

# 解淀粉芽孢杆菌 HRH317 菌株抗菌肽发酵条件优化及其抑菌活性研究

秦楠\*, 杨金梅, 梁莹支, 乔璐, 黄锐, 高宇洁

(山西中医药大学, 中药与食品工程学院, 榆次 030619)

**摘要:** **目的** 优化解淀粉芽孢杆菌 HRH317 菌株产抗菌肽的发酵条件并探讨其抑菌活性。**方法** 采用单因素试验和响应面法, 以抑菌圈直径为指标, 对解淀粉芽孢杆菌 HRH317 菌株产抗菌肽的发酵条件进行优化; 采用牛津杯法测定该抗菌肽的抑菌谱活性并通过双缩脲法研究其最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。**结果** 解淀粉芽孢杆菌 HRH317 菌株产抗菌肽的最佳发酵条件为: pH 为 7.5, 装液量为 50 mL, 接种量 3%, 培养时间 13 h、温度 38.5 °C、转速 145 r/min, 抗菌肽含量(50.53±0.37) μg/mL。在此条件下抗菌肽的抑菌圈直径达 15.97 mm。且针对 9 种指示菌的抑菌谱结果表明, 抗菌肽对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌的 MIC 为 3.45 μg/mL, 大肠杆菌、白地霉、巴氏醋酸杆菌 MIC 为 6.90 μg/mL, 禾谷镰孢菌、黄曲霉、假丝酵母 MIC 为 55.20 μg/mL, 红酵母 MIC 为 110.40 μg/mL。**结论** 发酵时间、转速及接种量是影响抗菌肽产量的主要因素。该抗菌肽具有广谱抗菌性, 尤其对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌抑制效果最好, 其次是霉菌、酵母菌。

**关键词:** 解淀粉芽孢杆菌; 抗菌肽; 抗菌活性; 最小抑菌浓度

## Optimization of fermentation conditions and antibacterial activity of antimicrobial peptides from *Bacillus amylolytica* HRH317 strain

QIN Nan\*, YANG Jin-Mei, LIANG Ying-Zhi, QIAO Lu, HUANG Rui, GAO Yu-Jie

(College of Pharmaceutical and Food Engineering, Shanxi University of Chinese Medicine, Yuci 030619, China)

**ABSTRACT: Objective** To optimize the fermentation conditions of antibacterial peptide produced by *Bacillus amylolytica* HRH317 and study its antimicrobial activity. **Methods** The fermentation conditions for the production of antimicrobial peptides by *Bacillus amylolytica* HRH317 strain with the diameter of the inhibition zone as an indicator were optimized by the single factor experiment and response surface method. The antimicrobial activity of the peptide was determined by Oxford Cup method and its minimum inhibitory concentration (MIC) was studied by biuret method. **Results** The optimal fermentation conditions for producing antimicrobial peptides by *Bacillus amylolytica* HRH317 were as follows: pH was 7.5, the filling volume was 50 mL, the inoculation was 3%, the culture

**基金项目:** 山西省自然科学基金面上项目(201801D121256)、山西省重点研发计划项目(201903D221032)、山西省教育厅创新项目(2019L0729)、山西中医药大学转化项目(2020PY-ZH-07)

**Fund:** Supported by the Natural Science Foundation of Shanxi Province (201801D121256), the Key R & D Project of Shanxi Province (201903D221032), Innovation Project of Shanxi Education Department (2019L0729), and the Transformation Project of Shanxi University of Chinese Medicine (2020PY-ZH-07)

\*通信作者: 秦楠, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品微生物发酵及功能食品。E-mail: bszy6688@163.com

\*Corresponding author: QIN Nan, Ph.D, Associate Professor, College of Pharmaceutical and Food Engineering, Shanxi University of Chinese Medicine, Yuci 030619, China. E-mail: bszy6688@163.com

time was 13 h, the temperature was 38.5°C, the rotation speed was 145 r/min, and the antimicrobial peptide content was  $(50.53 \pm 0.37)$   $\mu\text{g/mL}$ . Under this condition, the inhibition zone diameter of the antimicrobial peptide was 15.97 mm. The results of antibacterial spectrum against 9 kinds of indicator bacteria showed that the MIC of antimicrobial peptides against *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* was 3.45  $\mu\text{g/mL}$ , against *Escherichia coli*, *Geotrichum* and *Acetobacter pasteuriana* was 6.90  $\mu\text{g/mL}$ , against *Fusarium graminearum*, *Aspergillus flavus* and *Candida* was 55.20  $\mu\text{g/mL}$ , and the MIC of *Rhodotorula* was 110.40  $\mu\text{g/mL}$ . **Conclusion** Fermentation time, rotation speed and inoculum amount were the main factors affecting the yield of antimicrobial peptides. Moreover, the antimicrobial peptide has broad-spectrum antibacterial activity, especially for *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*, followed by mold and yeast.

