

分类号: Q93
学号: 20222106044

密级:
单位代码: 10759

石河子大学

硕士学位论文



伊枯草菌素 A 的分离纯化及抗菌应用

学位申请人

张文静

指导教师

张慧莉 副教授

熊正军 高级工程师

申请学位级别

专业硕士

专业名称

生物与医药

研究领域

生物技术与工程

所在学院

生命科学学院

中国·新疆·石河子

2026年5月

Separation, Purification and Antimicrobial Application of

Iturin A

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Professional Master of Biology & Medicine

By

Zhang Wen-jing

(Microbiology)

Dissertation Supervisor: Prof Zhang Hui-li

April,2026

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：张文静

时间：2026年5月18日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：张文静

时间：2026年5月18日

导师签名：张翠莉

时间：2026年5月18日

摘要

目的：伊枯草菌素 A (Iturin A) 是一种广谱性抗生素，由微生物发酵产生，其发酵液中含有蛋白质、多糖、色素等其他产物，成分复杂。因此伊枯草菌素 A 的分离纯化成本较高，其推广应用受到严重限制。为此，本文旨在构建一套高效的分离纯化工艺，并对其抑菌活性及稳定性进行评价；同时，将伊枯草菌素 A 与海藻酸钠复合成一种便于清洗的薄膜，探究该复合膜对葡萄的保鲜效果，以提高伊枯草菌素 A 在水果保鲜领域的实际应用价值。

方法：以 *Bacillus velezensis* ND 菌株为发酵菌株，首先通过酸化沉淀 pH、酸化沉淀时间，确定酸化沉淀最佳条件，然后通过单因素试验筛选浸提方式、浸提试剂、浸提比例、浸提温度及浸提时间，结合响应面法优化浸提工艺等方式，获得伊枯草菌素 A 最佳提取量。采用单因素试验筛选活性炭用量、脱色时间、脱色温度、脱色 pH 结合响应面试验最终确定活性炭最佳脱色工艺，利用伊枯草菌素 A 在不同溶剂中的溶解度差异进行初步萃取，通过大孔树脂柱层析和硅胶柱层析逐步纯化，以高效液相色谱法检测伊枯草菌素 A 浓度计算其纯度与回收率。进一步通过牛津杯扩散法测定纯化得到的伊枯草菌素 A 对锐顶镰刀菌、尖孢镰刀菌、三线镰刀菌、链格孢霉、黑曲霉、黑根霉、青霉、以及葡萄座束梗尾孢菌的抑菌活性，并评估其在不同 pH、热处理温度及紫外线照射下的稳定性。随后将伊枯草菌素 A 与海藻酸钠混合制得复合膜，并将该复合膜涂抹在葡萄表面，测定了在室温条件下储存不同时间时葡萄的失重率、抗坏血酸含量、可滴定酸和相对电导率，为开发新型的基于伊枯草菌素 A 的葡萄保鲜技术提供理论依据。

结果：（1）响应面优化确定了最佳提取条件，乙醇：水体积比为 7.4:1、温度 76.5°C、时间 1.2 h，平行三组试验，获得最佳提取量 6.02 ± 0.03 g/L。（2）响应面优化确定脱色最佳工艺条件，活性炭用量 1%、脱色时间 42 min、39.4°C、pH6.9，在此试验条件下，实际脱色率为 $65.43 \pm 0.68\%$ ，回收率为 $89.9 \pm 0.44\%$ 。本研究发现水：正丁醇比例 4:1，萃取效果最好，经高效液相色谱(HPLC)检测，纯度为 $19.23 \pm 0.14\%$ ，回收率为 $92.98 \pm 0.48\%$ 。（3）柱层析确定大孔树脂型号 HZ816 为最优，并优化洗脱条件，样液 pH7.8，水洗 120 mL，50%甲醇 120 mL，90%甲醇 100 mL，HPLC 检测纯化后伊枯草菌素 A 纯度为 $35.36 \pm 0.67\%$ ，回收率为 $79.58 \pm 1.19\%$ 。进一步采用硅胶柱层析，洗脱目标产物，最终伊枯草菌素 A 纯度提升至 $84.66 \pm 0.83\%$ ，回收率为 $70.86 \pm 0.83\%$ 。（4）伊枯草菌素 A 处理后会引发真菌（锐顶镰刀菌，尖孢镰刀菌，三线镰刀菌等）的细胞膜透性增大，抑制真菌细胞生长；并具有一定的热稳定性、酸碱稳定性、紫外稳定性。（5）海藻酸钠与伊枯草菌素 A 复合膜处理能有效维持细胞膜的完整性，抑制果实电导率的上升，维持较高的果实重量、抗坏血酸含量、可滴定酸含量，从而延长贮藏期维持葡萄的品质和营养物质。

