

研究报告

基于气相色谱-飞行时间质谱联用技术分析枯草芽孢杆菌对
变异链球菌的抑制作用黄慧敏¹ 张小凤¹ 易根云¹ 吴生荣¹ 周建业² 李志强^{2*} 王静^{1*}

(1. 兰州大学口腔医学院 甘肃 兰州 730000)

(2. 西北民族大学甘肃省口腔疾病研究重点实验室 甘肃 兰州 730000)

摘要:【背景】龋病危害着人类健康, 变异链球菌(*Streptococcus mutans*)是公认的主要致龋菌。我们前期的研究从口腔中分离出一株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), 其能抑制 *S. mutans* 的生长, 但尚未明确其抑菌作用的组分。【目的】利用非靶向代谢组学技术检测分析 *B. subtilis* zh78 抑制 *S. mutans* 生长可能的小分子代谢物, 以评估其在龋病防治研究及应用中的前景。【方法】取 *B. subtilis* zh78 经生长 0 h、7 h、12 h、5 d 时的菌液, 利用牛津杯法将冷甲醇萃取后的代谢物对 *S. mutans* 进行抑菌实验; 采用气相色谱-飞行时间质谱联用技术(GC-TOF-MS)对代谢物进行检测; 利用主成分分析(Principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘判别分析(Orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)和皮尔森相关分析(Pearson correlation analysis)等方法进行数据分析。【结果】*B. subtilis* zh78 生长 5 d 时的代谢产物对 *S. mutans* 具有明显抑菌作用, 其代谢物中木糖醇、氨基酸类及有机酸类等 36 种物质与其对 *S. mutans* 的抑制作用显著相关。【结论】*B. subtilis* zh78 可能产生木糖醇、氨基酸类及有机酸类等可能促进 *B. subtilis* zh78 抑制 *S. mutans* 生长的小分子代谢产物, 具有一定的防龋应用研究前景。

关键词: 枯草芽孢杆菌, 代谢组学, 抑菌性, 差异代谢物

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31560159, C0309); Key Cultivation Projects of Central Colleges and Universities of Northwest Minzu University (31920170162); Fundamental Research Funds for the Central Universities (31920160051); Basic Research Innovation Group Project of Gansu Province (17JR5RA274)

***Corresponding authors:** E-mail: LI Zhi-Qiang: lizhiqiang6767@163.com; WANG Jing: lzukqwj@126.com

Received: November 17, 2017; **Accepted:** December 15, 2017; **Published online** (www.cnki.net): January 17, 2018

基金项目: 国家自然科学基金(31560159, C0309); 西北民族大学中央高校重点培育项目(31920170162); 中央高校基本科研业务费专项(31920160051); 甘肃省基础研究创新群体项目(17JR5RA274)

***通信作者:** E-mail: 李志强: lizhiqiang6767@163.com; 王静: lzukqwj@126.com

收稿日期: 2017-11-17; **接受日期:** 2017-12-15; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-01-17

Measurement of inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Streptococcus mutans* by gas-chromatography-time of flight-mass spectrometry

HUANG Hui-Min¹ ZHANG Xiao-Feng¹ YI Gen-Yun¹ WU Sheng-Rong¹
ZHOU Jian-Ye² LI Zhi-Qiang^{2*} WANG Jing^{1*}

(1. School of Stomatology, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China)

(2. Key Laboratory of Oral Diseases of Gansu Province, Northwest Minzu University, Lanzhou, Gansu 730000, China)

Abstract: [Background] Dental caries is harmful to human health. *Streptococcus mutans* is recognized as the main cariogenic bacteria. In our previous studies, we found the *Bacillus subtilis* (*Bacillus subtilis* zh78) isolated from oral cavity could inhibit the growth of *S. mutans*. However, its bacteriostatic components were still ambiguous. [Objective] This study aimed to (1): determine the possible small molecular metabolite of *B. subtilis* zh78 that may inhibit the growth of *S. mutans* by untargeted metabolomics approach; (2) evaluate the prospect of *B. subtilis* zh78 in caries prevention and treatment. [Methods] Firstly, we used the cold methanol to extract the metabolites in the bacteria solutions from the *B. subtilis* zh78 growth at 0 hour, 7 hours, 12 hours and 5 days respectively. Oxford cup method was used to test the antibacterial activity of the extracted metabolites against *S. mutans*. Then, gas-chromatography-time of flight-mass spectrometry (GC-TOF-MS) was utilized to metabolomics detection. Lastly, we used principal component analysis (PCA), orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) and Pearson correlation analysis to process the data. [Results] The metabolites at 5 days of *B. subtilis* zh78 showed the most obvious inhibitory effect on *S. mutans*. 36 kinds of substances, such as xylitol, amino acids and organic acids produced by *B. subtilis* zh78 were significantly related to its inhibitory effect on *S. mutans*. [Conclusion] The findings suggested that the *B. subtilis* zh78 could produce certain kinds of metabolites (e.g. xylitol, amino acids and organic acids) which might exert the antibacterial effects on *S. mutans*. The *B. subtilis* zh78 displayed its potential in oral probiotic application and the related studies.

