC-MS 分析。

2.5.3 GC-MS 条件

使用气质联用仪对代谢物进行检测分析, 扫描的质量数范围为 33–600 m/z , 离子源类型为 EI 源, 程序升温: 起始温度为 70 °C, 以 5 °C/min 的升温速率提高至 230 °C, 后以 90 °C/min 的升温速率提高至 320 °C, 在此条件下维持 5 min; 载气(He)流速 1 mL/min; 电子电离能量 70 eV; 柱子型号为 RTX-5MS (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m)^[15]。

2.6 发酵液有效成分的初步分离纯化

2.6.1 硫酸铵沉淀

称取所需的固体硫酸铵使发酵液的硫酸铵饱和度为 20%、40%、60%, 4 °C 冰箱中静置 4 h 后, 以 10 000 $\times$ g 离心 10 min, 弃上清液, 沉淀用 1/10 样品体积的 PBS 缓冲液(pH 5.8)溶解^[17], 用超滤离心管对蛋白质沉淀进行脱盐处理。以未进行硫酸铵

沉淀处理的发酵上清液作为对照组,评价发酵液中的蛋白质活性。

2.6.2 醇沉

向发酵液中添加无水乙醇至终浓度为 75%, 4 °C 冰箱中静置过夜, 10 000×g 离心 10 min, 弃上清液, 取沉淀用 1/10 样品体积的 0.9% NaCl 溶液复溶^[17], 以评价发酵液中多糖的活性。

2.6.3 超滤

用 3、10、30 kD 的超滤离心管对植物乳杆菌发酵液进行超滤, 8 000×g 离心 30 min, 收集滤出液和浓缩液备用^[18], 以未进行超滤的发酵上清液作为对照组, 初步确定有效成分的分子量范围。

2.6.4 有机溶剂萃取

向发酵液中分别加入等体积的石油醚、正己烷、乙酸乙酯、二氯甲烷萃取 3 次, 充分混匀后静置, 收集萃余相进行双菌生物膜抑制实验。同时合并 3 次萃取相, 用旋转蒸发仪 50 °C、100 r/min 进行蒸发浓缩^[19], 后复溶于相同发酵液体积的体积分数为 5% 的 DMSO 水溶液中, 4 °C 冰箱中储存备用, 以未萃取的发酵上清液作为对照组, 初步确定有效成分的极性。

2.6.5 LC-MS 检测乙酸乙酯部位

将 2.6.4 中的乙酸乙酯部位的旋蒸浸膏复溶于 0.1% 的甲酸水溶液中并用 0.22 μm 滤膜过滤, 取 100 μL 滤液于进样瓶衬管中上机检测。

2.6.6 差异代谢物抑制双菌生物膜活性测定

按照 2.3 的方法制备生物膜, 测定 GC-MS 和 LC-MS 鉴定到的部分差异代谢物抑制双菌生物膜形成的活性。分别加入苯乳酸、乙酸、山梨糖醇、苯丙氨酸、烟酸至 96 孔板中使其终浓度为 1 mg/mL, 加入环肽(脯氨酸-苯丙氨酸、脯氨酸-亮氨酸)使其终浓度为 120 μg/mL。其中, 除苯乳酸用甲醇溶解配制外, 其余物质均用去离子水配制, 配制后用 0.22 μm 滤膜过滤除菌。代谢物抑制双菌生物膜的实验以甲醇和去离子水作为对照。

3 结果与讨论

3.1 植物乳杆菌发酵液有效成分的理化特性

3.1.1 温度对发酵液抑制生物膜效果的影响

如图 1A 所示, 发酵液经不同温度处理后, 抑制双菌生物膜的能力无显著变化, 甚至在 100 °C 处理 30 min 仍有抑制双菌生物膜的效果, 但比未处理时略有降低。这表明发酵液的有效成分具有热稳定性。

3.1.2 pH 对发酵液抑制生物膜效果的影响

如图 1B 所示, 发酵液在 pH 值为 4.0 时有较好的抑制生物膜形成能力, 但随着 pH 值的上升, 致病菌生物膜形成量显著上升, 抑制效果减弱。这表明发酵液有效成分具有较窄的 pH 耐受性, 其可能是有机酸或在酸性环境下才能显示出抑制效果的一类物质。

3.1.3 酶处理对发酵液抑制生物膜效果的影响

如图 1C 所示, 发酵上清液经过过氧化氢酶、蛋白酶 K 处理后, 抑制生物膜的效果变化较小, 说明发酵液有效成分为非蛋白类成分, 也非 H₂O₂。

3.2 代谢组学分析

3.2.1 代谢物轮廓分析

代谢组的数据分析可以采用多种处理方法, 其中主成分分析(Principal Component Analysis, PCA)和偏最小二乘判别分析(Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA)为常用的分析方法, 前者为无监督分析, 后者为有监督分析^[20]。为了找到对变异链球菌和白色念珠菌双菌生物膜形成可能具有抑制作用的代谢产物, 本研究采用基于 GC-MS 的代谢组学分析技术, 测定植物乳杆菌 CCFM8724 发酵前后的差异代谢物, 并用 PCA 和 PLS-DA 对代谢产物进行分析, 结果如图 2A、2B 所示。培养前后的发酵液具有显著差异, 说明在发酵过程中产生了可能抑制双菌生物膜的有效物质。

