

解淀粉芽孢杆菌发酵液的抑菌活性及抗氧化作用

王小娟¹, 任 莉², 张铃玉¹, 李洁明², 周 波³, 王惠民^{1,4}, 苏文金¹, 吴达仁¹

(1. 集美大学海洋食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 中国农业大学资源与环境学院, 北京 100193;
3. 山东农业大学生命科学学院, 山东 泰安 271018; 4. 台湾中兴大学生物医学研究所, 台湾 台中 402)

[摘要] 以尖孢镰刀菌黄瓜专化型病原菌为指示菌, 利用平板对峙法、牛津杯法等方法, 探究解淀粉芽孢杆菌 SJ100001 对尖孢镰刀菌的拮抗作用、SJ100001 菌株抑菌活性成分的来源、SJ100001 菌株发酵液的最佳发酵条件及其理化稳定性; 通过 DPPH 自由基清除能力和还原力的测定, 探究 SJ100001 菌株发酵液的抗氧化活性。结果表明, SJ100001 菌株对尖孢镰刀菌具有高效的抑制作用, 抑制率可达 62.80%, 其中 SJ100001 菌株发酵液抑菌率达到了 38.11%, 而菌体胞内可溶物的抑菌率仅 0.61%, 说明抑菌活性成分主要来源于菌株的次级代谢产物。利用马铃薯葡萄糖液体培养基发现, 在 180 r/min 摇床中, 37 ℃、恒温培养 72 h 为解淀粉芽孢杆菌 SJ100001 最佳的发酵条件, 发酵液对尖孢镰刀菌作用 48 h 时达到最佳抑菌效果, 抑菌率为 54.65%。稳定试验表明, 发酵液在 pH=2~11 时, 抑菌率保持在 50% 以上, 有较好稳定性, 在 pH=12~13 时, 抑菌率为 0.41%, 耐强碱性较弱; 发酵液经 121 ℃ 处理 60 min 或经不同蛋白酶处理后, 抑菌率依旧在 44% 以上, 且发酵液经连续紫外照射 24 h 后, 抑菌率在 30% 以上, 与对照组相比, 抑制率没有显著下降, 说明发酵液具有较强的理化稳定性。此外, SJ100001 菌株的发酵液的 DPPH 自由基清除率 $IC_{50} = (0.065 \pm 0.05) \text{ g/L}$, 并且具有较好的还原力。

[关键词] 解淀粉芽孢杆菌; 尖孢镰刀菌; 抑菌活性; 抗氧化活性

[中图分类号] Q 819

Study on the Antibacterial and Antioxidant Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* Fermentation Broth

WANG Xiaojuan¹, REN Li², ZHANG Lingyu¹, LI Jieming², ZHOU Bo³,
WANG Huimin^{1,4}, SU Wenjin¹, WU Daren¹

(1. College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. College of Resources and Environmental Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

3. College of Life Science, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China;

4. Graduate Institute of Biomedical Engineering, Chung Hsing University, Taichung 402, China)

Abstract: Plate confrontation and Oxford cup method were employed to investigate quantitatively the antibacterial activity against the indicator pathogens and optimize fermentation conditions. The antioxidant activity of fermentation broth of SJ100001 strain was determined by DPPH radical scavenging assay and reducing power assay. The inhibitory rate of the fermentation broth and intracellular soluble substance of SJ100001 strain to the indicator pathogen *Fusarium oxysporium* reached 62.80% and 38.11%, respectively, while that of the intracellular soluble substance was only 0.61%, indicating that the antibacterial active components were mainly de-

[收稿日期] 2021-04-06

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2018YFD0500202); 山东省农业重大应用技术创新项目(SD2019ZZ009)

[作者简介] 王小娟(1996—), 女, 硕士生, 从事食品科学方向研究。通信作者: 吴达仁(1990—), 男, 副教授, 博士, 从事分子营养学研究。E-mail: darrenwu20@163.com

rived from the secondary metabolites of the strain. The optimal fermentation condition of *B. amyloliquefaciens* SJ100001 was cultured in 180 r/min shaking table at 37 °C for 72 h. The best inhibitory effect was achieved when the fermentation liquid was applied to *F. oxysporum* for 48 h, and the inhibitory rate was 54.65%. Stable tests showed that the inhibition rate of fermentation broth at pH = 2-11 remained above 50%, while the inhibition rate at pH = 12-13 was 0.41%; the inhibition rate was still above 44% after the fermentation liquid was treated at 121 °C for 60 min or with different proteases, and the inhibition rate was above 30% after the fermentation liquid was irradiated by continuous UV irradiation for 24 h. Compared with the control group, the inhibition rate was not significantly decreased, indicating that the fermentation liquid had strong physical and chemical stability. Furthermore, the fermentation broth of stain SJ100001 exhibited strong antioxidant activity by DPPH scavenging ($IC_{50} = 0.065 \pm 0.05$ g/L) and reduction ability.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens*; *Fusarium oxysporum*; antibacterial activity; antioxidant activity

0 引言

黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 在世界各地都有种植^[1]。除碳水化合物和膳食纤维外, 黄瓜中还含有丰富的维生素和矿物质, 具有清热解毒、健脑安神等功效^[2]。近年来, 黄瓜的种植面积以及集约化种植规模不断扩大, 而常年的黄瓜连作种植也导致了土传枯萎病害的泛滥^[3]。黄瓜枯萎病是由尖孢镰刀菌黄瓜专化型病原真菌引起的一种危害性极强的世界性土传病害^[4], 黄瓜的整个生长期都有可能感染尖孢镰刀菌。由于尖孢镰刀菌的生命力极强, 可存活于土壤长达 10 a 以上, 并随着作物种植时间的增长不断累积, 这也导致黄瓜枯萎病成为黄瓜种植过程中难以防治的病害之一。有研究表明, 当黄瓜枯萎病严重时, 黄瓜减产率高达 50% 以上甚至绝产, 更严重时, 就会导致致病土壤不适宜黄瓜栽种^[3], 给世界各国的农业生产造成了重大的经济损失^[5]。

