

doi:10.12301/j.issn.2095-6002.2021.05.009

文章编号:2095-6002(2021)05-0074-08

引用格式:王星星,陈洲,韩盼盼,等. 外源氨基酸对侧孢短芽孢杆菌 S62-9 产 Brevilaterin 的影响[J]. 食品科学技术学报, 2021,39(5):74-81.



WANG Xingxing, CHEN Zhou, HAN Panpan, et al. Effects of exogenous amino acids on production of brevilaterin from *Brevibacillus laterosporus* S62-9[J]. Journal of Food Science and Technology, 2021,39(5):74-81.

外源氨基酸对侧孢短芽孢杆菌 S62-9 产 Brevilaterin 的影响

王星星, 陈洲, 韩盼盼, 刘杨柳, 李思霆, 贾英民*
(北京工商大学食品与健康学院, 北京 100048)

摘要:为探究添加外源氨基酸对侧孢短芽孢杆菌 S62-9 (*Brevibacillus laterosporus* S62-9, BL) 分泌抗菌肽 Brevilaterin 的影响,以 BL 发酵液的抗菌活性和 Brevilaterin 的组分变化为指标,分别采用琼脂扩散法和高效液相色谱法进行了分析。结果表明:添加 L-缬氨酸、L-甲硫氨酸和 2-氧代-3-甲基丁酸均能提高发酵液抗菌活性,抑菌直径最高可增加 18.08%。添加外源氨基酸还能改变 Brevilaterin 的组分构成。添加 L-甲硫氨酸后发酵液中只有抗菌肽组分 Brevilaterin B 和 C,且二者间的相对比例发生反转;而添加 L-缬氨酸或 2-氧代-3-甲基丁酸还能促进 BL 分泌多种新组分。添加外源氨基酸能有效提高发酵液抗菌活性并改变抗菌肽的组分构成,研究结果旨在为人工调控微生物合成新型、高效的抗菌肽奠定一定的理论基础。

关键词:侧孢短芽孢杆菌;抗菌肽;外源氨基酸;抗菌活性;组分构成

中图分类号:TS201.2;TQ465

文献标志码:A

食源性腐败微生物是引起食品变质的重要因素之一,而抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)被认为是极具应用潜力的新型生物防腐剂^[1-2],能抑制或杀死常见的食品腐败菌和部分耐药细菌等^[3],同时具有在生物体内不易残留、无免疫原性等特点。研究表明:同种生物机体中具有抗菌活性的 AMPs 通常是由多种肽混合而成,组成 AMPs 的组分不同,其抗菌特性及抗菌效果也不同^[4]。因此,改变 AMPs 的组分构成,对推广 AMPs 的生产和应用具有深远意义。

微生物源抗菌肽凭借发酵周期短、成本低廉、易于实现工业化等优势而备受关注,其中,氨基酸残基数少于 18 个的小分子肽通常是由非核糖体肽合成酶催化形成^[5],该酶的 A 结构域具有特异性识别氨

基酸或其衍生物(如 L-苯丙氨酸^[6]、L-缬氨酸^[7]、L-苏氨酸^[8])的独特功能,可以在一定程度上“掌控”微生物 AMPs 的氨基酸种类甚至组分结构。直接操纵 A 结构域以改变微生物分泌 AMPs 的种类还难以实现,但可通过添加外源氨基酸等特异性氨基酸或其衍生物来人工扩大 A 结构域的底物识别范围,进而改变 AMPs 的组分构成。Isabelle 等^[9]在培养基中添加 L-异亮氨酸,产生 2 种新的表面活性素;Iwase 等^[10]在培养基中添加氨基酸改变了伊枯草菌素 A 中同系物的比例;孙力军等^[11]在培养基中添加谷氨酸,选择性促进了脂肽中芬介素组分的分泌。本研究以一株高产 AMPs 的优良菌株——侧孢短芽孢杆菌 S62-9 (*Brevibacillus laterosporus* S62-9, BL) 为研究对象^[12-13],该菌株能够同时分泌 5 种不同结构

收稿日期:2020-11-28

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31801510;31771951);北京市自然科学基金-市教委联合重点项目(KZ201810011016)。

第一作者:王星星,女,硕士研究生,研究方向为食品微生物。

*通信作者:贾英民,男,教授,博士,主要从事食品微生物方面的研究。

的 AMPs(分别命名为 Brevilaterin A、B、C、D、E),且各组分的抗菌特性也存在差异。通过前期探索发现,该菌分泌 AMPs 的组分会受到外源氨基酸很大的影响。目前,研究主要集中在探究添加一种或分别添加几种氨基酸对 AMPs 组分合成的影响,而少有系统大量研究其对 AMPs 组分合成的影响。为此,本研究将系统探究外源氨基酸的存在对 BL 分泌 AMPs 组分产生的影响,希望为未来实现人工改变微生物合成新型、高效的 AMPs 奠定一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验菌株:酶与蛋白质工程实验室筛选的侧孢短芽孢杆菌。

抗菌活性实验用指示菌:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, ATCC 25923),中国工业微生物菌种保藏管理中心。

