

金抗肽 SIF₄ 对大肠杆菌基于细胞壁靶点的非细胞质膜损伤抑菌机理

李玉珍¹, 肖怀秋^{*1,2}, 刘 淼¹, 王 琳¹, 曾梦琪¹, 赵谋明²

(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. 华南理工大学 食品科学与工程学院, 广东 广州 510000)

摘要: 为阐明金抗肽 SIF₄ 对食源性大肠杆菌基于细胞壁靶点的非细胞质膜损伤抑菌机理, 研究了 SIF₄ 对细胞壁损伤的影响、与细胞壁脂多糖竞争性结合机理及对细胞壁膜组分影响机理, 并运用扫描电镜分析了菌体形貌变化。研究发现, SIF₄ 对菌体细胞壁有破坏作用, 在一定浓度范围内, 细胞壁受损与 SIF₄ 处理时间和处理剂量呈正相关, 且组间差异显著 ($P < 0.05$); SIF₄ 可与细胞壁脂多糖 (LPS) 竞争性结合, 结合量为 256 mg/L 或更大时, 表现无抑菌活性; 傅立叶变换红外光谱 (FT-IR) 分析发现, SIF₄ 对细胞壁多糖信息区、蛋白质与脂肪酸混合信息区影响明显, 揭示细胞壁是潜在抑菌效应靶点; 扫描电镜 (SEM) 分析发现, SIF₄ 可破坏菌体细胞壁膜结构并改变菌体形貌。研究认为, SIF₄ 可基于细胞壁损伤靶点作用于大肠杆菌并实现高效抑菌活性, 研究结果可为阐明基于细胞壁靶点的非细胞质膜损伤抑菌机理和食源性大肠杆菌生物防控提供依据。

关键词: 金抗肽; 细胞壁; 大肠杆菌; 非细胞质膜损伤; 抑菌机理

中图分类号: TS201.3 文章编号: 1673-1689(2023)06-0078-06 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2023.06.010

Non-Cytoplasmic Membrane Damage Antimicrobial Mechanism of Metal Antimicrobial Peptide SIF₄ Against *Escherichia coli* Based on Cell Wall Target

LI Yuzhen¹, XIAO Huaiqiu^{*1,2}, LIU Miao¹, WANG Lin¹, ZENG Mengqi¹, ZHAO Mouming²

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

Abstract: To elucidate the non-cytoplasmic membrane damage antimicrobial mechanism of metal antimicrobial peptide SIF₄ against foodborne *Escherichia coli* (*E. coli*) based on cell wall target, the effect of SIF₄ on cell wall damage, the competitive binding mechanism of SIF₄ with cell wall lipopolysaccharide (LPS), and the effect of SIF₄ on cell wall membrane components were investigated, and the changes in cell morphology of strain were analyzed using scanning electron microscopy. Results displayed that SIF₄ could destroy the bacterial cell wall. Within a certain concentration range, the damage to the cell wall was positively correlated with the treatment time and

收稿日期: 2022-08-11

基金项目: 湖南省自然科学基金科教联合基金项目 (2022JJ60046 和 2021JJ600040)。

作者简介: 李玉珍 (1981—), 女, 硕士, 副教授, 主要从事食源性致病微生物生物控制方面的研究。E-mail: yuzhenli@163.com

* 通信作者: 肖怀秋 (1981—), 男, 苗族, 硕士, 教授, 主要从事食品抗菌与保鲜研究。E-mail: xiaohuaiqiu@163.com

treatment dose of SIF₄, and the difference between groups was significant ($P<0.05$). SIF₄ could competitively bind with lipopolysaccharides (LPS), however, no antibacterial activity was observed when the binding amount exceeded 256 mg/L. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) analysis revealed that SIF₄ had a significant impact on cell wall polysaccharide information area, as well as the mixed information area of protein and fatty acid, indicating that cell wall was the potential antimicrobial targets. Scanning electron microscope (SEM) analysis showed that SIF₄ could destroy the cell wall membrane structure and alter strain morphology. This study suggests that SIF₄ can exert efficient antimicrobial activity against *E. coli* based on cell wall damage target. Research results could provide supports for elucidating the mechanism of non-cytoplasmic membrane damage based on cell wall targets and biological control of foodborne *E. coli*.