目前, 黄瓜枯萎病的防治手段主要为化学防治、物理防治和生物防治等^[6]。这些防治方法对黄瓜枯萎病都具有一定的防治效果, 但是每种方法各有优劣。使用化学农药是防治黄瓜枯萎病最常见的方法, 且在一定程度上能够快速抑制黄瓜枯萎病, 但其长期施用会导致环境污染, 危害人体及牲畜健康^[7], 也会导致病原菌耐药性增强, 防治效果差^[8]。物理防治主要从栽培期间的管理、土壤的杀菌^[9]及酸碱处理^[10]入手。化学和物理的方法防治效果比较显著, 但要及时对植物的根部进行保护, 对种植土壤的酸碱性、透气性进行调节, 否则极易受品种、天气、土壤以及操作技术等因素的影响而导致该方法无法进行大规模地推广。近年来, 人们日益追求蔬菜的品质和食用安全性, 绿色、安全、环境友好型的防治方法应运而生。生物防治由于具有无污染、病原菌不易产生抗药性的特点, 日益成为国内外研究者的研究热点。生物防治可通过拮抗微生物自身或其次级代谢产物对病原菌产生抑制作用, 削弱病原菌的致病力来达到防治的目的^[11]。目前, 研究天然高效的生物类抗菌物质来防治黄瓜枯萎病已成为食品领域的研究热点之一。

解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 具有广谱抗菌的特性, 能产生多种具有抑菌作用的次级代谢产物, 是研究较多的一类生防细菌^[12]。已有研究表明, 解淀粉芽孢杆菌的次级代谢产物多为脂肽、多肽、聚酮类和抗菌蛋白质等活性物质, 在防治植物病害中起着至关重要的作用, 如番茄青枯病^[13]、玉米耐盐性^[14]、西瓜枯萎病^[15]、黄瓜枯萎病^[16]、黄瓜灰霉病^[17]等。此外, 解淀粉芽孢杆菌还能提高植物本身对非生物胁迫的耐受性, 如高浓度盐的威胁^[14,18]。在种植业中, 解淀粉芽孢杆菌产生的抑菌物质可以作为蔬菜水果的绿色保鲜剂, 能够有效地抑制霉菌^[19]。在养殖业中, 解淀粉芽孢杆菌可作为饲料添加剂, 在动物体内调节并保持肠道内的有益菌群的平衡与稳定, 从而改善动物的肠道健康^[20], 帮助动物消化吸收, 提高饲料养分的利用率。此外, 解淀粉芽孢杆菌在净化水源、防治水体富营养化等方面也发挥着积极的作用^[19]。

本文以解淀粉芽孢杆菌为实验对象, 探究其对尖孢镰刀菌黄瓜专化型病原真菌的拮抗作用, 并对解淀

粉芽孢杆菌发酵液的最佳发酵条件、理化稳定性进行评价,为后续开发生防菌剂提供理论依据。此外,本实验还探究了解淀粉芽孢杆菌发酵液的抗氧化活性,以期进一步拓宽解淀粉芽孢杆菌发酵液的应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 供试菌株

生防菌解淀粉芽孢杆菌 SJ100001、病原菌尖孢镰刀菌 SJ300024 均由山东农业大学资源与环境微生物实验室提供。

1.1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂 (potato dextrose agar, PDA) 培养基,海博生物有限公司;马铃薯葡萄糖液体 (potato dextrose broth, PDB) 培养基:马铃薯浸出粉 6.0 g,葡萄糖 20.0 g, $\text{pH}=7.0\pm0.2$; LB 培养基:蛋白胨 10 g,酵母粉 5 g,氯化钠 10 g, $\text{pH}=7.0\pm0.2$; NA 培养基:蛋白胨 10 g,牛肉浸膏 3.0 g,氯化钠 5.0 g, $\text{pH}=7.3\pm0.1$ 。

1.1.3 主要试剂

溶菌酶 (Lysozyme),北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;氢氧化钠、盐酸,西陇化工股份有限公司;胰蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、酸性蛋白酶,上海麦克林生化科技有限公司; DPPH, Sigma Aldrich; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

SW-CJ-1FD 型超净工作台,苏州净化设备有限公司; ZQZY-AF8 型恒温振荡培养箱,上海知楚仪器有限公司; Synergy H1MF 型多功能酶标仪, BioTek 公司; KT-30L 型高压蒸汽灭菌锅,日本 ALP 仪器生产厂家; 5810R 型高速冷冻离心机,德国艾本德股份有限公司; DK-8D 型恒温水浴锅,金坛区金城海澜仪器制造厂; DENVER UB-7 型 pH 计,北京赛多丽丝科学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 解淀粉芽孢杆菌 SJ100001 对尖孢镰刀菌抑菌活性的测定

1.3.1.1 菌种活化

1) 病原真菌活化。挑取真菌菌苔,接种到 PDA 固体培养基中心, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 5 d。

2) 生防细菌活化。挑取解淀粉芽孢杆菌 SJ100001,三区划线法于 LB 固体培养基划线活化, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。

1.3.1.2 抑菌活性的测定

采用平板对峙法测定抑菌活性,具体过程为:取尖孢镰刀菌菌块 (直径为 0.7 cm) 接种于 PDA 培养皿 (直径为 9.0 cm) 中心,在菌块两侧 1.5 cm 处接种解淀粉芽孢杆菌。以尖孢镰刀菌为对照, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养,连续观察菌落的生长和生防菌对尖孢镰刀菌的抑制情况。待对照菌株菌丝长满培养皿时测量处理尖孢镰刀菌菌落直径,计算抑菌率^[21-22],抑菌率计算公式为:

$$\text{抑菌率}/\% = ((\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径})/(\text{对照菌落直径} - 0.7)) \times 100. \quad (1)$$

