

## 菲律宾蛤仔酶解产物的抑菌活性

刘 淇<sup>1</sup> 谢 沙<sup>1,2</sup> 赵 玲<sup>1</sup> 曹 荣<sup>1</sup> 万慧<sup>1,2</sup> 魏玉西<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>农业部水产品质量安全检测与评价重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(<sup>2</sup>青岛大学生物系, 266071)

**摘 要** 以菲律宾蛤仔为原料, 比较其胃蛋白酶、酸性蛋白酶、菠萝蛋白酶、胰蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解产物的抑菌活性; 利用正交实验优化抑菌活性最强的酶解产物的制备工艺, 并测定最优酶解条件下酶解产物的相对分子质量分布。结果表明, 菲律宾蛤仔胃蛋白酶酶解产物的抑菌活性最强, 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、酿酒酵母和副溶血弧菌均有一定的抑菌活性, 其中对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的抑菌活性较高, 对三联微球菌则未见明显的抑菌活性。胃蛋白酶的最优酶解工艺条件为: 酶解时间 2h, 温度 35℃, pH 2.0, 加酶量 3 000U/g, 料水比 1 : 4; 该条件下酶解产物的相对分子质量主要分布在 5000 以下。

**关键词** 菲律宾蛤仔 酶解产物 抑菌活性

**中图分类号** S93 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2013)02-0109-05

## Antimicrobial activity of hydrolysates from *Ruditapes philippinarum*

LIU Qi<sup>1</sup> XIE Sha<sup>1,2</sup> ZHAO Ling<sup>1</sup> CAO Rong<sup>1</sup>

WAN Hui-yi<sup>1,2</sup> WEI Yu-xi<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(<sup>2</sup>Biological Department, Qingdao University, 266071)

**ABSTRACT** The antibacterial activities of the hydrolysates from *Ruditapes philippinarum*, prepared by pepsin, acid protease, bromelin, trypsin and papain, were compared. Orthogonal experiments were employed to optimize the preparation process of the hydrolysate with the greatest antibacterial activity, and molecular weight distribution of the optimal hydrolysate was determined. The hydrolysate of pepsin showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Vibrio parahaemolyticus*. The optimal hydrolysis conditions for pepsin were as follows: 35℃, pH 2.0, reaction time 2 hours, dosage of protease 3 000U/g, and solid to liquid ratio 1 : 4. The molecular weight of the pepsin hydrolysate were mainly below 5 000.

**KEY WORDS** *Ruditapes philippinarum* Hydrolysates Antimicrobial activity

随着抗生素的广泛应用, 抗生素在畜禽产品中的残留、细菌耐药性、过敏反应和环境污染等问题日益严重(李 晔等 2003), 寻找代替抗生素的绿色抗菌剂已经成为世界性的研究课题。抗菌肽因具有材料来源广泛、

安全性高等优点而备受人们的青睐,近年来国内外掀起了研究抗菌肽的热潮。海洋中存在十几万种海洋动植物,为人类提供丰富的蛋白资源,是人类的蛋白源食物及生物活性物质的重要来源。目前,研究发现牡蛎(Liu *et al.* 2007)、紫贻贝(刘尊英等 2007)、罗非鱼(吴林泽等 2007)、坛紫菜(刘蕾等 2010)、文蛤(姚兴存等 2010)、南极磷虾(赵玲等 2011)的酶解产物都具有一定的抑菌活性。Bolscher等(2006)认为通过酶解蛋白质法生产抗菌肽可能是大批量生产抗菌肽最有前途的方法。酶解法具有反应条件温和、反应过程易控制等优点,本身无抗菌作用的物质可以通过改变蛋白质构型或酶解方式的不同而获得抗菌活性,具有抗菌活性的物质可以作为具有新功能物质和更强抗菌活性的前提物质(宋茹等 2009)。

菲律宾蛤仔 *Ruditapes philippinarum*,属双壳纲、帘蛤科、缀锦亚科、蛤仔属,具有营养丰富、味道鲜美、生长迅速、养殖周期短、适应性强等特点,是我国四大养殖贝类之一,年产量达200多万t(刘青等 2011)。近年来的研究表明,菲律宾蛤仔提取物具有抗氧化(郁迪等 2011)、抗肿瘤(郁迪等 2011)、抗菌(魏玉西等 2003)等作用。目前国内外关于菲律宾蛤仔酶解产物抑菌活性的研究尚未见报道,本研究以菲律宾蛤仔为研究对象,旨在通过酶解途径获得抑菌酶解产物,为菲律宾蛤仔的深加工利用提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 菲律宾蛤仔

