

◆ 生物科学 ◆

贝莱斯芽孢杆菌 BR-01 菌株高产抗菌肽培养基的优化及其抗菌肽的鉴定^{*}

周健平^{1,2}, 谢云巧¹, 廖雨虹¹, 李昕洋¹, 李一鸣^{1,2}, 李淑萍², 马修国¹, 雷诗敏¹, 林菲³,
姜伟^{2**}, 何勇强^{1,2**}

(1. 广西大学农学院, 广西南宁 530004; 2. 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室(广西大学), 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530004; 3. 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室(华南农业大学), 华南农业大学植物保护学院, 广东广州 510642)

摘要: 贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) BR-01 菌株对水稻细菌性条斑病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, *Xoc*) 具有较好的拮抗作用。为了提高该菌株的抗菌肽发酵产量和生防价值, 对其产抗菌肽培养基进行了优化, 并初步鉴定了其抗菌肽的成分。以 *B. velezensis* BR-01 菌株无菌发酵滤液对 *Xoc* 的抑菌圈直径为评价指标, 从 7 种常见培养基中筛选出最适培养基, 通过单因素试验优化初始培养基各组分含量和发酵条件, 再利用 Plackett-Burman (PB) 试验筛选出影响发酵滤液抑菌活性的显著因素, 运用响应面分析法获得最优发酵条件。利用 PCR 分析 *B. velezensis* BR-01 基因组中抗菌肽合成相关基因; 使用液相色谱-质谱联用 (Liquid Chromatography-Mass Spectrometer, LC-MS) 技术鉴定其产生的抗菌肽。结果表明, *B. velezensis* BR-01 菌株最佳抗菌肽培养基配方与发酵条件为麦芽糖 11.89 g/L、酵母提取物 13.54 g/L、NaCl 5 g/L、KH₂PO₄ 1 g/L、初始 pH 值为 7、发酵时间 48 h、发酵温度 32.3 °C。该优化方案下, *B. velezensis* BR-01 菌株的无菌发酵滤液对 *Xoc* 的抑菌圈直径为 (42.5 ± 0.2) mm, 显著高于优化前的 (28.0 ± 0.9) mm, 比优化前增大 51.79%。抗菌肽主要成分初步鉴定为溶杆菌素 (Bacilysin)、表面活性素 (Surfactin)、伊枯草菌素 (Iturin) 和丰原素 (Fengycin)。本研究为 *B. velezensis* BR-01 菌株用于快速、批量发酵制备生防菌液, 以及其抗菌肽的分离纯化、结构鉴定、田间生防利用等后续研究提供了理论基础。

关键词: 贝莱斯芽孢杆菌; 水稻细菌性条斑病菌; 抗菌肽; 发酵条件; 响应面法

中图分类号: S435.11 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2023)04-0693-13

DOI: 10.13656/j.cnki.gxkx.20230928.008

收稿日期: 2022-07-25

修回日期: 2022-09-09

* 国家重点研发项目(2018YFD0200302), 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室开放课题(SKLCUSA-a201917)和国家现代农业产业技术体系建设专项(nycytxgxcxtd-2021-06-2)资助。

【第一作者简介】

周健平(1994-), 男, 在读硕士研究生, 主要从事水稻病害生物防治研究。

【通信作者】**

姜伟(1975-), 男, 副教授, 主要从事植物生物技术研究, E-mail: weijiang@gxu.edu.cn。

何勇强(1963-), 男, 教授, 主要从事植物病理学和微生物学研究, E-mail: yqhe@gxu.edu.cn。

【引用本文】

周健平, 谢云巧, 廖雨虹, 等. 贝莱斯芽孢杆菌 BR-01 菌株高产抗菌肽培养基的优化及其抗菌肽的鉴定[J]. 广西科学, 2023, 30(4): 693-705.

ZHOU J P, XIE Y Q, LIAO Y H, et al. Optimization of High-yield Antimicrobial Peptide Culture Medium of *Bacillus velezensis* BR-01 and Identification of Its Antimicrobial Peptide [J]. Guangxi Sciences, 2023, 30(4): 693-705.

水稻(*Oryza sativa* L.)是三大主要粮食作物之一,是全世界接近一半人口的主食,也是重要的工业原料之一^[1]。水稻细菌性条斑病(Rice bacterial leaf streak)简称条斑病,俗称红叶病,是由稻黄单胞菌稻生致病变种[水稻细菌性条斑病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, *Xoc*)]侵染引起的一种细菌性病害。水稻发病后,造成条形叶斑、叶尖枯,光合作用下降,影响谷粒灌浆,一般减产15%–25%,严重时可达40%–60%^[2]。该病已经成为我国黄河以南多个稻区的主要水稻病害之一,严重影响水稻的安全生产。*Xoc*属于外来入侵物种,是我国重要的检疫对象之一^[3]。鉴于目前尚缺少高抗细菌性条斑病的水稻品种^[3],该病的防控主要依靠农业措施和化学防治。尽管化学防治以其方便、快速、效果显著等特点在水稻病害防治中发挥着重要作用,然而许多化学制剂有不可忽视的副作用,如化学残留物、环境污染和害虫抗性,显然不符合农业可持续发展的要求。而生物防治是一种可持续的、实用的植物病害管理方法,是水稻病害防治的一种很有前途的替代策略^[4]。

芽孢杆菌是一种厌氧或兼性厌氧、杆状、内生孢子的细菌,广泛分布于整个环境中,是水稻生产中常用的生物防治剂,一般通过产生抑菌蛋白或抗菌肽等发挥其生防作用^[5,6]。解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) Lx-11能够产生表面活性素(Surfactin)、杆菌霉素(Bacillomycin)和丰原素(Fengycin)3类脂肽类抑菌物质,盆栽实验证明Surfactin在控制*Xoc*侵染的过程中发挥了关键作用^[7]。黄梦桑等^[8]从辣椒根际土壤中分离筛选到对*Xoc*和水稻白叶枯病菌(*X. oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*)具有拮抗活性的高地芽孢杆菌(*B. altitudinis*) 181-7。AntiSMASH软件预测结果显示,181-7菌株中含有多个抑菌活性代谢产物基因簇,包括地衣杆菌素(Lichenysin)、溶杆菌素(Bacilysin)、Fengycin、细菌素(Bacteriocin)等。贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) 504对黄单胞菌属的细菌具有较好的抑菌活性,基因预测结果显示,*B. velezensis* 504含有*fenA*、*dhbA*、*sfrAA*、*bmyA*、*beaS*、*dfnA*及*bacA*等编码脂肽类和聚酮糖类抑菌化合物的基因簇^[5]。*B. velezensis*是芽孢杆菌属的一个新种^[9]。研究表明,*B. velezensis*的许多菌株具有抑制水稻病原菌生长和促进植物生长的能力。这些能力在很大程度上依赖于其产生的次级代谢产物,如环脂肽(Surfactin、Bacillomycin D、Fengycin等)和聚酮类化合物[大环内酰胺(Mac-

rolactin)、杆菌烯(Bacillaene)和地非西丁(Difficidin)等]^[10-12]。

生防菌从研究成果转化为应用产品需要阶梯式的试验与开发。发酵是影响生防菌研究与应用的重要因素,在微生物发酵过程中,不同的培养基成分和发酵条件对其生长速度、菌体量及抗菌活性物质的产出等具有显著影响。石慧敏等^[13]通过优化发酵工艺,使*B. velezensis* YH-18的芽孢产量较LB(Luria-Bertani)初始培养基提高9.48倍。张晓云等^[14]使用熊果苷作为菌株*B. subtilis* BAB-1产Surfactin的碳源,其Surfactin产量达到以葡萄糖为碳源时的3倍。乔俊卿等^[15]利用响应曲面法优化菌株*B. subtilis* t-500的产抗菌肽培养基后,成功检测到菌株在初始发酵培养基中不能生产的Fengycin。此外,即使是同一个种、属的不同菌株,其最适发酵条件也往往因为菌株不同的遗传背景、生理生化特性及环境适应性而存在差异^[16,17]。以近年来报道的*B. velezensis*菌株最适发酵条件为例,杨可^[18]优化*B. velezensis* TCS001菌株的最佳发酵条件为温度25℃、发酵培养时间36h;黎燕珊等^[16]报道*B. velezensis* HC-8菌株的最佳发酵条件为温度37℃、发酵培养时间48h;郭艳霞等^[19]研究发现*B. velezensis* YB19菌株的最适培养温度和时间分别为32℃和28h。目前,国内外已经有许多关于生物防治水稻细菌性条斑病的研究,但是详细的发酵条件研究还比较缺乏。

