

泥鳅抗菌肽制备及其抑制致鳃弧菌作用

窦宝杰^{1,2}, 丁闻^{1,2}, 卢静^{1,2*}, 郭全友³, 吕明生^{1,2*}, 王淑军^{1,2}

(1.江苏海洋大学 江苏省海洋生物资源与环境重点实验室, 江苏 连云港 222005; 2.江苏海洋大学 江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 222005; 3.中国水产科学院 东海水产研究所, 上海 200090)

摘要:为提升泥鳅开发利用价值, 开发新的抗菌活性成分, 利用胰蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶对泥鳅肉糜进行酶解, 通过分离和超滤提取泥鳅酶解产物。结果表明, 木瓜蛋白酶的酶解产物 M1 (<5 kDa 组分) 对常见致病细菌嗜水气单胞菌、副溶血性弧菌、哈维氏弧菌、鳃弧菌、温和水气单胞菌等具有抗菌作用。抗菌物质的分子量小于 5 kDa, 其抑制鳃弧菌的 IC_{50} 值为 15.76 mg/mL, 可抑制鳃弧菌生物膜的形成。推测其通过破坏鳃弧菌的细胞膜发挥其抗菌作用。

关键词:泥鳅; 蛋白酶; 酶解产物; 抗菌; 致病菌

Preparation of Antimicrobial Peptides from *Misgurnus anguillicaudatus* and Its Inhibitory Effect on *Vibrio anguillarum*

DOU Baojie^{1,2}, DING Wen^{1,2}, LU Jing^{1,2*}, GUO Quanyou³, LÜ Mingsheng^{1,2*}, WANG Shujun^{1,2}

(1. Jiangsu Provincial Key Laboratory of Marine Biological Resources and Environment, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, Jiangsu, China; 2. Key Laboratory of Marine Biotechnology of Jiangsu Province, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, Jiangsu, China; 3. East China Sea Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China)

Abstract: To enhance the development and utilization value of *Misgurnus anguillicaudatus* and develop new antibacterial active ingredients, the comminuted meat of *Misgurnus anguillicaudatus* was hydrolyzed by trypsin, pepsin, papain, neutral protease, and alkaline protease, and the enzymatic hydrolysates were extracted by separation and ultrafiltration. The results showed that the enzymatic hydrolysates of papain, namely M1 (with a component of <5 kDa), had antibacterial effects on common pathogenic bacteria, such as *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum*, and *Aeromonas temperate*. The molecular weight of the antibacterial substance was less than 5 kDa, and its IC_{50} for inhibiting *Vibrio anguillarum* was 15.76 mg/mL, which could inhibit the formation of the biofilm of *Vibrio anguillarum*. It was speculated that it could exert its antibacterial effect by destroying the cell membrane of *Vibrio anguillarum*.

Key words: *Misgurnus anguillicaudatus*; protease; enzymatic hydrolysates; antibacterial; pathogenic bacteria

引文格式:

窦宝杰, 丁闻, 卢静, 等. 泥鳅抗菌肽制备及其抑制致鳃弧菌作用[J]. 食品研究与开发, 2024, 45(5): 74-80.

DOU Baojie, DING Wen, LU Jing, et al. Preparation of Antimicrobial Peptides from *Misgurnus anguillicaudatus* and Its Inhibitory Effect on *Vibrio anguillarum*[J]. Food Research and Development, 2024, 45(5): 74-80.

泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 属于鲤形目鳅科, 在亚洲广泛分布^[1]。泥鳅富含优质蛋白质、透明质

酸、多糖、维生素、矿物质和必需氨基酸, 具有极高的营养价值和食用价值^[2-3]。泥鳅脂肪和胆固醇含量低, 属

基金项目: 江苏省连云港市 521 项目 (LYG06521202107); 江苏省海洋资源与环境重点实验室基金项目 (SH20201204); 中国水产科学研究院基本科研业务费资助项目 (2020TD68)

作者简介: 窦宝杰 (1997—), 男 (汉), 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术。

*通信作者: 卢静 (1990—), 女, 讲师, 博士, 研究方向: 食品生物技术; 吕明生 (1963—), 男, 教授, 博士, 研究方向: 食品生物技术。

高蛋白低脂肪食品,是潜在的优质动物蛋白资源^[2]。目前,市场上泥鳅加工产品仍以直接加工为主,如泥鳅干、麻辣泥鳅、泥鳅粉等^[4],其精深加工技术和应用亟需研究。

抗菌肽主要来源于植物和动物的提取以及微生物发酵,分子量多分布在 2~7 kDa^[5-7]。与传统抗生素相比,抗菌肽具有抗菌能力强、抗菌谱广、不易产生耐药性等特点^[5]。目前的研究发现,抗菌肽的作用机理主要是破坏细菌膜结构,导致菌体死亡^[8]。对于泥鳅源抗菌肽的研究,裴颖等^[9]使用 Tris-HCl 法对泥鳅中的抗菌肽进行提取,发现其对嗜水气单胞菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌抑菌效果明显。通过酶法生产的抗菌肽具有安全性高、酶解过程易于控制、生产得率高等优点^[8]。然而,使用酶解法提取泥鳅抗菌肽的研究相对较少,值得进一步研究。

