

基于带鱼(*Trichiurus lepturus*)蛋白复合酶解液中 ABP 对 G⁻等微生物的致死结构及表征活性分析*

何定芬¹ 谢超² 郑霖波² 叶常青³ 李海波¹

(1. 浙江国际海运职业技术学院 舟山 316021; 2. 浙江海洋大学食品与医药学院 舟山 316022;
3. 舟山市常青海洋食品有限公司 舟山 316021)

摘要 为研究带鱼(*Trichiurus lepturus*)蛋白复合酶解液中抗菌肽(ABP)的抑菌性及表征活性,本文以舟山小带鱼为研究对象,制备蛋白抗菌肽。研究得到抗菌肽分子量在区间(>3000Da, 3000—800Da, <800Da)内均有分布,在 3000—800Da 区间内含量达到 49.61%,酶解程度最深,氨基酸总量为 881.83mg/g,必需氨基酸与氨基酸总量比为 44.75%,必需氨基酸与非必需氨基酸比为 81.33%,营养价值高。六类提升抗菌效力的氨基酸占氨基酸总量 42.71%,抗菌效力较高,具有广谱抗菌活性,为阳离子型抗菌肽,对 G⁻具有较强的抑菌效能。抗菌效力与稀释 128 倍(10.15U/mL)土霉素抗菌效力相当,与稀释 4 倍的硫酸链霉素(325U/mL)抗菌效力相当。对抗菌肽的表征活性进行研究表明:该抗菌肽在 pH 2—12 下溶解度良好,均大于 88%,有强适应性;乳化性随 pH 增大而增强,pH 4 时乳化性最低,为 53.68%,在 pH 12 时达到最高值 78.34%;乳化稳定性在 pH 6 时达到最高,为 85.83%,pH 环境过酸或者过碱的情况下乳化稳定性均较低;发泡性随 pH 上升呈现增长趋势,在 pH 12 时达到最大值 57.33%,pH 4 时抗菌肽泡沫稳定性最低,为 22.86%,pH 升高,泡沫稳定性也随之增强,在 pH 12 时达到最大值 59.58%。该研究结果对探究带鱼抗菌肽的各项性质提供了理论依据,对带鱼抗菌肽的应用研究具有一定的理论指导意义。

关键词 带鱼(*Trichiurus lepturus*); 抗菌肽(ABP); 抑菌性; 表征活性

中图分类号 TS254; Q939.9 doi: 10.11693/hyhz20190700134

抗菌肽(antibacterial peptide, ABP), 也被称作抗微生物肽、抗生素肽(王婧等, 2018), 广泛存在于生物体内, 是在抵御病原体入侵生物体内时产生的具有抵抗力的一种肽类, 具有免疫效果(Yeung *et al.*, 2011)。抗菌肽为一种小分子肽, 具有特定的基因编码, 在特定条件诱导下产生, 主要是抵抗细菌、病毒、真菌, 也具有抑杀肿瘤细胞等活性等功效(梁秀丽等, 2019), 能够调控机体, 也被称为“宿主防御肽”(Yeaman *et al.*, 2007; Ernesto *et al.*, 2013), 在宿主细胞的免疫机制中起非常重要的作用(梁营芳等, 2016)。此外, 抗菌肽优点不仅是绿色、高效、安全, 且相比

于抗生素, 它有着更好的热稳定性(田春雷等, 2015)、动物低耐药性(华蕊等, 2019)以及抗氧化性(金海涛等, 2016)。目前国内外对抗菌肽的研究越来越广, 应用前景开阔。

带鱼(*Trichiurus lepturus*), 别名刀鱼、裙带、牙带鱼, 属鲈形目(Perciformes)、带鱼科(Trichiuridae), 在我国各沿海省份及地区都较常见。带鱼肉质紧实鲜美, 非常受人欢迎; 此外带鱼营养丰富, 人体必需各类蛋白质、微量元素等含量较高, 因此有很高的营养价值和利用价值(陈军等, 2012), 是我国东海及舟山渔场是极具商业价值的鱼种类之一(Zhao,

* 2019 年浙江省省级重点研发项目, 2019C02077 号; 浙江省基础公益基金项目, LGN19C200016 号。何定芬, 副教授, E-mail: 360186817@qq.com

