金属抗菌肽 SIF_4 对金黄色葡萄球菌细胞通透性的影响机制

肖怀秋[1,3]，李玉珍[*1]，林亲录[2]，赵谋明[3]，刘 军[1]，周 全[1]

（1. 湖南化工职业技术学院 制药与生物工程学院，湖南 株洲 412000；2. 中南林业科技大学 食品科学与工程学院，湖南 长沙 410004；3. 华南理工大学 食品科学与工程学院，广东 广州 510000）

摘要：为探明金属抗菌肽 SIF_4 对金黄色葡萄球菌细胞通透性的影响机制，从胞外碱性磷酸酶活性、细胞表面电位、细胞表面疏水性、细胞内膜通透性和胞内生物大分子泄漏等角度考察了 SIF_4 对细胞通透性的影响。研究发现，SIF_4 可破坏细胞壁结构完整性，随着抗菌肽质量浓度和温育时间的延长，胞外碱性磷酸酶活性也同步增长，2MIC 组与 TritonX-100 组无显著差异（$P>0.05$）；细胞表面电位与 SIF_4 质量浓度呈负相关关系；细胞表面疏水性与 SIF_4 质量浓度呈良好的量-效正相关关系；细胞内膜通透性与抗菌肽质量浓度和温育时间呈正相关；胞内生物大分子泄漏与抗菌肽质量浓度和温育时间呈正相关，温育 1 h 时，胞内蛋白质泄漏呈差异性显著（$P<0.05$），温育 3 h 后，2MIC 与 TritonX-100 细胞内生物大分子泄漏差异基本不显著（$P>0.05$）。结果表明，SIF_4 可增强细胞通透性并使胞内物质泄漏，还能增强细胞表面疏水性和降低细胞表面电位，使细胞聚沉并诱导细胞坏死。

关键词：金属抗菌肽；食源性致病菌；细胞通透性；抑菌机理；金黄色葡萄球菌

中图分类号：TS 201.6　**文章编号：**1673-1689(2023)02-0097-07　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2023.02.014

Mechanism of Metal Antimicrobial Peptide SIF_4 against *Staphylococcus aureus* Cell Permeability

XIAO Huaiqiu[1,3]，*LI Yuzhen*[*1]，*LIN Qinlu*[2]，*ZHAO Mouming*[3]，*LIU Jun*[1]，*ZHOU Quan*[1]

（1. School of Pharmaceutical and Bioengineering, Hunan Chemical Vocational Technology College, Zhuzhou, 412000 China; 2. College of Food Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004 China; 3. College of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510000 China）

Abstract: The mechanism of metal antimicrobial peptide SIF_4 against cell permeability of *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) was explored based on extracellular alkaline phosphatase activity (AKP), cell surface potential (CSP), cell surface hydrophobicity (CSH), cell inner membrane permeability (CIMP) and intracellular macromolecular leakage (IML). The results showed that SIF_4 could destroy cell wall structural integrity. With the increasing of antibacterial peptide concentration and incubation time, the activity of extracellular AKP also increased simultaneously, and there was

收稿日期：2021-03-29

基金项目：湖南省自然科学基金科教联合基金项目(2021JJ60040)。

作者简介：肖怀秋(1981—)，男，硕士，教授，主要从事食品抗菌与保鲜方面的研究。E-mail: xiaohuaiqiu@163.com

*** 通信作者：**李玉珍(1981—)，女，硕士，副教授，主要从事植物蛋白酶法改性及产物功能方面的研究。E-mail：yuzhenli@163.com

insignificant difference between 2MIC group and TritonX-100 group (P>0.05). The SIF_4 concentration had a negative correlation with CSP, and a good dose-effect positive correlation with CSH. Moreover, CIMP and IML had a positive correlation with the antibacterial peptide concentration and incubation time. There was a significant difference in IML (P<0.05) after incubation for 1 h, while there was insignificant difference between the 2MIC and TritonX-100 groups (P>0.05) after 3 h incubation. The findings suggested that SIF_4 could enhance cell permeability, cause IML leakage, enhance CSH and reduce CSP, inducing cell aggregation and apoptosis.