主要试剂:分析纯氨基酸(D/L-色氨酸、D/L-甲硫氨酸、D/L-缬氨酸、L-丙氨酸、L-甘氨酸、D-组氨酸、D/L-丝氨酸、L-羟脯氨酸、D/L-异亮氨酸、D/L-亮氨酸、L-谷氨酸、L-酪氨酸、L-胱氨酸、L-脯氨酸、L-天冬酰胺、L-苏氨酸、L-谷氨酰胺、D-天冬氨酸、D/L-苯丙氨酸、L-鸟氨酸盐酸盐)及色谱纯三氟乙酸,上海麦克林生化科技有限公司;分析纯氨基酸衍生物(3-氨基丁酸、L-蛋氨酸亚砷、S-甲基-L-半胱氨酸、2-氨基丁酸、2-羟基-4-甲基戊酸、2-氧代-3-甲基丁酸、2-羟基-3-甲基丁酸、 α -酮戊二酸),上海源叶生物科技有限公司;色谱纯乙腈,北京迈瑞达科技有限公司。

1.2 仪器与设备

TGL-20bR 型离心机,上海飞鸽股份有限公司;Scan 4000 型全自动菌落计数仪,法国 Interscience 公司;IF 260 型培养箱,德国 Memmert 公司;T6 型新世纪紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;1260 型高效液相色谱仪,美国 Agilent 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 培养基配制

营养肉汤(NB)培养基(g/L):蛋白胨 10,牛肉膏 3,氯化钠 5。pH 值 7.2,121 °C 灭菌 20 min。

营养肉汤琼脂(NA)培养基(g/L):蛋白胨 10,牛肉膏 3,氯化钠 5,琼脂 15。pH 值 7.2,121 °C 灭菌 20 min。

发酵培养基(g/L):葡萄糖 15,蛋白胨 12,氯化

锌 0.008 6,氯化钙 1.38,吐温 20 1.0。pH 值 7.0,121 °C 灭菌 20 min。

1.3.2 种子液制备

从斜面培养基中挑取适量 BL 划线接种到 NA 培养基上,在 37 °C 条件下培养 24 h。再挑取适量活化好的 BL 于 50 mL NB 培养基中,32 °C、240 r/min 摇床培养 12 h,进行活化。

1.3.3 摇瓶发酵培养

将活化好的种子液混匀,按体积分数 4% 的量分别接种于添加 5 g/L 不同氨基酸或其衍生物的发酵培养基中,32 °C、240 r/min 发酵培养 24 h,以未添加氨基酸或其衍生物的为空白对照组。

1.3.4 BL 菌体量的测定

发酵完成后,分别取摇匀的发酵液 2 mL,适当稀释,采用紫外分光光度计测定 600 nm 波长下样品的 OD 值,即为菌体量。

1.3.5 发酵液抗菌活性及 Brevilaterin 组分的测定

样品前处理:分别取添加不同氨基酸或其衍生物发酵的发酵液 1.5 mL,8 000 r/min 离心 5 min (4 °C),取上清液用 0.22 μ m 的无菌滤膜过滤备用。

发酵液抗菌活性的测定:采用琼脂扩散法^[14],以金黄色葡萄球菌为指示菌,将活化至对数期的指示菌液稀释至 OD₆₀₀ 为 0.7~0.8,取稀释后的菌液,以体积分数 3% 的量接种于 45 °C 左右的 NA 培养基中,混匀,倒平板,待冷却凝固,将无菌牛津杯置于平板上,分别加入 50 μ L 上清液,于 37 °C 培养 12~16 h,全自动菌落计数仪测定抑菌直径。将添加不同氨基酸或其衍生物的上清液的抑菌直径记为 A₁,对照组抑菌直径记为 A₀,抑菌直径增长率计算见式(1)。

$$\text{抑菌直径增长率} = \frac{A_1 - A_0}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

Brevilaterin 组分的测定:采用高效液相色谱法^[15],色谱柱为 InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 (4.6 mm \times 150 mm, 4 μ m)、XBridge[®] Peptide BEH C18 (4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m)、XSelect[®] Peptide CSH[™] C18 (4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m),流动相 A 为体积分数 0.1% 的 TFA 水溶液,流动相 B 为体积分数 0.1% 的 TFA 乙腈溶液,检测波长为 220 nm,柱温为 30 °C,流速为 1 mL/min,进样量 20 μ L,洗脱流程见表 1。

1.4 数据处理

实验均重复 3 次,采用 Excel 2019 和 Origin 8.1 软件进行数据处理。

表1 洗脱流程
Tab.1 Elution process

时间/min	φ (流动相 A)/%	φ (流动相 B)/%
0	85.0	15.0
25	58.0	42.0
30	58.0	42.0
33	20.0	80.0
36	85.0	15.0
46	85.0	15.0

2 结果与讨论

2.1 L-氨基酸对发酵液抗菌活性及 Brevilaterin 组分构成的影响

2.1.1 L-氨基酸对发酵液抗菌活性的影响

以菌体量为指标,考察了不同 L-氨基酸对菌

体生长情况的影响(表2)。结果显示:18种 L-氨基酸的添加在不同程度上影响了菌体生长。其中,与对照组相比,L-鸟氨酸盐酸盐的促进作用最明显,其菌体量增加了 54.97%,L-异亮氨酸和 L-亮氨酸次之,分别为 27.81%和 26.49%;而 L-甘氨酸对菌体生长呈明显的抑制作用,其菌体量下降了 39.07%。

