

## 枯草芽孢杆菌 DZSY21 抗菌肽的提取及其应用

苏 博, 付春情, 薛婉婷, 韩旺旺, 鲁瞳彤, 王海心, 陈冠宇, 姚沛琳, 徐礼生  
(宿州学院生物与食品工程学院, 宿州 234000)

**摘 要:** 为了提取枯草芽孢杆菌抗菌肽以探索其对食品的防腐效果, 选用枯草芽孢杆菌 DZSY21、解淀粉芽孢杆菌 FZB42 和枯草芽孢杆菌 OKB105 菌种发酵, 然后将这 3 个菌种的发酵上清液分别与丙酮按 1:2 的体积比混合, 旋转蒸发浓缩得到 3 种菌的抗菌肽粗提物。对抗菌肽的热稳定性试验可知 3 种菌的抗菌肽经 100 °C 加热 30 min 后抑菌效果均有小幅度降低, 但抑菌活性仍较强。抗菌肽蛋白酶稳定性试验结果显示, 3 种菌的抗菌肽对胰蛋白酶和木瓜蛋白酶都很敏感; 应用性试验中采用牛奶、苹果、肉等作为食品模型, 结果显示经枯草芽孢杆菌 DZSY21 抗菌肽处理后的试验组品相均明显好于对照组。表明枯草芽孢杆菌 DZSY21 抗菌肽具有较好的防腐效果。

**关键词:** 枯草芽孢杆菌; 抗菌肽; 分离提取; 天然食品防腐剂; 抑菌

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2022)05-0848-07

### Extraction and application of *Bacillus subtilis* DZSY21 antimicrobial peptide

SU Bo, FU Chunqing, XUE Wanting, HAN Wangwang, LU Tongtong,

WANG Haixin, CHEN Guanyu, YAO Peilin, XU Lisheng

(School of Biological and Food Engineering, Suzhou University, Suzhou 234000)

**Abstract:** In order to extract antimicrobial peptides from *Bacillus subtilis* and explore its anti-corrosion effect on food, three strains of *B. subtilis* DZSY21, *Bacillus amyolysis* FZB42 and *B. subtilis* OKB105 were selected for fermentation in this experiment, and then the fermentation supernatants of the three strains were mixed with acetone at a volume ratio of 1:2. The crude extracts of antimicrobial peptides from three strains were obtained by rotary evaporation concentration. According to the thermal stability test of the antimicrobial peptides, the antibacterial effects of the antibacterial peptides from the three bacteria were all slightly reduced after heating at 100 °C for 30 min, but the anti-bacterial activities still kept strong. The antimicrobial peptides of the three strains were sensitive to trypsin and papain. Milk, apple, meat and other food models were used in the application experiment, and the results showed that the experimental group was significantly better than the control group after treated with *B. subtilis* DZSY21 antimicrobial peptide, indicating that *B. subtilis* DZSY21 antimicrobial peptide has better antiseptic effect.

**Key words:** *Bacillus subtilis*; antibacterial peptide; isolation and extraction; natural food preservative; bacteriostasis

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), 隶属于芽孢杆菌属, 革兰氏染色呈紫色。枯草芽孢杆菌对人体及动植物没有危害, 是广泛应用于医药行业、动物饲料、植物病害和生物防治中的有益菌, 在微生物益生制剂方面的发展潜力巨大<sup>[1]</sup>。

抗菌肽被人类首次发现是在 20 世纪 80 年代初, 它由生物体产生, 是一种可以有效抑制或杀灭细菌、真菌、寄生虫、病毒和肿瘤细胞的小分子多肽类物

质, 具有良好的热稳定性、高效广谱抗菌活性、强碱性等特点, 还具有抗感染等生物活性<sup>[2-4]</sup>。枯草芽孢杆菌产生的抗菌物质主要分为抗菌蛋白和抗菌脂肽两大类, 其中抗菌脂肽分为 Surfactin、Iturin 和 Fengycin 3 种<sup>[5-6]</sup>。田秋月等<sup>[7]</sup>从枯草芽孢杆菌 S21 发酵菌液中纯化出两种抗菌脂肽, 并通过质谱鉴定出其组成成分。邹秋霞等<sup>[8]</sup>对枯草芽孢杆菌 YN145 进行分离鉴定, 试验表明其抗菌物质能耐高温、耐酸碱。

收稿日期: 2021-09-19

基金项目: 大学生创新创业训练计划项目 (202110379019, S202010379070), 安徽省自然科学基金项目 (KJ2020A0729), 产学研合作协同育人项目 (202002033001, 202002161034) 和宿州学院科研平台开放课题 (2019ykf29, 2020ykf22) 共同资助。