Keywords: metal antimicrobial peptide, foodborne pathogens, cell permeability, antimicrobial mechanism, *Staphylococcus aureus*

食源性致病菌是指在食品加工和流通过程中引入的病原菌,其中金黄色葡萄球菌(*S.aureus*)引起的食物中毒占细菌性食物中毒事件约 6.93%, 是重要的食源性致病菌[1]。曹啸监测葫芦岛市市售食品中微生物污染发现,*S.aureus* 检出率为 7.66%[2];潘少兵对安庆市 7 个超市冷冻食品微生物污染抽样发现,金黄色葡萄球菌占 42.86%[3];国译丹监测云南省外卖餐饮微生物污染状况发现,*S.aureus* 检出率为 1.14%[4];曹铁红监测通化区农贸市场销售肉与肉制品食源性致病菌污染状况发现,*S.aureus* 检出率为 36.25%[5]。传统热处理杀菌方式对食品热敏性营养成分和生物活性成分以及食品色香味等可产生潜在影响,而人工合成防腐剂常存在潜在“三致”危害,在保证食品安全的前提下,使用安全有效的抑菌技术来尽可能保留食品原有风味和新鲜度是食品防腐保鲜领域的重点。抗菌肽(Antimicrobial peptide,AMP)具有热稳定性好、抗菌活性高、特异性强、生物毒性低、副作用较少且不易产生耐药性等优势,可作为食品防腐保鲜剂[6]。初步研究表明,金属抗菌肽 SIF_4 对金黄色葡萄球菌有抑菌活性,最小抑菌质量浓度(MIC)为 0.2×10^{-3} g/L[7],且具有亚油酸氧化抑制和脂质过氧化保护活性[8],在模拟食品体系中有较好抑菌稳定性[9]。近年来,新型抗菌肽研究以细胞膜作为效应靶点居多,主要是因为以细菌细胞膜作为抗菌效应靶点可解决现有抗生素难以彻底杀灭处于减速生长期与休眠期的致病病原体的不足[10],细胞膜结构相对保守和作用于细胞膜的快速杀菌效应也使以细菌膜作为效应靶点具有天然优势[11]。阐明金属抗菌肽 SIF_4 对金黄色葡萄球菌基于细胞通透性的损伤机理可为其在食源性致病菌抑制的理论与应用研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

金属抗菌肽 SIF_4:作者所在课题组制备[7];金黄色葡萄球菌 ATCC25923: 从菌种保藏中心获得;胃蛋白酶和胰蛋白酶:诺维信(中国)生物技术有限公司;牛肉膏、胰蛋白胨:北京博星生物技术有限公司;TritonX-100:武汉卡诺斯科技有限公司;对硝基苯磷酸二钠 (PNPP)、邻硝基苯-β-D-半乳糖苷(ONPG):北京百奥莱博科技有限公司。

1.2 仪器与设备

冷冻离心机(HERMLEZ323K):德国 Hermle 公司;立式蒸汽灭菌锅(LDZX-40SAI):上海博迅公司;电位测定仪(Sizer 2000 Zeta):英国 Malvern 公司;超净工作台(BBS-SSC):济南腾览公司;电热恒温培养箱(DH-360):北京科伟公司;紫外可见分光光度计(UV-2500):日本岛津公司。

1.3 试验方法

1.3.1 金属抗菌肽 SIF_4 的制备工艺 称取 10.0 mg 花生肽亚铁加到 1 000 mL 胃仿生消化液中,于(37±0.5) ℃、100 r/min 仿生消化 2 h,0.5 mol/L NaOH 调 pH 至 7.6,终止胃仿生消化,用肠仿生消化液 (37±0.5) ℃、50 r/min 仿生十二指肠消化 1 h,调 pH 至 6.8,并于(37±0.5) ℃、50 r/min 继续仿生小肠消化 2 h,收集仿生消化液冷冻干燥[7]。

1.3.2 碱性磷酸酶活性的测定 参照 Marri 等的方法[12],将活化的金黄色葡萄球菌在 LB 液体培养基中培养至对数生长期,收集培养液于 6 500 r/min 离心 10 min,菌体用 0.02 mol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 次,重新悬浮菌体使菌悬液 OD_{600}=0.2~0.3。分别取菌悬液 50 mL 加入 SIF_4 使抗菌肽终质