本文以泥鳅为原料,选用 5 种蛋白酶对其进行酶解,并对酶解产物进行初步超滤纯化,制备出具有抑制致病菌作用的抗菌肽,初步探索其抗菌机制,以期为泥鳅的精深加工提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

泥鳅(*M. anguillicaudatus*):连云港金水湾食品有限公司;胰蛋白酶(20 万 U/g)、中性蛋白酶(20 万 U/g)、碱性蛋白酶(20 万 U/g):宁夏和氏璧生物技术有限公司;酸性蛋白酶(20 万 U/g)、木瓜蛋白酶(20 万 U/g):南京庞博生物工程有限公司;金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)、温和水气单胞菌(*Aeromonas temperate*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*):江苏省海洋生物资源与环境重点实验室保藏;2,2-二苯基-1-苦基肼(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl,DPPH):美国 Sigma 公司。

1.2 仪器与设备

5804R 高速冷冻离心机:艾本德(中国)有限公司;ALPH4 真空冷冻干燥机:江苏海企国际股份有限公司;THZ-103B 恒温培养摇床、DK-8D 恒温水浴锅:上海一恒科学仪器有限公司;Multiskan FC 全波长酶标仪:美国 Thermo fisher 公司;BPX-52 生化培养箱:上海博迅实业有限公司;JSMIT-800 扫描电镜:日本东京 JEOL 公司。

1.3 方法

1.3.1 泥鳅肉糜的酶解与纯化

1.3.1.1 泥鳅肉糜的酶解

利用胰蛋白酶、酸性蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶 5 种蛋白酶,以泥鳅肉糜为底物,底物质量分数为 30%(即 30 g 肉糜中加入 70 mL 水制成匀浆),每克肉糜中添加 900 U 蛋白酶,在一定条件下酶解

4 h,沸水浴中灭酶 15 min,冷却后 4 ℃下 4 000 r/min 离心 20 min,取上清液^[10-12]。胰蛋白酶、酸性蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶酶解产物分别命名为 Y、S、M、Z、J。具体酶解条件见表 1。

表 1 不同蛋白酶的酶解条件

Table 1 Enzymatic hydrolysis conditions of different proteases

蛋白酶名称	酶解温度/℃	酶解 pH 值
胰蛋白酶	37	6.5
酸性蛋白酶	40	3.0
木瓜蛋白酶	55	6.5
中性蛋白酶	50	6.5
碱性蛋白酶	50	8.0

1.3.1.2 酶解产物的纯化

将 Y、S、M、Z、J 先使用 0.45 μm 滤膜过滤,去除其中大分子杂蛋白。随后利用超滤装置对抽滤得到的液体进行分离纯化。经 5 kDa 和 10 kDa 的超滤膜超滤,每种泥鳅酶解产物获得 3 种组分,即<5 kDa、5~10 kDa、>10 kDa,依次标记为 Y1、Y2、Y3、S1、S2、S3、M1、M2、M3、Z1、Z2、Z3、J1、J2、J3。对各组分进行冷冻干燥用于后续试验。

1.3.2 酶解产物的抗菌活性

以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌为受试菌,测定菌液的光密度值(OD_{600 nm})以比较产物的抗菌活性。在无菌试管中加入酶解产物与 5 mL 液体培养基,接种 200 μL 菌悬液(菌浓度 1×10⁴ CFU/mL),以不加酶解产物作为对照,充分混匀,将试管放入 37 ℃恒温培养摇床中培养 20 h 后,测定 OD_{600 nm}^[13-15]。

1.3.3 酶解产物的抗致病菌活性

1.3.3.1 不同组分抗致病菌的活性

方法同 1.3.2,分别测定泥鳅木瓜蛋白酶酶解产物 M、M1、M2、M3 对常见病原菌哈维氏弧菌、鳗弧菌、温和水气单胞菌、嗜水气单胞菌、副溶血性弧菌的抑菌作用。抑菌率(X,%)的计算公式如下。

$$X=[1-(A_n-A_0)/A_0] \times 100 \quad (1)$$

式中:A_n 为试验组的吸光度;A₀ 为对照组吸光度;A₀ 为空白组吸光度。

1.3.3.2 不同浓度 M1 抑制鳗弧菌的活性

将 M1 梯度稀释,测定其对鳗弧菌的抗菌活性,计算出 IC₅₀ 值。

1.3.4 M1 抗氧化活性的测定

1.3.4.1 DPPH 自由基清除作用

将 M1 稀释成不同浓度梯度,将 0.2 mL 酶解产物 M1 与 0.2 mL 的 DPPH(0.1 mmol/L)依次加入,置于暗处,30 min 后测量 OD_{517 nm}^[16-17]。DPPH 自由基清除率计算公式如下。

$$Y=[1-(A_x-A_{x_0})/A_0] \times 100 \quad (2)$$

式中:Y 为 DPPH 自由基清除率,%;A_x 为 DPPH 与 M1 反应的吸光度;A_{x0} 为乙醇与 M1 反应的吸光度;

