

## 产抗真菌肽的爱媛类芽孢杆菌 HD 的筛选、鉴定 及发酵条件优化

鲁雷震<sup>1</sup>, 宏丹<sup>1</sup>, 封成玲<sup>1</sup>, 贾紫伟<sup>1</sup>, 周景波<sup>1</sup>, 宁亚维<sup>1</sup>, 贾英民<sup>2</sup>, 王志新<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>河北科技大学食品与生物学院 石家庄 050018

<sup>2</sup>北京工商大学食品与健康学院 北京 100048)

**摘要** 目的:从土壤中筛选产抗真菌肽的菌株,并通过优化其发酵条件提高产量。方法:用琼脂扩散法筛选菌株;通过形态观察、理化测定和 16S rDNA 序列分析鉴定菌株;采用蛋白酶处理、硫酸铵沉淀、膜透析、热稳定性研究确定抑菌物质;采用单因素和正交试验优化其发酵条件,并在发酵罐中放大验证。结果:获得 1 株产抗真菌物质的菌株,鉴定为爱媛类芽孢杆菌,命名为爱媛类芽孢杆菌(*Paenibacillus ehimensis*)HD。所产抑菌物质为小分子多肽,分子质量约 1 ku,其抑菌谱广,能抑制多株腐败真菌和致病细菌。爱媛类芽孢杆菌 HD 发酵产抗真菌肽最佳条件为:甘露醇 2.5 g/L, MgSO<sub>4</sub> 3.0 g/L, 鱼蛋白胨 10 g/L, 初始 pH 7.5, 装液量 40 mL/250 mL, 接种量 1×10<sup>8</sup> CFU/mL, 摇床转速 220 r/min, 发酵温度 32 ℃, 发酵时间 32 h。在该条件下,抗真菌肽效价为 324.92 AU/mL,比优化前提高了 3.63 倍。在 5 L 和 30 L 发酵罐中进行发酵验证,抗真菌肽效价分别为 371.01 AU/mL 和 364.05 AU/mL,产量达到最高时的时间提前至 20 h。结论:爱媛类芽孢杆菌 HD 所产抗菌肽具有较好抑菌作用,且经发酵优化与放大后产量稳定。

**关键词** 爱媛类芽孢杆菌; 抗真菌肽; 筛选; 鉴定; 发酵优化

**文章编号** 1009-7848(2022)03-0212-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.03.024

有害真菌会导致食品腐败,常见的食物腐败真菌主要包括青霉、曲霉、根霉等丝状真菌,部分菌株还会产生真菌毒素,如黄曲霉毒素、伏马毒素和脱氧雪腐镰刀菌烯醇等,对许多食品(乳制品、肉制品、烘焙食品及其衍生产品等)造成污染<sup>[1-2]</sup>。目前,应对有害真菌造成的食物腐败,使用最多的是添加化学防腐剂。随着人们生活水平的提高,对化学防腐剂的安全性有所担忧。开发安全、高效的生物源抑真菌物质成为发展的迫切需求。

抗真菌肽是一种具有双亲性的小分子多肽,一般由 10~50 个氨基酸组成,是能够抑制真菌侵害的一种多肽<sup>[3]</sup>。它可作为一种安全、高效的真菌抑制剂作用于食品防腐,并且独特的抑真菌机理也解决了其它药物导致的真菌耐药性的问题<sup>[4]</sup>。瑞典科学家 Boman<sup>[5]</sup>首次从惜古天蚕中发现小分子抗菌肽,研究发现其具有抗真菌作用。此后,人们先后从不同的生物体内发现抗真菌肽,包括植物、

动物和微生物,还有人工合成抗真菌肽<sup>[6]</sup>。微生物来源抗菌肽具有成本低、无残留、无毒害等优点,并且微生物是一个巨大的宝库,抗真菌肽的来源异常丰富,筛选获得具有高效、广谱抑真菌特性的微生物一直是研究者关注点。

目前分泌抗真菌肽的菌株大多数为芽孢杆菌属微生物,包括枯草芽孢杆菌、多粘芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌等。例如:于杰等<sup>[7]</sup>从海南省香蕉根部土壤中分离得到一株枯草芽孢杆菌 B25,能有效抑制香蕉枯萎病镰刀菌以及其它植物病原真菌。钱英等<sup>[8]</sup>从土壤中筛选分离得到 1 株解淀粉芽孢杆菌 BW-13,对酿酒酵母和植物病原真菌灰霉均具显著的抑菌活性。Ji 等<sup>[9]</sup>从植物根际土壤样品中筛选得到 1 株芽孢杆菌,所产抗真菌蛋白在植物病原真菌的生物防治中具有潜在应用价值。目前这些微生物及其所产抗菌肽主要用于生物防治,而用于食品防腐的较少,此外,所研究的抗真菌肽产量较低,极少人优化了发酵条件。基于此,本研究从江苏、河北土壤样品中筛选具有产抗真菌肽的菌株,优化其发酵条件,提高其发酵产量,为抗真菌肽的资源开发和工业化生产与应用提供参考。

**收稿日期:** 2021-03-07

**基金项目:** 河北省自然科学基金项目(C2020208014);河北省重点研发计划项目(20327124D)

**作者简介:** 鲁雷震(1994—),男,硕士生

**通信作者:** 王志新 E-mail: zhxwang0311@163.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

土壤取自河北、江苏等地;营养琼脂培养基(NA)、营养肉汤培养基(LB)、马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA),北京奥博星生物技术有限公司;胰蛋白酶、胃蛋白酶、过氧化氢酶、蛋白酶 K、蛋白酶 E,北京 Solarbio 公司;碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶,诺维信生物技术有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

超净工作台(SW-CJ-1FD),苏州安泰空气技术有限公司;恒温培养箱(ZSD-A1160)、恒温培养振荡器(ZHWY),上海智城分析仪器制造公司;立式蒸汽灭菌锅(YXQ-LS-50SII),上海博迅有限公司;分光光度计(Evolution 220),美国 Thermo 公司;冷冻离心机(SIGMA3-18K),德国 Sigma 公司;全自动菌落计数仪(Scan1200),法国 Interscience 公司;牛津杯(10 mm×7.8 mm×6 mm),新乡市新华检测仪器厂;发酵罐(5 L),上海保兴生物设备工程有限公司;发酵罐(30 L),上海国强生化工程设备有限公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 菌株筛选与鉴定 将土壤样品进行研磨,用生理盐水进行梯度稀释,然后涂布到产黄青霉指示菌平板上,28℃培养,筛选出透明圈较大的菌株。然后将初筛获得的菌株进行发酵,分别以总状毛霉、黄曲霉、白假丝酵母作为指示菌,采用琼脂扩散法<sup>[10]</sup>对发酵上清液进行抑菌活性测定。

参照《伯杰细菌鉴定手册》<sup>[11]</sup>及《微生物学实验教程》<sup>[12]</sup>中的方法,对菌株进行生理生化鉴定。由上海生物工程股份有限公司进行 16S rDNA 序列同源性鉴定,将获得的测序结果利用 NCBI 进行 BLAST 分析,利用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树,确定菌株的种属关系。

#### 1.3.2 抑菌物质的确定

1.3.2.1 过氧化氢的排除 参考张艾青等<sup>[13]</sup>的方法进行并加以改进,以未处理的发酵液作为对照,琼脂扩散法测定抑菌活性的变化。

1.3.2.2 蛋白酶处理 分别将胰蛋白酶、胃蛋白酶、蛋白酶 E、蛋白酶 K、过氧化氢酶、木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶等用各自最适 pH 值缓冲液配制