本课题组前期研究发现,从中药材土贝母块茎内分离获得的*B. velezensis* BR-01菌株对*Xoc*具有良好的拮抗效果,但还需要发酵数据支持下一步的研究与开发。本研究以*B. velezensis* BR-01菌株无菌发酵滤液对*Xoc*的抑菌圈直径为因变量,通过提高发酵滤液的抑菌活性来间接提高抗菌肽的浓度,并使用液相色谱-质谱联用(Liquid Chromatography-Mass Spectrometer, LC-MS)技术鉴定抗菌肽,为该菌株进一步的理论研究及后续的大田生防实验提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

水稻细菌性条斑病菌(*X. oryzae* pv. *oryzicola*) GX01,由亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室提供。贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) BR-01

菌株分离自中药土贝母的块茎组织,在前期的实验中已证明其对水稻细菌性条斑病菌具有较好的拮抗效果,菌株由本实验室筛选、保存及鉴定。

1.1.2 供试培养基

LB 培养基:酵母提取物 5.0 g/L、蛋白胨 10.0 g/L、NaCl 5.0 g/L;NB (Nutrient Broth)培养基:牛肉膏 3.0 g/L、酵母提取物 1.0 g/L、蛋白胨 5.0 g/L;PDB (Potato Dextrose Broth)培养基:马铃薯浸粉 3.0 g/L、葡萄糖 20.0 g/L;Landy 培养基:L-谷氨酸 5.0 g/L、酵母提取物 1.0 g/L、L-苯丙氨酸 2 mg/L、葡萄糖 20.0 g/L、 KH_2PO_4 1.0 g/L、KCl 0.5 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g/L、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.16 mg/L、 MnSO_4 5 mg/L;YSP (Yeast Sucrose Peptone)培养基:蛋白胨 2.0 g/L、酵母提取物 1.0 g/L、蔗糖 4.0 g/L;CM (Complete Medium)培养基:葡萄糖 5.0 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 g/L、柠檬酸钠 1.0 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L、 K_2HPO_4 4.0 g/L、 KH_2PO_4 6.0 g/L;NYBD (Nutrient Yeast Beef Dextrose)培养基:牛肉膏 8.0 g/L、酵母提取物 5.0 g/L、葡萄糖 10.0 g/L。以上培养基的 pH 值控制在 7.0-7.2,固体培养基额外添加 1.5% 琼脂粉。

1.2 方法

1.2.1 *B. velezensis* BR-01 菌株发酵滤液离体抑菌活性测定

以 *Xoc* 为指示菌,采用牛津杯法和交叉交叉法测定 *B. velezensis* BR-01 菌株发酵滤液离体抑菌活性^[20]。取 4 ℃ 低温离心后获得的 *B. velezensis* BR-01 菌株发酵上清液,通过孔径 0.22 μm 的细菌过滤器得到无菌发酵滤液。为保证培养皿底部平整,首先在培养皿底部铺一层 1 mm 厚度的水琼脂,再放置牛津杯。将加热融化的 NB 固体培养基冷却至 45 ℃,以 0.5% 的体积分数加入 10^8 CFU/mL 的指示菌液,摇晃均匀后倒入平皿中。冷却后取出牛津杯,每孔加入 0.1 mL 无菌发酵滤液,以加入等量发酵培养基上清液为对照,重复 3 次处理。28 ℃ 恒温培养箱中倒置培养 2 d,观察并测量抑菌圈直径。

1.2.2 *B. velezensis* BR-01 菌株初始发酵培养基筛选

从 -80 ℃ 冰箱中取出 *B. velezensis* BR-01 甘油保藏菌液,分别接种到 1.1.2 节各初始固体培养基平板上。28 ℃ 培养 48 h 后,挑取单菌落接种至对应的液体培养基中,28 ℃、200 r/min 条件下培养 48 h。

参照 1.2.1 节制备各初始培养基发酵滤液并测定其离体抑菌活性,各试验重复 3 次处理。

1.2.3 单因素试验

以 1.2.2 节最优培养基为初始发酵培养基,通过改变各组分种类及浓度或设置不同的培养条件,试验各因素对 *B. velezensis* BR-01 菌株发酵滤液抑菌活性的影响,每次优化后的结果进入随后的条件优化试验。(1)碳源:将初始发酵培养基中的碳源(酵母提取物)分别等质量替换为玉米粉、淀粉、蔗糖、麦芽糖、糊精和葡萄糖,并调整最适碳源浓度。(2)氮源:将初始发酵培养基中的氮源(蛋白胨)分别等质量替换为花生饼粉、牛肉膏、酵母提取物、豆粕粉、胰蛋白胨、尿素,并调整最适氮源浓度。(3)无机盐:在初始发酵培养基的基础上分别添加 CaCl_2 、 MgCl_2 、 CaCO_3 、 MnSO_4 、 K_2HPO_4 ,添加量为 0.1%(W/V),以不添加无机盐为对照。(4)pH 值:设置初始发酵培养基初始 pH 值为 4-9,设置 6 个梯度。(5)发酵时间:设置发酵时间为 12-72 h,设置 6 个梯度。(6)温度:设置摇床培养温度为 26-36 ℃,设置 6 个梯度。上述培养基配制后按每瓶 100 mL 分装到 250 mL 三角瓶中,初始发酵条件为 28 ℃、200 r/min 培养 48 h。参照 1.2.1 节制备各处理组发酵滤液并测定其离体抑菌活性,各试验重复 3 次处理。

1.2.4 Plackett-Burman (PB) 试验

根据单因素试验结果,采用 Design-Expert 12 软件 PB 设计法进行试验设计,以 *B. velezensis* BR-01 菌株发酵滤液抑菌圈直径为响应值,设置培养基组分及发酵条件中各个单因素的高(+1)、低(-1)两个水平,每组处理重复 3 次。参照 1.2.1 节制备各处理组发酵滤液并测定其离体抑菌活性,使用 Design-Expert 12 软件处理试验数据,通过方差分析判断各因素对发酵结果的重要程度,试验设计见表 1。

表 1 PB 试验因素与水平设计

Table 1 Factors and levels design of PB experiments

因素 Factors	编号 Symbols	水平 Level	
		低(-1) Low (-1)	高(+1) High (+1)
Maltose/(g/L)	A	6	12
Yeast extract/(g/L)	B	8	16
KH_2PO_4 /(g/L)	C	1	2
Initial pH value	D	6.0	7.5
Time/h	E	36	48
Temperature/℃	F	26	32

