侧孢短芽孢杆菌抗菌肽的结构与性质

马俊美， 宁亚维， 王志新， 孙国杰， 李兴峰， 贾英民*
（河北科技大学 生物科学与工程学院，河北 石家庄 050018）

摘要：为了研究侧孢短芽孢杆菌 S62-9 所产抗菌肽的结构与性质，采用 MALDI-TOF/TOF、FT-IR 对抗菌肽的相对分子质量、氨基酸序列及二级结构进行解析。结果显示，该抗菌肽的相对分子质量为 1 602.004 4 Da，由 11 个氨基酸组成：L-Y-K-L-V-K-V-V-L-N-M，其 N 端有一分子胆碱修饰，C 端有细交链孢菌酮酸衍生物修饰，二级结构主要由 β-转角和无规卷曲构成。抑菌试验结果显示：抗菌肽对所选 4 株革兰氏阳性菌的 MIC 为 7.81 μg/mL，对 4 株革兰氏阴性菌的 MIC 为 7.81~62.5 μg/mL，对青霉、黑曲霉的 MIC 分别为 31.25、62.5 μg/mL。溶血试验结果显示：抗菌肽质量浓度≤62.5 μg/mL 时，其溶血率不超过 10%；但抗菌肽质量浓度≥125 μg/mL 时，其溶血率超过 80%。稳定性实验结果显示：该抗菌肽具有很强的热稳定性和 pH 稳定性，对蛋白酶有很好的耐受性。

关键词：侧孢短芽孢杆菌；抗菌肽；结构；性质
中图分类号：Q 939.9　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2016)06—0629—06

Structure and Function Characterization of Antimicrobial Peptide from *Brevibacillus laterosporus*

MA Junmei, *NING Yawei*, *WANG Zhixin*, *SUN Guojie*, *LI Xingfeng*, *JIA Yingmin*
(School of Biological Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China)

Abstract: In order to study the structure and function of antimicrobial peptide from *Brevibacillus laterosporus* S62-9, the molecular mass, amino acid sequence and secondary structure of antimicrobial peptide were analyzed by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry and FT-IR. The results indicated that the molecular mass of the peptide is 1 602.004 4 Da, and the primary structure of the peptide contains eleven amino acid residues, L-Y-K-L-V-K-V-V-L-N-M with a choline and a tenuazonic acid connected to the N-terminal and the C-terminal, respectively. The secondary structure mainly consists of β -turn and random coil. Antimicrobial assay indicated that the peptide is able to inhibit the growth both Gram-positive and Gram-negative bacteria with the MIC values of 7.81 μg/mL and 7.81~62.5 μg/mL respectively. The peptide also can inhibit the growth of the Penicillium sp and Aspergillus niger with the MIC value of 31.25 μg/mL and 62.5 μg/mL, repectively. The hemolytic results showed that the peptide exhibited hemolytic activity below 10% at

收稿日期：2014-11-27
基金项目：国家“十二五”科技支撑计划项目(2013BAD10B03)；国家农业科技成果转化项目(2013GB2A200032)；河北省拔尖人才计划项目(098293)。
* **通信作者**：贾英民(1961—)，男，河北石家庄人，教授，博士研究生导师，主要从事食品微生物研究。E-mail：ymjia0311@hebust .edu.cn

62.5 μg/mL,and more than 80% at 125 μg/mL. In addition,the peptide showed high thermal and pH stability and a strong resisted proteinases.

Keywords: *Brevibacillus laterosporus*,antimicrobial peptide,structure,characterization

自 20 世纪 70 年代瑞典科学家 Boman[1]研究小组从惜古比天蚕中发现第一种抗菌肽天蚕素以来,截止到目前抗菌肽数据库(APD)收录的抗菌肽已有 2 441 种。其中,74.72%来源于动物,12.74%来源于植物,9.95%来源于细菌,0.9%来源于真菌、原生生物和古生菌。动物抗菌肽数量最多,但成本高。细菌抗菌肽因为具有发酵周期短、生产成本低、可大规模制备等优点,具有良好的工业化生产前景。