1.3.2 解淀粉芽孢杆菌 SJ100001 抑菌成分来源的测定

1.3.2.1 发酵液的制备

将活化的生防菌挑取 1 个单菌落接种于 50 mL LB 培养基中,置于恒温振荡培养箱 ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min) 发酵 12 h,制得发酵种子液。取 1 mL 种子液接种于 250 mL 的 LB 培养基中,置于恒温培养箱 ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min) 培养 48 h, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 下离心 10 min 去除菌体沉淀,用 0.22 μm 滤膜过滤,获得无菌滤液备用^[23]。

1.3.2.2 菌体胞内可溶物溶液的制备

收集 1.3.2.1 的菌体沉淀,加入适量生理盐水重悬, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 下离心 10 min,重复洗涤

2~3次, 收集菌体。使用25 mL生理盐水将菌体重悬, 得到菌体悬液, 向菌体悬液中加入500 μ L溶菌酶(100 mg/L), 于37 $^{\circ}$ C水浴1 h。然后超声破碎1 h, 90 $^{\circ}$ C加热处理10 min, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min下离心15 min, 收集上清液, 获得菌体胞内可溶物溶液备用^[24]。

1.3.2.3 发酵液和菌体胞内可溶物溶液抑菌活性的测定

参考牛津杯法^[25], 并稍作修改。在PDA(直径为9.0 cm)培养皿中心接种尖孢镰刀菌菌块(直径为0.7 cm), 在菌块两侧1.5 cm处放置牛津杯, 在牛津杯中缓慢加入200 μ L的发酵液或菌体胞内可溶物溶液, 以无菌水为对照^[26], 28 $^{\circ}$ C恒温培养, 观察菌落的生长情况。培养72 h后观察发酵液或菌体胞内可溶物溶液对尖孢镰刀菌的抑制效果, 计算抑菌率, 从而确定活性物质的来源。抑菌率计算参照式(1)。

1.3.3 解淀粉芽孢杆菌 SJ100001 发酵条件的优化

1.3.3.1 发酵培养基对发酵液抑菌活性的影响

分别以5%接种量接种种子液于LB、NA和PDB培养基中, 恒温振荡(37 $^{\circ}$ C、180 r/min)培养48 h, 得到LB、NA与PDB的发酵液。分别离心(4 $^{\circ}$ C、12000 r/min)15 min, 去除菌体沉淀, 用0.22 μ m滤膜过滤, 获得无菌滤液。测定不同培养基发酵液的抑菌活性, 计算抑菌率, 抑菌率计算参照式(1)。

1.3.3.2 发酵时间对发酵液抑菌活性的影响

以1%接种量接种种子液于PDB培养基中, 置于恒温培养箱(37 $^{\circ}$ C、180 r/min), 分别培养0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 d, 获得各个时间段的发酵液, 并测定抑菌活性, 计算抑制率, 抑菌率计算参照式(1)。

1.3.3.3 发酵液最佳抑菌时间的测定

采用皿内涂布法^[27]测定抑菌活性, 具体过程为: PDA培养皿内加入200 μ L无菌发酵液并快速涂干, 在培养皿的中心放置尖孢镰刀菌块(直径为0.7 cm), 以无菌水为对照组^[28], 置于28 $^{\circ}$ C恒温培养箱培养, 每隔24 h观察测量菌落直径, 用十字交叉法测量记录菌落的直径变化。待对照菌株菌丝长满培养皿时停止观察, 计算抑菌率, 抑菌率计算参照式(1)。

1.3.4 解淀粉芽孢杆菌 SJ100001 发酵液抑菌活性稳定性

1.3.4.1 pH 值对发酵液抑菌活性的影响

取7组洁净的玻璃试管, 每组分别加入5 mL的发酵液。实验组用0.2 mol/L的HCl和NaOH分别将发酵液调成pH=2~3, 5~6, 8~9, 10~11, 12~13。静置24 h后调回原pH值^[29]。对照组pH=7, 加入无菌水为溶剂组^[28]。参照1.3.1.2的抑菌方法计算抑制率, 抑菌率计算参照式(1)。

1.3.4.2 温度对发酵液抑菌活性的影响

取7组洁净的玻璃试管, 每组分别加入5 mL的发酵液。实验组分别置于恒温水浴锅或高温高压灭菌锅保持40, 60, 80, 100, 121 $^{\circ}$ C恒温处理30, 60 min。对照组放置室温(25 $^{\circ}$ C), 加入无菌水为溶剂组。参照1.3.1.2的抑菌方法计算抑制率, 抑菌率计算参照式(1)。

1.3.4.3 蛋白酶对发酵液抑菌活性的影响

取7组洁净的玻璃试管, 每组分别加入5 mL的发酵液。实验组分别加入中性蛋白酶(50 U/mg)、碱性蛋白酶(200 U/mg)、酸性蛋白酶(100 U/mg)、胰蛋白酶(250 U/mg)、胃蛋白酶(3000 U/mg)、木瓜蛋白酶(200 U/mg), 且使酶的终质量浓度为1 g/L。把各个反应混合液调到其酶最适的pH值与温度, 酶解4 h。处理完毕后, 将每组置于沸水浴中灭活处理10 min。不加入任何蛋白酶为对照组, 加入无菌水为溶剂组。参考1.3.2.3的牛津杯法对峙实验计算抑制率, 抑菌率计算参照式(1)。

1.3.4.4 紫外照射对发酵液抑菌活性的影响

在洁净的石英管中加入5 mL的发酵液, 将其置于功率为15 W的紫外灯下分别照射1, 2, 3, 4, 24 h。以不做任何处理的发酵液为对照^[30], 加入无菌水为溶剂组。参照1.3.1.2的抑菌方法计算抑制