量浓度分别为0.1 mg/L(1/2MIC)、0.2 mg/L(1MIC)和0.4 mg/L(2MIC)。取 50 mL 菌悬液加入 TritonX-100(终质量浓度为 100 μg/mL)作为阳性对照(下同),以 PBS 组作为阴性对照。所有试验组混匀后于37 ℃、130 r/min 振荡培养 3 h,每间隔 0.5 h 吸取5 mL 菌悬液于 6 500 r/min 离心 15 min,取上清液与 0.5 mL、0.1 g/dL 对硝基苯磷酸二钠(PNPP)混匀,37 ℃黑暗处理 30 min 至黄色产物生成,加入 0.2 mL 1mol/L NaOH 终止反应,紫外分光光度计测定 OD_{405}。

1.3.3 细胞表面电位的测定 参考陈飞龙等方法[13],取培养至对数生长期的培养液于 6 500 r/min 离心 10 min,菌体用无菌超纯水洗涤 2 次并重悬(OD_{600}=0.2~0.3),取 50 mL 菌悬液加入抗菌肽使终质量浓度分别为 1/2MIC、1MIC 和 2MIC,混匀后于 37 ℃温育 30 min,6 500 r/min 离心 10 min 并收集菌体,用无菌超纯水重悬并稀释至 OD_{600}=0.05,室温下测定细胞表面电位,以无菌超纯水组和 Triton X-100 组为阴性和阳性对照。

1.3.4 细胞表面疏水性的测定 参考 Hou 等方法[14],取培养至对数生长期培养液于 6 500 r/min 离心 10 min,收集菌体并用 PBS 洗涤 3 次,用 KNO_3 溶液(0.1 mol/L、pH 6.2)重悬使菌液 OD_{600}=0.5。取 4 mL 菌液加入 1 mL SIF_4 使其终质量浓度分别为 1/2MIC、1MIC 和 2MIC,测定 $OD_{600}(A_0)$;取抗菌肽与菌体混悬液 4.8 mL 加入 0.2 mL 十六烷并充分混合,室温静置 30 min 使两相完全分离,用无菌注射头吸取水相并测定 $OD_{600}(A_1)$。细胞表面疏水性用细菌吸附率表示,$A_{吸附率}/\%=(A_0-A_1)/A_0\times100\%$

1.3.5 细胞内膜通透性的测定 参考 Ibrahim 等的方法[15],取对数生长期的培养液于 6 500 r/min 离心 10 min,收集菌体并用 PBS 洗涤 3 次,用无菌的 M9 乳糖诱导培养基重悬,37 ℃、130 r/min 振荡培养 8 h,6 500 r/min 离心 10 min 并收集菌体,菌体沉淀用 β-半乳糖苷酶反应缓冲液重悬(OD_{600}=0.2)。分别吸取重悬液 50 mL,加入抗菌肽使终质量浓度分别为 1/2MIC、1MIC 和 2MIC,再加入 200 μL、1 mg/mL 邻硝基苯-β-D-半乳糖苷(ONPG)混匀,37 ℃温育 5 h,每隔 1 h 取出样品加入 50 μL、1 mol/L Na_2CO_3 终止反应,6 500 r/min 离心 5 min,测上清液 OD_{415},以 PBS 组和 Triton X-100 为阴性和阳性对照。

1.3.6 胞内生物大分子泄漏的测定 参照 Paul 等方法[16],取对数生长期的培养液于 6 500 r/min 离心 10 min,收集菌体用 PBS 洗涤 3 次并重悬(OD_{600}=0.2),将抗菌肽加入重悬液中使终质量浓度为 1/2MIC、1MIC 和 2MIC,37 ℃温育 5 h,每隔 1 h 离心取上清液 5 mL,6 500 r/min 离心 10 min,上清液用 0.22 μm 滤膜过滤并测定 OD_{280} 和 OD_{260},以 PBS 组和 Triton X-100 组为阴性和阳性对照。

1.3.7 试验数据处理 结果以平均值±标准偏差($\bar{x}\pm sd$,n=3)表示,仅进行组间均数差异多重比较,采用 SPSS25.0 进行单因素方差检验,方差齐性时采用最小显著性差异法,非齐性时使用塔姆黑尼 T_2 方法。

2 结果与分析

2.1 对细胞壁通透性的影响

碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,AKP)参与磷酸基团转移和代谢、胞内 Ca^{2+}调控、蛋白质分泌、核酸与脂质代谢及细胞分化调控等过程,位于细胞周质间隙,不能透过细胞壁,只有细胞壁受损并导致通透性增大时才能在胞外检测到,可作为细胞壁通透性及受损程度的重要表征指标[17]。SIF_4 对细胞壁通透性影响见图 1。

