·基础研究·

人肠道微生物中抗菌活性菌株的筛选及其代谢产物研究△

李德利[1]，丁鹏敏[1]，刘双月[1]，杨秀伟[2]，王如峰[1*]
1. 北京中医药大学 生命科学学院，北京　102488；2. 北京大学 药学院，北京　100083

［摘要］　**目的：**从肠道菌群中筛选抗菌活性菌株，明确其抗菌活性物质，为认识肠道微生物之间的相互作用乃至与宿主健康的关系奠定基础。**方法：**对肠道混合菌群进行体外培养，以抗菌活性为指标筛选活性单菌株；采用生化鉴定法和 16S rDNA 鉴定法对菌株进行鉴定；通过活性追踪手段，运用各种色谱分离技术对菌株的代谢产物进行分离纯化，并利用光谱技术鉴定其结构；采用微量孔板法测定各化合物的最低抑菌浓度（MIC）。**结果：**筛选得到具有抗菌作用的普通变形杆菌 *Proteus vulgaris* HA-3151 菌株；从其发酵液中分离得到 13 个化合物：*D*-3-苯基乳酸、环（丙-苯丙）二肽、环（酪-酪）二肽、环（酪-亮）二肽、环（酪-异亮）二肽、丁香酸、黄豆黄苷、大豆苷、大豆苷元、染料木苷、5-甲氧基大豆苷元、3-甲氧基没食子酸和染料木黄酮；其中，*D*-3-苯基乳酸、大豆苷元、染料木苷、染料木黄酮以及环（丙-苯丙）二肽、环（酪-酪）二肽具有抑菌作用。**结论：**首次得到了有抗菌活性的普通变形杆菌 *Proteus vulgaris* 菌株并证明其可产生有机酸、黄酮和二肽类抗菌活性物质，这些物质有助于其形成定植优势，进而对人体健康产生各种影响。

［关键词］　肠道微生物；普通变形杆菌；代谢产物；抗菌活性
［中图分类号］　R915　　［文献标识码］　A　　［文章编号］　1673-4890（2020）01-0026-09
doi：10. 13313/j. issn. 1673-4890. 20190611004

Screening of An Antibacterial Strain from Human Intestinal Microbes and Investigation on Its Active Metabolites

LI De-li[1], DING Peng-min[1], LIU Shuang-yue[1], YANG Xiu-wei[2], WANG Ru-feng[1*]
1. *School of Life Sciences*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488, *China*;
2. *School of Pharmaceutical Sciences*, *Peking University*, *Beijing* 100083, *China*

［**Abstract**］　**Objective**: To screen antibacterial strain from human intestinal microbes and ascertain its antibacterial active substances, so as to lay a foundation for understanding the interaction between intestinal microorganisms and its relationship with host health. **Methods**: Intestinal microbiota was cultured *in vitro*, and the active strain was screened using antibacterial activity as an index. The strain was identified by biochemical test and 16S rDNA sequencing. The metabolites of the strain were isolated and purified through activity tracking using various chromatographic separation techniques, and their structures were identified on the basis of spectral analysis. The minimum inhibitory concentration (MIC) of each compound was determined by microplate method. **Results**: A strain named *Proteus vulgaris* HA-3151 with antibacterial activity was screened out, and 13 compounds including *D*-3-phenyllactic acid, cycle(Ala-Phe), cycle(Tyr-Tyr), cycle(Tyr-Leu), cycle(Tyr-Ile), syringic acid, glycitin, daidzin, daidzein, genistin, 5-methoxydaidzein, 3-methoxygallic acid, and genistein were isolated from its fermentation broth. Among them, 6 compounds including *D*-3-phenyllactic acid, cycle(Ala-Phe), cycle(Tyr-Tyr), daidzein, genistin, and genistein showed antibacterial activity. **Conclusion**: The *Proteus vulgaris* strain with antibacterial activity was obtained for the first time and it was proved to produce antibacterial active substances such as organic acids, flavonoids and dipeptides, and these substances may contribute to the colonization advantage and further affect human health.

［**Keywords**］　intestinal microbes; *Proteus vulgaris*; metabolites; antibacterial activity

△［基金项目］　国家重点研发计划（2018YFC1704500）
*［通信作者］　王如峰，教授，研究方向：中药化学；Tel：（010）84738646，E-mail：wangrufeng@ tsinghua. org. cn

肠道微生物是指一群生活在动物肠道内的微生物群落，其体系庞大，种类和数量繁多，在进化过程中一直维持着动态平衡。肠道微生物主要由厚壁菌门和拟杆菌门的种类组成，另有少量变形菌门、放线菌门、疣微菌门和梭杆菌门的种类[1]。肠道微生物动态平衡的维持是微生物之间、微生物与宿主之间相互作用的结果。已有研究表明，定植抗性是肠道内部维持稳态的关键[2]。作为不同的生物体系，微生物与微生物之间，以及微生物与人体之间的相互作用应该通过分泌和接受化学介质来实现。与高等生物一样，肠道微生物也存在初生代谢和次生代谢，其代谢产物分泌到肠道中会对周围的微生物产生影响，这应该是实现微生物定植抗性的关键因素。通过分泌这些代谢产物，特别是具有生物活性的代谢产物，某种肠道微生物影响其他微生物的生存和发展，使自身在生存竞争中处于有利地位，这些活性代谢产物被人体吸收后也应该对人体的健康产生影响。

有研究报道奇异变形杆菌 *Proteus mirabilis* 对病原菌如白色念珠菌 *Candida albicans* 和鳗弧菌 *Vibrio anguillarum* 具有较强抑制活性[3]，从而有助于其生存并对其宿主有一定的保护作用。奇异变形杆菌属于肠杆菌科的变形杆菌属(*Proteus*)，该属主要包括普通变形杆菌 *P. vulgaris*、奇异变形杆菌 *P. mirabilis*、彭氏变形杆菌 *P. penneri*、黏液变形杆菌 *P. myxofaciens*、豪氏变形杆菌 *P. huuseri* 和 3 个未命名的基因种[4]。变形杆菌是肠道内常见的条件致病菌，正常情况下与宿主共生，参与调节菌群稳定，只在菌群紊乱时才具有致病性。在海洋动物的肠道中分离出的普通变形杆菌、奇异变形杆菌和彭氏变形杆菌体现出益生菌特性，这主要与细菌素的产生及其对致病菌的拮抗作用有关[5]。