作者简介: 苏博, 助理研究员。E-mail: subowsm31415@163.com

因为抗菌肽不易使细菌产生耐药性,且不会产生药物残留,所以近年来在畜牧业中将其作为抗生素替代物的研究逐渐增多<sup>[9-12]</sup>。张静等报道,育肥猪日粮中添加 100 或 200 mg·kg<sup>-1</sup> 抗菌肽菌丝霉素 (*Plectasin*) 可有效增强其免疫指标、肠道形态、抗氧化性,表现出良好的抗生素替代潜力<sup>[13]</sup>。张炜等发现菌肽 BSN-3 可在短时间内杀灭大肠杆菌及在不同条件下保存抗菌肽 BSN-37 药效活性可持续 7.5 h,显示抗菌肽 BSN-37 具有替代抗生素成为新抗菌药物的潜力<sup>[14]</sup>。抗菌肽在食品方面具有广泛的应用前景,是一种新型天然食品防腐剂,具有高效杀菌、安全、抑菌机制独特、不易残留、易被人体消化吸收并且无毒副作用等特点,提高了食品的安全性。它对食源性致病菌有抑制作用,因此可以应用于果蔬保鲜和食品包装等方面<sup>[15-18]</sup>。抗菌肽还可应用于美容化妆品和抗肿瘤治疗等领域,但是抗菌肽在来源、安全性、活体和体内稳定性方面仍存在问题,需要进行更深层次的研究<sup>[19]</sup>。

本研究依据抑菌能力的强弱,选用解淀粉芽孢杆菌 FZB42 作阳性对照和枯草芽孢杆菌 OKB105 作阴性对照来研究枯草芽孢杆菌 DZSY21 及离心上清液对细菌体外平板抑制试验,观察抑菌圈直径大小;对枯草芽孢杆菌 DZSY21 抗菌肽粗提物进行提取,并检测其抗菌活性;对 DZSY21 抗菌肽热稳定性和蛋白酶稳定性进行了测定;最后将其应用到牛奶、水果和肉的防腐保鲜研究,为食品防腐剂与保鲜剂的研究开发提供思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 试验菌种** 试验菌: 枯草芽孢杆菌 DZSY21 (*Bacillus subtilis* DZSY21), 解淀粉芽孢杆菌 FZB42 (*Bacillus amyloliquefaciens* FZB42), 枯草芽孢杆菌 OKB105 (*Bacillus subtilis* OKB105)。

指示菌 (致病菌): 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*)。

**1.1.2 培养基及培养条件** 用 1 000 mL 蒸馏水配制好培养基后再用 NaOH 调 pH, 121℃ 灭菌 20 min。

营养琼脂培养基 (NA 培养基): 胰蛋白胨 10 g, 牛肉浸膏 3 g, 氯化钠 5 g, 琼脂粉 15~20 g; pH 7.2~7.4。

种子培养基: 葡萄糖 20 g, 胰蛋白胨 10 g, 硫酸镁 0.24 g, 二水合磷酸二氢钠 2 g, 十二水合磷酸氢二钠 8 g; pH 7.4。

发酵培养基: 葡萄糖 20 g, 胰蛋白胨 20 g, 硫酸镁 0.048 g, 硫酸锰 0.02 g, 氯化钙 0.1 g, 二水合磷酸二氢钠 0.2 g, 十二水合磷酸氢二钠 0.8 g; pH 7.4。

培养条件: 将试验菌与指示菌涂布于固体 NA 培养, 37℃ 培养 24 h, 挑取单菌落在固体 NA 培养基上划线, 37℃ 培养 24 h。

**1.1.3 主要试剂和仪器** 主要试剂: 丙酮购置于上海苏懿化学试剂有限公司; 胰蛋白酶和木瓜蛋白酶购置于源叶生物; 75%酒精购置于宿州众望消毒药业有限公司; 95%酒精购置于安徽安特食品股份有限公司; 胰蛋白胨、牛肉浸膏、葡萄糖、硫酸镁等其他化学试剂均购置于国药集团化学试剂有限公司。