成 10 mg/mL 的酶液,与发酵液等量混合,在各种酶最适温度下温浴 2 h,灭酶 5 min,pH 值调至初始值。以未处理的发酵液作为对照,琼脂扩散法测定蛋白酶处理后的抑菌活性。

1.3.2.3 硫酸铵沉淀 根据硫酸铵饱和度常用表<sup>[14]</sup>称取对应的克数,使硫酸铵饱和度分别为 35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,4℃下静置 12 h,然后 4℃、8 000 r/min 离心 20 min,获得沉淀,用 pH 7.0 的磷酸盐缓冲液定容至原体积,测定其抑菌活性,以未处理的上清液和相同盐离子浓度的磷酸盐缓冲液作为对照。

1.3.2.4 膜透析分离处理 将 1.3.2.3 节盐析得到的粗提液分别装入截留分子质量为 0.5,1,2 和 3.5 ku 的透析袋中,用 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0,0.05 mol/L)进行透析,以透析前的粗提液作为对照,测定透析处理后样品的抑菌活性。

1.3.2.5 热稳定性分析 将发酵液分别置于 4,20,30,37,50,60,80,100℃处理 2 h,然后放置至室温。以未处理的发酵液作为对照,测定不同温度处理发酵液的抑菌活性。

1.3.3 抑菌谱的测定 采用琼脂扩散法测定爱媛类芽孢杆菌 HD 发酵上清液对真菌<sup>[10]</sup>和细菌<sup>[15]</sup>的抑制作用。

1.3.4 菌株生长曲线的测定 采用比浊法测定爱媛类芽孢杆菌 HD 生长曲线。每隔 2 h 进行取样,在 OD<sub>600</sub> 处测定吸光度值,绘制生长曲线。

1.3.5 发酵液效价的测定 参考王广贤<sup>[16]</sup>的方法进行发酵液效价的测定。

#### 1.3.6 发酵培养基的优化

1.3.6.1 碳源优化 碳源选择液糖、果糖、葡萄糖、麦芽糖、壳聚糖、乳糖、环糊精、蔗糖、甘露醇和可溶性淀粉,添加量为 1 g/100 mL,以不添加上述碳源的 LB 培养基作为对照。确定最佳碳源后,对其最适添加量进行探究。添加量设置为 0.5,1,1.5,2,2.5,3,4,5 g/100 mL。采用琼脂扩散法测定发酵上清液的抑菌活性,按照 1.3.5 节的方法计算发酵液的效价。

1.3.6.2 氮源优化 氮源选择胰蛋白胨、牛肉膏、蛋白胨、酪蛋白胨、酵母膏、酵母粉、鱼蛋白胨、白色玉米浆、尿素、硫酸铵和发酵玉米浆。对照选择为以添加 0.5 g/100 mL 甘露醇和 1 g/100 mL NaCl

的培养基。氮源添加量设置为 0.5, 1, 1.5, 2 g/100 mL。

1.3.6.3 无机盐的优化 无机盐选择  $MgSO_4$ 、 $FeCl_3$ 、 $Fe_2(SO_4)_3$ 、 $CaCl_2$ 、 $NaCl$ 、 $KCl$  和  $KH_2PO_4$ , 添加量为 0.1 g/100 mL, 对照选择为不添加金属离子的培养基 (0.5 g/100 mL 甘露醇、1.0 g/100 mL 鱼蛋白胨)。无机盐添加量设置为 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 g/100 mL。

1.3.6.4 正交试验 选择甘露醇、鱼蛋白胨、 $MgSO_4$  进行三因素三水平正交试验, 确定最优培养基组成。

1.3.7 发酵条件的优化

1.3.7.1 单因素优化 采用控制变量法, 其它条件不变, 选择不同的菌龄 (12, 18, 24, 36 h)、发酵培养基初始 pH 值 (5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9)、装液量 (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mL/250 mL)、接种量 (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3,  $3.5 \times 10^8$  CFU/mL)、发酵温度 (28, 30, 32, 34, 37 °C)、转速 (180, 200, 220, 240 r/min)、发酵时间 (6, 12, 18, 24, 36, 48, 60, 72 h), 利用琼脂扩散法进行测定发酵液活性并计算效价。

1.3.7.2 正交试验 选择对发酵时间、接种量、装液量、初始 pH 值进行四因素四水平正交试验, 确定最优发酵条件。

1.3.8 发酵放大验证 以摇瓶发酵的最优培养基为初始培养基, 选用工业级碳氮源, 甘露醇 2.5 g/L, 鱼蛋白胨 10 g/L,  $MgSO_4$  3 g/L。发酵条件为: 300 r/min, 装液量 50%, 接种量  $2.5 \times 10^8$  CFU/mL, 通气量 9 L/min, 发酵温度 32 °C。在 5, 30 L 发酵罐中分别进行爱媛类芽孢杆菌 HD 抗真菌肽发酵生产的放大验证。

1.3.9 数据处理与分析 上述试验每组进行 3 个平行, 数据取其平均值, 结果表示为“平均值±标准差”, 采用 Origin8.0 软件进行图形绘制, SPSS statistics 20 软件进行数据分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株筛选结果

从河北、江苏等地采集到 26 个土壤样品, 经过初筛, 获得 5 株具有抑菌效果的菌株, 结果如表 1 所示。菌株 HD 和 GL 对产黄青霉的抑菌活性最好, 其次为菌株 MH、XM 和 YM。

进一步对菌株 HD、GL 进行复筛, 结果如表 2 所示。菌株 HD 的抑菌活性稍高于菌株 GL。因此, 本研究选择菌株 HD 作为后续研究的菌株。

表 1 不同菌株对产黄青霉抑菌圈大小比较

Table 1 Comparison of inhibition zone of different strains against *Penicillium chrysogenum*

菌株编号	抑菌圈直径/mm
MH	11.0 ± 0.147
XM	8.60 ± 0.125
YM	9.85 ± 0.153
HD	15.50 ± 0.146
GL	14.35 ± 0.214

表 2 菌株对不同真菌抑菌圈大小比较

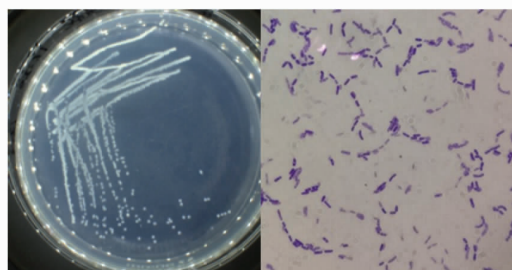
Table 2 Comparison of inhibition zone of strains against different fungi

菌株编号	抑菌圈直径/mm		
	总状毛霉	黄曲霉	白假丝酵母
HD	15.25 ± 0.145	14.36 ± 0.135	17.25 ± 0.104
GL	13.85 ± 0.105	11.36 ± 0.214	16.38 ± 0.105

### 2.2 菌株鉴定结果

2.2.1 菌株形态学及生理生化鉴定结果 37 °C 条件下, 菌株 HD 在 NA 培养基上培养 24 h 后菌落形态如图 1a 所示, 菌株 HD 的菌落形态较大, 呈圆形, 表面湿润, 菌落隆起, 颜色为乳白色。经革兰氏染色观察, 结果如图 1b 所示, 菌体呈短杆状, 有芽孢, 颜色为紫色, 为革兰氏阳性菌。