**KEY WORDS:** *Bacillus amylolytica*; antimicrobial peptide; antimicrobial activity; minimum inhibitory concentration

## 0 引言

抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)由生物体内免疫防御体系产生,是一类具有抵抗外源性病原菌的多肽类活性物质<sup>[1]</sup>。自然界中的抗菌肽以动物源抗菌肽为主,因其具有广谱高效抗菌活性、细胞选择性及不易产生耐药性等特点,一向被认为是抗生素的理想替代品<sup>[2-3]</sup>。动物体自身分泌的抗菌肽并没有达到抑制细菌所需浓度,存在产量低、成本高的缺点,所以利用微生物发酵生产抗菌肽成为抗菌肽生产利用的有效途径。

芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)是拮抗细菌中的重点研究对象。其生长迅速,能够产生诸如抗菌蛋白、肽等抑菌有效成分,对人体无毒害,不造成环境污染<sup>[4-5]</sup>。ABDALLAH 等<sup>[6]</sup>发现,芽孢杆菌 32a 所产生的脂肽具有抗菌、抗黏附以及抑制病原菌等活性,能够抑制根癌农杆菌产生生物膜。AMBRICO 等<sup>[7]</sup>利用培养芽孢杆菌 ET-1 中含有 iturin A 无细胞上清液(cell free supernatant, CFS)对青霉菌进行拮抗效果评价,得出 iturin A 的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)为 6.60 mg/L。张志焱等<sup>[8]</sup>对枯草芽孢杆菌 BL0006 产抗菌肽最适发酵工艺进行了研究,表明在最优条件下抗菌肽代谢产物效价最高。剧建格<sup>[9]</sup>对菌株 S62-9 产抗菌肽的发酵条件进行了研究,结果表明培养起始 pH 值为 7.0,装液量为 40 mL/300 mL,以 3%的接种量于 37 °C,250 r/min 摇床培养 22 h。芽孢杆菌及其代谢产物成为抑制病原菌最有效的天然生物制剂<sup>[10]</sup>,在农产品防腐保鲜、病原物防治及植株促生等方面表现出良好的前景。本研究中所采用试验菌株解淀粉芽孢杆菌 HRH317 由课题组从玉米田地分离筛选得到,前期对其所产抗菌物质、蛋白相关活性及其抑菌机制已进行深入研究<sup>[11]</sup>,通过玉米种植与食品保鲜试验表明,抗菌性表现出良好效果。

为后期更好地在实际应用中充分利用该菌株作为生物防腐剂,继续发掘其产肽物质及相关活性,本研究以解淀粉芽孢杆菌 HRH317 为出发菌株,对发酵时间、温度、

pH、接种量、转速等条件进行单因素试验,并通过方差分析从中选出影响显著的因子进行响应面设计,从而获得抗菌肽的最佳发酵条件,同时建立了 9 种菌的抑菌谱及其相关的抗菌肽 MIC,为后期工业化生产和应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

解淀粉芽孢杆菌 HRH317 菌株(*Bacillus amyloliquefaciens* HRH317, 编号: CGMCC No.7314)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、巴氏醋酸菌(*Acetobacter pasteurianus*)、禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum*)、白地霉菌(*Geotrichum*)、黄曲霉(*Aspergillus flavus*)、假丝酵母(*Candida*)、红酵母(*Rhodotorula*) (山西中医药大学食品微生物实验室); HCl、磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)、乙醇、牛肉膏、蛋白胨、葡萄糖、琼脂(分析纯,北京索来宝科技有限公司); 营养琼脂(nutrient agar, NA)培养基、营养肉汤(nutrient broth, NB)培养基、马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基(上海索来宝生物科技有限公司)。

DHP-500 型电热恒温培养箱(北京光明医疗仪器厂); YXQ-LS-75SII 立式压力蒸汽灭菌器、BSP-250 生化培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); BS210S 电子天平(北京赛多利斯天平有限公司); BSD-WX2280 卧式智能精密型摇床(上海博迅医疗生物仪器股份有限公司); DL-6MS 高速离心机(成都市生科仪器有限公司)。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 发酵上清液的制备

NB 作为种子培养基,培养 24 h 后,将发酵液按 3%的接种量接入发酵培养基中,三角瓶的装液量为 50 mL,在 37 °C、160 r/min 振荡培养 24 h,离心 10 min 去除菌体细

胞,然后用细菌过滤器(0.22  $\mu\text{m}$ )过滤,得到发酵液的无菌滤液,对其进行抑菌活性的检测。

### 1.2.2 指示菌悬液的制备

用接种环挑取一环枯草芽孢杆菌接入装有 5 mL 无菌水的试管中,稀释  $10^2$  倍后制成浓度为  $1.0 \times 10^6$  个/mL 的菌悬液,备用。

### 1.2.3 抗菌肽的制备

在冰浴条件下取 10 mL 的发酵液,边搅拌边缓缓地向上清液中添 6 mol/L HCl,将 pH 调整到 2.0。在 4  $^{\circ}\text{C}$  下静置过夜。沉淀的蛋白质在 10000 r/min 离心 10 min,沉淀用 5 倍体积的乙醇抽提,抽提后同条件离心,收集上清液,放置在干净的离心管中。沉淀用同种有机溶剂再次抽提,离心除去沉淀。合并 2 次的抽提液,通风橱内风干有机溶剂后,即为粗提物。得到的粗提物再用与乙醇相同体积的 20 mmol/L pH=7.0 PBS 溶解,然后测定抑菌活性。

### 1.2.4 HRH317 菌株抗菌肽的抑菌活性测定

采用牛津杯法<sup>[12]</sup>测定。

### 1.2.5 HRH317 菌株抗菌肽发酵条件的优化

#### (1)单因素试验

本试验选取不同接种量、发酵时间、pH、转速、温度进行单因素试验,各处理均在培养后,按照 1.2.3 取浓度 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的抗菌肽 100 mL 进行抑菌活性检测,记录抑菌圈直径作为指标。不同因子梯度条件见表 1。

#### (2)响应面法试验设计

基于单因素试验结果,采用中心组合试验

Box-Behnken 设计方案,对抑菌活性影响最显著的 3 个因素培养时间(h)、转速(r/min)、培养温度( $^{\circ}\text{C}$ ),分别用  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  来表示,并以 +1、0、-1 分别代表变量的水平,抗菌肽的抑菌圈直径  $Y$  表示响应值,每组试验重复 3 次,见表 2。