3.2.2 差异代谢物分析

如图 2C-2E 所示, 发酵过程中产生了丰富的代谢产物。从图 2D 可见, 培养基中的许多物质被消耗(蓝色的点表示下调, 即被消耗的物质), 产生了

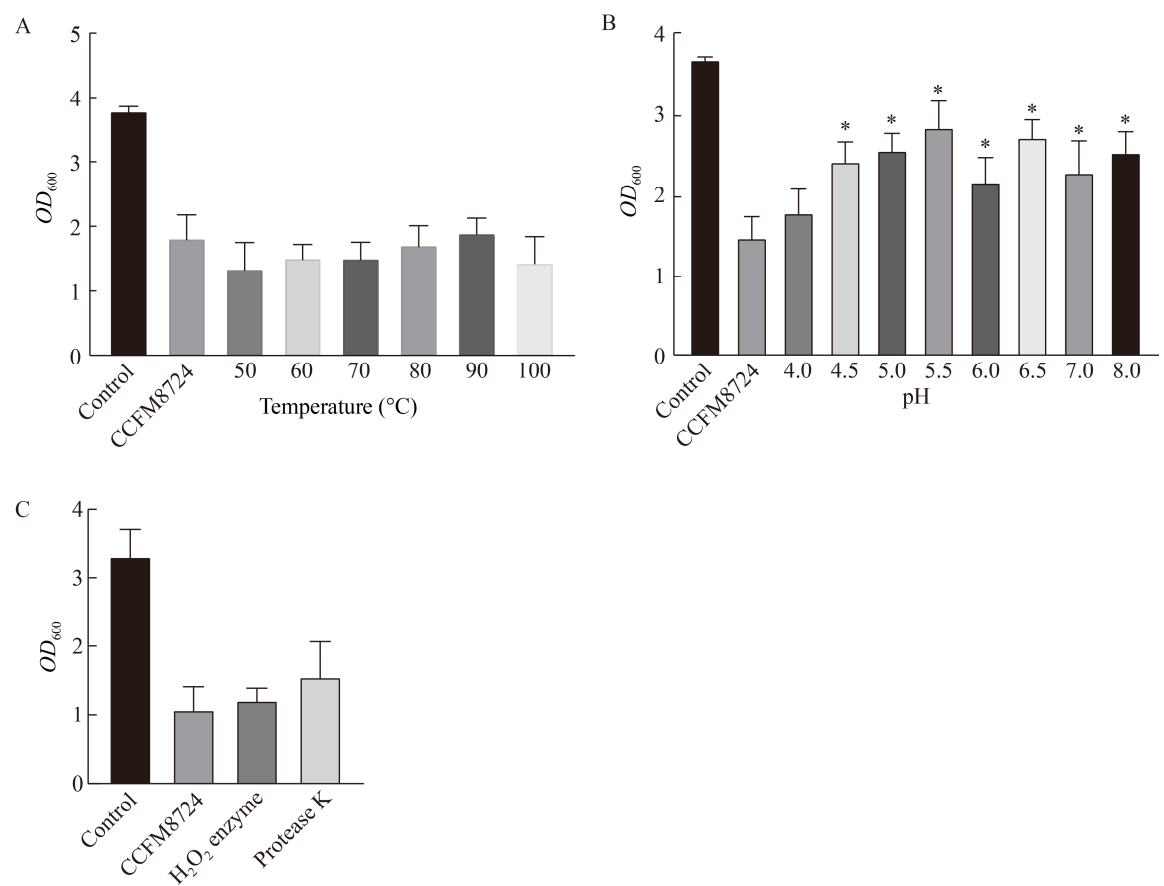
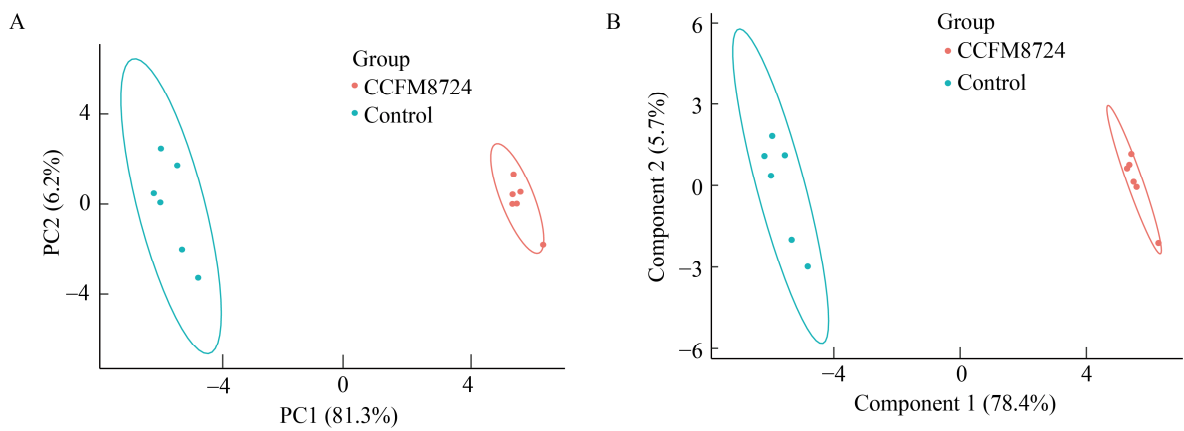


图 1 植物乳杆菌 CCFM8724 发酵液不同处理后抑制双菌生物膜的效果

Figure 1 The inhibition effect on the double-species biofilm of the *L. plantarum* CCFM8724 supernatant after different treatment

注: A: 不同温度处理; B: 不同 pH 处理; C: 酶处理。*表示与未经处理的植物乳杆菌发酵液相比, 抑制生物膜效果有显著性
Note: A: Temperature; B: pH; C: Enzyme. * indicating that compared with the untreated *L. plantarum* supernatant, the biofilm inhibition effect is significant