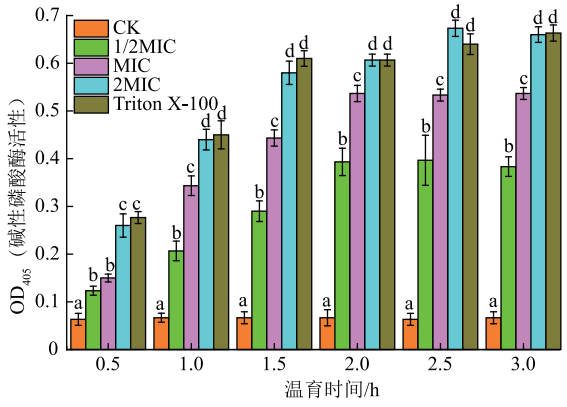


图 1 SIF_4 对碱性磷酸酶活性的影响

Fig. 1 Effect of SIF_4 on alkaline phosphatase activity

由图 1 可看出,随着抗菌肽质量浓度的增加与温育时间的延长,细胞壁通透性也随之增大,2.5 h 后基本达到稳定,随后细胞壁通透性增幅不明显。所有试验组与 PBS 组均存在显著差异(P<0.05)。温育 0.5 h,1/2MIC 组和 MIC 组以及 2MIC 和 TritonX-100 组的组间差异均不显著(P>0.05),温育 1.0 h,1/2MIC 组与 MIC 组和 TritonX-100 组差异均显著(P<0.05),可能是由于在抗菌肽与菌体接触前 30 min

主要为静电吸附,对细胞壁并未造成损伤[18]。研究发现，在所有组别中,2MIC 和 TritonX-100 组间差异均不显著(P>0.05)。TritonX-100 为双亲结构,可将膜蛋白解离并破坏细胞壁[19],2MIC 抗菌肽对细胞壁通透性影响与 TritonX-100 基本一致。SIF_4 对细胞壁通透性影响可能是由于其可取代菌体细胞壁表面 Mg^{2+},或与细胞壁负电性脂多糖(LPS)结合,或中和细胞壁结构上某一特定区域电荷诱导细胞壁结构变形,或结合细胞壁磷壁酸激活细菌自溶[11],研究结果与 Chung[20]等报道一致。

2.2 对细胞表面电位的影响

细胞表面电荷来源于菌体表面的—COOH、HPO_4^-和 NH_2^+等基团解离、从环境中吸附离子以及胞内离子与生物大分子泄漏,对菌体细胞聚沉与黏附有重要影响[21],常用 Zeta 电位表征[22]。细胞表面所带电荷是影响细胞与环境互作效应的重要因素,表面电荷绝对值越小,菌体越容易发生聚沉和黏附[21]。SIF_4 对菌体表面电位影响见图 2。

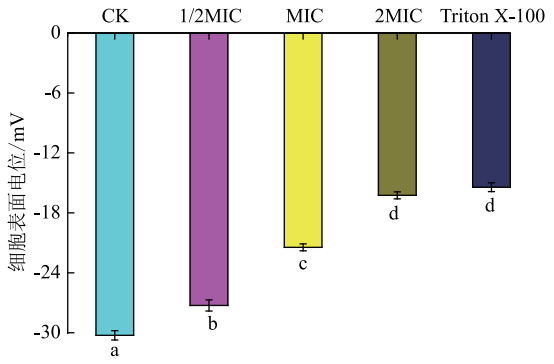


图 2 SIF_4 对细胞表面电位的影响

Fig. 2 Effect of SIF_4 on cell surface potential

从图 2 可看出，随着抗菌肽质量浓度的增加,Zeta 电位绝对值降低,对照组与试验组均存在显著差异 (P <0.05)。抗菌肽组间存在显著差异 (P< 0.05),Zeta 电位(y)与金属抗菌肽(x)存在质量浓度依赖(y=7.20x-30.10,R^2=0.961 3)。2MIC 与 TritonX-100 组间差异不显著(P>0.05),表明 2MIC 抗菌肽与 TritonX-100 对菌体细胞表面电位影响基本一致。通常情况下,Zeta 电位 (-5~0) mV 时易凝聚,(-30~-10) mV 不稳定,(-40~-30) mV 或更大有良好稳定性[23]。1/2MIC 组 Zeta 电位为(-27.27±0.56) mV,菌体细胞开始表现不稳定,MIC 和 2MIC 组 Zeta 电位分别为(-21.45±0.34) mV 和(-16.25±0.35) mV,表明随着抗菌肽质量浓度的增加,细胞变得更容易聚沉和黏附[21]。