### 1.2.6 抑菌谱测定

取质量浓度 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的抗菌肽 100 mL,按照 1.2.4 方法,分别对枯草芽孢杆菌等 9 株菌进行抑菌活力的测定,重复 3 次,测量并记录抑菌圈的大小,取其平均值。

### 1.2.7 最小抑菌浓度的测定

#### (1)肽液浓度的测定

采用 Gly-Gly-Tyr-Arg 四肽标准品绘制标准曲线,双缩脲法测定肽液浓度<sup>[13-14]</sup>。

#### (2)最小抑菌浓度的测定

将已知肽液浓度的样品溶液用 PBS 溶液进行二倍稀释,取 9 支试管,依次编号为 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256、PBS 溶液为空白对照,分别吸取 200  $\mu\text{L}$  移入涂布指示菌平板牛津杯中,每个质量浓度 3 个重复。置于 -4  $^{\circ}\text{C}$  扩散 12 h,37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h,测量抑菌圈直径,以能出现抑菌圈的最低浓度作为最小抑菌浓度<sup>[15]</sup>。

## 1.3 数据分析

采用 Origin 8.5 软件绘制单因素影响菌株抗菌肽抑菌活性的趋势图,采用 Design-Expert (version 8.0.6) 统计软件进行响应面设计与分析。

表 1 试验设计的因素和水平  
Table 1 Factors and levels of experiment design

因子	水平	其他参数
接种量/%	1、1.5、2、2.5、3、3.5、4	24 h、37 $^{\circ}\text{C}$ 、pH=7、160 r/min
转速/(r/min)	120、140、160、180、200、220	24 h、37 $^{\circ}\text{C}$ 、pH=7、3%
pH	4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0	24 h、37 $^{\circ}\text{C}$ 、3%、160 r/min
时间/h	0、6、12、18、24、30	37 $^{\circ}\text{C}$ 、pH=7、3%、160 r/min
温度/ $^{\circ}\text{C}$	17、22、27、32、37、42	24 h、pH=7、3%、160 r/min

表 2 响应面法因素水平编码表  
Table 2 Factors and levels in response surface analysis

因素	编码水平( $X_i$ )		
	-1	0	1
时间 $X_1/\text{h}$	12	18	24
转速 $X_2/(\text{r}/\text{min})$	120	140	160
温度 $X_3/^{\circ}\text{C}$	32	37	42

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验结果

#### 2.1.1 不同接种量对菌株抗菌肽抑菌活性的影响

抑菌活性随着接种量的增加呈现出先增高后减低的趋势,3%时抗菌肽抑菌圈直径为最大值(17.19 $\pm$ 0.35) mm。这可能是由于接种量过低,发酵培养时缺乏菌体细胞,延滞期过长减低发酵产率;接种量过高,引入发酵培养基的细胞过多,导致过度消耗培养基中的营养,不利于发酵产

物积累<sup>[16]</sup>。不同接种量对发酵产抗菌肽的影响不显著( $P>0.05$ )。因此选用接种量 3%为宜。

### 2.1.2 不同时间对菌株抗菌肽抑菌活性的影响

抗菌肽抑菌活性随发酵时间延长先增强后减弱,发酵 18 h 时抗菌肽抑菌圈达到最大(13.9±0.41) mm。接种初期菌体个体生长较慢,对数期阶段菌体利用培养基碳源和氮源大量增殖,并在对数生长末期开始合成肽类物质,由于稳定期逐渐过度至降速期,此时培养基营养匮乏、菌数逐渐减少,合成肽类物质能力降低从而导致抑菌活性逐渐减弱。发酵时间对其影响极显著( $P<0.01$ )。因此选择发酵时间 18 h 为宜。

### 2.1.3 不同 pH 对菌株抗菌肽抑菌活性的影响

随着初始 pH 的提高,抗菌肽抑菌活性呈现出缓慢增强并减弱的趋势,在 pH=7.5 时抗菌肽抑菌圈达到最大(13.8±0.23) mm。发酵过程较高或较低的 pH 均会抑制菌体的生长,使菌体生长缓慢,发酵水平下降,从而导致抗菌肽产量降低。其原因可能是某些酸性或碱性条件使得抗菌肽的转录翻译过程受阻<sup>[17]</sup>。初始 pH 影响不显著( $P>0.05$ )。因此选择 pH=7.5 为宜。

### 2.1.4 不同转速对菌株抗菌肽抑菌活性的影响

不同转速对抗菌肽的抑菌活性具有显著影响( $P<0.05$ ),随着转速的升高,发酵液的抑菌活性不断增强,当转速达到 140 r/min 时,抑菌圈直径达到最大值(14.38±0.11) mm,之后,随着转速的升高抑菌活性下降。因此选择菌株 HRH317 合成抗菌肽的最适转速为 140 r/min 为宜。

### 2.1.5 不同温度对菌株抗菌肽抑菌活性的影响

不同培养温度对抗菌肽的活性的影响较为显著( $P<0.05$ )。抗菌肽的抑菌活性随温度的升高而不断增强,当温度到达 37 °C 时,抑菌圈直径达到最大值(17.8±0.6) mm,温度继续升高抑菌活性呈明显下降趋势,原因是温度过高不适于该菌株生长繁殖或代谢产物的积累。因此选择发酵温度 37 °C 为宜。