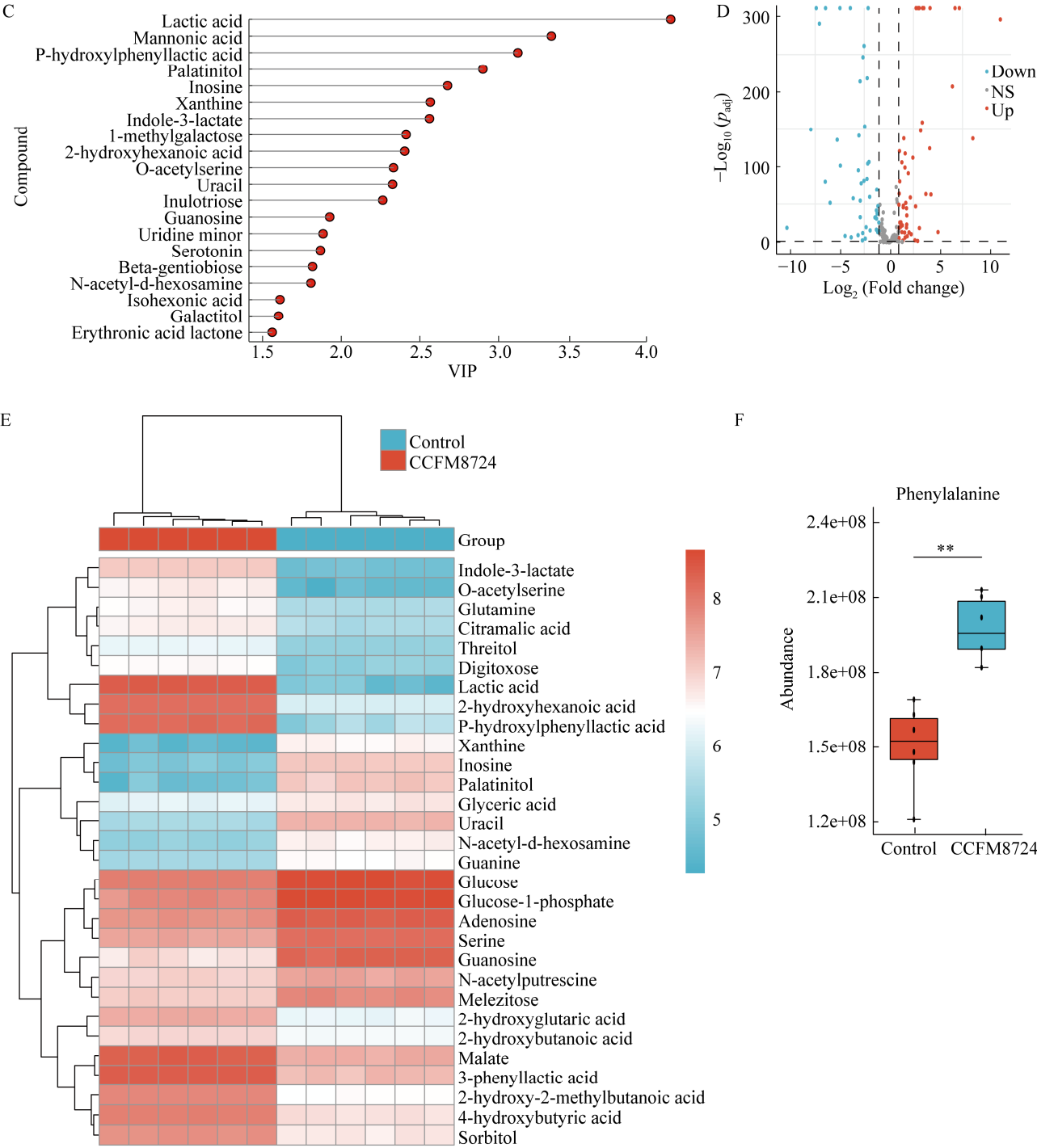


图 2 GC-MS 分析 MRS 培养基和植物乳杆菌 CCFM8724 差异代谢物

Figure 2 GC-MS analysis of the differential metabolites of MRS medium and *L. plantarum* CCFM8724

注: A: PCA 得分图; B: PLS-DA 结果图; C: VIP 得分图; D: 差异代谢物火山图; E: 差异代谢物热图; F: 苯丙氨酸相对含量。
**: $P < 0.01$

Note: A: PCA score; B: PLS-DA result; C: VIP score; D: Differential metabolites volcano map; E: Differential metabolites heatmap; F: Relative abundance of phenylalanine. **: $P < 0.01$

许多代谢产物(红色的点表示上调,即产生的物质)。结合变量投影重要度(Variable Importance for the Projection, VIP)值、差异倍数(Fold change)和 P 值进行了差异代谢物的筛选,为直观地表现出代谢物的差异情况,并显示两组样品之间的总体模式特征,对差异代谢物(选取 $P<0.05$ 的前 30 个物质)绘制了聚类热图。如图 2E 所示,这些含量显著升高的代谢产物中的有机酸、糖醇可能是潜在的有效成分。乔荣更等^[21]研究发现植物乳杆菌 SD26 上清液中的有机酸对口腔中的白色念珠菌起抑菌作用;王凤婷^[22]的研究也发现有机酸中的苯乳酸具有广谱抑菌性,其可以杀死食源性致病菌细胞,并破坏已经形成的生物膜结构;Takahashi-Abbe 等^[23]研究发现山梨糖醇在体外可以抑制变异链球菌产酸,在体内也可以减少牙菌斑生物膜的酸产量进而防治龋齿。此外,氨基酸类物质如苯丙氨酸(图 2F)在发酵前后也有显著差异。