Keywords: *Bacillus subtilis*, Metabolomics, Antibacterial activity, Differential metabolites

龋病是一种严重危害人类健康的感染性疾病, 变异链球菌(*Streptococcus mutans*)被认为是最主要的致龋菌, 在龋病的发生发展中具有始动作用^[1-3]。目前, 从口腔中寻找能够抑制 *S. mutans* 生长的天然菌株并开发其相关抑菌代谢产物, 是龋病防治研究的重要思路及方向之一。例如, 有研究从健康人群的口腔牙菌斑中分离出多株具有益生作用的乳杆菌, 能够抑制 *S. mutans* 的生长^[4-6]; 同时另有报道显示, 口腔中分离得到的血链球菌由于能产生 H₂O₂, 对 *S. mutans* 有一定的抑制作用^[7-9]。但是, 口腔中乳杆菌及血链球菌两者可能本身就有致龋作用^[10], 截至目前, 二者仍不能作为理想的防龋益生菌株。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是一种 G⁺兼性厌氧菌, 能产生多种功能性产物, 在植物学、食

品、医疗等领域被广泛地研发并利用^[11-13]。研究表明, *B. subtilis* 属于非致病菌, 其生长过程中能产生细菌素、枯草菌素、表面活性素等具有抑菌作用的物质, 这些物质能抑制多种肠道菌群, 具有较高的抑菌活性和较广的抑菌谱^[12,14], 因此其已被用作肠道的益生菌使用, 例如“妈咪爱”^[15]。目前, *B. subtilis* 虽在口腔中被检出^[16-18], 但其检出率较低, 在口腔生态环境中的作用尚不明确^[19], 而且未见其对 *S. mutans* 抑制作用的研究。在我们的前期研究中, 从健康人群口腔分离了一株 *B. subtilis* (并将其命名为 *B. subtilis* zh78), 其细菌培养液经过滤除菌后能抑制 *S. mutans* 生长, 但尚未探究其抑菌作用的代谢产物^[19]。

非靶向代谢组学是对生物体小分子(Molecular

weight, $M_w < 1\ 000$)进行定性和半定量分析的组学技术,可以实现对目标样本小分子代谢物的初步筛选^[20]。本研究拟利用该技术对前期发现的 *B. subtilis* zh78 进行检测,以分析 *B. subtilis* zh78 对 *S. mutans* 可能具有抑菌作用的代谢产物,为其在防龋益生方面的相关研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

S. mutans (ATCC 25157)购自北京大学口腔医学院, *B. subtilis* zh78 (CGMCC No. 9952)保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会,均由西北民族大学甘肃省口腔疾病研究重点实验室提供。

1.1.2 培养基

B. subtilis zh78 选择性培养基 T2 培养基(g/L): 葡萄糖 10.0, 大豆蛋白胨 10.0, 牛肉膏 5.0, 酵母提取物 2.0, 无菌去离子水 1 L, pH 7.0。 *S. mutans* 生长培养基 BHI 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 脱水小牛脑浸粉 12.5, 脱水牛心浸粉 5.0, 氯化钠 5.0, 葡萄糖 2.0, 磷酸氢二钠 2.5, 无菌去离子水 1 L, pH 7.4±0.2。固体培养基每升加入琼脂 20 g。

1.1.3 主要试剂和仪器

衍生化试剂为双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺 [Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide, BSTFA], 含有 1% (体积比) 三甲基氯硅烷 (Trimethyl chlorosilane, TMCS)。衍生化试剂购自 REGIS Technologies 有限公司。

GC 色谱仪, Agilent 公司; 质谱仪, LECO 公司; 气相色谱-飞行时间质谱联用仪配用的毛细管柱, J & W Scientific 公司。

1.2 抑菌实验

B. subtilis zh78 在 T2 培养基活化后, 挑取单克隆菌落转接至 T2 液体培养基培养, 分别选取其在生长 0 h [空白期, 设为 kb 期(组)]、7 h [指数期, 设为 zs 期(组)]、12 h [平台期, 设为 pt 期(组)]、5 d [消亡期, 设为 sw 期(组)]的生长菌液 4 °C、3 000 r/min 离心 5 min, 弃沉淀, 重复 3 次后 0.22 μm 滤器过滤。

向 *B. subtilis* zh78 生长各时期的上清液中按体积比(滤液/冷甲醇) 1:4 加入冷甲醇, 涡旋混匀后 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清置于无菌离心管中, 干燥得到萃取的代谢物。代谢物经无菌去离子水复溶后以牛津杯法进行 *S. mutans* 抑菌实验, 以无菌去离子水作为阴性对照, 每期产物设 6 个平行组, 十字交叉法测抑菌圈直径, 根据抑菌圈有无及大小判定其抑菌性。

1.3 代谢组学检测、分析

1.3.1 代谢物萃取及检测

取 *B. subtilis* zh78 生长 kb、zs、pt、sw 期的菌液, 4 °C、3 000 r/min 离心 5 min, 弃沉淀, 重复 3 次后 0.22 μm 滤器过滤, 得到 *B. subtilis* zh78 各生长期的上清液。取 *B. subtilis* zh78 各生长期的上清液 100 μL (kb、zs、pt、sw 每组各 6 例, 共计 24 例), 加入 0.4 mL 冷甲醇, 漩涡混匀, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 取 0.4 mL 上清经干燥、衍生化后, 进行气相色谱-飞行时间质谱联用 (GC-TOF-MS)检测。

1.3.2 数据分析

利用 LECO 公司的 Chroma TOF4.3X 软件和 LECO-Fiehn Rtx5 数据库对采集得到的谱图进行过滤噪音、解卷积、峰强度校正、峰定性和定量等分析。数据预处理后, 利用 SIMCA-P⁺ (V13.0)统计软件、R 语言包进行 PCA (Principal component analysis)、OPLS-DA (Orthogonal partial least squares discriminant analysis)及 Venn 等分析, 根据变量权重重要性排序 (Variable importance in projection, VIP>1), 结合 *t* 检验 ($P < 0.05$)寻找差异性表达代谢物; 采用皮尔森相关分析, 设 $r \geq 0.9$, $P < 0.05$ 为相关性化合物。

