



# 枯草芽孢杆菌发酵来源的抗菌肽安全性及功效性研究

徐思伟<sup>1</sup>, 王珍珍<sup>2</sup>, 林琳<sup>1</sup>, 陈丽<sup>1</sup>, 王蕊蕊<sup>1</sup>

(1. 上海科黛生物科技有限公司, 上海, 201703)

2. 南京玻得理生物科技有限公司, 江苏南京, 210031)

DOI:10.61369/CDCST.2025030020

**摘要:** 开发一种以豆粕和玉米粉为主要培养基的枯草芽孢杆菌发酵来源抗菌肽, 评估其安全性和抑菌活性, 探索其作用机制及应用潜力。通过内毒素、抗生素残留及耐药性实验验证安全性; 采用抑菌圈实验测定对金黄色葡萄球菌、痤疮丙酸杆菌、大肠杆菌等菌株的抑制效果; 利用耐药性诱导实验(10代传代)检测MIC稳定性; 通过鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)实验观察血管溶解效应; 结合质谱分析鉴定多肽序列, 并推测其作用机制。该抗菌肽在0.05%浓度下对金黄色葡萄球菌(DIZ=[41.27±0.11]mm)和痤疮丙酸杆菌(DIZ=[28.76±0.20]mm)抑制效果显著, 对大肠杆菌呈浓度依赖性抑制(DIZ=[15.28±0.15]mm), 但对表皮葡萄球菌和白色念珠菌无显著作用。耐药性诱导后, 其对金黄色葡萄球菌的MIC值稳定(0.25μg/mL)。CAM实验显示浓度依赖性血管溶解(0.01%~0.05%)。质谱鉴定出20条特征多肽序列(如YVEELKQLPGEKIIISPDEII), 作用机制涉及膜破坏、金属离子螯合及DNA结合。该抗菌肽具有高效抑菌活性、低耐药风险及多靶点作用机制, 对皮肤共生菌影响小, 在痤疮治疗护肤品中具有潜在应用价值。



徐思伟

**关键词:** 枯草芽孢杆菌; 耐药性; 痤疮丙酸杆菌; 表皮葡萄球菌, 金黄色葡萄球菌

**作者简介:** 徐思伟, 学士, 工程师, 主要从事日用化学品研发工作。E-mail: siwei.xu@corday.tech.

抗菌肽(Antimicrobial Peptides, AMPs)是一类广泛存在于生物体内的天然免疫防御分子, 具有广谱抗菌、抗病毒、抗真菌甚至抗肿瘤活性。与传统抗生素相比, 抗菌肽不易诱导耐药性, 且作用机制多样, 主要通过破坏微生物细胞膜、干扰代谢或诱导程序性死亡等方式发挥作用<sup>[1~3]</sup>。根据来源, 抗菌肽可分为动物源抗菌肽、植物源抗菌肽和微生物源抗菌肽。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是一种广泛应用的益生菌和工业发酵菌株, 能够通过核糖体或非核糖体途径合成多种AMPs, 包括脂肽类、细菌素和小分子肽等。这些抗菌肽具有广谱抗菌、抗病毒、抗真菌活性, 且不易诱导耐药性, 在医药、农业和食品工业中具有重要应用价值<sup>[1, 4~6]</sup>。其中, 脂肽类具有两亲性结构(亲水-疏水), 可插入微生物细胞膜, 形成孔洞或导致膜结构紊乱, 使胞内物质泄漏, 最终导致细胞死亡<sup>[7~9]</sup>。细菌素是一类具有广谱抑菌活性的小分子肽, 主要通过破坏病原微生物的细胞结构或干扰其代谢过程发挥抑菌作用。细菌素能与细胞膜中的磷脂分子结合, 形成跨膜孔道, 导致细胞内离子(如K<sup>+</sup>)和蛋白质泄漏, 最终引起细胞死亡。特别地, 能显著提高大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的细胞膜通透性, 导致电导率上升, 内容物外泄<sup>[10, 11]</sup>。