结论：本研究构建了一种从复杂的发酵液中分离纯化伊枯草菌素 A 的方法，并利用纯化后的伊枯草菌素 A 测定了其对于锐顶镰刀菌、尖孢镰刀菌、三线镰刀菌等的抗菌活性及其抗菌稳定性，发现将葡萄表面涂抹伊枯草菌素 A 与海藻酸钠复合膜，可显著提高葡萄品质。

关键词：伊枯草菌素 A；脱色；柱层析；海藻酸钠；葡萄保鲜

Abstract

Object: Iturin A is a broad-spectrum antibiotic produced by microbial fermentation. Its fermentation broth contains other byproducts such as proteins, polysaccharides, and pigments, resulting in a complex composition. Consequently, the separation and purification of Iturin A are costly, which severely limits its promotion and application. To address this issue, this study aims to establish an efficient separation and purification process and to evaluate its antibacterial activity and stability. Furthermore, Iturin A is combined with sodium alginate to form an easy-to-clean film, and the preservative effect of this composite film on grapes is investigated, with the goal of enhancing the practical application value of Iturin A in the field of fruit preservation.

Method: Using *Bacillus velezensis* ND strain as the fermentation strain, the optimal conditions for acid precipitation were first determined by examining the acid precipitation pH and time. Then, the optimal extraction yield of Iturin A was obtained through single-factor experiments to screen the extraction method, extraction reagent, extraction ratio, extraction temperature, and extraction time, combined with response surface methodology to optimize the extraction process. The optimal decolorization process using activated carbon was determined through single-factor experiments screening activated carbon dosage, decolorization time, decolorization temperature, and decolorization pH, combined with response surface methodology. Preliminary extraction was performed based on the solubility differences of Iturin A in different solvents, followed by stepwise purification using macroporous resin column chromatography and silica gel column chromatography. The concentration of Iturin A was detected by high-performance liquid chromatography to calculate its purity and recovery rate. The purified Iturin A was further used to determine its antifungal activity against *Fusarium acuminatum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium tricinctum*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus nigricans*, *Penicillium* sp., and *Cercospora viticola* using the Oxford cup diffusion method, and its stability under different pH levels, heat treatment temperatures, and ultraviolet irradiation was evaluated. In this study, the composite film of Iturin A and sodium alginate was applied on the surface of grapes. The weight loss rate, ascorbic acid content, titratable acidity, and relative electrical conductivity of grapes were measured at different time points under room temperature conditions, providing a theoretical basis for grape preservation.

Results: (1) Response surface optimization determined the optimal extraction conditions: ethanol:water volume ratio of 7.4:1, temperature 76.5 ° C, time 1.2 h. With three parallel experiments, the optimal extraction yield was (6.02 ± 0.03) g/L. (2) Response surface optimization established the optimal decolorization process conditions: activated carbon dosage of 1%, decolorization time of 42 min, temperature of 39.4° C, and pH of 6.9. Under these conditions, the actual decolorization rate was (65.43