通信作者: 谢超, 副教授, E-mail: xc750205@163.com

收稿日期: 2019-07-05, 收修改稿日期: 2019-08-21

2006)。数据显示,自20世纪50年代以来,东海带鱼的捕捞量始终占东海捕捞总量的最多份额,是最重要的海洋资源(王跃中等,2011)。在捕捞带鱼的过程中会夹杂20%—30%的低值小带鱼,数量巨大,但一直以来对低值小带鱼利用率却不高。因此,如何提高低值小带鱼的利用率,将是未来海洋渔业研究热点之一(陈凤杰,2013)。本研究对舟山低值小带鱼蛋白抗菌肽的抑菌性及食品理化性进行分析,为抗菌肽的进一步推广应用研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

带鱼(*Trichiurus lepturus*)蛋白抗菌肽(ABP),复合酶解法自制。

所用试剂如下:牛血清白蛋白(68000Da)、胰岛素(5808Da)、杆菌肽(1421Da)、氧化型谷胱甘肽(612Da)购自爱必信(上海)生物科技有限公司;大肠杆菌CMCC 44102、副溶血弧菌 ATCC 17802、肠炎沙门氏菌菌株 CMCC(B) 50335、小肠结肠炎耶尔森氏菌 ATCC 23715、黄色微球菌菌株 ATCC 58166、嗜热脂肪地芽孢杆菌 ATCC 7953、短双歧杆菌 ATCC 15700、金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 购自上海士锋生物科技有限公司;十二烷基磺酸钠、考马斯亮蓝购自吴江市德隆精细化工有限公司。

1.2 仪器与设备

仪器与设备如下:旋转蒸发仪(ZFY-1L)购自上海科兴仪器有限公司;ÄKTA 蛋白纯化系统(ÄKTAavant)购自杭州纽蓝科技有限公司;氨基酸自动分析仪(L-3000)购自苏州华美辰仪器设备有限公司;高速分散均质机(HAD-FJ200-S)、可见分光光度计(HAD-UV3200)、离心机(HAD-X201)、水浴恒温振荡器(HAD-SHA-B)购自北京恒奥德仪器仪表有限公司。

1.3 标准品的分子量分布

标准品及各分子量:牛血清白蛋白(68000Da)、胰岛素(5808Da)、杆菌肽(1421Da)、氧化型谷胱甘肽(612Da)。

采用 ÄKTA 蛋白纯化系统 SuperdexTM-75 HR 10/300 凝胶柱标准品进行洗脱分离,其条件为:过滤膜直径 0.45 μ m,进样量 300 μ L,流动相 50mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 5.8,含 0.3mol/L NaCl),流速 0.4mL/min,检测波长 280nm(宋茹,2011)。在上述条件下进行洗脱分离,横坐标为标准品洗脱体积(mL),纵坐标为相对分子质量对数($\lg M_r$),计算得出标准品

的分子量曲线方程。

1.4 抗菌肽的分子量分布

根据标准品的分子量曲线方程将带鱼蛋白抗菌肽的分子量分布情况分为3种:>3000Da,3000—800Da,<800Da,然后根据图谱计算各分子量区间的占比,最终确定带鱼蛋白抗菌肽的分子量分布情况。

1.5 氨基酸组成分析

将带鱼蛋白抗菌肽浓缩到固定的体积,然后用去离子水透析,使用的透析袋截留分子量为100Da,在4 $^{\circ}$ C环境中放置24h,取出后干燥,冷冻保存。将一定量的冻干样品溶于水解管中,溶剂选用6mol/L HCl,并充惰性气体对水解管密封,放置于110 $^{\circ}$ C下24h得到水解液。水解液脱酸干燥后用氨基酸自动分析仪测定氨基酸组成。

1.6 抗菌肽的抗菌谱和抗菌效力

1.6.1 抑菌圈 采用 Pushpa S. Murthy 等的琼脂扩散法进行抑菌圈的测定(Murthy *et al*, 2009),作为抗菌效果的表征指标,具体操作稍作调整。取100 μ L已被活化的菌种、菌浓度 10^7 CFU/mL的大肠杆菌菌悬液置于培养皿中,再加入15mL的(47 \pm 2) $^{\circ}$ C的营养琼脂培养基,混合均匀后静置,等待其凝固,然后用4mm的灭菌打孔器打孔,将25 μ L已除菌的酶解液加入每个孔中,在环境温度为恒定37 $^{\circ}$ C下培养24h,最后测定抑菌圈直径,用以确定带鱼蛋白抗菌肽的抗菌效果。

1.6.2 抗菌谱 实验用菌选用G⁻菌、G⁺菌、大肠杆菌CMCC 44102、副溶血弧菌ATCC 17802、肠炎沙门氏菌菌株CMCC(B) 50335、小肠结肠炎耶尔森氏菌ATCC 23715、黄色微球菌菌株ATCC 58166、嗜热脂肪地芽孢杆菌ATCC 7953、短双歧杆菌ATCC 15700、金黄色葡萄球菌ATCC 6538。将每种菌活化至生长对数期,按前述的抑菌圈法测带鱼蛋白抗菌肽的抗菌效果,均做平行实验3次,得出其抑菌谱。