目前食品工业研究较为成熟的细菌抗菌肽是乳酸链球菌素 (Nisin),它于 1969 年被 FAO 和 WHO 确定为安全、高效、可靠的食品防腐剂[2]。但是 Nisin 抑菌谱相对较窄,所以开发高效广谱的细菌抗菌肽成为研究热点。芽孢杆菌抗菌肽因为具有抗菌谱广、稳定性高、安全性好、易于进行分子加工等优势[3]而受到人们的关注。现已发现,芽孢杆菌属中的枯草芽孢杆菌[4-5]、地衣芽孢杆菌[6]、苏云金芽孢杆菌[7]、侧孢短芽孢杆菌[8-12]等均能产生抑制食品中致病菌和腐败菌的抗菌肽。其中,侧孢短芽孢杆菌是抗菌肽的一个新来源。2002 年,俄罗斯科学家 Krachkovskii 等[8]报道了第一株产抗菌肽的 *Brevibacillus laterosporus* IGM52,随后国内外科学家们陆续发现多株产抗菌肽的侧孢短芽孢杆菌:*Brevibacillus laterosporus* PNG-276[9],*Brevibacillus laterosporus* BPM3[10],*Brevibacillus laterosporus* LH-1[11],*Brevibacillus laterosporus* A60[12]等。尽管上述同为侧孢短芽孢杆菌,但不同菌株所产抗菌肽的结构、抑菌谱及特性各不相同。

作者所在实验室前期从土壤中成功分离到一株能产抗菌肽的侧孢短芽孢杆菌[13],研究证明其抗菌肽具有广谱抑菌性[14]。然而,该抗菌肽的结构、理化性质等尚未明确。因此,以作者所在实验室制备的抗菌肽纯品为研究对象,对其一级、二级结构及抑菌谱、溶血性、热稳定性等进行研究,以期为其进一步在食品工业的应用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 抗菌肽 试验用抗菌肽,河北科技大学食品生物技术与安全实验室制备,纯度大于 98%。

1.1.2 菌株 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 14458,蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)ATCC 63302,枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),单核增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)10403s,鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella*)CMCC50115,肠炎沙门氏菌(*Salmonella*)ATCC 50041,肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*),大肠杆菌(*Escherichia coli*)ATCC 44752,青霉(*Penicillium sp*),黑曲霉(*Aspergillus niger*),均为河北科技大学食品生物技术与安全实验室保藏菌株。

1.1.3 培养基 营养琼脂培养基(NA),查氏培养基,TSB-YE 培养基,PDA 培养基。

1.1.4 主要试剂和仪器 胃蛋白酶,Sigma 公司产品;胰蛋白酶,Amresco 公司产品;蛋白酶 K,Merck 公司产品;Triton X-100 非离子型表面活性剂,北京博奥拓科技有限公司产品。MALDI-TOF/TOF 5800 型质谱仪,美国 AB SCIEX 公司制造;Nicolet 6700 型傅里叶变换红外光谱仪,美国 Thermo 公司制造;Evolution 220 型分光光度计,美国 Thermo 公司制造;96 型微孔板,美国 Costar 公司制造。

1.2 抗菌肽的相对分子质量与氨基酸序列分析

将 0.5 μL 抗菌肽样品点样于 MALDI 靶板,自然干燥后再点 0.5 μL 质量浓度 0.5 g/L 的 CHCA 溶液(体积分数 50%乙腈水溶液含有质量分数 0.1% TFA),在室温下自然干燥。样品用 5800 型 MALDI-TOF/TOF 质谱仪进行分析,激光源为 355 nm 的 Nd:YAG 激光器,加速电压 20 kV,采用正离子和自动获取数据的模式采集数据。仪器先用Myoglobin 酶解肽段进行外标校正。样品的一级质谱扫描范围为 700~3 600 Da。一级质谱采用 Reflector Positive 模式,参数:CID OFF,mass rang 700~3 600 Da,Focus Mass 1 600 Da,Fixed laser intensity 4 500,Digitizer Bin Size 0.5 ns。

一级质谱进行完后,选择目标肽段离子进行串联质谱分析。串联质谱采用 2 kV Positive 模式,参数:CID ON,Precursor Mass Windows Relative 100

resolution (FWHM),Fixed laser intensity 5 000, Digitizer Bin Size 1 ns。

1.3 序列比对与理化参数分析

将获得的氨基酸序列输入 NCBI 蛋白质库(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)和抗菌肽数据库 APD(http://aps.unmc.edu/AP/main.php)进行氨基酸序列同源性比较;再利用生物信息学网站 ExPASy(http://www.expasy.org/tools/) 上的蛋白质结构预测软件 ProtParam 来分析抗菌肽的物理化学参数。