主要仪器: WT-ZNO 型超净工作台 (郑州中旺实验室设备有限公司); 智能生化培养箱 (上海三发科学仪器有限公司); 数显恒温水浴锅 (江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司); AL104 电子天平 (梅特勒-托多利仪器 (上海) 有限公司); GI100T 立式压力蒸汽灭菌锅 (上海博讯实业有限公司); ZWY-240 恒温培养振荡箱 (上海智城分析仪器制造有限公司); 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); SHZ-D(III) 循环水式真空泵 (巩义市予华仪器有限责任公司); CH2118K 微电脑电磁炉 (广东格兰仕微波生活电器制造有限公司); H1850 台式高速离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); 冰箱 (青岛海尔特种电器有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 枯草芽孢杆菌 DZSY21 及其上清液的体外平板抑菌试验** (1) 菌液活化: 活化 3 种试验菌, 将活化后的 3 种菌取 10 mL 分别接种至已灭菌的 100 mL 种子培养基中, 置于 28℃, 180 r·min<sup>-1</sup> 的摇床中振荡培养 18 h。

(2) 发酵上清液的制备: 从种子培养基中按 10% 的接种量接种到 100 mL 发酵培养基, 28℃, 200 r·min<sup>-1</sup>, 振荡培养 48 h。发酵液 5 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 30 min, 留上清液进行抑菌试验。

(3) 平板抑菌试验: 参考文献[20]中的方法进行。采用金黄色葡萄球菌和大肠杆菌作为指示菌, 先往已灭菌且烘干的培养皿中加入 1 mL  $OD_{600} = 0.3$  的指示菌, 再倾注 20 mL 已冷却至 50℃ 左右的固体 NA 培养基, 混合均匀后水平静置至凝固。选用直径为 6 mm 的打孔器打孔, 每板 3 个孔, 每孔进行 10 s 火焰封底, 冷却后在孔里分别加入 50 μL 的 3 种试验菌。将平板置于 4℃ 冰箱中扩散 2 h, 再放入 37℃ 恒温培养箱中培养 24 h, 测量抑菌圈直径。做 3 组平行试验并重复 3 次, 抑菌圈测量值取平均值。

(4) 发酵上清液抑菌试验: 与 1.2.1 (3) 操作方法相同, 只是将 3 种试验菌换作 3 种试验菌发酵上清液注入孔中, 做 3 组平行试验并重复 3 次, 抑菌圈测量值取平均值。

**1.2.2 抗菌肽粗提物制备及抑菌检测** (1) 丙酮沉淀: 参考文献[21]中的方法, 用孔径为 0.22  $\mu\text{m}$  的水系滤膜对 10 mL 发酵上清液进行抽滤。将丙酮和发酵上清液置于冰浴中预冷, 再按发酵上清液:丙酮=1:2 的体积比向发酵上清液中加入丙酮, 冰浴中温和搅拌 10 min, 再用低温离心机于 4  $^{\circ}\text{C}$ , 5 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 30 min, 所得上清液即抗菌肽溶液。丙酮沉淀物用 10 mL 无菌水溶解后进行抑菌试验, 将丙酮沉淀物与上清液作对比, 空白对照为无菌水, 测量抑菌圈直径。做 3 组平行试验并重复 3 次, 测量抑菌圈直径, 取平均值。

(2) 旋转蒸发浓缩: 将离心后所得的上清液放入旋转蒸发器中进行蒸发浓缩, 用无菌水将蒸发浓缩后所得溶液定容至 10 mL, 以保证每个菌种的上清液蒸发浓缩程度相同。用所得浓缩 2 倍的溶液进行抑菌试验, 设置 3 组平行试验并重复 3 次, 取抑菌圈直径平均值。

(3) 抗菌肽梯度稀释: 将所得浓缩溶液用无菌水稀释 2、4、8、16、32、64 和 128 倍后进行抑菌试验, 设置 3 组平行试验并重复 3 次, 测量抑菌圈直径, 取平均值。

**1.2.3 抗菌肽稳定性测定** (1) 热稳定性: 将 100 mL 的抗菌肽溶液分别置于 4、20、40、60、80、100 和 121  $^{\circ}\text{C}$  条件下处理 30 min 后, 进行抑菌试验, 通过测量抑菌圈大小以检测在不同温度下处理后抗菌肽的抑菌活性。试验平行重复 3 次后, 测量抑菌圈直径取平均值。

(2) 蛋白酶稳定性: 用无菌水分别配制胰蛋白酶和木瓜蛋白酶溶液 (浓度为 10  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 用 900  $\mu\text{L}$  的抗菌肽溶液与 100  $\mu\text{L}$  的蛋白酶液混合, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅中水浴 4 h 后再在 100  $^{\circ}\text{C}$  下加热 10 min 灭掉酶活。对照组分为 2 组, 对照组 1 为不加蛋白酶液的抗菌肽溶液在 37  $^{\circ}\text{C}$  处理 4 h 后再经 100  $^{\circ}\text{C}$  加热 10 min, 对照组 2 为不加蛋白酶液的抗菌肽只在 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴 4 h 不经 100  $^{\circ}\text{C}$  加热。处理后进行抑菌试验, 平行并重复 3 次取平均值, 通过抑菌圈大小检测经蛋白酶处理后抗菌肽的抑菌活性。

