

枯草芽孢杆菌 SC-2 产直链肽类代谢产物的分离纯化

邹远军, 宋欣沛, 郑一敏, 罗颀, 钟猛, 宋婷, 胥秀英

(重庆理工大学药学与生物工程学院, 重庆 400054)

摘要: 为了研究枯草芽孢杆菌 SC-2 发酵液主要抗菌活性物质, 以临床致病菌株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、痤疮丙酸杆菌、白色念珠菌等为指示菌, 采用打孔法检测抑菌活性, 对 SC-2 发酵液抑菌粗提物进行分离纯化。抑菌粗提物经硅胶柱层析、LH-20 凝胶柱层析和高效液相色谱法分离制备得到抑菌单体化合物 GNH-2。该物质表现出广谱的抗菌活性, 在质量浓度为 1 mg/mL 时对白色念珠菌、大肠杆菌和大肠埃希氏菌抑菌圈直径分别为 34 ± 0.30 mm、 18 ± 0.15 mm、 19 ± 0.10 mm, 对金黄色葡萄球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和痤疮丙酸杆菌的抑菌活性分别为 28 ± 0.10 mm、 30 ± 0.10 mm、 56 ± 0.35 mm, 优于同等浓度的万古霉素。通过能与茚三酮直接显色等实验结果, 初步推断 GNH-2 属于直链的肽类化合物, 为后续结构确证和新药开发提供依据。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 分离纯化; 抑菌活性; 直链肽类化合物

文章编号: 1673-9078(2017)5-85-90

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.5.014

Separation and Purification of Straight-chain Peptide Metabolites Produced by *Bacillus subtilis* SC-2

ZOU Yuan-jun, SONG Xin-pei, ZHENG Yi-min, LUO Jie, ZHONG Meng, SONG Ting, XU Xiu-ying

(College of Pharmacy and Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China)

Abstract: In order to study the main antimicrobial substances in the fermentation liquid of *Bacillus subtilis* SC-2, clinical strains of pathogenic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Propionibacterium acnes*, and *Candida albicans* were used as indicator strains, antimicrobial activity was measured using the agar diffusion method, and the crude extracts of SC-2 fermentation liquid were separated and purified. The crude extract containing antimicrobial substances was separated by silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 gel column chromatography, and high performance liquid chromatography (HPLC) to yield a monomeric compound, GNH-2, with antibacterial activity. This substance showed broad-spectrum antimicrobial activity. At a concentration of 1.0 mg/mL, the GNH-2 inhibition zone diameters against *Candida albicans*, *Escherichia coli*, and *E. coli* 251 were 34 ± 0.30 mm, 18 ± 0.15 mm, and 19 ± 0.10 mm, respectively. The GNH-2 inhibition zone diameters against *S. aureus*, MRSA, and *Propionibacterium acnes* were 28 ± 0.10 mm, 30 ± 0.10 mm, and 56 ± 0.35 mm, respectively, which were better than those of vancomycin at the same concentration. The results of ninhydrin coloration preliminarily suggested that GNH-2 was a straight-chain peptide. This work provides the basis for subsequent structure confirmation and new drug development.

Key words: *Bacillus subtilis*; separation and purification; antimicrobial activity; straight chain peptides

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)、痤疮丙酸杆菌(*P.acnes*)和白色念珠菌(*C.albicans*)等都是医院感染的重要病原体, 随着抗生素、抗癌药物以及免疫抑制剂的广泛应用, 病原微生物的耐药性日益增强, 因此寻找一种新的安全、无毒抗感染药物替代品具有重大的社会价值^[1-3]。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是一种好氧产芽孢的革兰氏阳性杆菌, 其生理特征多样, 易于分离培养, 能够产生多种抗菌代谢产物, 被认为是具有潜在的、能有效抑制病原菌的有益菌^[4], 具有很高的医用价值^[5]。目前已研究的枯草芽孢杆菌