既然肠道微生物可能通过分泌化学物质对其周围的微生物和宿主产生影响，这些化学物质到底是什么？它们通过什么机制来实现？这些问题的答案可能是揭示肠道菌群与人体健康关系的金钥匙。因此，开展肠道微生物的代谢产物研究，对于阐明肠道微生物与人体疾病发生机制和药物作用机制相关性的物质基础具有重要意义。鉴于此，笔者以变形杆菌为例，开展了此类研究。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

粪便样品来源于健康成年志愿者。指示菌株为本实验室冻存菌株：金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*、奇异变形杆菌 *Proteus mirabilis*、肺炎克雷伯菌 *Klebsiella pneumoniae*、大肠埃希菌 *Escherichia coli*、肠炎沙门氏菌 *Salmonella enteritidis*。

DNA-marker、细菌 DNA 提取试剂盒、PCR 扩增试剂盒购自博迈德科技发展有限公司；成套变形杆菌生化鉴定管购自青岛海博生物技术有限公司；细菌通用引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成；培养基成分购自北京奥博星生物科技有限公司；化学试剂正丁醇、甲醇、乙酸乙酯、石油醚等购自北京化工厂；其他实验耗材如牛津杯、96 孔板、微孔滤膜等由北京兰博利德商贸有限公司提供。

1.2　仪器

MLS-3780 高压灭菌锅(日本 Sanyo 公司)；JB-CJ-1500 超净工作台(北京昌平长城空气净化设备有限公司)；EPOCH 全波长酶标仪(美国伯腾仪器有限公司)；PCR 反应扩增仪(加拿大 BBI 公司)；DK-8D 型稳压温流电泳仪(上海斯特分析仪器有限公司)；恒温振荡培养箱(北京东联哈尔仪器制造有限公司)。

1.3　培养基

营养肉汤培养基：牛肉膏 3.0 g，蛋白胨 10.0 g，NaCl 5.0 g，蒸馏水 1000 mL，调节 pH 至 7.2 ~ 7.4，121 ℃灭菌 25 min。

营养琼脂培养基：牛肉膏 3.0 g，蛋白胨 10.0 g，NaCl 5.0 g，琼脂 20.0 g，蒸馏水 1000 mL，调节 pH 至 7.2 ~ 7.4，121 ℃灭菌 25 min。

改良高氏一号培养基：可溶性淀粉 20.0 g，KNO_3 1.0 g，K_2HPO_4 0.5 g，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g，NaCl 0.5 g，$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g，琼脂 20.0 g，重铬酸钾 50.0 mg，蒸馏水 1000 mL，调节 pH 至 7.2 ~ 7.4，121 ℃灭菌 25 min。

发酵培养基：大豆蛋白胨 10.0 g，蛋白胨 2.0 g，葡萄糖 20.0 g，可溶性淀粉 5.0 g，酵母膏 2.0 g，NaCl 4.0 g，K_2HPO_4 0.5 g，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g，$CaCO_3$ 2.0 g，蒸馏水 1000 mL，调节 pH 至 7.2 ~ 7.4，121 ℃灭菌 25 min。

1.4　活性菌株分离

取志愿者粪便适量置于无菌 0.9% 氯化钠溶液中，150 $r \cdot min^{-1}$振荡 1 h，使粪便充分分散，静置，上清液即为混合菌液。采用梯度稀释法将混合菌液稀释至 10^{-4}、10^{-5}、10^{-6}、10^{-7}，分别吸取各梯度稀释液接种于改良高氏一号液体培养基中，37 ℃、150 $r \cdot min^{-1}$振荡培养 12 ~ 24 h，获得混合菌群。将所得混合菌群用稀释涂布法接种于营养琼脂培养基中，待菌落长成后，用接种环挑取优势单菌落，划线法接种于营养琼脂培养基中。将长成的菌落进一步纯化，得到单菌株。

1.5　活性菌株筛选

1.5.1　样品预处理　将纯化得到的单菌株用营养肉汤培养基培养活化且培养至稳定后，分别以 2% 的接种量接种于 5 mL 发酵培养基中，于 37 ℃、150 $r \cdot min^{-1}$摇床培养 3 ~ 7 d。吸取各单菌株发酵液，5000 $r \cdot min^{-1}$(离心半径为 6.60 cm)离心 10 min，取上清液，经 0.22 μm 无菌滤膜过滤后，于 4 ℃保存。

1.5.2　抗菌活性筛选　采用牛津杯法验证发酵液活性：指示菌(金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、奇异变形杆菌、肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌、肠炎沙门氏菌)菌液浓度分别调至 1.5×10^8 $CFU \cdot mL^{-1}$，吸取 100 μL 接种至固体培养基，表面放置牛津杯，管内加 150 μL 待测样品，以空白培养基为实验对照组，每组设置 3 个重复。平皿 37 ℃静置 8 ~ 16 h，通过观察牛津杯周围有无透明圈确定发酵液样品有无抗菌活性，用直尺测量透明圈的直径并记录，结果取平均值。

1.6　活性菌株分类鉴定

1.6.1　生理生化鉴定　参考文献[6]变形杆菌的鉴定方法，采用成套变形杆菌生化鉴定管进行鉴定。

1.6.2　16S rDNA 鉴定　用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌液 DNA，采用 35 μL 反应体系进行 16S rDNA 序列全长扩增，所用引物为细菌通用引物(27F：5′ AGAGT TTGAT CCTGG CTCAG 3′；1492R：5′ TACGG YTACC TTGTT ACGAC TT 3′)。反应体系：模板 3 μL，上下游引物各 1 μL，5 × fast Pfu Buffer 7 μL，2.5 $mol \cdot L^{-1}$ dNTP 3 μL，FastPfu DNA Polymerase 1 μL，ddH_2O 19 μL。反应条件：95 ℃预变性 2 min，95 ℃变性 1 min，51 ℃退火 15 s，72 ℃延伸 1 min，循环 35 次，72 ℃延伸 5 min，反应结束后于 4 ℃保存。