**1.2.4 应用性试验** (1) 牛奶防腐试验: 参考文献[21]中的方法, 将瓶装新鲜日期的纯牛奶在超净台上进行无菌操作加入到已灭菌的试管中, 每管 15 mL, 再向每支试管中加入 300  $\mu\text{L}$  的大肠杆菌菌液。试管编

号为 0—7 号, 0 号为空白对照, 不加枯草芽孢杆菌 DZSY21 抗菌肽溶液; 1—7 号为试验组, 按照编号顺序分别加入 100、200、300、400、500、600 和 700  $\mu\text{L}$  抗菌肽溶液。振荡混匀后置于 37  $^{\circ}\text{C}$  下培养, 每天观察记录牛奶变质情况。平行并重复 3 次观察腐败的程度。将腐败程度分为 3 个等次, 即完全腐败、一般腐败和无腐败, 观察 7 d 后进行腐败程度统计。

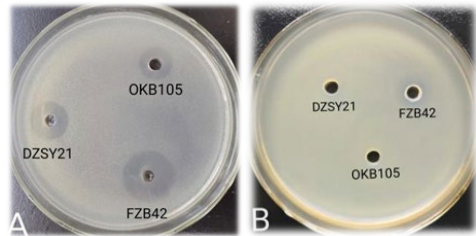
(2) 苹果防腐试验: 参考文献[21]中的方法, 用 75%乙醇为苹果表面消毒后, 用打孔器在其表面打出直径 6 mm、深 10 mm 的伤口, 在伤口处加入 150  $\mu\text{L}$  稀释倍数为 2、4、8 和 16 的枯草芽孢杆菌 DZSY21 抗菌肽溶液, 对照组为无菌水[22]。37  $^{\circ}\text{C}$  条件下观察并记录苹果伤口处病斑出现情况。平行并重复 3 次观察腐败的程度, 统计方法如上。

(3) 猪肉抑菌试验: 将新鲜猪肉平均切分 2 份, 每份约 100 g, 分别放在枯草芽孢杆菌 DZSY21 抗菌肽溶液和无菌水中浸泡 15 min, 捞出沥干后置于已灭菌的培养皿中, 室温条件下放置, 每天观察记录猪肉腐坏情况。平行并重复 3 次观察腐败程度, 统计方法如上。

## 2 结果与分析

### 2.1 枯草芽孢杆菌 DZSY21 及其上清液的体外平板抑菌试验

**2.1.1 细菌对峙试验** 图 1 是平板抑菌试验结果, A 图和 B 图分别是以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌为指示菌。由图 1 可看出, 3 种试验菌对大肠杆菌均有抑制作用, FZB42 对金黄色葡萄球菌有抑制作用, DZSY21 和 OKB105 对金黄色葡萄球菌的抑制效果不明显。

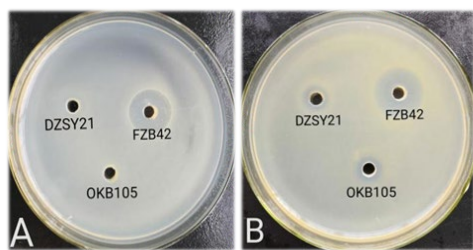


A. 大肠杆菌; B. 金黄色葡萄球菌。

图 1 细菌对峙试验

Figure 1 Bacterial dual-culture experiments

**2.1.2 发酵上清液抑菌试验** 图 2 是发酵上清液抑菌试验结果, A 图和 B 图的指示菌分别为大肠杆菌和金黄色葡萄球菌。表 1 是 3 个试验菌种对两种指示菌产生的抑菌圈直径。结合图 2 与表 1 中的数据可以看出, FZB42 发酵上清液的抑菌效果最好, DZSY21 其次, OKB105 效果最差。



