

琼脂扩散法定量测定多黏菌素对霉菌的抑菌活力

王志新¹, 宏丹¹, 刘洋¹, 鲁雷震¹, 周景波¹, 宁亚维¹, 贾英民²

(1. 河北科技大学生物科学与工程学院, 河北省发酵工程技术研究中心, 河北石家庄 050018)

(2. 北京工商大学食品学院, 北京 100048)

摘要: 本文研究抗菌肽抑制霉菌的活力定量测定方法, 选用多黏菌素 B 和产黄青霉作为研究对象, 采用琼脂扩散法优化指示菌浓度、抗菌肽添加量、培养时间等影响活力定量测定的条件, 进一步以黑曲霉为指示菌进行方法验证; 通过建立抗菌肽浓度对数值与抑菌圈直径之间的线性方程进行抗菌肽抑菌活力的计算。研究结果显示, 琼脂扩散法测定多黏菌素 B 抑制霉菌活力的最佳条件: 90 mm 平板添加 PDA 培养基 15 mL, 指示菌孢子浓度 $(1\sim5)\times 10^6$ 个/mL, 多黏菌素 B 添加量 100 μ L, 4 $^{\circ}$ C 预扩散时间 6~10 h, 28 $^{\circ}$ C 培养时间 24 h。以黑曲霉为指示菌进行方法验证时发现方法重复性好、精密度高。在此条件下, 多黏菌素 B 对产黄青霉和黑曲霉的抑菌活性分别为 524.81 U/mg 和 605.76 U/mg。该研究为抗菌肽在试验和生产过程中的活力测定提供参考和依据。

关键词: 琼脂扩散法; 定量测定; 多黏菌素 B; 霉菌

文章编号: 1673-9078(2019)06-251-257

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.6.033

Quantitative Determination of the Antifungal Activity of Polymyxin against Mold Fungi by Agar Infusion Method

WANG Zhi-xin¹, HONG Dan¹, LIU Yang¹, LU Lei-zhen¹, ZHOU Jing-bo¹, NING Ya-wei¹, JIA Ying-min²

(1. College of Bioscience and Bioengineering, Hebei University of Science and Technology, Research Center for Fermentation Engineering of Hebei, Shijiazhuang 050018, China)

(2. School of food and chemical engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

Abstract: The quantitative determination method of antimicrobial peptides against mold fungi was studied in this paper. The antifungal activity of polymyxin B against *Penicillium chrysogenum* was determined by agar infusion method, and the determination conditions of indicator concentration, peptide addition amount and culture time were then optimized. Furthermore, the quantitative determination method was verified with *Aspergillus niger*. The antifungal activity was calculated by establishing a linear equation between the antimicrobial peptide concentration and inhibition zone diameter. The results showed that the optimal conditions for quantitatively testing the activities of polymyxin B against mold fungi were as follows: The amount of PDA in 90 mm petri dish was 15 mL, the spore concentration was $(1\sim5)\times 10^6$ spores/mL, the addition of polymyxin B was 100 μ L, the pre-diffusion time was 6~10 h at 4 $^{\circ}$ C and the culture time was 24 h at 28 $^{\circ}$ C. The quantitative determination method was verified with *Aspergillus niger*, and the results indicated that this determination method had good repeatability and high precision. Under these conditions, the antifungal activities of polymyxin B against *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus niger* were 524.81 U/mg and 605.76 U/mg, respectively. This study could provide a reference and basis for the activity determination of antimicrobial peptides in the process of research and production.

Key words: agar infusion method; quantitative determination; polymyxin B; mold fungi

抗菌肽 (Antimicrobial peptides, AMPs) 是一类来源于动物、植物、微生物中的小分子多肽, 具有抵御外界病原微生物侵害、清除体内突变细胞、提高免疫等特性^[1-4]。目前, 抗菌肽广泛应用于食品^[5,6]、医药^[7]、保健品和饲料^[8]等领域, 其安全无毒的特点受到

收稿日期: 2019-03-11

基金项目: “十三五”重点研发计划项目 (2016YFF0202300; 2016YFD0400800);
河北省重点研发计划项目 (18227127D)

作者简介: 王志新 (1980-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 发酵工程

通讯作者: 贾英民 (1961-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全

药^[7]、保健品和饲料^[8]等领域, 其安全无毒的特点受到

在食品加工、保藏等环节最主要的问题是食品腐败变质, 在引起食品腐败变质的微生物中霉菌是其中较为重要的一类。霉菌不仅可以直接造成食品腐败, 而且部分霉菌在侵染食品的过程中产生毒素, 这些毒素的摄入会对人体产生巨大的危害^[9-11]。因此, 如何有效防治霉菌污染成为一项重要的研究内容。在霉菌污染控制中, 生物源的抗菌肽作为一种天然防腐剂研