2.2 解淀粉芽孢杆菌 SJ100001 抑菌成分的来源

为进一步探究抑菌活性物质的真正来源, 采用牛津杯法检测 SJ100001 菌体的发酵液和菌株悬液的抑菌活性, 结果如图 2、表 2 所示。可见, 与对照组相比, 菌体悬液组无透明抑菌带出现, 尖孢镰刀菌圈呈圆形生长, 抑制率仅 0.61%; 实验组能看到尖孢镰刀菌圈产生明显形变, 且抑菌活性达到了 38.11%, 提示发酵液对尖孢镰刀菌有明显的抑菌作用, 且产生抑菌活性的是 SJ100001 菌株的胞外次级代谢产物。

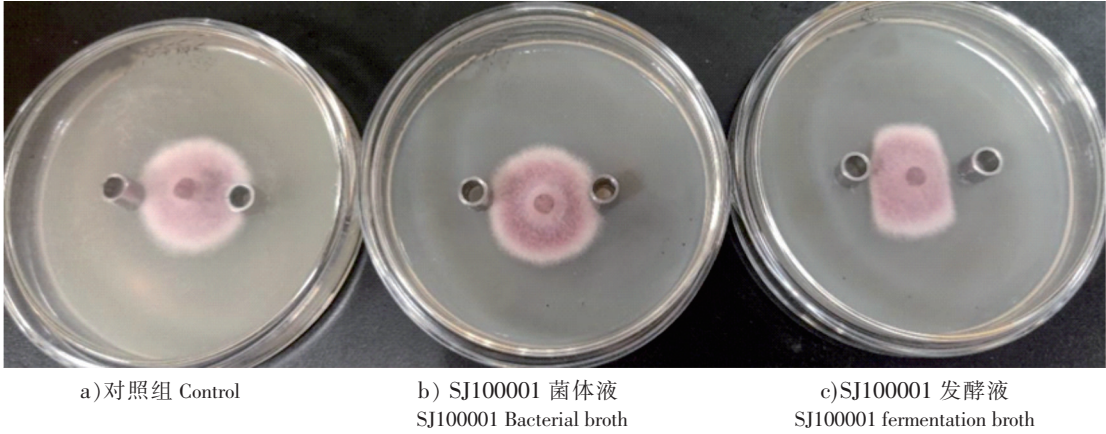


图 2 抑菌活性物质的来源
Fig.2 The sources of antibacterial active substances

表 2 抑菌活性物质的抑菌活性(72 h)
Tab.2 The activity of antibacterial active substances(72 h)

组别 Group	接种直径 Inoculation diameter/cm	菌落直径 Colony diameter/cm	抑制率 Inhibition rate/%
对照组 Control	0.70	3.14 ± 0.01	—
发酵液 Fermentation broth	0.70	2.21 ± 0.01	38.11
菌体液 Bacterial broth	0.70	3.13 ± 0.01	0.61

“—” 表示没有抑菌作用
“—” indicated no bacteriostatic effect

2.3 解淀粉芽孢杆菌 SJ100001 的最佳发酵条件

2.3.1 培养基对发酵液抑菌活性的影响

SJ100001 菌株在不同培养基中生长, 抑菌活性也不同。已有实验表明^[33], 培养基中的碳源、氮源和原始的 pH 值均会对活性物质产生影响。由表 3 可知, 利用 NA、LB、PDB 3 种培养基分别培养 SJ100001 菌株, 其发酵液中均会产生抑制尖孢镰刀菌的活性物质, 但 PDB 培养基中 SJ100001 菌株产生的抑菌物质, 其抑菌率高于其他 2 种培养基的。推测 PDB 培养基培养 SJ100001 菌株可产生更多的抑菌物质, 后期可将其作为发酵培养基, 以富集更多活性物质。

表 3 不同培养基发酵液的抑菌活性(72 h)
Tab.3 Antibacterial activity of fermentation broth with different media(72 h)

培养基 Culture medium	接种直径 Inoculation diameter/cm	菌落直径 Colony diameter/cm	抑制率 Inhibition rate/%
NA	0.70	2.06 ± 0.01	36.00
LB	0.70	2.04 ± 0.02	36.47
PDB	0.70	1.89 ± 0.02	44.94

2.3.2 发酵时间对发酵液抑菌活性的影响

SJ100001 菌株发酵液的抑菌活性随着发酵时间而变化，结果如图 3 所示。由图 3 可见，随着发酵时间的增加，发酵液的抑菌活性先升高后趋于平缓，在第 3 天时发酵液达到最大抑菌活性 59.57%。推测菌株的次级代谢产物在发酵液中随着时间逐渐累积，使发酵液的抑菌活性增强，在发酵 3 d 达到饱和，抑菌活性不再发生变化。

2.3.3 发酵液最佳抑菌时间

如图 4 所示，SJ100001 菌株发酵液在抑菌实验进行到第 2 天时，其抑菌效果最佳，抑制率为 54.65%。随着抑菌实验的进行，发酵液的抑菌效果降低，在第 7 天时其抑制率仅 26.45%。推测 3 ~ 4 d 后尖孢镰刀菌进入指数生长期，导致后期 SJ100001 菌株发酵液的抑菌活性相对降低。