1.2.5 最陡爬坡试验

根据 PB 试验得到影响发酵结果的显著因素, 根据前期单因素试验数据设计步长。显著因素步长方向应与其效应方向一致, 非显著因素取单因素最优水平, 通过最陡爬坡试验逼近发酵结果最优值。

1.2.6 响应面优化试验

通过最陡爬坡试验确定主要影响因子的最优组合, 以 *B. velezensis* BR-01 菌株发酵滤液对 *Xoc* 的抑菌圈直径为响应值, 通过 Design-Expert 12 软件设计 3 因素 3 水平 Box-Behnken 试验(表 2), 建立最优发酵条件并验证。

表 2 Box-Behnken 试验因素与水平设计

Table 2 Factors and levels design of Box-Behnken experiments

因素 Factors	编号 Symbols	水平 Levels		
		-1	0	+1
Maltose/(g/L)	X ₁	11	12	13
Yeast extract/(g/L)	X ₂	13	14	15
Temperature/°C	X ₃	31	32	33

1.2.7 抗菌肽合成相关基因的检测

根据文献[21-24]的方法, 利用特异性引物检测 Iturin、Bacillomycin D、Surfactin、Fengycin、和 Bacilysin 5 种抗菌肽的合成相关基因。PCR 反应体系: 1 μL 模板 DNA, 10 μL 5×PCR buffer, 5 μL dNTPs (2 mmol/L), 1.5 μL 上下游引物 (10 μmol/L), 0.6 μL DNA polymerase, ddH₂O 补足最终体积为 50 μL。PCR 扩增条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 5 min。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检查大小。

1.2.8 液相色谱质谱法分析抑菌肽

参照 Xu 等^[25]的方法从 *B. velezensis* BR-01 菌株发酵上清液中纯化获得抗菌肽粗提物。采用 LC-MS 检测和分析技术, 利用 Thermo Xcalibur 4.0 软件根据样品的质量-电荷比 (m/z) 测定目标物质的相对分子量, 并通过比较初步确定菌株产生的脂肽类型^[26]。

色谱条件: ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱 (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 柱温 30 °C; 自动进样器温度为 10 °C; 正离子 (ESI+) 模式下流动相 A 为 0.1% 甲酸水, B 为甲醇。样品梯度洗脱程序: 0.0–2.0 min, 95% A–95% A; 2.0–13.0 min, 95% A–5% A; 13.0–16.0 min, 5% A–5% A; 16.0–16.1 min, 5% A–95% A; 16.1–18.0 min, 95% A–

95% A, 流速为 0.3 mL/min, 进样体积为 2 μL。质谱条件: 离子源为加热型电喷雾 (HESI), 温度为 300 °C; 正离子模式下喷雾电压为 3.0 kV; 传输毛细管温度 320 °C, 鞘气压力 30 psi, 辅助气压力 10 psi; 扫描模式为 Full MS/dd-MS², 质量为 200–2 000 m/z, 一级扫描和二级扫描分辨率分别为 70 000 (FWHM) 和 17 500 (FWHM)。碰撞气: 高纯氮气。

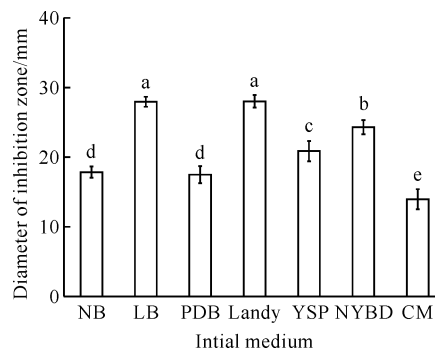
1.2.9 数据分析

每个试验至少独立重复 3 次, 结果以“平均值 ± 标准差”表示。使用 Design-Expert 12 软件进行 PB 试验设计和 Box-Behnken 试验设计并进行数据分析, 得到拟合回归方程, 进行试验方差分析。使用 SPSS 20.0 软件对最佳初始培养基和单因素试验结果进行统计分析, 并使用 Duncan 法进行显著性检验 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 适用于 *B. velezensis* BR-01 菌株的发酵培养基筛选

B. velezensis BR-01 菌株由不同的初始培养基发酵培养, 所获得的发酵滤液的抑菌活性会有明显的变化(图 1)。*B. velezensis* BR-01 菌株以 LB 培养基和 Landy 培养基作为初始发酵培养基时, 其发酵滤液的抑菌活性显著优于其他培养基, 抑菌圈直径分别为 (27.9 ± 0.7) mm 和 (28.0 ± 0.9) mm, 两者无显著差异。综合考虑成本因素, LB 培养基为 *B. velezensis* BR-01 菌株最适初始发酵培养基。



Different letters show significant difference at 0.05 level.

图 1 不同初始培养基培养获得的 *B. velezensis* BR-01 菌株发酵滤液对水稻细菌性条斑病菌抑菌活性的影响

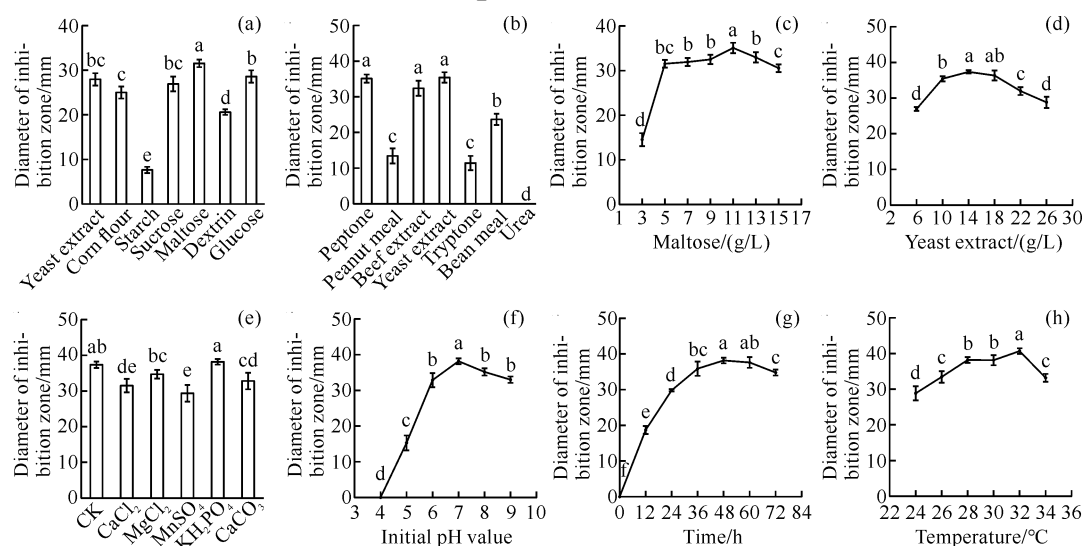
Fig. 1 Effects of different initial media on the antibacterial activity of *B. velezensis* BR-01 fermentation filtrate against *Xoc*

2.2 培养基及发酵条件的单因素优化

在单因素试验中, 以麦芽糖为碳源、以酵母提取

物为氮源时, *B. velezensis* BR-01 菌株发酵滤液对 *Xoc* 的抑菌圈直径分别取得最大值[图 2:(a)、(b)], 且随着麦芽糖浓度和酵母提取物浓度的提高, 抑菌圈直径呈先增加后减小的趋势[图 2:(c)、(d)]. 与空白对照组(CK)相比, 添加 $MgCl_2$ 对发酵滤液抑菌活性影响不显著, 添加 $CaCl_2$ 、 $MnSO_4$ 和 $CaCO_3$ 反而会不同程度地降低发酵滤液抑菌活性, 只有添加 KH_2PO_4 可以略微提高发酵滤液抑菌活性[图

2(e)]. *B. velezensis* BR-01 菌株在初始 pH 值为 7、 $32\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下发酵培养 48 h 得到的发酵滤液对 *Xoc* 的抑菌圈直径取得最大值[图 2:(f)、(g)、(h)]. 单因素试验结果表明, *B. velezensis* BR-01 菌株的最适碳源为麦芽糖, 最适碳源浓度为 11 g/L, 最适氮源为酵母提取物, 最适氮源浓度为 14 g/L, 最适无机盐为 KH_2PO_4 , 最适 pH 值为 7, 最适发酵时间 48 h, 最适发酵温度 $32\text{ }^\circ\text{C}$ 。



Different letters show significant difference at 0.05 level.