$\pm 0.68\%$), and the recovery rate was $(89.9 \pm 0.44)\%$. This study found that a water-to-n-butanol ratio of 4:1 gave the best extraction effect. High-performance liquid chromatography (HPLC) detection showed a purity of $(19.23 \pm 0.14)\%$ and a recovery rate of $(92.98 \pm 0.48)\%$. (3) Column chromatography identified the macroporous resin type HZ816 as optimal, and the elution conditions were optimized: sample solution pH of 7.8, elution with 90% methanol, water wash of 120 mL, 50% methanol wash of 120 mL, and 90% methanol elution of 100 mL. HPLC analysis showed that the purity of Iturin A after purification was $(35.36 \pm 0.67)\%$, with a recovery rate of $(79.58 \pm 1.19)\%$. Further purification using silica gel column chromatography to elute the target product increased the purity of Iturin A to $(84.66 \pm 0.83)\%$ (by HPLC), with a recovery rate of $(70.86 \pm 0.83)\%$. (4) Iturin A treatment increases the cell membrane permeability of fungi (such as *Fusarium acuminatum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium tricinctum*, etc.), thereby inhibiting fungal cell growth. In addition, Iturin A exhibits certain thermal stability, pH stability, and ultraviolet stability. (5) Treatment with the sodium alginate - Iturin A composite film effectively maintains cell membrane integrity, suppresses the increase in fruit electrical conductivity, and preserves higher fruit weight, ascorbic acid content, and titratable acidity, thereby extending the storage period and effectively maintaining the quality and nutritional content of grapes.

Conclusion: This study established a method for the separation and purification of Iturin A from complex fermentation broth. Using the purified Iturin A, its antifungal activity against *Fusarium acuminatum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium tricinctum*, and other fungi, as well as its antifungal stability, were evaluated. It was found that applying a composite film of Iturin A and sodium alginate onto the surface of grapes significantly improved grape quality.

Key words: Iturin A; Decolorization; Column chromatography; Sodium alginate; Grape preservation

目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
目录.....	V
第 1 章 绪论.....	1
1.1 伊枯草菌素 A 的研究进展.....	1
1.1.1 伊枯草菌素 A 的结构与性质.....	1
1.1.2 伊枯草菌素 A 的沉淀与提取.....	1
1.2 伊枯草菌素 A 的脱色与分离纯化.....	2
1.2.1 伊枯草菌素 A 的脱色方法.....	2
1.2.2 伊枯草菌素 A 的萃取.....	2
1.2.3 伊枯草菌素 A 的柱层析.....	2
1.3 伊枯草菌素 A 在防腐保鲜方面的应用.....	4
1.3.1 伊枯草菌素 A 抑菌防腐机制.....	4
1.3.2 海藻酸钠复合膜的保鲜效果.....	5
1.4 研究内容、目标及意义.....	5
1.4.1 研究内容.....	5
1.4.2 研究目的.....	6
1.4.3 研究意义.....	6
1.4.4 技术路线.....	6
第 2 章 响应面法优化伊枯草菌素浸提工艺.....	7
2.1 实验材料与仪器.....	7
2.1.1 供试菌株.....	7
2.1.2 实验试剂与仪器.....	7
2.1.3 培养基组成.....	8
2.2 实验方法.....	8
2.2.1 菌株的发酵与伊枯草菌素 A 含量测定.....	8
2.2.2 酸化沉淀条件的确定.....	8
2.2.3 浸提工艺的优化.....	9
2.3 实验结果与分析.....	10
2.3.1 伊枯草菌素 A 标准曲线的绘制.....	10
2.3.2 酸化沉淀条件的优化结果.....	11