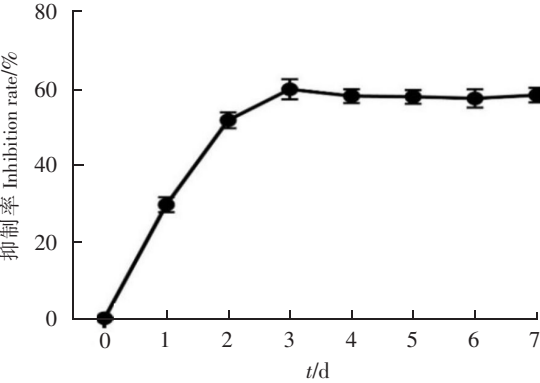


图 3 发酵时间对抑菌活性的影响

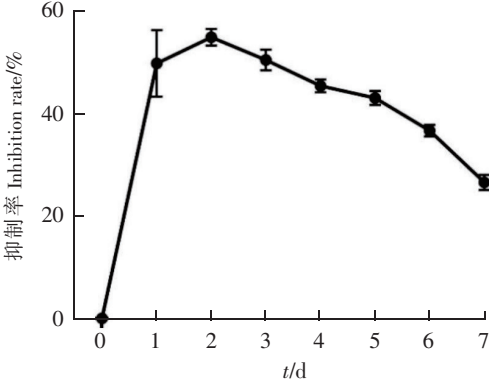


图 4 抑菌时间对抑菌活性的影响

Fig.3 Effect of fermentation time on antibacterial activity Fig.4 Effect of antibacterial time on antibacterial activity

2.4 解淀粉芽孢杆菌 SJ100001 发酵液抑菌活性的稳定性

2.4.1 pH 值对发酵液抑菌活性的影响

如图 5 所示，SJ100001 菌株发酵液经不同的酸碱处理后，抑菌活性与对照组相比有显著差异。在 pH = 2 ~ 11 时，抑菌活性均在 52.00% 以上，相比于对照组显著上升 ($P < 0.05$)；在 pH = 12 ~ 13 时，发酵液的抑菌活性仅 0.41%，与对照组相比显著下降了 49.69% ($P < 0.01$)。表明发酵液中的抑菌活性物质对酸碱具有一定的耐受性，但在强碱的条件下会失活。

2.4.2 温度对发酵液抑菌活性的影响

如图 6 所示，发酵液经 40, 60, 80, 100, 121 °C 分别处理 30 与 60 min 后，依然具有较高的抑菌活性，并且活性保持在 45% 以上，与对照组 (25 °C) 相比没有显著差异 ($P > 0.05$)。经 121 °C 高温高压处理 60 min 的发酵液，抑菌活性略低于对照组，但仍保持在 44% 以上。提示发酵液中的活性物质具有较好的热稳定性。

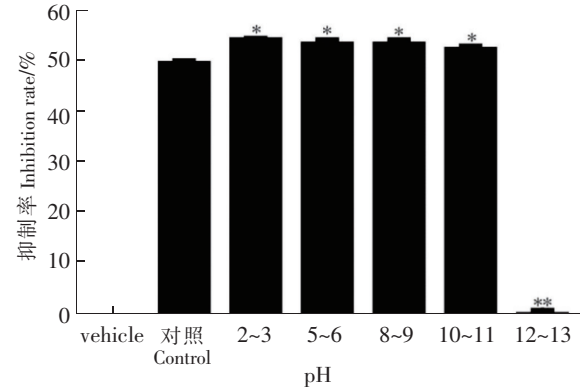


图 5 pH 处理对抑菌活性的影响

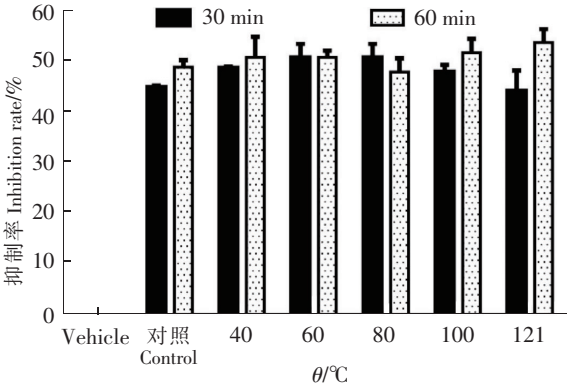


图 6 温度对抑菌活性的影响

Fig.5 Effect of pH treatment on antibacterial activity Fig.6 Effect of temperature on antibacterial activity

2.4.3 紫外照射对发酵液抑菌活性的影响

如图 7 所示, 经过不同时间的紫外线照射, 发酵液的抑菌活性依然保持在 30% 以上, 与未经紫外照射处理的对照组相比没有显著下降 ($P > 0.05$)。此外, 紫外照射 24 h 后, 发酵液抑菌活性依旧没有显著下降。上述结果表明, SJ100001 菌株发酵液的抑菌活性物质具有紫外稳定性。

2.4.4 蛋白酶对发酵液抑菌活性的影响

在不同的蛋白酶酶解处理 4 h 后, SJ100001 菌株发酵液对蛋白酶的稳定性测定结果如图 8 所示。由图 8 可见, 中性蛋白酶、碱性蛋白酶、胃蛋白酶的处理使发酵液的抑菌活性与对照组相比略微降低, 但抑制率均在 51%; 而木瓜蛋白酶、酸性蛋白酶、胰蛋白酶的处理, 相比于对照组的抑菌活性降低至 49% 左右。

不同蛋白酶特异性酶切位点不同, 造成酶解后抑菌活性有差异, 但抑菌活性均保持在 49% 以上, 说明发酵液中的活性成分绝大部分没有被蛋白酶破坏, 依然具有一定的稳定性。可初步推断, SJ100001 菌株产生的具有抑制尖孢镰刀菌的次级代谢产物可能为非蛋白类化合物。