3.3 乳杆菌有效成分的初步分离

乳杆菌产生的有效抑制生物膜的成分可以参照抑菌物质的提取方法进行分离,通常分泌到胞外的抑菌物质需要离心去除菌体后对发酵上清液进行纯化,需要根据抑菌物质的不同结构、性质、分子量等特征选择不同的方法。

3.3.1 硫酸铵沉淀蛋白质效果

如图 3A 所示,硫酸铵沉淀法是常用的非特异性提取蛋白质的方法。通过终浓度为 20%、40%、60% 的硫酸铵沉淀发酵液的蛋白质,结果显示发酵液的蛋白质均无抑制生物膜的效果,这与前面加蛋白酶的实验结果吻合对应,进一步证明了植物乳杆菌发酵液的有效成分非蛋白类物质,但不能排除小分子肽类物质的作用。

3.3.2 醇沉多糖效果

如图 3B 所示,通过终浓度为 75% 的乙醇沉淀发酵液的多糖,结果显示发酵液的多糖并无抑制生物膜的效果。

3.3.3 不同分子量的发酵液效果

如图 3C 所示,采用截留分子量分别为 3、10、30 kD 超滤离心管对发酵液进行超滤,收集 <3 kD、

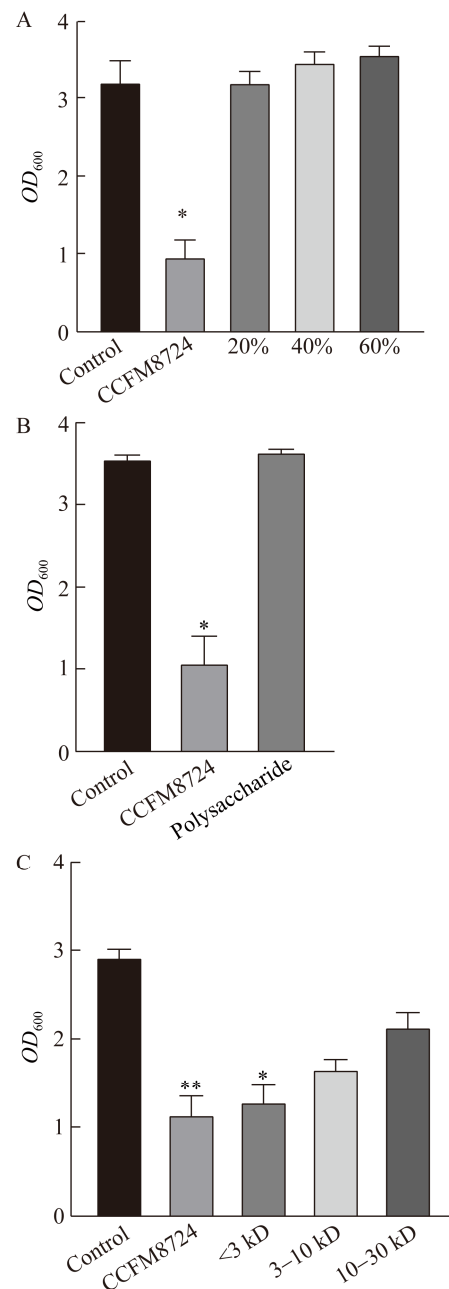


图 3 植物乳杆菌 CCFM8724 发酵液中不同物质抑制双菌生物膜的效果

Figure 3 The inhibition effect on the double-species biofilm of different substances in *L. plantarum* CCFM8724 supernatant

注: A: 硫酸铵提取蛋白质; B: 乙醇提取多糖; C: 超滤分离不同分子量的物质。*: $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。下同

Note: A: Protein extracted by ammonium sulfate; B: Polysaccharides extracted by ethanol; C: Substances with different molecular weights separated by ultrafiltration. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$. The same below

3–10 kD、10–30 kD、>30 kD 这 4 个范围的发酵液,以初步确定有效成分的分子量,结果显示发酵液的有效成分主要为<3 kD 的小分子物质。

3.3.4 不同有机溶剂萃取效果比较

有机溶剂萃取法适用于大多数物质的提取,主要利用发酵液中的不同组分极性不同而在两相的分配系数不同进行提取。对不同有机溶剂萃取发酵上清液代谢物抑制致病菌生物膜形成的能力进行比较,萃取相和萃余相的生物膜形成效果如图 4 所示。石油醚、正己烷、二氯甲烷的萃取相无抑制致病菌生物膜形成的能力,其有效成分仍存在于萃余相中,而乙酸乙酯的萃取相显著抑制生物膜形成(图 4A),而萃余相基本无活性(图 4B),这表明乙酸乙酯为合适的萃取剂,发酵液有效成分主要为中等极性的一类物质。进一步对乙酸乙酯萃取出来的有效成分进行鉴定。

3.3.5 乙酸乙酯部位 LC-MS 鉴定结果

将乙酸乙酯萃取的中等极性的代谢物进行液质联用分析,结果如表 1 所示,在乙酸乙酯部位中共检测到 291 种与数据库匹配的化合物,其中包括丰富的有机酸类和氨基酸类物质。乳酸菌产生的抑菌物质主要包括有机酸、过氧化氢、细菌素等物质,其中有机酸包括常见的乳酸、乙酸、柠檬酸等。有机酸的主要抑菌机理为:其解离产生的 H^+ 积累后会降低环境中的 pH 值,从而抑制病原菌的生长;而未解离的酸对某些细菌细胞膜有所损伤,从而破坏能量代谢,引发菌体死亡^[24]。陆春波等^[13]研究发现乳酸菌代谢产生的乳酸、乙酸、辛酸、癸酸等有机酸和脂肪酸对大肠杆菌有很好的抑菌效果。Heleno 等发现对羟基苯甲酸及其衍生酯类具有良好的抑菌性,可抑制多种真菌和细菌^[25]。窦诗雯的研究表明苯甲酸乙酯、对羟基苯甲醛对柑橘的酸腐病菌有抑制作用^[26]。本研究通过 GC-MS 和 LC-MS 检测到的有机酸包括苯乳酸、乙酸、羟基己酸、甘油酸、烟酸、3-吡啶丙烯酸等。乳杆菌所产的有抑制生物膜形成效果的有机酸主要是溶于乙酸乙酯部位的中等极性有机酸,我们推测其主要通过损伤微生物细胞膜起作用。