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳，观察凝胶成像系统的扩增效果并拍照，将扩增成功的 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行双向测序。测序结果与 GenBank 中已知的核酸序列比对，从中选取同源性较高的序列，再用 DNAMAN 软件比对，并用 MEGA 5.0 软件构建系统发育树。

1.7　活性物质提纯及结构鉴定

1.7.1　活性物质定位　取预处理后的发酵上清液和空白培养基，分别加至 3 kD 的超滤管中，以离心半径 6.60 cm、7000 $r \cdot min^{-1}$离心 25 min，取下层滤液即为除蛋白后样品和空白培养基。采用微量稀释法，测定添加不同体积的样品后对铜绿假单胞菌指示菌的生长抑制率。具体操作如下：用营养肉汤培养基将活化后的铜绿假单胞菌菌液调整浓度至 1.5×10^7 $CFU \cdot mL^{-1}$，取 96 孔板，分别加入 20、30、40、50、60 μL 待测样品，对照组加同量的空白培养基，再加入菌液 20 μL。用培养基补足体积至 200 μL，每组设置 4 个重复孔。将 96 孔板置于微量振荡器上振荡几分钟以充分混匀，37 ℃培养 8 ~ 12 h。培养结束后将孔板取出，用酶标仪测定各组在 600 nm 处的吸光度值(A)。将实验结果与相同条件下不除蛋白的发酵液和空白培养基的抑制率进行比较，分析发酵液去除蛋白前后抗菌活性的变化。按公式(1)计算抑制率。

$$抑制率 = \frac{A_{对照组} - A_{实验组}}{A_{对照组}} \times 100\% \qquad (1)$$

1.7.2　活性物质提取　采用有机溶剂萃取法提取发酵液中的活性物质，运用 **1.5.2** 中所述的牛津杯法比较不同极性溶剂(石油醚、乙酸乙酯、正丁醇)依次萃取和直接萃取得到的萃取相和萃余相活性，确定最佳提取溶剂。

1.7.3　活性物质纯化与结构鉴定　以铜绿假单胞菌为活性追踪指示菌，运用大孔树脂吸附柱色谱法、薄层色谱法、硅胶柱色谱法、凝胶柱色谱法和高效液相色谱法，对发酵液中的活性物质进行分离纯化。利用质谱技术、核磁共振技术对所得纯化合物进行结构鉴定。

1.8　化合物抗菌活性测试

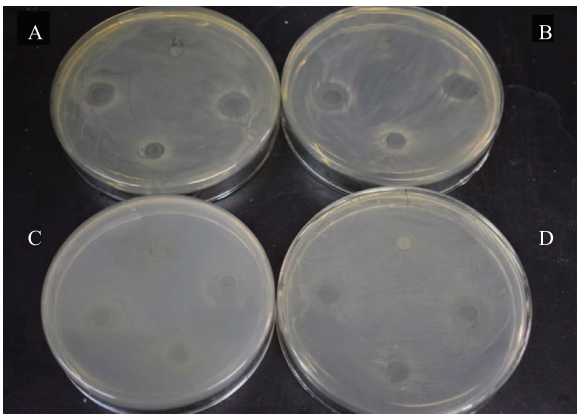
将各化合物用 DMSO 溶解后，加水稀释至适宜浓度，以铜绿假单胞菌为指示菌，采用微量稀释法测定化合物的最低抑菌浓度(MIC)，96 孔板内化合物的终质量浓度为 500、250、125、……0.98 $mg \cdot L^{-1}$，

DMSO 的终质量分数为 5%，以无菌生长的最低浓度为单体化合物的 MIC，实验重复 3 次。

2　结果与分析

2.1　活性菌株分离筛选

通过改良高氏一号培养基直接培养法缩减肠道微生物的种类，剔除了大部分对重铬酸钾敏感的肠道菌，最终从人源粪便中筛选得到 1 株具有广谱抗菌活性的菌株，编号为 HA-3151。该菌株发酵液能抑制金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的生长，在牛津杯周围能看见清晰的透明圈，对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径约为 15.9 mm（见图 1，A、B），对铜绿假单胞菌的抑菌圈直径约为 16.4 mm（见图 1，C、D）。此外对奇异变形杆菌、肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌、肠炎沙门氏菌的生长也有抑制作用，其抑菌圈直径大小见表 1。



注：A、B. 金黄色葡萄球菌；C、D. 铜绿假单胞菌。

图 1　菌株 HA-3151 发酵液的抑菌圈展示图

表 1　菌株 HA-3151 对指示菌的抑菌结果（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

指示菌株	菌种分类	抑菌直径/mm
金黄色葡萄球菌	革兰氏阳性菌	15.9 ± 0.10
铜绿假单胞菌	革兰氏阴性菌	16.4 ± 0.10
奇异变形杆菌	革兰氏阴性菌	15.3 ± 0.06
肺炎克雷伯菌	革兰氏阴性菌	15.7 ± 0.15
大肠埃希菌	革兰氏阴性菌	15.2 ± 0.06
肠炎沙门氏菌	革兰氏阴性菌	14.3 ± 0.12

2.2　活性菌株鉴定

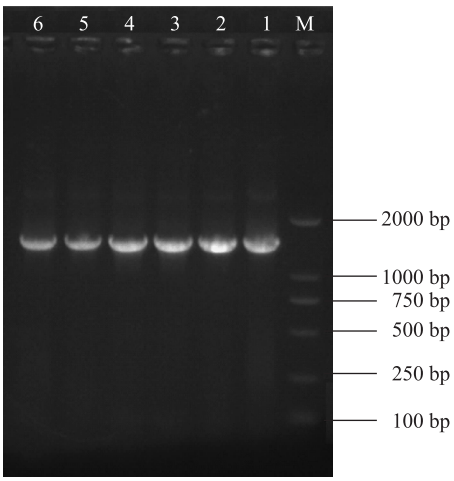
2.2.1　生理生化鉴定　结合菌落形态和革兰氏染色阴性结果，对菌株 HA-3151 的生理生化实验结果（表 2）进行分析，初步判定 HA-3151 为肠杆菌科变形杆菌属普通变形杆菌 *P. vulgaris*。