2 结果与分析

2.1 抑菌实验结果

牛津杯法抑菌实验结果显示: 在 *B. subtilis* zh78 的 kb、zs、pt、sw 各期冷甲醇萃取代谢产物抑菌实验 (*S. mutans*)中, sw 期代谢产物产生了明显的抑菌圈, 而 zs、pt 期代谢产物产生的抑菌圈不明显, kb 期和阴性对照组均未出现抑菌圈(图 1)。

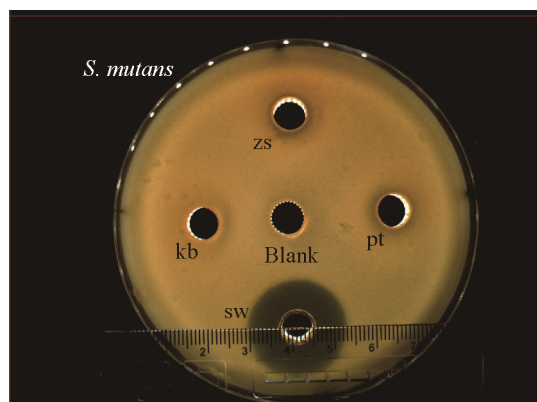


图1 *B. subtilis* zh78 各生长时期代谢产物对 *S. mutans* 的抑制作用

Figure 1 Inhibitory effect of metabolites of *B. subtilis* zh78 on *S. mutans* at different growth stages

注: kb: 空白期(组); zs: 指数期(组); pt: 平台期(组); sw: 消亡期(组). sw 期代谢物产生了明显的抑菌圈(平均直径为 14.2 mm); zs、pt 期代谢物产生的抑菌圈不明显. Blank 为阴性对照组, 周围没有出现抑菌圈; kb 组周围没有出现抑菌圈. Note: kb: Blank phase (group); zs: Exponential phase (group); pt: Plateau phase (group); sw: Extinction phase (group). The metabolite of sw phase produced an obvious inhibition zone (the average diameter of inhibition zone was 14.2 mm). The metabolite of zs and pt phases produced an unobvious inhibition zone. The negative control group (blank) and kb phase did not see an inhibition zone.

2.2 代谢组学检测、分析结果

2.2.1 主成分分析(PCA)

如图 2 所示, *B. subtilis* zh78 在 kb、zs、pt、sw 各期代谢产物的主成分分别位于不同象限(累积解释率 $R^2X=0.731$, $Q^2=0.647$), 各组样本基本上可以区分。

2.2.2 差异化合物筛选

OPLS-DA 组间差异分析结果显示, sw 组代谢产物与 kb、zs、pt 各组代谢产物分别具有明显的差异(图 3), kb、zs、pt 组分别与 sw 组对比分析, 模型的 R^2X 分别为 0.73、0.64、0.644, R^2Y 分别为 0.996、0.992、0.988, Q^2 分别为 0.987、0.973、0.939。

将 *B. subtilis* zh78 sw 期与生长各期的差异代谢物分别进行比对, 寻找 *B. subtilis* zh78 sw 期特异性差异代谢物, 结果显示其含有 97 种 sw 期的特异性代谢物, 如 Venn 图(图 4)显示。将抑菌圈直径与筛选出的 97 种差异化合物进行皮尔森相关性

分析, 根据 $r \geq 0.9$ 和 $P < 0.05$ 筛选出 36 种与抑菌圈直径显著正相关的代谢物(表 1)。

3 讨论

我们前期研究在人体正常口腔中分离获得的 *B. subtilis* zh78, 其生长菌液能明显地抑制 *S. mutans* 生长^[19]。本研究对其小分子代谢产物进行了非靶向性代谢组学初步筛查, 以明确其可能的抑菌组分。

对 *B. subtilis* zh78 在各生长周期的代谢产物用冷甲醇萃取后, 进行了 *S. mutans* 抑菌实验, 发现 sw 期的代谢产物对 *S. mutans* 能够产生显著的抑制作用, 其抑菌圈直径达到 14.2 mm。该结果表明 *B. subtilis* zh78 的抑菌性代谢产物可由甲醇萃取得到, 在后续利用代谢组学的方法, 从其甲醇提取物中寻找抑菌物质是可行的。对 *B. subtilis* zh78 各期的代谢产物进行了 PCA 分析, 结果显示其在 kb、zs、pt、sw 各期代谢产物具有明显差异。结合抑菌实验结果, 推测 *B. subtilis* zh78 的抑菌物质主要在

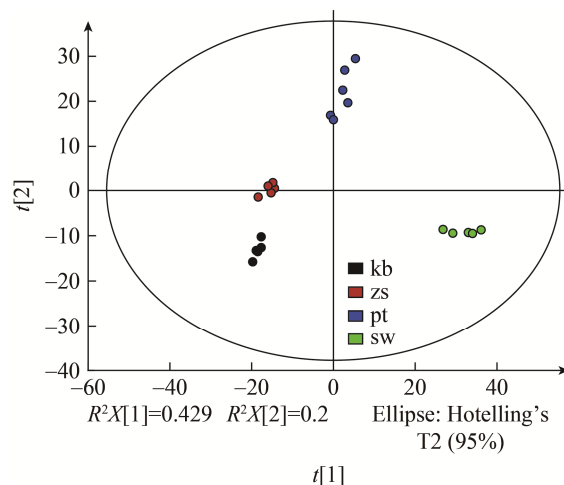


图2 24 例 *B. subtilis* zh78 样本的 PCA 得分图

Figure 2 PCA scores plot of 24 samples of *B. subtilis* zh78

注: 样本都处于 95% 置信区间内, 各组样本基本上可以分开; kb 为空白期(组), 黑色; zs 为指数期(组), 红色; pt 为平台期(组), 蓝色; sw 为消亡期(组), 绿色, 下同。

Note: All samples are within 95% confidence intervals, samples of each group can be basically distinguished; kb refers to blank phase (group), black; zs refers to exponential phase (group), red; pt refers to plateau phase (group), blue; sw refers to extinction phase (group), green. The same below.