同时,以抑菌直径增长率为指标,考察了不同 L-氨基酸对发酵液抗菌活性的影响(表2)。结果显示:18种 L-氨基酸对发酵液抗菌活性具有不同程度的影响。L-缬氨酸、L-鸟氨酸盐酸盐、L-甲硫氨酸的添加均能明显提高发酵液抗菌活性,其中以 L-缬氨酸的促进作用最强,其抑菌直径的增长率达 18.08%,L-鸟氨酸盐酸盐次之;而 L-异亮氨酸和 L-亮氨酸却表现出较强的抑制作用,其抑菌直径分别降低了 13.52%和 13.28%。

表2 不同 L-氨基酸对发酵液抗菌活性的影响

Tab.2 Effects of different L-amino acids on antibacterial activity of fermentation broth

L-氨基酸	OD ₆₀₀	抑菌直径增长率/%	L-氨基酸	OD ₆₀₀	抑菌直径增长率/%
对照	1.51 ± 0.01	0	L-谷氨酸	1.50 ± 0.03	2.87 ± 1.48
L-色氨酸	1.80 ± 0.01	0.68 ± 2.37	L-酪氨酸	2.90 ± 0.04*	3.35 ± 3.02
L-甲硫氨酸	1.37 ± 0.01	5.01 ± 1.48	L-胱氨酸	1.82 ± 0.04*	-0.45 ± 0.45
L-缬氨酸	1.58 ± 0.04	18.08 ± 0.41	L-脯氨酸	1.35 ± 0.06	3.65 ± 1.72
L-丙氨酸	1.34 ± 0.05	-0.93 ± 1.01	L-天冬酰胺	1.37 ± 0.02	-0.21 ± 1.43
L-甘氨酸	0.92 ± 0.02	-1.64 ± 4.03	L-苏氨酸	1.58 ± 0.03	0.74 ± 0.82
L-丝氨酸	1.51 ± 0.02	0.97 ± 1.09	L-谷氨酰胺	1.48 ± 0.01	3.11 ± 1.09
L-羟脯氨酸	1.41 ± 0.01	1.57 ± 2.52	L-苯丙氨酸	1.33 ± 0.05	-3.54 ± 2.70
L-异亮氨酸	1.93 ± 0.01	-13.52 ± 1.65	L-鸟氨酸盐酸盐	2.34 ± 0.01	9.30 ± 0.79
L-亮氨酸	1.91 ± 0.06	-13.28 ± 2.29			

*表示 L-酪氨酸和 L-胱氨酸的溶解性差,导致发酵液的 OD₆₀₀ 值大。

2.1.2 L-氨基酸对 Brevilaterin 组分构成的影响

外源添加 L-氨基酸能够显著影响发酵液抗菌活性,而发酵液中 AMPs 的组分构成不同,表现出的抗菌活性也不同^[11],因此,本研究进一步通过 HPLC 分析了添加 L-氨基酸后发酵液中 Brevilaterin 组分构成的变化情况,见图 1(由于 Brevilaterin A 的含量很低,在文中不予以比较)。当未添加 L-氨基酸发酵时,BL 分泌的 AMPs 以 Brevilaterin B、C 和 E 为主。相比而言,添加 L-鸟氨酸盐酸盐能选择性提高 Brevilaterin B、C 和 E 的含量[图 1(a)];而 L-亮氨酸或 L-异亮氨酸的添加却使得 Brevilaterin B、C、D 和 E 的含量均显著降低[以图 1(b)为例];添加

L-缬氨酸发酵后,Brevilaterin B、C、D 和 E 之间的相对比例发生很大变化,Brevilaterin B 的含量显著降低,而 Brevilaterin E 未检测出,同时还出现了多种未知组分[图 1(c)];添加 L-甲硫氨酸后,HPLC 只能检测到 Brevilaterin B 和 C,二者间相对比例发生了反转[图 1(d)];而添加其余 L-氨基酸对 Brevilaterin 的组分构成几乎无影响。

小分子 AMPs 通常是由非核糖体肽合成酶催化形成,该酶是一个庞大的酶组体系,由多种具备不同催化功能的催化蛋白按特定空间顺序排列而成,各模块专一性催化对应单元并组装到新生肽链当中^[16]。其中,腺苷酰化酶主要负责特异性识别氨基

酸底物,它可直接参与调控小分子肽结构中的氨基酸种类和数量^[17]。从本研究结果来看,外源添加的氨基酸确实能显著影响 AMPs 的分泌,推测原因是外源添加的氨基酸能为该酶组体系的催化合成提供更多的底物选择,进而改变 AMPs 的组分构成。

