

## 研究报告

## 植物乳植杆菌 J50 产抗菌肽的分离纯化及基因组学分析

周恺颀<sup>1</sup>, 王辰汇<sup>2</sup>, 李崎<sup>1</sup>, 钮成拓<sup>1</sup>, 郑飞云<sup>1</sup>, 刘春风<sup>\*1</sup>

1 江南大学 生物工程学院 酿酒科学与工程研究室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

周恺颀, 王辰汇, 李崎, 钮成拓, 郑飞云, 刘春风. 植物乳植杆菌 J50 产抗菌肽的分离纯化及基因组学分析[J]. 微生物学通报, 2025, 52(3): 1219-1233.

ZHOU Kaijie, WANG Chenhui, LI Qi, NIU Chengtuo, ZHENG Feiyun, LIU Chunfeng. Purification and identification of antimicrobial peptides produced by *Lactiplantibacillus plantarum* J50 and genomics analysis[J]. Microbiology China, 2025, 52(3): 1219-1233.

**摘要:**【背景】食品腐败的主要原因是食源性致病菌的污染。乳酸菌产生抗菌肽能够有效抑制食源性致病菌的生长。【目的】对一株具有广谱抑菌能力的植物乳植杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*) J50 展开研究, 分离纯化其产生的抑菌物质并开展其基因组学分析。【方法】通过多种酶处理判断抑菌物质种类, 通过有机溶剂萃取、凝胶过滤层析和半制备高效液相色谱对其分离纯化, 使用液质联用表征, 人工合成后测定其稳定性和最低抑制浓度, 并对菌株开展基因组学分析。【结果】通过酶敏感性试验判断其产生的抑菌有效物质为抗菌肽, 分离纯化得到抗菌肽纯品, 表征出肽段序列为: SGAGY (N→C), 相对分子质量为 453.44 Da。其在 pH≤5.5 时能保持有效抑菌能力, 具有较强的热稳定性和紫外线照射稳定性, 对实验的 G<sup>+</sup>和 G<sup>-</sup>食源性致病菌的最低抑制浓度在 0.7–1.6 g/L。基因组学分析显示抗菌肽 SGAGY 是非核糖体肽, 并且菌株 J50 具有双肽细菌素 plantaricin EF 合成相关基因。【结论】菌株 J50 至少能够产生 2 种高效抗菌肽, 抑菌谱系较广, 具有应用于食品工业的潜在价值。

**关键词:** 乳酸菌; 抗菌肽; 分离纯化; 最低抑制浓度; 基因组学分析

资助项目: 国家自然科学基金(32272282)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32272282).

\*Corresponding author. E-mail: liuchunfeng@jiangnan.edu.cn

Received: 2024-05-10; Accepted: 2024-08-27; Published online: 2024-09-30

## Purification and identification of antimicrobial peptides produced by *Lactiplantibacillus plantarum* J50 and genomics analysis

ZHOU Kaijie<sup>1</sup>, WANG Chenhui<sup>2</sup>, LI Qi<sup>1</sup>, NIU Chengtuo<sup>1</sup>, ZHENG Feiyun<sup>1</sup>, LIU Chunfeng<sup>\*1</sup>

1 Laboratory of Brewing Science & Technology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** [Background] The main cause of food spoilage is the contamination by foodborne pathogens. The antimicrobial peptides (AMPs) produced by lactic acid bacteria can effectively inhibit the growth of foodborne pathogens. [Objective] To isolate and purify the antimicrobial substances produced by *Lactiplantibacillus plantarum* J50 and carry out genomics analysis. [Methods] The antimicrobial substances were identified by a variety of enzyme treatments, purified by organic solvent extraction, gel filtration chromatography, and semi-preparative high performance liquid chromatography, and characterized by liquid chromatography-mass spectrometry. After artificial synthesis, the stability and minimum inhibitory concentration were measured. Finally, genomic analysis was carried out on the strain. [Results] The antimicrobial substances produced by strain J50 were identified to be AMPs. The purified AMPs were characterized as SGAGY (N→C), with the relative molecular weight of 453.44 Da. They exerted antimicrobial effects at pH≤5.5, demonstrated strong thermostability and ultraviolet irradiation stability and the minimum inhibitory concentration of 0.7–1.6 g/L on Gram-positive and Gram-negative foodborne pathogens. Genomic analysis showed that the SGAGY was a non-ribosomal peptide, and J50 carried the genes involved in the synthesis of plantaricin EF. [Conclusion] Strain J50 can produce at least two AMPs, with a broad antimicrobial spectrum, demonstrating a potential value for application in the food industry.

**Keywords:** lactic acid bacteria; antimicrobial peptide; isolation and purification; minimum inhibitory concentration; genomics analysis

食品腐败是食品安全领域的重要问题,绝大多数食品腐败是由食源性致病菌引起的<sup>[1]</sup>,食品防腐剂的使用是抑制食源性致病菌生长的关键手段。目前,常用的食品防腐剂如苯甲酸钠、亚硝酸钠等均属于化学合成防腐剂<sup>[2]</sup>,可能由于部分商家的非法滥用,给人体健康带来潜在风险如致癌风险<sup>[3]</sup>等,随着消费者对化学合成防腐剂的日渐抵触,寻找天然、高效、无毒副作用的食品防腐剂成为食品行业的迫切需求。

抗菌肽是一类能够抑制微生物生长发育或繁殖的多肽<sup>[4]</sup>,是一种天然的食品防腐剂。由乳

酸菌产生的天然抗菌肽因具有高效、无毒、可降解且不易产生耐药性等特点<sup>[5]</sup>,被视为传统防腐剂的理想替代品或增效剂,逐渐成为近年来行业内的研究热点。一般而言,从发酵食品或动物消化道中筛选具有抑菌作用的乳酸菌是一种有效途径,因为长期的实践结果证明这些来源的乳酸菌基本不具有毒害作用。如 Angelescu 等<sup>[6]</sup>从酸奶中筛选到瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*) 34.9,其发酵液对多种G<sup>+</sup>菌具有良好的抑制作用。Li 等<sup>[7]</sup>从乌骨鸡消化道中筛选出一株唾液乳杆菌(*L. salivarius*),对金

黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)具有明显的抑制作用,并且具有良好的热稳定性。Zafar 等<sup>[8]</sup>从反刍动物来源筛选到 7 株双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)乳酸菌,其对于大肠杆菌(*Escherichia coli*)和金黄色葡萄球菌的抑制效果存在差异。

乳酸菌产生的抗菌肽主要存在于发酵液中,具有产量低、分离难度大等特点。抗菌肽的分离纯化方法主要包括预处理、粗纯化和细纯化 3 个步骤。预处理主要通过等电点沉淀、盐析法、有机溶剂萃取法<sup>[9-11]</sup>将抗菌肽与大量杂质初步分离。粗纯化通过离子交换色谱、疏水作用色谱、分子排阻色谱<sup>[12-15]</sup>等色谱方法,进一步去除杂质,提高抗菌肽的纯度。纯化则通过半制备或制备级液相色谱、凝胶过滤色谱<sup>[16-17]</sup>等方法,获得接近纯品的抗菌肽。这些方法结合使用,能够从复杂的发酵液中分离纯化出高纯度的抗菌肽。不同抗菌肽的抗菌谱和特性各异,针对不同的细菌和真菌种类表现出独特的抑菌能力<sup>[18]</sup>。在面对不同的环境条件,如盐浓度、热处理和 pH 时,抗菌肽的抑菌能力也会产生变化<sup>[14]</sup>。在食品的生产过程中,环境变化较为复杂,可能引起抗菌肽的变性失活,因此,探讨抗菌肽在各种环境条件下的抑菌能力的稳定性具有重要的意义。