1.4 抗菌肽的 FT-IR 光谱测定

1.4.1 样品测定 取纯化后冷冻干燥的样品约 1 mg,加入经恒温干燥的 KBr 约 100 mg,置于研钵中研磨至混合均匀,然后用压片器压片,可得含有分散样品的透明卤化盐薄片。用傅里叶变换红外光谱仪对压片进行红外光谱扫描, 波数扫描范围:400~4 000 cm^{-1},分辨率 4 cm^{-1},扫描 32 次,记录图谱。

1.4.2 FT-IR 光谱分析抗菌肽的二级结构 利用 Omnic 软件取 1 700~1 600 cm^{-1} 波段图谱,用 PeakFit v4.12 软件分析:先基线校正, 然后用 Deconvolve Gaussian IRF 去卷积, 再由二阶导数多次拟合至拟合图谱与原图谱残差 $R^2 \geqslant 0.999$,确定各子峰与各二级结构对应关系,然后根据各子峰面积分数计算出各部分二级结构所占比率。

1.5 最小抑菌浓度的测定

培养好的细菌用灭过菌的液体培养基稀释为 10^6 cfu/mL 作为测试菌液 (*Listeria monocytogenes* 10403s 用 TSB-YE 培养基, 其余细菌用 NB 培养基);培养好的真菌孢子用查氏培养基稀释至 2×10^4 cfu/mL 作为测试孢子悬液。

参照并适当修改 Wiegand 等 [15] 人介绍的 MIC 测定方法:在 96 孔板上标记相应的抗菌肽浓度,做 3 组平行。1—10 列为实验组,11 列作为阳性生长对照组,12 列作为阴性空白对照组。在第一列中加入 200 μL 质量浓度为 500 μg/mL 的抗菌肽溶液,将抗菌肽质量浓度依次进行二倍梯度稀释,从第一列的孔中吸取 100 μL 抗菌肽溶液至对应的第 2 列的板孔中,并用移液器小心吸打 6~8 次混匀。重复上一步的操作,直至稀释到第 10 列。将从第 10 列板孔中吸取的 100 μL 溶液废弃。在 1—11 列接入 100 μL 以上制备好的菌悬液和孢子悬液, 第 12 列加入相应的无菌培养基。培养 16~20 h(细菌 37 ℃培养,真菌 30 ℃培养)。以无可见菌生长的最低样品浓度作为该样品最小抑菌浓度。

1.6 溶血活性的测定

采集健康小鼠新鲜血液置于抗凝管,1 500 r/min 离心 5 min,去除上清液、血小板及白细胞层,利用 pH 7.4 的 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 制成体积分数 8% 的血红细胞悬浮液。利用 PBS 对抗菌肽样品稀释,首先制得质量浓度 500 μg/mL 的样品,再进行二倍稀释,得到一系列质量浓度为 500~0.98 μg/mL 的样品。取稀释后的 100 μL 红细胞悬液(体积分数 8%)与不同浓度的抗菌肽样品等体积混合,37 ℃培养 1 h。保温 1 h 后,1 500 r/min 离心 5 min,吸取上清液 100 μL,在 540 nm 下检测上清液吸光值,得到抗菌肽浓度与溶血率之间的关系。每个样品测试设定 3 个平行, 终体积分数 0.1%的 Triton X-100 为阳性对照,PBS 缓冲液为阴性对照。溶血率:

$$r=(OD_{540YP}-OD_{540PBS})/(OD_{540\ Triton\ X-100}-OD_{540PBS})$$

1.7 抗菌肽的稳定性

1.7.1 抗菌肽的温度稳定性 将抗菌肽分别在 40、60、80、100 ℃水浴热处理 30 min 和 2 h,同时 121 ℃高压蒸汽处理 20 min,处理完毕样品取出用冰块迅速冷却至室温,然后测定其抑菌圈直径,以室温下未作加热处理的样品作为对照,计算抗菌肽活性回收率。

1.7.2 抗菌肽的 pH 稳定性 取抗菌肽溶液,用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 调节 pH 为 2~12,30 ℃恒温水浴锅中温育 2 h, 样品取出后全部调节至初始 pH,以未调节 pH 的样品作为对照,测定其抑菌圈直径,计算抗菌肽活性回收率。