氨基酸作为重要的生物小分子,在微生物发酵过程中对菌体生长及其次级代谢物的合成起着关键性作用^[18]。董难等^[19]发现:在培养基中添加 L-谷氨酸不仅能促进 *Streptomyces* sp. M-Z18 的生长,还能促进 ϵ -聚赖氨酸的分泌。结合 2.1.1 节中添加 L-氨基酸对菌体生长情况的影响,本研究发现:添加 L-鸟氨酸盐酸盐不仅能促进菌体生长,还能选择性促进 Brevilaterin B、C 和 E 的分泌。Wu 等^[20]报道,在培养基中添加 L-酪氨酸会抑制伊枯草菌素 A 的分泌。本研究也发现,添加

L-异亮氨酸或 L-亮氨酸显著抑制了 Brevilaterin B、C、D 和 E 的分泌。此外,Yulia^[21]发现,培养基中添加 L-缬氨酸能明显改变伊枯草菌素 A 中各组分间的相对比例。朱玲燕等^[22]发现,在培养基中添加 L-谷氨酸、L-亮氨酸、L-天冬氨酸和 L-缬氨酸均能选择性提高表面活性素中 C₁₅ 组分的分泌量。孙力军等^[11]也发现添加 L-谷氨酸发酵后,可产生 3 种新的表面活性素组分。同样,本研究发现:添加 L-缬氨酸或 L-甲硫氨酸能改变 Brevilaterin 初始组分间的相对比例;而添加 L-甲硫氨酸能显著促进 Brevilaterin B 的分泌,添加 L-缬氨酸则产生了新的 AMPs 组分。添加 L-鸟氨酸盐酸盐、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-缬氨酸或 L-甲硫氨酸影响了发酵液中 Brevilaterin 的组分构成,进而表现出不同的抗菌活性。

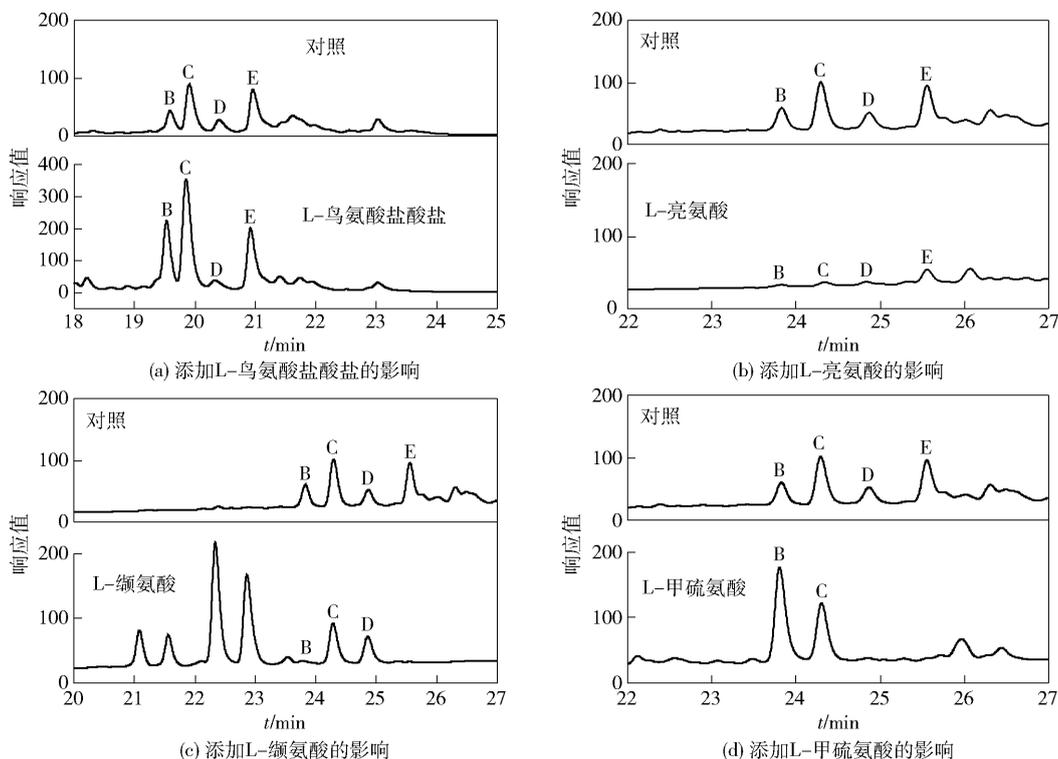


图1 不同 L-氨基酸对 Brevilaterin 组分构成的影响

Fig. 1 Effects of different L-amino acids on component constitution of Brevilaterin

2.2 D-氨基酸对发酵液抗菌活性及 Brevilaterin 组分构成的影响

2.2.1 D-氨基酸对发酵液抗菌活性的影响

考察了不同 D-氨基酸对菌体生长情况的影响(表 3)。结果显示:D-组氨酸的促进作用最明显,菌体量增加了 46.56%,D-甲硫氨酸次之;但 D-苯丙氨酸、D-丝氨酸和 D-缬氨酸对菌体生长具有一定的抑制作用,其菌体量分别下降了 30.53%、29.77%、