随着基因组学的发展,通过基因组测序获取目标生物体的全基因组信息,利用生物信息学工具深入分析这些数据,识别潜在的抗菌肽编码基因成为可能。通过基因组数据挖掘,可能找到传统分离手段未能发现的抗菌肽,并从基因层面解释其合成代谢的机理。如 Li 等<sup>[19]</sup>使用全基因组测序联合质谱鉴定到植物乳植杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*) M4L1 所产的新型细菌素 M4L1,并挖掘到基因组内的多个细菌素合成基因。

本研究通过前期工作,从云南省楚雄市豆瓣酱的发酵中后期样品中筛选到一株植物乳植杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*) J50<sup>[20]</sup>,其发酵液对 G<sup>+</sup>菌及 G<sup>-</sup>菌均具有良好的抑制效果。本研究鉴定并分离纯化菌株 J50 发酵液中的抑菌活性物质,并对其理化性质及抑菌能力展开探究;同时,利用基因组学技术挖掘菌株 J50 基因组中的潜在抗菌肽序列,以期为生物防腐剂的开发利用提供理论及数据基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌 株

植物乳植杆菌(*L. plantarum*) J50、大肠杆菌(*E. coli*) JM109、鸡伤寒沙门氏菌(*Salmonella gullinarum*)、阪崎氏肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*) CMCC(B)46117、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) CMCC(B)10104、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*) CMCC(F)98003、米曲霉(*A. oryzae*)、白色念珠菌(*Candida albicans*) CMCC(F)98001、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) S288C,均由本实验室保藏。

### 1.2 培养基

德氏乳杆菌(de Man, Rogosa and Sharpe, MRS)培养基参考文献[21]配制,不添加吐温-80,以免影响后续分离纯化实验。优化发酵培养基(g/L):甘油 8.0,胰蛋白胨 12.5,酵母粉 6.5,七水磷酸二氢钾 2.0,柠檬酸铵 2.0。LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0,酵母粉 5.0,NaCl 10.0。营养肉汤培养基(g/L):蛋白胨 5.0,牛肉粉 3.0,NaCl 5.0。酵母浸出粉胨葡萄糖(yeast extract peptone dextrose, YPD)培养基(g/L):酵母粉 10.0,蛋白

胨 2.0, D-葡萄糖 2.0。马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基(g/L): 土豆 200.0, D-葡萄糖 20.0, 琼脂 15.0。培养基均使用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 调节至 pH=6.5。固体培养基中琼脂浓度为 15 g/L。

### 1.3 主要试剂和仪器

BCA 法蛋白质浓度测定试剂盒及五肽 SGAGY (纯度>99.5%), 生工生物工程(上海)股份有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 北京百泰克生物技术有限公司。实验使用的酶, 阿拉丁试剂(上海)有限公司, 对应的缓冲液和最适温度分别为:  $\alpha$ -淀粉酶: 10 mmol/L PBS 缓冲液(pH 6.0), 70 °C; 脂肪酶: 10 mmol/L PBS 缓冲液(pH 7.0), 37 °C; 酸性蛋白酶: 10 mmol/L 乙酸-乙酸钠缓冲液(pH 3.0), 40 °C; 蛋白酶 K: 20 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L CaCl<sub>2</sub> (pH 7.4), 70 °C; 胰蛋白酶: 10 mmol/L PBS 缓冲液(pH 8.0), 37 °C; 胃蛋白酶: 10 mmol/L 乙酸-乙酸钠缓冲液(pH 2.0), 40 °C。

ÄKTA 蛋白纯化系统, GE 公司; 高效液相色谱仪、液质联用仪, Waters 公司。

### 1.4 抑菌能力的检测

(1) 发酵液的制备: 挑取菌株 J50 单菌落到 3 mL MRS 培养基中, 37 °C、180 r/min 培养过夜活化, 将 3 mL 种子液接种于 30 mL MRS 培养基中, 37 °C、180 r/min 扩大培养 24 h 至稳定期( $3.0 \times 10^{10}$  CFU/mL), 再将 33 mL 扩大培养液接种于 300 mL 优化发酵培养基中, 37 °C、180 r/min 厌氧发酵 26 h 后 12 000×g 离心 5 min, 取上清液经 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤, 用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 调节上清液 pH=4.0。

(2) 发酵液的酶处理: 使用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 溶液, 将(1)中制备的上清液分别调节至各个实验用酶的最适 pH, 并于各酶最适温度下水浴预热 5 min。之后迅速向发酵液中加

入 1/10 体积的酶液, 上下颠倒混匀 5 次, 快速放回最适温度下水浴反应 30 min。处理完成后迅速冰水浴降温, 调节 pH 至 4.0, 检测抑菌能力。各酶的阴性对照组使用该酶对应的缓冲液代替酶液, 其余条件相同。

(3) 琼脂扩散法检测抑菌能力: LB 固体培养基冷却至 45 °C 左右时, 添加 0.5% 处于对数期( $OD_{600}=0.8$ )的指示菌液(金黄色葡萄球菌), 倒平板并控制琼脂厚度 2 mm。使用无菌的 5 mm 孔径打孔器在抑菌指示平板琼脂上打孔。将 20  $\mu$ L 抑菌液加入琼脂孔中。将平板置于 37 °C 静置培养 6 h, 测量抑菌圈直径  $d_1$  (mm) 并按公式(1)计算抑菌能力(antimicrobial unit, AU):

$$\text{抑菌能力}(AU) = \frac{\pi(d_1^2 - d_0^2)}{4V} = \frac{3.14(d_1^2 - 25)}{0.08} \quad (1)$$

式(1)中: AU: 抑菌能力, mm<sup>2</sup>/mL;  $d_1$ : 抑菌圈直径, mm;  $d_0$ : 琼脂孔径, 5 mm; V: 抑菌液体积, 0.02 mL。

### 1.5 抗菌肽的粗提取

将 500 mL 发酵液与等体积乙酸乙酯振荡混合, 静置 30 min 后分液, 分别收集上层有机相和下层水相。将收集到的水相再重复上述操作萃取 2 次。将收集到的上层有机相合并, 经过减压蒸馏(120 r/min, 55 °C)和氮气吹扫, 将浓缩产物溶于去离子水, 定容至 50 mL, 12 000×g 离心 10 min 后经 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤。

### 1.6 抗菌肽的纯化

使用蛋白纯化系统和制备级凝胶过滤层析柱: Hiload 16/600 Superdex 30pg 对提取液进行初步纯化。流动相为超纯水, 流量 1.0 mL/min, 进样量 2.5 mL, 监视  $UV_{214}$  和  $UV_{280}$ , 峰收集条件为 slope: 50 mAU/min。检测每个收集到的色谱峰洗脱液的抑菌能力。二次纯化使用半制备 HPLC, 半制备色谱柱: XBridge BEH C18 Column。流动相 A: 0.2% 甲酸水溶液, 流动相 B: 乙腈。

色谱条件为等度洗脱, 流量 3 mL/min, 流动相: 90% A+10% B, 时间 10 min, 监视  $UV_{214}$  和  $UV_{280}$ , 手动收集各色谱峰洗脱液并测定抑菌能力。将具有抑菌能力的洗脱液氮气吹扫并冷冻干燥, 以去除挥发性物质并获得纯化样品粉末。另外, 使用 BCA 法蛋白质浓度测定试剂盒分别测定分离纯化各阶段获得的样品的多肽浓度, 并参考酶活与比酶活的关系计算比抑菌能力  $AU/c$  ( $mm^2/mg$ , 表示每 mg 抑菌物质能形成的抑菌圈面积  $mm^2$  的大小), 用以评价比较抑菌物质的纯度。