表 2　菌株 HA-3151 生理生化鉴定结果

生化指标	结果	生化指标	结果
葡萄糖	+	乳糖	+
产气	+	产酸	+
蔗糖	+	H_2S	+
苯丙氨酸酶	+	靛基质实验	+
西蒙氏枸橼酸盐	+	明胶	−
鸟氨酸脱羧酶	+	氨基酸脱羧酶	−
尿素酶	+	木糖	+
麦芽糖	+	脂酶	−
甘露醇	+	水杨苷	+
七叶苷水解	+		

注：+ 为阳性；− 为阴性。

2.2.2　16S rDNA 鉴定　PCR 产物的 1% 琼脂糖凝胶电泳成像结果见图 2，各样品在 1500 bp 左右有明亮单一条带，无杂带污染。测序后发现其 16S rDNA 序列全长为 1476 bp。



注：M. DNA Marker；1 ~ 6. PCR 产物。

图 2　PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图

通过与 GenBank 数据库的同源性比较，结果显示菌株 HA-3151 与变形杆菌属同源性最高。根据 Blast 比对结果，下载了有文献报道的变形杆菌属的代表菌株序列，采用 MEGA 5.0 软件进行 1000 次相似重复度计算，构建系统发育树见图 3。从图 3 可知，HA-3151 与普通变形杆菌 *P. vulgaris* 聚在同一分支，可信度值为 100。

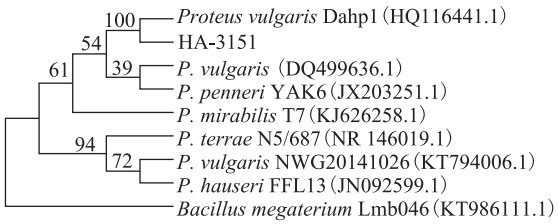


图 3　菌株 HA-3151 的系统发育树

2.3　活性物质提纯及结构鉴定

2.3.1　活性物质定位　超滤法除去蛋白质的发酵液与未除蛋白质的发酵液对铜绿假单胞菌生长的抑制率见图 4，两者差异无统计学意义。在加入体积为 60 μL(终体积为 200 μL)时，两者都完全抑制铜绿假单胞菌的生长。

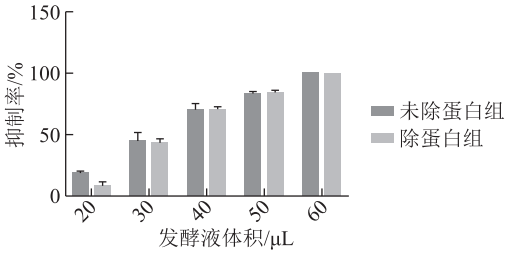


图 4　发酵液去除蛋白质前后抑菌活性对比

2.3.2　活性物质提取　发酵液经不同极性溶剂依次萃取和直接萃取后，各有机萃取相和萃余相的物质活性用牛津杯法进行检测，结果见表 3。直接用正丁醇萃取的正丁醇相的抑菌活性最好，且在萃余相中活性很弱，因此正丁醇是发酵液中活性物质萃取的最佳溶剂，并通过增加萃取次数来减弱萃余相中的活性物质残余，提高萃取得率。

2.3.3　活性物质纯化与结构鉴定　从变形杆菌 HA-3151 发酵液中分离得到了 13 个化合物，包括有机酸类 3 个(*D*-3-苯基乳酸、丁香酸、3-甲氧基没食子酸)，二肽类 4 个[环(丙-苯丙)二肽、环(酪-酪)二肽、环(酪-亮)二肽、环(酪-异亮)二肽]，黄酮类 6 个(黄豆黄苷、大豆苷、大豆苷元、染料木苷、5-甲氧基大豆苷元、染料木黄酮)。各化合物的结构式见图 5，鉴定结果如下：

D-3-苯基乳酸(*D*-3-phenyllactic acid)，白色结晶；[α] +19.80°；ESI-MS *m/z* 165.056 2[M-H]$^-$；^{1}H-NMR (400 MHz，DMSO-d_6)：δ 7.23 (m，5H，H-Phe)，4.13 (t，1H，*J* = 3.6 Hz，H-2)，2.95 (d，1H，*J* = 13.6 Hz，H-3a)，2.78 (dd，1H，*J* = 13.6，8.4 Hz，H-3b)；^{13}C-NMR(100 MHz，DMSO-d_6)：δ 40.33 (C-3)，71.25 (C-2)，126.29 (C-7)，128.15 (C-5，9)，129.58 (C-6，8)，138.35 (C-4)，175.34 (COOH)。以上数据与文献报道的 *D*-3-苯基乳酸数据一致[7-8]。

丁香酸(syringic acid)，无色结晶；ESI-MS *m/z* 197.046 3 [M-H]$^-$；^{1}H-NMR (400 MHz，MeOD-d_4)：δ 7.33 (s，2H，H-3，5)，3.88 (s，6H，2OCH_3)；^{13}C-NMR (100 MHz，MeOD-d_4)：δ 57.08 (OCH_3)，108.65 (C-3，5)，122.20 (C-4)，142.06 (C-2，6)，149.14 (C-1)，170.22 (COOH)。以上数据与文献报道的丁香酸数据一致[9]。

3-甲氧基没食子酸(3-methoxygallic acid)，白色结晶；^{1}H-NMR (400 MHz，DMSO-d_6)：δ 7.07 (s，1H，H-6)，7.02 (s，1H，H-4)，3.77 (s，3H，OCH_3)；^{13}C-NMR (100 MHz，DMSO-d_6)：δ 56.00 (OCH_3)，104.96 (C-6)，110.87 (C-4)，120.67 (C-5)，139.11 (C-2)，145.35 (C-3)，147.93 (C-1)，167.58 (COOH)。以上数据与文献报道的 3-甲氧基没食子酸数据一致[10]。