究较多^[12-16]。郝曼等^[13]从大豆球蛋白中提取到一种碱性肽,其可以抑制黑曲霉和青霉,最小抑菌浓度分别为 1.6 和 1.2 mg/mL。黄现青等^[14]报道,采用药敏纸片法研究枯草芽孢杆菌脂肽对点青霉的抑制性,用其处理桃子采摘后的霉变,其防腐效率达到 76.5%。孙卉等^[15]采用管碟法考察枯草芽孢杆菌发酵液抑制引起苹果腐烂的霉菌,发现其对扩展青霉具有良好的抑制性,抑制率可达 40%~80%。刘尊等^[16]分别利用孢子萌发抑制法和菌落生长抑制法分析亚麻籽环肽混合物对霉菌的抑制,观察到其对宛氏拟青霉和黄曲霉具有一定抑制活性。可见,抗菌肽在食品腐败真菌的抑制中具有重要的作用,但研究中发现,抗菌肽的性能测定和评价标准并没有完善的评价系统,测定方法不统一,结果缺乏可比性。因此,如何准确的测定抗菌肽的抗菌活性也就成为了一个重要的问题。

在抗菌肽的活力测定中,关于抑制细菌活性的测定方法很多,主要有管碟法^[17]、浊度法、微量肉汤稀释法^[18]、平板扩散法^[19]等。但在真菌的活力测定中,尤其是对于产生孢子和菌丝的霉菌,若借鉴细菌测定的微量肉汤稀释法或浊度法容易造成误差^[20]。而针对孢子和菌丝特性开发的孢子萌发抑制法和菌丝生长抑制法^[11,15,21,22]亦存在一定不足,孢子萌发抑制法在观察过程中,芽管的长度无法准确测定,在计算萌发率时会造成误差;菌丝生长抑制法试验过程中,菌饼大小和厚度的不统一亦会导致霉菌生物量的不统一,进而影响测量结果的准确性。因此,寻找抑制霉菌活性的适宜测定方法较为重要。魏东东等^[23]通过建立抗菌肽浓度对数值与抑菌圈直径的线性关系来定量测定抗菌肽对细菌的抑菌活力,该方法操作简单,结果相对准确。基于此,本研究考察此种测定方法是否适用于抗菌肽对霉菌的定量测定。

本研究采用琼脂扩散法进行抗菌肽抑制霉菌的活力定量测定,通过优化多黏菌素 B 对产黄青霉的定量测定条件,建立抗菌肽浓度对数值与抑菌圈直径之间的线性关系确定抗菌肽对霉菌的抑菌活力,并进一步采用黑曲霉验证方法的可行性,以期建立适用性高的抗菌肽抑制腐败性霉菌的定量测定方法,为抗菌肽的活力评价方法的统一与评价标准的建立奠定一定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

指示菌:产黄青霉 *Penicillium chrysogenum*(ATCC 10106)、黑曲霉 *Aspergillus niger*(ATCC 16404),本

实验室保存。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA),北京奥博星生物技术有限责任公司。

试剂:多黏菌素 B (polymyxin B),上海麦克林生化科技有限公司;其他试剂均为分析纯。

耗材:一次性平板(90 mm),江苏康健医疗用品有限公司;牛津杯(内径 6.0 mm,外径 7.8 mm),武汉药科新技术开发有限公司。

1.2 仪器设备

超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;霉菌培养箱,上海一恒科技有限公司;紫外分光光度计,天美科学仪器有限公司;显微镜,日本奥林巴斯株式会社;全自动菌落计数仪,法国 Interscience 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 孢子悬液的制备

接种环挑取 1~2 环保藏的霉菌孢子,接种于 PDA 培养基,28 °C 恒温培养 18~30 h,用生理盐水洗脱孢子,脱脂棉过滤,血球计数板计数,采用生理盐水进行孢子悬液的稀释与调整,备用。

1.3.2 多黏菌素 B 溶液的配制

采用无菌水配制浓度为 4.0 mg/mL 的多黏菌素 B 母液,然后进行二倍梯度稀释,分别制备浓度为 0.125、0.25、0.5、1.0、2.0 和 4.0 mg/mL 的测定液。