收稿日期: 2016-06-22

作者简介: 邹远军(1990-), 男, 硕士研究生, 主要从事微生物药物的研究

通讯作者: 郑一敏(1963-), 男, 教授, 主要从事天然药物研究与开发

大多产生环脂肽类的抗菌物质, 如枯草菌表面活性素(Surfactin)、伊枯草素(Iturin)、芬枯草素(Fengycin)等^[5,6], 这些环肽类物质与茚三酮染色前需要酸水解才能显色, 而对于直链肽类物质则可以用茚三酮直接显色^[7], 目前鲜有直链肽类抗菌物质的相关报道。本实验室近年来从食用酸菜中分离筛选得到一株枯草芽孢杆菌 SC-2, 本研究首先检测了该菌株活性粗提物的抑菌谱, 通过实验摸索利用现代色谱技术对枯草芽孢杆菌 SC-2 发酵液抑菌粗提物进行分离纯化, 最终利用硅胶色谱柱层析、LH-20 凝胶色谱柱层析和高效液相色谱法这一实验路线分离制备得到活性物质 GNH-2。GNH-2 具有广谱的抗菌活性, 对 MRSA、金黄色葡萄球菌和痤疮丙酸杆菌抗菌活性明显优于同等浓度的万

古霉素(治疗 *MRSA* 首选药物^[8]);应用薄层色谱法(TLC)和茚三酮直接染色技术检测到GNH-2能与茚三酮直接显色,质谱分析其分子量为376,初步推断GNH-2属于小分子直链的肽类化合物,这些结果将为下一步的结构确定和后续研究工作提供详实依据。

1 材料和方法

1.1 原料

1.1.1 供试菌株

SC-2菌株:本实验室自行从酸菜中分离得到,通过形态观察、生理生化实验和16s rDNA分子生物学实验^[9],最终鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

供试指示菌:耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(*MRSA44*、*MRSA45*)、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、大肠埃希氏菌、痤疮丙酸杆菌、白色念珠菌,均由本实验室保存。

1.1.2 培养基与试剂

菌株SC-2发酵培养基:葡萄糖20.0g,酵母粉5.0g,硫酸镁0.5g;超纯水1000mL,pH7.0~7.2。

LB固体培养基:酵母提取物5.0g,蛋白胨10.0g,NaCl10.0g,琼脂15.0~20.0g,超纯水1000mL,pH7.0~7.2。

CM0787培养基:牛肉膏10.0g,蛋白胨5g,酵母粉3g,葡萄糖5g,淀粉1g,氯化钠5g,醋酸钠3g,L-半胱氨酸盐酸盐0.5g,琼脂15g,超纯水1000mL,pH6.8。

改良马丁培养基:蛋白胨5g,硫酸镁0.5g,磷酸氢二钾1g,葡萄糖20g,酵母粉2g,琼脂1.7g,超纯水1000mL。

大孔吸附树脂,天津浩聚树脂科技有限公司;柱层析硅胶,青岛海浪硅胶干燥剂有限公司;柱层析凝胶,上海金穗生物科技有限公司;TLC分析板,烟台江友硅胶开发有限公司;茚三酮,成都科隆试剂有限公司;其它柱层析试剂均为国产分析纯,高效液相色谱所用为色谱纯。

1.2 仪器与设备

发酵罐,Dansence3000-JES10-50L;SP-DJ系列水平净化工作台,上海浦东物理光学仪器厂;H2P-250型全温振荡培养箱,上海精宏实验设备有限公司;LDZX-50KBS立式压力蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂;H-1650型台式离心机,湖南湘仪仪器有限公司;JM1812-1卷式膜小型试验机,大连屹东膜工程设备有限公司;RE-52A型旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器