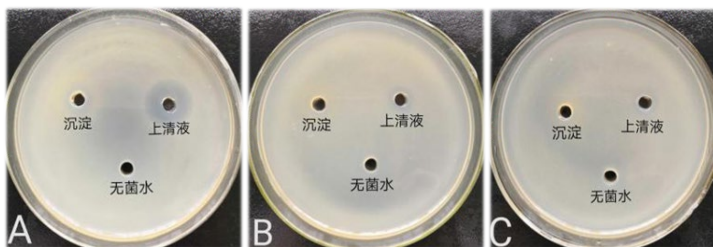
A. 大肠杆菌; B. 金黄色葡萄球菌。

图 2 发酵上清液抑菌试验

Figure 2 Fermentation supernatant bacteriostatic test

## 2.2 抗菌肽的分离与纯化

**2.2.1 丙酮沉淀** 图 3 以金黄色葡萄球菌为指示菌, 3 个试验菌种未经超滤的丙酮沉淀上清液与沉淀物抑菌试验结果, A、B 和 C 图分别为菌种 FZB42、DZSY21 和 OKB105, 以无菌水作为对照。由表 2 可知, 在未经过孔径为  $0.22\ \mu\text{m}$  的滤膜超滤的情况下, 3 个菌种中 FZB42 的抑菌效果最好, DZSY21 其次, OKB105 效果最差; 经过直径为  $0.22\ \mu\text{m}$  的滤膜超滤后, FZB42 和 DZSY21 的抑菌效果变差, 而 OKB105 的抑菌效果无明显变化。由数据



A. FZB42; B. DZSY21; C. OKB105。

图 3 丙酮沉淀上清液与沉淀物抑菌试验

Figure 3 Acetone precipitation supernatant and sediment inhibition experiment

表 2 丙酮沉淀上清液与沉淀物抑菌试验的抑菌圈直径

Table 2 Diameters of inhibition zone in acetone precipitation supernatant and sediment inhibition experiment mm

指示菌	FZB42		DZSY21		OKB105	
	超滤	未超滤	超滤	未超滤	超滤	未超滤
金黄色葡萄球菌	17.34	19.04	8.37	9.06	8.98	7.86

表 3 旋转蒸发浓缩试验中的抑菌圈直径

Table 3 Inhibition zone diameters in rotary evaporation concentration test mm

指示菌	FZB42		DZSY21		OKB105	
	超滤	未超滤	超滤	未超滤	超滤	未超滤
大肠杆菌	22.48	25.55*	9.54	11.91	10.07	8.92
金黄色葡萄球菌	24.15	28.66	11.76	14.00	11.53	9.67

**2.2.3 抗菌肽梯度稀释试验** 图 4 是抗菌肽梯度稀释试验, A 图中指示菌为大肠杆菌, B 图为金黄色葡萄球菌。以抑菌效果最好的未经超滤的 FZB42 为例, 稀释倍数为 32 时就没有出现抑菌效果 (表 4), 说明抗菌肽的抑菌活性呈现浓度依赖关系。

推测可能是因为 FZB42 和 DZSY21 产生的抗菌肽分子量大于 OKB105 产生的抗菌肽分子量, 在超滤过程中由于 FZB42 和 DZSY21 产生的部分抗菌肽未能通过滤膜而导致抗菌肽浓度降低, 而 OKB105 产生的抗菌肽因分子量较小, 能通过滤膜而导致其抗菌肽浓度提高, 具体原因需根据这一现象进行更深入的研究。

表 1 发酵上清液抑菌试验抑菌圈直径

Table 1 Inhibition zone diameter of fermentation

指示菌	supernatant mm		
	FZB42	DZSY21	OKB105
大肠杆菌	17.46	7.26	6.81
金黄色葡萄球菌	19.16	7.92	7.31

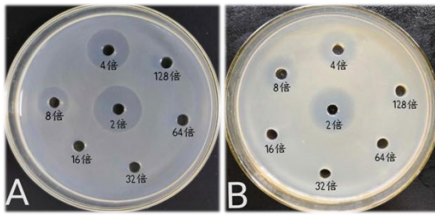
注: \*和\*\*分别为 0.05 及 0.01 水平上的显著性差异。下同。

**2.2.2 旋转蒸发浓缩** 将离心后所得的上清液放入旋转蒸发器中进行蒸发浓缩后, 抑菌试验结果如表 3 所示。未超滤的情况下, FZB42 的抑菌效果最好, DZSY21 其次, OKB105 最差; 超滤后 OKB105 的抑菌效果稍好于 DZSY21, FZB42 的最好。

## 2.3 抗菌肽稳定性测定

**2.3.1 热稳定性** 图 5 是以大肠杆菌为指示菌的抗菌肽热稳定性试验结果, A 图为 FZB42, B 图为 DZSY21, C 图为 OKB105。由表 5 可以看出, 抗菌肽在  $4\sim 60\ ^\circ\text{C}$  之间活性无明显变化,  $80\sim 100\ ^\circ\text{C}$  时