该研究采用枯草芽孢杆菌发酵得到抗菌肽, 对其安全

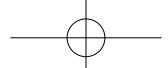
性、耐药性和抑菌功效进行相关测试, 结果表明枯草芽孢杆菌发酵来源的抗菌肽在皮肤微生态护理领域具有潜在的应用价值。

## 1. 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

试剂: 枯草芽孢杆菌, 菌种保藏号CGMCC No.13932, 南京工业大学; 去离子水, 自制; LB培养基, ST156, 碧云天; 大豆豆粕、玉米粉, 山东玉宝生物科技股份有限公司胰蛋白胨; 大豆琼脂(TSA), 货号HB0177, 海博生物; mGEL鲎试剂, 货号RT06500, 湛江安度斯生物; 三氟乙酸、甲酸、乙腈(HPLC级), Sigma。

仪器: 微量移液器, 瑞宁; MJPS-150型培养箱, 上海精宏; THZ-98c摇床, 一恒; Vortex genius 3型涡旋仪, 德国IKA; YQ-1001C超声波清洗仪, 上海易净; AD340型紫外分光光度计, Beckman; Easy nLC型高效液相色谱(HPLC)、EASY Column(100 μm\*2 cm, 5 μm, C18)型上样柱、EASY Column(75 μm\*10 cm, 3 μm, C18)型分析柱、Q-Exactive HF-X型质谱仪、NanoDrop 2000C型紫外可见分光光度计, Thermo Fisher Scientific; 66871型C18固相萃



取柱，Sigma；10KD 截留分子量的超滤管，PALL。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 制备方法

将该枯草芽孢杆菌接种到 LB 培养基中，30~40℃ 培养 15~24h，每隔 2h 测定发酵液在 OD600 值，直至菌株进入对数生长期。按 1% (v/v) 的接种量将活化后的枯草芽孢杆菌接种到优化后的发酵培养基（豆粕 20%、氯化钠 0.3%，玉米粉 5%，水）中，确定发酵工艺参数：发酵温度为 37℃，发酵时间 16h，发酵 pH 为 5.5，搅拌转速为 240rpm。将预处理后的发酵液通过超滤系统，小分子杂质随滤液排出，抗菌肽被截留浓缩。一项专利采用截留分子量 1000~2000Da 的超滤膜浓缩粗抗菌肽溶液，过夜处理后弃滤液得到浓缩液。最后，设置真空度 -0.15Pa，蒸汽压力 0.15MPa，温度 45℃，将溶液浓缩至原体积的 1/34。在 -0.15 Pa、45℃ 条件下浓缩至原体积的 1/3 倍，然后采用真空冷冻干燥法去除抗菌肽溶液中的水分。设定冷冻温度 -40℃，真空度 0.24 MPa，按照程序升温 (-40→0℃ /5h, 0→5℃ /12h, 5→10℃ /10h, 10→20℃ /3h)，最后 20~30℃ 解析干燥 6h，得到最终的粉剂产品。

### 1.2.2 内毒素和抗生素含量测定

采用凝胶法鲎试剂 (Limulus Amebocyte Lysate, LAL) 检测发酵产物中内毒素含量，其原理基于鲎 (Limulus polyphemus) 血液中的变形细胞溶解物与细菌内毒素 (脂多糖, LPS) 的特异性反应<sup>[12]</sup>。实际操作中，取出 3 支鲎试剂，标记为阳 (+)，阴 (-) 和样品。阴 (-) 加入 200μL 内毒素检查用水，阳 (+) 管加入 100μL 内毒素检查用水和 100μL E0.25，样品管加入 100μL 内毒素检查用水和 100μL 样品，混匀，封口膜封口，37℃ 孵育 (60±2) min。结果判定时，将反应管取出，缓慢倒转 180°，若管内形成乳白色凝胶，并且凝胶不变形，不从管壁滑落则为阳性；未形成凝胶或形成的凝胶不坚实、变形并从管壁滑落则为阴性。

抗生素含量测定中，参照《化妆品中二甲硝咪唑等 120 种原料的检验方法》，其规定了化妆品中二甲硝咪唑等 120 种抗感染药物的液相色谱 - 质谱联用法，包括定性筛查方法与定量测定方法<sup>[13]</sup>。