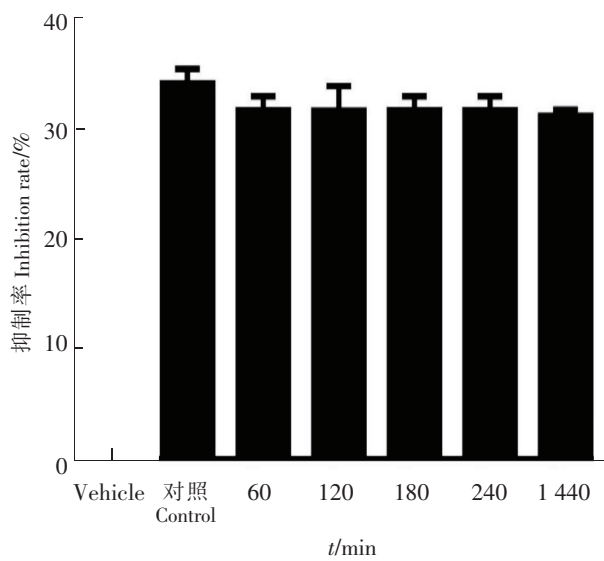


图 7 紫外照射对抑菌活性的影响

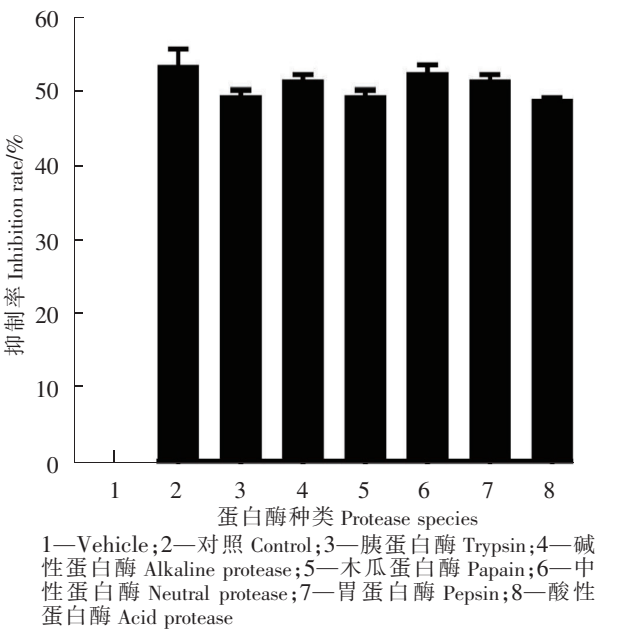


图 8 蛋白酶对抑菌活性的影响

Fig.7 Effect of ultraviolet radiation on antibacterial activity Fig.8 Effect of protease treatment on antibacterial activity

2.5 解淀粉芽孢杆菌 SJ100001 发酵液的抗氧化活性

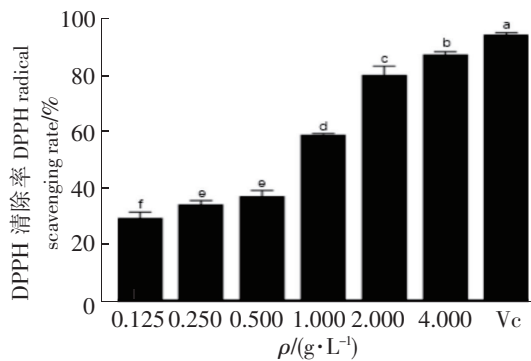
2.5.1 DPPH 自由基清除能力

如图 9 所示, 发酵液的 DPPH 自由基清除能力与浓度呈正相关, 随着浓度的不断提高, 发酵液的 DPPH 自由基清除能力从 29.33% 上升至 87.26%, 其抗氧化能力显著提高 ($P < 0.05$), 表明发酵液具有一定的抗氧化活性。

2.5.2 铁离子还原力测定

抗氧化物质将 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} , Fe^{2+} 与三氯化铁发生络合反应, 形成了蓝色物质, 从而在 700 nm 下有强吸收峰, 即抗氧化能力与吸收峰强度呈正比。

如图 10 所示, 铁离子的还原力随着发酵液浓度的增加而增加 ($P < 0.05$), 再次证明了发酵液具有抗氧化活性。



小写字母表示不同浓度的发酵液之间存在显著差异 ($P<0.05$)
Lowercase letters indicated that there were significant differences between different concentrations of fermentation broth

图 9 发酵液浓度对 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.9 Effect of fermentation broth concentration on DPPH radical scavenging rate

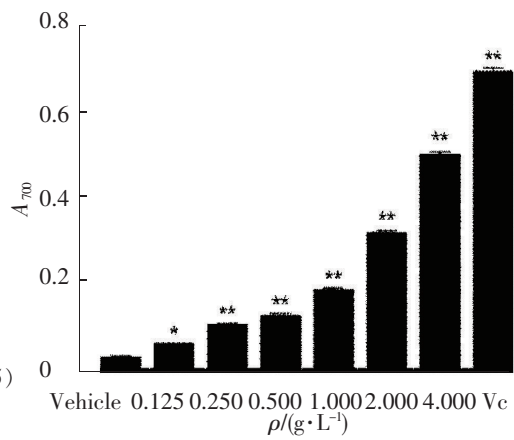


图 10 发酵液浓度对铁离子还原力的影响

Fig.10 Effect of fermentation broth concentration on reduction activity

3 讨论

已有研究结果显示，解淀粉芽孢杆菌的次级代谢产物如抗菌蛋白^[34]、脂肽^[35]、多肽类^[36-37]等均具有抑菌效果^[38-39]。Wong 等^[40]从解淀粉芽孢杆菌中分离得到相对分子质量为 50 ku 的抗菌蛋白，该抗菌蛋白通过增加病原菌细胞膜的通透性而起到抑菌效果。Kaewklom 等^[41]从一株解淀粉芽孢杆菌 SP-1-13LM 中分离得到一种新型的多肽 PPB，该多肽具有广谱抑菌性，可有效抑制包括沙门氏菌在内的多种病原菌的生长。本实验结果表明，解淀粉芽孢杆菌 SJ100001 的次级代谢产物对尖孢镰刀菌黄瓜专化型病原真菌具有拮抗作用。