厂;DL-400循环冷却器,郑州长城科工贸有限公司;SHZ-C型循环水式多用真空泵巩义市英峪仪器厂;LC-20A型Shimadzu高效液相色谱仪,日本岛津公司;Waters 3100 Mass Detector;色谱分析柱,Welchrom C18,5 μ m,4.6 \times 250mm;Welchrom LP-C18,5 μ m,4.6 \times 250mm;半制备柱Boston Crest ODS,5 μ m,10.0 \times 250mm;XS105DU型电子天平,梅特勒托利多仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 抑菌试验方法

采用打孔法进行抑菌试验。分别从斜面上挑取一环各指示菌菌种接入10mL无菌蒸馏水中,调整菌液浓度为 10^8 CFU/mL,取菌悬液400 μ L均匀涂布于相应固体培养基平板(培养基厚5mm)上。用灭过菌的打孔器(直径为6mm)在平板上打孔,定量将待测样品溶液加入所打孔中(以样品溶液与培养基表面齐平为准)。最后将平板平放入37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中培养24h,用游标卡尺测量抑菌圈直径大小,以确定样品抑菌活性。

1.3.2 菌株SC-2抑菌粗提物的制备

菌株SC-2发酵液经8000r/min、离心10min收集上清液,再经0.22 μ m过滤膜过滤除菌,上清液用卷式膜浓缩截留300~1000活性部分;然后用H103大孔树脂提取活性物质,取其50%乙醇解吸附液减压浓缩;最后再用8000r/min、离心10min收集上清液冷冻干燥得到浅黄色粉末粗提物,即抗菌粗提物。

1.3.3 菌株SC-2抗菌粗品的抑菌谱测定

采用琼脂扩散打孔法测定SC-2抗菌粗品对指示菌的抗菌活性。分别在CM0787培养基上接种痤疮丙酸杆菌,改良马丁培养基上接种白色念珠菌,LB固体培养基上接种其它剩余指示菌,涂布均匀,然后在上面打孔,往孔里加入过滤除菌的粗品水溶液50 μ L,经37 $^{\circ}$ C培养24h后用游标卡尺测定平板上抑菌圈的直径。做三次平行试验,取平均值。

1.3.4 SC-2抑菌粗提物的硅胶柱层析分离

称取300~400目硅胶160g溶于3倍氯仿甲醇系统(三氯甲烷:甲醇=7:3),搅拌均匀并超声脱气,湿法装柱,平衡压实(柱高20cm,直径为6cm)。另取SC-2抑菌粗提物5g加适量蒸馏水溶解后,与50 $^{\circ}$ C水浴锅上拌与硅胶中,蒸干碾成粉末,干法上样。使用氯仿-甲醇-水洗脱系统进行梯度洗脱,每个梯度洗脱约6BV,每50mL洗脱液收集为一个馏分,总计收集120瓶。将收集到的洗脱液分别浓缩后,进行TLC薄层分析(展开剂为三氯甲烷:甲醇:水=5:5:0.5),展开

吹干后置于 254 nm 紫外荧光下观察,记录拍照后用碘蒸汽显色,综合紫外和碘蒸汽显色结果将含有相同或相似的成分进行合并。

1.3.5 SC-2 粗提物硅胶柱层析分离组分的抑菌活性检测

将经过硅胶柱层析分离后得到的各合并组分进行减压浓缩,真空干燥后用蒸馏水定量溶解,配制成 5 mg/mL 的样品溶液按照 1.3.1 方法进行抑菌试验,以确定各组分的抑菌活性。

1.3.6 抑菌活性组分中抑菌活性物质的分离纯化

采用 LH-20 凝胶柱层析梯度洗脱,高效液相色谱法对经过活性检测的抑菌活性组分进行进一步分离纯化。

1.3.7 HPLC 纯度分析及质谱检测

将经过 1.3.6 节分离得到的单一活性物质,溶于适当的溶剂中进行 HPLC 分析,分别采用不同的色谱柱和流动相、在不同的波长条件下,采用色谱峰面积归一法鉴定活性物质的纯度^[10]。用 Waters 3100 Mass Detector 对分离所得物质进行质谱分子量检测。