1.3.3 抗菌肽浓度与抑菌圈直径间线性关系的验证

将灭菌的 PDA 培养基冷却至 45~50 °C,将 1.3.1 中制备的 *P. chrysogenum* ATCC 10106 孢子悬液按照 1%的添加量加入到 PDA 培养基中,混匀,量取 15 mL 分装至 90 mm 培养皿中,冷却后,等距离放置 6 个牛津杯,将 1.3.2 配制的不同浓度的多黏菌素 B 溶液加入牛津杯中,4 °C 预扩散 6~10 h 后,28 °C 培养箱中恒温培养,使用全自动菌落计数仪测量抑菌圈直径。以多黏菌素 B 浓度的对数值为横坐标,以抑菌圈直径为纵坐标,绘制抗菌肽浓度对数值与抑菌圈直径间的线性关系,验证二者之间是否存在线性关系,分析该测定方法的可行性。

1.3.4 抑菌测定方法的条件优化

1.3.4.1 指示菌孢子浓度优化

按照 1.3.1 的方法分别制备 $(1\sim5)\times 10^5$ 、 $(1\sim5)\times 10^6$ 和 $(1\sim5)\times 10^7$ 个/mL 浓度的 *P. chrysogenum* ATCC 10106 孢子,以 1%的添加量加入到 PDA 培养基,制备不同孢子浓度的含菌平板,其余条件同 1.3.3 的抑菌测定方法。

1.3.4.2 抗菌肽添加量优化

在牛津杯中分别加入 50 μL 、100 μL 、150 μL 不同稀释浓度的多黏菌素 B 测定液，其余同 1.3.3 的抑菌测定方法。

1.3.4.3 培养时间的优化

按照 1.3.3 的方法进行抑菌活力的测定，制备的含菌平板经过预扩散后，放置在 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中分别培养 18、24 和 30 h，观察抑菌平板中菌落状态，测定抑菌圈大小。

以上优化，每个试验 3 个平行，每个平行重复 3 次。建立抗菌肽浓度对数值与抑菌圈直径间的线性回归方程，以回归方程的相关系数 R^2 、斜率、截距以及相对标准偏差为依据，进行方法精密度、准确度和重复性的优化。

1.3.5 抑菌测定方法的验证

采用 *A. niger* ATCC 16404 对 1.3.4 建立的抑菌测定方法进行验证试验，建立多黏菌素 B 浓度对数值与抑菌圈直径间的线性关系，确定抗菌肽活力测定方法。

1.4 抗菌活力计算

参照魏东东等^[23]的活力定义公式进行抗菌活力的计算。

1.5 数据处理

采用 Origin 8.0 软件分析线性回归方程、斜率、截距、相关系数，计算平均数、标准偏差以及相对标准偏差。采用 SPSS statistics 20 软件进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 抗菌肽浓度与抑菌圈直径间线性关系的验证

Tramer 等^[24]和魏东东等^[23]在进行抗菌肽活力测定中发现，抗菌肽浓度的对数值与抑菌圈直径之间存在线性关系，而且魏东东依据此线性关系，建立了抗菌肽对细菌的活力定量测定方法，解决了抗菌肽由于没有统一标准品而无法进行定量测定的现状。这种活力定量测定方法能否适用于抗菌肽对霉菌的测定？本

文通过研究多黏菌素 B 对 *P. chrysogenum* ATCC 10106 的抑菌试验进行方法的验证。结果发现，多黏菌素 B 浓度为 0.125、0.25、0.50、1.0、2.0、4.0 mg/mL 时，其浓度的对数值与抑菌圈直径之间存在良好的线性关系，其相关系数 R^2 均达到 0.99 以上（图 1），从表 1 可以看出，三次重复测定的结果相对偏差均较小，可见其准确性和精密度较好。因此，在抗菌肽抑制腐败霉菌的活力测定中，该测定方法具有一定可行性。且从图 2 可以看出，采用此测定方法获得的抑菌圈呈现圆形，且边缘整齐，测量误差小，结果直观。

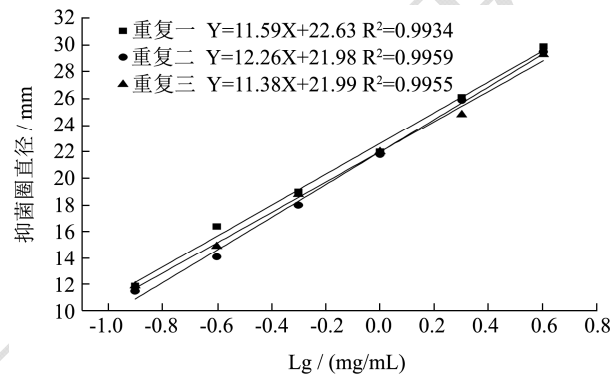


图 1 抗菌肽浓度对数值与抑菌圈直径之间的线性关系
Fig.1 Linear relationship between logarithm of antifungal peptide concentration and diameter of inhibition zone diameter