菌株 HD 经过核糖、葡萄糖、糖原、麦芽糖、N-乙酰-葡萄糖胺等生理生化试验为阳性, 经过鼠李



(a) 菌落形态图 (b) 细胞形态图

图 1 菌株 HD 形态学特征

Fig.1 Morphological characteristics of strain HD

糖、D-阿拉伯糖、L-阿拉伯糖等生理生化试验为阴性。与王曦<sup>[17]</sup>报道的爱媛类芽孢杆菌的理化鉴定结果一致。

2.2.2 分子生物学鉴定结果 由上海生物工程有限公司进行 16S rDNA 测序, 序列长度为 1 374 bp, 将其提交 GenBank, 登录号为 MT186159。

构建的系统发育树结果所示, 菌株 HD 与爱

媛类芽孢杆菌 (*Paenibacillus ehimensis*) HNSQJYH 130 和爱媛芽孢杆菌 (*Bacillus ehimensis*) KCTC3747 同源率为 99% (图 2)。进一步与爱媛类芽孢杆菌的标准菌株进行比对, 发现菌株 HD 与爱媛类芽孢杆菌 KCTC3748T (AY116665) 的同源率为 98.76%。

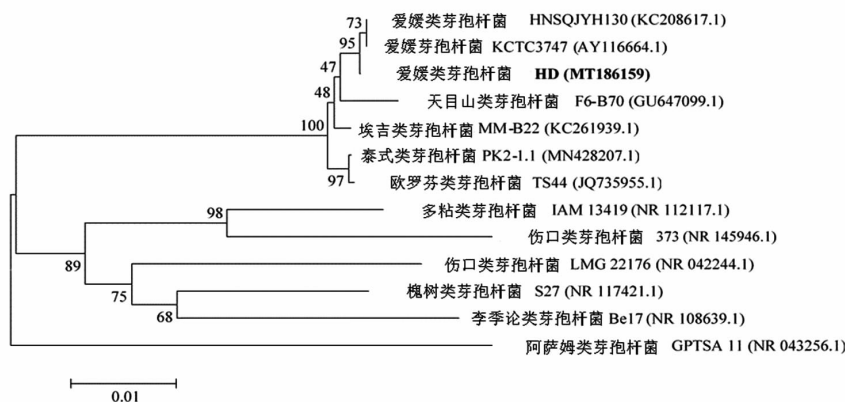


图 2 爱媛类芽孢杆菌 HD 菌株 16S rDNA 系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of the 16S rDNA sequence of *P. ehimensis* HD

综合 16S rDNA 序列比对结果、生理生化特性以及形态特征, 鉴定该菌株为爱媛类芽孢杆菌, 命名为爱媛类芽孢杆菌 HD。

### 2.3 抑菌物质分析结果

2.3.1 过氧化氢的排除 细菌在发酵代谢过程中, 可能产生过氧化氢。为了排除过氧化氢的抑菌作用, 对发酵上清液进行热处理和与过氧化氢酶反应后测定其抑菌活性, 结果如图 3a 所示。图 3a 显示, 发酵上清液经过处理后, 抑菌物质的活性有少量损失, 说明发酵上清液的抑菌物质中可能存在极少量的过氧化氢。

2.3.2 蛋白酶处理 爱媛类芽孢杆菌所产抑菌物质主要有水解酶、多肽、多糖, 其中酶蛋白和多肽往往能被蛋白酶分解。蛋白酶处理的结果如图 3b 所示, 爱媛类芽孢杆菌 HD 所产抑菌物质对蛋白酶 E 敏感, 处理后完全失活; 对碱性蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶和过氧化氢酶较敏感, 抑菌效价回收率分别为 73.15%, 71.78%, 92.70% 和 90.96%; 对蛋白酶 K 和木瓜蛋白酶具有较好的耐受性, 活性基本没有损失。陈文俊<sup>[18]</sup>发现多粘类芽孢杆菌产生的抗菌蛋白对蛋白酶 K 也具有很强的耐受

性; 短芽孢杆菌 YNP-1<sup>[19]</sup>产生的抗菌蛋白对蛋白酶 K 和木瓜蛋白酶也不敏感。蛋白酶处理结果初步表明, 爱媛类芽孢杆菌 HD 所产抑菌物质主要为蛋白质或多肽。

2.3.3 硫酸铵沉淀处理 收集蛋白和多肽时一般采用硫酸铵沉淀法。爱媛类芽孢杆菌 HD 发酵上清液采用不同饱和度的硫酸铵进行沉淀, 对沉淀物的抑菌活性进行检测, 结果如图 3c 所示。当硫酸铵饱和度为 35% 时有抑菌物质析出, 当饱和度为 70% 时抑菌物质基本上全部析出, 上清液对指示菌没有抑菌性, 此时沉淀物的抑菌活性达到最大; 进一步加大硫酸铵浓度, 只是杂蛋白析出, 对抑菌活性没有明显的增强, 最终选择 70% 饱和度的硫酸铵进行蛋白沉淀。通过硫酸铵沉淀试验进一步验证爱媛类芽孢杆菌 HD 所产抑菌物质主要为蛋白或多肽类物质。

2.3.4 膜透析分离处理 膜透析处理用于脱盐和不同分子质量物质的初步分离。选用不同截留分子质量的透析袋对 70% 饱和度的硫酸铵沉淀物进行透析处理, 结果如表 3 所示。透析袋截留分子质量为 3.5 ku 时, 透析后的液体没有抑菌活性。截留

分子质量为 0.5 ku 时,抑菌效价回收率为 83.57%。原因可能是为了维持溶液的渗透压平衡,缓冲液中的小分子物质进入透析袋内造成抑菌物质的稀释,或者是部分具有抗菌活性的小分子通过了滤膜,降低了抗菌物质的整体活性。

2.3.5 热稳定性 经过不同的温度处理,爱媛类芽孢杆菌 HD 发酵上清液的抑菌结果如图 3d 所示。在 4~37℃条件下处理,抑菌活性无损失;在 50~100℃处理,抑菌活性分别损失了 27.54%,36.54%,46.49%和 45.47%,说明抑菌物质具有一定的热稳定性,进一步证明主要为小分子物质。