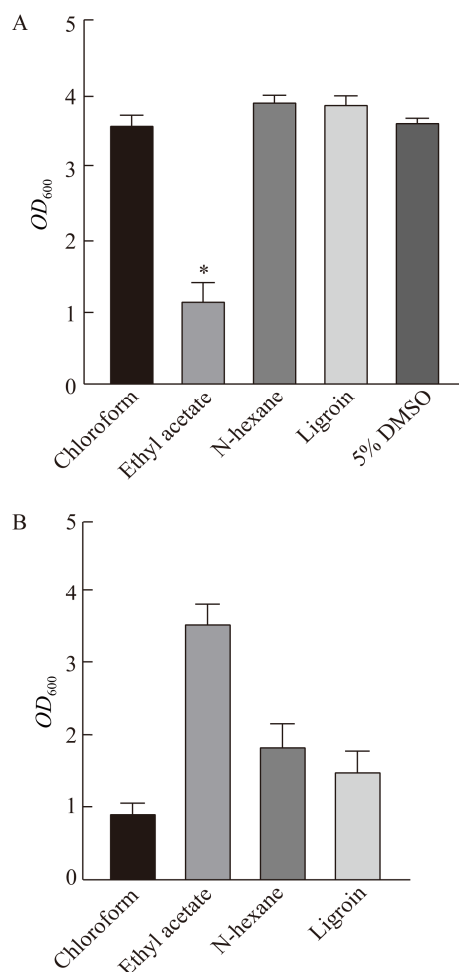


图 4 植物乳杆菌 CCFM8724 不同有机溶剂萃取相及萃余相抑制双菌生物膜的效果

Figure 4 The inhibition effect on the double-species biofilm of extraction phase and raffinate phase of *L. plantarum* CCFM8724 supernatant

注: A: 有机溶剂萃取相; B: 有机溶剂萃余相

Note: A: Organic solvent extraction phase; B: Organic solvent raffinate phase

LC-MS 检测的乙酸乙酯部位中,环肽类物质[亮氨酸-脯氨酸环肽 Cyclo(Leucyl-Prolyl)、苯丙氨酸-脯氨酸环肽 Cyclo(Phenylalanyl-Prolyl)]有较高的含量。其中,组成环二肽的苯丙氨酸(图 2F)在发酵液中也 GC-MS 检测到具有较高的含量。环二肽已被证明有群体感应激活或拮抗^[27]、抗菌^[28]、抗真菌^[29]、抗病毒^[30]、抑制毒素^[31]等多种生理功能。Li 等^[32]研究发现干酪乳杆菌 AST18 产生的 3 种环二肽和乳酸协同作用可以有效地抑