11.45%。

D-氨基酸对发酵液抗菌活性影响的实验结果显示:添加 D-组氨酸能明显提高发酵液抗菌活性,抑菌直径增长率为 7.04%;而添加 D-异亮氨酸、D-亮氨酸、D-缬氨酸、D-甲硫氨酸则表现出抑制作用,其中 D-异亮氨酸、D-亮氨酸和 D-缬氨酸的抑制作用最强,抑菌直径分别降低了 33.61%、23.14%、23.13%。

表3 不同D-氨基酸对发酵液抗菌活性的影响

Tab.3 Effects of different D-amino acids on antibacterial activity of fermentation broth

D-氨基酸	OD ₆₀₀	抑菌直径增长率/%	D-氨基酸	OD ₆₀₀	抑菌直径增长率/%
对照	1.31 ± 0.00	—	D-异亮氨酸	1.51 ± 0.01	-33.61 ± 0.00
D-色氨酸	1.60 ± 0.07	1.65 ± 3.51	D-亮氨酸	1.66 ± 0.04	-23.14 ± 3.60
D-甲硫氨酸	1.75 ± 0.01	-7.94 ± 1.71	D-天冬氨酸	1.31 ± 0.02	1.38 ± 1.26
D-缬氨酸	1.16 ± 0.02	-23.13 ± 2.36	D-苯丙氨酸	0.91 ± 0.02	0.55 ± 0.95
D-组氨酸	1.92 ± 0.01	7.04 ± 1.85	D-丝氨酸	0.92 ± 0.00	1.10 ± 2.66

2.2.2 D-氨基酸对 Brevilaterin 组分构成的影响

本研究进一步通过 HPLC 分析了添加 D-氨基酸后 Brevilaterin 组分构成的变化情况(图2)。添加 D-组氨酸能选择性提高 Brevilaterin B、C 和 E 的含量[图2(a)];添加 D-缬氨酸后, HPLC 只能检测出 Brevilaterin C 和 E, 其含量均显著降低[图2(b)];添加 D-甲硫氨酸后, HPLC 只能检测出 Brevilaterin B 和 C, 其含量也显著降低[图2(c)];添加 D-亮氨酸和 D-异亮氨酸后则均只检测出一个新组分[以图2(d)为例];而添加其余 D-氨基酸对 Brevilaterin 的组分构成几乎无影响。添加 D-组氨酸、D-异亮氨酸或 D-亮氨酸、D-缬氨酸或 D-甲硫氨酸影响了发酵液中 Brevilaterin 的组分构成, 进而表现出不同的抗菌活性。此外, 结合 2.2.1 节中添加 D-氨基

酸对菌体生长情况的影响, 发现添加 D-组氨酸不仅能够促进菌体生长, 还能选择性促进 Brevilaterin B、C 和 E 的分泌。

廖福荣^[23]发现在半合成培养基中添加 L-缬氨酸可促进环孢菌素 A 的合成; 相反, 添加 D-缬氨酸却抑制了环孢菌素 A 的形成。Wu 等^[24]发现添加 D-甲硫氨酸和 D-苯丙氨酸能促进乳酸链球菌素的产生, 但添加 L 型的氨基酸却不产生任何影响。本研究同样也发现: 添加 L-氨基酸对 Brevilaterin 组分的影响不同于 D-氨基酸。