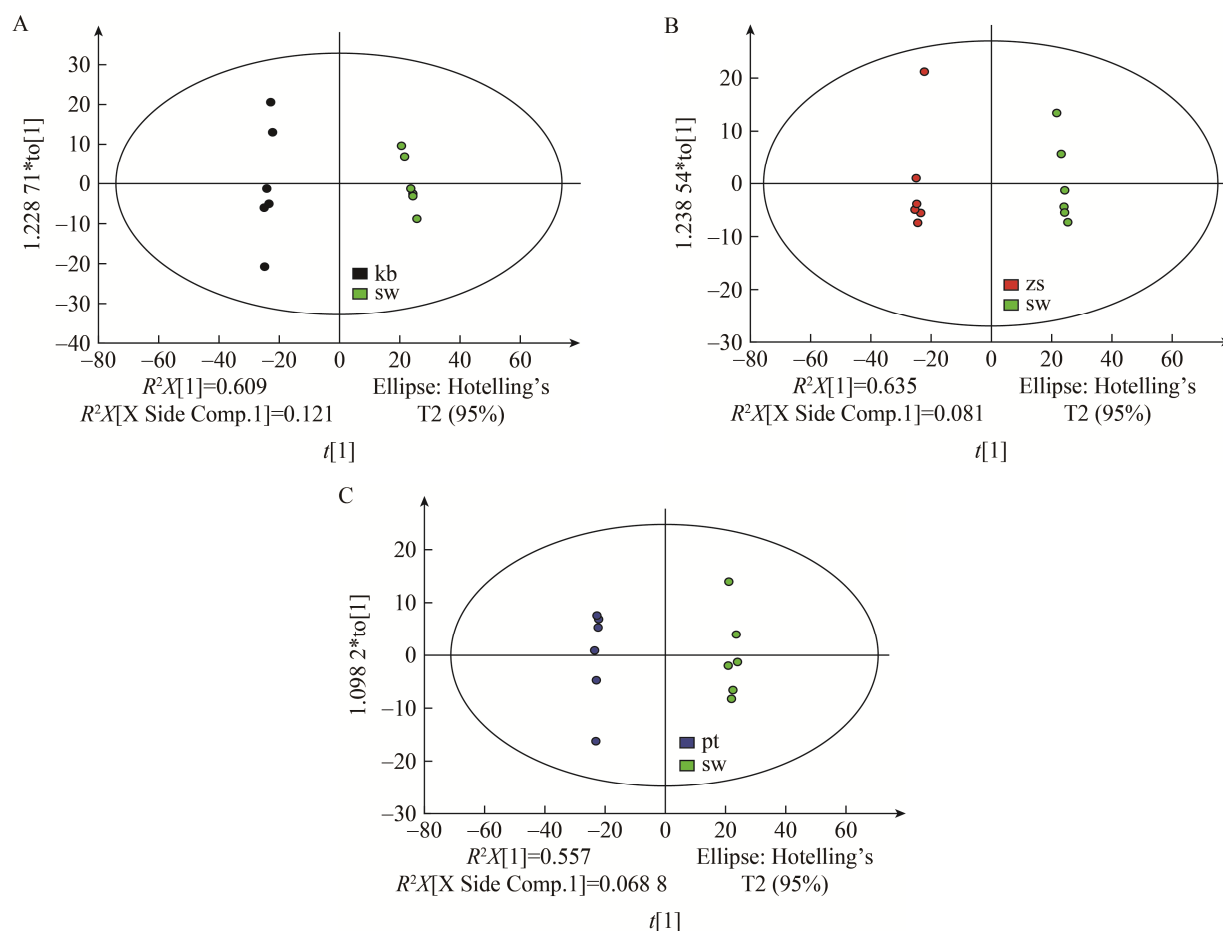


图3 *B. subtilis* zh78 各对比组间的 OPLS-DA 得分图

Figure 3 OPLS-DA (Orthogonal partial least squares discriminant analysis) scores plot obtained from each comparative group of *B. subtilis* zh78

注: sw 组代谢物与 kb、zs、pt 各组代谢物均有明显差异。A: sw 组 vs kb 组; B: sw 组 vs zs 组; C: sw 组 vs pt 组。

Note: The metabolites of sw group were significantly different from those of kb group, zs group, pt group. A: sw group vs kb group; B: sw group vs zs group; C: sw group vs pt group.