## 2.2 响应面分析

### 2.2.1 响应面试验设计与结果

如表 3 所示,17 个试验点中 12 个是析因点,5 个是零点,析因点是自变量取值在  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  所构成的三维顶点,零点表示区域的中心点,其中重复零点试验 5 次,用以估算试验误差。

### 2.2.2 回归模型的建立与方差分析

利用 Design Expert 8.0.6.1 软件对表中数据进行多元回归拟合,得到解淀粉芽孢杆菌 HRH317 菌株抗菌肽的抑菌圈直径( $Y$ )对培养时间( $X_1$ )、转速( $X_2$ )、培养温度( $X_3$ )的多项回归方程:

$$Y=15.74-0.066X_1+0.48X_2+1.24X_3+1.07X_1X_2+0.76X_1X_3+0.16X_2X_3-1.21X_1^2-1.84X_2^2-2.49X_3^2。$$

从方差分析表 4 中得出模型  $F$  值为 76.18,对应的  $P<0.0001$ ,达到显著水平,失拟项的  $P=0.3214>0.05$  不显著,

说明该模型拟合程度较好,试验误差小,可以用此模型预测解淀粉芽孢杆菌 HRH317 抗菌肽发酵条件对抑菌活性的影响。回归方程系数显著性检验结果:  $X_2$ 、 $X_3$  的一次项极显著( $P<0.01$ ),  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  二次项极显著( $P<0.01$ ),交互项  $X_1X_2$ 、 $X_1X_3$  极显著( $P<0.01$ ),其他项均不显著。由  $F$  值得出试验各因素对抑菌活性影响的主次顺序为:  $X_3>X_2>X_1$ ,即温度>转速>时间。

根据模型方程绘制响应面图,见图 1。其中每个响应面分别代表 2 个变量在恒定值(取零水平值)下,另外 2 个独立变量之间的相互作用。

由图 1a 可知,在转速水平为 0 时,培养时间与温度对抑菌圈直径的交互影响极显著( $P<0.01$ )。在 32~37 °C、6~12 h 时,抑菌圈直径呈递增趋势,之后,随着温度的增大,培养时间的延长,抑菌圈直径随之下降。由图 1b 可知,在培养时间为 0 时,转速与温度对抑菌圈直径的交互影响不显著( $P>0.05$ )。在 32~37 °C、120~140 r/min 时,抑菌圈直径呈递增趋势,之后,随着温度及转速的增大,抑菌圈直径随之下降。由图 1c 可知,在温度水平为 0 时,培养时间与转速对抑菌圈直径的交互影响极显著( $P<0.01$ )。在 120~140 r/min、6~12 h 时,抑菌圈直径呈递增趋势,之后随着转速的增大,培养时间的延长,抑菌圈直径随之下降。

表 3 中心组合试验方案及结果  
Table 3 Scheme and result of central composite tests

试验编码	编码水平			抑菌圈直径/mm
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	
1	-1	-1	0	13.23
2	+1	-1	0	10.92
3	-1	+1	0	12.31
4	+1	+1	0	14.27
5	-1	0	-1	11.23
6	+1	0	-1	10.16
7	-1	0	+1	12.41
8	+1	0	+1	14.36
9	0	-1	-1	10.08
10	0	+1	-1	10.47
11	0	-1	+1	12.03
12	0	+1	+1	13.06
13	0	0	0	15.89
14	0	0	0	15.23
15	0	0	0	15.92
16	0	0	0	15.78
17	0	0	0	15.88

表 4 二次回归模型的方差分析结果  
Table 4 Analysis of variance for each item of developed quadratic regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	72.58	9	8.06	76.18	<0.0001	**
$X_1$	0.035	1	0.035	0.33	0.5827	
$X_2$	1.85	1	1.85	17.50	0.0041	**
$X_3$	12.30	1	12.30	116.20	<0.0001	**
$X_1X_2$	4.56	1	4.56	43.06	0.0003	**
$X_1X_3$	2.28	1	2.28	21.54	0.0024	**
$X_2X_3$	0.10	1	0.10	0.97	0.3581	
$X_1^2$	6.20	1	6.20	58.59	0.0001	**
$X_2^2$	14.31	1	14.31	135.21	<0.0001	**
$X_3^2$	26.03	1	26.03	245.86	<0.0001	**
剩余	0.74	7	0.11			
失拟项	0.40	3	0.13	1.61	0.3214	
纯误差	0.34	4	0.084			