2.3 对细胞膜表面疏水性的影响

细胞表面疏水性是影响细菌非特异性黏附到其他物质或界面的重要因素之一,也影响营养物质吸收、胞内代谢物排泄及细胞分化。菌体疏水性越高越容易聚沉[24],SIF_4 对细胞表面疏水性影响见表1。

表 1 SIF_4 对菌体表面疏水性的影响

Table 1 Effect of SIF_4 on cell surface hydrophobicity

组别	菌体吸附率/%
空白对照	24.29±3.04^{a}
1/2MIC	39.23±2.28^{b}
MIC	42.34±0.81^{b,c}
2MIC	52.68±1.35^{d,e}
TritonX-100	53.66±0.90^{e}

*:字母相同表示差异不显著(P>0.05),字母不同表示差异显著(P<0.05)

由表 1 可看出,空白对照组与其他试验组均存在显著差异 (P<0.05),1/2MIC 与 MIC 组差异不显著,MIC 与 2MIC 组和 TritonX-100 组存在显著差异(P<0.05)。细胞表面疏水性随抗菌肽质量浓度的增加呈递增趋势,2MIC 与 TritonX-100 差异不显著。试验用 KNO_3 缓冲液 pH 值(6.2)高于菌体 pI(2.0~3.0)[25],菌体带负电荷,SIF_4 为阳离子抗菌肽,可与细胞表面有较强静电吸附，导致细胞表面电负性增强,疏水性下降,细胞膜混乱程度增大,细胞膜受损加重[26],与 Lee 研究结果基本一致[27]。

2.4 对细胞膜内膜通透性的影响

β-半乳糖苷酶为胞内糖苷水解酶,可将乳糖水解为半乳糖和葡萄糖,乳糖为诱导物,常作为细胞内膜通透性的生物标记[28]。邻硝基苯 β-D-半乳吡喃糖苷(ONPG)可作为乳糖替代物并可被酶解生成黄色邻-硝基苯酚,在 415 nm 处有特征吸收峰。金黄色葡萄球菌细胞膜结构完整时,胞外 β-半乳糖苷酶极低,只有细胞内膜受损时,ONPG 才能介入胞内并与胞内 β-半乳糖苷酶反应生成黄色邻-硝基苯酚,测定 $OD_{415\ nm}$ 可间接反映细胞内膜通透性与细胞膜受损情况[28],SIF_4 对细胞内膜通透的影响见图 3。

由图 3 可看出,温育 1 h 时,对照组与 1/2MIC 细胞外 β-半乳糖苷酶分泌活性无显著差异,温育 2 h,试验组与对照组均存在显著差异(P<0.05),且

随抗菌肽质量浓度的增加和温育时间的延长,细胞内膜通透性呈增大趋势,且呈良好的剂量-效应关系(正相关);温育时间超过 3 h(含 3 h)后,细胞膜通透性增幅减缓或略有下降,2MIC 与 TritonX-100 组差异不显著,与 Epand[29]等研究结论一致。

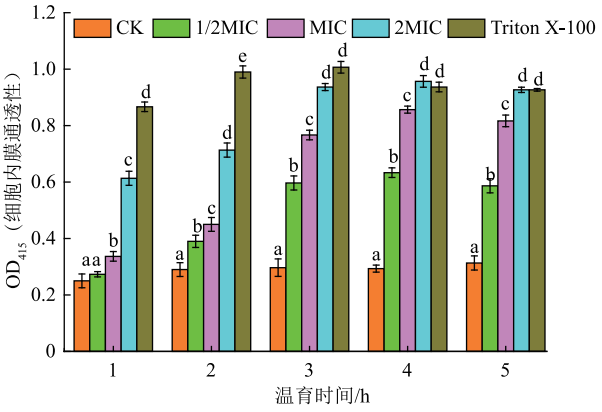


图 3 SIF_4 对 β-半乳糖苷酶活性的影响

Fig. 3 Effect of SIF_4 on β-galactosidase activity

2.5 对胞内生物大分子泄漏的影响

细胞膜受损时,胞内核酸和蛋白质等生物大分子可泄漏至胞外,并导致代谢紊乱和细胞坏死[6]。菌体含嘌呤和嘧啶等核苷酸及酪氨酸和色氨酸等具有共轭双键的芳香族氨基酸残基,分别在 260 nm 和 280 nm 处有最大紫外特征光吸收[30]。SIF_4 对胞内生物大分子泄漏影响见图 4。