1.7.3 抗菌肽的蛋白酶敏感性 将抗菌肽与质量浓度 1 mg/mL 的胃蛋白酶、胰蛋白酶、蛋白酶 K 在各自适宜的 pH 下 37 ℃恒温水浴反应 2 h,每 30 min 震荡 1 次。反应结束后 100 ℃沸水浴 200 s 灭酶,调 pH 至初始值,以未经处理的样品作为对照。计算抗菌肽活性回收率。

2 结果与讨论

2.1 抗菌肽的相对分子质量与氨基酸序列分析

由 TOF-MS 分析得到的一级质谱图可知, 抗菌肽的相对分子质量为 1 602.004 4 Da; 得到的串联谱图采用仪器自带的软件 4000 Explorer 并结合文献进行序列分析。

如图 1 所示。

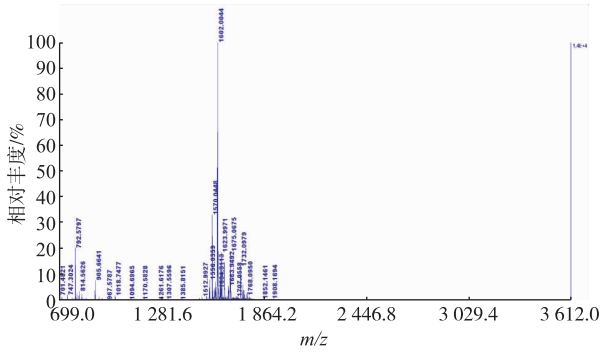


图 1 抗菌肽的一级质谱图

Fig. 1 MALID-TOF-MS spectrum of antimicrobial peptide

得到序列后，再采用软件Data Explorer将串联质谱图上由母离子碎裂后得到的子离子与序列进行匹配。结果表明：该肽段由11个氨基酸组成，N端有一分子胆碱修饰，C端有细交链孢菌酮酸衍生物修饰，属于伪肽，其一级结构信息：CH-L-Y-K-L-V-K-V-V-L-N-M-TA，见图2。

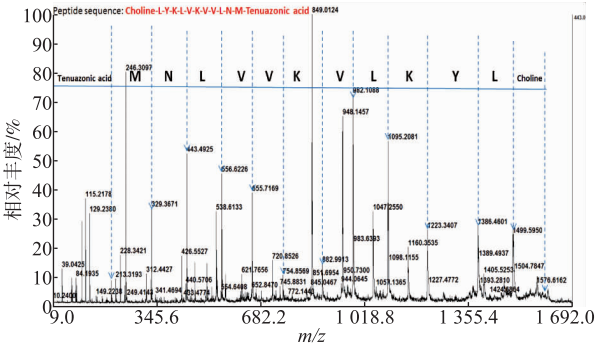


图 2 抗菌肽的二级质谱图

Fig. 2 MS/MS spectrum of antimicrobial peptide

2.2 序列比对与理化参数分析

将抗菌肽氨基酸序列输入抗菌肽数据库APD与NCBI数据库中进行BLAST序列比对，发现此抗菌肽与赵璟[12]等从*Brevibacillus laterosporus* A60中发现的抗菌肽BL-A60一级结构相同，与数据库其它已知抗菌肽同源性较低，最高只达到46.15%。利用ProtParam软件对抗菌肽理化参数分析的结果如下：理论等电点9.70，GRAVY为1.209，疏水性比率63%，带电荷数+2，脂溶性指数185.45。研究表明，抗菌肽带电荷数与疏水性比率会影响其与细胞膜的作用方式，进而影响其抑菌效果。生物信息学分析表明，抗菌肽带正电荷，推测其可能会与菌体膜表面带负电的磷脂接触吸引，引起裂解，同时所含疏水氨基酸可能会引起膜的裂解。抗菌肽具体抑菌作用方式，作者所在课题组目前正在研究中。

2.3 抗菌肽的FT-IR光谱测定

2.3.1 FT-IR光谱分析抗菌肽的官能团 通过红外光谱可对抗菌肽所含官能团作初步了解。见图3，抗菌肽主要含有—CH_2—、—CH_3、—OH、—NH_2、C—OH等官能团。另外，约在837 cm^{-1}处的吸收证明，苯环上有对位二取代，与测序结果含有酪氨酸相吻合；2 500~1 700 cm^{-1}区无吸收峰，说明抗菌肽结构中无三键和累积双键。