2.3.3 浸提工艺的优化结果	11
2.4 讨论	16
2.5 小结	17
第 3 章 伊枯草菌素 A 的脱色工艺与分离纯化	18
3.1 实验材料与仪器	18
3.1.1 实验材料	18
3.1.2 实验试剂	18
3.1.3 实验仪器	18
3.2 实验方法	19
3.2.1 基于熵权法的脱色工艺、纯化工艺综合评价	19
3.2.2 脱色工艺研究	19
3.2.3 液-液萃取工艺研究	21
3.2.4 大孔树脂分离工艺研究	21
3.2.5 硅胶柱层析纯化工艺研究	24
3.3 实验结果与分析	24
3.3.1 脱色工艺的优化结果	24
3.3.2 液-液萃取工艺优化结果	31
3.3.3 大孔树脂分离工艺研究结果	31
3.3.4 硅胶柱层析纯化伊枯草菌素 A 结果	36
3.3.5 基于熵权法的纯化工艺综合评价结果	37
3.4 讨论	37
3.5 小结	38
第 4 章 伊枯草菌素 A 的抑菌性研究及其抗菌应用	39
4.1 实验材料与仪器	39
4.1.1 实验菌株	39
4.1.2 实验材料	39
4.1.3 培养基及溶液	39
4.1.4 实验仪器	39
4.2 实验方法	40
4.2.1 伊枯草菌素 A 的抑菌活性及作用机制研究	40
4.2.2 伊枯草菌素 A 抑菌稳定性试验	41
4.2.3 伊枯草菌素 A 的葡萄保鲜效果测定	42
4.3 结果与分析	43
4.3.1 伊枯草菌素 A 的抑菌活性及作用机制研究结果	43

4.3.2 伊枯草菌素 A 的抑菌稳定性分析结果.....	49
4.3.3 伊枯草菌素 A 的葡萄保鲜效果测定结果.....	52
4.4 讨论.....	56
4.5 小结.....	57
第 5 章 结论与展望.....	58
5.1 结论.....	58
5.2 创新点.....	58
5.3 展望.....	59
参考文献.....	60
致谢.....	66
作者简介.....	67

第 1 章 绪论

1.1 伊枯草菌素 A 的研究进展

1.1.1 伊枯草菌素 A 的结构与性质

Iturin A 是由芽孢杆菌 (*Bacillus* spp.) 通过非核糖体肽合成酶 (NRPS) 生物合成的一类环脂肽 (cyclic lipopeptide) 类抗生素。其结构^[1,2]是由 7 个亲水的氨基酸残基与疏水的 β -氨基脂肪酸通过酰胺键连接而成, 形成的两亲性分子, 如图 1.1 所示^[3]。七肽的氨基酸序列为(L-)Asn-(D-)Tyr-(D-)Asn-(L-)Gln-(L-)Pro(D)Asn-(L-)Ser, 其中氨基酸种类不同可形成不同种的环脂肽^[4]。脂肪酸链长度通常为 C14-C17, 由 NRPS 中的酰基连接酶 (AL) 结构域通过底物特异性识别和选择不同链长的 β -氨基脂肪酸前体加以调控, 其脂肪酸链的长度不同, 产生了四种同系物, 分别为 Iturin A、C、D 和 E^[5]。

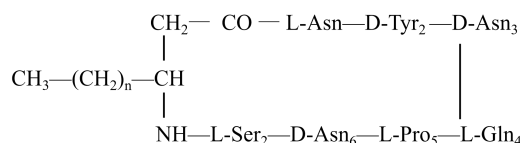


图 1-1 Iturin A 的结构示意图

Fig.1-1 The Structure of Iturin

表 1-1 Iturin 家族同系物种类

Table 1-1 Iturin Family Homologous Species

类型	氨基酸残基							氨基酸脂肪链
	1	2	3	4	5	6	7	
Iturin A	Asn	Tyr	Asn	Gln	Pro	Asn	Ser	nC14,iC15,aC15
Iturin C	Asn	Tyr	Asn	Gln	Pro	Asn	Ser	nC14,iC15,aC15
Iturin D	Asn	Tyr	Asp	Gln	Pro	Asp	Ser	含自由-COOH
Iturin E	Asn	Tyr	Asp	Gln	Pro	Asp	Ser	含自由-COOH ₃

注: n: R¹=H, R²=H; i: R¹=CH₃, R²=H; a: R¹=CH₃, R²=H

1.1.2 伊枯草菌素 A 的沉淀与提取

在初步纯化步骤中, 通常要对发酵培养基进行浓缩, 对目标产物进行沉淀, 主要方法包括酸化沉淀和盐析法。由于 Iturin A 是两亲性分子, 其带电荷状态随 pH 变化而改变, 进而影响分子在水相中的溶解性。因此, Iturin A 在酸性条件下溶解度降低, 从而沉淀析出。抗菌肽在高盐环境的溶解度降低, 产生沉淀, 可将抗菌肽从发酵液中分