环(丙-苯丙)二肽[cyclo (L-Ala-L-Phe)]，无定形粉末；[α] +10.00°；^{1}H-NMR (400 MHz，MeOD-d_4)：δ 7.14-7.26 (m，5H，-Phe)，4.22 (s，1H，H-5)，3.42 (m，1H，H-3)，3.00 (d，1H，*J* = 14.0 Hz，H-8a)，2.64 (d，1H，*J* = 17.6 Hz，H-8b)，0.51 (d，3H，*J* = 6.4 Hz，CH_3)；^{13}C-NMR (100 MHz，MeOD-d_4)：δ 21.10 (C-7)，41.56 (C-6)，45.35 (C-8)，58.22 (C-3)，129.16 (C-4)，130.30 (C-11，13)，132.18 (C-10，14)，137.07 (C-9)，169.37 (C-5)，170.73 (C-2)。以上数据与文献报道的环(丙-苯丙)二肽数据一致[11]。

环(酪-酪)二肽[cyclo (L-Tyr-L-Tyr)]，无定形粉末；[α] +39.39°；ESI-MS *m/z* 327.135 5 [M + H]$^+$；^{1}H-NMR (400 MHz，DMSO-d_6)：δ 9.18 (s，2H，H-1)，7.74 (s，2H，OH)，6.83 (d，4H，*J* = 7.6 Hz，H-2′，2″，6′，6″)，6.66 (d，4H，*J* = 7.6 Hz，H-3′，3″，5′，5″)，3.84 (s，2H，H-3，

表 3　不同萃取方法活性对比($\bar{x} \pm s$，$n = 3$)

mm

萃取方法	对照组抑菌圈直径	萃取相抑菌圈直径			萃余相抑菌圈直径		
		石油醚	乙酸乙酯	正丁醇	石油醚	乙酸乙酯	正丁醇
直接萃取	—	—	19.0 ± 0.11	22.0 ± 0.10	16.0 ± 0.11	11.0 ± 0.10	< 10.0 ± 0.10
依次萃取	—	—	19.3 ± 0.10	10.3 ± 0.10	—	—	—

注：—表示无抑菌圈。

6)，2.52（dd，2H，J=13.6，6.0 Hz，H-7，7′a)，2.10（dd，2H，J=13.6，6.0 Hz，H-7，7′b)；^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO-d_6)：δ 38.8（C-7，7′)，56.22（C-3，6)，115.51（C-2′，2″，6′，6″)，127.03（C-4′，4″)，131.22（C-1′，1″)，156.55（C-3′，3″，5′，5″)，166.73（C-2，5)。以上数据与文献报道的环(酪-酪)二肽数据一致[12]。

环(酪-亮)二肽[cyclo（L-Tyr-L-Leu)]，无定形粉末；[α]+10.00°；^{1}H-NMR（400 MHz，MeOD-d_4)：δ 6.93（d，2H，J=8.4 Hz，H-13，17)，6.64（d，2H，J=8.4 Hz，H-14，16)，4.16（s，2H，H-1，4)，3.69（dd，1H，J=10.0，4.0 Hz，H-6)，3.13（dd，1H，J=14.0，4.8 Hz，H-11a)，2.76（dd，1H，J=14.0，4.8 Hz，H-11b)，1.37（m，1H，H-8)，0.82（m，3H，CH_3)；^{13}C-NMR（100 MHz，MeOD-d_4)：δ 21.67（C-10)，23.69（C-9)，24.98（C-8)，39.72（C-11)，45.55（C-7)，54.42（C-6)，57.93（C-3)，116.74（C-14)，127.33（C-12)，132.74（C-13)，133.07（C-17)，158.49（C-15)，169.44（C-2)，170.97（C-5)。以上数据与文献报道的环(酪-亮)二肽数据一致[13-14]。

环(酪-异亮)二肽[cyclo（L-Tyr-L-Ile)]，无定形粉末；[α]-32.56°；^{1}H-NMR（400 MHz，MeOD-d_4)：δ 6.93（d，2H，J=8.4 Hz，H-13，17)，6.69（d，2H，J=8.4 Hz，H-14，16)，4.26（s，2H，H-1，4)，3.70（dd，1H，J=4.4，1.6 Hz，H-6)，3.19（dd，1H，J=14.0，4.4 Hz，H-11a)，2.89（dd，1H，J=14.0，4.4 Hz，H-11b)，0.79～0.67（m，6H，CH_3)；^{13}C-NMR（100 MHz，MeOD-d_4)：δ 12.20（C-10)，15.66（C-9)，24.98（C-8)，39.20（C-11)，40.14（C-7)，57.70（C-5)，61.22（C-2)，116.59（C-14，16)，127.80（C-12)，132.93（C-13，15)，158.23（C-15)，169.64（C-2，5)。以上数据与文献报道的环(酪-异亮)二肽数据一致[15]。

黄豆黄苷(glycitin)，白色粉末；^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6)：δ 8.38（s，1H，H-2)，7.48（s，1H，H-5)，7.33（s，1H，H-8)，7.41（d，2H，J=7.6 Hz，H-2′，6′)，6.81（d，2H，J=7.6 Hz，H-3′，5′)，5.19（d，1H，J=4.0 Hz，H-1″)，3.46（m，1H，H-2″)，3.48（m，1H，H-3″)，3.16（m，1H，H-4″)，3.46（m，1H，H-5″)，5.18（d，1H，J=4.0 Hz，OH-1″)，5.14（d，1H，J=4.0 Hz，OH-2″)，5.41（d，1H，J=4.0 Hz，OH-3″)，5.08（d，1H，J=4.0 Hz，OH-4″)，4.64（m，1H，OH-6″)，3.88（s，3H，CH_3)，9.54（s，1H，OH-4′)；^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO-d_6)：δ 153.22（C-2)，123.31（C-3)，174.56（C-4)，104.91（C-5)，147.64（C-6)，151.72（C-7)，103.61（C-8)，151.40（C-9)，118.00（C-10)，122.77（C-1′)，130.25（C-2′)，115.16（C-3′)，157.37（C-4′)，115.16（C-5′)，130.2（C-6′)，99.79（C-1″)，73.20（C-2″)，76.94（C-3″)，69.76（C-4″)，77.39（C-5″)，60.81（C-6″)，56.01（OCH_3)。上述数据与文献报道的黄豆黄苷一致[16]。