A_0 为 DPPH 与水的吸光度。

1.3.4.2 羟自由基清除作用

将 M1 稀释成不同浓度梯度,将 0.1 mL 酶解产物 M1、0.1 mL 9 mmol/L FeSO_4 、0.1 mL 9 mmol/L 水杨酸(无水乙醇溶液)、0.1 mL H_2O_2 混合,37 °C 水浴 15 min,测量 $\text{OD}_{510\text{ nm}}$ [16-17]。羟自由基清除率计算公式如下。

$$W = [1 - (A_x - A_{x_0}) / A_0] \times 100 \quad (3)$$

式中: W 为羟自由基清除率,%; A_x 为样品的吸光度; A_{x_0} 为空白试剂的吸光度; A_0 为不含样品的对照的吸光度。

1.3.4.3 超氧阴离子自由基清除活性

将 M1 稀释成不同浓度梯度,将 0.2 mL M1 与 1 mL Tris-HCl (50 mmol/L) 混合,25 °C 温育 10 min,立即加入 30 μL 邻苯三酚(6 mmol/L),室温放置 30 min,测量 $\text{OD}_{320\text{ nm}}$ 。超纯水和 V_c 分别作空白对照和阳性对照[16-17]。超氧阴离子自由基清除率计算公式如下。

$$Z = [1 - (A_x - A_{x_0}) / A_0] \times 100 \quad (4)$$

式中: Z 为超氧阴离子自由基清除率,%; A_x 为 M1+Tris-HCl+邻苯三酚的吸光度; A_{x_0} 为 M1+Tris-HCl+HCl 的吸光度; A_0 为水+Tris-HCl+邻苯三酚吸光度。

1.3.4.4 还原力测定

将 M1 稀释成不同浓度梯度,将 0.2 mL M1、0.2 mL 磷酸盐缓冲溶液(0.2 mol/L, pH6.6)和 0.2 mL 的 1% 铁氰化钾混合,50 °C 孵育 20 min,然后加入 0.2 mL 10% 三氯乙酸,混合后 5 000 r/min 离心 10 min。将 0.5 mL 上清液、2.5 mL 蒸馏水与 0.1 mL 的氯化铁混合,测量 $\text{OD}_{700\text{ nm}}$,超纯水和 V_c 作参照 [16-17]。

1.3.5 M1 抗菌机理研究

1.3.5.1 M1 对鳗弧菌生物膜的作用

将 24 孔板每孔添加新鲜的 LB 培养基 1 mL,40 μL 菌液,加入 M1 以达到不同浓度,37 °C 静置培养 24 h。弃掉培养液,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)轻洗 3 次,每孔加入 0.1% 结晶紫溶液 1 mL,染色 20 min。倒出染色液,用去离子水冲洗 3 遍。于 45 °C 烘箱干燥,加入 95% 乙醇脱色 3 min,将脱色液移入 96 孔板,测定 $\text{OD}_{570\text{ nm}}$ [18-19]。

电镜检测菌体的生物膜:将 24 孔板中一孔添加新鲜的 LB 培养基 2 mL,100 μL 菌液,加入 M1 使之浓度达到 IC_{50} 值,放入无菌玻璃片,37 °C 培养 24 h。以不加入 M1 为对照。待生物被膜形成后,弃去培养液,用 PBS 冲洗 3 次,风干,向孔板中加入 2 mL 2.5% 戊二醛固定生物膜。再分别用 30%、50%、70%、80%、90%、100% 乙醇脱水 10 min,喷金后电镜观察[20]。

1.3.5.2 M1 抑制致病菌细胞膜的作用

通过测量细胞成分的释放($\text{OD}_{260\text{ nm}}$)来测定细胞膜的完整性。首先将鳗弧菌培养至对数期,然后 5 000 r/min 离心 5 min。用 0.1 mol/L PBS (pH7.4)洗涤沉淀 3 次,

与不同浓度样品在 37 °C 培养 4 h,在 260 nm 测定释放的核酸[21]。

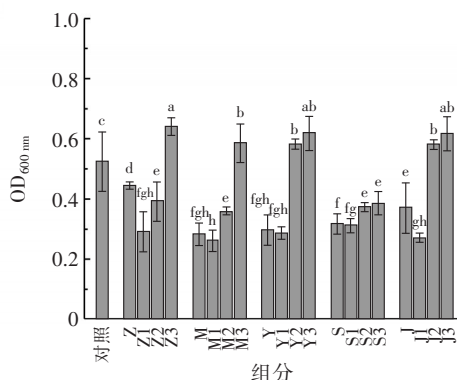
1.4 数据的统计分析

所有试验均设 3 个平行样,数据以平均值 $\pm$ 标准差表示。采用 Origin 2018 制图,SPSS Statistics 26 对数据的差异性进行分析。

2 结果与讨论

2.1 蛋白酶对酶解产物抗菌活性的影响

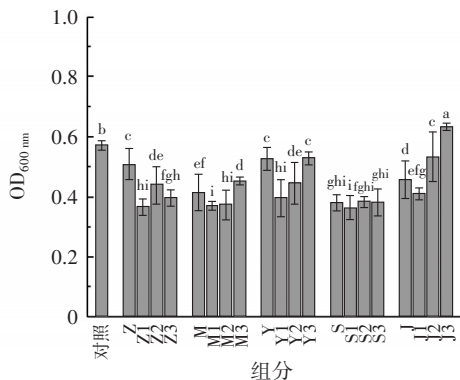
图 1、图 2 为经不同蛋白酶酶解后,泥鳅酶解产物对大肠杆菌与金黄色葡萄球菌活性的影响。