$$R^2=0.9899 \quad R^2_{Adj}=0.9769$$

注: \* $P < 0.05$ , 表示差异显著; \*\* $P < 0.01$  表示差异极显著。

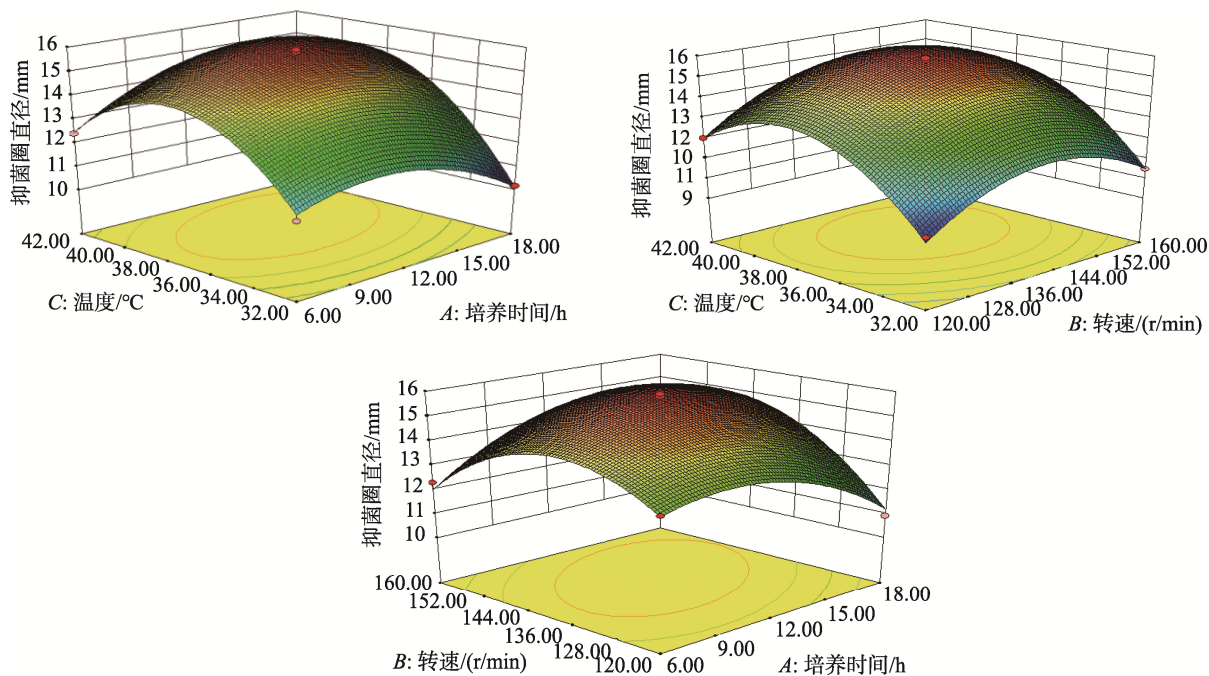


图 1 两因素交互作用对抑菌圈直径的影响  
Fig.1 Influence of interaction of two factors on the diameter of bacteriostatic zone

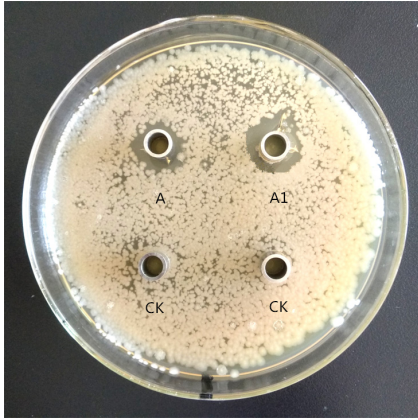
### 2.2.3 验证性试验

通过利用 Design Expert 8.0.6 软件分析可知, 获得解淀粉芽孢杆菌 HRH317 菌株抗菌肽的最优培养条件为: 培养时间 12.74 h、转速 144.89 r/min、温度 38.49 °C, 在此条件

下抑菌圈直径为 15.95 mm。但考虑实际操作过程的简便性, 为适应工业生产需要, 将最佳条件修改为: 培养时间 13 h、转速 145 r/min、温度 38.5 °C。在最适条件下进行了 3 组重复性试验, 抑菌圈的平均直径为 15.97 mm, 与预测值相差

0.02 mm, 拟合度良好, 无显著性差异( $P>0.05$ ), 表明试验确定的模型条件可以用于预测实际值, 此方程有效可靠。

产肽最适工艺条件与菌液抑菌活性的比较, 见图 2。如图 2 所示, 通过提取得到的抗菌肽的抑菌圈直径提高了 35%。



注: A 菌液; A1 抗菌肽; CK 无菌水。

图 2 HRH317 菌株菌液与抗菌肽活性比较

Fig.2 Comparison of bacterial fluid and activity of antimicrobial peptides of HRH317 strain

### 2.3 HRH317 菌株抗菌肽抑菌谱

抑菌圈的大小反映出测试菌对抗菌肽的敏感程度或受抑程度<sup>[18]</sup>。根据抗菌素抑菌圈试验结果判定标准: 抑菌圈直径  $> 20$  mm 为极敏感, 在 15~20 mm 范围内为高度敏感, 10~15 mm 为中度敏感, 7~9 mm 为低度敏感, 小于 7 mm 无抑菌圈者为不敏感<sup>[19-20]</sup>。由表 5 可知, 与对照组相比, 抗菌肽对 9 种菌均有抑菌效果, 枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌呈高度敏感; 白地霉、黄曲霉、大肠杆菌、巴氏醋酸杆菌均呈现出中度敏感; 禾谷镰孢菌、假丝酵母、红酵母呈现出低度敏感, 初步说明抗菌肽具有广谱抗菌性。

### 2.4 最小抑菌浓度的测定

#### 2.4.1 肽液浓度

在 540 nm 的波长下, 通过双缩脲法测得不同梯度浓度 Gly-Gly-Tyr-Arg 四肽标准品, 回归方程为:  $Y=0.0043X+0.019$ , 抗菌肽的浓度约为  $(441.56\pm 1.24)$   $\mu\text{g/mL}$ 。经过倍比稀释后的肽液浓度依次为: 1:2 ( $220.78$   $\mu\text{g/mL}$ )、1:4 ( $110.40$   $\mu\text{g/mL}$ )、1:6 ( $55.20$   $\mu\text{g/mL}$ )、1:8 ( $27.60$   $\mu\text{g/mL}$ )、1:16 ( $13.80$   $\mu\text{g/mL}$ )、1:32 ( $6.90$   $\mu\text{g/mL}$ )、1:64 ( $3.45$   $\mu\text{g/mL}$ )、1:128