图 2 单因素条件下 *B. velezensis* BR-01 菌株发酵滤液对水稻细菌性条斑病菌抑菌活性的影响

Fig. 2 Effect of single factor on antibacterial activity of *B. velezensis* BR-01 fermentation filtrate against *Xoc*

2.3 培养基及发酵条件的响应面优化

2.3.1 PB 试验结果

PB 试验设计与结果见表 3。由方差分析可知, 不同的因素对发酵结果的作用大小不同。其中麦芽

糖(A)、酵母提取物(B)、温度(F)影响作用显著($P < 0.05$)且都为正效应, 3 因素按影响作用大小排序为温度(F) > 酵母提取物(B) > 麦芽糖(A)(表 4), 选取这 3 个因素进入下一步试验。

表 3 PB 试验设计与结果

Table 3 Design and results of PB experiments

序号 Number	A: 麦芽糖/ (g/L) A: maltose/ (g/L)	B: 酵母提取物/ (g/L) B: yeast extract/ (g/L)	C: 磷酸二氢钾/ (g/L) C: KH_2PO_4 / (g/L)	D: 初始 pH 值 D: initial pH value	E: 时间/h E: time/h	F: 温度/ $^\circ\text{C}$ F: temperature/ $^\circ\text{C}$	抑菌圈直径/mm Diameter of inhibition zone /mm
1	6	16	2	7.5	36	26	37.2 ± 0.5
2	6	8	1	7.5	36	32	38.6 ± 0.9
3	12	8	2	7.5	36	32	39.0 ± 0.6
4	6	8	1	6.0	36	26	34.0 ± 1.0
5	6	8	2	6.0	48	32	38.4 ± 0.3
6	6	16	1	7.5	48	26	39.0 ± 0.7
7	12	8	2	7.5	48	26	38.3 ± 1.2
8	12	16	2	6.0	36	26	39.6 ± 0.2
9	12	16	1	6.0	36	32	41.5 ± 1.0
10	12	16	1	7.5	48	32	41.7 ± 0.6
11	6	16	2	6.0	48	32	39.8 ± 0.6
12	12	8	1	6.0	48	26	36.8 ± 0.7

表4 PB试验统计分析

Table 4 Statistical analysis of PB experiments

编号 Symbols	因素 Factors	效应值 Effect value	F值 F value	P值 P value	重要性排序 Importance ranking
A	Maltose/(g/L)	0.825 0	9.56	0.027 1	3
B	Yeast extract/(g/L)	1.141 7	18.30	0.007 9	2
C	KH ₂ PO ₄ /(g/L)	0.058 3	0.05	0.835 6	6
D	Initial pH value	0.308 3	1.34	0.300 0	5
E	Time/h	0.341 7	1.64	0.256 5	4
F	Temperature/°C	1.175 0	19.40	0.007 0	1

2.3.2 最陡爬坡试验结果

最陡爬坡试验结果见表5, 最优发酵条件组合为麦芽糖 12 g/L、酵母提取物 14 g/L、培养温度 32 °C。

表5 最陡爬坡路径试验设计与结果

Table 5 Design and results of the steepest uphill experiments

序号 Number	麦芽糖/(g/L) Maltose/(g/L)	酵母提取物/(g/L) Yeast extract/(g/L)	温度/°C Temperature/°C	抑菌圈直径/mm Diameter of inhibition zone/mm
1	10	12	28	37.0 ± 1.1
2	11	13	30	40.1 ± 0.5
3	12	14	32	42.1 ± 0.4
4	13	15	34	35.3 ± 0.9
5	14	16	36	29.5 ± 0.5

在此发酵条件下, *B. velezensis* BR-01 菌株发酵滤液对 *Xoc* 的抑菌圈直径最大, 为 42.1 mm, 取该组合为响应中心点, 进入下一步试验。

2.3.3 Box-Behnken 试验结果

Box-Behnken 试验设计与结果见表6。使用 Design-Expert 12 软件对 Box-Behnken 试验数据进行多元回归拟合, 得到 *B. velezensis* BR-01 菌株发酵滤液抑菌圈直径(Y)对麦芽糖(X₁)、酵母提取物(X₂)、温度(X₃)的回归方程: $Y = 42.07 - 0.58X_1 - 0.26X_2 + 0.71X_3 + 0.43X_1X_2 + 0.13X_1X_3 -$

$0.50X_2X_3 - 2.23X_{12} - 0.41X_{22} - 1.76X_{32}$ 。方差分析结果显示, 该模型回归拟合度 P 值 $< 0.000 1$, 回归显著; 模型失拟值 $P = 0.240 0 > 0.05$, 失拟项不显著, 模型稳定误差小。该模型的决定系数 $R^2 = 0.992 5$, 校正决定系数 $R^2 = 0.979 0$, 模型拟合度较好, 预测可信度较高(表7)。

表6 Box-Behnken 试验设计与结果

Table 6 Design and results of Box-Behnken experiments

序号 Number	X ₁ : 麦芽糖/(g/L) X ₁ : maltose/(g/L)	X ₂ : 酵母提取物/(g/L) X ₂ : yeast extract/(g/L)	X ₃ : 温度/°C X ₃ : temperature/°C	Y: 抑菌圈直径/mm Y: diameter of inhibition zone/mm
1	0	-1	-1	38.8 ± 1.4
2	-1	0	-1	38.0 ± 0.7
3	-1	0	1	39.2 ± 1.1
4	1	0	-1	36.7 ± 0.6
5	-1	1	0	39.2 ± 0.8
6	1	1	0	38.8 ± 0.6
7	0	1	-1	39.6 ± 0.5
8	0	-1	1	41.2 ± 0.8

续表

Continued table

序号 Number	X ₁ :麦芽糖/(g/L) X ₁ :maltose/(g/L)	X ₂ :酵母提取物/(g/L) X ₂ :yeast extract/(g/L)	X ₃ :温度/℃ X ₃ :temperature/℃	Y:抑菌圈直径/mm Y:diameter of inhibition zone/mm
9	-1	-1	0	40.9±1.2
10	0	0	0	41.9±0.4
11	0	1	1	40.0±0.1
12	0	0	0	42.2±0.6
13	1	0	1	38.4±0.9
14	0	0	0	42.1±0.7
15	1	-1	0	38.8±0.3