由图 4(a)可看出,试验组与阴性对照组(PBS 组)蛋白质泄漏呈显著差异(P<0.05),且随着抗菌肽剂量的增加和温育时间的延长,蛋白质泄漏呈递增趋势,温育 3~5 h,2MIC 组与 Trition X-100 组差异不显著(P>0.05),说明金属抗菌肽在 2MIC 质量浓度条件下对细胞膜损伤导致的蛋白质泄漏与 TritonX-100 影响基本一致;从图 4(b)可看出,温育 1 h,PBS 组与 1/2MIC 组差异不显著(P>0.05),温育时间进一步延长时,试验组与 PBS 组差异显著(P<0.05),温育 4 h,2MIC 组与 Triton X-100 组差异不显著(P>0.05)。SIF_4 对菌体胞内生物大分子泄漏与作用剂量和温育时间呈正相关。SIF_4 引起细胞膜通透性增强并诱导细胞坏死可能是由于 Fe^{2+} 与菌体细胞接触后,带负电荷的细胞壁脂多糖与 Fe^{2+} 正电荷相吸,使抗菌肽穿透细胞壁进入菌体并与膜蛋白质或胞内生物大分子结构中活性基团反应,造成胞内紫外吸收生物大分子泄漏,扰乱细胞代谢导致细胞死亡[31]。

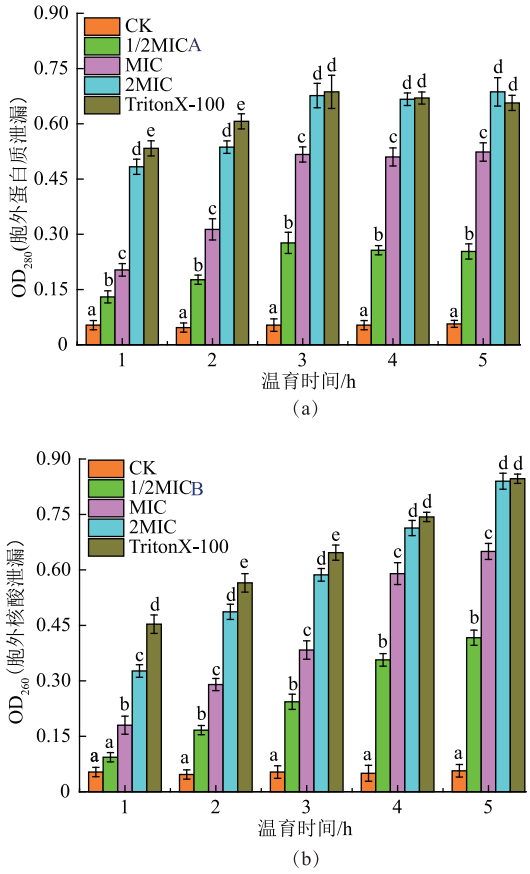


图 4 SIF_4 对胞内生物大分子泄漏的影响

Fig. 4 Effect of SIF_4 on intracellular biomacromolecular leakage

3 结 语

细胞壁与细胞膜结构完整是维持细胞形态与稳定细胞内环境的关键,当这些屏障受损或核心遭到破坏时,细胞通透性增大甚至出现不可逆孔洞,引起胞内离子、小分子物质及生物大分子物质泄漏并诱导细胞死亡,细胞通透性改变常作为抗菌肽研究重要的生物标记[28]。作者从细胞壁通透性、细胞表面电位、表面疏水性和细胞内膜通透性及胞内生物大分子泄漏等方面研究了金属抗菌肽 SIF_4 对细胞通透性的影响并发现,抗菌肽质量浓度的增加和温育时间的延长可增强细胞壁通透性,试验组与 PBS 组均存在显著差异(P<0.05),2MIC 和 TritonX-100 组间差异不显著(P>0.05);Zeta 电位(y)与金属抗菌肽(x)存在质量浓度依赖(y=7.20x-30.10,R^2=0.961 3);细胞表面疏水性随抗菌肽质量浓度增加呈递增趋势,2MIC 与 TritonX-100 差异不显著(P>0.05);细胞