## 1.7 抗菌肽的表征

将样品粉末用超纯水复溶, 使用液质联用仪分析样品。液相条件: UPLC 分析柱: BEH C18 2.1 mm×150 mm×1.7  $\mu m$ , 流动相: 100% 0.1% 甲酸 10 min; 30% 乙腈+70% 0.1% 甲酸 15 min; 80% 乙腈+20% 0.1% 甲酸 20 min; 100% 乙腈 30 min。柱温: 45  $^{\circ}C$ , 流量: 0.75 mL/min, 进样量: 5  $\mu L$ 。质谱条件: 离子方式  $ESI^+$ , 毛细管电压: 3.5 kV, 锥孔电压: 30 V, 离子源温度: 100  $^{\circ}C$ , 脱溶剂气温度: 400  $^{\circ}C$ , 脱溶剂气流量: 700 L/h, 锥孔气流量: 50 L/h, 碰撞能量: 6/20 V, 质荷比范围: 200–2 000  $m/z$ , 电压: 1 800 V。液质联用数据使用软件 MassLynx v4.1 分析并使用 MaxEnt III 和 Peptide sequence 功能解析肽段序列, 使用在线网站 <https://web.expasy.org/protparam> 计算对应肽段物理化学性质。

## 1.8 抗菌肽性质的测定

### 1.8.1 抗菌肽稳定性的测定

将五肽样品粉末用去离子水复溶至 1.0 g/L, 分别进行以下稳定性测定实验。抑菌圈实验使用金黄色葡萄球菌和大肠杆菌作为指示菌。

热稳定性实验: 于 60、80、100  $^{\circ}C$  水浴 30 min, 处理完成后迅速冰水浴降温, 调节 pH=4.0, 检测抑菌能力。pH 稳定性: 用 1 mol/L HCl 和

NaOH 分别将溶液 pH 值调节至 3.0、4.0、5.0、5.5、6.0, 其中 pH 4.0 的样品溶液做阳性对照, 用调节至 pH 3.0、4.0、5.0、5.5、6.0 的 50 mmol/L 乳酸钠缓冲溶液做阴性对照, 检测抑菌能力。紫外线照射稳定性: 分别照射紫外线 1、2、4、6 h, 调节 pH 4.0 后检测抑菌能力。

### 1.8.2 抗菌肽最低抑制浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 的测定

将五肽样品粉末用 pH 4.0 的 50 mmol/L 乳酸钠缓冲液溶解至 2.0 g/L, 并按 0.1 g/L 的梯度稀释至 0.5 g/L。使用不同的食源性致病菌或食品发酵菌作为指示菌, 使用琼脂扩散法观察抑菌圈现象, 记录出现抑菌圈现象的最低质量浓度。不同的菌株采用对应的琼脂培养基, LB 培养基: 枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、鸡伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌; LB 培养基添加 3% NaCl: 副溶血弧菌; 营养肉汤培养基: 铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯氏菌; PDA 培养基: 米曲霉、黑曲霉; YPD 培养基: 白色念珠菌、酿酒酵母。

## 1.9 基因组学分析

使用细菌基因组提取试剂盒提取过夜活化的菌株 J50 的基因组 DNA, 送至苏州金唯智生物科技有限公司开展基因组从头测序。基于测序数据, 使用软件 Hifiasm v0.13-r308、Canu v1.7 进行组装, 使用软件 Pilon 对组装结果进一步校正, 得到最终的组装结果。完成组装后, 使用软件 Prodigal v2.6.3 预测起始位点和编码区。基于预测得到的编码基因的蛋白序列, 使用 BLAST v2.3.0 与非冗余蛋白数据库 (non-redundant protein database, NR)、京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)、综合抗生素抗性数据库 (the comprehensive antibiotic resistance database, CARD) 中的蛋白序列进行比对, 选取最优的匹配结果作为该基

因的注释结果。使用软件 antiSMASH v6.0.0 分析基因组中的次级代谢产物基因簇。

## 2 结果与分析

### 2.1 抑菌物质的种类判定及纯化表征

#### 2.1.1 抑菌物质的种类判定

为了探究植物乳杆菌 J50 发酵液中的抑菌物质的种类,采用多种水解酶类如淀粉酶、脂肪酶、蛋白酶处理 J50 的发酵液,并测试处理前后的发酵液的抑菌能力,结果如图 1,发酵液的抑菌能力对  $\alpha$ -淀粉酶、脂肪酶不敏感,对蛋白酶类敏感,其中对蛋白酶 K 最敏感,其实验组的  $AU=(5\ 307.81\pm 436.49)\text{ mm}^2/\text{mL}$ ,与对照组相比降低 48.4%,其余蛋白酶与对照组相比,降低幅度在 17.9%–36.2%之间。因此可以初步认为,发酵液中的抑菌物质属于对蛋白酶类敏感的蛋白质或多肽,即抗菌肽类物质,并且不具有糖类和脂质基团修饰。

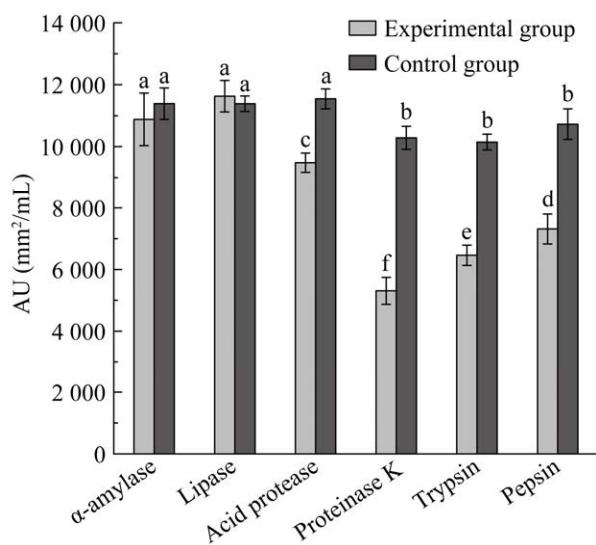


图 1 抑菌物质的种类判定 不同小写字母表示差异显著。

Figure 1 Classification and crude extraction of antibacterial substances. Different lowercase letters indicate significant differences.

#### 2.1.2 抗菌肽的纯化及表征

发酵液中抗菌肽的粗提取使用乙酸乙酯抽提法,获得的抽提液抑菌能力  $AU=(23\ 866.89\pm 788.75)\text{ mm}^2/\text{mL}$ 。纯化阶段采用 2 次色谱纯化并使用液质联用仪表征抗菌肽。首先使用凝胶过滤色谱,测试收集到的每个吸收峰的抑菌能力,如图 2A,其中 G3 (115–122 mL)具有明显的抑菌圈,抑菌能力  $AU=(14\ 367.24\pm 339.61)\text{ mm}^2/\text{mL}$ 。随后将 G3 峰使用半制备 HPLC 再次纯化,手动收集各吸收峰洗脱液,色谱结果如图 2B, G3 在 5.2 min 处有最强吸收峰,记作 H3。抑菌圈实验显示 H3 峰的洗脱液出现抑菌现象,抑菌能力  $AU=(9\ 020.61\pm 578.84)\text{ mm}^2/\text{mL}$ ,而其他吸收峰洗脱

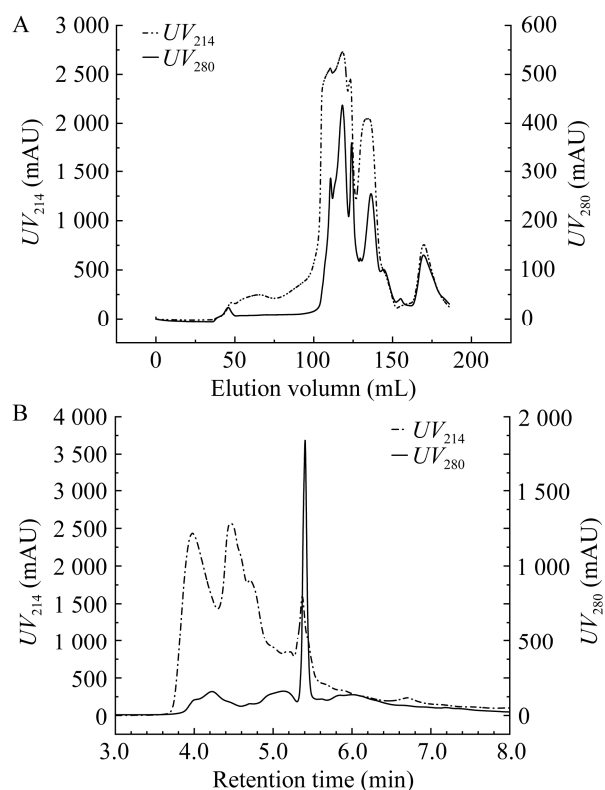


图 2 液相色谱结果 A: 凝胶过滤色谱; B: 半制备 HPLC。

Figure 2 Results of liquid chromatography. A: Gel filtration chromatography; B: Semi-HPLC.