表 7 Box-Behnken 试验统计分析

Table 7 Statistical analysis of Box-Behnken experiments

来源 Source	平方和 Sum of square	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
Model	36.86	9	4.10	73.36	<0.000 1
X ₁	2.65	1	2.65	47.37	0.001 0
X ₂	0.55	1	0.55	9.87	0.025 6
X ₃	4.06	1	4.06	72.74	0.000 4
X ₁ X ₂	0.72	1	0.72	12.94	0.015 6
X ₁ X ₃	0.06	1	0.06	1.12	0.338 5
X ₂ X ₃	1.00	1.00	1.00	17.91	0.008 2
X ₁₂	18.42	1	18.42	329.85	<0.000 1
X ₂₂	0.62	1	0.62	11.03	0.021 0
X ₃₂	11.42	1	11.42	204.46	<0.000 1
Residual error	0.28	5	0.06		
Lack of fit	0.23	3	0.08	3.32	0.240 0
Pure error	0.05	2	0.02		
Total	37.14	14			
R ²	0.992 5				
Adjusted R ²	0.979 0				

采用 Design-Expert 12 软件,根据上述拟合方程绘制显著因子间相互作用的响应面曲线图(图 3)。由结果可知,响应面曲线图均为凸面图,存在抑菌率获得最大值的发酵条件组合。通过软件求解回归方

程得到以下最优解决方案:麦芽糖(X₁)11.82 g/L、酵母提取物(X₂)13.42 g/L、温度(X₃)32.3 ℃,最大抑菌圈直径预测为 42.3 mm。

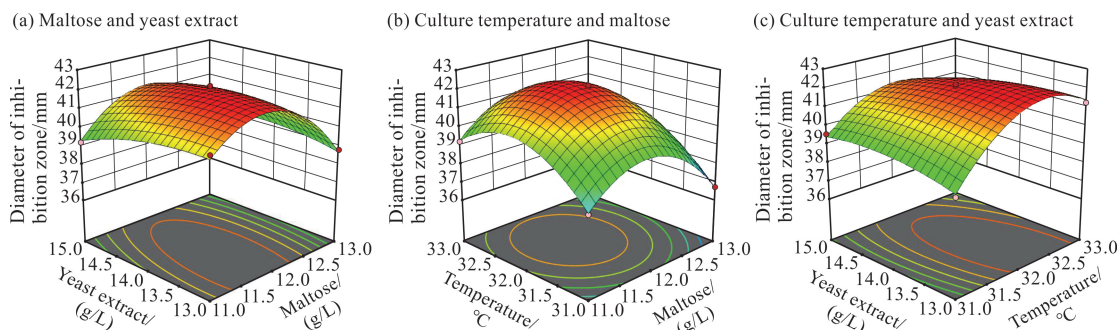


图3 各培养因素对抑菌圈直径交互影响的响应面

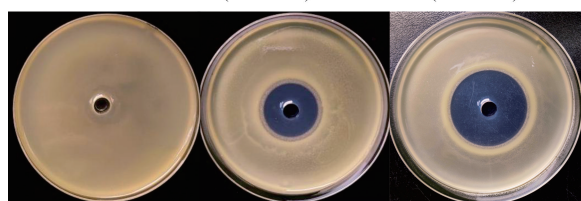
Fig. 3 Response surface diagram of interaction of culture factors on inhibition zone diameter

2.4 响应面最优条件验证

按照 Box-Behnken 试验预测值优化发酵条件显著因素,按照单因素试验优化发酵条件非显著因素,得到全部发酵条件如下:麦芽糖 11.89 g/L、酵母提取物 13.54 g/L、NaCl 5 g/L、 KH_2PO_4 1 g/L、初始 pH 值为 7、发酵时间 48 h、培养温度 32.3 °C。为验证响应面最优条件的可行性,在该优化方案下制备 *B. velezensis* BR-01 菌株发酵滤液并测定其对 *Xoc* 的离体抑菌活性,试验重复 3 次处理。结果显示,*B. velezensis* BR-01 菌株发酵滤液对 *Xoc* 的抑菌圈直径为 (42.5 ± 0.2) mm(图 4),与回归模型预测的最大抑菌圈直径 42.3 mm 相近,表明回归模型合理、可信。

(a) Control group (b) Before optimization (c) After optimization

(a) Control group	(b) Before optimization	(c) After optimization
Diameter of inhibition zone: 0 mm	Diameter of inhibition zone: (28.0 ± 0.9) mm	Diameter of inhibition zone: (42.5 ± 0.2) mm



Values given are the means \pm standard deviations of triplicate measurements.

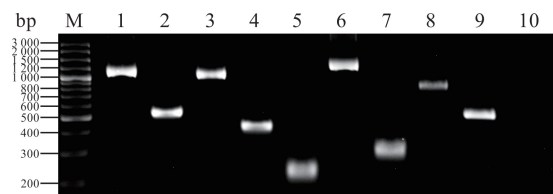
图4 各培养因素优化前后 *B. velezensis* BR-01 菌株发酵滤液抑菌活性对比Fig. 4 Comparison of antimicrobial activity of *B. velezensis* BR-01 fermentation filtrate before and after optimization of each culture factor

优化前使用 LB 培养基制备的 *B. velezensis* BR-01 菌株发酵滤液对 *Xoc* 的抑菌圈直径为 (28.0 ± 0.9) mm,优化后制备的 *B. velezensis* BR-01 菌株发酵滤液对 *Xoc* 的抑菌圈直径相比优化前增加了 51.79%,表明采用优化发酵方案可以有效提高 *B. velezensis* BR-01 菌株发酵滤液的抑菌活性物质

浓度。

2.5 抗菌肽合成相关基因的检测

本研究从 *B. velezensis* BR-01 菌株中成功扩增到与 Iturin 合成相关的基因 *ituA* 和 *ituD*,与 Bacilomycin D 合成相关的基因 *bmyB* 和 *bmyC*,与 Surfactin 合成相关的基因 *urfAA*,与 Fengycin 合成相关的基因 *fenB* 和 *fenD*,与 Bacilysin 合成相关的基因 *bacA* 和 *bacD*(图 5)。结果表明,*B. velezensis* BR-01 菌株具有产生多种抗菌肽的潜力。



Hole M represents Maker, hole 1 - 10 represent *ituA*, *ituD*, *bmyC*, *bmyB*, *urfAA*, *fenB*, *fenD*, *bacD*, *bacA* and non-template control in sequence.

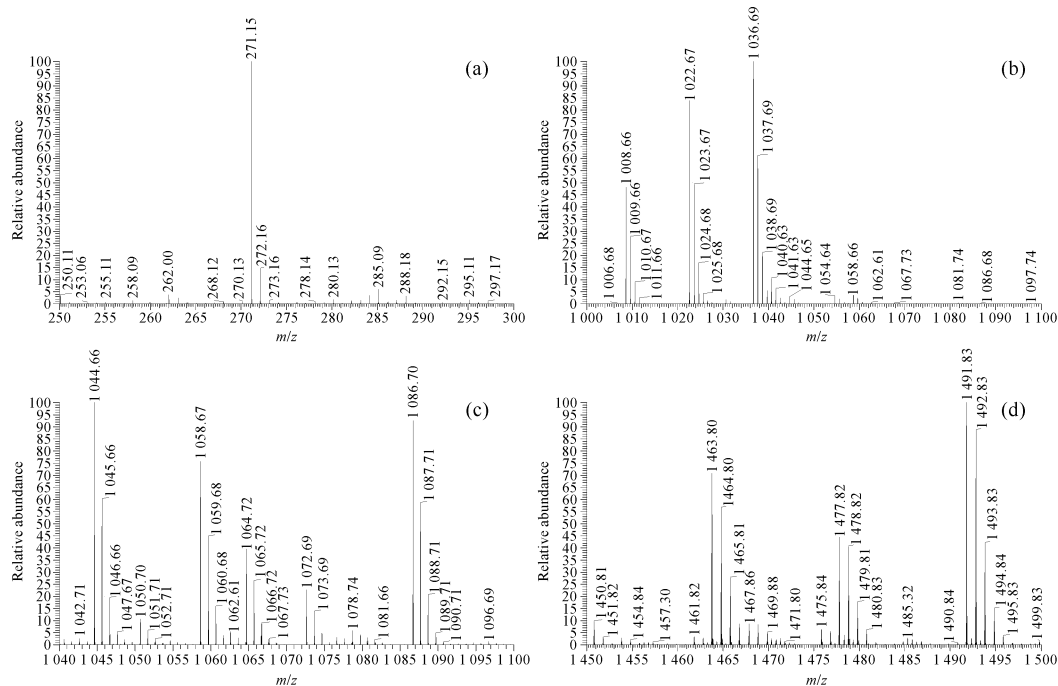
图5 *B. velezensis* BR-01 菌株抗菌肽合成基因的扩增Fig. 5 Amplification of antimicrobial peptide synthesis gene of *B. velezensis* BR-01