表 3 透析前、后抑菌活性回收率

Table 3 Recovery of antifungal activity before and after dialysis

透析袋截留分子量/ku	效价回收率/%
0.5	83.57 ± 0.147
1	10.21 ± 0.076
2	6.99 ± 0.135
3.5	0

由上述结果推断,爱媛类芽孢杆菌 HD 所产抑菌物质主要为小分子多肽,分子质量在 1 ku 左右。

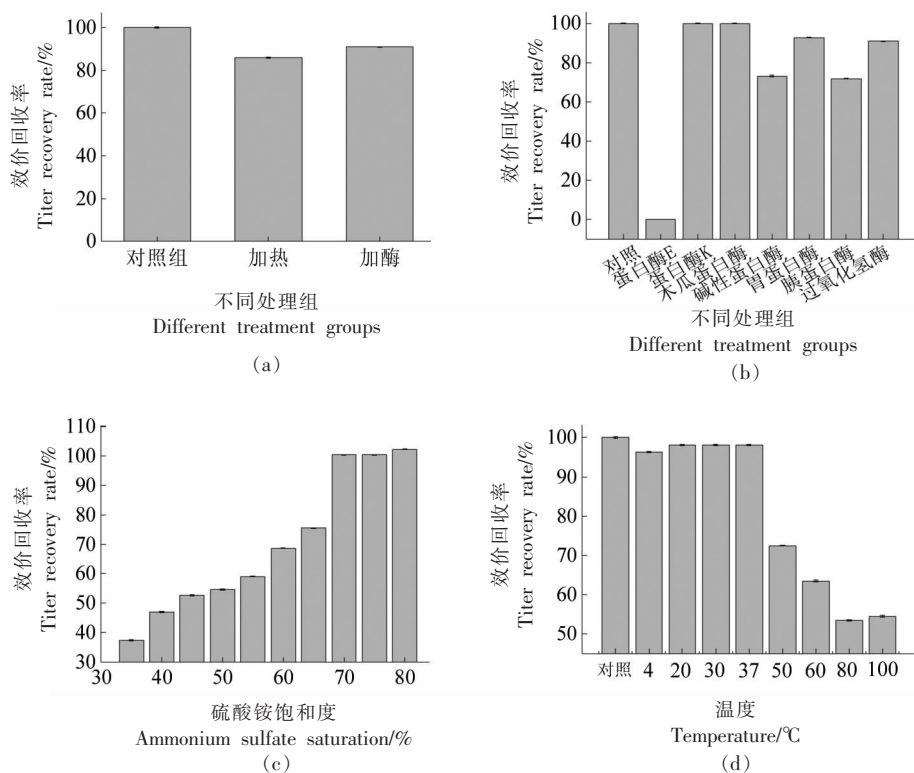


图 3 爱媛类芽孢杆菌 HD 所产抑菌物质的确定

Fig.3 Determination of antifungal substances produced by *P. ehimensis* HD

## 2.4 抑菌谱

爱媛类芽孢杆菌 HD 发酵液的抑菌谱测定结果如表 4 所示。从表 4 中可以看出,发酵上清液对所测定的菌株均具有抑制作用,且对真菌的抑菌效果大于细菌。研究报道显示,目前分离出的菌株单独抑制细菌或真菌的较多,对两类菌均存在抑制作用的较少。白杰等<sup>[20]</sup>分离得到的株枯草芽孢杆菌 B<sub>3</sub> 只能抑制大肠杆菌和沙门氏菌。王曦<sup>[17]</sup>分

离得到的爱媛类芽孢杆菌 NJ2008 也只能抑制大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌等多种细菌。Zhao 等<sup>[21]</sup>分离得到的芽孢杆菌 BH072,能够抑制黑曲霉、腐霉菌、灰霉菌等真菌,对细菌无抑制作用。因此,本研究筛选获得的爱媛类芽孢杆菌 HD,其所产抗真菌肽的抑菌谱相对较广,具有一定的研究与应用价值。

表 4 爱媛类芽孢杆菌 HD 抗菌肽的抑菌谱  
Table 4 Antimicrobial spectrum of antimicrobial peptides produced by *P. ehimensis* HD

指示菌		发酵液抑菌圈直径/mm
真菌	产黄青霉	18.45 ± 0.071
	黑曲霉	16.81 ± 0.014
	总状毛霉	17.50 ± 0.071
	黄曲霉	13.50 ± 0.212
	白假丝酵母	18.75 ± 0.035
	裂殖酵母	18.25 ± 0.035
革兰氏阳性菌	金黄色葡萄球菌	15.25 ± 0.106
	单核细胞增生李斯特氏菌	12.05 ± 0.071
	蜡样芽孢杆菌	13.35 ± 0.106
	枯草芽孢杆菌	13.50 ± 0.212
革兰氏阴性菌	大肠杆菌	17.05 ± 0.106
	沙门氏菌	11.70 ± 0.212
	荧光假单胞菌	12.20 ± 0.071

### 2.5 菌株生长曲线

菌株生长曲线的测定对于分析目标菌株繁殖代谢具有重要的意义。如图 4 所示,爱媛类芽孢杆菌 HD 在培养 4 h 后,吸光度值明显上升。在 4~16 h 时间段内,增长较快,为对数生长期。在 16~30 h 时间段内,变化趋势不大,进入稳定期。30 h 后菌体进入生长衰亡期。

### 2.6 优化的发酵培养基

2.6.1 碳源 培养基中的碳源是提供菌体生长的主要养料,为细胞碳骨架和代谢产物的形成提供原料及能量。图 5a 显示,当可溶性淀粉作为碳源

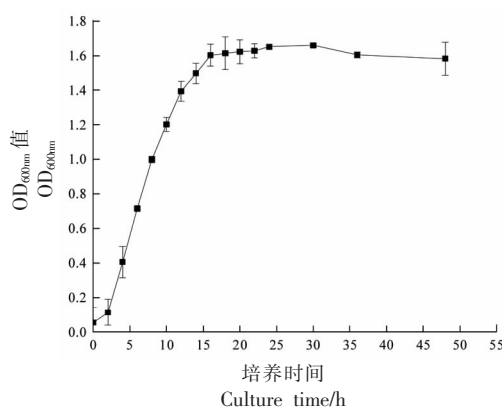


图 4 爱媛类芽孢杆菌 HD 的生长曲线

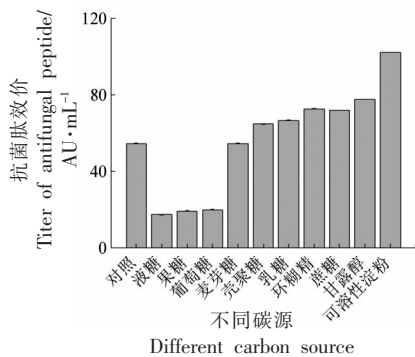
Fig.4 The growth curve of *P. ehimensis* HD

时,发酵液抗真菌肽产量最高。但在培养基高温灭菌的过程中,可溶性淀粉容易老化。以甘露醇、环糊精和蔗糖作为碳源时,抗真菌肽产量也明显高于对照组,因此,在实际应用中可以选择这 3 个物质作为碳源。

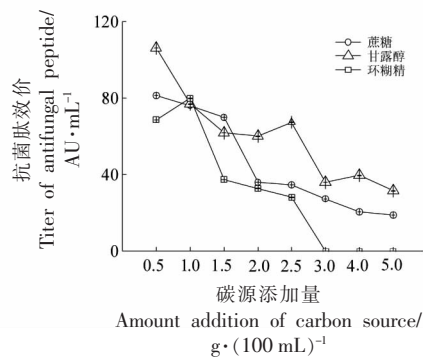
本研究进一步优化了甘露醇、环糊精和蔗糖的添加量,结果如图 5b 所示。甘露醇对抗真菌肽的合成优于环糊精和蔗糖,当甘露醇添加量为 0.5 g/100 mL 时,抗真菌肽的抑菌活性最好,产量最高。随着甘露醇添加量的提高,抑菌效价反而降低,可能是随着甘露醇添加量的增大,逐渐形成了底物反馈抑制,从而影响抗真菌肽的代谢分泌。

2.6.2 氮源 氮源主要用于构成细胞物质以及代谢物氮素的来源。图 5c 的氮源优化结果显示,无机氮源尿素和硫酸铵不利于抗真菌肽的产生。当玉米浆粉作为氮源时,抗真菌肽的效价最高,其次是蛋白胨、胰蛋白胨和鱼蛋白胨。

进一步优化了上述 4 种氮源的添加量,结果



(a)



(b)