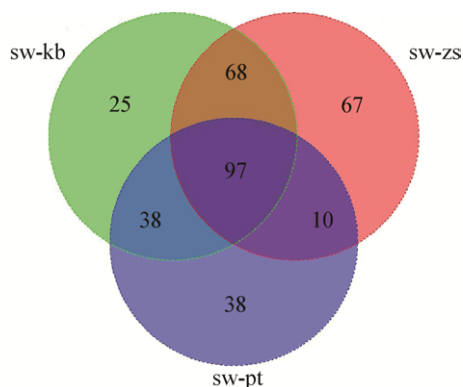


图4 差异代谢物 Venn 图

Figure 4 Venn map of differential metabolites

注: 与 kb、zs、pt 组相比, sw 组含有 97 种特异性代谢物。

Note: The sw group contains 97 specific metabolites compared with kb group, zs group and pt phase.

sw 期产生。根据 OPLS-DA 组间差异分析,并结合差异化合物和抑菌圈的皮尔森相关性分析,结果显示,该菌在 sw 期能产生与抑制 *S. mutans* 生长显著相关的小分子代谢产物约 36 种,提示该 36 种物质均有可能在抑制 *S. mutans* 生长中发挥作用。对该 36 种物质进行了文献查证,结果显示,其中木糖醇、L-谷氨酸、L-酪氨酸是已报道的对 *S. mutans* 具有抑制作用的物质。苯乙酸、羟基乙酸、L-苹果酸、D-塔格糖等化合物的抑菌防龋性能在文献中有不同的报道,而其他物质是否参与到抑菌实验当中则有待于在后续的研究中进行进一步研究(表 1)。

表 1 与抑菌圈直径显著相关的代谢物

Table 1 Metabolites significantly related to inhibitory zone diameter

| No. | Name | <i>r</i> | <i>P</i> | Similarity | VIP value | | | FC | | |
|-----|---|----------|----------|------------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | | | | sw/kb | sw/zs | sw/pt | sw/kb | sw/zs | sw/pt |
| 1 | 木糖醇 Xylitol | 0.900 | 0.031 | 812 | 1.27 | 1.18 | 1.27 | 4.61 | 3.75 | 2.50 |
| 2 | L-谷氨酸 L-glutamic acid | 0.990 | 0.003 | 435 | 1.03 | 1.12 | 1.03 | 1.76 | 3.61 | 1.43 |
| 3 | L-酪氨酸 L-tyrosine | 0.982 | 0.006 | 759 | 1.28 | 1.05 | 1.18 | 7.09 | 1.95 | 7.23 |
| 4 | 苯乙酸 Phenylacetic acid | 0.996 | 0.001 | 868 | 1.27 | 1.24 | 1.33 | 25.76 | 26.32 | 21.94 |
| 5 | 羟基乙酸 Glycolic acid | 0.990 | 0.003 | 805 | 1.27 | 1.14 | 1.33 | 3.43 | 2.17 | 2.03 |
| 6 | 丁醛 Butyraldehyde | 0.990 | 0.003 | 469 | 1.26 | 1.24 | 1.32 | 24.78 | 24.68 | 24.22 |
| 7 | D-塔格糖 D-tagatose 2 | 0.990 | 0.003 | 309 | 1.28 | 1.36 | 1.51 | 31.49 | 7.90 | 2.70 |
| 8 | L-苹果酸 L-malic acid | 0.990 | 0.003 | 471 | 1.16 | 1.23 | 1.42 | 21.57 | 2.28 | 2.54 |
| 9 | 亚精胺 Spermidine | 0.996 | 0.001 | 886 | 1.28 | 1.14 | 1.57 | 26.57 | 26.01 | 19.36 |
| 10 | 黄嘌呤 Xanthine | 0.995 | 0.002 | 825 | 1.27 | 1.30 | 1.17 | 8.68 | 9.56 | 4.83 |
| 11 | 乳酰氨 Lactamide 2 | 0.993 | 0.002 | 493 | 1.19 | 1.13 | 1.16 | 27.55 | 16.09 | 14.38 |
| 12 | 马来酰胺酸 Maleamate 4 | 0.990 | 0.003 | 704 | 1.22 | 1.19 | 1.01 | 6.90 | 2.50 | 1.33 |
| 13 | 戊二酸 Glutaric acid | 0.990 | 0.003 | 762 | 1.09 | 1.22 | 1.07 | 4.18 | 15.68 | 3.10 |
| 14 | 葡萄糖二酸 Saccharic acid | 0.990 | 0.003 | 952 | 1.27 | 1.25 | 1.24 | 4.36 | 3.83 | 1.52 |
| 15 | 亚麻酸 Linolenic acid | 0.990 | 0.003 | 468 | 1.28 | 1.25 | 1.33 | 24.33 | 24.90 | 24.80 |
| 16 | 蜡酸 Cerotinic acid | 0.990 | 0.003 | 262 | 1.27 | 1.24 | 1.32 | 21.11 | 21.67 | 21.57 |
| 17 | 胸腺脱氧嘧啶核苷 Thymidine 3 | 0.990 | 0.003 | 220 | 1.27 | 1.21 | 1.32 | 20.37 | 20.14 | 20.83 |
| 18 | 天冬酰胺 Asparagine 3 | 0.990 | 0.002 | 944 | 1.24 | 1.21 | 1.15 | 28.51 | 29.08 | 22.90 |
| 19 | 谷氨酰胺 Glutamine 2 | 0.990 | 0.003 | 296 | 1.35 | 1.04 | 1.29 | 7.17 | 9.46 | 3.26 |
| 20 | 胞苷 Cytidine 2 | 0.987 | 0.003 | 543 | 1.28 | 1.25 | 1.34 | 22.35 | 22.92 | 22.81 |
| 21 | L-异亮氨酸 L-isoleucine | 0.990 | 0.003 | 775 | 1.10 | 1.06 | 1.32 | 5.85 | 3.46 | 5.12 |
| 22 | L-正亮氨酸 L-norleucine 1 | 0.989 | 0.003 | 442 | 1.25 | 1.22 | 1.30 | 22.41 | 22.98 | 22.88 |
| 23 | 乳糖醛酸 Digalacturonic acid | 0.990 | 0.003 | 646 | 1.28 | 1.26 | 1.34 | 23.71 | 24.35 | 24.25 |
| 24 | 草酰乙酸 Oxalacetic acid | 0.985 | 0.003 | 499 | 1.28 | 1.25 | 1.33 | 23.75 | 24.32 | 24.22 |
| 25 | 薄荷缩酮 Menthone 1 | 0.990 | 0.003 | 305 | 1.53 | 1.18 | 1.46 | 21.12 | 21.29 | 21.58 |
| 26 | 甘油醚 Diglycerol 1 | 0.990 | 0.003 | 520 | 1.06 | 1.10 | 1.32 | 26.38 | 23.24 | 22.27 |
| 27 | 肌酸 Creatine degr | 0.990 | 0.003 | 227 | 1.26 | 1.24 | 1.32 | 21.67 | 22.24 | 22.14 |
| 28 | 松果体素 Melatonin 3 | 0.989 | 0.003 | 237 | 1.33 | 1.25 | 1.28 | 25.66 | 26.22 | 26.12 |
| 29 | 甲基丙二酸 Methylmalonic acid | 0.989 | 0.003 | 938 | 1.23 | 1.24 | 1.11 | 1.62 | 2.37 | 1.58 |
| 30 | D-赤酮酸内酯 D-erythrulactone 2 | 0.988 | 0.004 | 587 | 1.24 | 1.26 | 1.23 | 1.42 | 2.08 | 1.48 |
| 31 | α -氨基己二酸 Alpha-aminoadipic acid | 0.990 | 0.004 | 236 | 1.26 | 1.24 | 1.32 | 23.61 | 24.20 | 24.09 |
| 32 | N-乙酰-D-甘露糖胺 N-acetyl-beta-D-mannosamine 3 | 0.990 | 0.003 | 789 | 1.27 | 1.25 | 1.33 | 39.05 | 45.35 | 46.82 |
| 33 | N ϵ -乙酰左旋赖氨酸 N-epsilon-acetyl-L-lysine 2 | 0.990 | 0.003 | 702 | 1.25 | 1.22 | 1.31 | 29.38 | 29.94 | 29.83 |