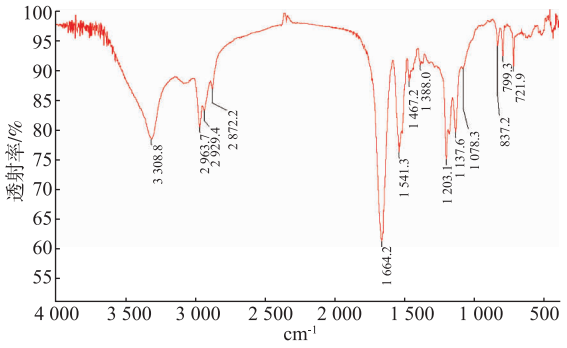


图 3 抗菌肽的红外光谱图

Fig. 3 FT-IR spectra of antimicrobial peptide

2.3.2 FT-IR光谱分析抗菌肽的二级结构 FT-IR技术已被广泛应用于获得蛋白质和多肽类物质的二级结构信息[16]。抗菌肽二级结构的相对含量决定了其酰胺Ⅰ带(1 700~1 600 cm^{-1})的吸收峰形状，结合二阶导数、去卷积技术，可以把原来未能分辨的峰进一步分解为各个子峰，并指出各个子峰的峰位值，通过曲线拟合的方法，定量分析抗菌肽分子中二级结构的各个组分。参照文献[17-18]报道可知：图4中1 626.6 cm^{-1}处的子峰表明有β-折叠存在，1 644.4 cm^{-1}处的子峰属于无规卷曲，1 662.2 cm^{-1}、1 680.3 cm^{-1}处的子峰属于β-转角。

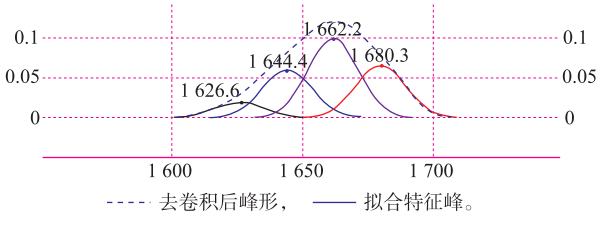


图 4 红外光谱图酰胺Ⅰ带拟合完成示意图

Fig. 4 Curve-fitting of amide I band of antimicrobial peptide

面积归一化计算得抗菌肽二级结构中 α-螺旋、β-折叠、β-转角和无规卷曲的面积分数为 0、8.08%、67.31%和 24.60%。不同极性溶剂体系和模拟态环境对抗菌肽二级结构的影响还需进一步研究。

2.4 最小抑菌浓度的测定

最小抑菌浓度(MIC)反映了抑菌类物质对病原微生物的抑杀效果,是衡量抑菌物质潜力的首要指标。实验中采用 96 孔板法进行最小抑菌浓度的测定,表 1 显示,抗菌肽具有广谱抑菌性,不仅对革兰氏阳性细菌具有明显的抑菌作用,而且对革兰氏阴性细菌、霉菌也表现出不同程度的抑制作用。

表 1 抗菌肽的最小抑菌浓度

Table 1 MIC values of antimicrobial peptide

微生物	MIC/(μg/mL)
革兰氏阳性细菌	
Staphylococcus aureus ATCC 14458	7.81
Bacillus cereus ATCC 63302	7.81
Bacillus subtilis	7.81
Listeria monocytogenes 10403s	7.81
革兰氏阴性细菌	
Salmonella CMCC 50115	7.81
Salmonella ATCC 50041	62.5
Klebsiella pneumoniae	31.25
Escherichia coli ATCC 44752	31.25
真菌	
Penicillium sp.	31.25
Aspergillus niger	62.5

国内外关于侧孢短芽孢杆菌抑菌作用的研究普遍集中在植物病害防治,如赵璟等[12]研究了 *Brevibacillus laterosporus* A60 所产抗菌肽对辣椒疫霉的抑制情况;赵秀香等[19]研究了 *Brevibacillus laterosporus* B8 分泌的抑菌物质对烟草黑胫病菌及其它植物病原菌的抑制情况;Saikia 等[10]研究了 *Brevibacillus laterosporus* BPM3 所产抗菌肽对植物病原真菌和革兰氏阳性菌的抑制情况。本课题重点研讨侧孢短芽孢杆菌抗菌肽在食品中的应用和发展潜力,因此选用食品中常见的致病菌和腐败菌做指示菌,结果表明 *Brevibacillus laterosporus* S62-9 所产抗菌肽抑菌谱较广,具有良好发展潜力。