解淀粉芽孢杆菌发酵液抑菌活性受诸多因素的影响，实验表明，SJ100001 菌株在 PDB 培养基中发酵培养 72 h 时抑菌率最高，且抑菌活性物质在第 2 d 时抑菌率最高，说明 PDB 培养基发酵可获得浓度相对较高的抑菌物质，并且仅需较短的时间就达到较好的抑菌效果，有利于后期分离纯化抑菌物质。该培养方法与解淀粉芽孢杆菌 H15^[42]、解淀粉芽孢杆菌 CQN-2^[43]和解淀粉芽孢杆菌 K6^[44]存在一定的差异，这种差异可能与菌株及其来源有关。

次级代谢产物的稳定性影响其提取与开发。夏京津等^[45]研究表明，解淀粉芽孢杆菌 HE 发酵液中的抑菌活性物质对高温、酸、碱和蛋白酶具有一定的耐受性。刘昆昂等^[46]研究表明，解淀粉芽孢杆菌 BA-KA4 的胞外抑菌活性物质能够有效抑制灰霉病菌生长，且对温度、pH 值和紫外线的稳定性较高。本次实验结果显示，SJ100001 发酵液中的抑菌活性物质同样具有良好的耐酸碱性和热稳定性、紫外线以及蛋白酶稳定性。解淀粉芽孢杆菌 SJ100001 产生的次级代谢产物不仅具有抑菌作用，还具有较好的抗氧化能力。

4 结论

本实验探究解淀粉芽孢杆菌 SJ100001 对尖孢镰刀菌黄瓜专化型病原真菌的抑菌作用，结果表明，解淀粉芽孢杆菌 SJ100001 对尖孢镰刀菌黄瓜专化型病原真菌具有高效的拮抗作用，且抑菌物质是菌株的次级代谢产物。采用平板对峙法和牛津杯法，确定了 SJ100001 菌株最佳抑菌效果的发酵条件，即：37 ℃ 180 r/min 摇床恒温培养 72 h，且通过紫外、温度、酸碱、蛋白酶等稳定性实验和抗氧化活性实验，验证了菌株发酵液具有较好的抑菌稳定性和抗氧化性。

[参 考 文 献]

[1] 田雲, 蒋景龙, 李丽, 等. 不同培养条件对黄瓜发状根生长影响研究 [J]. 分子植物育种, 2017, 15(8): 3231-

3236.

- [2] 吕慧芳,刘四运,王俊良. 黄瓜的保健价值及机理研究进展 [J]. 吉林蔬菜, 2012(3): 57-58.
- [3] 杜宾. 一株黄瓜枯萎病拮抗菌的鉴定及发酵培养基的优化 [J]. 北方园艺, 2017(3): 132-137.
- [4] JABER E H A, SROUR A Y, ZAMBOUNIS A G, et al. Identification of SCAR markers linked to the *Foc* gene governing resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* in cucumber cv. SMR-18 [J]. European Journal of Plant Pathology, 2020, 157(10): 845-855.
- [5] LAN C Z, RUAN H C, YANG X J, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and specific detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* Owen [J]. Phytoparasitica, 2018, 46(9): 283-293.
- [6] SUN L, SONG S, FU L, et al. Exploring a soil fumigation strategy based on ammonium bicarbonate to control *Fusarium* wilts of cucurbits [J]. Crop Protection, 2015, 70:53-60.
- [7] GUDMESTAD N C, ARABIAT S, PASCHE J S. Prevalence and impact of SDHI fungicide resistance in *Alternaria solani* [J]. Plant Disease, 2013, 97(7): 952-960.
- [8] 陈海龙. 黄瓜枯萎病生物防治研究进展 [J]. 现代农业科技, 2014(18): 160.
- [9] 邓锋. 浅谈黄瓜枯萎病的综合防治措施 [J]. 南方农业, 2017, 11(20): 1-2.
- [10] 侯晓峰. 黄瓜枯萎病的发生及综合防治 [J]. 现代农业科技, 2012(9): 180.
- [11] 杨侃侃, 刘晓虹, 陈宸, 等. 黄瓜枯萎病研究进展 [J]. 湖南农业科学, 2019(6): 121-124.
- [12] 柴庆凯, 张斌, 常若葵, 等. 解淀粉芽孢杆菌 LJ02 对黄瓜抗灰霉病菌的生防效果及其诱导抗性机理的初步研究 [J]. 植物病理学报, 2019, 49(6): 828-835.
- [13] TAN S Y, JIANG Y, SONG S, et al. Two *Bacillus amyloliquefaciens* strains isolated using the competitive tomato root enrichment method and their effects on suppressing *Ralstonia solanacearum* and promoting tomato plant growth [J]. Crop Protection, 2013, 43:134-140.
- [14] CHEN L, LIU Y P, WU G W, et al. Induced maize salt tolerance by rhizosphere inoculation of *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 [J]. Physiol Plant, 2016, 158(1): 34-44.
- [15] 王夏雯, 孟佳丽, 刘永锋, 等. 解淀粉芽孢杆菌 B1619 对连作西瓜生长及枯萎病发生的影响 [J]. 福建农业学报, 2019, 34(11): 1302-1308.
- [16] HAN L, WANG Z, LI N, et al. *Bacillus subtilis* SQR 9 can control *Fusarium* wilt in cucumber by colonizing plant roots [J]. Applied Soil Ecology, 2019, 136:55-66.
- [17] 柴庆凯, 张斌, 常若葵, 等. 解淀粉芽孢杆菌 LJ02 对黄瓜抗灰霉病菌的生防效果及其诱导抗性机理的初步研究 [J]. 植物病理学报, 2019, 49(6): 828-835.
- [18] 王王伟, 王卿惠. 解淀粉芽孢杆菌相关功能机制研究进展 [J]. 生物技术通报, 2020, 36(1): 150-159.
- [19] 胡忠亮, 郑催云, 田兴一, 等. 解淀粉芽孢杆菌在环境保护和农业生产中的应用 [J]. 农药, 2016, 55(4): 241-245.
- [20] RASHA M R, KHALED M S. Evaluation of *Bacillus amyloliquefaciens* on the growth performance, intestinal morphology, hematology and body composition of *Nile tilapia*, *Oreochromis niloticus* [J]. Aquaculture International, 2015, 23(1): 203-217.
- [21] 曹明慧, 冉炜, 杨兴明, 等. 烟草黑胫病拮抗菌的筛选及其生物效应 [J]. 土壤学报, 2011, 48(1): 151-159.
- [22] 朱明杰. 禾谷镰刀菌拮抗菌的筛选及抑菌特性研究 [D]. 郑州: 河南工业大学, 2013.
- [23] 史一然, 徐伟慧, 吕智航, 等. 解淀粉芽孢杆菌 LZN01 对西瓜专化型尖孢镰刀菌的抑制效应 [J]. 江苏农业科学, 2019, 47(12): 141-145.
- [24] 刘红, 潘红春, 蔡绍哲, 等. 酶解-超声法破碎大肠杆菌提纯包涵体 [J]. 重庆大学学报 (自然科学版), 2004, 27(10): 75-78.
- [25] 李扬, 陈东玫, 杨凤秋, 等. 解淀粉芽孢杆菌 ZJ01 对苹果轮纹病菌抑制作用 [J]. 河北果树, 2019(4): 4-6.
- [26] 王永强. 解淀粉芽孢杆菌 SDTB009 的分离鉴定及其对番茄枯萎病的防治研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2020.
- [27] 龚明福, 韩松, 李超, 等. 苦豆子根瘤内生细菌分离及其对棉花枯萎病的生物防治效果测定 [J]. 微生物学通报, 2011, 38(6): 865-870.