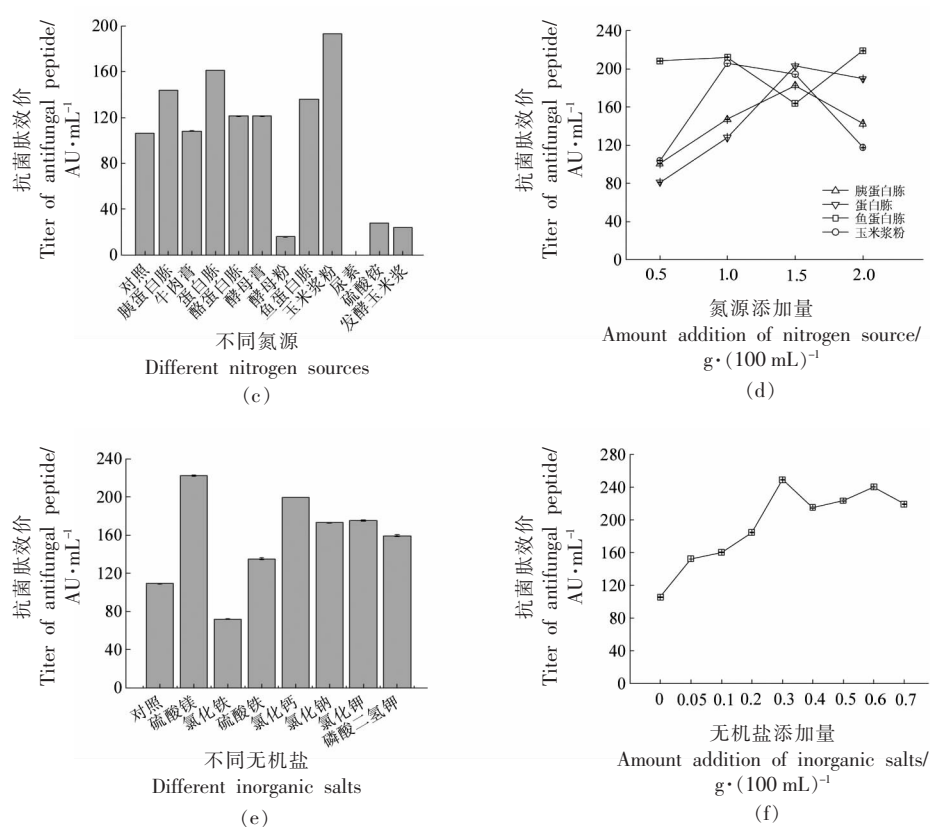


图5 爱媛类芽孢杆菌 HD 发酵培养基的优化

Fig.5 Optimization of fermentation medium of *P. ehimensis* HD

如图 5d 所示。当鱼蛋白胨的添加量为 1 g/100 mL 时,抗真菌肽的活性最高,且鱼蛋白胨也是工业级的氮源,具有一定的经济效益。

**2.6.3 无机盐** 无机盐是微生物生长代谢过程中不可缺少的营养物质,无机盐优化的结果如图 5e 所示。图 5e 结果显示,发酵培养基中加入 MgSO<sub>4</sub> 对抗真菌肽合成的促进作用最为明显。进一步优化 MgSO<sub>4</sub> 的添加量,结果如图 5f 所示。当 MgSO<sub>4</sub> 的添加量为 0.3 g/100 mL 时,爱媛类芽孢杆菌 HD 所产抗真菌肽的活性最高。

**2.6.4 正交试验结果** 将上述优化获得的培养基成分进行三因素三水平 L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>)的正交试验,结果见表 5。结果显示,影响抗真菌肽合成的因素依次是甘露醇>MgSO<sub>4</sub>>鱼蛋白胨,其最优组合为 A<sub>1</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>,即甘露醇 2.5 g/L,MgSO<sub>4</sub> 3 g/L,鱼蛋白胨 10 g/L。

## 2.7 优化的发酵条件

**2.7.1 菌龄** 选择合适菌龄的种子培养液接入发酵培养基可以缩短菌体发酵产生抗菌肽的延迟

表 5 正交表试验结果

Table 5 Results of orthogonal experiment

编号	A 甘露醇/ g·(100 mL) <sup>-1</sup>	B MgSO <sub>4</sub> / g·(100 mL) <sup>-1</sup>	C 鱼蛋白胨 g·(100 mL) <sup>-1</sup>	效价/ AU·mL <sup>-1</sup>
1	0.25	0.2	0.5	179.94
2	0.25	0.3	1.0	264.92
3	0.25	0.4	1.5	258.82
4	0.5	0.2	1.0	146.19
5	0.5	0.3	1.5	179.94
6	0.5	0.4	0.5	142.32
7	1.0	0.2	1.5	125.78
8	1.0	0.3	0.5	184.53
9	1.0	0.4	1.0	179.94
K <sub>1</sub>	703.68	451.90	508.78	
K <sub>2</sub>	468.44	629.39	591.05	
K <sub>3</sub>	490.25	581.08	564.54	
R	235.24	177.49	84.26	

期,减短发酵时间<sup>[22]</sup>。菌龄优化的结果如图 6a 所示,当菌龄为 12,18,24 h 时,菌株生长代谢稳定,抗真菌肽产量高,发酵 36 h 时抗真菌肽产量达到峰值;当菌龄为 36 h 时,发酵代谢产物明显降低。因此,爱媛类芽孢杆菌 HD 发酵生产抗真菌肽时,种子液的菌龄选择 12~24 h。

2.7.2 发酵初始 pH 值 发酵液 pH 值影响微生物的生长繁殖及代谢产物的合成,影响微生物酶的活性,也影响微生物对营养物质的吸收利用<sup>[23]</sup>。图 6b 为发酵初始 pH 值对抗真菌肽产量的影响,由结果可知,在 pH 5~6.5 范围内,抗真菌肽的活性随着 pH 值的升高而增大,当 pH 值为 6.5 时,抗真菌肽活性达到最高;然而,pH 值大于 6.5 时,抗真菌肽的活性开始下降。因此,选择发酵培养基的

初始 pH 值为 6.5。

2.7.3 装液量 研究了不同装液量对发酵产生抗真菌肽的影响,结果如图 6c 所示。在 250 mL 锥形瓶中装液量为 50 mL 时,抗真菌肽的产量也最高。

2.7.4 接种量 菌体的接种量对菌体的生长繁殖及代谢产物的分泌具有重要意义。接种量对抗真菌合成的影响结果如图 6d 所示,当接种量为  $2.5 \times 10^8$  CFU/mL 时,抗真菌肽的产量最高。