1.6.3 抗菌效力 选取对照用的抗生素为土霉素和硫酸链霉素(华蕊等,2019),实验指示菌为大肠杆菌。首先配制土霉素及硫酸链霉素的浓度为1300U/mL,再采用二倍稀释法进行稀释,按前述方法测定各个浓度下的抑菌圈直径,与带鱼蛋白抗菌肽形成的抑菌圈直径对比,得出小带鱼抗菌肽的抗菌效力。

1.7 溶解度

参照崔霞等(2006)的方法,略作修改。首先配制1mol/L和6mol/L的HCl和NaOH缓冲液,再分别取

带鱼蛋白抗菌肽 5mL。调节 pH 依次为 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12, 然后将各样品在 25°C 下振荡(100r/min, 30min), 取出离心 20min, 取上清液测定蛋白质含量。对照组为 pH 7 未离心时的样品液蛋白质含量, 计算带鱼蛋白抗菌肽在各个 pH 条件下的溶解度, 实验均平行 3 次, 计算公式为式(1):

$$\text{溶解度}(\%) = (\text{上清液蛋白质含量} / \text{样品液 pH 7 未离心时蛋白质含量}) \times 100. \quad (1)$$

1.8 乳化性和乳化稳定性

1.8.1 乳化性 采用杨华连等(2019)的方法, 略做修改。配制浓度为 1% 的带鱼抗菌肽溶液为样品液, 调节 pH 依次为 2、4、6、8、10、12, 取 10mL 样品液, 将 10mL 大豆色拉油加至样品液中, 8000r/min 高速均质混合 1min, 25°C 恒温水浴 25min, 获得混合均匀的乳化液, 最后在 3000r/min 离心条件下离心 15min, 得到乳化液 A。对乳化液 A 的液体高度和乳化层进行测定, 计算乳化性, 计算公式为式(2):

$$\text{乳化性}(\%) = (\text{乳化层高度} / \text{液体高度}) \times 100. \quad (2)$$

1.8.2 乳化稳定性 将乳化液 A 置于温度为 80°C 的恒温水浴锅中 25min, 取出后再次在 3000r/min 离心条件下离心 15min, 得到乳化液 B。对乳化液 B 的乳化层高度进行测定, 计算乳化稳定性, 计算公式为式(3):

$$\text{乳化稳定性}(\%) = (\text{乳化液 B 乳化层高度} / \text{乳化液 A 乳化层高度}) \times 100. \quad (3)$$

1.9 发泡性和泡沫稳定性

1.9.1 发泡性 采用 Vilailak Klompong 等人的方法(Klompong *et al.*, 2007), 略做修改。分别取 5.0mL 带鱼抗菌肽溶液, 体积记为 V_1 , 调节 pH 为 2、4、6、8、10、12; 然后在室温 8000r/min 高速均质混合 3min, 样品液均质后马上转移到量筒中, 1min 记录体积 V_2 , 计算发泡性, 计算公式为式(4):

$$\text{发泡性}\% = \frac{V_2 - V_1}{V_1} \times 100. \quad (4)$$

1.9.2 泡沫稳定性 均质后的混合液在室温静置 5min, 记录体积 V_3 , 计算泡沫稳定性, 计算公式为式(5):

$$\text{泡沫稳定性}\% = \frac{V_3 - V_1}{V_1} \times 100. \quad (5)$$

2 结果与分析

2.1 标准品分子量分布

标准品分子量分布结果见表 1。

表 1 标准品分子量分布结果
Tab.1 The distribution results of molecular weight of standard products

标准品	牛血清白蛋白	胰岛素	杆菌肽	氧化型谷胱甘肽
分子量 $M_r(\text{Da})$	68000	5808	1421	612
$\lg M_r$	4.6792	3.2168	3.1269	2.7136
洗脱体积 (mL)	10.38	17.24	18.32	22.58
分子量曲线方程	$y = -0.01848x + 6.8023, R^2 = 0.9913$			

2.2 抗菌肽的分子量分布

观察图 1 及表 2 可以看出带鱼抗菌肽的分子量分布并不单一, 在三个区间(>3000Da, 3000—800Da, <800Da)内均有分布, 其中分子量在 3000—800Da 区间内分布最多, 百分含量达到 49.61%, 而在洗脱体积在 15mL 前并没有出峰, 说明小带鱼抗菌肽并不含大分子量的肽, 酶解程度较深。