### 1.2.3 抑菌实验

采用打孔法进行抑菌圈测试<sup>[14, 15]</sup>，使用外径为 7.8mm 的牛津杯，在平板上垂直打孔。用微量移液器向牛津杯中注入 100~150 μL 的待测样品，将平板置于 37℃ 恒温培养箱

中培养 16~20h。培养结束后，用镊子取出牛津杯，倒置平板，采用十字交叉法测量抑菌圈直径 (DIZ, Diameter of the Inhibitory Zone)。设置阳性对照为不含药物的溶剂 (无菌培养基)，重复 3 次实验。当 DIZ ≤ 7.8 mm，无抑菌作用，7.8 mm < DIZ ≤ 16.0 mm 属于有抑菌作用；DIZ > 16 mm 具有强烈抑菌作用<sup>[16]</sup>。

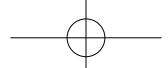
### 1.2.4 耐药性测试

测试菌株为金黄色葡萄球菌，包括初代最小抑菌浓度 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 测试和 10 次药物诱导后的 MIC 测试，对比前后的 MIC 值<sup>[17]</sup>。初代 MIC 测试中，将样品配置为 12.8 mg/mL 的母液备用。取测试菌株金黄色葡萄球菌在培养基划线接种，置于 37℃ 静置培养 1 天，至长出单克隆。无菌接种环挑取成熟单克隆菌株接种在 5mL 液体 TSB 中，置于 37℃ 振荡培养至 OD600 约为 0.6，培养基调整 OD 值为 0.6。按千分之一比例接入调整好浓度的菌液至液体培养基中配置为含菌培养基，取 1mL 含菌培养基，加入测试药物 (终浓度 128 μg/mL) 配置为含药菌液。实验组初始孔加药时，取 200μL 含药菌液加至 96 孔板的初始孔中，取 100μL 剩余菌液 (不含测试药物) 加至 96 孔板的其余孔中。然后从初始孔中吸取 100μL 液体加入到第 2 孔菌液中，混合后再从第 2 孔中吸取 100μL 液体加入到第 3 孔中，依次至第 11 孔，第 11 孔弃掉 100μL 液体，37℃ 静置培养 1 天 (表 1)。取出 96 孔板，肉眼观察菌体沉淀情况。

表 1 布板图

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A/μg · mL <sup>-1</sup>	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0
B/μg · mL <sup>-1</sup>	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0
C/μg · mL <sup>-1</sup>	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0

在 10 代诱导实验中，称取 TSA 培养基干粉 40.0g，加热搅拌溶解于 1000mL 蒸馏水中，分装三角瓶，121℃ 高压灭菌 15 分钟，倾入无菌平皿，冷却备用。将样品配置为 12.8mg/mL 的母液备用。TSA 培养基中按比例添加药物，使液体培养基中药物浓度为 1/2 MIC 即 0.125μg/mL 的含药培养基。将测试菌种 USA300 于 TSA 平板培养基上划线，37℃ 培养至可见明显菌斑。挑取单菌落，接种于 5mL 液体培养基，37℃，200rpm 培养至 OD600 为 0.6。按千分之一的比例接种 OD600=0.6 的 USA300 于 1mL 含药培养基 (TSA 培养基药物浓度：0.125μg/mL)，37℃，200rpm 培养至 OD600 再次达到 0.6。重复步骤 6，直到 10 次药物诱



导结束。诱导结束后按照初代 MIC 测试方法进行 MIC 测试实验，肉眼观察菌落情况。

### 1.2.5 鸡胚 CAM 模型

鸡胚绒毛尿囊膜 (CAM, Chorioallantoic membrane model) 模型是一种广泛应用于化妆品、药物和生物医学研究的替代动物实验方法，尤其在眼刺激性测试、血管生成研究和药物筛选等领域具有重要价值。参考文献<sup>[18, 19]</sup>中的方法对样品稀释液进行模型测试，观察出血 (Hemorrhage)、血管溶解 (Vascular Lysis) 和凝血 (Coagulation) 三种毒性反应。