2.5 溶血活性的测定

通过分析抗菌肽对红细胞的溶血活性来判定其对正常哺乳动物细胞的细胞毒性,结果(图 5)表明:抗菌肽质量浓度≤62.5 μg/mL 时,其溶血率不超过 10%;但质量浓度>62.5 μg/mL 时,溶血性急剧增大;抗菌肽质量浓度≥125 μg/mL 时,其溶血率超过 80%。由于抗菌肽在最小抑菌浓度范围内溶血性较低,因此具有深入研究价值和潜在应用价值。

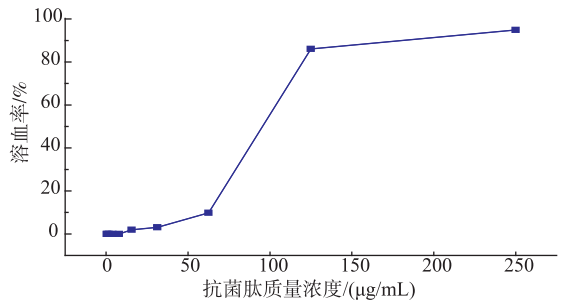


图 5 抗菌肽的溶血活性

Fig. 5 Hemolytic activities of Antimicrobial Peptide

2.6 抗菌肽的稳定性

抗菌肽的稳定性是其能否大规模生产和应用的重要因素。目前国内唯一获批用于食品加工的抗菌肽类防腐剂 Nisin,因为只在酸性条件 pH 2.0 时抑菌活性最强,pH 8.0 时几乎不溶[20],稳定性也较差,导致在生产应用中存在局限性。本实验所产抗菌肽具有强耐酸碱和耐热稳定性:抗菌肽经 100 ℃处理 2 h 后,活性回收率 92.40%,121 ℃(高压灭菌)处理 20 min 回收率为 97.00%;在 pH 2~12 下作用 2 h,抗菌肽的抑菌活性无变化。除此之外,抗菌肽对胃蛋白酶、胰蛋白酶、蛋白酶 K 均有很好的耐受性:抗菌肽与胃蛋白酶在 37 ℃恒温水浴反应 2 h 后,活性回收率为 93.27%;与胰蛋白酶、蛋白酶 K 反应 2 h 后,抑菌活性无变化。

3 结 语

侧孢短芽孢杆菌 S62-9 所产抗菌肽结构与性质研究结果表明,该抗菌肽为 11 个氨基酸组成的小分子多肽,N 端有一分子胆碱修饰,C 端有细交链孢菌酮酸衍生物修饰;二级结构主要由 β-转角和无规则卷曲组成;具有很好的热稳定性和 pH 稳定性,对蛋白酶有很好的耐受性,且该抗菌肽的抑菌谱较广,在最小抑菌浓度范围内溶血性较低。上述结果表明,该抗菌肽在食品防腐领域具有一定的开发前景,有望成为新一代的天然防腐剂。

参考文献:

[1] Boman H G,Nilsson I,Rasmuson B. Inducible antibacterial defense system in Drosophial[J]. **Nature**,1972,237:232-235.

[2] 何唯平,刘梅森. 食品防腐剂概念[J]. 中国食品添加剂,2004(5):37-40.
HE Weiping,LIU Meisen. Survey about food preservatives[J]. **China Food Additives**,2004(5):37-40. (in Chinese)

[3] 陈雪,侯红漫,陈莉,等. 产细菌素芽孢杆菌的筛选及发酵条件的研究[J]. 中国酿造,2008(9):26-30.
CHEN Xue,HOU Hongman,CHEN Li,et al. Screening of bacteriocin producing *Bacillus* and study on fermentation conditions [J]. **China Brewing**,2008(9):26-30. (in Chinese)

[4] 胡瑞萍,张铎,张丽萍,等. 枯草芽孢杆菌 BSD-2 一种抗菌肽的分离纯化与鉴定[J]. 华北农学报,2011,26(6):201-206.
HU Ruiping,ZHANG Yi,ZHANG Liping,et al. Purification and identification of an antimicrobial peptides from *Bacillus subtilis* BSD-2[J]. **Acta Agriculturae Boreali–Sinica**,2011,26(6):201-206. (in Chinese)

[5] 刘静,王军,姚建铭,等. 枯草芽孢杆菌 JA 抗菌物特性的研究及抗菌肽的分离纯化[J]. 微生物学报,2004,44(4):511-514.
LIU Jing,WANG Jun,YAO Jianming,et al. Properties of the crude extract of *Bacillus subtilis* and purification of antimicrobial peptides[J]. **Acta Microbiologica Sinica**,2004,44(4):511-514. (in Chinese)

[6] Teixeira M L,Cladera-Olivera F,Santos D J,et al. Purification and characterization of a peptide from *Bacillus licheniformis* showing dual antimicrobial and emulsifying activities[J]. **Food Research International**,2009,42:63-68.