Keywords: metal antimicrobial peptide, cell wall, *Escherichia coli*, non-cytoplasmic membrane damage, antimicrobial mechanism

食品富含碳水化合物、蛋白质和脂肪等营养成分,在其加工链各节点均极易受到食源性致病菌污染,既影响营养价值,还可产生潜在生物毒素,食源性致病菌(foodborne pathogen)以大肠菌群污染和大肠杆菌超标为主,是引起食品公共安全事故与食物中毒的重要病原菌^[1]。吴萱等从北京 6 个辖区的大型超市和农贸市场随机采集 259 份生鲜肉样本,大肠杆菌检出率为 65.25%,对甲氧苄氨嘧啶-磺胺甲恶唑高度耐药,其次为多西环素^[2];张耀文等采用大肠杆菌荧光 PCR 试剂盒对采集的 90 份生鲜驼乳进行致病性大肠杆菌检测发现,大肠杆菌检出率为 20%^[3];刘文双等分析山东不同地区蛋鸡养殖场分离的 440 株大肠杆菌 *bla*_{CTX-M} 基因流行情况及耐药性,32.27% 菌株携带 *bla*_{CTX-M} 基因,携带 *bla*_{CTX-M} 基因菌株阿莫西林耐药率最高,四环素耐药率次之^[4]。

抗菌肽具有抗菌谱广、稳定性好、特异性强、对哺乳动物细胞毒副作用少且不易产生耐药性等优势,可多靶点作用于食源性致病菌,是最具潜力的抗生素替代品,特别适用于多重耐药性食源性致病菌抑制^[5-6]。由于抗菌肽结构和抑菌机理的多样性,存在多种抑菌假说模型^[5]。Alamethicin 通过 α -螺旋肽结构以“桶板模型”增强细胞质膜通透性并抑制菌体增殖^[7],Cecropin A 以“毯式模型”靶向作用于细胞质膜脂质双分子层^[8]。大量研究^[9-11]认为,细胞质膜通透性改变和结构受损是最重要且最关键的抑菌机理,但有部分抗菌肽在细胞膜表面形成跨膜孔道进入膜内并导致细胞质膜透性增加,却未直接导致菌体死亡,也就说抗菌肽存在其他非细胞质膜损伤效应靶点^[5]。课题组前期基于细胞质膜损伤角度研

究了金属抗菌肽(简称金抗肽)SIF₄ 对大肠杆菌抑菌机制发现,SIF₄ 可破坏细胞质膜结构、增强细胞质膜通透性、诱导膜去极化和膜氧化损伤,导致胞内物质泄漏并造成细胞聚沉,并对大肠杆菌细胞壁有破坏作用^[12-13],但基于细胞壁靶点的非细胞质膜抑菌机理还不清楚。因此,为阐明金抗肽 SIF₄ 基于细胞壁损伤靶点的非细胞质膜抑菌机理,作者从细胞壁损伤靶点研究了 SIF₄ 对大肠杆菌的非细胞质膜损伤机理,以期为食源性大肠杆菌生物防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

金抗肽 SIF₄:作者所在课题组自制^[12];大肠杆菌 ATCC25922:上海保藏生物技术中心获得;牛肉膏、蛋白胨、NaCl、曲拉通(Triton-X100):国药集团;细胞壁脂多糖:北京索莱宝科技有限公司;多粘菌素 B:南京都莱生物技术有限公司;其他试剂:国产分析纯。

1.2 仪器与设备

JEM-7500F 型扫描电子显微镜:日本株式会社;UV-2600 紫外可见分光光度计、IRPrestige-21 傅立叶变换红外光谱仪:日本岛津公司。

1.3 方法

1.3.1 对细胞壁损伤的影响 参照文献[14]并修改。将已活化的大肠杆菌接种至牛肉膏蛋白胨液体培养基中,37 ℃、120 r/min 培养 12 h,4 000 r/min 离心 10 min,收集菌体。用 PBS 溶液(0.03 mmol/L, pH 7.2)稀释至 OD_{630 nm} 为 0.1~0.3。在 96 孔细胞培