1.3.8 菌株 SC-2 抗菌成分的茚三酮显色分析^[7]

分别称取 5 mg 硅胶柱层析分离下来的活性物质,3 mg 凝胶柱层析分离下来的活性物质和 1 mg 纯品溶解于 1 mL 蒸馏水,各取 5 μL 点样与 TLC 薄层分析板上,展开剂为正丁醇-冰醋酸-水,体积比为 4:1:1 展开;干燥后用 2%茚三酮丙酮溶液直接显色,高温烘干显色,观察记录实验结果。

1.3.9 纯品的抑菌活性验证

对经过高效液相色谱纯化后的纯品 GNH-2 用甲醇配制成 1.0 mg/mL 的样品按照 1.3.1 方法进行抑菌活性的验证。

1.3.10 数据统计分析

实验中所有抗菌活性抑菌圈数据均为 3 次平行实验数据的平均值。

2 结果与分析

2.1 菌株 SC-2 抗菌粗品的抑菌谱

表 1 抗菌粗品 (5mg/mL) 对各指示菌抗菌活性测定

指示菌株	抑菌圈直径/mm
MRSA44 耐甲氧西林金葡球菌 44	29±0.12
MRSA45 耐甲氧西林金葡球菌 45	30±0.15
<i>Staphylococcus aureus</i> 金黄色葡萄球菌	33±0.36
<i>E. coli</i> 大肠杆菌	27±0.21
<i>E. coli bacteria251</i> 大肠埃希氏菌 251	28±0.42
<i>Acne propionic acid bacillus</i> 痤疮丙酸杆菌	48±0.28
<i>Candida albicans</i> 白色念珠菌	41±0.50

注:表中显示为三个平行的平均值;打孔的直径为6.0 mm。

采用琼脂扩散法对菌株 SC-2 的粗提物水溶液进行抑菌普实验。结果表明(表 1),该粗提物对革兰氏阳性细菌金黄色葡萄球菌、MRSA、白色念珠菌、痤疮丙酸杆菌均由很强的抑菌作用,并且对革兰氏阴性菌大肠杆菌、大肠埃希氏菌具有很好的抑菌作用。

2.2 SC-2 抑菌粗提物的硅胶柱层析分离及各

组分的活性检测

表 2 硅胶柱层析组分 A-H 的抑菌圈直径 (mm)

Table 2 Inhibition zone diameters of gel column chromatography fractions A-H

指示菌	组分 A	组分 B	组分 C	组分 D	组分 E	组分 F	组分 G	组分 H
MRSA44	-	-	14±0.14	-	-	18±0.15	32±0.16	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	19±0.12	-	-	17±0.26	36±0.12	-
<i>E. coli</i>	-	-	13±0.20	-	-	12±0.18	29±0.26	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	21±0.25	42±0.15	-
<i>Acne propionic acid bacillus</i>	-	-	25±0.38	-	-	-	45±0.34	-

注:表中显示为三个平行的平均值;打孔的直径为6.0 mm。

枯草芽孢杆菌 SC-2 发酵液的活性物质粗提物经过硅胶柱层析梯度洗脱分离得到 8 个组分,通过减压浓缩、蒸干后用纯水配制成质量浓度为 5.0 mg/mL 的

样品对 MRSA、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、白色念珠菌、痤疮丙酸杆菌进行抑菌试验,结果如表 2 所示。