离出来,但盐在后期处理不易去除,因此 Iturin A 的粗提技术以酸化沉淀法为主,结合离心初步分离目标产物,随后采用溶剂萃取进一步纯化^[6-9]。在具体工艺优化中,Whang^[10]等在酸性条件下用 70%乙醇提取抗菌酚类化合物,在提升酚类提取效率 2 倍的同时,将蛋白质残渣转化为 Iturin A 的产率提高了 33%,最终达 1.95 g/L。此外,Yu^[11]等通过乙醇萃取与冷冻干燥联用分发现可直接获得高纯度产物,这普遍适用于医药及食品领域。

1.2 伊枯草菌素 A 的脱色与分离纯化

1.2.1 伊枯草菌素 A 的脱色方法

发酵液常用的脱色方法为吸附脱色,其中活性炭是一种吸附能力较强的材料,可用于去除溶液中的色素^[12]。将含有 Iturin A 的粗提液与活性炭混合,色素分子被吸附到活性炭表面,然后通过过滤或离心等手段分离活性炭,从而实现脱色。李乐乐^[13]等使用活性炭对大豆发酵液进行脱色,优化后的脱色条件为:活性炭添加量 1%、脱色温度 50°C、脱色时间 45 min;胡庆莘^[14]等在单因素试验的基础上,利用响应面法进一步优化海参多肽液的脱色条件,确定最佳脱色条件为:每 100 mL 多肽液活性炭 0.9 g,时间 32 min,温度 50°C, pH2.2,在此条件下,脱色率达到 85.39 ± 2.25%,回收率达到 88.57 ± 1.86%。活性炭脱色法具有成本低,操作简便等优点,但活性炭微粒可能会残留在 Iturin A 提取液中,不利于后续 Iturin A 的开发利用。因此,脱色后仍需进一步纯化处理。

1.2.2 伊枯草菌素 A 的萃取

由于萃取法操作简单、价格低廉,因此该方法被普遍利用,萃取的原理是利用有机溶剂基于抗菌肽的疏水性将其从水中分离出来,常用有机溶液包括甲醇、乙酸乙酯、乙腈、二氯甲烷和三氯甲烷等。Chen^[15]等发现,固液萃取含菌发酵液与液液萃取无菌发酵液对比,前者得到 Surfactin 的纯度比后者高 35%左右。Hu^[16]等通过萃取-反萃取法分步调节 pH 为 2.0、7.0~8.0 高效分离脂肽,成本效益显著。Zhang^[17]等利用响应面法优化如超声辅助水两相体系的 pH、溶剂比例等萃取工艺参数,最终分离出高纯度脂肽。

1.2.3 伊枯草菌素 A 的柱层析

目前,柱层析技术在抗菌脂肽的分离纯化中应用广泛,但由于单一柱层析法的分离能力有限,多数研究则倾向于采用多种柱层析方法联用的策略,以期实现 Iturin A

等高纯度目标产物的有效获取。柱层析^[18]是利用各组分在固定相与流动相之间分配的差异来实现分离的纯化技术，根据填料类型的不同，常用的柱层析模式包括大孔树脂柱层析、凝胶过滤层析、离子交换层析和硅胶柱层析等，这些方法均有高度纯化抗菌脂肽的能力。

1.2.3.1 大孔树脂柱层析

大孔树脂柱层析是根据物质中不同成分与树脂的相互吸附作用力强弱的不同，通过调节流动相的极性大小，使得待分离纯化物质中各组分依次流出^[19]。Yuan 等^[20]有研究以辣椒秸秆为原料，首先采用 AB-8 大孔吸附树脂进行初步富集，研究通过吸附-解吸条件优化，筛选出适合的树脂类型，使 Iturin 纯度较粗提物纯度显著提高。Ma 等^[21]将大孔树脂吸附与超滤结合，有效分离 Iturin 与表面活性素、风霉素，这不仅优化了 Iturin 的富集效率，还为复杂脂肽混合物的规模化纯化提供了技术参考，兼具环保性与工业可行性^[22-23]。