大豆苷(daidzin)，白色粉末；^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6)：δ 9.55（s，1H，OH-4′)，8.39（s，1H，H-2)，8.05（d，1H，J=9.2 Hz，H-1)，7.41（d，2H，J=7.6 Hz，H-2′，6′)，7.23（s，1H，H-8)，7.14（d，1H，J=8.8 Hz，H-6)，6.81（d，2H，J=8.0 Hz，H-3′，5′)，5.18（d，1H，J=4.0 Hz，OH-1″)，5.14（d，1H，J=4.0 Hz，OH-2″)，5.41（d，1H，J=4.0 Hz，OH-3″)，5.08（d，1H，J=4.0 Hz，OH-4″)，4.64（m，1H，OH-6″)；^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO-d_6)：δ 60.82（C-6″)，69.80（C-4″)，73.31（C-2″)，76.66（C-3″)，77.39（C-5″)，100.16（C-8)，103.56（C-1″)，115.16（C-3′，5′)，115.76（C-6)，118.64（C-10)，122.49（C-1′)，123.88（C-3)，127.13（C-5)，130.26（C-2′，6′)，153.51（C-2)，157.21（C-4′)，157.44（C-9)，161.58（C-7)，174.92（C-4)。以上数据与文献报道的大豆苷数据[16]一致。

大豆苷元(daidzein)，白色粉末；^{1}H-NMR(400 MHz，DMSO-d_6)：δ 10.77（s，1H，OH-7)，9.53（s，1H，OH-4′)，8.27（s，1H，H-2)，7.95（d，1H，J=8.4 Hz，H-5)，7.37（d，2H，J=8.4 Hz，H-2′，6′)，6.92（d，1H，J=8.8 Hz，H-6)，6.85（s，1H，H-8)，6.80（d，2H，J=8.4 Hz，H-3′，5′)；^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO-d_6)：δ 102.57（C-8)，115.42（C-3′，5′)，115.59（C-6)，117.10（C-10)，123.01（C-3)，123.95（C-1′)，127.76（C-5)，130.54（C-2′，6′)，153.28（C-2)，157.64（C-4′)，157.90（C-9)，162.98（C-7)，175.16（C-4)。以上数据与文献报道的大豆苷元数据[16]一致。

染料木苷(genistin)，白色粉末；^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)：δ 12.93 (s, 1H, OH-5)，9.60 (s, 1H, OH-4′)，8.42 (s, 1H, H-2)，7.39 (d, 2H, J = 8.4 Hz, H-2′, 6′)，6.81 (d, 2H, J = 8.4 Hz, H-3′, 5′)，6.71 (s, 1H, H-8)，6.46 (s, 1H, H-6)，5.19 (d, 1H, J = 4.0 Hz, H-1″)，3.46 (m, 1H, H-2″)，3.48 (m, 1H, H-3″)，3.16 (m, 1H, H-4″)，3.46 (m, 1H, H-5″)，5.18 (d, 1H, J = 4.0 Hz, OH-1″)，5.14 (d, 1H, J = 4.0 Hz, OH-2″)，5.41 (d, 1H, J = 4.0 Hz, OH-3″)，5.08 (d, 1H, J = 4.0 Hz, OH-4″)，4.64 (m, 1H, OH-6″)；^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6)：δ 60.81 (C-6″)，69.77 (C-4″)，73.26 (C-2″)，76.59 (C-3″)，77.38 (C-5″)，94.71 (C-8)，99.76 (C-1″)，100.02 (C-6)，106.27 (C-10)，115.28 (C-3′, 5′)，121.18 (C-1′)，122.74 (C-3)，130.36 (C-2′, 6′)，154.79 (C-2)，157.41 (C-4′)，157.69 (C-9)，161.82 (C-5)，163.20 (C-7)，180.70 (C-4)。以上数据与文献报道的染料木苷数据[16]一致。

5-甲氧基大豆苷元(5-methoxydaidzein)，淡黄色粉末；^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)：δ 10.59 (s, 1H, OH-7)，9.52 (s, 1H, OH-4′)，8.29 (s, 1H, H-2)，7.44 (s, 1H, H-5)，7.39 (d, 2H, J = 8.4 Hz, H-2′, 6′)，6.95 (s, 1H, H-8)，6.81 (d, 2H, J = 8.4 Hz, H-3′, 5′)，3.89 (s, 3H, CH_3)；^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6)：δ 56.01 (OCH_3)，103.00 (C-8)，104.89 (C-6)，115.12 (C-3′, 5′)，115.13 (C-10)，122.96 (C-3)，123.13 (C-1′)，130.24 (C-2′, 6′)，147.11 (C-4′)，151.90 (C-7)，152.68 (C-9)，157.29 (C-5)，174.50 (C-4)。以上数据与文献报道的5-甲氧基大豆苷元数据一致[17]。

染料木黄酮(genistein)，白色粉末；^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)：δ 12.94 (s, 1H, OH-5)，9.57 (s, 1H, OH-4′)，8.31(s, 1H, H-2)，7.39