由表 2 可知,SC-2 抗菌粗提物经硅胶柱层析分离

出的 8 各组分中, 组分 C、F 和 G 有抑菌活性, 其中组分 G 活性最强, 故接下来优先对组分 G 进行进一步的分离纯化。

2.3 抑菌活性组分的分离纯化

2.3.1 凝胶柱层析

将硅胶柱层析所得活性组分 G 在薄层层析板上展开, 如图 3, 结果显示硅胶不能完全将各组分分开, 所以本实验采用凝胶柱层析, 利用分子筛的原理对组分 G 进行进一步的分离纯化。洗脱条件为: 将组分 G 用超纯水配制成 0.1 g/mL 的样品溶液, 上样 1 mL, 洗脱液为纯水-80%甲醇(甲醇浓度梯度增高)梯度洗脱, 每个梯度洗脱体积为 3 BV, 流速为 1 BV/h, 每 15 mL 收集为一个馏分。将所接馏分依次点板分析, 合并相同馏分, 共得到三个组分, 配制样品浓度为 3 mg/mL 依次进行抗菌活性实验测定, 结果如表 3。结果显示 G2 为最强活性部位, 薄层板分析显示依然还有两个组分, 故仍需进行下一步的分离纯化。

表 3 凝胶柱层析组分 G1-G3 抑菌圈直径 (mm)

Table 3 Inhibition zone diameters of fractions G1-G3

指示菌	组分 G1	G2	G3
<i>MRSA44</i>	-	34±0.15	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	35±0.20	-
<i>E. coli</i>	-	28±0.10	15±0.15
<i>Candida albicans</i>	12±0.15	44±0.25	-
<i>Acne propionic acid bacillus</i>	10±0.25	50±0.30	-

注: 表中显示为三个平行的平均值; 打孔的直径为 6.0 mm。

2.3.2 HPLC 的制备

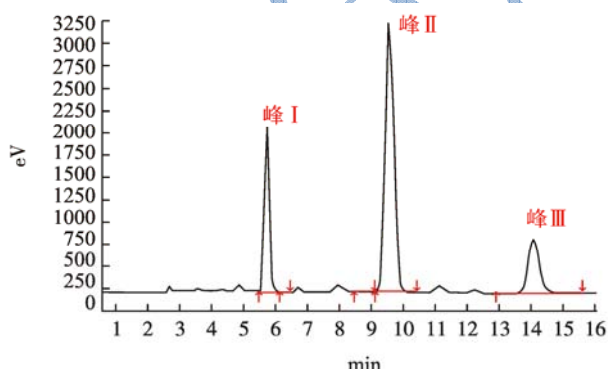


图 1 G2 在 HPLC 条件下色谱峰

Fig.1 Chromatographic peaks of G2 from HPLC

凝胶层析所得活性部位 G2 仍然不是单一成分, 通过筛选本研究采用 HPLC 法对 G2 组分进行进一步的分离纯化。方法: 将组分 G2 用色谱甲醇配制成 1.0 mg/mL 的样品溶液, 进样量为 20 μL。色谱条件为: 色谱柱为 Welchrom C18, 5 μm, 4.6×250 nm, SPD-20A

检测波长 220 nm, 3%甲醇等度洗脱, 洗脱速度为 1 mL/min, 柱温: 室温。组分 G2 在该色谱条件下主要有三个洗脱峰, 如图 1 所示。利用半制备柱 (Boston Crest ODS, 5 μm, 10.0×250 nm), 分别收集三个洗脱峰样品, 干燥后用超纯水配制成 1 mg/mL 的样品进行抗菌活性测定。通过抑菌试验最终确定峰 I、峰 III 无活性, 峰 II 为活性部位, 呈白色晶体状, 编号为 GNH-2。

2.4 HPLC 纯度分析及质谱检测

2.4.1 HPLC 纯度分析

方法: 将 GNH-2 用适量甲醇溶解后配制成 0.1 mg/mL 的样品溶液, 进样量为 20 μL。色谱条件 1: 同 2.3.2; 色谱条件 2: 色谱柱为 Welchrom LP-C18, 5 μm, 4.6×250 nm, SPD-20A 检测波长 254 nm, 1~5% 乙腈梯度洗脱, 洗脱速度为 1 mL/min, 柱温: 室温。GNH-2 色谱图如图 2 所示。