( $1.73$   $\mu\text{g/mL}$ )、1:256 ( $0.86$   $\mu\text{g/mL}$ )。

#### 2.4.2 最小抑菌浓度

由表 6 可知, 抗菌肽浓度逐渐减低, 受试菌被抑制效果亦逐渐减弱。其中抗菌肽对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌的 MIC 为  $3.45$   $\mu\text{g/mL}$ , 大肠杆菌、白地霉、巴氏醋酸杆菌 MIC 为  $6.9$   $\mu\text{g/mL}$ , 禾谷镰孢菌、黄曲霉、假丝酵母 MIC 为  $55.20$   $\mu\text{g/mL}$ , 红酵母 MIC 为  $110.40$   $\mu\text{g/mL}$ 。综上所述, 抗菌肽抑制细菌的能力优于霉菌和酵母菌。MOLINOS 等<sup>[21]</sup>采用肠球菌抗菌肽 Enterocin AS-48 浸洗处理新鲜草莓果, 发现质量浓度  $25$   $\mu\text{g/mL}$  即可显著降低草莓果表面单核细胞增生李斯特菌的数量 ( $P<0.05$ ); 高明燕等<sup>[22]</sup>研究枯草芽孢杆菌抗菌肽 RP-07 质量浓度为  $0.5$   $\text{mg/mL}$  时, 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门杆菌的抑菌效果良好。杆菌肽作为一种强杀菌剂, 能明显抑制革兰氏阳性菌, 特别对葡萄球菌、棒状杆菌有较强抑制作用, 对部分革兰氏阴性菌、真菌有一定的抑制效果<sup>[23-24]</sup>。

## 3 结论与讨论

杆菌肽生产菌株大多分布于芽孢杆菌属。杆菌肽合成为于细胞内, 并借助细胞膜上的转运蛋白将其分泌到胞外<sup>[25]</sup>。发酵条件、培养基营养成分及复杂代谢调节机制是影响芽孢杆菌次生代谢物产生的主要因素, 因此探明菌株产抗菌肽的发酵条件是关键的步骤。张玉明等<sup>[26]</sup>对地衣芽孢杆菌产杆菌肽发酵工艺条件进行了优化, 得到最佳条件: 接种量 9%、转速 200 r/min、发酵温度  $37$   $^{\circ}\text{C}$ 、pH 为 7, 经过 25 h 发酵后肽含量  $(783.51\pm 7.34)$  U/mL。梁洁等<sup>[27]</sup>报道了利用转基因酵母 GSCAD5 产抗菌肽研究, 最适发酵条件接种量 3%、转速 200 r/min、发酵温度  $30$   $^{\circ}\text{C}$ 、pH 为 6.5、时间 72 h。本研究采用单因素与响应面法对解淀粉芽孢杆菌 HRH317 产抗菌肽的发酵条件进行了初步筛选, 研究结果表明发酵时间、转速及接种量是影响抗菌肽产量的主要因素, 其中发酵时间与接种量, 发酵时间与温度有极显著的交互作用。最佳条件为: 在初始 pH 为 7.5 的 NB 培养液, 装液量为 50 mL/250 mL, 接种量 3%, 转速 145 r/min,  $38.5$   $^{\circ}\text{C}$  下振荡培养 13 h, 抗菌肽含量  $(50.53\pm 0.37)$   $\mu\text{g/mL}$ , 在此条件下抗菌肽的抑菌圈直径达 15.97 mm。与其他相关研究比较, 该菌株发酵时间周期缩短, 在实际生产过程中对节约能耗有着重要的意义。张志焱等<sup>[8]</sup>、雷波<sup>[28]</sup>分别对枯草芽孢杆菌 BL0006、*B. licheniformis* 产抗菌肽发酵条件进行了研究, 其中 pH 分别是 7.5、7.4, 其结果与本研究相一致。

表 5 各供试菌种的抑菌圈直径(mm,  $n=3$ )

Table 5 Bacteriostatic circle diameter of the antimicrobial peptide to tested strains (mm,  $n=3$ )

菌种	大肠杆菌	巴氏醋酸菌	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	禾谷镰孢菌	白地霉	黄曲霉	假丝酵母	红酵母
抑菌圈直径	14.87 $\pm$ 0.35	12.05 $\pm$ 0.22	16.29 $\pm$ 0.42	17.32 $\pm$ 0.29	9.17 $\pm$ 0.26	13.13 $\pm$ 0.41	10.08 $\pm$ 0.16	8.12 $\pm$ 0.13	7.95 $\pm$ 0.24

表 6 不同菌种的最小抑菌浓度测定(n=3)  
Table 6 Determination of the minimum inhibitory concentration of different strains (n=3)

指示菌	抗菌肽浓度/( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )								
	220.78	110.40	55.20	27.60	13.80	6.90	3.45	1.73	0.86
大肠杆菌	-	-	-	-	-	-	+	+	+
巴氏醋酸菌	-	-	-	-	-	-	+	+	+
金黄色葡萄球菌	-	-	-	-	-	-	-	+	+
枯草芽孢杆菌	-	-	-	-	-	-	-	+	+
禾谷镰孢菌	-	-	-	+	+	+	+	+	+
白地霉菌	-	-	-	-	-	-	+	+	+
黄曲霉	-	-	-	+	+	+	+	+	+
假丝酵母	-	-	-	+	+	+	+	+	+
红酵母	-	-	+	+	+	+	+	+	+