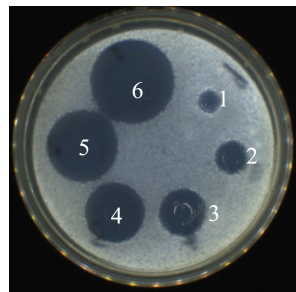


图 2 不同浓度多黏菌素 B 抑菌试验
Fig.2 Antifungal test with different concentrations of polymyxin B

注：1~6 分别代表多黏菌素 B 浓度为 0.125、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0 mg/mL。

图 1 显示，多黏菌素 B 浓度在 0.125~4.0 mg/mL 时的线性关系良好，因此，以下研究中选择此浓度作为多黏菌素 B 活力测定的适宜浓度。除了抗菌肽浓度，抗菌肽的添加量、指示菌浓度和培养时间等因素同样影响测定方法的准确性，需要对这些影响因素进行优化，以获得最适的定量测定条件。

表 1 多黏菌素 B 抑制 *P. chrysogenum* ATCC 10106 的结果分析

Table 1 Analysis of the inhibition of polymyxin B against <i>P. chrysogenum</i> ATCC 10106					
项目	斜率	RSD/%	截距	RSD/%	R^2
多黏菌素 B 抑制 <i>P. chrysogenum</i> ATCC 10106	11.74 $\pm$ 0.461	3.93	22.20 $\pm$ 0.369	1.66	0.9953

表 2 孢子浓度对多黏菌素 B 抑制 *P. chrysogenum* ATCC 10106 的结果分析

Table 2 Analysis of the spore concentration on the inhibition of polymyxin B against *P. chrysogenum* ATCC 10106

孢子浓度 (个/mL)	斜率	RSD/%	截距	RSD/%	R ²
10 ⁵	12.24±0.12 ^a	1.69	19.44±0.09 ^b	0.79	0.9893
10 ⁶	11.45±0.11 ^a	1.68	19.55±0.12 ^b	0.11	0.9978
10 ⁷	11.74±0.27 ^a	3.93	22.20±0.21 ^a	1.66	0.9982

注：不同字母表示同列在 $p<0.05$ 水平上的统计差异性；相同字母表示同列差异不显著。下表同。

2.2 测定方法的条件优化

2.2.1 指示菌孢子浓度优化

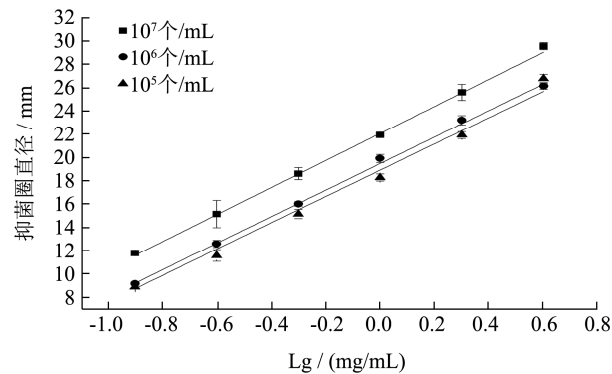


图 3 孢子浓度对多黏菌素 B 抑制 *P. chrysogenum* ATCC 10106 的影响

Fig.3 Effect of the spore concentration on the inhibition of polymyxin B against *P. chrysogenum* ATCC 10106

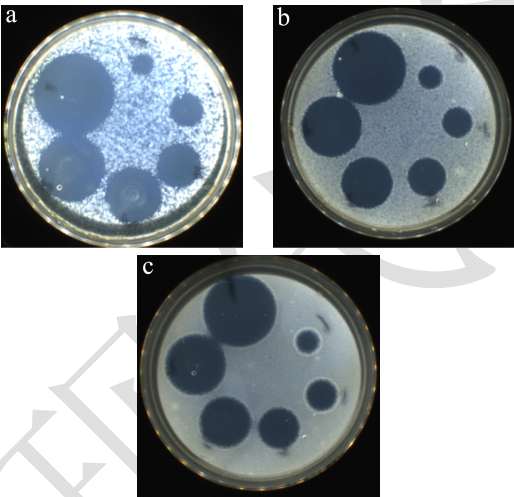


图 4 不同孢子浓度的抑菌试验

Fig.4 Antifungal test with different concentrations of spore

注：a、b 和 c 分别代表指示菌孢子浓度为 10^5 、 10^6 、 10^7 个/mL。

分别采用 10^5 、 10^6 、 10^7 个/mL 浓度的 *P. chrysogenum* ATCC 10106 孢子制备含菌平板，进行多黏菌素 B 的抑菌研究，绘制多黏菌素 B 对数值与抑菌圈直径之间的线性回归方程，结果见图 3。不同的指示菌浓度对斜率、截距及决定系数的结果见表 2。