- [28] 樊丽娟, 郭海, 杨成德, 等. 内生解淀粉芽孢杆菌 262AG6 抑菌物质的初步探究 [J]. 西北农业学报, 2020, 29(6): 912-920.
- [29] 韦丹丹, 缪卫国, 孙茜茜, 等. 解淀粉芽孢杆菌 HAB-2 抑制杧果炭疽菌的活性成分分析 [J]. 果树学报, 2018, 35(10): 1253-1261.
- [30] 胡忠亮, 郑催云, 田兴一, 等. 解淀粉芽孢杆菌 HZM9 菌株发酵液的抑菌谱及稳定性测定 [J]. 南京林业大学学报 (自然科学版), 2017, 41(3): 65-70.
- [31] LUO W, ZHAO M M, YANG B, et al. Identification of bioactive compounds in *Phyllanthus emblica* L. fruit and their free radical scavenging activities [J]. Food Chemistry, 2009, 114(2): 499-504.
- [32] SAMPATH KUMAR N S, NAZEER R A, JAIGANESH R. Purification and identification of antioxidant peptides from the skin protein hydrolysate of two marine fishes, horse mackerel (*Magalaspis cordyla*) and croaker (*Otolithes ruber*) [J]. Amino Acids, 2012, 42(5): 1641-1649.
- [33] MIZUMOTO S, SHODA M. Medium optimization of antifungal lipopeptide, iturin A, production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation by response surface methodology [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 76(1): 101-108.
- [34] KIM B M, RHEE J S, PARK G S, et al. Cu/Zn- and Mn-superoxide dismutase (SOD) from the copepod *Tigriopus japonicus*: molecular cloning and expression in response to environmental pollutants [J]. Chemosphere, 2011, 84(10): 1467-1475.
- [35] LEE M H, LEE J, NAM Y D, et al. Characterization of antimicrobial lipopeptides produced by *Bacillus* sp. LM7 isolated from chungkookjang, a Korean traditional fermented soybean food [J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 221: 12-18.
- [36] 刘秀, 郭中坤, 王可洲. 抗菌肽来源、分类方式、生物学活性、作用机制及应用研究进展 [J]. 中国医药生物技术, 2016, 11(6): 539-543.
- [37] ALVAREZ-SIEIRO P, MONTALBÁN-LÓPEZ M, MU D, et al. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family [J]. Springer Open Choice, 2016, 100: 2939-2951.
- [38] JIAO R, MUNIR S, HE P, et al. Biocontrol potential of the endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* YN201732 against tobacco powdery mildew and its growth promotion [J]. Biological Control, 2020, 143: 104160.
- [39] KANG B R, PARK J S, JUNG W. Antifungal evaluation of fengycin isoforms isolated from *Bacillus amyloliquefaciens* PPL against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* [J]. Microbial Pathogenesis, 2020, 149: 104509.
- [40] WONG J H, HAO J, CAO Z, et al. An antifungal protein from *Bacillus amyloliquefaciens* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 105(6): 1888-1898.
- [41] KAEWKLOM S, LUMBERT S, KRAIKUL W, et al. Control of *Listeria monocytogenes* on sliced bologna sausage using a novel bacteriocin, amysin, produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from Thai shrimp paste (Kapi) [J]. Food Control, 2013, 32(2): 552-557.
- [42] 韩玉竹, 邓钊, 张宝, 等. 解淀粉芽孢杆菌 H15 产抗菌肽的发酵条件优化和提取方法比较研究 [J]. 食品科学, 2015, 36(15): 135-141.
- [43] 杨求华. 渔源解淀粉芽孢杆菌 CQN-2 菌株培养基及发酵条件优化 [J]. 渔业研究, 2020, 42(4): 339-347.
- [44] 杨胜远, 韦锦, 郑燮茹. 解淀粉芽孢杆菌抗菌物质发酵培养基的优化 [J]. 食品科学, 2015, 36(11): 150-156.
- [45] 夏京津, 陈建武, 宋怿, 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.
- [46] 刘昆昂, 黄亚丽, 贾振华, 等. 拮抗灰霉病菌的芽孢杆菌筛选、鉴定及其代谢产物抑菌效果研究 [J]. 华北农学报, 2020, 35(3): 200-207.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)