养板中每组每孔先加入 100 μ L 菌液并分为 3 组: A 组每孔加入 50 μ L PBS 缓冲液 (阴性对照); B 组每孔加入 50 μ L TritonX-100 (质量浓度为 300 mg/L, 阳性对照); C 组每孔加入 50 μ L SIF₄, 终质量浓度为 1/2MIC、MIC 和 2MIC (MIC = 0.4 mg/L), 振荡均匀后于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养 120 min, 每间隔 30 min 测定 $A_{630\text{nm}}$ 。

1.3.2 与细胞壁脂多糖竞争性结合抑制分析 以大肠杆菌 ATCC25922 为供试菌株, 参考刘天琪^[15]等方法并修改。将 SIF₄ 与脂多糖 (LPS) 预先孵育后再测定细胞存活率以验证 SIF₄ 与细胞壁脂多糖竞争性结合机制。用无菌 PBS 溶液配制 SIF₄ 溶液并与质量浓度为 1 024、512、256、128、64、32、16、8、4、2 mg/L 和 1 mg/L 的大肠杆菌细胞壁脂多糖等体积混合 (终质量浓度为 1MIC), 37 $^{\circ}$ C 共育 60 min; 将共育物与等体积大肠杆菌 (1×10^6 CFU/mL) 于 37 $^{\circ}$ C 温育 2 h; 吸取 0.1 mL 菌液涂布于牛肉膏蛋白胨平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 计数菌落斑数并计算细胞存活率, 以多粘菌素 B (终质量浓度为 1 g/L) 作为阳性对照。

1.3.3 对菌体细胞壁膜组分的影响 参照 Helm 等方法并修改^[16]。将对数生长期菌体于 4 000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀, 用 PBS 溶液将菌体洗涤 3 次并重悬 ($OD_{630\text{nm}}$ 为 0.1~0.3)。取适量 SIF₄ 与等体积大肠杆菌于 37 $^{\circ}$ C 温育 2 h (终质量浓度为 1MIC), 取共培养物置于 KBr 透明光学晶片中, 减压干燥成透明膜状物, 按中国药典方法校准仪器, 对比分析 SIF₄ 处理前后菌体细胞壁膜组分红外光谱位移规律, 解析 SIF₄ 处理对菌体细胞壁组分的影响机制。

1.3.4 对菌体形貌的影响 样品制备参考 Zhang 等方法并修改^[17]。取对数期菌体于 4 000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀, 用 PBS 溶液洗涤数次并重悬; 将菌悬液与 SIF₄ 等体积混合 (终质量浓度为 1/2 MIC、1MIC 和 2MIC), 37 $^{\circ}$ C 温育 2 h, 4 000 r/min 离心 10 min, 加入戊二醛 (终体积分数为 2.5%) 固定过夜, 用 PBS 洗 2 遍, 再用乙醇梯度洗脱 (体积分数为 30%、50%、70%、85%、90% 各 1 次, 体积分数 100% 2 次) 10 min, 滴于洁净盖玻片烘干, 将盖玻片粘在样品台上并经离子溅射喷金和扫描电镜观察菌体表面形貌变化, 对照组为 PBS 组。

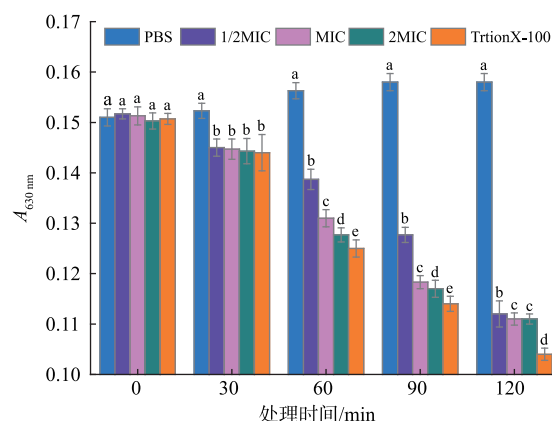
1.3.5 数据处理方法 试验重复测定 3 次, 试验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS25.0 单因素方差检验进行组内均数差异多重比较, 方差齐性时采用最小显