1.2.3.2 凝胶柱层析

凝胶层析是利用分子大小差异实现分离，大分子不能进入凝胶孔隙，洗脱速度较快，优先出峰；小分子物质则因进入孔隙而滞留，洗脱顺序滞后，最常用的是 Sephadex G。张宝^[24]采用凝胶层析、制备型反相高效液相层析进一步分离纯化后，得到两种具有强烈抑制立枯丝核菌的 *Bacillomycin L*。出晓铭等^[25]利用 Sephadex LH-20 凝胶柱分级，成功分离 Iturin A2 和 A4 同系物，并通过 Q-TOF-MS 和核磁共振明确其分子量（1042.5 Da 和 1056.5 Da）及结构特征，该方法不仅实现了 Iturin A 的高效分离，还为其他脂肽类物质，如表面活性素、风霉素的精细纯化提供了技术参考。

1.2.3.3 离子交换柱层析

离子交换层析是利用离子交换剂对被分离物质中所含不同离子的亲和力的不同完成物质的分离纯化。郝彦利^[18]利用 DEAE-52 离子交换层析溶解过 DEAE-52 离子柱，洗脱液为 25 mM PBS 缓冲液 pH7.0，洗脱速度为 1.0 mL/min、HPLC 色谱 4 个步骤，最终鉴定为 1 种抗菌肽，确定其分子量为 1042 Da。

1.2.3.4 硅胶柱层析

硅胶柱层析是其分离原理与薄层层析相同，即以硅胶为固定相，通过调节流动相的极性梯度实现各组分的分离纯化。根据不同物质的特性，洗脱体系通常选择不同比例的二氯甲烷或三氯甲烷与甲醇混合溶剂。例如，顾康博^[26]等通过正相硅胶柱层析进行初步分离，利用不同氯仿-甲醇比例的洗脱剂去除杂质并富集目标脂肽。高兆建等^[27]

采用硅胶柱层析从短小芽孢杆菌 XLP27 的粗提取物中分离出单一活性组分, 随后通过半制备 RP-HPLC 进一步精细纯化, 最终获得由 5 种 Iturin A 同系物组成的环状脂肽, 纯度显著提升。谢定刚^[28]联合使用大孔吸附树脂和硅胶柱层析, 从菌株 F1-63 中分离纯化抗菌脂肽。研究发现, 大孔吸附树脂能去除提取物中的大部分杂质, 随后通过硅胶柱层析进行精制, 成功得到了高纯度的 *Bacillomycin D*

1.3 伊枯草菌素 A 在防腐保鲜方面的应用

1.3.1 伊枯草菌素 A 抑菌防腐机制

1.3.1.1 直接破坏微生物细胞膜

Iturin A 具有抗真菌活性, 其低毒性使之在农业和医药领域应用广泛^[29-32], 疏水脂肪酸链与亲水肽环协同作用, 嵌入真菌细胞膜脂双层, 造成膜通透性增加及离子渗漏, 菌丝塌陷、孢子畸形及胞内核酸与蛋白质外流, 如黑曲霉菌丝经 Iturin A 处理后出现细胞器崩解与空泡化^[33-35]。此外, Iturin A 触发活性氧 (ROS) 的过量积累, 引发膜脂过氧化反应, 丙二醛 (MDA) 含量显著升高, 破坏膜结构稳定性。如针对白念珠菌, Iturin-AgNPs 复合物通过膜去极化与 ROS 介导的氧化应激, 导致细胞膜完整性丧失及代谢功能紊乱, 从而引发细胞死亡^[35], 物理攻击加上氧化损伤下, 让 Iturin A 在低浓度下就能有效抑制病原微生物^[33,36]。