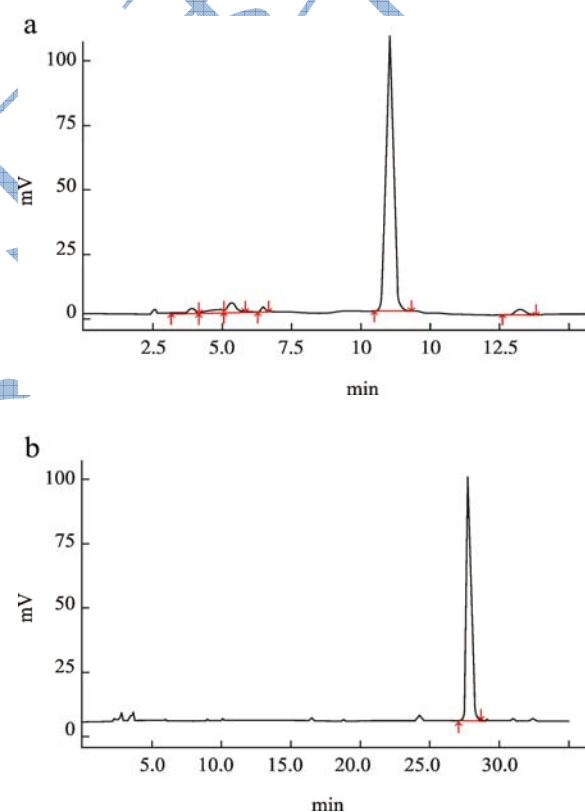


图 2 GNH-2 的 HPLC 图谱

Fig.2 HPLC chromatogram of GNH-2

由图 2a 可知, GNH-2 在色谱条件 1 下进样后仅在 9~10 min 出现一个强吸收峰, 面积归一法分析纯度达到 92.5%; 由图 2b 可知, GNH-2 在色谱条件 2 下进样后仅在 28 min 出现一个强吸收峰, 面积归一法纯度达到 95%以上。结合 2.5 节薄层显色结果可初步说明该物质为较纯化合物。

2.4.2 GNH-2 质谱分析

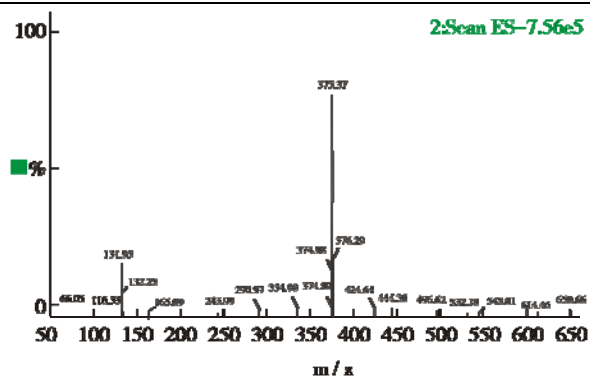


图3 GNH-2的质谱图

Fig.3 Mass spectrum of GNH-2

方法同 2.4.1, 进样量为 10 μ L。质谱参数, MODE: ESI-, Capillary (kV): 3.0 kV, Source Temperature: 120 $^{\circ}$ C, Desolvation Temperature: 350 $^{\circ}$ C, Desolvation Gas Flow: 600 L/Hr, Cone Gas Flow: 50 L/Hr, Cone voltage: 30 V Mass (m/z): 100~1500。质谱图如图 3 所示。

由图 3 可知, GNH-2 在负离子模式(ES-)下分子离子峰 m/z 为 375, 及(M-H)⁺分子量为 375, 可得 GNH-2 的相对分子质量为 376。