从图 3 和表 2 可以看出，当孢子浓度为 10^5 个/mL

时，线性相关 ($R^2=0.9893$) 较差；同时试验中还发现，当指示菌浓度较低时，抑菌圈边缘不清晰，存在颗粒感 (如图 4)，易给测量带来较大误差。孢子浓度为 10^6 个/mL 时，截距与斜率的相对标准偏差均较小，线性相关度高，可见其准确度和精密度相对良好，因此，选择 *P. chrysogenum* ATCC 10106 孢子浓度为 $(1\sim5)\times10^6$ 个/mL 作为最佳的指示菌浓度。

2.2.2 抗菌肽添加量条件优化

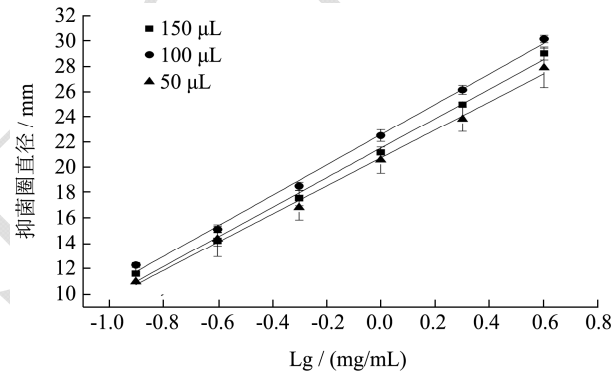


图 5 抗菌肽添加量对多黏菌素 B 抑制 *P. chrysogenum* ATCC 10106 的影响

Fig.5 Effect of the peptide addition amount on the inhibition of polymyxin B against *P. chrysogenum* ATCC 10106

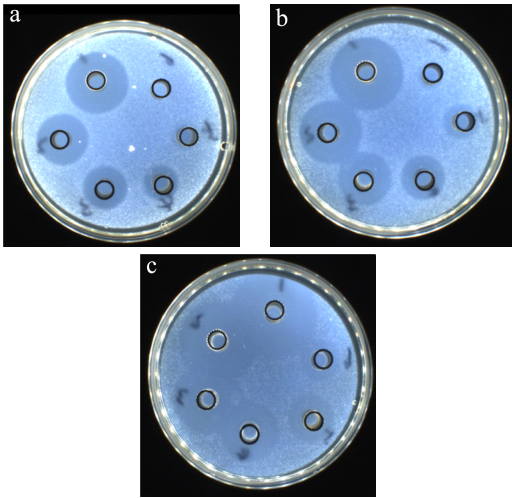


图 6 不同抗菌肽添加量的抑菌实验

Fig.6 Antifungal test with different peptide addition amount

注：a、b 和 c 分别代表抗菌肽添加量 50、100、150 μL 。

采用 $(1\sim5)\times10^6$ 个/mL 浓度的 *P. chrysogenum* ATCC 10106 孢子制备含菌平板，进行多黏菌素 B 的

抑菌研究,多黏菌素 B 添加量分别为 50 μL 、100 μL 、150 μL ,绘制多黏菌素 B 对数值与抑菌圈直径的线性回归方程,结果见图 5。不同的指示菌浓度对斜率、截距及决定系数的结果见表 3。

从图 5 和图 6 可以看出,多黏菌素 B 添加量为 50 μL 时的抑菌效果不明显;添加量为 150 μL 时,抑菌

圈直径过大,相邻的抑菌圈相连,影响试验结果的测定,并且抗菌肽在一定时间内不能完全扩散;当添加量为 100 μL 时,斜率和截距的相对标准偏差均较小,线性相关度高 ($R^2=0.9963$),可见其准确度和精密度好(表 3)。因此,选择多黏菌素 B 添加量 100 μL 作为试验最佳条件。

表 3 抗菌肽添加量对多黏菌素 B 抑制 *P. chrysogenum* ATCC 10106 的结果分析

Table 3 Analysis of the peptide addition amount on the inhibition of polymyxin B against *P. chrysogenum* ATCC 10106

多黏菌素 B 添加量/ μL	斜率	RSD/%	截距	RSD/%	R^2
50	11.08 ± 0.517^a	8.08	18.77 ± 0.052^b	5.19	0.9952
100	12.00 ± 0.089^a	1.29	20.61 ± 0.010^a	1.05	0.9963
150	11.66 ± 0.478^a	7.09	19.54 ± 0.017^a	1.73	0.9942

表 4 培养时间对多黏菌素 B 抑制 *P. chrysogenum* ATCC 10106 的结果分析

Table 4 Analysis of the culture time on the inhibition of polymyxin B against *P. chrysogenum* ATCC 10106