2.3 氨基酸衍生物对发酵液抗菌活性及 Brevilaterin 组分构成的影响

2.3.1 氨基酸衍生物对发酵液抗菌活性的影响

不同氨基酸衍生物对菌体生长情况的影响见表

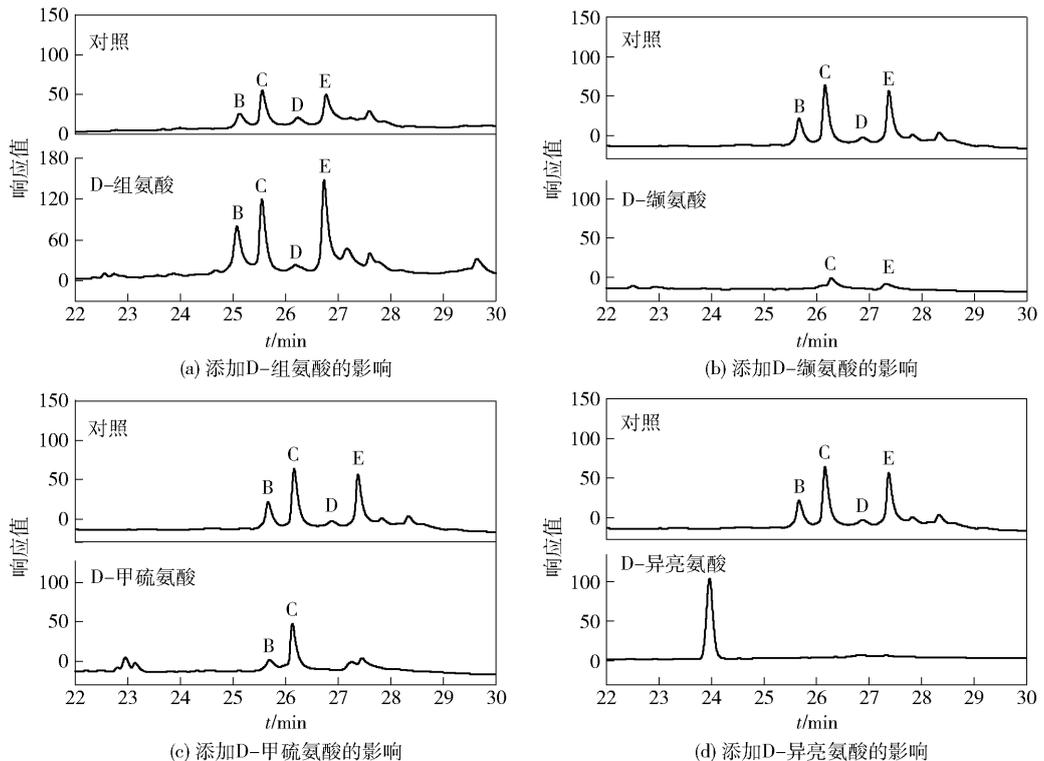


图2 不同D-氨基酸对 Brevilaterin 组分构成的影响

Fig.2 Effects of different D-amino acids on component constitution of Brevilaterin

4。结果显示:3-氨基丁酸的促进作用最明显,菌体量增加了 42.86%,2-氧代-3-甲基丁酸次之;而添加 2-氨基丁酸、2-羟基-3-甲基丁酸或 2-羟基-4-甲基戊酸却表现出一定的抑制作用,菌体量分别下降了 21.80%、12.78%、11.28%。

表 4 不同氨基酸衍生物对发酵液抗菌活性的影响

Tab. 4 Effects of different amino acid derivatives on antibacterial activity of fermentation broth

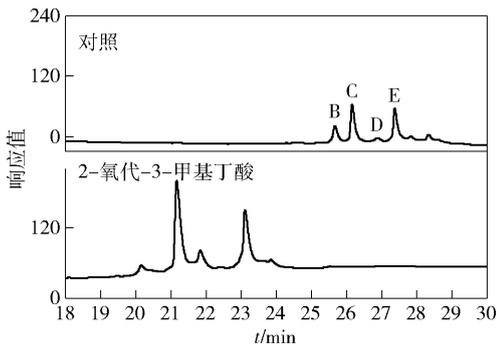
氨基酸衍生物	OD ₆₀₀	抑菌直径增长率/%	氨基酸衍生物	OD ₆₀₀	抑菌直径增长率/%
对照	1.33 ± 0.04	—	2-羟基-4-甲基戊酸	1.18 ± 0.04	-1.43 ± 1.84
3-氨基丁酸	1.90 ± 0.03	-0.23 ± 2.19	2-氧代-3-甲基丁酸	1.70 ± 0.04	8.83 ± 2.51
L-蛋氨酸亚砷	1.48 ± 0.04	0.91 ± 0.39	2-羟基-3-甲基丁酸	1.16 ± 0.09	-2.43 ± 3.10
S-甲基-L-半胱氨酸	1.52 ± 0.03	2.72 ± 1.36	α-酮戊二酸	1.57 ± 0.01	-2.23 ± 4.35
2-氨基丁酸	1.04 ± 0.07	-8.39 ± 0.39			

2.3.2 氨基酸衍生物对 Brevilaterin 组分构成的影响

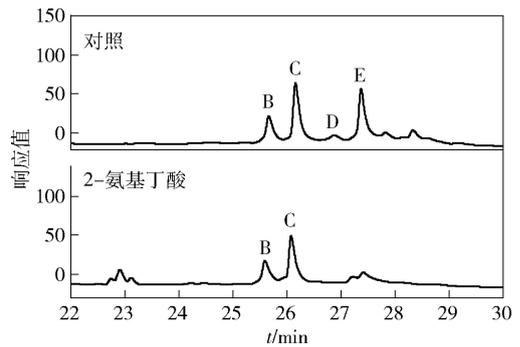
本研究通过 HPLC 进一步分析了添加氨基酸衍生物后 Brevilaterin 组分构成的变化情况(图 3)。添加 2-氧代-3-甲基丁酸后,HPLC 检测出多种未知组分,而 Brevilaterin B、C、D、E 均未检测出[图 3(a)];添加 2-氨基丁酸后,HPLC 只能检测出 Brevilaterin B 和 C,其含量也显著降低[图 3(b)];而添加其余氨基酸衍生物对 Brevilaterin 的组分构成几乎无影响。

除添加氨基酸对 AMPs 的合成有影响外,某些氨基酸的衍生物同样会对 AMPs 的合成产生重要影响。Traber 等^[25]发现加入 2-氨基丁酸能促进环孢

菌素 A 的合成,加入 3-氨基丁酸却抑制了其合成。Kobel 等^[26]发现添加 D/L-α-氨基丁酸可抑制除环孢霉素 A 外的所有环孢霉素的形成。本研究结果表明:添加 2-氧代-3-甲基丁酸能促进 BL 分泌多种新组分,添加 2-氨基丁酸则抑制了 Brevilaterin B 和 C 的合成。添加 2-氧代-3-甲基丁酸或 2-氨基丁酸影响了发酵液中 Brevilaterin 的组分构成,进而表现出不同的抗菌活性。此外,结合 2.3.1 中添加氨基酸衍生物对菌体生长情况的影响,发现添加 2-氧代-3-甲基丁酸不仅能促进菌体生长,还能产生新的 Brevilaterin 组分。