不同小写字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。

图 1 泥鳅酶解产物对大肠杆菌的抑制活性

Fig.1 Inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of *Misgurnus anguillicaudatus* on *Escherichia coli*



不同小写字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。

图 2 泥鳅酶解产物对金黄色葡萄球菌抑制活性

Fig.2 Inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of *Misgurnus anguillicaudatus* on *Staphylococcus aureus*

由图 1 可以看出,泥鳅蛋白酶酶解产物各组分对大肠杆菌抑制活性差异明显。其中,添加木瓜蛋白酶酶解产物组分 M1 的 OD 值最低,说明 M1 抑制大肠杆菌活性作用最强。图 2 显示添加酸性蛋白酶酶解产物组分 S1 和木瓜蛋白酶酶解产物组分 M1 的 OD 值低于其他组分,说明这 2 个组分抑制金黄色葡萄球菌活性高于其他组分。经过超滤后分子量小于 5 kDa 的酶

解产物抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌活性更强,这与王蕾^[22]的结果相似。研究发现从泥鳅中提取的抗菌肽能够杀死大部分革兰阳性菌,部分革兰阴性菌^[23]。研究表明,不同浓度的泥鳅肽可对多种细菌产生抑制作用^[24]。酶解产物抗菌活性的强弱与选用的蛋白酶有关^[25]。吴林泽等^[26]发现,使用碱性蛋白酶酶解的罗非鱼下脚料粗肽对金黄色葡萄球菌的抗菌效果好。虽然这5种蛋白酶都具有制备抗菌肽的潜力,但不同蛋白酶对蛋白的酶切位点不同,其产生的抗菌肽的数量与质量也不同。根据效果,选用木瓜蛋白酶进行后续研究。

2.2 泥鳅木瓜蛋白酶酶解产物对致病菌的抑制作用

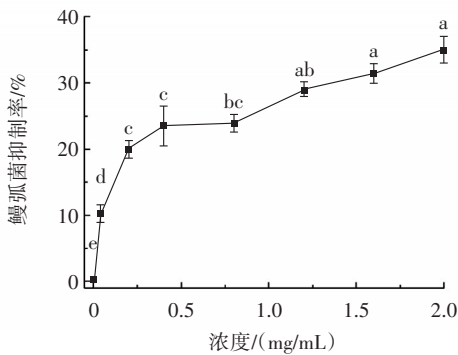
泥鳅木瓜蛋白酶酶解产物各组分对致病菌的抑制作用见表2。

表2 泥鳅木瓜蛋白酶酶解产物各组分对致病菌的抑制作用
Table 2 Inhibitory effects of various components of enzymatic hydrolysates of papain of *Misgurnus anguillicaudatus* on pathogenic bacteria

组分	抑菌率/%				
	嗜水气单胞菌	鳃弧菌	哈维氏弧菌	温和水气单胞菌	副溶血性弧菌
M	6.28±0.47 ^b	10.01±0.60 ^b	-	6.99±0.96 ^b	5.37±2.48 ^{ab}
M1	9.64±2.08 ^a	35.79±1.73 ^a	6.56±1.70	24.48±2.32 ^a	8.57±2.13 ^a
M2	5.74±0.21 ^c	6.48±2.23 ^c	-	6.14±1.42 ^c	5.10±0.17 ^c
M3	-	-	-	-	-

注:同列不同小写字母表示差异显著, $P<0.05$ 。-表示未检测出抑菌活性。

由表2可知,在泥鳅木瓜蛋白酶酶解产物中,分子量越小其抗菌效果越强。其中M1对常见水产动物致病菌嗜水气单胞菌、鳃弧菌、哈维氏弧菌、温和水气单胞菌、副溶血性弧菌均具有一定的抑制作用。M1对不同致病菌的抗菌效果不同,对鳃弧菌的抑菌活性更强,具体结果见图3。



不同小写字母表示差异显著, $P<0.05$ 。

图3 泥鳅多肽M1抑制鳃弧菌活性

Fig.3 Inhibitory activity of polypeptide M1 from *Misgurnus anguillicaudatus* on *Vibrio anguillarum*

由图3可知,随着M1浓度的增加,对鳃弧菌抑制

活性增加。通过计算,其 IC_{50} 值为15.76 mg/mL。杨富敏^[27]利用碱性蛋白酶酶解扇贝裙边,其产物分子量集中在1~3 kDa,可以抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的生长。康丹丹等^[28]通过木瓜蛋白酶制备多肽,其对金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌和化脓性链球菌的最低抑制浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)分别为5、10、2.5 mg/mL。王碧超^[29]以金枪鱼骨头制备的胶原基抗菌肽,其抑制大肠杆菌MIC和最小杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC)值分别为4 mg/mL和8 mg/mL。结果表明,泥鳅酶解多肽M1具有一定抗菌作用。

2.3 泥鳅多肽M1的抗氧化活性

泥鳅多肽M1的抗氧化活性见图4~图7。

由图4可知,当M1浓度达到20 mg/mL,其DPPH自由基清除率超过50%。DPPH自由基是一种相对稳定的脂质自由基,加入抗氧化剂后能够抑制自由基的氧化^[30]。常雷^[31]利用蛋白酶酶解蟾蜍皮获得抗氧化肽和抗菌肽,其DPPH自由基清除活性 IC_{50} 值分别为2.24 mg/mL和1.004 mg/mL。由图5可知,M1羟自由基清除活性较好,通过计算其 IC_{50} 值为5.43 mg/mL。