培养时间/h	斜率	RSD/%	截距	RSD/%	R^2
18	11.14 ± 0.44^a	6.44	18.34 ± 0.46^b	3.99	0.9963
24	11.21 ± 0.12^a	1.69	19.99 ± 0.09^a	0.08	0.9958
30	11.39 ± 0.24^a	3.75	19.47 ± 0.11^a	1.07	0.9942

2.2.3 培养时间条件优化

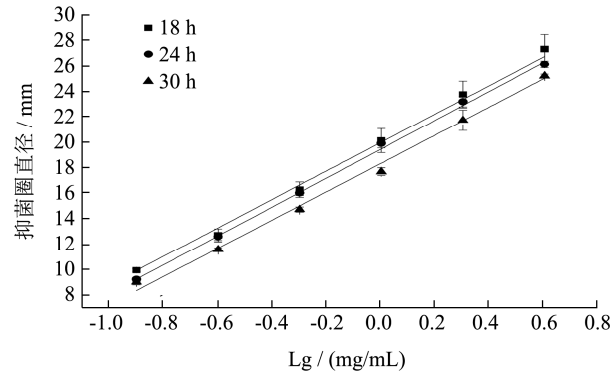


图 7 培养时间对多黏菌素 B 抑制 *P. chrysogenum* ATCC 10106 的影响

Fig.7 Effect of the culture time on the inhibition of polymyxin B against *P. chrysogenum* ATCC 10106

采用 10^6 个/mL 浓度的 *P. chrysogenum* ATCC 10106 孢子制备含菌平板,进行多黏菌素 B 的抑菌研究,多黏菌素 B 添加量为 100 μL ,培养时间 18~30 h,绘制多黏菌素 B 对数值与抑菌圈直径的线性回归方程,结果见图 7。不同的指示菌浓度对斜率、截距及决定系数的结果见表 4。

从图 7、8 以及表 4 可以看出,培养时间为 18 h 时,斜率和截距的相对标准偏差较大,且根据实际情况,在试验过程当中,18 h 菌落还没有完全覆盖培养基;而 30 h 已经有部分菌丝产生,在结果测量过程中,均可能影响试验结果的准确性;培养 24 h 时,其斜率和截距的相对标准偏差较小,线性相关性高,精密度和准确度好,故选择培养 24 h 作为方法测定的适宜培

养时间。

多黏菌素 B 对 *P. chrysogenum* ATCC 10106 的定量测定条件为:指示菌孢子浓度为 $(1\sim5)\times10^6$ 个/mL,多黏菌素 B 添加量 100 μL ,4 $^{\circ}\text{C}$ 预扩散时间 6~10 h,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养时间为 24 h,在此条件下计算多黏菌素 B 对 *P. chrysogenum* ATCC 10106 的抑菌活力为 524.81 U/mg。

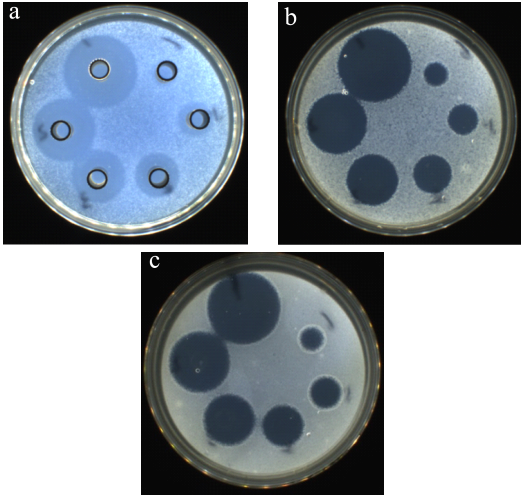


图 8 不同培养时间的抑菌试验

Fig.8 Antifungal test with different culture time

注: a、b 和 c 分别代表培养 18、24、30 h。

2.3 验证实验

采用 *A. niger* ATCC 16404 对上述建立的抑菌定量测定方法进行验证,结果见图 9 和表 5。

从图 9 和表 5 可以看出,多黏菌素 B 对 *A. niger*

ATCC 16404 抑制试验的重复性和精密度较好,说明建立的多黏菌素B抑制霉菌的定量测定方法具有较强

的适用性。在此条件下测得多黏菌素 B 对 *A. niger* ATCC 16404 的抑菌活力为 605.76 U/mg。

表 5 多黏菌素 B 抑制 *A. niger* ATCC 16404 的结果分析

Table 5 Analysis of the inhibition of polymyxin B against *A. niger* ATCC 16404

项目	斜率	RSD/%	截距	RSD/%	R ²
多黏菌素 B 抑制 <i>A. niger</i> ATCC 16404	11.85±0.255	3.72	21.12±0.117	0.96	0.9964