著性差异法, 非齐性时使用塔姆黑尼 T2 方法。

2 结果与分析

2.1 对细胞壁损伤的影响

细胞壁在菌体保护、形态维持、细胞增殖和信号转导等方面有重要作用, 一旦受损, 对细胞形态与胞内生物分子功能有重要影响^[18]。SIF₄ 对菌体细胞壁影响见图 1。



相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$), 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图 1 SIF₄ 对菌体细胞壁损伤的影响

Fig. 1 Effect of SIF₄ on cell wall damage

由图 1 可看出, 对照组 $A_{630\text{nm}}$ 吸光值随处理时间增加呈递增趋势, 表明菌体生长没有受到影响; SIF₄ 处理 30 min 时, 试验组组间差异不显著 ($P > 0.05$), 但与对照组差异显著 ($P < 0.05$); 处理 60、90、120 min 时, 组间差异显著 ($P < 0.05$), 且随着处理时间和处理剂量增加, $A_{630\text{nm}}$ 值呈显著下降趋势 ($P < 0.05$)。表明菌体细胞壁受到不同程度损伤, 使细胞壁通透性增加, 与抗菌肽 MDpep9 对大肠杆菌细胞壁影响相似^[14]。TritonX-100 可破坏菌体细胞壁, 导致细胞壁结构变形, 从而有助于抗菌肽插入细胞膜和影响胞内物质生物合成, TritonX-100 可能以“毯式模型”介入细胞膜并进入胞内, SIF₄ 对大肠杆菌作用机制类似 TritonX-100, 但显著低于其对菌体细胞壁的破坏作用 ($P < 0.05$)。抗菌肽主要通过抑制细胞壁合成和 (或) 直接破坏细胞壁实现抑菌活性^[5], 如人源抗菌肽 β -defensin3 能抑制细胞壁形成并使细胞壁穿孔, 破坏细胞正常形态而最终导致细菌死亡^[19], sarcotoxins II 能抑制细胞壁合成而使菌体细胞形态维持受阻, 从而阻碍菌体正常生长^[20], 而家蝇抗

菌肽则可破坏大肠杆菌细胞壁结构完整性^[14]。SIF₄对细胞壁的破坏作用可能是因为金抗肽 SIF₄ 为金属阳离子抗菌肽,可与细胞壁负电性脂多糖竞争性结合破坏细胞壁结构,并与细胞壁负电荷区域结合导致菌体形变等有关^[12,21]。

2.2 与细胞壁脂多糖竞争性结合抑制分析

脂多糖(LPS)是革兰氏阴性菌细胞壁外壁的一层较厚的类脂多糖类物质,是抗菌肽主要的非细胞质膜效应靶点^[22]。SIF₄与细胞壁脂多糖竞争性结合试验结果见表1。

表1 SIF₄与脂多糖竞争性结合试验结果

Table 1 Competitive binding results between SIF₄ and LPS

序号	组别	细胞存活率/%
1	1 g/L 多粘菌素 B	1.17 ± 0.81 ^a
2	1 mg/L LPS	1.87 ± 0.81 ^a
3	2 mg/L LPS	3.73 ± 0.40 ^a
4	4 mg/L LPS	4.43 ± 0.81 ^{a,b}
5	8 mg/L LPS	18.42 ± 1.76 ^c
6	16 mg/L LPS	46.85 ± 1.40 ^d
7	32 mg/L LPS	66.43 ± 1.21 ^e
8	64 mg/L LPS	93.71 ± 1.40 ^f
9	128 mg/L LPS	96.74 ± 1.76 ^g
10	256 mg/L LPS	100.71 ± 1.40 ^h
11	512 mg/L LPS	100.93 ± 1.07 ^h
12	1 024 mg/L LPS	100.70 ± 1.40 ^h