1.3.1.2 干扰代谢与生物膜形成

Iturin A 的抑菌机制具有双重靶向性, 既干扰微生物核心代谢通路, 也能直接瓦解生物膜的群体结构^[37-38]。具体来看, 它可抑制能量代谢关键酶的活性——在降低 ROS 清除酶水平, 同时抑制精氨酸生物合成相关基因的表达, 这一作用直接破坏胞内质子动力, 最终造成能量生成中断与氧化还原失衡。以金黄色葡萄球菌为例, Iturin A 可对其活性氧清除系统造成明显抑制, 这种抑制直接引发胞内代谢的混乱, 同时大幅降低肠毒素等关键毒力因子的合成水平。Iturin A 可阻断群体感应信号的传递, 能使金黄色葡萄球菌新生生物膜的形成量下降约 30%; 即便对已成熟的生物膜, 它也能实现有效破坏, 诱导近 60% 的无柄细胞死亡^[39-40]。另外, Iturin A 可通过调控脂质代谢发挥作用: 它既能降低麦角甾醇含量, 也能降低磷脂脂肪酸的饱和度。因此, 削弱了生物膜基质的结构稳定性, 最终造成菌群黏附能力下降, 生物膜整体结构随之崩解^[41-42]。除此之外, Iturin A 还能抑制 *epsA*、*tasA* 等生物膜核心基因的表达, 直接阻断胞外多糖的合成, 进一步加速生物膜细胞的裂解与消亡^[40,43]。

1.3.2 海藻酸钠复合膜的保鲜效果

1.3.2.1 海藻酸钠的基本简介

海藻酸钠^[44]是褐藻类中提取的天然高分子，具备良好的成膜特性。由于所成膜透明度高且柔韧，其在涂膜基质领域应用广泛。虽然亲水性较强，但海藻酸钠膜层脆、弹性弱且耐水性差，故需通过添加钙离子等交联剂来提升阻水性能。首先海藻酸钠分子链中带负电的羧基因静电排斥使高分子链充分伸展，加之亲水基团对水分子的强作用力，可抑制果实水分散失，减少失重^[45]；其次海藻酸钠在葡萄表面形成的膜具有气体选择渗透功能，可构成微气调环境，降低呼吸强度，减缓营养物质的转化与消耗，进而延长果实贮藏期^[46]。

1.3.2.2 海藻酸钠复合膜在水果中的应用

水果保鲜领域，常利用浸渍或喷洒方式将可食用涂料覆盖于果蔬表层^[47]，经空气干燥后成膜。此方法能够减轻贮藏过程中水分散失所致的萎蔫现象，使果实外观饱满光亮；还可有效防御微生物侵染及机械损伤^[48-52]。董亚^[53]研究发现，涂膜处理可延缓砀山梨中还原糖、可溶性固形物及有机酸含量的减少，同时对过氧化物酶和多酚氧化酶活性具有一定抑制作用。于洋^[54]将明胶/海藻酸钠涂膜液以及添加单宁酸的复合涂膜液应用于小米蕉与蓝莓的采后贮藏，结果表明，涂膜能显著推迟果实后熟，贮藏期间维持优良色泽，阻碍水分损失，使涂膜果实保持较高硬度并降低失重率。

1.4 研究内容、目标及意义

1.4.1 研究内容

本研究以 *Bacillus velezensis* ND 为发酵液为研究对象，主要开展以下研究：

(1) 通过单因素试验结合响应面分析法，确定从发酵液中提取 Iturin A 酸化沉淀与有机试剂提取的最优条件。

(2) 采用单因素试验结合响应面分析法，确定活性炭吸附粗提液中色素的最佳工艺条件。利用正丁醇对脱色后提取液进行萃取，再利用大孔树脂、硅胶柱进行分离纯化，得到高纯度的 Iturin A。

(3) 采用牛津杯扩散法分析 Iturin A 对锐顶镰刀菌、尖孢镰刀菌等真菌病原体的抑制作用，并考察其在不同浓度、pH、温度及紫外照射条件下的稳定性，同时检测真菌孢子萌发率、抑制率、最低抑菌浓度 (MIC) 与最低杀菌浓度 (MLC)。将 Iturin A 与海藻酸钠混合制备保鲜复合膜，通过测定果实贮藏期间的失重率、抗坏血酸含量、