表 1 LC-MS 鉴定乙酸乙酯部位结果

Table 1 LC-MS identification results of ethyl acetate parts

名称 Compound name	分子式 Molecular formula	分子量 Molecular weight	物质含量(峰面积) Substance content (peak area)
Cyclo (leucyl-prolyl)	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	210.135 4	6.76E+09
3-(propan-2-yl)-octahydropyrrolo [1,2-a] pyrazine-1,4-dione	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₂	196.120 0	2.25E+09
Nicotinic acid	C ₆ H ₅ NO ₂	123.031 2	1.67E+09
D-(+)-pyroglutamic acid	C ₅ H ₇ NO ₃	129.041 7	1.29E+09
Cyclo (phenylalanyl-prolyl)	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂	244.119 5	7.36E+08
δ-valerolactam	C ₅ H ₉ NO	99.068 12	5.72E+08
L-phenylalanine	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165.077 7	5.51E+08
Methoxyacetyl fentanyl	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₂	352.221 4	4.34E+08
Bis (4-ethylbenzylidene) sorbitol	C ₂₄ H ₃₀ O ₆	414.203 2	3.75E+08
Palmitic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	273.264 7	3.47E+08
Sorbic acid	C ₆ H ₈ O ₂	112.051 8	2.94E+08
Kojic acid	C ₆ H ₆ O ₄	142.025 6	2.89E+08
3-(propan-2-yl)-octahydropyrrolo [1,2-a] pyrazine-1,4-dione	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₂	196.120 0	2.82E+08
L-norleucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.093 6	2.43E+08
3-(1-hydroxyethyl)-2,3,6,7,8,8a-hexahydropyrrolo [1,2-a] pyrazine-1,4-dione	C ₉ H ₁₄ N ₂ O ₃	198.098 9	2.4E+08
6-chloro-5-fluoro-1H-1,2,3-benzotriazole	C ₆ H ₃ ClFN ₃	170.998 2	2.17E+08
Trans-3-indoleacrylic acid	C ₁₁ H ₉ NO ₂	187.062 1	2.16E+08
11(Z),14(Z),17(Z)-eicosatrienoic acid	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	306.254 6	2.08E+08
5-hydroxymethyl-2-furaldehyde	C ₆ H ₆ O ₃	126.030 9	1.93E+08
L-phenylalanine	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165.077 7	1.75E+08
N-acetyltyramine	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	179.093 7	1.62E+08
3-(3-methylbut-2-en-1-yl)-3H-purin-6-amine	C ₁₀ H ₁₃ N ₅	203.116 3	1.58E+08
Trans-3-indoleacrylic acid	C ₁₁ H ₉ NO ₂	187.062 6	1.54E+08
L-norleucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.093 6	1.52E+08
DL-tryptophan	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	204.088 4	1.47E+08
Thymine	C ₅ H ₆ N ₂ O ₂	126.042 0	1.4E+08
DL-2-(acetyl amino)-3-phenylpropanoic acid	C ₁₁ H ₁₃ NO ₃	207.088 7	1.34E+08
2,3,4,9-tetrahydro-1H-β-carboline-3-carboxylic acid	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₂	216.089 1	1.34E+08
N-acetyl-L-leucine	C ₈ H ₁₅ NO ₃	173.104 4	1.21E+08
3-amino-2-phenyl-2H-pyrazolo [4,3-c] pyridine-4,6-diol	C ₁₂ H ₁₀ N ₄ O ₂	242.079 5	1.11E+08
Citral	C ₁₀ H ₁₆ O	152.119 2	1.04E+08
L-isoleucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.093 6	1.01E+08
Zearalenone	C ₁₈ H ₂₂ O ₅	300.132 7	96 530 493
Erucamide	C ₂₂ H ₄₃ NO	337.333 2	93 019 808
Cuminaldehyde	C ₁₀ H ₁₂ O	148.088 1	87 336 234
4-indolecarbaldehyde	C ₉ H ₇ NO	145.052 0	83 814 650
3-(propan-2-yl)-octahydropyrrolo [1,2-a] pyrazine-1,4-dione	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₂	196.120 0	82 947 443
4-hydroxybenzaldehyde	C ₇ H ₆ O ₂	122.036 3	76 605 388
L-tyrosine	C ₉ H ₁₁ NO ₃	181.072 8	75 039 309
Quinoline	C ₉ H ₇ N	129.057 5	73 628 673
Butyl 4-aminobenzoate	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	193.109 5	71 095 422
6,6-dimethyl-4-piperidino-5,6-dihydro-2H-thiine-2-thione	C ₁₂ H ₁₉ NS ₂	241.091 5	70 416 290
L-valine	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117.078 2	69 431 403
DL-arginine	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	174.110 4	64 710 006
DL-lysine	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	146.104 9	15 520 585

制真菌的生长,而且其抗真菌活性不会受到胃蛋白酶和胰蛋白酶的影响。Mashima 等^[33]研究发现韦荣球菌属产生的 Cyclo (L-Leu-L-Pro)环状二肽抑制了口腔中戈登链球菌生物膜的形成。丁婷等^[34]研究发现米曲霉来源的环二肽通过群体感应的抑制作用减少了荧光假单胞菌生物膜形成而不影响其生长。环二肽是自然界存在的最简单的小分子肽类,广泛存在于微生物的发酵液中,其对蛋白酶不敏感,这也与本实验结果吻合。因此,我们推测环肽类化合物可以通过调节群体感应进而抑制变异链球菌和白色念珠菌双菌生物膜形成。

3.3.6 差异代谢物抑制双菌生物膜活性

经鉴定乳酸菌发酵上清液中抑制双菌生物膜的有效成分主要为有机酸类、糖醇、环二肽等物质。本研究选取了 GC-MS 鉴定到的差异代谢物苯乳酸、乙酸、山梨糖醇和 LC-MS 鉴定到的含量丰富的代谢物环肽(脯氨酸-苯丙氨酸、脯氨酸-亮氨酸)、烟酸以及二者均鉴定到的代谢物苯丙氨酸进行了抑制双菌生物膜的实验,由图 5 可以看出,苯乳酸、

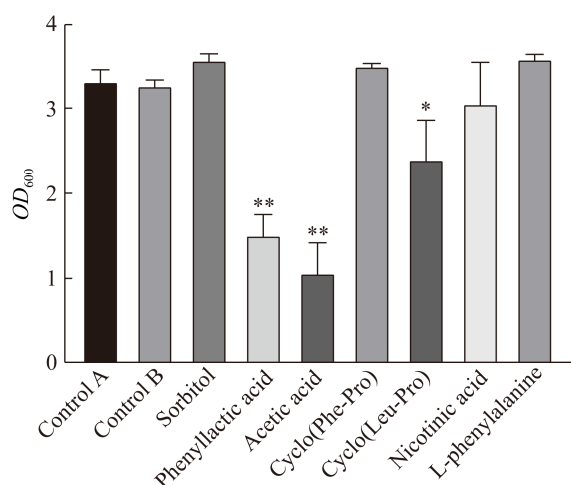


图 5 GC-MS 和 LC-MS 鉴定的部分差异代谢物抑制双菌生物膜活性结果

Figure 5 The inhibition effect on the double-species biofilm of partial differential metabolites identified by GC-MS and LC-MS

注: Control A: 以水为对照; Control B: 以甲醇为对照

Notes: Control A used water as the control group; Control B used methanol as the control group

乙酸对双菌生物膜具有极显著的抑制效果,而环肽(脯氨酸-亮氨酸)对双菌生物膜具有显著的抑制效果,但效果弱于有机酸,这也与先前文献报道的环肽(脯氨酸-亮氨酸)具有抑制口腔中戈登链球菌生物膜的结果相吻合^[33]。然而本研究中其余代谢物在单独作用于双菌生物膜时并未表现出明显的抑制作用,这可能是因为发酵液是一个混合体系,该物质需要在特定代谢物存在的环境中才能起作用,同时发酵液中也存在多种物质的协同增效作用,而不同物质之间的复配和协同增效机制仍值得进一步研究与探索。