2.5 SC-2 抗菌成分的茚三酮显色分析

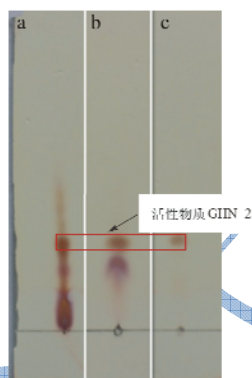


图4 茚三酮显色图谱

Fig.4 Ninhydrin color map

注: a 表示硅胶层析组分 G; b 表示凝胶柱层析组分 G2; c 表示 GNH-2。

根据肽类化合物游离的氨基和羧基能与茚三酮发生显色反应, 本实验采用茚三酮直接显色法, 结果如图 4, 三个样品均有显色斑点且呈现斑点逐渐减少的趋势, 组分 G 与 G2 显蓝紫色和棕黄色两种斑点, GNH-2 显棕黄色。由氨基酸与茚三酮反应可知, 大多数氨基酸的 α -氨基与茚三酮反应生成蓝紫色产物, 而脯氨酸和羟脯氨酸则与茚三酮反应则形成黄色产物。根据已有枯草芽孢杆菌代谢产物的相关报道^[5,6], GNH-2 的相对分子质量, 初步推断分离所得抗菌物质为含有脯氨酸或羟脯氨酸的小分子直链肽类化合物。

另外, 该显色反应也能同步监测本研究所采用的分离纯化实验路线, 侧面反映本文所用的分离纯化方法是一种简单快速、效率高的方法。

2.6 化合物 GNH-2 的活性验证

对通过 HPLC 分离纯化过后的纯品 GNH-2 定量进行进一步的活性验证, 用超纯水将 GNH-2 配制成 1 mg/mL 的样品溶液, 部分指示菌以 1 mg/mL 万古霉素作为阳性对照, 超纯水作为阴性对照(无活性), 结果如表 4 所示, 图 5 为部分抑菌平板直观图。

表4 GNH-2的抑菌圈直径

Table 4 Diameter of GNH-2 inhibitory zones (mm)

指示菌	GNH-2 (1 mg/mL)	万古霉素 (1 mg/mL)
MRSA44	28±0.10	23±0.15
MRSA45	30±0.15	23±0.10
<i>Staphylococcus aureus</i>	28±0.10	24±0.15
<i>E. coli</i> bacteria251	19±0.10	/
<i>E. coli</i>	18±0.15	/
<i>Acne propionic acid bacillus</i>	56±0.35	48±0.25
<i>Candida albicans</i>	34±0.30	/

注: 表中显示为三个平行的平均值; 打孔的直径为 6.0 mm; /代表未做阳性对照。

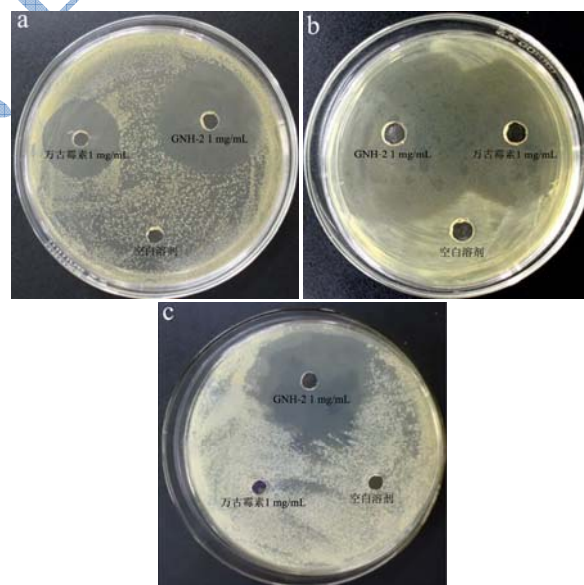


图5 GNH-2 体外抑菌实验

Fig.5 In vitro antibacterial experiment with GNH-2

注: a 表示 MRSA45; b 表示 P. aeruginosa; c 表示 Candida albicans。

由表 4 和图 5 可得, 分离纯化所得纯品化合物 GNH-2 在质量浓度为 1 mg/mL 时对金黄色葡萄球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和痤疮丙酸杆菌的抑菌活性均优于同等浓度的万古霉素, 对白色念珠菌、大肠