液均无抑菌能力，因此认为 H3 峰对应的洗脱物质即为 G3 中所含的有效抑菌物质。

为了评估各纯化步骤中获得的样品的纯度，使用 BCA 法测定了各样品的多肽浓度  $c$ ，结果如表 1。随着纯化实验的开展，抑菌能力与浓度之比( $AU/c$ )逐渐升高，从乙酸乙酯抽提液的  $3\ 770\ \text{mm}^2/\text{mg}$  升至半制备 HPLC 的  $14\ 175\ \text{mm}^2/\text{mg}$ ，意味着抑菌有效物质的纯度提升了 3.76 倍。

将 H3 峰的洗脱物质使用液质联用仪表征，UPLC 的结果如图 3A，抗菌肽于 6.27 min 洗脱，对应的质谱图如图 3A，图 3B 中丰度最高的母离子质荷比  $m/z=453.34$ ，经解析，对应的肽段为五肽：Ser-Gly-Ala-Gly-Tyr (N→C)，单字母表示为 SGAGY。经 BLAST 和抗菌肽库查询，该肽段序列未被报道过，为本文首次发现的抗菌肽序列。使用多肽工具计算出抗菌肽的物理参数：相对分子质量 453.44 Da、等电点 5.24、

消光系数 1 490、吸光度 3.286、平均亲水性  $-0.220$ 。五肽中，S、G、Y 均为亲水氨基酸，而中间的 A 为疏水氨基酸，这样的双亲性结构使抗菌肽表现出表面活性剂的性质，能够吸附结合于磷脂双分子层中<sup>[22]</sup>，使细胞膜结构紊乱，从而实现抑制细菌生长的效果。同时，由于抗菌肽 SGAGY 的小分子结构，可能通过细胞膜进入细菌内部，根据非膜结合机制展现靶向抑制细胞内特定酶系的能力，从而抑制细菌的生长发育。具体的抑菌机制仍需要进一步研究。

### 2.1.3 抗菌肽性质测定结果

对抗菌肽 SGAGY 分别进行热处理、pH 处理、紫外线照射处理，结果如表 2。可知抗菌肽 SGAGY 在偏酸的环境下能保持抑菌能力<sup>[22]</sup>，并且 pH 越低时表现出的抑菌能力越强，pH 3.0 时对金黄色葡萄球菌的抑制能力达到  $(1\ 906.81 \pm 84.22)\ \text{mm}^2/\text{mL}$ ，对大肠杆菌的抑制

表 1 纯化步骤与抑菌能力对比

Table 1 Antimicrobial ability results of each purification steps

Purification sample	Ethyl acetate extract	Gel filtration eluate	HPLC eluate
$AU\ (\text{mm}^2/\text{mL})$	$23\ 866.89 \pm 788.75$	$14\ 367.24 \pm 339.61$	$9\ 020.61 \pm 578.84$
$c\ (\text{g/L})$	6.330	1.412	0.613
$AU/c\ (\text{mm}^2/\text{mg})$	3 770	10 175	14 715

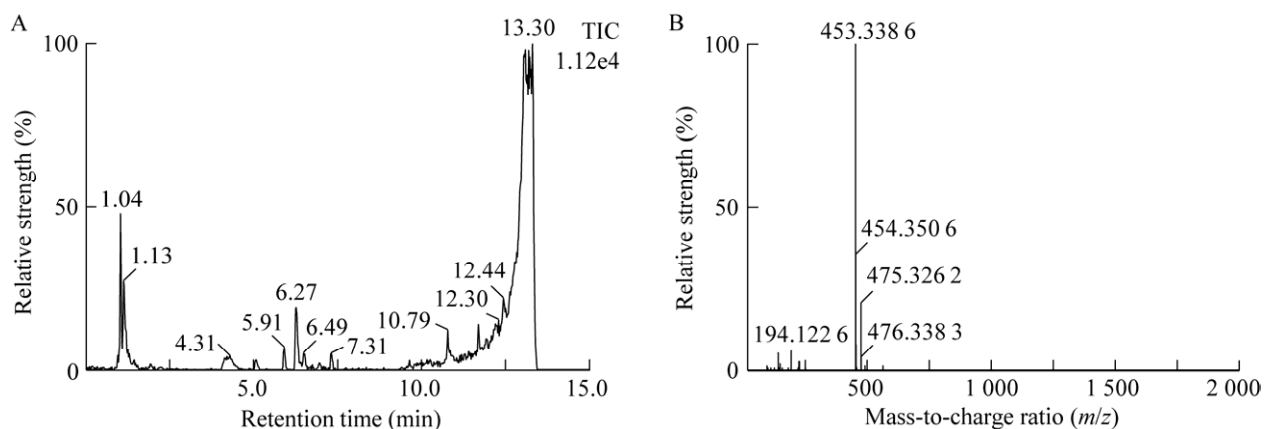


图 3 质谱结果

Figure 3 Results of mass-spectrometry. A: UPLC; B: MS ESI<sup>+</sup>.

表 2 抗菌肽稳定性测试

Table 2 Stability test of antimicrobial peptide

Method	Group	Indicator strains			
		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
		AU (mm <sup>2</sup> /mL)	Relative ratios (%)	AU (mm <sup>2</sup> /mL)	Relative ratios (%)
Heat treatment	20 °C (CK)	1 855.50±159.37a	100.00	1 498.03±128.67a	100.00
	60 °C	1 902.40±120.18a	102.53	1 529.89±97.03a	102.13
	80 °C	1 826.73±177.24a	98.45	1 441.81±143.09b	96.25
	100 °C	1 764.36±139.81b	95.09	1 474.45±112.87a	98.43
pH adjustment	3.0	1 906.81±84.22a	102.77	1 531.46±229.46a	103.54
	4.0 (CK)	1 855.50±159.37a	100.00	1 479.03±128.67a	100.00
	5.0	1 564.29±168.74b	84.31	1 253.93±136.23b	84.78
	5.5	1 108.49±78.99c	59.74	894.94±63.77c	60.51
	6.0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Ultraviolet treatment	0 h (CK)	1 855.50±159.37a	100.00	1 479.03±128.67a	100.00
	1 h	1 898.68±202.27a	102.33	1 548.41±163.30a	104.69
	2 h	1 772.01±143.33b	95.50	1 462.62±115.73a	98.89
	4 h	1 807.25±188.77a	97.40	1 401.08±152.40b	94.73
	6 h	1 712.62±123.19c	92.30	1 398.68±99.46b	94.57

The Duncan test method was used to analyze, and different letters in the same column indicated significant differences ( $P<0.05$ ). N.D.: Not detected.