注:相同字母表示组间差异不显著($P > 0.05$),不同字母表示组间差异显著($P < 0.05$)。

由表1可看出,随着LPS质量浓度升高,SIF₄抑菌活性降低(细胞存活率上升),说明SIF₄可与LPS有效结合并影响抑菌活性。SIF₄与LPS结合效率越高,游离SIF₄越少,抑菌效率就越低,否则抑菌效率就越高^[23]。在LPS质量浓度为256 mg/L时,细胞存活率为(100.71 ± 1.40)%,SIF₄不再具备抗菌活性,表明SIF₄和LPS最大结合量可达到256 mg/L,研究结论与抗菌肽API6-A类似^[23]。研究还发现,SIF₄在质量浓度1~4 mg/L时与多粘菌素B对细胞存活率影响无显著差异($P > 0.05$),多粘菌素B可与细菌外膜LPS结合,通过破坏细菌外膜渗透性而发挥抑菌活性^[24]。SIF₄为金属阳离子抗菌肽^[12],带正电荷,脂多糖由脂质和多糖构成,带负电荷,能与SIF₄

通过静电吸附作用发挥抗菌活性,也有可能是SIF₄结构中的Fe²⁺可取代Zn²⁺、Mg²⁺等维持脂多糖结构稳定的金属离子,从而发挥良好抑菌活性^[25]。

2.3 对菌体细胞壁膜组分的影响

傅立叶变换红外光谱(FT-IR)能提供特征性基团吸收光谱谱带,分析微生物细胞红外光谱谱带可用于微生物细胞与微生物组分的鉴别^[16,26]。SIF₄处理前后菌体细胞壁膜红外光谱见图2。

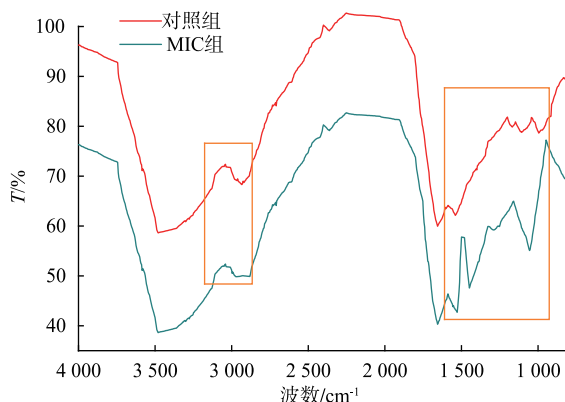


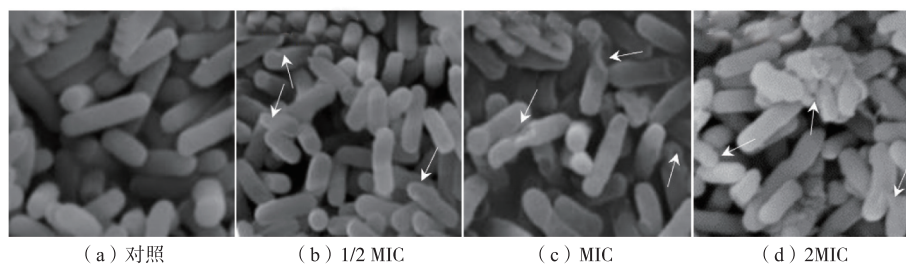
图2 SIF₄对细胞壁膜组分的影响

Fig. 2 Effect of SIF₄ on cell wall membrane components

FT-IR提供的分子特征基团吸收光谱带可用于描述细胞壁膜组分信息,其中,900~500 cm⁻¹为指纹信息区;1 200~900 cm⁻¹为细胞壁多糖信息区;1 500~1 200 cm⁻¹为蛋白质和脂肪酸混合信息区域;1 800~1 500 cm⁻¹为多肽酰胺和蛋白质信息区;3 000~2 800 cm⁻¹为脂肪酸信息区^[26]。当抗菌肽结合菌体细胞壁并破坏细胞壁膜结构时,可引起红外光谱图谱特征区吸收光谱的改变。由图2可看出,与对照组相比,试验组(1MIC组)在1 200~900、1 500~1 200、3 000~2 800 cm⁻¹的3个区间红外光谱吸收峰变化明显,分别对应细胞壁多糖信息区、蛋白质与脂肪酸混合信息区、脂肪酸信息区,表明SIF₄对细胞壁多糖信息区、蛋白质与脂肪酸混合信息区以及脂肪酸信息区域有一定影响,特别是1 200~900 cm⁻¹和1 500~1 200 cm⁻¹区域影响最明显,揭示细胞壁是金抗肽SIF₄的潜在抑菌效应靶点^[12-13]。