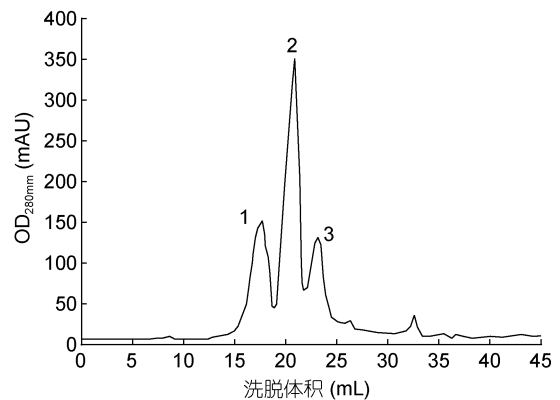


图 1 带鱼蛋白抗菌肽凝胶分离色谱图

Fig.1 Separation chromatogram of the antibacterial peptide gel

表 2 带鱼蛋白抗菌肽凝胶分离结果
Tab.2 Separation results of the antibacterial peptide gel

分离峰	洗脱体积 (mL)	分布范围 (Da)	百分含量 (%)
1	17.70	> 3000	31.53
2	20.28	3000—800	49.61
3	22.94	< 800	18.86

2.3 氨基酸组成分析

分析表 3 可得, 经过复合酶解得到的带鱼抗菌肽中共含有 17 种氨基酸, 氨基酸总量为 881.83mg/g, 其中含量最高的是必需氨基酸缬氨酸, 含量为 110.37mg/g; 其次是苯丙氨酸, 含量为 94.34mg/g; 含

量最低的氨基酸是甲硫氨酸, 含量仅有 9.32mg/g。计算得出, 必需氨基酸比氨基酸总量的比值为 44.75%, 高于 FAO/WHO 建议值 40%; 必需氨基酸比非必需氨基酸的比值为 81.33%, 远高于 FAO/WHO 建议值 60%, 因此可证明小带鱼抗菌肽营养价值较高 (Eggum, 1991)。氨基酸种类中脯氨酸、亮氨酸、丙氨酸、赖氨酸、缬氨酸和精氨酸可以促进抗菌肽的结构形成, 就能够让抗菌肽的抗菌效力得到一定程度的提升 (Boman *et al*, 1981; Jaynes *et al*, 1988)。由表中数据计算可得, 这六类氨基酸在氨基酸总量中占比达到 42.71%, 可以推测小带鱼抗菌肽的抗菌效力较高。

表 3 带鱼蛋白抗菌肽氨基酸组成分析

Tab.3 The amino acid composition of the antimicrobial peptides

氨基酸	含量(mg/g)	氨基酸	含量(mg/g)
天冬氨酸	38.17	苏氨酸*	20.83
丝氨酸	41.18	谷氨酸	76.94
甘氨酸	32.68	丙氨酸	74.28
缬氨酸*	110.37	半胱氨酸	48.46
异亮氨酸*	36.57	亮氨酸*	46.36
酪氨酸	84.62	苯丙氨酸*	94.34
赖氨酸*	76.85	组氨酸	22.13
精氨酸	26.35	脯氨酸	42.38
甲硫氨酸*	9.32	ΣAA	881.83
EAA	394.64	NEAA	485.19

注: *代表必需氨基酸, ΣAA 代表氨基酸总量; EAA 代表必需氨基酸总量; NEAA 代表非必需氨基酸总量

2.4 抗菌肽的抗菌谱和抗菌效力

带鱼抗菌肽的抗菌谱及抗菌效力分别见表 4 及表 5。

表 5 带鱼蛋白抗菌肽的抗菌效力

Tab.5 Antibacterial efficacy of the antimicrobial peptides

稀释倍数	2 倍	4 倍	8 倍	16 倍	32 倍	64 倍	128 倍
土霉素	32.6±0.3	29.8±0.1	27.1±0.6	24.5±0.2	22.3±0.8	20.2±0.4	18.7±0.7
硫酸链霉素	21.3±0.2	18.6±0.6	16.4±0.1	13.8±0.5	11.6±0.8	9.8±0.6	7.2±0.1
带鱼抗菌肽				18.8±0.3			

2.5 溶解度

通过对抗菌肽的表征特性进行研究, 获得带鱼抗菌肽在不同 pH 下的溶解度如图 2 所示。分析柱状图可得, 在 pH 7 时抗菌肽的溶解度最低, 只有 89.86%, 在偏酸或者偏碱性的环境下抗菌肽的溶解度较高, 分析其原因可能是 pH 7 时处于抗菌肽的等电点附近, 而蛋白质及肽类在等电点附近时, 溶解度