能力达到(1 531.46±229.46) mm<sup>2</sup>/mL, 而 pH 3.0 的缓冲液并没有抑菌能力, 可以排除 pH 对指示菌的影响。抗菌肽在 pH>5.5 时对 2 株指示菌失去抑菌效果, 这是由于当溶液 pH 大于抗菌肽等电点(5.24)时, 五肽的净电荷发生改变, 由带正电荷变为不带电荷或带负电荷, 丧失与细胞膜表面的磷脂阴离子结合的能力, 从而影响其抑菌能力。而随着 pH 降低, 溶液中的抗菌肽带正电荷量增加, 从而更好发挥离子结合作用, 使抑菌能力增强。其在 100 °C 处理 30 min 后对 2 株指示菌仍能保持 95% 和 98% 的抑菌能力, AU 分别为(1 764.36±139.81) mm<sup>2</sup>/mL 和 (1 474.45±112.87) mm<sup>2</sup>/mL, 说明抗菌肽 SGAGY 具有较强的热稳定性。其在紫外线照射 6 h 后仍能保持 92% 和 94% 的活性, AU 分别为 (1 712.62±123.19) mm<sup>2</sup>/mL 和 (1 398.68±99.46) mm<sup>2</sup>/mL, 说明该细菌素有较强的紫外线照射稳定性。推

测原因是热处理及紫外线照射处理会使大分子蛋白质发生变性从而失活<sup>[23]</sup>, 但抗菌肽 SGAGY 作为小分子五肽, 不具有三级结构, 不会因结构改变而失活, 并且分子内的氨基酸残基均较为稳定, 热处理和紫外线照射对其作用效果有限, 因而具有较强的热稳定和紫外线照射稳定性。

实验还测定了抗菌肽 SGAGY 对不同菌株的最低抑制浓度, 结果见表 3。抗菌肽 SGAGY 对 G<sup>+</sup> 和 G<sup>-</sup> 菌均有抑制能力, 对蜡状芽孢杆菌及肺炎克雷伯氏菌的抑制能力最强, MIC=0.7 g/L; 对阪崎氏肠杆菌的抑制能力最弱, MIC=1.6 g/L。从实验结果来看, 其对 G<sup>+</sup> 菌的抑制能力强于对 G<sup>-</sup> 菌的抑制。抗菌肽 SGAGY 在 2.0 g/L 浓度以下对米曲霉、黑曲霉、酿酒酵母及白色念珠菌均未表现出抑制能力。这是由于真菌与细菌的细胞壁和细胞膜结构不同、表面物质所带电荷量不同, 结合阳离子抗菌肽的能力及受到的抑制



**表 3** 抗菌肽对各菌株的最低抑制浓度  
Table 3 MIC of antimicrobial peptide SGAGY against various strains

Indicator strains	MIC (g/L)
<i>B. cereus</i> +	0.7
<i>K. pneumoniae</i> +	0.7
<i>B. amyloliquefaciens</i> +	0.8
<i>B. subtilis</i> +	0.8
<i>S. aureus</i> +	0.8
<i>S. gullinarum</i> -	0.8
<i>P. aeruginosa</i> -	1.0
<i>E. coli</i> -	1.0
<i>V. parahaemolyticus</i> -	1.2
<i>E. sakazakii</i> -	1.6
<i>A. niger</i> *	N.D.
<i>A. oryzae</i> *	N.D.
<i>C. albicans</i> *	N.D.
<i>S. cerevisiae</i> *	N.D.

+: Gram-positive strains; -: Gram-negative strains; \*: Fungi; N.D.: Not detected.

效果也有所不同。因此,在实验条件下,抗菌肽 SGAGY 对真菌不具有抑制效果。该结果表明适当浓度的抗菌肽 SGAGY 能够有效抑制食品中的腐败细菌和食源性致病细菌,有作为全新的食品抗菌防腐剂的的应用前景。但其对食品中可能出现的污染类真菌几乎没有抑制作用,所以限制了其部分应用范围。

## 2.2 基因组学结构与基因功能分析

### 2.2.1 基因组结构

为挖掘抗菌肽合成相关的基因,对菌株 J50 开展了基因组从头测序,基因组组装结果如图 4,菌株 J50 的基因组 DNA 具有 1 条染色体 DNA 及 7 条质粒,均为环状结构。相关基因组数据文件已上传至 NCBI 数据库,项目编号为 PRJNA1047294,基因组编号为 CP140096。其中,染色体 DNA 共包含 3 023 556 bp 碱基对,2 987 个蛋白质编码序列,G+C 含量为 44.82%。

### 2.2.2 基因功能注释

对菌株 J50 基因组上的基因序列进行分析,并使用多种数据库进行基因功能注释,可根据基因的具体功能挖掘出有价值的基因。

根据 NR 数据库的比对分析,结果如图 5。可知植物乳植杆菌 J50 的大部分基因来自同种植物乳植杆菌(53.89%),绝大部分基因来自同属乳植杆菌属(99.36%),极少部分基因来自细菌(0.53%)和其他来源(0.11%)。

在 KEGG 生物通路数据库上进行基因注释分析,如图 6 所示,植物乳植杆菌 J50 具有 391 个碳水化合物代谢基因、238 个全局和概览图基因、182 个氨基酸代谢基因、114 个核苷酸代谢基因、152 个膜运输基因、116 个能量代谢基因,34 个抗药性基因和 22 个次级代谢产物基因等。具有众多基因的特点与其菌株来源有关,豆瓣酱中营养成分复杂,群落演替明显,存在菌种间的长期竞争及相互作用,丰富的基因使 J50 能够适应多种复杂环境。其中碳水化合物、氨基酸、核苷酸及能量代谢基因是菌株 J50 生长发育所必需的基因,而膜运输基因、抗药性基因及次级代谢产物基因则与其在群落演替中扮演的角色高度相关,赋予菌株 J50 抵抗其他菌种产生的抗生素类物质的能力,并分泌自身特有的拮抗物质从而取得优势地位。

使用 CARD 预测菌株 J50 的抗生素抗性基因,结果如表 4。可以看出,菌株 J50 具有 26 种抗生素抗性,共 180 个相关基因,抗性机制包括外排泵、靶点替换、靶点保护、抗生素失活。菌株 J50 能够抵抗诸如大环内酯类、多肽/糖肽类、四环素类、林可酰胺类、氟喹诺酮类等多种抗生素。在这些抗性基因中,多肽/糖肽类抗性基因使其能够免疫自身产生的抗菌肽的毒性。菌株 J50 具有多种抗生素抗性,使其在豆瓣酱的复杂环境中能够在与其他菌种生存竞争