(a) 添加2-氧代-3-甲基丁酸的影响



(b) 添加2-氨基丁酸的影响

图 3 不同氨基酸衍生物对 Brevilaterin 组分构成的影响

Fig. 3 Effects of different amino acid derivatives on component constitution of Brevilaterin

3 结论

本研究以 BL 分泌的 Brevilaterin 为对象,考察了 18 种 L-氨基酸、9 种 D-氨基酸和 8 种氨基酸衍生物对 BL 发酵液抗菌活性及所产 Brevilaterin 组分的影响。结果表明:添加 L-缬氨酸、L-鸟氨酸盐酸盐、L-甲硫氨酸、D-组氨酸和 2-氧代-3-甲基丁酸均能提

高发酵液抗菌活性,L-缬氨酸效果最明显;而添加 L/D-异亮氨酸、L/D-亮氨酸、D-缬氨酸、D-甲硫氨酸或 2-氨基丁酸则相反。此外,这些氨基酸的添加均能改变 Brevilaterin 的组分构成。添加 L-甲硫氨酸后发酵液中只能检测到 Brevilaterin B 和 C,且二者的相对比例也发生了反转;而添加 L-缬氨酸和 2-氧代-3-甲基丁酸后还能促进 BL 分泌新的 Brevilaterin

组分。可见,外源氨基酸的加入既能提高发酵液的抗菌活性,又能改变 AMPs 的组分构成,研究旨在为未来人工调控微生物合成新型、高效 AMPs 提供理论依据。

参考文献:

- [1] WANG M J, MA Y X, MOU H J, et al. Bacillomycin D lipopeptides from marine *Bacillus megaterium* as antimicrobial and preservative agents for large yellow croaker, *Larimichthys crocea* [J]. *Journal of Food Safety*, 2019, 39(7): e12652.
- [2] BARBOSA A A T, MANTOVANI H C, JAIN S. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their potential in the preservation of fruit products [J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2017, 37(7): 1-12.
- [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 Y M, LIU Y L, CHEN Z. Research status and application prospect in food safety of antimicrobial peptides [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2017, 35(6): 1-9.
- [4] AGEITOS J M, SÁNCHEZ-PÉREZ A, CALO-MATA P, et al. Antimicrobial peptides (AMPs): ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2016, 133: 117-138.
- [5] SÜSSMUTH R D, MAINZ A. Nonribosomal peptide synthesis-principles and prospects [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(14): 3770-3821.
- [6] TAN X F, DAI Y N, ZHOU K, et al. Structure of the adenylation-peptidyl carrier protein didomain of the *Microcystis aeruginosa* microcystin synthetase McyG [J]. *Acta Crystallographica*, 2015, 71(4): 873-881.
- [7] REIMER J M, ALOISE M N, HARRISON P M, et al. Synthetic cycle of the initiation module of a formylating nonribosomal peptide synthetase [J]. *Nature*, 2016, 529(7585): 239-242.
- [8] SCAGLIONE A, FULLONE M R, MONTEMIGLIO L C, et al. Structure of the adenylation domain Thr1 involved in the biosynthesis of 4-chlorothreonine in *Streptomyces* sp. OH-5093: protein flexibility and molecular bases of substrate specificity [J]. *The FEBS Journal*, 2017, 284(18): 2981-2999.
- [9] ISABELLE G, FRANÇOISE P, JEAN W, et al. Lipopeptides with improved properties: structure by NMR, purification by HPLC and structure-activity relationships of new isoleucyl-rich surfactins [J]. *Journal of Peptide Science*, 1997, 3(2): 145-154.
- [10] IWASE N, RAHMAN M, ANO T. Production of iturin A homologues under different culture conditions [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2009, 21: s28-s32.
- [11] 孙力军, 陆兆新, 别小妹, 等. 培养基对解淀粉芽孢杆菌 ES-2 菌株产抗菌脂肽的影响 [J]. *中国农业科学*, 2008, 41(10): 3389-3398.
SUN L J, LU Z X, BIE X M, et al. Influence of medium on antimicrobial lipopeptide production by *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2 [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41(10): 3389-3398.
- [12] 马俊美, 宁亚维, 王志新, 等. 侧孢短芽孢杆菌抗菌肽的结构与性质 [J]. *食品与生物技术学报*, 2016, 35(6): 629-634.
MA J M, NING Y W, WANG Z X, et al. Structure and function characterization of antimicrobial peptide from *Brevibacillus laterosporus* [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2016, 35(6): 629-634.
- [13] LIU Y L, MA A J, HAN P P, et al. Antibacterial mechanism of Brevilaterin B: an amphiphilic lipopeptide targeting the membrane of *Listeria monocytogenes* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104: 10531-10539.
- [14] 王美姿, 刘杨柳, 韩盼盼, 等. 外界因素和食品内部环境变化对 Brevilaterin 抗菌特性的影响 [J]. *食品科学技术学报*, 2021, 39(1): 78-87.
WANG M Z, LIU Y L, HAN P P, et al. Effect of external factors and internal environment changes of food on the antibacterial properties of Brevilaterin [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2021, 39(1): 78-87.
- [15] YANG X, HUANG E, YUAN C H, et al. Isolation and structural elucidation of brevibacillin, an antimicrobial lipopeptide from *Brevibacillus laterosporus* combating drug-resistant gram-positive bacteria [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2016, 82(9): 2763-2772.
- [16] REIMER J M, EIVASKHANI M, HARB I, et al. Structures of a dimodular nonribosomal peptide synthetase reveal conformational flexibility [J]. *Science*, 2019, 366(6466): 1-5.
- [17] SUZUKI S, HARA R, KINO K. Production of aminoacyl prolines using the adenylation domain of nonribosomal peptide synthetase with class III polyphosphate kinase 2-mediated ATP regeneration [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2018, 125(6): 1-5.
- [18] 冯劲松, 李玮, 刘燕, 等. 氨基酸添加对吸水链霉菌 5008 发酵过程中有效霉素 A 合成的影响 [J]. *食品与发酵工业*, 2013, 39(5): 11-16.
FENG J S, LI W, LIU Y, et al. Effects of amino acids on the biosynthesis of validamycin A in the fermentation of *Streptomyces hygroscopicus* 5008 [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2013, 39(5): 11-16.