内膜通透性随抗菌肽质量浓度增加和温育时间延长呈递增趋势,且呈良好量-效关系(正相关);胞内核酸与蛋白质等生物大分子泄漏与抗菌肽剂量与温育时间也呈正相关。结果表明,金属抗菌肽 SIF_4 可破坏细胞壁(膜)结构完整,增加细胞通透性并使胞内物质泄漏,还可增强细胞表面疏水性和降低细胞表面电位,使细胞聚沉并诱导细胞坏死,可作为食源性致病菌的潜在抑菌剂。

参考文献:

[1] LEON M,SEGURA C.Review of antimicrobial peptides as promoters of food safety:Limitations and possibili- ties within the food industry[J]. **Journal of Food Safety**,2020,40(6):e12854.
[2] 曹啸. 葫芦岛市 13 类市售食品微生物监测分析[J]. 当代医学,2017,23(34):28-30.
[3] 潘少兵,陶成钢,郑晓涵. 2017 年夏安庆市大型超市冷冻食品微生物污染状况调查与分析[J]. 安庆师范学院学报(自然科学版),2018,24(4):82-86.
[4] 国译丹,范璐,汤小召,等. 2018 年云南省外卖餐饮的微生物污染状况调查[J]. 食品安全质量检测学报,2019,10(22):7633-7638.
[5] 曹铁红,刘桂华. 通化市 2014-2018 年肉与肉制品中食源性致病菌检测结果分析[J]. 中国卫生工程学,2020,19(1):39-41.
[6] BOPARAI J,SHARMA P.Mini review on antimicrobial peptides,sources,mechanism and recent applications[J]. **Protein and Peptide Letters**,2020,27(1):4-16.
[7] 肖怀秋,李玉珍,林亲录,等. 花生肽亚铁胃肠仿生消化产物对金黄色葡萄球菌的抑菌机理[J]. 食品与发酵工业,2020,46(18):111-116.
[8] 肖怀秋,李玉珍,赵谋明,等. 模拟人胃肠仿生消化对花生肽亚铁抗氧化活性的影响[J]. 中国油脂,2020,45(5):50-55,86.
[9] 肖怀秋,李玉珍,林亲录,等. 金属抗菌肽 SIF_4 在人工模拟食品体系中的抑菌稳定性研究[J]. 食品与发酵工业,2021,47(22):121-125.
[10] EPAND R,WALKER C,EPAND R,et al. Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics[J]. **BBA- Biomembranes**,2016,1858(5):980-987.
[11] 肖怀秋,李玉珍,林亲录,等. 抗菌肽多靶点作用抑菌机理研究进展[J]. 食品与生物技术学报,2022,41(5):11-19.
[12] MARRI L,DALLAI R,MARCHINI D. The novel antibacterial peptide ceratotoxin A alters permeability of the inner and outer membrane of *Escherichia coli* K-12[J]. **Current Microbiology**,1996,33(1):40-43.
[13] 陈飞龙. *Lactobacillus paracasei* FX-6 产抗菌肽对金黄色葡萄球菌作用机制及其应用研究[D]. 广州:华南农业大学,2016.
[14] HOU L,SHI Y,ZHAI P,et al. Inhibition of foodborne pathogens by Hf-1,a novel antibacterial peptide from the larvae of the housefly(*Musca domestica*) in medium and orange juice[J]. **Food Control**,2007,18(11):1350-1357.
[15] IBRAHIM H,SUGIMOTO Y,AOKI T. Ovotransferrin antimicrobial peptide (OTAP-92) kills bacteria through a membrane damage mechanism[J]. **Biochimica et Biophysica Acta General Subjects**,2000,1523(2-3):196-205.
[16] PAUL S,DUBEY R,MAHESWARI D,et al. *Trachyspermum ammi*(L.) fruit essential oil influencing on membrane permeability and surface characteristics in inhibiting food-borne pathogens[J]. **Food control**,2011,22(5):725-731.
[17] DANIKOWSKI K,TONG C. Alkaline phosphatase activity of *Staphylococcus aureus* grown in biofilm and suspension cultures[J]. **Current Microbiology**,2018,75:1226-1230.
[18] LI R,LIU Z,DONG W,et al. The antifungal peptide CGA-N12 inhibits cell wall synthesis of *Candida tropicalis* by interacting with KRE9[J]. **Biochemical Journal**,2020,477(3):747-762.
[19] MIOZZARI G,NIEDERBERGER P,HUTTER R. Permeabilization of microorganisms by Triton X-100[J]. **Analytical Biochemistry**,1978,90(1):220-233.
[20] CHUNG Y,SU Y,CHEN C,et al. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall [J]. **Acta Pharmacologica Sinica**,2004,25(7):932-936.
[21] ZHANG X,JIANG Z,YUAN H,et al. Influence of surface zeta potential on adhesion of *Chlorella* sp. to substratum surfaces[J]. **Advanced Materials Research**,2013,690-693:1431-1434.
[22] WILSON W,WADE M,HOLMAN S,et al. Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta