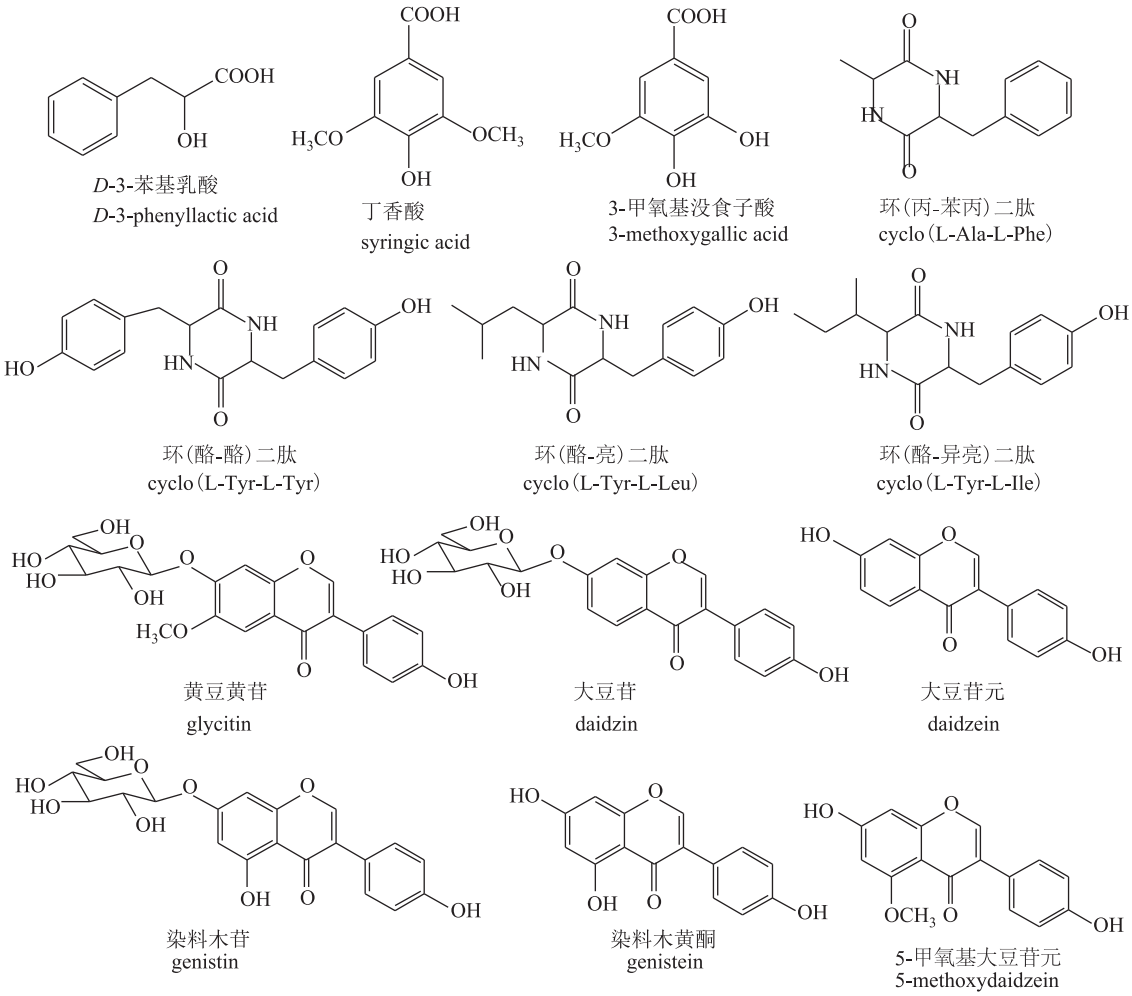


图 5　从普通变形杆菌 HA-3151 发酵液分离的化合物的结构式

(d, 2H, J = 8.4 Hz, H-2′, 6′), 6.81 (d, 2H, J = 8.4 Hz, H-3′, 5′), 6.37 (s, 1H, OH-8), 6.21 (s, 1H, OH-6); ^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6): δ 93.85 (C-8), 99.15 (C-6), 104.64 (C-10), 115.24 (C-3′, 5′), 121.39 (C-1′), 122.46 (C-3), 130.34 (C-2′, 6′), 154.17 (C-2), 157.60 (C-4′), 157.77 (C-9), 162.18 (C-5), 164.47 (C-5), 180.40 (C-4)。以上数据与文献报道的染料木黄酮数据[16]一致。

2.4　化合物抗菌活性研究

经微量稀释法测定各化合物对铜绿假单胞菌的 MIC 结果见表 4；其他化合物无抗菌活性。

表 4　单体化合物抗铜绿假单胞菌实验结果(n = 3)

编号	化合物名称	MIC/μg·mL^{-1}
H-001	环(丙-苯丙)二肽	>500
H-026	环(酪-酪)二肽	>500
H-004	*D*-3-苯基乳酸	250
H-012	大豆苷元	>500
H-013	染料木苷	>500
H-022	染料木黄酮	>500

3　结论与讨论

本研究从人源肠道菌群中得到 1 株能产生抗菌活性物质的普通变形杆菌 *Proteus vulgaris* 菌株，并从其培养液中分离纯化了一系列具有抗菌活性的有机酸、黄酮和二肽类化合物。这是普通变形杆菌代谢产物具有抗菌活性的首次报道，也是肠道菌通过分泌次生代谢产物产生定植优势进而影响人体的有力证据。

根据我们的实验结果，结合文献报道，分离得到的这些代谢产物普遍具有抗菌活性。3-苯基乳酸和丁香酸最早发现于蜂蜜中，是其最主要的抗菌物质[18]。3-苯基乳酸是天然存在的抗菌剂，对人和动物安全无毒，有望作为一种新型防腐剂运用于食品、医药及化妆品行业。目前报道 3-苯基乳酸主要由乳酸杆菌属菌株产生，它参与苯丙氨酸代谢途径。由于乳酸脱氢酶的种类不同，生成的苯基乳酸构型也不相同[19]，*D*-苯基乳酸的抗菌活性大于 *L*-苯基乳酸[20]，本研究中变形杆菌 HA-3151 所产生的苯基乳酸即为 *D* 型。丁香酸为常见的药用植物代谢产物，是白蒿的主要抗菌成分，对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌均有抑制作用[21-22]。本研究证明环(丙-苯丙)二肽、环(酪-酪)二肽具有抗菌活性，另有文献报道环(酪-亮)二肽对犬小孢菌有抑制作用(MIC 为 50 mg·L^{-1})[23]，环(酪-异亮)二肽对多种海洋细菌有抑制作用(MIC 为 200 mg·L^{-1})[24]。黄酮类化合物的抗菌活性多有报道，本研究中分离得到的大豆苷元、染料木苷和染料木黄酮经检测有抗菌作用，推测这些成分均为普通变形杆菌的抗菌活性组成成分。

本研究确认了普通变形杆菌通过分泌代谢产物对其他细菌的抑制作用，这证明肠道内确实存在微生物间相互制衡的物质基础。这些抗菌活性代谢产物被人体吸收后会进入血液循环，对人体其他部位的感染疾病起到干预作用。然而，抗菌活性物质只是肠道菌分泌的代谢产物的一部分，其他代谢产物包括活性物质和毒性物质也同样会对人体健康产生有利或不利影响。越来越多的研究证实，肠道菌群的紊乱与疾病的发生发展密切相关[25-27]，这是因为紊乱的菌群表现为有益菌减少，有害菌增多。我们认为，菌群的结构改变只是表象，而致病的根源应该归因于两者分泌的化学介质的差异。药物通过调节菌群的结构治疗疾病也应该是由于不同的菌群结构释放的化学介质不同而造成的。因此，开展不同种类的肠道菌的代谢产物研究，应该能为揭秘肠道菌群与人体健康的相关性问题提供科学依据。

参考文献

[1] ECKBURG P B, BIK E M, BERNSTEIN C N, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora [J]. Science, 2005, 308(5728): 1635-1638.