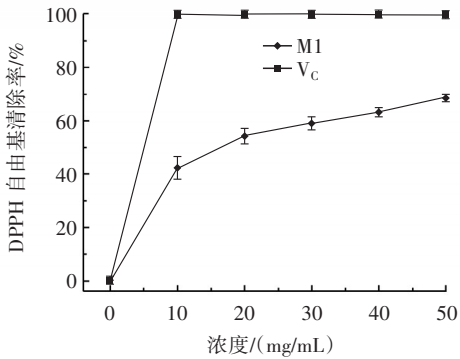


图4 泥鳅多肽M1的DPPH自由基清除活性

Fig.4 DPPH scavenging activity of polypeptide M1 from *Misgurnus anguillicaudatus*

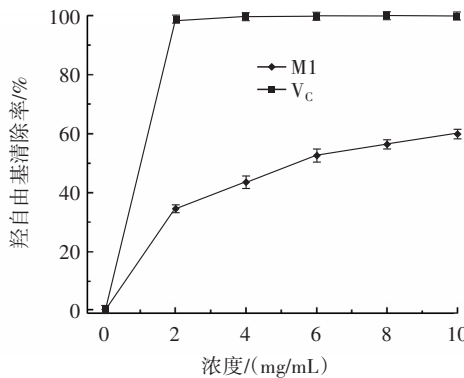


图5 泥鳅多肽M1的羟自由基清除活性

Fig.5 Hydroxyl radical scavenging activity of polypeptide M1 from *Misgurnus anguillicaudatus*

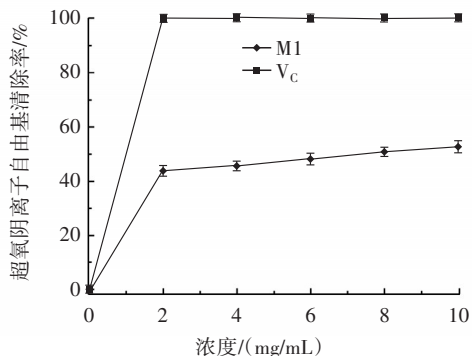


图6 泥鳅多肽 M1 的超氧阴离子自由基清除活性

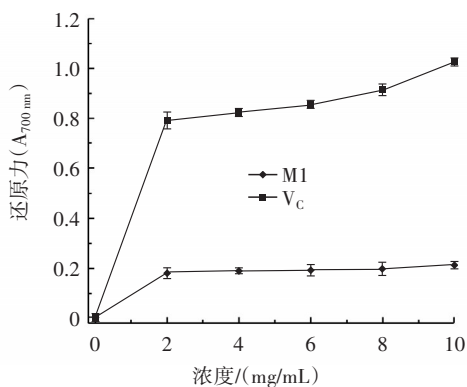
Fig.6 Superoxide radical scavenging activity of polypeptide M1 from *Misgurnus anguillicaudatus*

图7 泥鳅多肽 M1 的还原力

Fig.7 Reducing activity of polypeptide M1 from *Misgurnus anguillicaudatus*

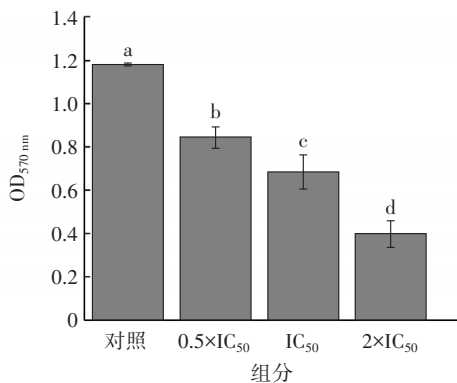
一般认为某种物质的 IC_{50} 低于 10.0 mg/mL 时,说明其具有良好的抗氧化性^[30-31]。由图 6 可知,当 M1 浓度为 2 mg/mL 时,其超氧阴离子自由基活性达到 43.58%,其 IC_{50} 值 7.33 mg/mL,说明其具有良好的超氧阴离子自由基清除活性。由图 7 可知,随着 M1 浓度的提升,其吸光度不断提升。当 M1 浓度为 2 mg/mL,其吸光度为 0.18,说明 M1 具有良好的还原力。研究表明,分子量较小的肽,具有更强的抗氧化活性,并且多肽中疏水性氨基酸的比例越高其抗氧化活性越强^[32]。Zhi 等^[33]研究发现扇贝蛋白质酶解物中低分子量的组分具有更强的氧自由基吸收能力。综上,泥鳅蛋白经过蛋白酶酶解后形成的小分子多肽具有较好的抗氧化性。