2.7.5 发酵温度 温度会影响发酵过程中酶的速率和代谢产物的合成。温度的影响结果见图 6e,结果显示,当发酵温度为 32 °C 时,抗真菌肽的活性最高。

2.7.6 转速 摇床转速也是影响发酵产抗真菌肽的一个因素,过高过低都会影响菌株的发酵情况。转

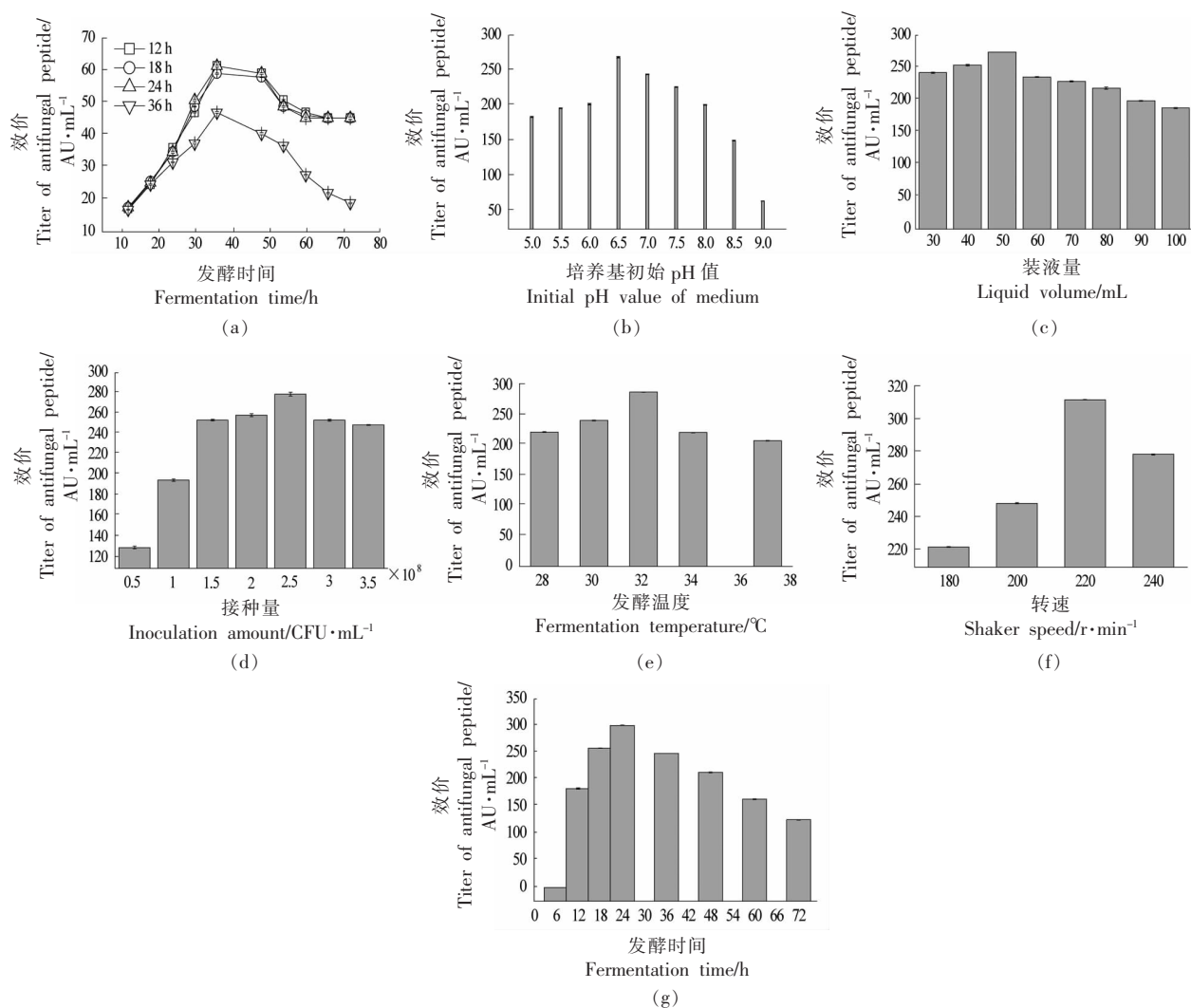


图6 爱媛类芽孢杆菌 HD 发酵条件优化

Fig.6 Optimization of fermentation conditions of *P. ehimensis* HD



速的优化结果见图 6f 所示,当摇床转速为 220 r/min 时,抗真菌肽产量达到最高。

2.7.7 发酵时间 研究了不同发酵时间对发酵产生抗真菌肽的影响,结果如图 6g 所示。当发酵时间为 24 h 时,抗真菌肽的活性最高。

2.7.8 正交试验结果 对爱媛类芽孢杆菌 HD 合

成抗真菌肽的发酵条件进行四因素四水平  $L_{16}(4^4)$  的正交试验优化,结果见表 6。结果显示,影响抗真菌肽合成的因素是接种量>发酵时间>pH 值>装液量,其最优组合为  $A_4B_1C_1D_4$ ,即发酵初始 pH 7.5,装液量 40 mL/250 mL,接种量  $1 \times 10^8$  CFU/mL,发酵时间 32 h,此时发酵生产的抗真菌肽产量高。

表 6 正交表试验结果

Table 6 Results of orthogonal experiment

编号	A (pH 值)	B (接种量/CFU·mL <sup>-1</sup> )	C (装液量/mL)	D (发酵时间/h)	效价AU·mL <sup>-1</sup>
1	6.0	$1 \times 10^8$	40	20	222.42
2	6.0	$1.5 \times 10^8$	50	24	198.52
3	6.0	$2 \times 10^8$	60	28	143.84
4	6.0	$2.5 \times 10^8$	70	32	158.14
5	6.5	$1 \times 10^8$	50	28	268.84
6	6.5	$1.5 \times 10^8$	40	32	290.00
7	6.5	$2 \times 10^8$	70	20	121.29
8	6.5	$2.5 \times 10^8$	60	24	130.84
9	7.0	$1 \times 10^8$	60	32	321.86
10	7.0	$1.5 \times 10^8$	70	28	194.79
11	7.0	$2 \times 10^8$	40	24	164.25
12	7.0	$2.5 \times 10^8$	50	20	135.89
13	7.5	$1 \times 10^8$	70	24	268.83
14	7.5	$1.5 \times 10^8$	60	20	249.21
15	7.5	$2 \times 10^8$	50	32	231.01
16	7.5	$2.5 \times 10^8$	40	28	184.03
$K_1$	722.92	1 081.94	860.70	728.81	
$K_2$	810.96	932.52	834.26	762.44	
$K_3$	816.79	660.39	845.75	791.49	
$K_4$	933.08	608.90	743.05	1 001.01	
R	122.12	473.05	117.65	272.20	

测定优化前后爱媛类芽孢杆菌 HD 发酵液中抗真菌肽的产量,结果如图 7 所示。由结果可知,优化后抗真菌肽的产量具有显著提高,发酵 32 h,抗真菌肽产量达到最高值(效价为 324.92 AU/mL),与未优化前的基础培养基相比(48 h 抗真菌肽效价最高为 89.51 AU/mL),抗真菌肽效价提高了 3.63 倍,发酵时间缩短了 16 h。

## 2.8 放大发酵验证

采用工业级原料,在 5 L 和 30 L 发酵罐上分别进行爱媛类芽孢杆菌 HD 抗真菌肽的发酵放大,结果如图 8a 和图 8b 所示。结果显示,发酵过程中罐内 pH 值变化不大,一直维持在中性左右。

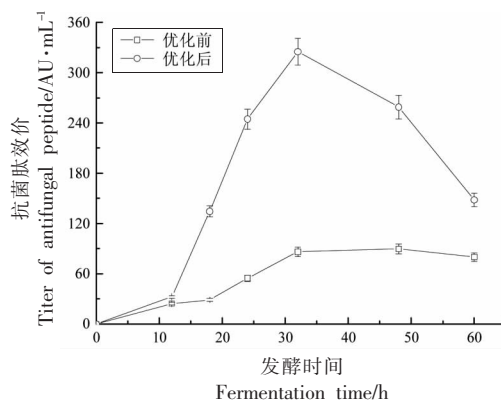


图 7 优化前后效价对比

Fig.7 Comparison of titers of antifungal peptides before and after optimization

发酵 8 h 发酵液开始出现抑菌活性, 此时溶氧值开始下降。8~16 h 溶氧值下降速度较快, 菌体生长旺盛, 此阶段抗真菌肽产量呈现快速上升趋势。20 h 后抗真菌肽产量达到最高值, 5 和 30 L 罐中的效价分别为 371.10 AU/mL 和 364.05 AU/mL, 比摇瓶发酵分别提高了 1.14 和 1.12 倍。值得注意的

是, 在发酵罐中抗真菌肽达到最高值比摇瓶发酵时间缩短了 12 h, 可能是由于通气量和转速同时影响发酵罐内的溶氧状态, 使菌体生长较快, 抗真菌肽产量在较短的时间内易达到最高值。经过发酵罐的放大验证, 为实现抗真菌肽的工业化应用进一步奠定了基础。