分析表 4 可得, 带鱼抗菌肽对革兰氏阴性菌(G⁻)及革兰氏阳性菌(G⁺)均有抑菌作用, 证明该抗菌肽具有广谱抗菌活性。从整体上分析, 该抗菌肽对 G⁻的抗菌效果优于对 G⁺的抗菌效果, 分析其原因可能是由于革兰氏阴性和阳性菌之间的菌外膜差别, 导致的作用结果不同。革兰氏阴性菌菌外膜上带负电的多糖等物质易与抗菌肽产生作用, 破坏膜结构, 内容物溢出, 发挥抗菌作用; 革兰氏阳性菌菌外膜多为无脂多糖类, 只有少数酸类物质带负电, 不易与抗菌肽产生作用, 故抗菌作用较弱 (Bhaskar *et al*, 2008)。一般来说, 对革兰氏阴性菌抗菌效果较优的是阳离子型抗菌肽, 因此可以推测小带鱼抗菌肽为阳离子型抗菌肽。

表 4 带鱼蛋白抗菌肽的抗菌谱

Tab.4 Antibacterial spectra of the antimicrobial peptides

实验用菌	抑菌圈直径(mm)
革兰氏阴性菌(G ⁻)	
大肠杆菌 CMCC 44102	16.2±0.2
副溶血弧菌 ATCC 17802	12.7±0.3
肠炎沙门氏菌菌株 CMCC(B) 50335	9.8±0.1
小肠结肠炎耶尔森氏菌 ATCC 23715	11.6±0.6
革兰氏阳性菌(G ⁺)	
黄色微球菌菌株 ATCC 58166	8.9±0.4
嗜热脂肪地芽孢杆菌 ATCC 7953	9.5±0.0
金黄色葡萄球菌 ATCC 6538	10.8±0.3
短双歧杆菌 ATCC 15700	9.3±0.2

由表 5 可得, 带鱼抗菌肽对大肠杆菌的抗菌效力约与稀释 128 倍(10.15U/mL)的土霉素抗菌效力相当, 与稀释 4 倍的硫酸链霉素(325U/mL)抗菌效力相当。

会降低 (Linder *et al*, 1996), 在 pH 远离 7 时因为偏离了等电点, 所以抗菌肽的溶解性提高。pH 对溶解性的影响机制是改变溶液的静电荷和疏水相互作用, 达到影响溶解性的目的 (Sorgentini *et al*, 2002)。总体而言, 带鱼抗菌肽在各个 pH 下溶解度表现良好, 均大于 88%, 证明该抗菌肽有很强的适应性, 利用价值相对较高。

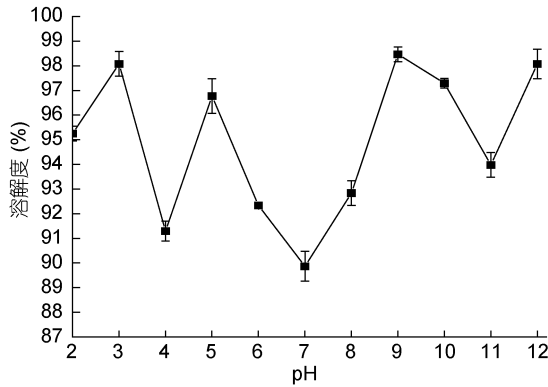


图2 带鱼蛋白抗菌肽不同 pH 下溶解度

Fig.2 Solubility of the antibacterial peptide at different pH values

2.6 乳化性和乳化稳定性

蛋白酶解液的乳化性与其肽链上的亲水基团、疏水基团有关。在酶解过程中,疏水基团会不断暴露,疏水性的变强会促进结合油滴,进而增强了乳化性。但是酶解程度过大时产生的小分子肽会降低乳化性。小带鱼抗菌肽乳化性及乳化稳定性在不同 pH 下变化情况见图 3、图 4。

由图 3 可得,当 pH 为 4 时带鱼抗菌肽乳化性最低,只有 53.68%,当 pH 上升时,其乳化性也表现出增长的趋势,在 pH 范围在 6—10 时增长迅速,在 pH 为 12 时达到最高,乳化性为 78.34%。抗菌肽溶液的乳化性受各种因素的影响,其中包括溶液中一些亲水基团和亲油基团的含量,溶液溶解性、溶液所带电荷多少及正负性、肽链长度、肽链分子空间结构等会影响到乳化性(温青玉等,2018)。