有所降低，121℃时丧失活性。试验结果说明3种抗菌肽热稳定性均较好，在涉及热处理的食品加工过程中活性不易丧失，作为食品防腐剂的应用价值较高。



A. 大肠杆菌; B. 金黄色葡萄球菌。

图4 抗菌肽梯度稀释试验

Figure 4 Antimicrobial peptide gradient dilution experiment

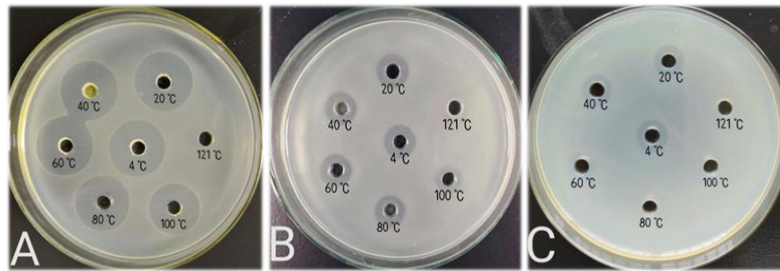
2.3.2 蛋白酶稳定性 图6是抗菌肽蛋白酶稳定性试验结果，以金黄色葡萄球菌为指示菌，图A、B

和C中抗菌肽分别为FZB42、DZSY21和OKB105。由表6中的数据可以得出，3个菌种对胰蛋白酶和木瓜蛋白酶都很敏感，FZB42抗菌肽和DZSY21抗菌肽对胰蛋白酶和木瓜蛋白酶的敏感程度相当，OKB105抗菌肽对胰蛋白酶的敏感程度相较于木瓜蛋白酶更高一点。

表4 抗菌肽梯度稀释试验抑菌圈直径

Table 4 Inhibition zone diameters in antibacterial peptide gradient dilution experiment mm

指示菌	稀释倍数						
	2	4	8	16	32	64	128
大肠杆菌	17.08	14.91	12.2	9.02	0	0	0
金黄色葡萄球菌	21.33	18.23	13.68	9.37	0	0	0



A. FZB42; B. DZSY21; C. OKB105。

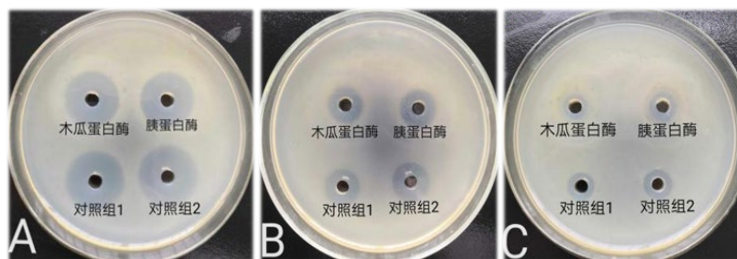
图5 抗菌肽热稳定性试验

Figure 5 Antimicrobial peptide thermal stability experiment

表5 抗菌肽热稳定性试验抑菌圈直径

Table 5 Inhibition zone diameters in antibacterial peptide thermal stability test mm

温度/℃	FZB42		DZSY21		OKB105	
	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌
4	25.34	27.70	11.43	13.44	8.73	9.01
20	25.85*	28.61*	11.86	13.67	8.84	9.32
40	25.62	28.06	11.89*	13.88*	8.96*	9.69*
60	25.46	27.84	11.59	13.33	8.29	8.97
80	24.55	26.61	10.04	12.88	7.16	8.36
100	21.80	23.56	9.15	11.12	6.52	7.81
120	0	0	0	0	0	0



A. FZB42 抗菌肽; B. DZSY21 抗菌肽; C. OKB105 抗菌肽。

图6 抗菌肽蛋白酶稳定性试验

Figure 6 Antimicrobial peptide protease stability experiment

表 6 抗菌肽蛋白酶稳定性试验抑菌圈直径  
Table 6 Inhibition zone diameters in antibacterial peptide protease stability test

蛋白酶	FZB42		DZSY21		OKB105	
	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌
胰蛋白酶	17.62	21.14	8.14	13.48	6.98	10.16
木瓜蛋白酶	17.05*	20.84*	7.48*	12.40*	6.25*	8.98*
对照组 1	19.42	23.56	9.26	14.25	7.24	10.79
对照组 2	19.69	24.27	9.90	15.14	7.66	11.29