2.6 LC-MS 技术分析抑菌肽

芽孢杆菌可以代谢多种类型的抗菌肽,相当数量的抗菌肽具体组成和相对分子质量已经确定^[26-28]。本研究采用 LC-MS 检测技术分析 *B. velezensis* BR-01 菌株抗菌肽粗提取物的成分,结合对应于质谱的色谱图中每个时间段出现的峰,根据相对分子质量和“-CH₂-”脂肪链的结构特征分析质谱中的一系列单峰,结合 2.5 节抗菌肽合成相关基因的检测结果作出以下推测:(1)推测 m/z 271.15 为抗菌二肽 Bacilysin [图 6(a)];(2)推测 m/z 1 008.66、 m/z 1 022.67 和 m/z 1 036.69 为 Surfactin 同系物 [图 6(b)];(3)推测 m/z 1 044.66、 m/z 1 058.67、 m/z 1 072.69 和 m/z 1 086.70 为 Iturin 同系物 [图 6(c)];(4)推测 m/z 1 463.80、 m/z 1 477.82 和 m/z

m/z 1491.83 为 Fengycin 同源物[图 6(d)]. 基于上述结果, 推测该菌株可能产生 4 种抗菌肽: Bacilysin、

Surfactin、Iturin 和 Fengycin (表 8)。



(a) Bacilysin, MS spectra of m/z 271.15; (b) Surfactin, MS spectra of m/z 1008.66, m/z 1022.67 and m/z 1036.69; (c) Iturin, MS spectra of m/z 1044.66, m/z 1058.67, m/z 1072.69 and m/z 1086.70; (d) Fengycin, MS spectra of m/z 1463.80, m/z 1477.82 and m/z 1491.83.

图 6 抗菌肽脂粗提物的 LC-MS 分析

Fig. 6 LC-MS analysis of antibacterial peptides extracts

表 8 抗菌肽脂粗提物的 LC-MS 分析

Table 8 LC-MS analysis of antibacterial peptides extracts

质量测定值/(m/z) Measured mass value/(m/z)	离子结形式 Ion junction form	抗菌肽类型 Antibacterial peptide type
271.15	[M+H] ⁺	Bacilysin
1008.66	[M+H] ⁺	C13 Surfactin A or C14 Surfactin B or C13 Surfactin C
1022.67	[M+H] ⁺	C14 Surfactin A or C15 Surfactin B or C14 Surfactin C
1036.69	[M+H] ⁺	C15 Surfactin A or C16 Surfactin B or C15 Surfactin C
1044.66	[M+H] ⁺	C14 Iturin B
1058.67	[M+H] ⁺	C15 Iturin B
1072.69	[M+H] ⁺	C16 Iturin B
1086.70	[M+H] ⁺	C17 Iturin B
1463.80	[M+H] ⁺	C14 Fengycin A or C16 Fengycin A or C14 Fengycin B
1477.82	[M+H] ⁺	C15 Fengycin A or C17 Fengycin A or C15 Fengycin B
1491.83	[M+H] ⁺	C18 Fengycin A or C16 Fengycin B

3 讨论

贝莱斯芽孢杆菌因其丰富的抗菌肽产物被广泛

应用于多种植物病害的生物防治。Cao 等^[29]分析了对尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 和青枯菌 (*Ralstonia solanacearum*) 有拮抗作用的两株 *B.*

velezensis 的抗菌代谢产物,共鉴定到3种脂肽化合物(Surfactin、Iturin 和 Fengycin),其中 Iturin 在防御病原真菌方面起主要作用。*B. velezensis* IP22 菌株能够显著减轻野油菜黄单胞菌辣椒斑点病致病变种(*X. campestris* pv. *vesicatoria*) 侵染造成的辣椒细菌性斑点病,利用高效液相色谱质谱技术可检测到该菌株抗菌代谢产物中的 Fengycin 和 Locillomycin 家族^[30]。Wu 等^[31]报道 *B. velezensis* FZB42 中的 Difficidin 和 Bacilysin 对水稻黄单胞菌具有拮抗活性。本研究利用特异性引物 PCR 扩增 *B. velezensis* BR-01 菌株的基因组 DNA,并使用 LC-MS 技术初步将 *B. velezensis* BR-01 菌株抗菌肽成分鉴定为 Bacilysin、Surfactin、Iturin 和 Fengycin。其中 Surfactin 和 Bacilysin 被认为具有抗细菌的功能^[32,33],可能对水稻细菌性条斑病菌具有拮抗活性。

抗菌肽在农业病虫害防控领域具有广阔的应用前景,利用微生物生产抗菌肽是一个现实可行的选择。但是微生物生产抗菌肽是一个复杂的发酵过程,只有合适的发酵环境,才能让目标菌株的生产性能得到充分的释放^[34]。本研究以 *B. velezensis* BR-01 菌株无菌滤液对 *Xoc* 的抑菌圈直径为因变量,通过提高发酵滤液的抑菌活性来间接提高抗菌肽的浓度。在碳源筛选试验中 *B. velezensis* BR-01 菌株对麦芽糖、葡萄糖等速效碳源利用率较高,而对淀粉、玉米粉等迟效碳源利用率较低,这与黎燕珊等^[16]研究结果相近,但与赵晓燕等^[35]研究发现菌株 *B. amyloliquefaciens* XLA03 的最佳碳源为玉米淀粉不同。在氮源筛选试验中 *B. velezensis* BR-01 菌株几乎不能利用无机氮源尿素,在有机氮源范围内更偏好酵母提取物、蛋白胨等速效氮源,对迟效氮源花生饼粉利用效率较差,这与张晓勇等^[36]的研究结果相近。肖靛等^[37]研究报道菌株 *B. subtilis* P5 添加 CaCl_2 时对辣椒炭疽病抑菌活性最强;张冬冬等^[38]研究表明 MnSO_4 、 CaCl_2 对菌株 *B. malacitensis* Z-5 的生长有显著的促进作用;侯美如等^[39]发现菌株 *B. amyloliquefaciens* SSSYB 以 CaCO_3 为无机盐时产纤维素酶发酵中药材黄芪的能力最强;张志焱等^[40]报道添加 KH_2PO_4 后菌株 *B. subtilis* BL0006 的抗菌肽杀菌价效最高。本研究中只有 KH_2PO_4 对 *B. velezensis* BR-01 菌株发酵滤液的抑菌活性有一定的促进作用,但效果不显著,可能是因为培养基中的酵母提取物和 NaCl 已经满足 *B. velezensis* BR-01 菌株发酵产抗菌肽对无机盐的营养代谢需求。在发酵