2.4 泥鳅多肽 M1 的抗菌机理

2.4.1 M1 对鳃弧菌生物膜的抑制作用

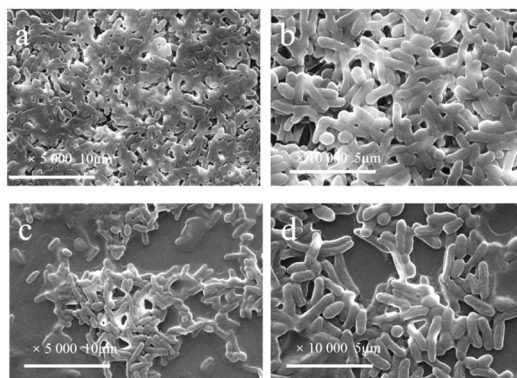
M1 对鳃弧菌生物膜的抑制作用见图 8,鳃弧菌生物被膜电镜图见图 9。

由图 8 可知,随着 M1 浓度的提升,染色液的 OD 值显著降低,M1 对鳃弧菌生物膜的形成具有抑制作用。生物被膜是微生物黏附于介质的表面,通过分泌的胞外基质包裹而形成的三维网状结构,是微生物在



不同小写字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。

图8 M1 对鳃弧菌生物膜的抑制作用

Fig.8 Inhibitory effect of M1 on biofilm of *Vibrio anguillarum*

a. 未经 M1 处理的鳃弧菌的扫描电镜图(5 000×); b. 未经 M1 处理的鳃弧菌的扫描电镜图(10 000×); c. 经 M1 处理的鳃弧菌的扫描电镜图(5 000×); d. 经 M1 处理的鳃弧菌的扫描电镜图(10 000×)。

图9 鳃弧菌生物被膜电镜图

Fig.9 Scanning electron micrograph of biofilm of *Vibrio anguillarum*

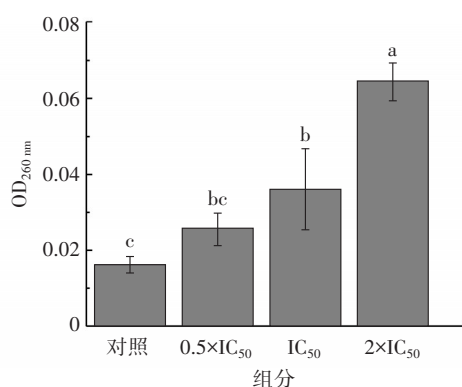
环境中定植的物质基础^[34]。抑制生物膜的形成可以减少细菌的黏附和聚集,从而抑制鳃弧菌的感染。

如图 9 所示,未经 M1 处理的玻片中,鳃弧菌菌体密集集中的黏附在玻片的表面,相互堆叠,结构紧密,互相连结,显示了菌株良好的生物膜形成能力。相反,经过 M1 处理后(图 9c、图 9d)鳃弧菌之间稀疏和松散,形成孔隙,表明生物被膜的形成受到了影响。这与赵洋等^[20]获得的结果相似。结果表明,泥鳅多肽 M1 使鳃弧菌的生长受到抑制,可以明显减少鳃弧菌生物膜的形成。

2.4.2 M1 对鳃弧菌细胞膜完整性的作用

M1 对鳃弧菌细胞膜完整性的作用见图 10。

由图 10 可知,当 M1 浓度高于 IC_{50} 的 50% 时,检测到细胞内容物的释放量($OD_{260 nm}$)显著增加,说明泥鳅多肽 M1 对鳃弧菌的细胞膜具有损伤作用。此外,经过 M1 处理后(图 9c、图 9d),鳃弧菌表面更加粗糙,并且部分鳃弧菌表面发生皱缩,形态发生改变,这说明鳃



不同小写字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。

图 10 M1 对鳗弧菌细胞膜完整性的作用

Fig.10 Effect of M1 on cell membrane integrity of *Vibrio anguillarum*

弧菌细胞膜出现了损伤。相反,未经 M1 处理的鳗弧菌(图 9a、图 9b)生长状态良好,未出现明显的形态变化。研究表明,抗菌肽会与菌体细胞的膜蛋白结合,抑制菌体的新陈代谢,导致菌体死亡裂解^[35]。抗菌肽会提高膜的渗透性并破坏细胞膜结构,从而使核酸、蛋白质和其他细胞成分渗漏^[36]。胡平等^[37]研究发现蛭蛭多肽 Probrelin 会影响白色念珠菌细胞膜的完整性,从而抑制白色念珠菌的生长。推测 M1 通过与鳗弧菌细胞膜的相互作用,使细菌的细胞膜产生缺陷,导致细菌控制物质进出困难,进而使得细菌破裂,导致细胞内容物溢出。

3 结论

以连云港泥鳅为原料,每克肉糜中添加 900 U 木瓜蛋白酶,在 55 °C 条件下酶解 4 h。经过超滤分离,分子量小于 5 kDa 酶解产物 M1 对多种病原菌的生长具有抑制作用,其对鳗弧菌的抗菌效果最好,抑制鳗弧菌的 IC₅₀ 值为 15.76 mg/mL。泥鳅多肽 M1 具有清除 DPPH 自由基、羟自由基和超氧阴离子自由基的作用,抗氧化活性较好。M1 可以明显抑制鳗弧菌的生物膜的形成,破坏鳗弧菌的细胞膜,引起鳗弧菌形态的改变,导致细胞内容物的流出。本研究为进一步开发泥鳅多肽、发现更多天然抗菌物质、提高泥鳅的经济价值提供参考。

参考文献:

[1] 王梦杰,王海华,陈建华. 泥鳅营养成分和营养需求研究进展[J]. 江西水产科技, 2018(6): 10-13.
WANG Mengjie, WANG Haihua, CHEN Jianhua. Research progress on nutritional components and nutritional requirements of loach[J]. Jiangxi Fishery Science and Technology, 2018(6): 10-13.
[2] 韩淙琳,刘珈铭,李茜,等. 泥鳅多糖的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(11): 4411-4419.
HAN Conglin, LIU Jiaming, LI Qian, et al. Research progress of *Misgurnus anguillicaudatus* polysaccharide[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(11): 4411-4419.