- [19] 董难, 陈旭升, 任喜东, 等. 发酵过程流加 L-谷氨酸提高 ϵ -聚赖氨酸的产量[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(7): 79–82.
DONG N, CHEN X S, REN X D, et al. Enhancement of ϵ -poly-L-lysine production through L-glutamic acid feeding during fermentation by *Streptomyces* sp. M-Z18 [J]. Food and Fermentation Industries, 2013, 39(7): 79–82.
- [20] WU J Y, LIAO J H, SHIEH C J, et al. Kinetic analysis on precursors for iturin A production from *Bacillus amyloliquefaciens* BPD1 [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2018, 126(5): 630–635.
- [21] YULIA R. Influence of palmitic acid and amino acids addition on iturin A productivity by *Bacillus subtilis* RB14-CS [J]. Journal of Biological Diversity, 2005, 6(3): 172–174.
- [22] 朱玲燕, 刘强, 刘洋, 等. 培养基组分对枯草芽孢杆菌产表面活性素的影响[J]. 生物加工过程, 2015, 13(5): 8–13.
ZHU L Y, LIU Q, LIU Y, et al. Effects of medium components on the production of surfactin in *Bacillus subtilis* [J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2015, 13(5): 8–13.
- [23] 廖福荣. 氨基酸对 *Tolypocladium flatum* 环孢菌素 A 生物合成的影响[J]. 国外医药抗生素分册, 1998, 19(1): 27–28.
LIAO F R. Effects of amino acids on biosynthesis of cyclosporin A in *Tolypocladium flatum* [J]. World Notes on Antibiotics, 1998, 19(1): 27–28.
- [24] WU H, XUE E, ZHI N, et al. D-Methionine and D-phenylalanine improve *Lactococcus lactis* F44 acid resistance and nisin yield by governing cell wall remodeling [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 86(9): 1–7.
- [25] TRABER R, 黄威. 加入前体物定向生物合成新的环孢菌素同系物[J]. 国外医药抗生素分册, 1990, 11(3): 168–170.
TRABER R, HUANG W. New homologues of cyclosporins were synthesized by adding the precursors to the directed biosynthesis [J]. World Notes on Antibiotics, 1990, 11(3): 168–170.
- [26] KOBEL H, TRABER R. Directed biosynthesis of cyclosporins [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1982, 14(4): 237–240.

Effects of Exogenous Amino Acids on Production of Brevilaterin from *Brevibacillus laterosporus* S62-9

WANG Xingxing, CHEN Zhou, HAN Panpan, LIU Yangliu, LI Siting, JIA Yingmin*
(School of Food and Health, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

Abstract: To explore the effect of addition of exogenous amino acids on *Brevibacillus laterosporus* S62-9 (BL) secreted Brevilaterin, the antibacterial activity of BL fermentation broth and the composition change of Brevilaterin were analyzed by agar diffusion method and high performance liquid chromatography, respectively. The results showed that the addition of L-valine, L-methionine and 2-oxo-3-methyl-butyric acid could increase the antibacterial activity of the fermentation broth, and the maximum antibacterial diameter could increase by 18.08%. Furthermore, the addition of exogenous amino acids could also change the components of Brevilaterin. The addition of L-methionine could induce BL only to secrete Brevilaterin B and C, and the relative ratio between the two was reversed. The addition of L-valine or 2-oxygen-3-methyl-butyric acid also promoted BL to secrete a variety of new components. In conclusion, adding exogenous amino acids could effectively improve the antibacterial activity of the fermentation broth and even change the components of antimicrobial peptides, which might provide a theoretical foundation for the artificial regulation of microbial synthesis of novel and efficient antimicrobial peptides.

Keywords: *Brevibacillus laterosporus*; antimicrobial peptide; exogenous amino acid; antibacterial activity; component constitution

(责任编辑:张逸群)