### 1.2.6 氨基酸测序

抗菌肽测序包括样品制备、LC-MS/MS 质谱分析、数据库检索、数据分析和肽段鉴定结果几个流程。色谱分离阶段，每份分级样品采用纳升流速 HPLC 液相系统 Easy nLC 进行分离。缓冲液：A 液为 0.1% 甲酸水溶液，B 液为 0.1% 甲酸乙腈水溶液（乙腈为 84%）。色谱柱以 95% 的 A 液平衡。样品由自动进样器上样到上样柱 (Thermo scientific EASY column, 100 μm\*2 cm, 5 μm, C18)，再经分析柱 (Thermo scientific EASY column, 75 μm\*10 cm, 3 μm, C18) 分离，流速为 250 nL/min。相关液相梯度如下：0~50 min, B 液线性梯度从 0%~35%；50~58 min, B 液线性梯度从 35%~100%；58~60 min, B 液维持在 100%。质谱鉴定阶段，样品经色谱分离后用 Q-Exactive HF-X 质谱仪 (Thermo Fisher) 进行质谱分析，分析时长：60 min，检测方式为正离子，母离子扫描范围为 300~1800 m/z，一级质谱分辨率为 70,000 at m/z 200, AGC (Automatic gain control) target 为 3e6, Maximum IT 为 10 ms, 动态排除时间 (Dynamic exclusion) 为 40.0 s。多肽和多肽的碎片的质量电荷比按照方法采集：每次全扫描 (full scan) 后采集 10 个碎片图谱 (MS2 scan), MS2 Activation Type 为 HCD, Isolation window 为 2 m/z, 二级质谱分辨率为 17,500 at 200 m/z, Normalized collision energy 为 30 eV, Underfill ratio 为 0.1 %<sup>[20]</sup>。质谱测试原始文件 (Raw File) 用软件 MaxQuant 1.5.5.1 检索相应的数据库，最后得到多肽鉴定及定量分析结果。

### 1.2.7 统计学方法

使用 SPSS28.0 软件进行统计学分析，数据用 Mean ± SD 表示，若数据呈正态分布，则采用配对样本 t 检验，否则采用两个相关样本 Wilcoxon 秩和检验。显著

性水平  $\alpha=0.05$ 。在图例中， $P \geq 0.05$ ,  $P<0.05$ ,  $P<0.01$  和  $P<0.001$  分别用 “n.s.”, “\*”, “\*\*” 和 “\*\*\*” 表示。

## 2. 结果与讨论

### 2.1 安全性测试：内毒素和抗生素

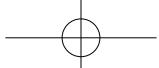
该内毒素的测试浓度为 0.05% (w/v)，测试结果无乳状凝胶出现，为阴性，表明该发酵产物无内毒素。抗感染类药物测试中，检出浓度限为 0.25 mg/kg，定量浓度为 0.75 mg/kg，均未检出，表明该发酵产物不含化妆品禁用的抗生素物质。

### 2.2 抑菌性和耐药性测试

在抑菌圈测试中，所选用菌种为金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、大肠杆菌、白色念珠菌和痤疮丙酸杆菌，这些微生物与皮肤健康关系密切，可能影响皮肤屏障、引发感染或炎症<sup>[21]</sup>。例如，金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 是常见的皮肤致病菌，可能导致脓疱疮、毛囊炎和伤口感染<sup>[22]</sup>。表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) 是皮肤常驻菌群，可抑制金黄色葡萄球菌等致病菌生长，属于皮肤有益共生菌<sup>[23]</sup>。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 可能导致结膜炎或者皮肤炎症。白色念珠菌 (*Candida albicans*) 属于真菌，可引起皮肤甲沟炎<sup>[24]</sup>。痤疮丙酸杆菌 (*Cutibacterium acnes*) 过度增殖可引发毛囊炎症，导致粉刺、丘疹和脓疮<sup>[25]</sup>。抑菌圈试验中测试了样品在 0.01% 和 0.05% (w/v) 两个浓度下对各菌株的抑制作用。表 2 中的 DIZ 数据显示在样品浓度 0.01% 和 0.05% 时，对金黄色葡萄球菌和痤疮丙酸杆菌均具有强烈抑制作用，对大肠杆菌均具有抑制作用，并且随浓度呈依赖性，而对表皮葡萄球菌和白色念珠菌均无抑制作用。