注: 数据为 3 次重复试验的平均值; +表示长菌, -表示未长菌。

在抗菌肽的抑菌活性研究中发现, 该抗菌肽具有广谱抗菌性。尤其对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌抑制效果最好, 其次是霉菌、酵母菌。这可能是由于细菌的外膜含有较多带负电荷的分子, 如脂多糖、磷脂酸等, 阳离子抗菌肽可通过静电吸引与膜成分相互作用, 从而与细胞膜结合; 而真菌细胞膜结构、成分与细菌有很大差异, 与阳离子抗菌肽亲和的负性磷脂分布于内层, 且细胞膜含有丰富的胆固醇和膜蛋白, 两者的存在使细胞膜趋于稳定, 能阻止或降低抗菌肽渗透进入真核细胞<sup>[29]</sup>。在最小抑菌浓度测定试验中, 编号 1:128 的牛津杯附近, 金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌落逐渐靠近牛津杯布满, 随着抗菌肽倍比缩小至 1:64, 牛津杯孔附近有抑菌圈出现, 据此判定, 抗菌肽对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的最低抑菌浓度为 3.45  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。同时对其他指示菌进行了 MIC 测定, 大肠杆菌、白地霉、巴氏醋酸杆菌 MIC 为 6.90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 禾谷镰孢菌、黄曲霉、假丝酵母 MIC 为 55.20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 红酵母 MIC 为 110.40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。综合抑菌谱与 MIC 测定结果发现, 枯草芽孢杆菌对抗菌肽耐受力强于其他菌种, 这可能是由于对杆菌肽耐受力越强的菌株, 其自身越有可能具备强大的杆菌肽合成能力<sup>[30]</sup>。下一步将对抗菌肽通过 DEAE-琼脂糖凝胶 FF (DEAE Sepharose FF)、反相高效液相色谱法多步柱层析分离纯化及抑菌机制进行深入的研究。

#### 参考文献

- [1] 夏海平. 抗菌肽发酵工艺开发及规模化生产工厂设计[D]. 上海: 华东理工大学, 2015.  
XIA HP. Development of antimicrobial peptide fermentation process and design of large-scale production plant [D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2015.
- [2] 汪以真. 动物源抗菌肽的研究现状和展望[J]. 动物营养学报, 2014, 26(10): 2934–2941.
- [3] 贾英民, 刘杨柳, 陈洲. 抗菌肽研究现状及其在食品安全中的应用前景[J]. 食品科学技术学报, 2017, 35(6): 1–9.  
JIA YM, LIU YL, CHEN Z. Research status and application prospect of antimicrobial peptides in food safety [J]. J Food Sci Technol, 2017, 35(6): 1–9.
- [4] YUAN B, WANG Z, QIN S, *et al.* Study of the anti-sapstain fungus activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CGMCC 5569 associated with *Ginkgo biloba* and identification of its active components [J]. Bioresour Technol, 2012, 114(7): 536–541.
- [5] 洪鹏, 安国栋, 胡美英, 等. 解淀粉芽孢杆菌 HF-01 发酵条件优化[J]. 中国生物防治学报, 2013, 29(4): 569–578.  
HONG P, AN GD, HU MY, *et al.* Optimization of fermentation conditions of *Bacillus amyloliquefaciens* HF-01 [J]. Chin J Biol Control, 2013, 29(4): 569–578.
- [6] ABDALLAH DB, TOUNSI S, GHARSALLAH H, *et al.* Lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* strain 32a as promising biocontrol compounds against the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Environ Sci Pollut Res, 2018, 25(36): 36518–36529.
- [7] AMBRICO A, TRUPO M. Efficacy of cell free supernatant from *Bacillus subtilis* ET-1, an Iturin A producer strain, on biocontrol of green and gray mold [J]. Postharv Biol Technol, 2017, 134: 5–10.
- [8] 张志焱, 赵倩, 于佳民, 等. 一株枯草芽孢杆菌产抗菌肽培养基筛选及发酵工艺优化的研究[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(4): 1217–1226.  
ZHANG ZY, ZHAO Q, YU JM, *et al.* Screening of culture medium for producing antimicrobial peptides by *Bacillus subtilis* and optimization of fermentation process [J]. Chin Anim Husb Vet Med, 2019, 46(4): 1217–1226.
- [9] 尉建格. 高效广谱抗菌肽产生菌的筛选及发酵条件的研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2009.  
JU JG. Screening of high efficient broad-spectrum Antimicrobial peptide-producing strain and study on its fermentation conditions [D].