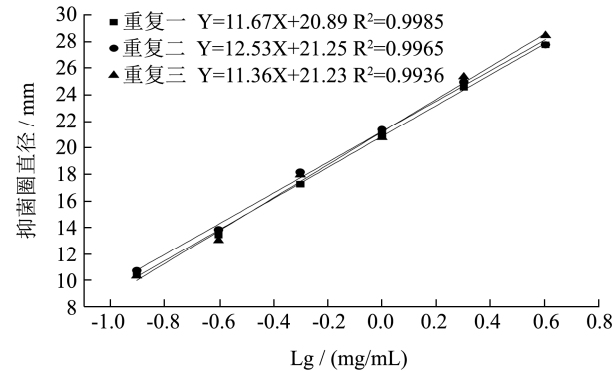


图 9 抗菌肽浓度对数值与抑菌圈直径之间的线性关系

Fig.9 Linear relationship between logarithm of antifungal peptide concentration and diameter of inhibition zone diameter

3 结论

采用琼脂扩散法,通过优化多黏菌素 B 抑制 *P. chrysogenum* ATCC 10106 的测定条件,获得其定量测定的适宜条件为:指示菌孢子浓度为 (1~5) ×10⁶ 个/mL,多黏菌素 B 添加量 100 μL,4℃预扩散时间 6~10 h,28℃培养时间 24 h,90 mm 平板中添加 PDA 培养基 15 mL。进一步采用 *A. niger* ATCC 16404 进行方法准确性的验证,结果显示其重复性和稳定性较好。本研究建立的基于抗菌肽浓度与抑菌圈直径之间线性关系的定量测定方法具有成本低、操作简单、重复性好、普适性高等特点,可以广泛应用于抗菌肽研究的相关领域,为抗菌肽的进一步应用奠定基础。

参考文献

[1] Cao J, De la F C, Ou R W, et al. Yeast-based synthetic biology platform for antimicrobial peptide production [J]. *Acs Synthetic Biology*, 2018, 7(3): 896-902

[2] Kang H K, Kim C, Seo C H, et al. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review [J]. *Journal of Microbiology*, 2017, 55(1): 1-12

[3] Liu S, Fan L, Sun J, et al. Computational resources and tools for antimicrobial peptides [J]. *Journal of Peptide Science*, 2017, 23(1): 4-12

[4] Reddy K V R, Yedery R D, Aranha C. Antimicrobial peptides: premises and promises [J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2004, 24(6): 536-547

[5] 田俊. 苜蓿子挥发油抗食品腐败真菌活性、作用机理及天然防腐剂的开发研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2012

TIAN Jun. Studies on antifungal activity, mechanism against food spoilage fungi and development of a natural preservative of essential oil from dill [D]. Wuhan: Wuhan University, 2012

[6] Sierra J M, Fusté E, Rabanal F, et al. An overview of antimicrobial peptides and the latest advances in their development [J]. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2017, 17(6): 663-676

[7] Méndez-samperio P. The human cathelicidin hCAP18/LL-37: a multifunctional peptide involved in mycobacterial infections [J]. *Peptides*, 2010, 31(9): 1791-1798

[8] Tatjana K, Andrejus C, Sandra M, et al. Nisin-loaded pectin nanoparticles for food preservation [J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 54: 49-56

[9] 陈亮, 秦素雅, 衡军影, 等. 微生物抗菌肽在食品工业中的应用研究进展[J]. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2018, 39(5): 119-126

CHEN Liang, QIN Su-ya, HENG Jun-ying, et al. Research and application advances of antimicrobial peptides in Food industry. [J]. *Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition)*, 2018, 39(5): 119-126

[10] 金红, 叶锐, 徐晶, 等. 抗菌肽对食品腐败菌抑制效果的研究进展[J]. *农产品加工*, 2018, 5: 59-63

JIN Hong, YE Rui, XU Jing, et al. Research progress of antibacterial peptides in inhibiting Food degradation bacteria [J]. *Farm Products Processing*, 2018, 5: 59-63

[11] 吴克刚, 崔绮婷, 董艳, 等. 芳香植物精油对食品常见腐败微生物抗菌活性的研究[J]. *现代食品科技*, 2017, 33(4): 120-127, 81

WU Ke-gang, CUI Qi-chang, DONG Yan, et al. Antimicrobial effects of edible plant essential oils on common food spoilage microorganisms [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2017, 33(4): 120-127, 81

[12] Liu Z, Zeng M, Dong S, et al. Effect of an antifungal peptide from oyster enzymatic hydrolysates for control of gray mold (*Botrytis cinerea*) on harvested strawberries [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2007, 46: 95-98