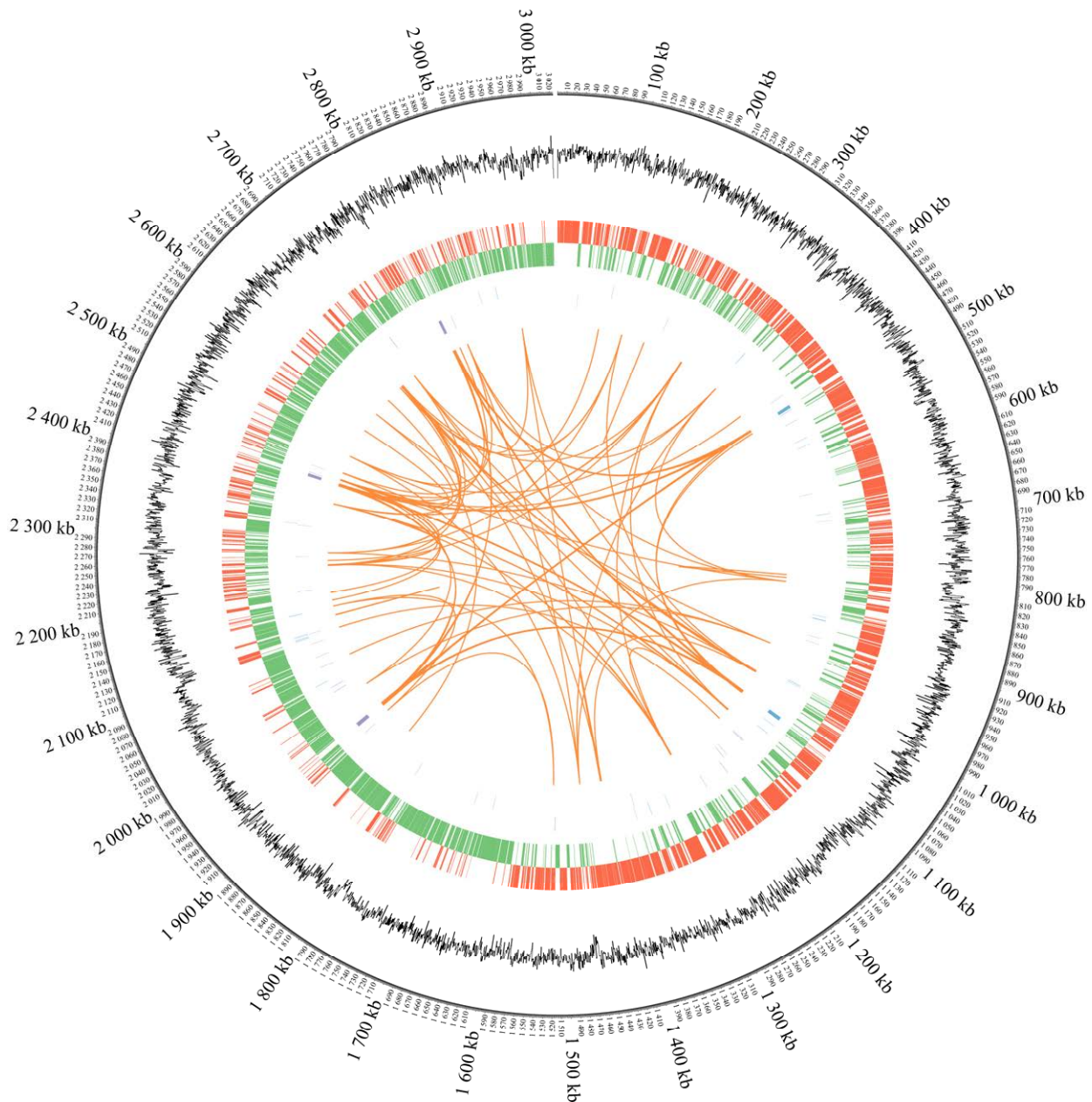


图4 菌株J50的基因组结构 圈图展示7种信息,从外至内分别是:第1圈是基因组位置信息,第2圈是G+C含量信息,第3圈是正链上的编码基因(红色标注),第4圈是负链上的编码基因(绿色标注),第5圈是正链上的ncRNA信息(蓝色标注),第6圈是负链上的ncRNA信息(紫色标注),第7圈标注的是基因组内长片段重复序列信息(橙色标注)。

Figure 4 Genome structure of strain J50. The circle diagram shows seven types of information, from outside to inside: the 1st circle is genomic location information, the 2nd circle is G+C content information, the 3rd circle is coding genes on the positive strand (marked in red), the 4th circle is coding genes on the negative strand (marked in green), the 5th circle is ncRNA information on the positive strand (marked in blue), the 6th circle is ncRNA information on the negative strand (marked in purple), and the 7th circle is long fragment repeat sequence information within the genome (marked in orange).

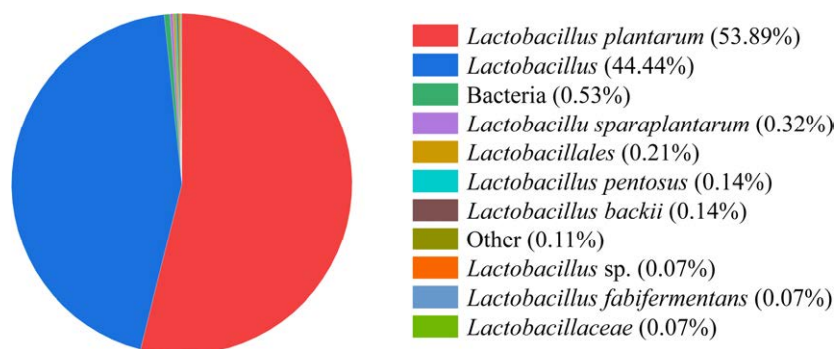


图 5 菌株 J50 NR 同源物种贡献

Figure 5 NR homologous species contribution of strain J50.



图 6 基因组 KEGG 注释结果

Figure 6 KEGG annotation results of genome.

表 4 抗性基因注释结果

Table 4 Annotation results of drug resistance genes

Types of drug resistance	Number of genes
Macrolide antibiotic	38
Peptide/glycopeptide antibiotic	30
Tetracycline antibiotic	19
Fluoroquinolone antibiotic	15
Lincosamide antibiotic	15
Aminocoumarin antibiotic	7
Fosfomycin	6
Nitroimidazole antibiotic	6
Triclosan	5
Aminoglycoside antibiotic	4
Fusidic acid	4
Monobactam	4
Mupirocin	4
Isoniazid	3
Streptogramin antibiotic	3
Cephalosporin	2
Oxazolidinone antibiotic	2
Pleuromutilin antibiotic	2
Phenicol antibiotic	2
Rifamycin antibiotic	2
Para-aminosalicylic acid	1
Sulfonamide antibiotic	1
Acridine dye	1
Diaminopyrimidine antibiotic	1
Elfamycin antibiotic	1
Nitrofurantoin antibiotic	1

时占据优势地位。由于这些抗生素抗性基因均位于染色体 DNA，而质粒上不存在抗性基因，因此不易发生细菌种间抗生素抗性基因的转移。但是，仍需相关实验证明菌株 J50 的安全性和可靠性。

使用软件 antiSMASH 分析，得到多个次级代谢产物基因簇，其中有与抗菌肽的合成和修饰高度相关的 RiPP (核糖体合成和翻译后修饰肽) 基因簇，结构见图 7。基因簇 RiPP (基因组位置 365 448–377 598) 中，具有 5 个多肽内切酶

编码基因(SPI00\_03015, SPI00\_03040, SPI00\_03045, SPI00\_03050, SPI00\_03055)、1 个多肽裂解及转运酶基因(SPI00\_03030)，以及编码双肽细菌素 plantaricin EF 的基因 *plnE* 和 *plnF*<sup>[24]</sup>。多肽内切酶能够对翻译后的抗菌肽前体肽进行剪切修饰，并通过转运酶运送到胞外。基因 *plnE* 和 *plnF* 分别编码多肽 plantaricin E 和 plantaricin F，当这 2 条肽段同时存在时能够结合细胞膜从而展现抑菌效果<sup>[25-26]</sup>，并且对 G<sup>+</sup>菌和 G<sup>-</sup>菌均具有良好的抑制作用。这表明植物乳植杆菌 J50 至少能够产生 2 种目前已知的抗菌肽。

遗憾的是，在基因组分析结果中并没有挖掘到抗菌肽 SGAGY 的编码基因。推测五肽 SGAGY 的合成并不属于核糖体翻译后修饰系统，而是非核糖体肽(non-ribosomal peptide)，不属于核糖体合成，而是由非核糖体多肽合成蛋白质(non-ribosomal peptide synthase)合成的<sup>[27]</sup>，这也能解释其结构简单、仅由 5 个氨基酸组成的现象。挖掘定位抗菌肽的合成基因对于理论和生产有关键意义，因此在今后的研究中有必要对 SGAGY 的合成代谢机制进行深入的探究，从而定位到关键的合成酶系。

### 3 讨论

作为已经商品化使用的抗菌肽，乳酸链球菌素 nisin 已经得到广泛的研究，从乳酸链球菌发酵液中分离纯化 nisin 所采用的方法包括等电点沉淀、盐析、离子交换色谱<sup>[28]</sup>等方法。然而，nisin 的使用存在严重的局限性<sup>[29]</sup>，即仅对 G<sup>+</sup>菌有效果，不能抑制 G<sup>-</sup>菌如 *E. coli*，极大限制了 nisin 的使用范围。因此，从乳酸菌中挖掘新型、高效、广谱抑菌的抗菌肽作为 nisin 的替代品，具有较好的前景。本研究针对一株广谱抑菌的植物乳植杆菌(*L. plantarum*) J50 的抑菌



图 7 Plantaricin EF RiPP 基因簇结构

Figure 7 Structure of the RiPP gene cluster of plantaricin EF.