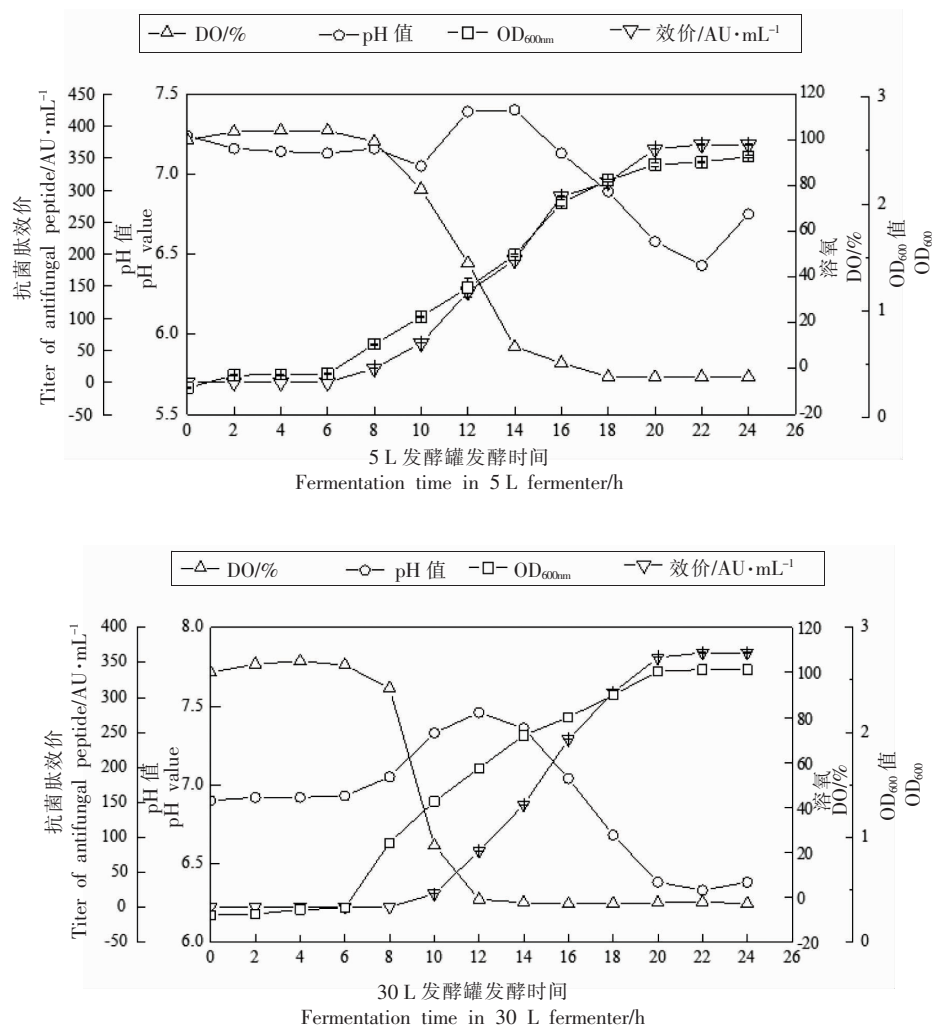


图 8 发酵罐放大验证

Fig.8 The amplification verification in fermentation tank

### 3 结论

抗真菌肽由于其独特的抑菌机理进入了人们的视线, 成为了研究趋势。本研究从河北、江苏等地的土壤样品中筛选获得 1 株产抗真菌肽菌株, 经过形态观察、生理生化测定及 16S rDNA 分析, 鉴定为爱媛类芽孢杆菌, 命名为爱媛类芽孢杆菌 HD。菌株发酵上清液经过过氧化氢排除、蛋白酶处理、硫酸铵沉淀、膜透析分离、热稳定性研究等

操作, 确定其抑真菌物质为小分子多肽, 分子质量在 1 ku 左右。经过抑菌谱研究, 爱媛类芽孢杆菌 HD 抗真菌肽具有广谱的抑菌特性, 对多株腐败真菌和条件致病细菌均具有良好的抑制。

本研究在 LB 培养基的基础上优化了爱媛类芽孢杆菌 HD 发酵产抗真菌肽的培养基, 并对发酵条件进行了优化。最适培养基和培养条件为甘露醇 2.5 g/L, 鱼蛋白胨 10 g/L, MgSO<sub>4</sub> 3.0 g/L, 初始

pH 7.5, 装液量 40 mL/250 mL, 接种量  $1 \times 10^8$  CFU/mL, 摇床转速 220 r/min, 发酵温度 32 °C, 发酵时间 32 h。在最优条件下, 抗真菌肽产量最高, 效价为 324.92 AU/mL, 比优化前提高了 3.63 倍。进一步在 5, 30 L 发酵罐上进行了发酵验证, 其抗真菌肽效价分别为 371.10 AU/mL 和 364.05 AU/mL, 发酵时间提前到了 20 h。由此可知, 爱媛类芽孢杆菌 HD 发酵产抗真菌肽性能稳定, 发酵周期短。国内外其它爱媛类芽孢杆菌产抑菌物质进行发酵优化的研究还未见报道, 本次菌株优化所得发酵培养基为工业级原料, 并且发酵周期短, 具有良好的经济效益, 这为抗真菌肽的工业化应用奠定了理论基础。

### 参 考 文 献

- [1] LUZ C, IZZO L, RITIENI A, et al. Antifungal and antimycotoxigenic activity of hydrolyzed goat whey on *Penicillium* spp: An application as biopreservation agent in pita bread [J]. LWT - Food Science and Technology, 2020, 118: 108717.
- [2] 廖子龙, 于英威, 唐坤, 等. 农作物中真菌毒素研究进展[J]. 粮油仓储科技通讯, 2019, 35(2): 47-49.  
LIAO Z L, YU Y W, TANG K, et al. Research progress of mycotoxins in crops[J]. Liangyou Cangchu Keji Tongxun, 2019, 35(2): 47-49.
- [3] CHIO H, LEE D G. Antifungal activity and pore-forming mechanism of astacidin 1 against *Candida albicans*[J]. Biochimie, 2014, 105: 58-63.
- [4] 燕晓翠, 杨春蕾, 姚大为, 等. 抗菌肽的国内外研究进展[J]. 天津农业科学, 2017, 23(5): 35-41.  
YAN X C, YANG C L, YAO D W, et al. Research progress on domestic and abroad of antibacterial peptides[J]. Tianjin Agricultural Science, 2017, 23(5): 35-41.
- [5] BOMAN H G. Antibacterial peptides: key components needed in immunity[J]. Cell, 1991, 65(2): 205-207.
- [6] 刘秀, 郭中坤, 王可洲. 抗菌肽来源、分类方式、生物学活性、作用机制及应用研究进展[J]. 中国医药生物技术, 2016, 11(6): 539-543.  
LIU X, GUO Z K, WANG K Z. Research progress in origin, classification, biological activity, mechanism of action and application of antimicrobial peptides[J]. Chinese Medicinal Biotechnology, 2016, 11(6): 539-543.
- [7] 于杰, 张荣意, 谭志琼, 等. 枯草芽孢杆菌 B25 抗真菌作用及抗菌蛋白的分离纯化[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(3): 629-634.  
YU J, ZHANG R Y, TAN Z Q, et al. Studies on antifungal activity and purification of antifungal substance from *Bacillus subtilis* B25 strain[J]. Genomics and Applied Biology, 2016, 35(3): 629-634.
- [8] 钱英, 汪琨, 章小洪, 等. 解淀粉芽孢杆菌 BW-13 产生的抗真菌物质特性研究与初步分离纯化[J]. 浙江工业大学学报, 2012, 40(1): 42-45.  
QIAN Y, WANG K, ZHANG X H, et al. Characterization and prefractionation of antifungal substance produced by *Bacillus amylolique faciens* BW-13[J]. Journal of Zhejiang University of Technology, 2012, 40(1): 42-45.
- [9] JI Z L, PENG S, CHEN S S, et al. Identification and characterization of a serine protease from *Bacillus licheniformis* W10: A potential antifungal agent [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 145: 594-603.
- [10] 王志新, 宏丹, 刘洋, 等. 琼脂扩散法定量测定多黏菌素对霉菌的抑菌活力[J]. 现代食品科技, 2019, 35(6): 251-257.  
WANG Z X, HONG D, LIU Y, et al. Quantitative determination of the antifungal activity of polymyxin against mold fungi by agar infusion method[J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(6): 251-257.
- [11] 东秀株, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 373-384.  
DONG X Z, CAI M Y. Handbook of systematic identification of common bacteria[M]. Beijing: Science Press, 2001: 373-384.
- [12] 沈萍, 陈向东. 微生物学试验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007: 241-242, 247.  
SHEN P, CHEN X D. Microbiology test [M]. Beijing: Higher Education Press, 2007: 241-242, 247.
- [13] 张艾青, 刘书亮, 敖灵. 产广谱细菌素乳酸菌的筛选和鉴定[J]. 微生物学通报, 2007, 34(4): 753-756.  
ZHANG A Q, LIU S L, AO L. Screening and identification of broadspectrum bacteriocin-producing