表 2 抑菌圈直径的测试结果 (Mean ± SD)

样品浓度 %/ (w/v)	菌种	DIZ/mm	抑菌效果判定
0.01	金黄色葡萄球菌	38.24 ± 0.25	强烈抑菌
	表皮葡萄球菌	7.80 ± 0.00	无抑菌
	大肠杆菌	11.50 ± 0.38	抑菌
	痤疮丙酸杆菌	21.53 ± 0.22	强烈抑菌
	白色念珠菌	7.80 ± 0.00	无抑菌
0.05	金黄色葡萄球菌	41.27 ± 0.11	强烈抑菌
	表皮葡萄球菌	7.80 ± 0.00	无抑菌
	大肠杆菌	15.28 ± 0.15	抑菌
	痤疮丙酸杆菌	28.76 ± 0.20	强烈抑菌
	白色念珠菌	7.80 ± 0.00	无抑菌



基于上述强烈抑菌作用，进一步测试了样品的耐药性，显示样品对初代金黄色葡萄球菌的 MIC 值是  $0.25\mu\text{g}/\text{mL}$ ；当金黄色葡萄球菌在样品诱导 10 代后，MIC 值仍为  $0.25\mu\text{g}/\text{mL}$ ，表明未增强其耐药性。

### 2.3 对鸡胚影响

根据图 1 所示，在 0.01% 和 0.05% 浓度下，出现了不同程度的细小血管溶解情况，但没有出现明显的出血和凝血情况。随浓度增大，血管溶解情况有所加剧。

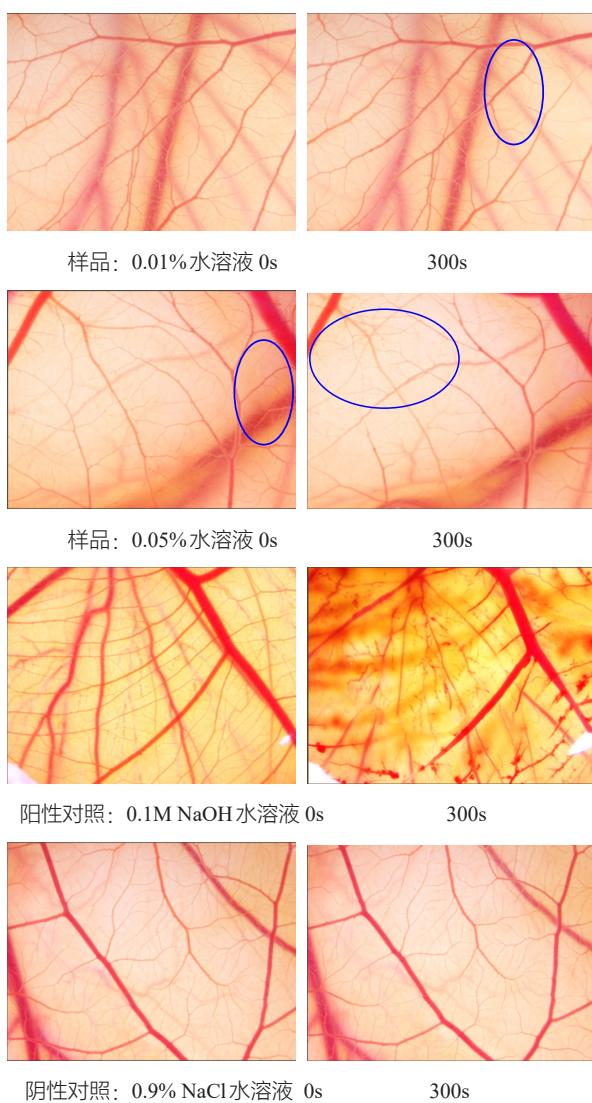


图 1 鸡胚 CAM 测试结果

### 2.4 氨基酸序列分布

根据测试结果，筛选出峰强度前 20 的多肽序列（表 3），其中谷氨酸 (E)，其次为亮氨酸 (L)、赖氨酸 (K)、精氨酸 (R) 和 丝氨酸 (S) 为主要多肽组成氨基酸。多肽长度从 3 到 20 不等，其中 20 个氨基酸的多肽序列占比较大，并且几乎所有多肽均带电荷数。