物质展开研究，分别通过发酵液分离纯化和基因组学分析的方式挖掘抗菌肽。使用不同种类的水解酶处理发酵液，蛋白酶类的处理使发酵液的抑菌能力显著下降，所以判断发酵液中的抑菌物质为抗菌肽<sup>[30]</sup>。并且，经淀粉酶及脂肪酶处理后发酵液的抑菌能力没有发生显著变化，说明发酵液中的抗菌肽不具有糖基化修饰及脂质修饰<sup>[31]</sup>。发酵液经过有机溶剂抽提、凝胶过滤层析、半制备液相色谱分离纯化，并使用液质联用仪表征出抗菌肽相对分子质量 453.44 Da 和氨基酸序列 SGAGY (N→C)。抗菌肽 SGAGY 具有两亲性性质，能行使表面活性剂的作用<sup>[32]</sup>，使其他细菌细胞膜功能造成紊乱<sup>[33]</sup>，从而达到抑制食源性致病菌的作用。该肽段的抑菌性质未被相关文献报道过。人工合成了抗菌肽 SGAGY 纯品并测试其对热处理、pH 和紫外线照射处理的稳定性，结果显示其具有优秀的热稳定性和紫外线照射稳定性，在 pH≤5.5 时能发挥抑菌能力。因此，可以认为抗菌肽 SGAGY 能耐受食品生产过程中常见的热处理和 pH 环境，并且有较强的耐紫外线照射能力，具有良好的应用前景。目前人工合成多肽多用固相化学合成法<sup>[34]</sup>，成本较高，若能挖掘出抗菌肽合成相关基因并构建工程菌株，通过生物工程手段生产抗菌肽<sup>[35]</sup>，将大幅度减少生产费用。抑菌圈实验结果显示抗菌肽 SGAGY 对多种食源性致病细菌具有较强的抑制能力，对 G<sup>+</sup>菌的抑制效果比 G<sup>-</sup>菌好，但对实验的真菌均未产生抑制效果。因此可以认为在合适的添加量下，抗菌肽 SGAGY 的加入可以抑制食源性致

病细菌的生长，使其有望应用为广谱抗细菌的新型天然防腐剂。基因组测序和分析认为抗菌肽 SGAGY 是非核糖体肽，它的合成通过多酶体系催化氨基酸连接<sup>[36]</sup>，但本研究未能挖掘到相关合成酶系，需要开展更深入的研究。在菌株 J50 基因组中还发现核糖体合成和翻译后修饰系统的基因簇，其中包括双肽细菌素 plantaricin EF 的编码基因 *plnE* 和 *plnF* 以及相关功能基因。细菌素 plantaricin EF 是一种高效的抗菌肽<sup>[37-39]</sup>，能同时针对 G<sup>-</sup>菌和 G<sup>+</sup>菌发挥抑制作用。其在发酵液中与抗菌肽 SGAGY 发挥协同增效作用<sup>[40]</sup>，显著增强发酵液的抑菌能力。

## 4 结论

植物乳植杆菌(*L. plantarum*) J50 的发酵液经分离纯化，鉴定出其中一种抑菌物质是抗菌肽，其相对分子质量 453.44 Da，氨基酸序列为 SGAGY (N→C)，其抑菌作用为本次研究首次发现。它具有热稳定性和紫外线照射稳定性，在 pH≤5.5 时能发挥抑菌能力。其对 G<sup>+</sup>菌和 G<sup>-</sup>菌均具有抑制能力，并且对 G<sup>+</sup>菌的抑制效果比 G<sup>-</sup>菌好，其对蜡状芽孢杆菌及肺炎克雷伯氏菌的抑制能力最强，MIC=0.7 g/L，对阪崎氏肠杆菌抑制能力最弱，MIC=1.6 g/L。经基因组学分析判断抗菌肽 SGAGY 是非核糖体肽，其合成代谢的具体机制需开展进一步研究。基因组学分析还发现植物乳植杆菌 J50 具有分泌细菌素 plantaricin EF 的能力。综上所述，植物乳植杆菌 J50 至少能够分泌 2 种目前已知的抗菌肽，因其高效、广谱的抑菌能力，有望替代化学合