- Baoding: Hebei Agricultural University, 2009.
- [10] CHEN K, TIAN Z, LUO Y, *et al.* Antagonistic activity and the mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* DH-4 against citrus green mold [J]. *Phytopathology*, 2018, 108(11): 1253–1262.
- [11] QIN N, GUO LL, WANG XM, *et al.* Antimicrobial spectrum and preliminary screening of substance from strain HRH317 of *Bacillus amyloliquefaciens* [J]. *Int J Agric Biol*, 2020, 24: 685–690.
- [12] 周芳, 熊海涛, 张江, 等. 牛津杯法测定抗菌肽对四种有害微生物的抑制效果[J]. *饲料工业*, 2018, 29(6): 48–51.
- ZHOU F, XIONG HT, ZHANG J, *et al.* Inhibitory effect of antimicrobial peptides on four harmful microorganisms by Oxford Cup method [J]. *Feed Ind*, 2018, 29(6): 48–51.
- [13] 唐开水, 周鸿翔, 田娅玲, 等. 低浓度小分子多肽含量测定方法的比较研究[J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(16): 144–148.
- TANG KY, ZHOU HX, TIAN YL, *et al.* Comparative study on the determination methods of low concentration small molecule polypeptide [J]. *Food Res Dev*, 2018, 39(16): 144–148.
- [14] PEREIRA HA, KASUS-JACOBI A, GRIFFITH GL. Peptide compounds and methods of production and use thereof [J]. *Board Regent Univ Oklahoma Pat*, 2017, 33(8): 772–787.
- [15] 翟娅菲, 张星稀, 相启森, 等. 南瓜多糖的体外抑菌活性[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(10): 70–74.
- ZHAI YF, ZHANG XX, XIANG QS, *et al.* Antibacterial activity of pumpkin polysaccharide *in vitro* [J]. *Food Res Dev*, 2019, 40(10): 70–74.
- [16] XIONG X, YANG HS, LI L, *et al.* Effects of antimicrobial peptides in nursery diets on growth performance of pigs reared on five different farms [J]. *Livestock Sci*, 2014, 167(1): 206–210.
- [17] 韩玉竹, 邓钊, 张宝, 等. 解淀粉芽孢杆菌 H15 产抗菌肽的发酵条件优化和提取方法比较研究[J]. *食品科学*, 2015, 36(15): 135–141.
- HAN YZ, DENG Z, ZHANG B, *et al.* Optimization of fermentation conditions and comparison of extraction methods of antimicrobial peptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* H15 [J]. *Food Sci*, 2015, 36(15): 135–141.
- [18] 章斌, 侯小桢, 饶强, 等. 佛手精油的超声提取及清除亚硝酸钠作用研究[J]. *食品研究与开发*, 2011, 32(12): 43–47.
- ZHANG B, HOU XZ, RAO Q, *et al.* Study on ultrasonic extraction of bergamot essential oil and its effect of removing sodium nitrite [J]. *Food Res Dev*, 2011, 32(12): 43–47.
- [19] 李悦, 候滨滨, 赵婧. 柑橘类精油抗菌活性的研究[J]. *天然食品添加剂*, 2011, 32(6): 190–192.
- LI Y, HOU BB, ZHAO J. Study on antibacterial activity of citrus essential oil [J]. *Nat Food Addit*, 2011, 32(6): 190–192.
- [20] 李巧巧, 雷激, 唐洁, 等. 商品柑橘精油的抑菌性及其应用研究[J]. *食品与机械*, 2011, 27(6): 160–162.
- LI QQ, LEI J, TANG J, *et al.* Study on bacteriostasis of commercial citrus essential oil and its application [J]. *Food Mach*, 2011, 27(6): 160–162.
- [21] MOLINOS AC, ABRIOUEL H, BEN O, *et al.* Inactivation of *Listeria monocytogenes* in raw fruits by enterocin As-48 [J]. *J Food Prot*, 2008, 71(12): 2460–2467.
- [22] 高明燕, 刘爱玲, 刘建军, 等. 抗菌肽 RP-07 的抑菌作用及其稳定性研究[J]. *黑龙江兽医*, 2015, (4): 189–193.
- GAO MY, LIU AL, LIU JJ, *et al.* Study on bacteriostasis and stability of antibacterial peptide RP-07 [J]. *Heilongjiang Vet*, 2015, (4): 189–193.
- [23] 闵勇, 刘项羽, 石丽桥, 等. 细菌抗菌肽的研究及其应用前景[J]. *农村经济与科技*, 2017, 28(S1): 179–183.
- MIN Y, LIU XY, SHI LQ, *et al.* Research and application prospect of bacterial antimicrobial peptides [J]. *Rural Econ Sci Technol*, 2017, 28(S1): 179–183.
- [24] 金红, 叶锐, 徐晶, 等. 抗菌肽对食品腐败菌抑制效果的研究进展[J]. *农产品加工*, 2018, (5): 59–63.
- JIN H, YE R, XU J, *et al.* Research progress of antimicrobial peptides against food spoilage bacteria [J]. *Agric Prod Proc*, 2018, (5): 59–63.
- [25] NEUMULLER AM, KONZ D, MARAHIEL MA. The two-component regulatory system Bac RS is associated with bacitracin 'self-resistance' of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716 [J]. *Eur J Biochem*, 2001, 268(11): 3180–3189.
- [26] 张玉明, 倪志华, 李宝库. 杆菌肽产生菌的分离鉴定及其发酵条件初步研究[J]. *生物技术通报*, 2015, 31(5): 153–157.
- ZHANG YM, NI ZH, LI BK. Isolation and identification of bacitracin-producing strain and preliminary study on its fermentation conditions [J]. *Biotechnol Bull*, 2015, 31(5): 153–157.
- [27] 梁洁, 彭中健, 梁淑娃, 等. 转基因酵母菌深层发酵生产抗菌肽的研究[J]. *现代食品科技*, 2009, 25(6): 639–642.
- LIANG J, PENG ZJ, LIANG SW, *et al.* Study on production of antimicrobial peptides by submerged fermentation of transgenic yeast [J]. *Mod Food Technol*, 2009, 25(6): 639–642.
- [28] 雷波. 杆菌肽发酵的培养基优化及影响其检测的因素[J]. *食品与生物技术学报*, 2006, 26(6): 79–82.
- LEI B. Optimization of culture medium for bacitracin fermentation and factors affecting its detection [J]. *J Food Biotechnol*, 2006, 26(6): 79–82.
- [29] YEAMAN MR, YOUNT NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance [J]. *Pharm Rev*, 2003, 55(1): 27–55.
- [30] AHMAD V, KHAN MS, JAMAL QMS, *et al.* Antimicrobial potential of bacteriocins: In therapy, agriculture and food preservation [J]. *Int J Antimicrob Agent*, 2017, 49(1): 1–11.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)

## 作者简介



秦楠, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品微生物发酵及功能食品。  
E-mail: bszy6688@163.com