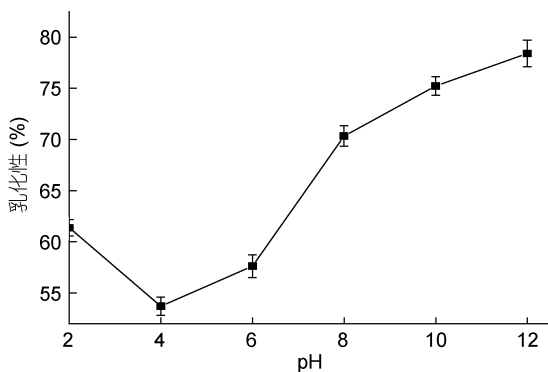


图3 带鱼蛋白抗菌肽乳化性随 pH 变化

Fig.3 Emulsification of the antimicrobial peptides with pH

分析图 4 可得,带鱼抗菌肽的乳化稳定性呈现 A 型图,在 pH 6 时达到最高,为 85.83%。当 pH 环境过

酸或者过碱的情况下乳化稳定性均较低,分析其原因可能是由于粒子之间存在电荷排斥作用,一定条件下可能会造成粒子间的聚集和絮化,因此导致了乳化稳定性的降低。总体来说,带鱼抗菌肽不仅乳化性展现出较强的效果,因此具有较高的商业价值。

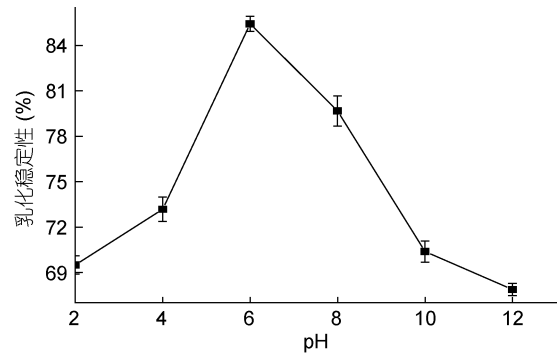


图4 带鱼蛋白抗菌肽乳化稳定性随 pH 变化

Fig.4 The emulsification stability of the antibacterial peptide vs. pH

2.7 发泡性和泡沫稳定性

发泡性指的是产生并维持的界面面积,与蛋白质分子的极性基团及大小相关,酶解液的 pH 环境很大程度上决定了发泡性和泡沫稳定性(宋茹,2011)。泡沫只有存在可溶性蛋白才能形成,并且在等电点处可溶性蛋白浓度将会降低,因此发泡性减弱,但不溶性蛋白则会提高泡沫稳定性。带鱼抗菌肽发泡性和泡沫稳定性在不同 pH 下变化情况见图 5、图 6。

由图 5 可以看出,带鱼抗菌肽发泡性随 pH 上升呈现出增长的趋势,在 pH 12 时达到最大值 57.33%,分析原因可能是 pH 环境为碱性时,溶液内的电荷数变多,促进了蛋白质界面的气水吸收,提高了起泡性。

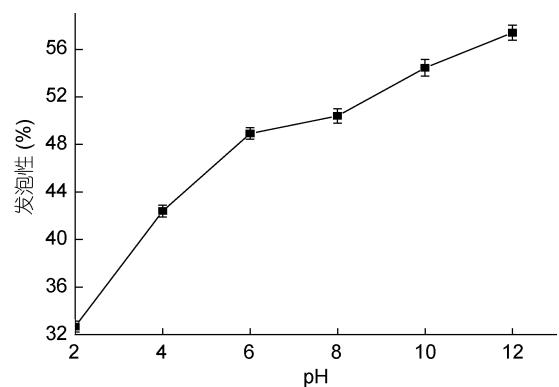


图5 带鱼蛋白抗菌肽发泡性随 pH 变化

Fig.5 Flammability of antibacterial peptides of squid with pH

如图 6 所示, 当 pH 4 时带鱼抗菌肽泡沫稳定性降至最低, 只有 22.86%, 可能是达到多数蛋白质分子的等电点; 之后当 pH 升高时, 泡沫稳定性也随之增强, 在 pH 12 时达到最大值 59.58%。原因可能是在酸性环境下, 肽分子之间离子排斥作用较强, 不易在界面形成交联网状结构的稳定液膜(肖连冬等, 2014), 结果造成泡沫稳定性的降低。