- lactic acid bacterium[J]. *Microbiology China*, 2007, 34(4): 753-756.
- [14] 魏群. 基础生物化学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2009: 108-113, 129-130.
- WEI Q. Basic biochemistry experiment[M]. Beijing: Higher Education Press, 2009: 108-113, 129-130.
- [15] 魏东东, 刘杨柳, 王志新, 等. 基于琼脂扩散法的抗菌肽定量测定方法优化[J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(17): 105-110.
- WEI D D, LIU Y L, WANG Z X, et al. Optimization of quantitative determination of antimicrobial peptides by agar diffusion method[J]. *Food Research and Development*, 2018, 39(17): 105-110.
- [16] 王广贤. 侧孢短芽孢杆菌产抗菌肽发酵条件的优化以及抑菌性质的初步研究[D]. 石家庄: 河北科技大学, 2011.
- WANG G X. Optimization of fermentation conditions and study on properties of antimicrobial peptide from *Brevibacillus laterosporus*[D]. Shijiazhuang: Hebei University of Science and Technology, 2011.
- [17] 王曦. 爱媛类芽孢杆菌南京分离株的鉴定及其体内外的抑菌活性[D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- WANG X. Screening, identification of a *Paenibacillus ehimensis* isolate from Nanjing and its antimicrobial effect in *in vitro* and *in vivo*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011.
- [18] 陈文俊. 西瓜内生细菌 JK-3 菌株的种类鉴定及其拮抗机理的初步研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2010.
- CHEN W J. Identification of *Endophytic bacterium* JK-3 from watermelon plants and its antagonistic mechanism[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2010.
- [19] 王忠忠. 短短芽孢杆菌 YNP-1 的分离及其抗菌物质的初步鉴定[D]. 西安: 陕西科技大学, 2018.
- WANG Z Z. Isolation of *Brevibacillus brevis* YNP-1 and preliminary identification of its antibacterial substance [D]. Xian: Shaanxi University of Science and Technology, 2018.
- [20] 白杰, 负建民, 祝发明, 等. 枯草芽孢杆菌菌株 B<sub>3</sub> 抗菌肽的分离纯化与鉴定[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(8): 78-85.
- BAI J, YUN J M, ZHU F M, et al. Isolation, purification and identification of antibacterial peptide from *Bacillus subtilis* strain B<sub>3</sub>[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2018, 44(8): 78-85.
- [21] ZHAO X, ZHOU Z J, HAN Y, et al. Isolation and identification of antifungal peptides from *Bacillus* BH072, a novel bacterium isolated from honey[J]. *Microbiological Research*, 2013, 168(9): 598-606.
- [22] 方亚坤. 高产甘油酸菌株的筛选鉴定及发酵工艺的初步优化[D]. 开封: 河南大学, 2017.
- FANG Y K. Screening and identification of a strain producing glyceric acid and studies on fermentation process[D]. Kaifeng: Henan University, 2017.
- [23] 李鑫. 解淀粉芽孢杆菌 HRH<sub>317</sub> 产抑菌物质发酵条件及其稳定性研究[D]. 晋中: 山西农业大学, 2014.
- LI X. Study on the fermentation conditions and stability of antibacterial materials produced by *Bacillus amyloliquefaciens* HRH<sub>317</sub>[D]. Jinzhong: Shanxi Agricultural University, 2014.

### Screening, Identification and Optimization the Fermentation Conditions of *Paenibacillus ehimensis* HD Producing Antifungal Peptides

Lu Leizhen<sup>1</sup>, Hong Dan<sup>1</sup>, Feng Chengling<sup>1</sup>, Jia Ziwei<sup>1</sup>, Zhou Jingbo<sup>1</sup>, Ning Yawei<sup>1</sup>, Jia Yingmin<sup>2</sup>, Wang Zhixin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Food Science and Biology, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018

<sup>2</sup>School of Food and Health Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048)

**Abstract** Objective: Strains for antifungal peptides production were screened and isolation from soil, and then the antifungal peptides yield was improved by optimizing its fermentation conditions. Methods: Agar plate dilution and agar diffusion method were used for the strain isolation. Morphological, physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA sequence of the strain were used for the strain analysis and identification. The antifungal properties of antifungal substances were determined by protease treatment, ammonium sulfate precipitation, membrane dialysis and thermal stability study. The fermentation medium and conditions for antifungal peptides production were optimized by single factor and orthogonal tests, and then the fermentation amplification was carried out in the fermenter. Results: An antifungal pep-

tides-producing strain was screened and identified as *Paenibacillus ehimensis*. The strain was named as *Paenibacillus ehimensis* HD. The antifungal substances produced by *P. ehimensis* HD was verified as small molecular polypeptides with the molecular weight of about 1 ku. The antifungal peptides had a broad spectrum of antimicrobial activity, which could not only inhibit the spoilage fungi, but also inhibit the pathogenic bacteria. The optimum conditions for antifungal peptides production by *P. ehimensis* HD were as follows: mannitol 2.5 g/L, MgSO<sub>4</sub> 3.0 g/L, fish peptone 10 g/L, initial pH 7.5, liquid volume 40 mL/250 mL, inoculation amount 1×10<sup>8</sup> CFU/mL, shaker speed 220 r/min, fermentation temperature 32 °C, fermentation time 32 h. Under the optimal conditions, the titer of antifungal peptides was 324.92 AU/mL, which was 3.63-fold compared to the initial medium. Scale-up of antifungal peptides fermentation from shaking flask to 5 L and 30 L fermenters, the titers of antifungal peptides were 371.01 AU/mL and 364.05 AU/mL, respectively, moreover, the fermentation time was forward to 20 h. Conclusion: The antifungal peptides produced by *P. ehimensis* HD had good antifungal activity, and the yield of antifungal peptides was stable after fermentation optimization and amplification.

**Keywords** *Paenibacillus ehimensis*; antifungal peptides; screening; identification; fermentation optimization