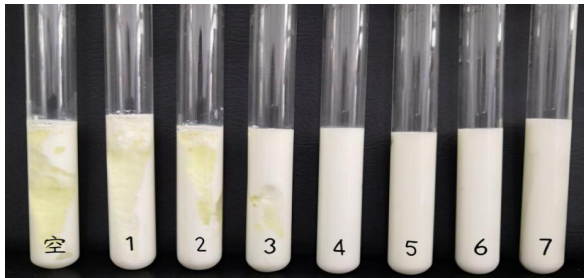


图 7 枯草芽孢杆菌 DZSY21 抗菌肽牛奶防腐试验

Figure 7 *B. subtilis* DZSY21 antibacterial peptide applied in milk preservation experiment

## 2.4 应用性试验

**2.4.1 牛奶防腐试验** 枯草芽孢杆菌 DZSY21 抗菌肽牛奶防腐试验结果 (图 7) 显示, 在 37 °C 条件下放置 7 d 后, 空白组中的牛奶已经明显变质即完全腐败, 出现分层现象, 分层后的液体为淡黄色, 打

开试管塞能闻到一股奶制品特有的酸味。1、2 和 3 号试管由于加入的抗菌肽较少, 也出现了变质即一般腐败, 但变质程度随着抗菌肽添加量的增加而降低, 且后面的试管中牛奶未出现分层现象, 打开试管塞后无异味, 几乎未变质即无腐败。

**2.4.2 苹果防腐试验** 枯草芽孢杆菌 DZSY21 抗菌肽苹果防腐试验结果 (图 8) 显示, 枯草芽孢杆菌 DZSY21 抗菌肽溶液经过梯度稀释后在苹果上打孔进行防腐试验。图 8 中从左至右为空白组和稀释倍数分别为 2、4、8 和 16 倍的试验组, 可以看出, 稀释 2 倍后打孔的苹果品相良好, 无病斑, 稀释 4、8 和 16 倍后打孔的苹果上出现的病斑随着稀释倍数的增加而扩大, 空白组的病斑直径最大。试验结果说明枯草芽孢杆菌 DZSY21 抗菌肽的抑菌效果较好, 有较强的抑菌活性。



图 8 枯草芽孢杆菌 DZSY21 抗菌肽苹果防腐试验

Figure 8 Apple antisepsis experiment of *B. subtilis* DZSY21 antibacterial peptide



图 9 枯草芽孢杆菌 DZSY21 抗菌肽鲜猪肉防腐试验

Figure 9 Antibacterial experiment of *B. subtilis* DZSY21 antibacterial peptide in fresh pork

**2.4.3 鲜猪肉防腐试验** 图 9 为枯草芽孢杆菌 DZSY21 抗菌肽鲜猪肉防腐试验结果。图 9 (a) 为无菌水浸泡处理的对照组, 图 9 (b) 为抗菌肽处理的试验组。可以看出, 在室温条件下放置 3 d 后, 对照组颜色明显变深, 表面出现黄色斑点并伴有恶

臭, 出现完全腐败的现象; 而试验组品相相对较好, 无明显腐坏现象。

## 3 讨论与结论

在试验中, 与阳性对照 FZB42 抗菌肽相比, DZSY21 抗菌肽抑菌效果稍弱, 与阴性对照 OKB105 相比, DZSY21 抑菌效果较好。在以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌为指示菌的抑菌试验中, 3 种试验菌对大肠杆菌的抑制效果均明显好于金黄色葡萄球菌。在发酵上清液抑菌试验中, 3 种试验菌对指示菌均有抑制作用且对金黄色葡萄球菌的抑制作用强于对大肠杆菌的抑制作用。表明枯草芽孢杆菌 DZSY21 对致病菌均有抑制作用。

在丙酮沉淀上清液与沉淀物抑菌试验中发现 FZB42 的沉淀物也有较强抑菌活性, 可能是丙酮沉

淀其他杂蛋白的过程中沉淀了一部分抗菌肽或者沉淀中含有其他抗菌成分,但因沉淀物中含有较多杂蛋白,故只保留上清液进行后续纯化。将上清液用直径为 0.22  $\mu\text{m}$  的滤膜超滤后,发现 FZB42 和 DZSY21 的抗菌肽浓度降低,而 OKB105 的抗菌肽浓度不变,推测是因为在超滤过程中部分 FZB42 和 DZSY21 的抗菌肽未能全部通过滤膜,OKB105 的抗菌肽因分子量较小故全部通过了滤膜,但具体原因需深入对分子量进行研究。