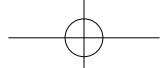
表 3 峰强度前 20 的多肽序列

多肽序列	长度 / 氨基酸个数	质量	电荷数
DMSDSD	6	668.19594	1
YVEELKQLPGEKIIISPDEII	20	2312.2515	2
LLDK	4	487.3006	1;2
HLR	3	424.25465	2
SECCP	5	537.15632	1
RQELEELNDLEFQIYRMQE	20	2611.2224	2
WVRTYKDAVIDFMSERFQWD	20	2591.2267	2
GNSIGGVIVLL	11	1040.623	2
SIDSLIL	7	759.43782	1
VEEAKDIFRVEVQCINQNKL	20	2374.2315	2
FDK	3	408.20088	2
DLEMMREMFGCSGIENYSRH	20	2404.0068	2
YSYEE	5	689.25444	1
DSIEDYMSDSENMKDMFQMN	20	2428.9167	2
TMDDLVMPKHEAEHIPDQTV	20	2305.0719	3
EIPGIKLSDTIREKMARAGE	20	2213.1838	2
EYGSLSIAVQFYTEAKTVMI	20	2249.129	2
WTYASEFGQDQGSHDGEWEC	20	2330.8811	2
GAKL	4	387.24817	2
IDLFMCGAATLLQLWRNRYF	20	2430.2341	3

### 3. 结果和讨论

本研究通过枯草芽孢杆菌发酵技术成功制备了一种新型抗菌肽，经实验验证具有优异的安全性和广谱抗菌活性。安全性评估显示，该抗菌肽内毒素含量低，无抗生素残留，且经 10 代诱导后对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度 (MIC) 保持稳定 ( $0.25\mu\text{g}/\text{mL}$ )，表明其具有较低的耐药性风险。

在功效性方面，该抗菌肽展现出显著的靶向抗菌特性。实验证实，在 0.05% 浓度下对痤疮主要致病菌（金黄色葡萄球菌和痤疮丙酸杆菌）具有强力抑制作用（抑菌圈直径分别达  $[41.27 \pm 0.11]\text{mm}$  和  $[28.76 \pm 0.20]\text{mm}$ ），而对皮肤共生菌（如表皮葡萄球菌）影响较小。这种选择性抑



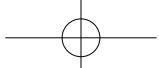
制特性使其特别适合用于痤疮治疗护肤品，可在杀灭致病菌的同时维护皮肤微生态平衡。

抗菌肽的作用机制主要基于其独特的氨基酸序列特征，包括阳离子-疏水结构（如 YVEELKQLPGEKIIISPDEII 序列）通过静电作用靶向结合细菌膜负电荷磷脂，疏水端插入破坏膜完整性<sup>[26]</sup>。金属离子螯合位点（如 DLEMMREMGCFCGSIENYSRH 中的 His/Cys）可干扰细菌铁代谢；DNA 结合域（如 WTYASEFGQDQGS HDGEWEC 中的 Trp）能抑制细菌复制<sup>[27]</sup>。这种多靶点协同作用机制不仅确保了高效的抗菌活性，更重要的是有效规避了单一靶点可能引发的耐药性问题。鸡胚绒毛尿囊膜（CAM）实验观察到浓度依赖性的血管溶解现象，进一步证实了其生物活性，同时也为后续剂型优化提供了安全浓度参考<sup>[28]</sup>。

综上所述，该抗菌肽兼具高效抗菌活性和良好安全性，其选择性抑制特性和多靶点作用机制使其在功能性护肤品领域具有广阔的应用前景，特别适用于痤疮等细菌性皮肤问题的预防和治疗。