(待续)

(续表 1)

| | | | | | | | | | | |
|----|------------------------------------|-------|-------|-----|------|------|------|-------|-------|-------|
| 34 | 氨基葡萄糖酸 Glucosaminic acid | 0.990 | 0.003 | 331 | 1.27 | 1.23 | 1.33 | 23.40 | 26.42 | 22.75 |
| 35 | 苯甲酰甲酸 Benzoylformic acid 2 | 0.990 | 0.003 | 264 | 1.25 | 1.22 | 1.31 | 26.10 | 26.67 | 26.56 |
| 36 | L-羟脯氨酸 Trans-4-hydroxy-L-proline 2 | 0.990 | 0.003 | 839 | 1.17 | 1.15 | 1.22 | 26.27 | 26.84 | 26.73 |

注: r 为相关系数, r 越接近于 1, 代表相关性越高; P 为相关系数的假设检验, $P \leq 0.05$, 表明相关关系具有统计学意义; Similarity 为代谢物与标准库中物质的匹配程度, 满分为 1 000, 越接近 1 000 说明定性出的物质越准确; VIP 值为代谢物引起两组之间差异所占的权重, $VIP > 1$ 是选择差异代谢物的标准; FC 值为代谢物在两组中的峰面积比值, $FC > 1$, 代表该物质含量 sw 组高于 kb 组(或 sw 组高于 zs 组, sw 组高于 pt)。代谢物后面的数字表示代谢物经衍生化后所带的衍生化基团的个数, “代谢物+衍生化基团的数目”即表示该代谢物。

Notes: r refers to the correlation coefficient, the closer to 1, the higher the correlation is; P refers to the hypothesis test value of correlation coefficient, $P \leq 0.05$, showing the correlation is statistically significant; Similarity refers to the matching degree between metabolites and substance in standard library, the total value of which is 1 000, and the closer to 1 000, the more accurate the substance is; VIP refers to the variable importance in the projection value, VIP value greater than 1 is the criteria for selecting different metabolites; FC refers to the peak area ratio of metabolites between the two groups. $FC > 1$, representing the level of the tested component in sw phase is higher than that in kb phase (or that in sw phase higher than that in zs phase, or that in sw phase higher than pt phase). The number behind the metabolite represents the number of derivatization groups of the metabolite after derivatized. The form that metabolites+number of derivatization groups represents the metabolite.