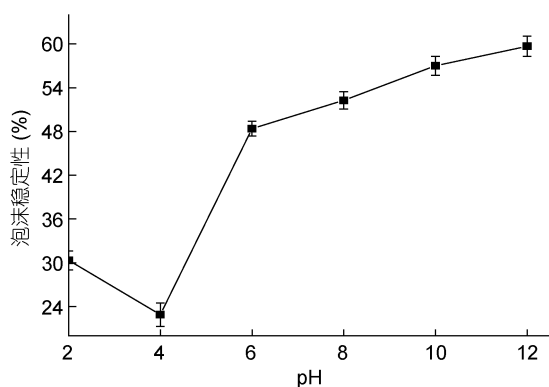


图 6 带鱼抗菌肽泡沫稳定性随 pH 变化

Fig.6 Antibacterial peptide foam stability vs. pH

3 结论

本实验采用自制的舟山带鱼抗菌肽作为研究对象, 探究抗菌肽的抑菌结构及表征活性等特征。实验得出带鱼蛋白抗菌肽的抑菌结构及理化性质为: 分子量在三个区间(>3000Da, 3000—800Da, <800Da)内均有分布, 其中分子量在 3000—800Da 区间内含量达到 49.61%, 酶解程度较深; 氨基酸总量为 881.83mg/g, 必需氨基酸比氨基酸总量的比值为 44.75%, 必需氨基酸比非必需氨基酸的比值为 81.33%, 营养价值高; 六类提升抗菌效力的氨基酸在氨基酸总量中占比 42.71%, 推测抗菌效力较高; 具有广谱抗菌活性, 对 G 菌具有较强的致死效果, 为阳离子型抗菌肽; 抗菌效力约与稀释 128 倍(10.15U/mL)的土霉素抗菌效力相当, 与稀释 4 倍的硫酸链霉素(325U/mL)抗菌效力相当。

带鱼蛋白抗菌肽表征活性为: 在不同 pH 下溶解度表现均良好, 且大于 88%, 证明该抗菌肽有很强的适应性, 利用价值相对较高; 乳化性随着 pH 值的增大而逐渐增强, 当 pH 为 4 时带鱼抗菌肽乳化性最低, 只有 53.68%, 在 pH 为 12 时达到最高, 乳化性为 78.34%; 乳化稳定性在 pH 6 时达到最高, 为 85.83%, pH 环境过酸或者过碱的情况下乳化稳定性均较低;

发泡性随 pH 上升呈现出增长的趋势, 在 pH 12 时达到最大值 57.33%; pH 4 时小带鱼抗菌肽泡沫稳定性降至最低, 只有 22.86%, 之后当 pH 升高时, 泡沫稳定性也随之增强, 在 pH 12 时达到最大值 59.58%。本实验探究得到舟山带鱼蛋白抗菌肽的抑菌性及表征活性指标, 为蛋白抗菌肽的推广应用提供了理论依据。

参 考 文 献

- 王 婧, 刁小龙, 陈晓兰等, 2018. 抗菌肽 Indolicidin 的研究进展. 江苏农业学报, 34(4): 949—954
- 王跃中, 贾晓平, 林昭进等, 2011. 东海带鱼渔获量对捕捞压力和气候变动的响应. 水产学报, 35(12): 1881—1889
- 田春雷, 袁 威, 任志华等, 2015. 复合抗菌肽“态康利保”对断奶仔猪红细胞免疫功能的影响. 中国兽医学报, 35(5): 795—798
- 华 蕊, 杨 慧, 吴科榜等, 2019. 抗菌肽 CJH 对常见畜禽病原菌抑菌活性及与抗生素协同杀菌效应研究. 饲料研究, 42(1): 111—114
- 杨华连, 陈 莉, 卢红梅等, 2019. 薏仁米糠多肽的功能特性研究. 中国酿造, 38(4): 126—130
- 肖连冬, 程 爽, 李 杰, 2014. 大豆分离蛋白起泡性和乳化性影响因素的研究. 中国酿造, 33(4): 83—86
- 宋 茹, 2011. 黄鲫(*Setipinna taty*)蛋白抗菌肽的制备及抗菌作用等生物活性研究. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 18—20
- 陈 军, 赵 立, 孟玉洁, 2012. 带鱼脱腥工艺研究. 江苏农业科学, 40(2): 223—225
- 陈凤杰, 2013. 以低值小带鱼为原料的重组鱼脆粒加工及贮藏研究. 无锡: 江南大学硕士学位论文
- 金海涛, 但启雄, 袁 威等, 2016. 复合抗菌肽“态康利保”对断奶仔猪组织抗氧化功能的影响. 中国兽医学报, 36(7): 1212—1217, 1258
- 崔 霞, 周艳明, 牛 森等, 2006. 酶法水解苦荞蛋白制备可溶性生物活性肽最佳条件的研究. 粮食与食品工业, 13(1): 39—41
- 梁秀丽, 刘书梅, 蒋志惠等, 2019. 3 种检测牛白细胞源抗菌肽抗病毒活性方法的建立. 畜牧与兽医, 51(5): 83—88
- 梁莹芳, 林慧敏, 石芸洁等, 2016. 带鱼酶解蛋白亚铁螯合肽对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)生长、免疫及品质的影响. 海洋与湖沼, 47(6): 1257—1262
- 温青玉, 张康逸, 杨 帆等, 2018. 小麦分离蛋白质理化性质及功能特性研究. 河南农业科学, 47(5): 149—154
- Bhaskar N, Benila T, Radha C *et al*, 2008. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of *Catla (Catla catla)* for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. *Bioresource Technology*, 99(2): 335—343
- Boman Hans G, Hultmark D, 1981. Cell-free immunity in insects. *Trends in Biochemical Sciences*, 6: 306—309
- Eggum B, 1991. Comments on report of a joint FAO/WHO expert consultation on protein quality evaluation, Rome 1990. *Zeitschrift Für Ernährungswissenschaft*, 30(2): 81—88