[7] KIM P I,BAI H,BAI D,et al. Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26[J]. **Journal of Applied Microbiology**,2004,97:942-949.

[8] Krachkovskii S A,Sobol A G,Ovchinnikova T V,et al. Isolation,biological properties,and spatial structure of antibiotic loloatin A[J]. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**,2002,28(4):269-273.

[9] Desjardine K,Pereira A,Wright H,et al. Tauramamide,a lipopeptide antibiotic produced in culture by *Brevibacillus laterosporus* isolated from a marine habitat:structure elucidation and synthesis[J]. **Journal of Natu-Ral Products**,2007,70(12):1850-1853.

[10] Saikia R,Gogoi D K,Mazumder S,et al. *Brevibacillus laterosporus* strain BPM3,a potential biocontrol agent isolated from a natural hot water spring of Assam,India[J]. **Microbiological Research**,2011,166:216-225.

[11] 任召珍,郑媛,孙谧,等. 海洋侧孢短芽孢杆菌 Lh-1 抗菌活性物质的分离及特性研究[J]. 微生物学报,2007,47(6):997.
REN Zhaozhen,ZHENG Yuan,SUN Mi,et al. Purification and properties of an antimicrobial substancefrom marine *Brevibacillus laterosporus* Lh-1[J]. **Acta Microbiologica Sinica**,2007,47(6):997. (in Chinese)

[12] ZHAO J,GUO L,ZENG H,et al. Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from *Brevibacillus laterosporus* strain A60[J]. **Peptides**,2012,33:206-211.

[13] 剧建格,于宏伟,韩军,等. 广谱高效抑菌物质产生菌的筛选及鉴定[J]. 微生物学通报,2009,36(5):689-693.
JU Jiange,YU Hongwei,HAN Jun,et al. Identification and screening of broad-spectrum antibiotics-producing strains [J]. **Institute of Microbiology**,2009,36(5):689-693. (in Chinese)

[14] 杨倩, 于宏伟, 郭润芳, 等. 侧孢短芽孢杆菌 S62-9 产抗菌物质的分离纯化及部分特性的研究 [J]. 河北农业大学学报,2010,33(2):74-78.
YANG Qian,YU Hongwei,GUO Runfang,et al. Study on purification and partial properties of antimicrobial substance from *Brevibacillus laterosporus* S62-9[J]. **Journal of Agricultural University of Hebei**,2010,33(2):74-78. (in Chinese)

[15] Wiegand I,Hilpert K,Hancock R E. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances[J]. **Nature Protocols**,2008,3(2):163-175.

[16] Andrushchenko V V,Vogel H J,Prenner E J. Solvent-dependent structure of two tryptophan-rich antimicrobial peptides and their analogs studied by FTIR and CD spectroscopy[J]. **Biochimica et Biophysica Acta**,2006,1758:1596-1608.

[17] Miller L M,Bourassa M W,Smith R J. FTIR spectroscopic imaging of protein aggregation in living cells [J]. **Biochimica et Biophysica Acta**,2013,1828:2339-2346.

[18] Ulrichs T,Drotleff A M,Ternes W. Determination of heat-induced changes in the protein secondary structure of reconstituted livetins (water-soluble proteins from hen's egg yolk) by FTIR[J]. **Food Chemistry**,2015,172:909-920.

[19] 赵秀香,吴元华,李晔. 拮抗细菌 B8 对烟草黑胫病菌的抑制作用及其菌株鉴定[J]. 中国生物防治,2007,23(1):54-59.
ZHAO Xiuxiang,WU Yuanhua,LI Ye. Inhibition of an antagonistic Rhizobacteria B8 to *Phytophthora parasiticavar.* nicotianae and its identification[J]. **Chinese Journal of Biological Control**,2007,23(1):54-59.(in Chinese)

[20] Kayalvizhi N,Gunasekaran P. Purification and characterization of a novel broad-spectrum bacteriocin from *Bacillus licheniformis* MKU3[J]. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**,2010,15:365-370.