[3] 游丽君. 泥鳅蛋白抗氧化肽的分离纯化及抗疲劳、抗癌功效研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2010.
YOU Lijun. Study on the purification of antioxidant peptide from loach protein and its antifatigue and anticancer activities[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2010.
[4] 党晓妍,王茵,吴成业,等. 泥鳅高值化开发利用研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(1): 20-26.
DANG Xiaoyan, WANG Yin, WU Chengye, et al. Research progress on the high-value development and utilization of loach[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2017, 8(1): 20-26.
[5] 齐志涛,徐杨,邹钧,等. 水产动物抗菌肽研究进展[J]. 水产学报, 2020, 44(9): 1572-1583.
QI Zhitao, XU Yang, ZOU Jun, et al. Review of antimicrobial peptides from aquatic animals[J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(9): 1572-1583.
[6] ZHAO M D, QU Y, LIU J, et al. A universal adhesive incorporating antimicrobial peptide nisin: Effects on *Streptococcus mutans* and saliva-derived multispecies biofilms[J]. Odontology, 2020, 108(3): 376-385.
[7] QIAO Y, MA X W, ZHANG M, et al. Ceroicin, a novel piscidin-like antimicrobial peptide from black seabass, *Centropristis striata*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2021, 110: 86-90.
[8] 时志琪,连凯琪,林正丹,等. 抗菌肽杀菌效果、机制研究方法进展[J]. 中国畜禽种业, 2020, 16(11): 52-53.
SHI Zhiqi, LIAN Kaiqi, LIN Zhengdan, et al. Research progress on germicidal efficacy and mechanism of antimicrobial peptides[J]. The Chinese Livestock and Poultry Breeding, 2020, 16(11): 52-53.
[9] 裴颖,陈晓平. 泥鳅抗菌肽的制备及其抑菌效果的研究[J]. 现代农业科技, 2009(24): 296-297.
PEI Ying, CHEN Xiaoping. Research on preparation and antibacterial effect of loach cecropin[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2009(24): 296-297.
[10] 刘超,齐月,王岩. 酶法制备鲢鱼体表黏液抗菌肽的工艺研究[J]. 食品工业, 2013, 34(7): 91-93.
LIU Chao, QI Yue, WANG Yan. Preparation of antibacterial peptide from catfish skin mucus by enzymatic process[J]. The Food Industry, 2013, 34(7): 91-93.
[11] 芦双,黄儒强,梁学世,等. 罗非鱼鱼鳞活性肽的提取及其抗氧化活性研究[J]. 广东农业科学, 2012, 39(22): 152-154.
LU Shuang, HUANG Ruqiang, LIANG Xueshi, et al. Extracting of active peptides from *Tilapia* scales and its antioxidant activity[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2012, 39(22): 152-154.
[12] 尤娟,罗永康,沈慧星. 酶法制备鲢鱼蛋白抗氧化肽研究[J]. 渔业现代化, 2010, 37(3): 42-47.
YOU Juan, LUO Yongkang, SHEN Huixing. Study on preparation of antioxidant peptides of silver carp proteins[J]. Fishery Modernization, 2010, 37(3): 42-47.
[13] 王凯旋,卫兰兰,洪婷,等. 分光光度计比浊法测定抗菌物质效价[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(3): 209-214.
WANG Kaixuan, WEI Lanlan, HONG Ting, et al. Determination of antimicrobial substances by microbial turbidimetry[J]. Food and Fermentation Industries, 2015, 41(3): 209-214.
[14] 翁佩芳,江华珍,冯凤琴,等. 酶标比浊法评价月桂酸单甘油酯对肉葡萄球菌的抑菌活性[J]. 中国食品学报, 2012, 12(5): 188-194.
WENG Peifang, JIANG Huazhen, FENG Fengqin, et al. Evaluating of antimicrobial activity of glycerol monolaurate against *Staphylococcus carnosus* with the microplate reader[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012, 12(5): 188-194.
[15] 吴承燕,苏羽航,王艳君,等. 酶解海带蛋白制备抗菌肽的工艺