- [13] 郝曼.大豆球蛋白碱性肽对霉菌的抑制特性及其应用研究[D].济南:齐鲁工业大学,2016
HAO Man. Antifungal property of glycinin basic peptide and its application research [D]. Jinan: Qilu University of Technology, 2016
- [14] 黄现青,别小妹,吕凤霞,等.枯草芽孢杆菌 fmbJ 产脂肽抑制点青霉效果及其桃防腐试验[J].农业工程学报,2008,124(1):263-267
HUANG Xian-qing, BIE Xiao-mei, LYU Feng-xia, et al. Inhibitory effect of lipopeptides from *Bacillus Subtilis* fmbJ on *Penicillium notatum* and its antisepsis to peach [J]. Transactions of the CSAE, 2008, 124(1): 263-267
- [15] 孙卉,师俊玲,杨保伟.枯草芽孢杆菌 CCTCC M207209 对苹果采后致腐真菌的抑制作用[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2009,37(12):168-174
SUN Hui, SHI Jun-ling, YANG Bao-wei. Antifungal activity of *Bacillus subtilis* CCTCC M207209 on rot-causing fungi in postharvest apples [J]. Journal of Northwest A & University (Nat. Sci. Ed.), 2009, 37(12): 168-174
- [16] 刘尊,汪勇, Martin J T R,等.亚麻籽环肽混合物抑制霉菌生长繁殖活性[J].食品与发酵工业,2018,44(3):30-34
LIU Zun, WANG Yong, Martin J T R, et al. Antifungal activity of flaxseed cyclolinopeptides mixtures [J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(3): 30-34
- [17] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(第四部)[M].北京:中国医药科技出版社,2015
National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Edition IV) [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2015
- [18] Wiegand I, Kai H, Hancock R E W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances [J]. Nature Protocols, 2008, 3(2): 163-175
- [19] 邵盛男,王伟.大口黑鲈抗菌肽提取及抑菌活性初步研究[J].渔业信息与战略,2018,33(3):201-205
SHAO Sheng-nan, WANG Wei. Identification of antibacterial activity of antimicrobial peptides in largemouth bass [J]. Fishery Information & Strategy, 2018, 33(3): 201-205
- [20] Cabañas R, Abarca M L, Bragulat M R, et al. *In vitro* activity of imazalil against *Penicillium expansum*: Comparison of the CLSI M38-A broth microdilution method with traditional techniques [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 129(1): 26-29
- [21] 王志新,李昌旺,宏丹,等.多粘菌素 B 抑制丝状真菌的定量测定方法研究[J].食品工业科技,2019,40(8):207-214,220
WANG Zhi-xin, LI Chang-wang, HONG Dan, et al. Study on the quantitative determination method of polymyxin B against filamentous fungi [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(8): 207-214, 220
- [22] 王辉,曾晓房,冯卫华,等.柠檬皮中的柠檬苦素对青霉的抑菌活性和机理[J].食品与发酵工业,2019,45(5):75-79
WANG Hui, ZENG Xiao-fang, FENG Wei-hua, et al. Antifungal activity and mechanism of limonoids from lemon peel against *Penicillium* [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(5): 75-79
- [23] 魏东东,刘杨柳,王志新,等.基于琼脂扩散法的抗菌肽定量测定方法优化[J].食品研究与开发,2018,39(17):105-110
WEI Dong-dong, LIU Yang-liu, WANG Zhi-xin, et al. Optimization of quantitative determination of antimicrobial peptides by agar diffusion method [J]. Food Research and Development, 2018, 39(17): 105-110
- [24] Tramer J, Fowler G G. Estimation of nisin in foods [J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 1964, 15(8): 522-528

(上接第 222 页)

- [20] 胡本琼.面包中比容的测定[J].计量与测试技术,2002,6:39
HU Ben-qiong. Method for the determination of specific volume in bread [J]. Metrology & Measurement Technique, 2002, 6: 39
- [21] 李远志,郑素霞,罗树灿,等.真空微波加工马铃薯脆片的工艺特性[J].食品与发酵工业,2003,29(8):40-43
LI Yuan-zhi, ZHENG Su-xia, LUO Shu-can, et al. Study on the processing characteristics of potato crisps chips by vacuum micro-wave [J]. Food and Fermentation Industries, 2003, 29(8): 40-43
- [22] 熊永森,王俊,王金双,等.微波干制胡萝卜片试验研究[J].科技通报,2002,18(3):251-255,260
XIONG Yong-sen, WANG Jun, WANG Jin-shuang, et al. A study on the microwave drying carrot slices [J]. Bulletin of Science and Technology, 2002, 18(3): 251-255, 260