## 参考文献

- [1] CHEN MENGLING, WANG HUI, ZHANG CHUANG, et al. Recent advances in antimicrobial lipopeptide fengycin secreted by *Bacillus*: Structure, biosynthesis, antifungal mechanisms, and potential application in food preservation[J]. *Food Chemistry*, 2025, 489144937.
- [2] 李道明, 王瑛, 陈超, 等. 芽孢杆菌几种重要抗菌脂肽研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(05):1768–1783.
- [3] 翟少伟, 李剑, 史庆超. 抗菌脂肽 Surfactin 的抗菌活性及应用[J]. 动物营养学报, 2015, 27(05):1333–1340.
- [4] 张淘峩, 乌日娜, 纪帅气, 等. 豆酱油枯草芽孢杆菌 S1-2 产细菌素分离鉴定及其稳定性研究[J]. 食品工业科技, 2024, 45(08):158–164.
- [5] 白杰, 贲建民, 祝发明, 等. 枯草芽孢杆菌菌株 B3 抗菌肽的分离纯化与鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(08):78–85.
- [6] 胡瑞萍, 张铎, 张丽萍, 等. 枯草芽孢杆菌 BSD-2 一种抗菌肽的分离纯化与鉴定[J]. 华北农学报, 2011, 26(06):201–206.
- [7] 苗永美, 苗翠萍, 于庆才. 枯草芽孢杆菌 BBs-27 发酵液性质及脂肽对黄色镰刀菌的抑菌作用[J]. 生物技术通报, 2023, 39(09):255–267.
- [8] 李红亚, 李术娜, 王树香, 等. 益生芽孢杆菌脂肽类抑菌成分的高效液相色谱-电喷雾串联质谱分析[J]. 动物营养学报, 2017, 29(04):1191–1197.
- [9] 付云, 赵谋明, 庞一扬, 等. 源自螺旋藻渣枯草芽孢杆菌发酵抗菌肽 SP-AP-1 和伊枯草菌素对金黄色葡萄球菌抑菌机制对比研究[J]. 食品科学, 2021, 42(01):108–114.
- [10] 袁勇军, 汪昊, 戚向阳. *B. Subtilis* Y-6 产抗菌肽对桃软腐菌的抑制机理研究[J]. 核农学报, 2014, 28(06):1047–1051.
- [11] 高娟娟, 贾丽艳, 畅盼盼, 等. 枯草芽孢杆菌细菌素 A32 的抑菌机理研究[J]. 中国食品学报, 2021, 21(10):56–64.
- [12] 张晨雪, 蔡彤, 陈晨, 等. 细菌内毒素检查微量凝胶法的研究[J]. 中国药物警戒, 2024, (8).
- [13] 国家药品监督管理局. 国家药监局关于将化妆品毒理学试验方法样品前处理通则等 19 项制修订项目纳入化妆品安全技术规范(2015 年版)的通告(2024 年第 12 号)[EB/OL]. 北京: 国家药监局, 2024[https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/hzhpptg/jmhzhptg/20240321171624153.html].
- [14] ISO. ISO 20776-1:2019, Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. Part 1: Broth micro-dilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases[S]. Switzerland:ISO (the International Organization for Standardization) 2019.
- [15] 王世强. 打孔法测定抗生素的效价[J]. 生物学通报, 2005, (03):2–2.
- [16] 柳成东, 肖明霞, 李琦华, 等. 饲用益生菌凝结芽孢杆菌抑菌性能的研究[J]. 中国畜牧杂志, 2021, 057(010):236–241.
- [17] INSTITUTE CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS. CLSI M07, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grows Aerobically[S]. Wayne:CLSI Document M07-A9, 2012.
- [18] 王宁, 洪新宇, 帅怡, 等. 鸡胚绒毛尿囊膜血管试验在化妆品安全性评价中的应用研究[J]. 现代预防医学, 2016, 43(22):4163–4165+4199.
- [19] 周建娣, 杨明杰, 杨杏芬, 等. 眼刺激试验离体替代方法研究进展[J]. 卫生研究, 2004, (04):515–517.
- [20] WANG SHUNXI, TIAN LEI, LIU HAIJUN, et al. Large-Scale Discovery of Non-conventional Peptides in Maize and *Arabidopsis* through an Integrated Peptidogenomic Pipeline[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(7):1078–1093.
- [21] KI V. and ROTSTEIN C. Bacterial skin and soft tissue infections in adults: A review of their epidemiology, pathogenesis, diagnosis, treatment and site of care[J]. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 2008, 19(2):173–84.
- [22] 顾建青. 金黄色葡萄球菌与特应性皮炎[J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2023, 17(04):381–382.
- [23] 胡新月, 王德娴, 宋丽雅. 表皮葡萄球菌对皮肤健康的作用研究进展[J]. 微生物学通报, 2023, 50(01):368–376.
- [24] PETKOVSEK Z., ELERSIC K., GUBINA M., et al. Virulence potential of *Escherichia coli* isolates from skin and soft tissue infections[J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(6):1811–7.
- [25] 黄舒燕, 黄卫东, 蔡蕾, 等. 重度痤疮患者皮肤菌群多样性研究[J]. 福建医药杂志, 2025, 47(02):5–8+129.
- [26] MAMOU GIDEON, CORONA FEDERICO, COHEN-KHAIT RUTH, et al. Peptidoglycan maturation controls outer membrane pro-