2.4 对菌体形貌的影响

扫描电镜(SEM)是观察微生物菌体形貌最有效的手段,通过电子束对样品外在结构扫描得到三维立体构造,SIF₄对菌体形貌影响见图3。

图3 SIF₄处理对菌体形貌的影响Fig. 3 Effect of SIF₄ treatment on strain morphology

由图3可看出,对照组菌体微观结构没有发生明显改变,菌体呈清晰杆状,菌体细胞壁膜结构完整且表面平滑,见图3(a)。1/2MIC SIF₄处理后,部分菌体细胞壁膜变粗糙,出现轻微坍塌,菌体表面开始出现皱缩,细胞壁膜结构完整性遭到一定程度破坏,见图3(b)。1MIC SIF₄处理后,菌体除表面出现皱缩和凹陷外,部分菌体的细胞膜出现明显崩塌,见图3(c)。2MIC SIF₄处理后,菌体表面凹陷和皱缩现象更为明显,胞内原生质体有泄漏,可观测到有部分菌体出现聚集现象,见图3(d)。可能是由于菌体与SIF₄互作后,细胞壁膜结构完整性遭到破坏,使胞内蛋白质和核酸等原生质组分泄漏,从而使结构受损细胞产生的细胞碎片与坍塌的菌体出现聚集。课题组前期研究观察到,SIF₄可破坏细胞壁(膜)结构并使胞内容物泄漏,可增强表面疏水性和降低表面zeta电位,造成细胞聚沉和生物代谢紊乱^[12],SIF₄对菌体细胞壁膜影响机理与抗菌肽P7相似^[27]。

3 结 语

从细胞壁损伤、细胞壁脂多糖竞争性结合、细胞壁膜组分衍变及菌体形貌改变等方面系统研究了SIF₄对基于细胞壁损伤靶点的大肠杆菌非细胞质膜损伤抑菌机理。研究发现,SIF₄可破坏大肠杆菌细胞壁结构,在一定质量浓度范围内,细胞壁受损与SIF₄处理时间和处理剂量呈正相关且组间差异显著($P<0.05$),细胞壁受损可使细胞壁通透性增加;SIF₄可与大肠杆菌细胞壁脂多糖(LPS)有效结合,与LPS结合量达到256 mg/L或更大时,抑菌活性消失。FT-IR分析发现,SIF₄对细胞壁多糖信息区和蛋白质与脂肪酸混合信息区影响最明显,表明细胞壁可能是SIF₄潜在抑菌效应靶点。SEM观测发现,随着SIF₄处理剂量的增加,菌体形貌可出现壁膜变糙、轻微坍塌、表面皱缩、表面崩塌、原生质泄漏及细胞聚集等递进现象,SIF₄可使菌体形貌发生显著改变。

参考文献:

- [1] LI Y, PEI X Y, BAI L, et al. The China national foodborne pathogen surveillance system: twenty years of experience and achievements[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2021, 18(8): 519-527.
- [2] 吴萱, 杨璐, 刘艳超, 等. 北京市售鸡肉和猪肉中大肠杆菌污染情况及耐药特征分析[J]. *中国食品卫生杂志*, 2022, 34(2): 211-216.
- [3] 张耀文, 蔡扩军, 徐敏. 生驼乳中大肠杆菌的污染情况调查[J]. *中国畜牧业*, 2022(13): 41-42.
- [4] 刘文双, 魏秀丽, 赵云亭, 等. 山东地区蛋鸡源大肠杆菌 CTX-M 型超广谱 β -内酰胺酶耐药基因的流行传播研究[J]. *山东农业科学*, 2022, 54(9): 142-147.
- [5] 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.
- [6] 肖怀秋, 李玉珍, 林亲录. 金属抗菌肽 SIF₄ 对金黄色葡萄球菌细胞通透性的影响机制[J]. *食品与生物技术学报*, 2023, 42(2): 97-103.
- [7] LI Y, QI X, ZHANG Q, et al. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application[J]. *Peptides*, 2012, 37(2): 207-215.
- [8] MARASSI F M, OPELLA S J, JUVVADI P, et al. Orientation of Cecropin A helices in phospholipid bilayers determined by solid-state NMR spectroscopy[J]. *Biophysical Journal*, 1999, 77(6): 3152-3155.