- Ernesto P M, De Oca M, 2013. Antimicrobial peptide elicitors: new hope for the post-antibiotic era. *Innate Immunity*, 19(3): 227—241
- Jaynes J M, Burton C A, Barr S B *et al*, 1988. In vitro cytotoxic effect of novel lytic peptides on *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma cruzi*. *The FASEB Journal*, 2(13): 2878—2883
- Klompong V, Benjakul S, Kantachote D *et al*, 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*, 102(4): 1317—1327
- Linder M, Fanni J, Parmentier M, 1996. Functional properties of veal bone hydrolysates. *Journal of Food Science*, 61(4): 712—716
- Murthy P S, Manonmani H K, 2009. Physico-chemical, antioxidant and antimicrobial properties of Indian monsooned coffee. *European Food Research and Technology*, 229(4): 645—650
- Sorgentini D A, Wagner J R, 2002. Comparative study of foaming properties of whey and isolate soybean proteins. *Food Research International*, 35(8): 721—729
- Yeaman M R, Yount N Y, 2007. Unifying themes in host defence effector polypeptides. *Nature Reviews Microbiology*, 5(9): 727—740
- Yeung A T, Gellatly S L, Hancock R E W, 2011. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(13): 2161—2176
- Zhao X Y, 2006. *In situ* target-strength measurement of young hairtail (*Trichiurus haumela*) in the Yellow Sea. *ICES Journal of Marine Science*, 63(1): 46—51

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF HAIRTAIL (*TRICHIURUS LEPTURUS*) PROTEIN PEPTIDE AND THE FOOD PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES

HE Ding-Fen¹, XIE Chao², ZHENG Lin-Bo², YE Chang-Qing³, LI Hai-Bo¹

(1. Zhejiang International Maritime Vocational and Technical College, Zhoushan 316021, China; 2. College of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China; 3. Zhoushan Changqing Marine Food Limited Company, Zhoushan 316021, China)

Abstract To study the antibacterial activity and food physicochemical properties of fish protein antibacterial peptide, we took hairtail *Trichiurus lepturus* as the research object for the preparation of protein antimicrobial peptide. The molecular weight of the antimicrobial peptides was distributed in the ranges of >3000, 3000—800, and <800Da. The content reached 49.61% in the range of 3000—800Da at which enzymatic hydrolysis was the deepest. The total amount of amino acids was 881.83mg/g; the ratio of essential amino acids to amino acids was 44.75%; the ratio of essential amino acids to non-essential amino acids is 81.33%; and the nutritional value is high. Six types of amino acids enhanced the antibacterial efficacy and they accounted for 42.71% of the total amino acids, showing a high and broad-spectrum antibacterial activity and being a cationic antibacterial peptide. The antibacterial efficacy is equal to that of 128-fold (10.15U/mL) diluted oxytetracycline, and that of the 4-fold dilution of streptomycin sulfate (325U/mL). The antimicrobial peptide had a good solubility at pH 2—12, reaching 88%, and has strong adaptability. Emulsification increased with increasing pH from the lowest emulsifiability of 53.68% at pH 4 to the highest of 78.34% at pH 12. The emulsification stability reached the highest of 85.83% at pH 6, and was low in the two ends of pH scale. The foaming property increased with the increase of pH value, reaching the maximum of 57.33% at pH 12. The antibacterial peptide foam had the lowest stability at pH 4 for 22.86% only, and peaked to 59.58% at pH 12. The results of this study provide a theoretical basis for exploring properties and applications of the antibacterial peptides.

Key words hairtail *Trichiurus lepturus*; antimicrobial peptide; bacteriostatic; physical and chemical properties