条件优化方面,发现 *B. velezensis* BR-01 菌株最适 pH 值为 7,其中性偏弱碱性环境下抑菌活性较高,与张晓勇等^[36]的研究结果相近,但与 Ye 等^[41]研究发现菌株 *B. amyloliquefaciens* S1 适合在偏弱酸性或中性环境下生长不同。*B. velezensis* BR-01 菌株在 32.3 °C 条件下培养 48 h 后其抑菌活性最强,其中发酵时间与郭艳霞等^[19]的研究结果相近,发酵温度与黎燕珊等^[16]的研究结果相近。

为提高 *B. velezensis* BR-01 菌株产抗菌肽的能力,增加其对水稻细菌性条斑病的生防价值,本研究在单因素试验的基础上,对培养基成分与培养条件设计了多因素的组合试验。微生物发酵因素优化的常规方法是正交试验设计,正交试验设计能够同时兼顾多因素对发酵结果的影响,寻求各因素最佳水平的组合。但正交试验设计无法构建微生物发酵响应值的回归方程,从而无法通过数学模型获得最优解^[42,43]。本研究利用响应面分析法优化 *B. velezensis* BR-01 菌株产抗菌肽培养基和发酵条件,与正交试验设计相比,响应面分析法试验次数少,试验精度高,能够综合考虑多因素间的交互作用并构建回归方程,是近年来微生物发酵参数优化和工艺考察的首选^[44-46]。

结合文献分析和本研究结果,发现不同来源的贝莱斯芽孢杆菌菌株在不同的培养条件下产生的抗菌肽的成分与含量存在一定差异,这种差异是贝莱斯芽孢杆菌菌株间拮抗能力、拮抗谱多样性的基础。*B. velezensis* BR-01 菌株的分离与研究为水稻细菌性条斑病的生物防治提供了新的微生物资源与理论基础。

4 结论

B. velezensis BR-01 菌株高产抗菌肽培养基配方为麦芽糖 11.89 g/L、酵母提取物 13.54 g/L、NaCl 5 g/L、 KH_2PO_4 1 g/L。最适发酵条件为初始 pH 值 7、发酵时间 48 h、发酵温度 32.3 °C。抗菌肽主要成分初步鉴定为 Bacilysin、Surfactin、Iturin 和 Fengycin。该方案可用于快速、批量发酵制备 *B. velezensis* BR-01 菌株生防菌液。本研究结果为该菌株抗菌肽的分离纯化、结构鉴定及田间生防利用等后续研究提供了理论基础。

参考文献

- [1] 汪文霞. 经济新常态下粮食安全问题思考[J]. 粮食科技与经济, 2020, 45(6): 36-37.
- [2] 张荣胜, 陈志谊, 刘永锋. 水稻细菌性条斑病研究进展

- [J]. 江苏农业学报, 2014, 30(4): 901-908.
- [3] 张荣胜, 戴秀华, 王晓宇, 等. 江苏省水稻品种对水稻细菌性条斑病抗性鉴定及评价[J]. 植物保护学报, 2014, 41(4): 385-389.
- [4] RAHMAN S F S A, SINGH E, PIETERSE C M J, et al. Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens [J]. *Plant Science*, 2018, 267: 102-111.
- [5] 李生樟, 陈颖, 杨瑞环, 等. 一株拮抗黄单胞菌的贝莱斯芽孢杆菌的分离和鉴定[J]. 微生物学报, 2019, 59(10): 1969-1983.
- [6] 刘磊, 梁昌聪, 曾迪, 等. 芽孢杆菌次生代谢产物及其在土传病害防控中的应用研究进展[J]. 热带作物学报, 2017, 38(4): 775-782.
- [7] 张荣胜, 王晓宇, 罗楚平, 等. 解淀粉芽孢杆菌 Lx-11 产脂肽类物质鉴定及表面活性素对水稻细菌性条斑病的防治作用[J]. 中国农业科学, 2013, 46(10): 2014-2021.
- [8] 黄梦桑, 杨瑞环, 阎依超, 等. 一株具有防治水稻条斑病潜力的高地芽孢杆菌 181-7 [J]. 植物病理学报, 2021, 51(6): 962-974.
- [9] 杨可, 司文, 林海, 等. 利用响应面分析法优化贝莱斯芽孢杆菌 TCS001 的发酵条件[J]. 农药学报, 2019, 21(4): 444-452.
- [10] 徐淑琴, 贺曦, 龚紫凤, 等. 贝莱斯芽孢杆菌的生物学特性及其农业应用现状[J]. 饲料研究, 2022, 45(9): 143-147.
- [11] 杨冰, 杜春梅. 贝莱斯芽孢杆菌次生抗生物质的研究进展[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(2): 502-512.
- [12] 蔡高磊, 张凡, 欧阳友香, 等. 贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) 研究进展[J]. 北方园艺, 2018(12): 162-167.
- [13] 石慧敏, 叶建仁, 王焱, 等. 响应面优化 *Bacillus velezensis* YH-18 产芽孢培养基和培养条件[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2023, 47(1): 209-218.
- [14] 张晓云, 郭庆港, 王培培, 等. 不同碳氮源对枯草芽孢杆菌 BAB-1 产抗菌脂肽的影响[J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(2): 251-258.
- [15] 乔俊卿, 刘卮洲, 张荣胜, 等. 枯草芽孢杆菌 T-500 产脂肽类抗生素的摇瓶发酵工艺优化[J]. 南京农业大学学报, 2018, 41(3): 447-455.
- [16] 黎燕珊, 崔文艳, 张陈芳, 等. 抗金银花白粉病菌贝莱斯芽孢杆菌 HC-8 菌株培养基及发酵条件优化[J]. 南方农业学报, 2021, 52(8): 2148-2157.
- [17] 吴志美, 兰明先, 高熹, 等. 除草活性成团泛菌 ZLSY20 菌株发酵条件的优化[J]. 南方农业学报, 2019, 50(9): 1990-1997.
- [18] 杨可. 贝莱斯芽孢杆菌 TCS001 发酵条件优化及其生防作用研究[D]. 杭州: 浙江农林科技大学, 2019.
- [19] 郭艳霞, 贾丽艳, 畅盼盼, 等. 响应面法优化贝莱斯芽孢杆菌 YB19 产中性蛋白酶发酵条件[J]. 中国调味品, 2021, 46(4): 16-20, 37.
- [20] 吴建飞, 张金龙, 田迪, 等. 抗水稻细菌性条斑病芽孢杆菌菌株的选育[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(16): 3-8.
- [21] MORA I, CABREFIGA J, MONTESINOS E. Antimicrobial peptide genes in *Bacillus* strains from plant environments [J]. *International Microbiology*, 2011, 14(4): 213-223.
- [22] YANG L R, QUAN X, XUE B G, et al. Isolation and identification of *Bacillus subtilis* strain YB-05 and its antifungal substances showing antagonism against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* [J]. *Biological Control*, 2015, 85: 52-58.
- [23] SAJITHA K L, DEV S A. Quantification of antifungal lipopeptide gene expression levels in *Bacillus subtilis* B1 during antagonism against sapstain fungus on rubberwood [J]. *Biological Control*, 2016, 96: 78-85.
- [24] PLAZA G, CHOJNIAK J, RUDNICKA K, et al. Detection of biosurfactants in *Bacillus* species: genes and products identification [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2015, 119(4): 1023-1034.
- [25] XU B H, YE Z W, ZHENG Q W, et al. Isolation and characterization of cyclic lipopeptides with broad-spectrum antimicrobial activity from *Bacillus siamensis* JFL15 [J]. *3 Biotech*, 2018, 8(10): 444.
- [26] 夏京津, 陈建武, 宋烽, 等. 解淀粉芽孢杆菌 HE 活性成分鉴定及抗菌特性分析[J]. 南方水产科学, 2019, 15(3): 41-49.
- [27] 周维, 田丹丹, 杨扬, 等. 解淀粉芽孢杆菌 G9R-3 脂肽类化合物抑制香蕉枯萎病菌机理及防效评价[J]. 西南农业学报, 2019, 32(8): 1810-1816.
- [28] HASAN N, FARZAND A, HENG Z, et al. Antagonistic potential of novel endophytic *Bacillus* strains and mediation of plant defense against *Verticillium* wilt in upland cotton [J]. *Plants*, 2020, 9(11): 1438. DOI: 10.3390/plants9111438.
- [29] CAO Y, PI H L, CHANDRANGSU P, et al. Antagonism of two plant-growth promoting *Bacillus velezensis* isolates against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum* [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 4360. DOI: 10.1038/s41598-018-22782-z.
- [30] PAJČIN I, VLAJKOV V, FROHME M, et al. Pepper bacterial spot control by *Bacillus velezensis*: bioprocess solution [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(10): 1463. DOI: 10.3390/microorganisms8101463.
- [31] WU L M, WU H J, CHEN L N, et al. Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have

- antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 12975. DOI: 10.1038/srep12975.
- [32] 邓建良, 刘红彦, 王鹏涛, 等. 生防芽孢杆菌脂肽抗生素研究进展[J]. 植物保护, 2010, 36(3): 20-25.
- [33] 吴黎明, 李曦, 伍辉军, 等. 芽孢杆菌抗菌二肽溶杆菌素的研究进展[J]. 南京农业大学学报, 2018, 41(5): 778-783.
- [34] 曲远航, 郭庆港, 李社增, 等. 生防枯草芽孢杆菌 HMB 19198 发酵培养基的筛选及优化[J]. 农药学报, 2022, 24(3): 509-519.
- [35] 赵晓燕, 杨欢, 陈建刚, 等. 一株烟草青枯病生防菌的筛选鉴定及其发酵优化[J]. 湖北农业科学, 2014, 53(8): 1810-1814.
- [36] 张晓勇, 李树江, 严凯, 等. 杧果采后炭疽病生防菌株筛选及其培养特性研究[J]. 园艺学报, 2021, 48(11): 2171-2184.
- [37] 肖靓, 田建, 易有金, 等. 辣椒炭疽病菌拮抗内生菌培养条件优化[J]. 食品科技, 2017, 42(10): 21-26.
- [38] 张冬冬, 姜军坡, 朱宝成. 棉花黄萎病生防芽孢杆菌 Z-5 菌株发酵培养基的优化[J]. 棉花学报, 2014, 26(1): 10-17.
- [39] 侯美如, 刘宇, 王岩, 等. 解淀粉芽孢杆菌固态发酵黄芪中有效成分的变化[J]. 中国兽医杂志, 2017, 53(5): 64-68.
- [40] 张志焱, 赵倩, 于佳民, 等. 一株枯草芽孢杆菌产抗菌肽培养基筛选及发酵工艺优化的研究[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(4): 1217-1226.
- [41] YE M, SUN L H, YANG R, et al. The optimization of fermentation conditions for producing cellulase of *Bacillus amyloliquefaciens* and its application to goose feed [J]. Royal Society Open Science, 2017, 4(10): 171012. DOI: 10.1098/rsos.171012.
- [42] 杨秀荣, 王雪莲, 王敏, 等. 利用响应面分析方法优化生防细菌 B579 增殖培养基[J]. 微生物学杂志, 2010, 30(3): 35-39.
- [43] 李姝江, 王淋敏, 谯天敏, 等. 利用响应面法优化贝莱斯芽孢杆菌 ZJ20 发酵参数[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2019, 47(2): 88-96.
- [44] 周国庆, 谭玉梅, 王亚萍, 等. 响应面法优化“金花”菌培养基配方[J]. 山地农业生物学报, 2018, 37(2): 27-32.
- [45] SHAKIR H A, MAHMOOD R, IRFAN M, et al. Protease production from *Bacillus safensis* in submerged fermentation using response surface methodology [J]. Revista Mexicana de Ingenieria Quimica, 2019, 18(1): 375-385.
- [46] HE Y H, XU J P, WANG S J, et al. Optimization of medium components for production of chitin deacetylase by *Bacillus amyloliquefaciens* Z7, using response surface methodology [J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2014, 28(2): 242-247.

Optimization of High-yield Antimicrobial Peptide Culture Medium of *Bacillus velezensis* BR-01 and Identification of Its Antimicrobial Peptide

ZHOU Jianping^{1,2}, XIE Yunqiao¹, LIAO Yuhong¹, LI Xinyang¹, LI Yiming^{1,2}, LI Shuping², MA Xiuguo¹, LEI Shimin¹, LIN Fei³, JIANG Wei^{2**}, HE Yongqiang^{1,2**}

(1. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China; 2. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources (Guangxi University), College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China; 3. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources (South China Agricultural University), College of Plant Protection, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong, 510642, China)

Abstract: *Bacillus velezensis* BR-01 strain has a good antagonistic effect on *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*). In order to improve the antimicrobial peptide fermentation yield and biocontrol value of the strain,

the medium for producing antimicrobial peptides was optimized, and the components of antimicrobial peptides were preliminarily identified. The diameter of the inhibition zone of *B. velezensis* BR-01 sterile fermentation filtrate against *Xoc* was used as the evaluation index, and the optimal medium was selected from 7 common media. The content of each component of the initial medium and the fermentation conditions were optimized by single factor test. Plackett Burman (PB) test was used to screen out the significant factors affecting the antibacterial activity of the fermentation filtrate, and the optimal fermentation conditions were obtained by response surface analysis. The genes related to antimicrobial peptide synthesis in *B. velezensis* BR-01 genome were analyzed by PCR. Liquid Chromatography-Mass Spectrometer (LC-MS) was used to identify the antimicrobial peptides. The results showed that the optimal antimicrobial peptide medium and fermentation conditions of *B. velezensis* BR-01 strain were as follows: maltose 11.89 g/L, yeast extract 13.54 g/L, NaCl 5 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, initial pH value is 7, fermentation time 48 h, and fermentation temperature 32.3 °C. Under this optimization scheme, the inhibition zone diameter of the sterile fermentation filtrate of *B. velezensis* BR-01 strain against *Xoc* was (42.5 ± 0.2) mm, which was significantly higher than that before optimization (28.0 ± 0.9) mm, which was 51.79% higher than that before optimization. The main components of the antimicrobial peptide were preliminarily identified as Bacilysin, Surfactin, Iturin and Fengycin. This study provides a theoretical basis for the rapid and batch fermentation of *B. velezensis* BR-01 strain for the preparation of biocontrol bacterial liquid, and provides a theoretical basis for the subsequent research on the separation and purification, structural identification and field biocontrol utilization of its antimicrobial peptides.

Key words: *Bacillus velezensis*; *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*; antimicrobial peptide; fermentation conditions; response surface methodology

责任编辑:梁 晓



微信公众号投稿更便捷

联系电话:0771-2503923

邮箱:gxxk@gxas.cn

投稿系统网址:<http://gxxk.ijournal.cn/gxxk/ch>