- [9] PRIYADARSHINI D, IVICA J, SEPAROVIC F, et al. Characterisation of cell membrane interaction mechanisms of antimicrobial peptides by electrical bilayer recording[J]. **Biophysical Chemistry**, 2022, 281: 106721.
- [10] PANDIDAN S, MECHLER A. Latest developments on the mechanism of action of membrane disrupting peptides [J]. **Biophysics Reports**, 2021, 7(3): 173-184.
- [11] TAN T T, WU D, LI W Z, et al. High specific selectivity and membrane-active mechanism of synthetic cationic hybrid antimicrobial peptides based on the peptide FV7[J]. **International Journal of Molecular Sciences**, 2017, 18(2): 339.
- [12] 肖怀秋, 李玉珍, 林亲录, 等. 金属抗菌肽 SIF₄ 对大肠杆菌的抑菌机制研究[J]. **食品与发酵工业**, 2022, 48(1): 111-116.
- [13] 李玉珍, 肖怀秋, 王琳, 等. 金抗肽 SIF₄ 基于糖代谢途径和细胞质膜氧化损伤的大肠埃希菌抑菌机理[J]. **食品与发酵工业**, 2022, 48(20): 122-129.
- [14] 唐亚丽. 家蝇抗菌肽的分离及对细胞膜和 DNA 的作用[D]. 无锡: 江南大学, 2009.
- [15] 刘天琪. 新型抗菌肽 Anoplin 的 N-甲基化氨基酸替换和 N 端脂肪酸修饰类似物的设计及构效关系研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2020.
- [16] HELM D, NAUMANN D. Identification of some bacterial cell components by FT-IR spectroscopy[J]. **FEMS Microbiology Biology Letters**, 2010, 126(1): 75-79.
- [17] ZHANG F, CUI X W, YAN R, et al. Antimicrobial activity and mechanism of the human milk-sourced peptide Casein201[J]. **Biochemical & Biophysical Research Communications**, 2017, 485(3): 698-704.
- [18] HÖLTJE J V. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*[J]. **Micro-Biology and Molecular Biology Reviews**, 1998, 62(1): 181-203.
- [19] HARDER J, BARTELS J, CHRISTOPHERS E, et al. Isolation and characterization of human β -Defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2001, 276(8): 5707-5713.
- [20] ANDO K, NATORI S. Inhibitory effect of sarcotoxin IIA, an antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina*, on growth of *Escherichia coli*[J]. **Journal of Biochemistry**, 1988, 103(4): 735-739.
- [21] BIERBAUM G, SAHL H G. Induction of autolysis of staphylococci by the basic peptide antibiotics Pep 5 and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes[J]. **Archives of Microbiology**, 1985, 141(3): 249-254.
- [22] PAPO N, SHAI Y. A molecular mechanism for lipopolysaccharide protection of gram-negative bacteria from antimicrobial peptides[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2005, 280(11): 10378-10387.
- [23] 贺晓秋. 基于 HIV-1 MPER 的抗菌肽设计及抗菌机理研究[D]. 吉林: 吉林大学, 2016.
- [24] KANAZAWA K, SATO Y, OHKI K, et al. Contribution of each amino acid residue in polymyxin B (3) to antimicrobial and lipopolysaccharide binding activity[J]. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, 2009, 57(3): 240-244.
- [25] 肖怀秋, 李玉珍, 刘军, 等. 花生肽亚铁金属配位螯合物结构解析及稳态性研究[J]. **中国酿造**, 2019, 38(5): 119-122.
- [26] NAUMANN D, HELM D, LABISCHINSKI H. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy[J]. **Nature**, 1991, 351(6321): 81-82.
- [27] LI L R, SHI Y H, CHENG X R, et al. A cell-penetrating peptide analogue, P7, exerts antimicrobial activity against *Escherichia coli* ATCC25922 via penetrating cell membrane and targeting intracellular DNA[J]. **Food Chemistry**, 2015, 166: 231-239.