3 个菌种产生的抗菌肽均有良好的热稳定性,经 100  $^{\circ}\text{C}$  加热 30 min 后抗菌效果仅有小幅度降低,但仍具有良好的抑菌活性,因此推测作为防腐剂在食品热加工处理过程中活性不易丧失。在蛋白酶稳定性试验中,3 种抗菌肽对胰蛋白酶和木瓜蛋白酶都很敏感。相较于木瓜蛋白酶,对胰蛋白酶的敏感程度更高,因此作为防腐剂在日常生活中比较稳定。在牛奶防腐试验中,37  $^{\circ}\text{C}$  放置 7 d 后,空白对照组的牛奶已明显变质,出现分层现象并伴有酸味,而添加了枯草芽孢杆菌 DZSY21 抗菌肽的试验组除添加量较少的几组外,几乎未出现腐坏现象。在苹果、鲜猪肉等食品防腐试验中,经枯草芽孢杆菌 DZSY21 抗菌肽处理后的试验组品相均明显好于对照组,表明该抗菌肽具有良好的防腐效果。

通过阴阳对照细菌体外抑菌试验、抗菌肽抑菌试验以及稳定性试验,结果表明枯草芽孢杆菌 DZSY21 抗菌肽作为天然食品防腐剂,具有良好的热稳定性和抑菌活性,应用前景广泛,但要通过进行临床试验以进一步研究 DZSY21 抗菌肽应用于食品中是否对人体安全无毒。

## 参考文献:

[1] 闫杨,刘月静,陈芳. 枯草芽孢杆菌的应用现状概述[J]. 生物学教学, 2019, 44(2): 2-3.  
 [2] 何湘鹃,林震宇,原丽红,等. 抗菌肽的现状与未来[J]. 热带医学杂志, 2019, 19(2): 253-256.  
 [3] 汪吴晶,高金燕,佟平,等. 抗菌肽的作用机制、应用及改良策略[J]. 动物营养学报, 2017, 29(11): 3885-3892.  
 [4] 朱江. 抗菌肽对动物的影响及发展[J]. 畜牧兽医科技信

息, 2019(1): 31.

- [5] 吴骏晨,王美玲,朱赟程,等. 枯草芽孢杆菌主要抗菌物质研究进展[J]. 畜牧与饲料科学, 2017, 38(5): 67-70.  
 [6] FAHIM S, DIMITROV K, GANCEL F, et al. Impact of energy supply and oxygen transfer on selective lipopeptide production by *Bacillus subtilis* BBG21[J]. Bioresour Technol, 2012, 126: 1-6.  
 [7] 田秋月,刘杰,张亮,等. *Bacillus subtilis* S21 产抗菌脂肽分离鉴定及半固态发酵工艺初探[J]. 饲料工业, 2019, 40(2): 40-46.  
 [8] 邹秋霞,任佐华,高诗涵,等. 枯草芽孢杆菌 YN145 分离鉴定及抑菌活性[J]. 中国生物防治学报, 2017, 33(3): 421-426.  
 [9] 王为栋,孙海娟. 抗菌肽生物活性及其作用机理研究进展[J]. 当代畜牧, 2018(33): 32-34.  
 [10] 王亚平,余维维,秦梦茹,等. 抗菌肽的作用机理及应用[J]. 湖北农业科学, 2018, 57(5): 9-13, 70.  
 [11] 葛琳,刘晓志,高健,等. 抗菌肽抗菌机制及与抗生素协同作用的研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(12): 1474-1481.  
 [12] 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.  
 [13] 张静,任锦帅,孙国虎,等. 全株青贮玉米饲喂育肥猪效果试验研究[J]. 中国畜牧业, 2021(9): 37-39.  
 [14] 张炜,杭柏林,司素锦,等. 抗菌肽 BSN-37 的抑菌活性及其稳定性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(1): 287-295.  
 [15] 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.  
 [16] 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.  
 [17] 王宏亮,李昂,那杰. 抗菌肽在果蔬保鲜中的应用[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(3): 238-240.  
 [18] 王玲. 抗菌肽的研究现状及在食品防腐保鲜中的应用前景[J]. 食品工业, 2011, 32(8): 97-99.  
 [19] 汪吴晶,高金燕,佟平,等. 抗菌肽的作用机制、应用及改良策略[J]. 动物营养学报, 2017, 29(11): 3885-3892.  
 [20] 谭才邓,朱美娟,杜淑霞,等. 抑菌试验中抑菌圈法的比较研究[J]. 食品工业, 2016, 37(11): 122-125.  
 [21] 樊陈,高兆建,张桂英,等. 地衣芽孢杆菌抗菌肽的纯化及抗菌特性分析[J]. 中国农学通报, 2013, 29(33): 313-318.  
 [22] 高兆建,樊陈,鞠民友,等. 枯草芽孢杆菌抗菌肽在食品防腐中的应用性研究[J]. 徐州工程学院学报(自然科学版), 2013, 28(2): 67-72.