木糖醇(Xylitol)是一种已明确具有防龋作用的物质, 已被广泛应用于口香糖、糖果、糕点等食品中用以防龋^[21]。文献报道, 木糖醇对 *S. mutans* 具有抑制作用^[22-23], 而且抑制 *S. mutans* 生长的相关机理较为明确: 木糖醇可经 *S. mutans* 的非特异性磷酸果糖转移酶系统进入 *S. mutans* 细胞内部, 再通过磷酸化代谢产物的堆积抑制其生长^[24]; 木糖醇可干扰 *S. mutans* 蛋白合成及热休克蛋白 70、60 的表达, 从而影响 *S. mutans* 的生长^[25]。结合本实验结果(不仅在 sw 组中明显升高, 且与抑菌圈直径的相关系数 $r=0.990$, $P=0.031$), 提示木糖醇可能是 *B. subtilis* zh78 所产生小分子代谢产物中一种抑制 *S. mutans* 效果明确的物质。同时, *B. subtilis* zh78 可能产生木糖醇这种具有典型防龋抑菌作用的物质, 提示其在后续的益生菌研发中具有重要的价值。另外, 有研究者将谷氨酸等 20 种游离氨基酸与变异链球菌共同培养后发现, D、L 型谷氨酸可以抑制变异链球菌的生长和生物膜的形成, D、L 型酪氨酸能延缓变异链球菌的生长^[26]。结合本实验结果中它们与 *S. mutans* 抑菌作用的相关性, 我们推测 *B. subtilis* zh78 可能产生 L-谷氨酸、L-酪氨酸 2 种对 *S. mutans* 可能具有一定抑菌活性的小分子物质。

在上述与抑制 *S. mutans* 生长相关的化合物

中, 另有 3 种(苯乙酸、羟基乙酸、L-苹果酸)具有广谱抗菌能力的有机酸。有研究证实, 有机酸由于能提高胞内渗透压、透化细菌外膜、抑制生物大分子合成、消耗营养等作用而具有杀菌作用^[27]。苯乙酸在医药工业中常用于青霉素的产生, 具有较强的杀菌作用^[28]; 同样地, L-苹果酸^[29]和羟基乙酸^[30]也被证实具有抑菌作用; 以上 3 种有机酸的 $r \geq 0.99$ 且 $P < 0.01$, 因此, *B. subtilis* zh78 的小分子代谢物中可能也含有该 3 种能广谱杀菌或抑菌的有机酸, 从而能起到抑制 *S. mutans* 生长的作用。

此外, 在与抑菌相关的物质中除了上述已报道具有抑菌作用的物质外, 我们还发现了一种稀有单糖——D-塔格糖。D-塔格糖是半乳糖的酮糖形式, 与木糖醇等多元醇类似, 在口腔中产酸量低, 也可以作为糖代用品在日常生活中使用, 起到能防止牙釉质脱矿及防龋作用^[31]。

非靶向代谢组学能全面、无偏倚地检测生物样本中的代谢物, 可以对样本中代谢物进行初步盲选, 寻找对比组别间的差异性代谢物。因此, 该技术能研究目的对象在小分子代谢物方面的组成情况, 全面筛查研究对象功能与代谢物之间的关系。然而, 非靶向代谢组学仅为半定量分析, 筛查到的代谢物尚不能通过其含量进行深入探讨, 并且同其他组学研究一样, 代谢组学存在一

定的误差, 因此需要同其他系统生物学研究方法相结合, 才可以获得在含量和功能方面更确定的研究结果。

4 结论

本研究对 *B. subtilis* zh78 进行了非靶向代谢组学检测及相关分析, 结果显示, 36 种小分子物质与其对 *S. mutans* 抑制作用显著正相关($r \geq 0.95$ 且 $P < 0.01$)的物质被检测到, 这些物质主要包括糖醇类、有机酸类和氨基酸类等。其对 *S. mutans* 生长的抑制作用在相关的研究中有不同的报道, 结合本研究结果, 初步推测 *B. subtilis* zh78 可能产生这 36 种代谢物, 这些代谢物在 *B. subtilis* zh78 对 *S. mutans* 的抑菌作用中可能具有一定促进作用, 这为将来深入研究 *B. subtilis* zh78 的抑菌作用机理, 及深入分析其在龋病预防和口腔益生应用等方面的前景提供了一定的理论参考。