potential measurements[J]. **Journal of Microbiological Methods**,2001,43(3):153-164.
[23] CHAN M,BELL D,DUNNIL P. The relationship between the zeta potential and the size of soya protein acid precipitate particles [J]. **Biotechnology & Bioengineering**,2010,24(8):1897-1900.
[24] 侯利霞,翟培,施用晖,等. 家蝇抗菌肽对细菌细胞表面特性影响及其作用机理的研究[J]. 微生物学通报,2007,34(3):434-437.
[25] 毛雪芳. 滁菊精油对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的抗菌机制及其在肉类保鲜中的应用[D]. 镇江:江苏大学,2019.
[26] 付云,赵谋明,庞一扬,等. 源自螺旋藻渣枯草芽孢杆菌发酵抗菌肽 SP-AP-1 和 Iturin A 对金黄色葡萄球菌抑菌机制对比研究[J]. 食品科学,2020,41(4):1-13.
[27] LEE D,KIM H,PARK Y,et al. Design of novel analogue peptides with potent antibiotic activity based on the antimicrobial peptide,HP(2-20),derived from N-terminus of Helicobacter pylori ribosomal protein L1[J]. **BBA–Proteins Proteomics**,2002,1598(1):185-194.
[28] LUO J. Cell permeabilized and it's application[J]. **Acta Microbiologica Sinica**,2001,41(3):386.
[29] EPAND R,EPAND R. Domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents[J]. **Molecular Biosystems**,2009,5(6):580-587.
[30] LAVIN G,LORING H,STANLEY W. Ultraviolet absorption spectra of latent mosaic and ring spot viruses and of their nucleic acid and protein components[J]. **Journal of Biological Chemistry**,1939,130(1):259-268.
[31] YU L,ZHU M,LIU E,et al. Studies of the mechanism of an antibacterial peptide (cecropinA-magainin) on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* membranes[J]. **Biotechnology and Applied Biochemistry**,2015,63(3):805-811.

科　技　信　息

科研人员开发高效转化人造淀粉和单细胞蛋白新方法

近日,中国农业科学院生物技术研究所微生物蛋白设计与智造创新团队与国内相关科研单位合作,开发了一种利用玉米秸秆高效生物合成人造淀粉和单细胞蛋白的新技术,进一步降低了人造淀粉的生产成本,为粮食生产提供了新的途径。相关研究成果发表在《科学通报(Science Bulletin)》上。

该研究创建了一种使用现有的农业废弃物(玉米秸秆)高效合成人造淀粉和微生物蛋白的新技术,利用包含纤维素降解酶和淀粉合成酶的体外多酶分子体系,与酿酒酵母进行生物转化,可以把玉米秸秆中的纤维素高效酶水解合成人造淀粉,同时在有氧条件下低成本发酵生产微生物蛋白。这种新方法首次创建了从商业化纤维素酶中去除 β-葡萄糖苷酶的高效纤维素降解及纤维二糖生成技术,能有效控制和降低纤维素酶成本,同时利用底物穿梭效应减少产物抑制,提高纤维素酶水解能力。而且,整个生物制造过程中无须辅酶和能量输入,没有糖损失以及设备投资小,为满足人造淀粉和微生物蛋白生物合成的经济性要求提供了可能。

[信息来源]中国农业科学院生物技术研究所.科研人员开发高效转化人造淀粉和单细胞蛋白新方法[EB/OL]. (2023-1-11).https://www.caas.cn/xwzx/kyjz/325572.html