4 结论

本研究对植物乳杆菌 CCFM8724 产生的抑制双菌生物膜的有效成分特性进行分析,其为具有热稳定性且非蛋白和过氧化氢类物质,同时具有较窄的 pH 耐受性,可能为一类有机酸或在酸性条件下起作用的小分子中等极性物质。进一步结合基于 GC-MS 的非靶向代谢组学的方法寻找发酵液与初始培养基的差异代谢物,发现主要是有机酸、糖醇和氨基酸类物质。之后采用超滤和有机溶剂提取的方法对发酵液进行初步分离,再结合 LC-MS 对得到的有效成分进行鉴定,初步确定环肽类化合物和有机酸的协同作用抑制了变异链球菌和白色念珠菌双菌生物膜的形成,而具体的环肽种类和量效关系有待后续研究。本研究为将来深入研究植物乳杆菌 CCFM8724 的抑菌作用机理及深入分析其在龋病预防等方面的应用提供了一定的理论参考。

REFERENCES

- [1] Chen K, Gao S, Duangthip D, Lo E, Chu C. Managing early childhood caries for young children in China[J]. Healthcare, 2018, 6(1): 11
- [2] Raja M, Hannan A, Ali K. Association of oral candidal carriage with dental caries in children[J]. Caries Research, 2010, 44(3): 272-276
- [3] Struzycka I. The oral microbiome in dental caries[J]. Polish Journal of Microbiology, 2014, 63(2): 127-135
- [4] Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, Scott-Anne K, Gregoire S, Pai CH, Gonzalez-Begne M, Watson G, Krysan

- DJ, Bowen WH, et al. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms *in vivo*[J]. *Infection and Immunity*, 2014, 82(5): 1968-1981
- [5] Qin SJ, Xu WQ, Zhang QX, Zhao JX, Zhang H, Chen W. Inhibitory effect of *Lactobacillus plantarum* CCFM8724 on caries-causing dual biofilms[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(13): 127-132 (in Chinese)
秦苏佳, 徐晚晴, 张秋香, 赵建新, 张灏, 陈卫. 植物乳杆菌 CCFM8724 对致龋双菌生物膜的抑制作用[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(13): 127-132
- [6] Zhang QX, Qin SJ, Xu XY, Zhao JX, Zhang H, Liu ZM, Chen W. Inhibitory effect of *Lactobacillus plantarum* CCFM8724 towards *Streptococcus mutans*- and *Candida albicans*-induced caries in rats[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 4345804
- [7] Wang CJ, Chang T, Yang H, Cui M. Antibacterial mechanism of lactic acid on physiological and morphological properties of *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*[J]. *Food Control*, 2015, 47: 231-236
- [8] Muench DF, Kuch DJ, Wu H, Begum AA, Veit SJ, Pelletier ME, Soler-Garcia AA, Jerse AE. Hydrogen peroxide-producing lactobacilli inhibit gonococci *in vitro* but not during experimental genital tract infection[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2009, 199(9): 1369-1378
- [9] Zou J, Jiang H, Cheng H, Fang JH, Huang GR. Strategies for screening, purification and characterization of bacteriocins[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 117: 781-789
- [10] Bulgasem BBY, Hassan Z, Huda-Faujan N, Ali RRH, Lani MMN, Alshelmani MMI. Effect of pH, heat treatment and enzymes on the antifungal activity of lactic acid bacteria against *Candida* species[J]. *Malaysian Journal of Microbiology*, 2017, 13(3): 195-202
- [11] Xu WQ, Zhang QX, Zheng YY, Zhao JX, Ma FL. Screening of *Lactobacilli* for treating periodontitis and evaluation of oral probiotic properties[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021. DOI: <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.025948> (in Chinese)
徐晚晴, 张秋香, 郑彦懿, 赵建新, 马方励. 治疗牙周炎的乳杆菌筛选及口腔益生特性评价[J]. *食品与发酵工业*, 2021. DOI: <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.025948>
- [12] Wu HZ, Bao ZN, Lin WF. Antimicrobial characteristics of *Lactobacillus reuteri* fermentation liquid and properties of its antimicrobial substances[J]. *Food Science and Technology*, 2019, 44(10): 8-13 (in Chinese)
吴惠贞, 鲍志宁, 林伟锋. 罗伊氏乳杆菌发酵液的抑菌特性与抑菌成分性质初探[J]. *食品科技*, 2019, 44(10): 8-13
- [13] Lu CB, Mao Y, Li GH, Zhao YY, Deng Y. Analysis and identification of main antibacterial metabolites secreted by *Lactobacillus plantarum* DY6[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(9): 2258-2271 (in Chinese)
陆春波, 毛银, 李国辉, 赵运英, 邓禹. 植物乳杆菌 DY6 主要抑菌代谢物的分析和鉴定[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(9): 2258-2271
- [14] Hu C, Pang XY, Lv JP, Liu Q, Lu J, Zhang SW, Yi SN, Hao LY, Xu XX, Leng YB. Screening of a *Lactobacillus rhamnosus* strain against *Fusarium Verticillium* and its application in maize[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(24): 87-93 (in Chinese)
胡诚, 逢晓阳, 吕加平, 刘骞, 芦晶, 张书文, 依胜男, 郝莉雨, 许晓曦, 冷友斌. 一株抑制轮枝镰孢菌的鼠李糖乳杆菌的筛选及其在玉米防霉中应用[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(24): 87-93
- [15] Lu HQ, Chen HQ, Tang X, Yang Q, Zhang H, Chen YQ, Chen W. Evaluation of metabolome sample preparation and extraction methodologies for oleaginous filamentous fungi *Mortierella alpina*[J]. *Metabolomics*, 2019, 15(4): 1-10
- [16] Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, Zelena E, Francis-McIntyre S, Anderson N, Brown M, Knowles JD, Halsall A, Haselden JN, et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry[J]. *Nature Protocols*, 2011, 6(7): 1060-1083
- [17] Liu XL. Isolation and identification of endophytic fungi from *Ginkgo biloba* and study on antimicrobial and antioxidant activity[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2007 (in Chinese)
刘小莉. 银杏内生真菌分离鉴定及其抗菌抗氧化作用研究[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2007
- [18] Hu C. Screening of *Lactobacillus* against *Fusarium Verticillium* and study on its antibacterial properties[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2020 (in Chinese)
胡诚. 抑制轮枝镰孢菌乳酸菌的筛选及其抑菌特性研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2020
- [19] Gao P. Isolation and identification of lab strains with a broad-spectrum antibacterial activity and extraction purification and identification of the bacteriocin[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2016 (in Chinese)
高鹏. 广谱抗菌乳酸菌的分离鉴定及细菌素的提取、纯化及结构鉴定[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2016
- [20] Sadiq FA, Yan BW, Zhao JX, Zhang H, Chen W. Untargeted metabolomics reveals metabolic state of *Bifidobacterium bifidum* in the biofilm and planktonic states[J]. *LWT*, 2020, 118: 108772
- [21] Qiao RG, Jia Y, Zhang HX, Xie YH, Jin JH, Liu H, Jiang LS, Hao YL. Screening of oral pathogen inhibiting lactic