REFERENCES

- [1] Bowen WH. Dental caries-not just holes in teeth! A perspective[J]. Molecular Oral Microbiology, 2016, 31(3): 228-233
- [2] Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms[J]. Caries Research, 2011, 45(1): 69-86
- [3] Svensäter G, Borgström M, Bowden GHW, et al. The acid-tolerant microbiota associated with plaque from initial caries and healthy tooth surfaces[J]. Caries Research, 2003, 37(6): 395-403
- [4] Yang J, Du GC, Chen J, et al. Characterization of a probiotic *Lactobacillus* strain isolated from oral cavity[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(4): 403-408 (in Chinese)
杨娟, 堵国成, 陈坚, 等. 口腔乳酸杆菌的分离及其益生特性[J]. 微生物学报, 2013, 53(4): 403-408
- [5] Samot J, Lebreton J, Badet C. Adherence capacities of oral *Lactobacilli* for potential probiotic purposes[J]. Anaerobe, 2011, 17(2): 69-72
- [6] Simark-Mattsson C, Emilson CG, Håkansson EG, et al. *Lactobacillus*-mediated interference of mutans streptococci in caries-free vs. caries-active subjects[J]. European Journal of Oral Sciences, 2007, 115(4): 308-314
- [7] Giacaman RA, Torres S, Gómez Y, et al. Correlation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* colonization and *ex vivo* hydrogen peroxide production in carious lesion-free and high caries adults[J]. Archives of Oral Biology, 2015, 60(1): 154-159
- [8] Fujishima K, Kawada-Matsuo M, Oogai Y, et al. *dpr* and *sod* in *Streptococcus mutans* are involved in coexistence with *S. sanguinis*, and *PerR* is associated with resistance to H_2O_2 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(5): 1436-1443
- [9] Zheng X, Zhang K, Zhou X, et al. Involvement of *gshAB* in the interspecies competition within oral biofilm[J]. Journal of Dental Research, 2013, 92(9): 819-824
- [10] Zhou XD. Cariology[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2011: 41 (in Chinese)
周学东. 龋病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 41
- [11] Barbosa TM, Serra CR, La Ragione RM, et al. Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(2): 968-978
- [12] Huang HY, Wang JL, Ma R, et al. Antifungal activities of *Bacillus subtilis* STO-12 and analysis on its antifungal substances[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2017, 29(1): 81-88 (in Chinese)
黄华毅, 王佳琳, 马荣, 等. 枯草芽孢杆菌 STO-12 抑菌活性及其抑菌物质分析[J]. 浙江农业学报, 2017, 29(1): 81-88
- [13] Kumar KVK, Yellareddygar SK, Reddy MS, et al. Efficacy of *Bacillus subtilis* MBI 600 against sheath blight caused by *Rhizoctonia solani* and on growth and yield of rice[J]. Rice Science, 2012, 19(1): 55-63
- [14] Poormontaseri M, Hosseinzadeh S, Shekarforoush SS, et al. The effects of probiotic *Bacillus subtilis* on the cytotoxicity of *Clostridium perfringens* type a in Caco-2 cell culture[J]. BMC Microbiology, 2017, 17: 150
- [15] Hu ZF, Xu L, Wang SW. The clinical efficacy of Xiaor kang granule combined with MAMIAI to 98 children with autumn Pediatric diarrhea[J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2017, 37(5): 176-178 (in Chinese)
胡泽富, 徐玲, 王思为. 小儿康颗粒联合妈咪爱治疗小儿秋季腹泻 98 例临床观察[J]. 中国生化药物杂志, 2017, 37(5): 176-178
- [16] Naidorf IJ. Clinical microbiology in endodontics[J]. Dental Clinics of North America, 1974, 18(2): 329-344
- [17] Sunde PT, Olsen I, Lind PO, et al. Extraradicular infection: a methodological study[J]. Dental Traumatology, 2000, 16(2): 84-90
- [18] Yamane K, Ogawa K, Yoshida M, et al. Identification and characterization of clinically isolated biofilm-forming gram-positive rods from teeth associated with persistent apical periodontitis[J]. Journal of Endodontics, 2009, 35(3): 347-352
- [19] You XL, Wang SG, Zeng S, et al. *In vitro* inhibitive activity of metabolites *Bacillus subtilis* isolated from oral cavity[J]. Journal of Oral Science Research, 2015, 31(10): 991-994,999 (in Chinese)
游祥磊, 王少果, 曾飒, 等. 口腔枯草芽孢杆菌代谢产物的抑菌活性研究[J]. 口腔医学研究, 2015, 31(10): 991-994,999
- [20] Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G. Metabolomics: the apogee of the omic trilogy[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2013, 13(4): 263-269

- [21] Lynch H, Milgrom P. Xylitol and dental caries: an overview for clinicians[J]. Journal of the California Dental Association, 2003, 31(3): 205-209
- [22] Söderling EM. Xylitol, mutans streptococci, and dental plaque[J]. Advances in Dental Research, 2009, 21(1): 74-78
- [23] Söderling EM, Hietala-Lenkki AM. Xylitol and erythritol decrease adherence of polysaccharide-producing oral *Streptococci*[J]. Current Microbiology, 2010, 60(1): 25-29
- [24] Reiner AM. Xylitol and D-arabitol toxicities due to derepressed fructose, galactitol, and sorbitol phosphotransferases of *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1977, 132(1): 166-173
- [25] Himech M, Mayrand D, Grenier D, et al. Xylitol disturbs protein synthesis, including the expression of HSP-70 and HSP-60, in *Streptococcus mutans*[J]. Molecular Oral Microbiology, 2000, 15(4): 249-257
- [26] Zhang LD, Ling JQ, Tong ZC. Effects of free amino acids on *Streptococcus mutans* proliferation and biofilm formation[J]. Chinese Journal of Conservative Dentistry, 2014, 24(6): 313-316 (in Chinese)
张罗丹, 凌均荣, 童忠春. 游离氨基酸对变异链球菌生长及生物膜形成的影响[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2014, 24(6): 313-316
- [27] Zhang J, Tian ZG, Wang JH, et al. Advances in antimicrobial molecular mechanism of organic acids[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2011, 42(3): 323-328 (in Chinese)
张军, 田子罡, 王建华, 等. 有机酸抑菌分子机理研究进展[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(3): 323-328
- [28] Madan SS, Wasewar KL. Removal of phenylacetic acid from aqueous streams[A]//Suresh S, Kumar A, Shukla A, et al. Biofuels and Bioenergy (BICE2016)[M]. Cham: Springer, 2017: 209-213
- [29] Eswaranandam S, Hettiarachchy NS, Johnson MG. Antimicrobial activity of citric, lactic, malic, or tartaric acids and Nisin-incorporated soy protein film against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella gaminara*[J]. Journal of Food Science, 2014, 69(3): FMS79-FMS84
- [30] Abels C, Kaszuba A, Michalak I, et al. A 10% glycolic acid containing oil-in-water emulsion improves mild acne: a randomized double-blind placebo-controlled trial[J]. Journal of Cosmetic Dermatology, 2011, 10(3): 202-209
- [31] Wong D. Sweetener determined safe in drugs, mouthwashes, and toothpastes[J]. Dentistry Today, 2000, 19(5): 32,34-35

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: (1) 本刊要求作者投稿时在正文前写上主要作者专业和研究背景的简介, 并指出自己的工作(已发表的文章)在综述中的体现, 同时请在稿件中用不同颜色标出来。(2) 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。