[2] WU X M, TAN R X. Interaction between gut microbiota and ethnomedicine constituents [J]. Nat Prod Rep, 2019, 36(5): 788-809.

[3] GRAÇA A P, VIANA F, BONDOSO J, et al. The antimicrobial activity of heterotrophic bacteria isolated from the marine sponge *Erylus deficiens* (Astrophorida, Geodiidae) [J]. Front Microbiol, 2015, 6: 389. doi: 10.3389/fmicb.2015.00389.

[4] O'HARA C M, BRENNER F W, STEIGERWALT A G, et al. Classification of *Proteus vulgaris* biogroup 3 with recognition of *Proteus hauseri sp.* nov., nom. rev. and unnamed *Proteus genomospecies* 4, 5 and 6 [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2000, 50(5): 1869-1875.

[5] NGUYEN V D, PHAM T T, NGUYEN T H T, et al. Screening of marine bacteria with bacteriocin-like activities and probiotic potential for ornate spiny lobster (*Panulirus ornatus*) juveniles[J]. Fish Shellfish Immun, 2014, 40(1): 49-60.

[6] DRZEWIECKA D. Significance and roles of *Proteus spp.* bacteria in natural environments[J]. Microb Ecol, 2016, 72(4): 741-758.

[7] ARASU M V, KIM D H, KIM P I, et al. *In vitro* antifungal, probiotic and antioxidant properties of novel *Lactobacillus plantarum* K46 isolated from fermented sesame leaf[J]. Ann Microbiol, 2013, 64(3): 1333-1346.

[8] WANG H, SHEN F, XIAO R, et al. Purification and characterization of antifungal compounds from *Bacillus coagulans* TQ33 isolated from skimmed milk powder[J]. Ann Microbiol, 2012, 63(3): 1075-1081.

[9] HADUNGKIT M, LUANRATANA O. Anti-Salmonella activity of constituents of *Ardisia elliptica* Thunb[J]. Nat Prod Res, 2006, 20(7): 693-696.

[10] YANG J, YANG X D, WU H Y, et al. Chemical study on *Glochidion Hirsutum*(Ⅱ)[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(6): 986-988, 1012.

[11] 李冬, 朱伟明, 顾谦群, 等. 海洋放线菌 H2003 代谢产物中环二肽成分及其抗肿瘤活性的初步研究[J]. 海洋科学, 2007, 31(5): 45-48.

[12] 白文婷, 谢一辉, 韦益飞, 等. 藏药宽筋藤极性部位的化学成分研究[J]. 中药材, 2017, 40(3): 600-603.

[13] 陈光英, 刘晓红, 温露, 等. 南海红树林内生真菌 1893 代谢产物研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2003, 42(1): 49-51, 54.

[14] CHEN J H, LAN X P, LIU Y, et al. The effects of diketopiperazines from *Callyspongia sp.* on release of cytokines and chemokines in cultured J774A. 1 macrophages[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2012, 22(9): 3177-3180.

[15] 丁广治, 刘云宝, 马双刚, 等. 格木内生真菌烟曲霉的代谢产物[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(20): 3083-3085.

[16] RONG H, ZHANG G D, YUN F L, et al. A new isoflavone derivative from *Streptomyces sp.* YIM GS3536[J]. Chem Nat Compd, 2013, 48(6): 856-858.

[17] KULESH N I, VASILEVSKAYA N A, VESELOVA V V, et al. Minor polyphenols from *Maackia amurensis* wood[J]. Chem Nat Compd, 2008, 44(6): 575-577.

[18] WILLKINS A L, YINRONG L, SENG T T. Extractives from New Zealand honeys. 4. Linalool derivatives and other components from nodding thistle (*Carduus nutans*) honey[J]. J Agr Food Chem, 1993, 41(6): 873-878.

[19] 孙大庆, 李芬, 李洪飞. 苯乳酸微生物代谢研究进展[J]. 农产品加工, 2018, 9(5): 55-56, 59.

[20] 刘韵昕. 苯乳酸的抑菌活性及抑菌机理研究[D]. 临汾: 山西师范大学, 2017.

[21] 王景祥, 贡瑞生, 黄土改. 白蒿抗菌有效成分的研究[J]. 中国药学杂志, 1983, 18(2): 27-28.

[22] 杨光, 包晓玮, 陈勇, 等. 6 种酚类化合物及胡桃醌的体外抑菌活性[J]. 动物营养学报, 2018, 30(9): 3710-3719.

[23] WANG F W. Bioactive metabolites from *Guignardia sp.*, an endophytic fungus residing in *Undaria pinnatifida*[J]. Chin J Nat Med, 2012, 10(1): 72-76.

[24] 漆淑华, 钱培元, 张偲. 海洋细菌 *Pseudomonas sp.* 抗菌代谢产物的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(3): 420-423.

[25] ABEGUNDE A T, MUHAMMAD B H, BHATTI O, et al. Environmental risk factors for inflammatory bowel diseases: evidence based literature review[J]. World J Gastroentero, 2016, 22(27): 6296-6317.

[26] ZHU W H, WINTER M G, BYNDLOSS M X, et al. Precision editing of the gut microbiota ameliorates colitis[J]. Nature, 2018, 553(7687): 208-227.

[27] FORSLUND K, HILDEBRAND F, NIELSEN T, et al. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota[J]. Nature, 2015, 528(7581): 262-266.

(收稿日期: 2019-06-11　　编辑: 谢睿)