- acid bacteria and its antibacterial properties[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(11): 75-81 (in Chinese)
- 乔荣更, 贾宇, 张红星, 谢远红, 金君华, 刘慧, 蒋林树, 郝彦玲. 可抑制口腔致病菌的乳酸菌筛选及其抑菌特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(11): 75-81
- [22] Wang FT. Antibacterial and antibiofilm activity of phenyllactic acid against two food-borne spoilage bacteria[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2018 (in Chinese)
- 王凤婷. 苯乳酸对两株食源性腐败菌及其生物膜产生的抑制作用研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2018
- [23] Takahashi-Abbe S, Abbe K, Takahashi N, Tamazawa Y, Yamada T. Inhibitory effect of sorbitol on sugar metabolism of *Streptococcus mutans* in vitro and on acid production in dental plaque in vivo[J]. Oral Microbiology and Immunology, 2001, 16(2): 94-99
- [24] Chen CT. Isolation and screening of low temperature-resistant lactic acid bacteria and bacteriostasis of its metabolites[D]. Harbin: Master's Thesis of Harbin University of Commerce, 2019 (in Chinese)
- 陈翠婷. 耐低温乳酸菌分离筛选及其代谢产物抑菌性研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学硕士学位论文, 2019
- [25] Heleno SA, Ferreira ICFR, Esteves AP, Ćirić A, Glamočlija J, Martins A, Soković M, Queiroz MJRP. Antimicrobial and demelanizing activity of *Ganoderma lucidum* extract, p-hydroxybenzoic and cinnamic acids and their synthetic acetylated glucuronide methyl esters[J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 58: 95-100
- [26] Dou SW. The screening of potential antifungal in *Citrus* sour rot disease and structure-activity analysis[D]. Xiangtan: Master's Thesis of Xiangtan University, 2018 (in Chinese)
- 窦诗雯. 柑橘酸腐病潜在抑菌物质的筛选及构效分析[D]. 湘潭: 湘潭大学硕士学位论文, 2018
- [27] Yu XD, Li L, Sun SW, Chang AP, Dai XY, Li H, Wang YL, Zhu H. A cyclic dipeptide from marine fungus *Penicillium chrysogenum* DXY-1 exhibits anti-quorum sensing activity[J]. ACS Omega, 2021, 6(11): 7693-7700
- [28] Nishanth Kumar S, Nath VS, Pratap Chandran R, Nambisan B. Cyclic dipeptides from rhabditid entomopathogenic nematode-associated *Bacillus cereus* have antimicrobial activities[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 30(2): 439-449
- [29] Ström K, Sjögren J, Broberg A, Schnürer J. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(9): 4322-4327
- [30] Kwak MK, Liu R, Kwon JO, Kim MK, Kim AH, Kang SO. Cyclic dipeptides from lactic acid bacteria inhibit proliferation of the influenza A virus[J]. Journal of Microbiology, 2013, 51(6): 836-843
- [31] Yan PS, Song Y, Sakuno E, Nakajima H, Nakagawa H, Yabe K. Cyclo(L-leucyl-L-prolyl) produced by *Achromobacter xylosoxidans* inhibits aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(12): 7466-7473
- [32] Li HJ, Liu L, Zhang SW, Cui WM, Lv J. Identification of antifungal compounds produced by *Lactobacillus casei* AST18[J]. Current Microbiology, 2012, 65(2): 156-161
- [33] Mashima I, Miyakawa H, Scannapieco FA, Nakazawa F. Identification of an early stage biofilm inhibitor from *Veillonella tobetsuensis*[J]. Anaerobe, 2018, 52: 86-91
- [34] Ding T, Li Y. Inhibition on quorum sensing of *Pseudomonas fluorescens* by cyclic dipeptide isolated from *Aspergillus oryzae* and its mechanism[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2020, 18(2): 234-244 (in Chinese)
- 丁婷, 李勇. 米曲霉来源的环二肽对荧光假单胞菌群体感应的抑制及其机制[J]. 生物加工过程, 2020, 18(2): 234-244