- tein assembly[J]. Nature, 2022, 606(7916):953–959.  
[27] 马良. 界面上抗菌肽 CM15 与磷脂膜作用机理以及 Ca<sup>2+</sup> 对 DNA 水化层结构影响 [D]. 2021.  
[28] 尹杨燕, 彭昊, 李小宁, 等. 枯草芽孢杆菌体外抑菌试验及其抑菌蛋白的鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2022, 54(12):57–63.

## Safety and Efficacy Study of Antimicrobial Peptides Derived from *Bacillus Subtilis* Fermentation

Xu Si-wei<sup>1</sup>, Wang Zhen-zhen<sup>2</sup>, Lin Lin<sup>1</sup>, Chen Li<sup>1</sup>, Wang Rui-rui<sup>1</sup>  
(1.Shanghai Corday Biotechnology Co., LTD., Shanghai, 201703  
2.Nanjing Baudry Biotechnology Co., LTD., Nanjing, Jiangsu, 210031)

**Abstract :** To develop an antimicrobial peptide derived from *Bacillus subtilis* fermentation using soybean meal and corn flour as the primary culture medium, and to evaluate its safety, antimicrobial activity, mechanism of action, and potential applications. Safety was assessed through endotoxin testing, antibiotic residue analysis, and resistance evaluation. Antimicrobial activity was determined via inhibition zone assays against *Staphylococcus aureus*, *Cutibacterium acnes*, *Escherichia coli*, and other strains. Resistance induction (10 passages) was performed to monitor MIC stability. The vascular dissolution effect was observed using the chick chorioallantoic membrane (CAM) assay. Peptide sequences were identified by mass spectrometry, and the mechanism of action was inferred based on structural features. At 0.05% concentration, the antimicrobial peptide exhibited strong inhibition against *S. aureus* (DIZ = [41.27 ± 0.11] mm) and *C. acnes* (DIZ = [28.76 ± 0.20] mm), concentration-dependent inhibition against *E. coli* (DIZ = [15.28 ± 0.15] mm), but no significant effect on *Staphylococcus epidermidis* or *Candida albicans*. The MIC against *S. aureus* remained stable (0.25 µg/mL) after resistance induction. The CAM assay revealed concentration-dependent vascular dissolution (0.01%–0.05%). Mass spectrometry identified 20 characteristic peptide sequences (e.g., YVEELKQLPGEKIISPDEII), with mechanisms involving membrane disruption (cationic-hydrophobic structure), metal ion chelation (His/Cys), and DNA binding (Trp). This antimicrobial peptide demonstrates potent antibacterial activity, low resistance risk, and a multi-target mechanism, with minimal impact on skin commensal bacteria, suggesting promising potential for acne treatment in skincare formulations.

**Keywords :** *Bacillus subtilis*; drug resistance; *Cutibacterium acnes*; *Staphylococcus epidermidis*; *Staphylococcus aureus*