杆菌和大肠埃希氏菌也有较强的活性。GNH-2 即为 SC-2 发酵液中主要抗菌活性物质。

3 结论

实验菌株 SC-2 分离来自食用酸菜中,属于枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*),其发酵液经过卷式膜浓缩、大孔树脂粗提、硅胶柱层析、凝胶柱层析和 HPLC 制备最终分离得到活性化合物 GNH-2,通过 HPLC 纯度分析和质谱检测确定了 GNH-2 为纯度高于 92%、分子量为 376 的化合物。该物质能与茚三酮直接显色,表明其 N 端含有游离氨基酸,故可以初步推断该化合物为小分子直链肽类化合物^[7],具体结构鉴定和后续研究工作将另文报道。该化合物产自可食用的益生菌体内,对人体应无毒副作用,具有安全可靠的特点。同时该物质表现出广谱的抗菌活性,对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(*MRSA*)、痤疮丙酸杆菌、白色念珠菌等临床感染菌均有较强的活性,特别是对 *MRSA* 的抗菌活性优于同等浓度的万古霉素,这就为开发新型抗感染药物提供理论与实验依据。由于直链多肽结构简单易修饰,许多小分子直链多肽逐渐成为化学合成研究的重要先导化合物,用来开发活性更强、药动学性质更好的临床候选药物^[11],具有广阔的市场开发价值。

参考文献

- [1] Yao Z, Peng Y, Chen X, et al. Healthcare associated infections of *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*: A case-control-control study [J]. *Plos one*, 2015, 10(10): 1213-1232
- [2] Mohamed Jabbie. Protective immune responses against systemic candidiasis evoked by DNA vaccine containing epitope (LKVIRK) from HSP90 of candida, albicans [D]. Northeast Normal University, 2012
- [3] Hyo Mi Han. Anti-inflammatory effects of antimicrobial peptide P5 in mice in response to propionibacterium acnes [A]. Scientific Research Publishing. Proceedings of 2015 Workshop 9 [C]. Scientific Research Publishing, 2015:1
- [4] Bais H P, Fall R, Vivanco J M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of arabis roots by *pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production [J]. *Plant Physiol.*, 2004, 134(1): 307-319
- [5] Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions [J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 56(4): 845-57
- [6] Foster J W, Woodruff H B. Antibiotic substances produced by bacteria [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2010, 1213(1): 125-136
- [7] 张欢,丛丽娜,侯英敏,等.海洋枯草芽孢杆菌 HS-A38 产直链脂肽活性物质的初步检测[J].海洋科学,2011,35(8):37-42
ZHANG Huan, CONG Li-na, HOU Ying-min, et al. Antimicrobial activity of linear lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* HS-A38 [J]. *Marine Sciences*, 2011, 35(8): 37-42
- [8] Alejandra Morales-Cartagena, Antonio Lalueza, Francisco López-Medrano, et al. Treatment of *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* infections: Importance of high vancomycin minimum inhibitory concentrations [J]. *World Journal of Clinical Infectious Diseases*, 2015, 2: 14-29
- [9] 江娟,邹远军,张云玲,等.抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌株的筛选与鉴定[J].现代食品科技,2013,4:788-791
JIANG Juan, ZOU Yuan-jun, ZHANG Yun-ling, et al. Screening and identification of strain with anti-*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* activity [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 4: 788-791
- [10] 邵颖,陈宏伟,柴文波,等.蛹拟青霉发酵液中抑菌活性成分的分离纯化[J].食品科学,2012,33(23):116-120
SHAO Ying, CHEN Hong-wei, CHAI Wen-bo, et al. Isolation and purification of antibacterial components in fermentation broth of *Paecilomyces militaris* [J]. *Food Science*, 2012, 33(23): 116-120
- [11] 王佳,孙德群.小分子多肽类似物研究进展[J].药学学报, 2015,8:931-944
WANG Jia, SUN De-qun. Research progress of small peptidomimetics [J]. *Acta Pharmaceutica*, 2015, 8: 931-944