成防腐剂, 作为新型天然防腐剂应用于食品或其他领域中。

## REFERENCES

- [1] YAN H, AIZHAN R, LU YY, LI X, WANG X, YI YL, SHAN YY, LIU BF, ZHOU Y, LÜ X. A novel bacteriocin BM1029: physicochemical characterization, antibacterial modes and application[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2021, 130(3): 755-768.
- [2] 罗玲莉. 细菌素 BM1157 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2021.
- [3] LUO LL. Study on antibacterial mechanism of bacteriocin BM1157 against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2021 (in Chinese).
- [3] 刘锦红. 天然食品防腐剂乳酸链球菌素在乳制品中的应用研究[J]. *轻工科技*, 2021, 37(7): 8-9.
- [4] BÜYÜKKIRAZ ME, KESMEN Z. Antimicrobial peptides (AMPs): a promising class of antimicrobial compounds[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2022, 132(3): 1573-1596.
- [5] SILVEIRA RF, ROQUE-BORDA CA, VICENTE EF. Antimicrobial peptides as a feed additive alternative to animal production, food safety and public health implications: an overview[J]. *Animal Nutrition*, 2021, 7(3): 896-904.
- [6] ANGELESCU IR, GROSU-TUDOR SS, COJOC LR, MARIA GM, CHIRIȚOIU GN, MUNTEANU CVA, ZAMFIR M. Isolation, characterization, and mode of action of a class III bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 34.9[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2022, 38(12): 220.
- [7] LI HW, XIANG YZ, ZHANG M, JIANG YH, ZHANG Y, LIU YY, LIN LB, ZHANG QL. A novel bacteriocin from *Lactobacillus salivarius* against *Staphylococcus aureus*: Isolation, purification, identification, antibacterial and antibiofilm activity[J]. *LWT*, 2021, 140: 110826.
- [8] ZAFAR M, ALAM S, SABIR M, SABA N, DIN AU, AHMAD R, KHAN MR, MUHAMMAD A, DAYISOYLU KS. Isolation, characterization, bacteriocin production and biological potential of Bifidobacteria of ruminants[J]. *Analytical Biochemistry*, 2022, 658: 114926.
- [9] WANG J, ZHAO X, YANG YW, ZHAO AM, YANG ZN. Characterization and bioactivities of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW32[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 74: 119-126.
- [10] ZHAO Q, SHI YN, WANG XF, HUANG AX. Characterization of a novel antimicrobial peptide from buffalo casein hydrolysate based on live bacteria adsorption[J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(12): 11116-11128.
- [11] DÜNDAR H, ATAKAY M, ÇELIKBİÇAK Ö, SALIH B, BOZOĞLU F. Comparison of two methods for purification of enterocin B, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* W3[J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2015, 45(8): 796-809.
- [12] WOO C, JUNG S, FUGABAN JI, BUCHELI JV, HOLZAPFEL WH, TODOROV SD. Bacteriocin production by *Leuconostoc citreum* ST110LD isolated from organic farm soil, a promising biopreservative[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2021, 131(3): 1226-1239.
- [13] RAY MOHAPATRA A, JEEVARATNAM K. Inhibiting bacterial colonization on catheters: antibacterial and antibiofilm activities of bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* SJ33[J]. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2019, 19: 85-92.
- [14] DAI JY, FANG LM, ZHANG MM, DENG HL, CHENG X, YAO MY, HUANG L. Isolation and identification of new source of bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* C010 and growth kinetics of its batch fermentation[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2022, 38(4): 67.
- [15] MERLICH A, GALKIN M, CHOISET Y, LIMANSKA N, VASYLIEVA N, IVANYTSIA V, HAERTLÉ T. Characterization of the bacteriocin produced by *Enterococcus italicus* ONU547 isolated from Thai fermented cabbage[J]. *Folia Microbiologica*, 2019, 64(4): 535-545.
- [16] BOSÁK J, HRALA M, MICENKOVÁ L, ŠMAJS D. Non-antibiotic antibacterial peptides and proteins of *Escherichia coli*: efficacy and potency of bacteriocins[J]. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 2021, 19(3): 309-322.
- [17] SANTHI SUDHA S, ARANGANATHAN V. Experimental elucidation of an antimycobacterial bacteriocin produced by ethnomedicinal plant-derived *Bacillus subtilis* (MK733983)[J]. *Archives of Microbiology*, 2021, 203(5): 1995-2006.
- [18] FU Y, ZHAO DB, WANG LY, JIANG GC, LIU XJ. A broad-spectrum novel bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* in Nanjing steamed roast duck: purification, antimicrobial characteristics, and antibacterial mechanisms[J]. *Food Bioscience*, 2022, 50: 101995.
- [19] LI HB, GUO LD, ZHANG XY, MU HQ, SHA SF, LIN Y, HOU HW, WANG LP. Whole-genome sequencing combined with mass spectrometry to identify bacteriocin and mine silent genes[J]. *LWT*, 2022, 169: 113975.
- [20] 刘春风, 周恺颀, 钮成拓, 等. 一株广谱抑菌的乳酸菌及其发酵方法: CN202310793558.9[P]. 2023-08-29.
- [20] LIU CF, ZHOU KJ, NIU CT, et al. A broad-spectrum anti-microbial lactic acid bacteria and its fermentation method: CN202310793558.9[P]. 2023-08-29 (in Chinese).
- [21] De MAN JC, ROGOSA M, SHARPE ME. A medium for the cultivation of lactobacilli[J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1960, 23(1): 130-135.
- [22] DASH R, BHATTACHARJYA S. Thanatin: an emerging host defense antimicrobial peptide with multiple modes of action[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(4): 1522.
- [23] 张漫敏, 曾祥益, 方利敏, 徐静宇, 程新, 姚明印, 黄林. 植物乳杆菌 C010 产细菌素的分离纯化及理化稳定性分析[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(3): 31-37.
- [23] ZHANG MM, ZENG XY, FANG LM, XU JY, CHENG X, YAO MY, HUANG L. Purification and

- physicochemical stability analysis of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C010[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(3): 31-37 (in Chinese).
- [24] EKBLAD B, KYRIAKOU PK, OPPEGÅRD C, NISSEN-MEYER J, KAZNESSIS YN, KRISTIENSEN PE. Structure-function analysis of the two-peptide bacteriocin plantaricin EF[J]. Biochemistry, 2016, 55(36): 5106-5116.
- [25] KAWAHARA A, ZENDO T, MATSUSAKI H. Identification and characterization of bacteriocin biosynthetic gene clusters found in multiple bacteriocins producing *Lactiplantibacillus plantarum* PUK6[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2022, 133(5): 444-451.
- [26] JIANG H, LI P, GU Q. Heterologous expression and purification of plantaricin NC8, a two-peptide bacteriocin against *Salmonella* spp. from *Lactobacillus plantarum* ZJ316[J]. Protein Expression and Purification, 2016, 127: 28-34.
- [27] SHI J, LIU CL, ZHANG B, GUO WJ, ZHU JP, CHANG CY, ZHAO EJ, JIAO RH, TAN RX, GE HM. Genome mining and biosynthesis of kitacinnamycins as a STING activator[J]. Chemical Science, 2019, 10(18): 4839-4846.
- [28] BRUM LFW, dos SANTOS C, ZIMNOCH SANTOS JH, BRANDELLI A. Structured silica materials as innovative delivery systems for the bacteriocin nisin[J]. Food Chemistry, 2022, 366: 130599.
- [29] SULTHANA R, ARCHER AC. Bacteriocin nanoconjugates: boon to medical and food industry[J]. Journal of Applied Microbiology, 2021, 131(3): 1056-1071.
- [30] GHOSH B, SUKUMAR G, GHOSH AR. Purification and characterization of pediocin from probiotic *Pediococcus pentosaceus* GS4, MTCC 12683[J]. Folia Microbiologica, 2019, 64(6): 765-778.
- [31] ŚMIAŁEK J, NOWAKOWSKI M, BZOWSKA M, BOCHENSKA O, WLIZŁO A, KOZIK A, DUBIN G, MAK P. Structure, biosynthesis, and biological activity of succinylated forms of bacteriocin BacSp222[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(12): 6256.
- [32] LÓPEZ-GARCÍA G, DUBLAN-GARCÍA O, ARIZMENDI-COTERO D, OLIVÁN LMG. Antioxidant and antimicrobial peptides derived from food proteins[J]. Molecules, 2022, 27(4): 1343.
- [33] GU YX, ISMAEL M, WANG X, LIU BF, SHAN YY, CHEN YJ, ZHOU Y, YI YL, XIN L. Mining and heterologous expression of bacteriocins from *Limosilactobacillus fermentum* LBM97[J]. Food Bioscience, 2021, 44: 101389.
- [34] TAN P, FU HY, MA X. Design, optimization, and nanotechnology of antimicrobial peptides: from exploration to applications[J]. Nano Today, 2021, 39: 101229.
- [35] CUI YL, LUO LL, WANG X, LU YY, YI YL, SHAN YY, LIU BF, ZHOU Y, LÜ X. Mining, heterologous expression, purification, antibactericidal mechanism, and application of bacteriocins: a review[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2021, 20(1): 863-899.
- [36] PAVITHRRA G, RAJASEKARAN R. Gramicidin peptide to combat antibiotic resistance: a review[J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2020, 26(1): 191-199.
- [37] ZHAO DY, WANG Q, MENG FQ, LU FX, BIE XM, LU ZX, LU YJ. TetR-type regulator Lp\_2642 positively regulates plantaricin EF production based on genome-wide transcriptome sequencing of *Lactiplantibacillus plantarum* 163[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(14): 4362-4372.
- [38] ZHAO DY, MENG FQ, ZHOU LB, LU FX, BIE XM, SUN J, LU ZX, LU YJ. Maltose effective improving production and regulatory biosynthesis of plantaricin EF in *Lactobacillus plantarum* 163[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(7): 2713-2723.
- [39] FIMLAND N, ROGNE P, FIMLAND G, NISSEN-MEYER J, KRISTIENSEN PE. Three-dimensional structure of the two peptides that constitute the two-peptide bacteriocin plantaricin EF[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2008, 1784(11): 1711-1719.
- [40] ABDUL AZIZ NFH, ABBASILIASI S, NG ZJ, ABU ZARIN M, OSLAN SN, TAN JS, ARIFF AB. Recovery of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Lactobacillus bulgaricus* FTDC 1211 using polyethylene-glycol impregnated amberlite XAD-4 resins system[J]. Molecules, 2020, 25(22): 5332.