- 优化[J]. 食品工业, 2020, 41(1): 109-112.
- WU Chengyan, SU Yuhang, WANG Yanjun, et al. Optimization of antibacterial peptides preparation by enzymatic hydrolysis of kelp protein[J]. The Food Industry, 2020, 41(1): 109-112.
- [16] 柯勤勤, 罗洋洋, 何林凌, 等. 草鱼鱼鳞抗氧化肽的酶法制备及其抗氧化稳定性研究[J]. 四川农业大学学报, 2017, 35(3): 433-438, 451.
- KE Qinqin, LUO Yangyang, HE Linling, et al. Enzymatic preparation and antioxidant stability of the peptide extracted from scales of grass carp[J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2017, 35(3): 433-438, 451.
- [17] DOS SANTOS AGUILAR J G, CASTRO R J S, SATO H H. Production of antioxidant peptides from pea protein using protease from *Bacillus licheniformis* LBA 46[J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2020, 26(1): 435-443.
- [18] DIAO W R, HU Q P, ZHANG H, et al. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.)[J]. Food Control, 2014, 35(1): 109-116.
- [19] KONG M, CHEN X G, LIU C S, et al. Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E. coli*[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2008, 65(2): 197-202.
- [20] 赵洋, 张欣, 夏雨婷, 等. 抗菌肽抑制金黄色葡萄球菌的黏附及生物被膜形成研究[J]. 畜牧兽医杂志, 2021, 40(6): 25-32.
- ZHAO Yang, ZHANG Xin, XIA Yuting, et al. Inhibitory effect of antimicrobial peptides on adhesion and biofilm formation of *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2021, 40(6): 25-32.
- [21] HU J F, TIAN X Q, WEI T, et al. Anti-*Helicobacter pylori* activity of a *Lactobacillus* sp. PW-7 exopolysaccharide[J]. Foods, 2021, 10(10): 2453.
- [22] 王蕾. 猕猴桃多肽的制备工艺及其抗菌活性的研究[D]. 西安: 西北大学, 2018.
- WANG Lei. Preparation of kiwifruit polypeptide and its antibacterial activity[D]. Xi'an: Northwest University, 2018.
- [23] 胡功铃, 陈国平, 胡宗利, 等. 杂合抗菌肽 HMCM 的原核表达及其活性鉴定[J]. 药物生物技术, 2012, 19(1): 6-10.
- HU Gongling, CHEN Guoping, HU Zongli, et al. Prokaryotic expression and activity identification of hybrid peptide HMCM[J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2012, 19(1): 6-10.
- [24] PARK C B, LEE J H, PARK I Y, et al. A novel antimicrobial peptide from the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*[J]. FEBS Letters, 1997, 411(2/3): 173-178.
- [25] ZHANG J L, PENG S, CHENG X A, et al. Functional analysis of hybrid peptide CAMA-syn: Expression in mammalian cells and antimicrobial potential[J]. Protein & Peptide Letters, 2012, 19(10): 1076-1081.
- [26] 吴林泽, 李从发. 罗非鱼下脚料酶解产物中抗菌肽的初步研究[J]. 科技信息(科学教研), 2007(17): 283, 428.
- WU Linze, LI Congfa. Preliminary study on antimicrobial peptides from enzymatic hydrolysates of *Tilapia* leftovers[J]. Science & Technology Information, 2007(17): 283, 428.
- [27] 杨富敏. 酶解海湾扇贝裙边制备抗菌肽的研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2013.
- YANG Fumin. Study on preparation of antibacterial peptides from scallop skirt by enzymatic hydrolysis[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2013.
- [28] 康丹丹, 李照莹, 董浩澜, 等. 辣木叶蛋白质酶解产物的制备及其抗菌活性研究[J]. 食品工业科技, 2019, 40(8): 114-119.
- KANG Dandan, LI Zhaoying, DONG Haolan, et al. Preparation of enzymatic hydrolysis products from *Moringa oleifera* leaves protein and its antibacterial activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(8): 114-119.
- [29] 王碧超. 胶原蛋白抗菌多肽的制备及其性能研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2021.
- WANG Bichao. Preparation and properties of collagen-based antimicrobial peptides[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2021.
- [30] SAFARI R, YAGHOUBZADEH Z. Antioxidant activity of bioactive peptides extracted from sea cucumber (*Holothuria leucospilata*)[J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2020, 26(4): 2393-2398.
- [31] 常雷. 蟾蜍皮酶解肽提取及抗氧化、抗菌性研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2019.
- CHANG Lei. Study on the extraction of enzymolysis polypeptides and their oxidation resistance and antimicrobial properties from toad skin[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2019.
- [32] WANG L Y, MA M T, YU Z P, et al. Preparation and identification of antioxidant peptides from cottonseed proteins[J]. Food Chemistry, 2021, 352: 129399.
- [33] ZHI T X, LI X Y, SADIQ F A, et al. Novel antioxidant peptides from protein hydrolysates of scallop (*Argopecten irradians*) mantle using enzymatic and microbial methods: Preparation, purification, identification and characterization[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 164: 113636.
- [34] 龚川杰, 胡容, 吕远平, 等. 竹笋壳提取物对膜璞毕赤酵母及其生物膜的抑制作用[J]. 中国调味品, 2021, 46(11): 27-29, 36.
- GONG Chuanjie, HU Rong, LV Yuanping, et al. Inhibition of bamboo shoot shell extracts on *Pichia membranaefaciens* and its biofilm[J]. China Condiment, 2021, 46(11): 27-29, 36.
- [35] WANG J J, DOU X J, SONG J, et al. Antimicrobial peptides: Promising alternatives in the post feeding antibiotic era[J]. Medicinal Research Reviews, 2019, 39(3): 831-859.
- [36] MATSUZAKI K. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2009, 1788(8): 1687-1692.
- [37] 胡平, 赵卓冉, 袁亚萍, 等. 中药蛭蟾多肽 Probrelin 抗白色念珠菌活性研究[J]. 微生物学报, 2021, 61(11): 3619-3630.
- HU Ping, ZHAO Zhuoran, YUAN Yaping, et al. Activity of the antimicrobial peptide probrelin from traditional Chinese medicine grub against *Candida albicans*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(11): 3619-3630.