鲜活的菲律宾蛤仔2011年12月购于山东省青岛市新贵都集贸市场,置于干净的海水中静养使其吐出杂物(焉翠蔚等 2009)。取贝肉,用蒸馏水冲洗,沥干。

#### 1.1.2 供试菌种

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、大肠杆菌 *Escherichia coli*、四联微球菌 *Micrococcus tetragenus*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由青岛大学生物系提供,副溶血弧菌 *Vibrio parahaemolyticus* 由中国水产科学研究院黄海水产研究所海洋食品工程实验室提供。

#### 1.1.3 试剂

胃蛋白酶( $1.2 \times 10^3$  U/g),国药集团;酸性蛋白酶( $5.0 \times 10^4$  U/g)、菠萝蛋白酶( $5.0 \times 10^5$  U/g)、中性蛋白酶( $1.3 \times 10^5$  U/g)、木瓜蛋白酶( $5.0 \times 10^5$  U/g),吉宝(青岛)生物科技有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

#### 1.1.4 培养基

营养琼脂培养基:营养琼脂33g、蒸馏水1L,用于细菌的培养。

YEPD培养基:葡萄糖20g、蛋白胨20g、酵母粉10g、琼脂15g、蒸馏水1L,pH6.0,用于啤酒酵母的培养。

胰蛋白胨大豆琼脂培养基:胰蛋白胨大豆琼脂40g、蒸馏水1L,用于副溶血弧菌的培养。

#### 1.1.5 主要仪器

HZS-HA水浴震荡器,国华电器有限公司;冷冻离心机,德国Eppendorf公司;真空冷冻干燥机,丹麦Scanlaf公司;旋转蒸发仪,上海爱朗仪器有限公司;高压蒸汽灭菌锅,日本SANYO公司;PHs-3C型精密pH计,上海精密科学仪器有限公司;高效液相色谱LC1200,安捷伦科技有限公司。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 抑菌活性测定

参照文献(赵玲等 2011),采用滤纸片法测定酶解产物的抑菌活性(以下抑菌活性测定中酶解产物浓度均为80mg/ml)。

#### 1.2.2 单酶的筛选

选取胃蛋白酶、酸性蛋白酶、菠萝蛋白酶、胰蛋白酶和木瓜蛋白酶,在各酶最适的酶解条件下(表1),采用滤纸片法比较5种蛋白酶酶解产物的抑菌活性。酶解工艺如下:

菲律宾蛤仔——匀浆——酶解——90℃灭酶15min——离心——取上清液调pH至7——过滤——真空

浓缩——冷冻干燥。

表 1 不同蛋白酶酶解条件

Table 1 The hydrolysis conditions of different enzymes

酶种类 Proteases	时间(h) Time	加酶量(U/g) Enzyme concentration	温度(°C) Temperature	pH	料水比 Solid liquid ratio
胃蛋白酶 Pepsin	3	3 000	37	2	1 : 3
酸性蛋白酶 Acid protease	3	3 000	40	4	1 : 3
菠萝蛋白酶 Bromelin	3	3 000	45	7	1 : 3
胰蛋白酶 Trypsin	3	3 000	50	8	1 : 3
木瓜蛋白酶 Papain	3	3 000	45	7	1 : 3

### 1.2.3 酶解工艺优化

在单因素实验的基础上,选取时间、加酶量、温度、pH、料水比 5 个因素,选择 L16(4<sup>5</sup>)正交表进行酶解工艺优化试验,以抑菌圈直径大小为指标,确定制备菲律宾蛤仔抑菌酶解产物的最佳酶解条件,并进行抑菌活性追踪实验验证。

### 1.2.4 相对分子质量的测定

参考文献(赵 玲等 2011),采用液相色谱法分析,记录峰位保留时间。根据待测样品出峰时间以及标准曲线,计算抑菌酶解产物的相对分子质量。

## 2 结果与分析

### 2.1 单酶水解抑菌效果

不同蛋白酶酶解产物的抑菌效果见表 2。菲律宾蛤仔胃蛋白酶酶解产物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、酿酒酵母和副溶血弧菌均有一定的抑菌活性,且对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的生长抑制效果显著(图 1、图 2),对四联微球菌未见明显的抑菌活性。菲律宾蛤仔酸性蛋白酶和菠萝蛋白酶酶解产物也有一定的抑菌活性,而胰蛋白酶和木瓜蛋白酶的酶解产物对 6 株菌均未见明显的抑菌活性,因此以下实验以胃蛋白酶的酶解产物为研究对象。

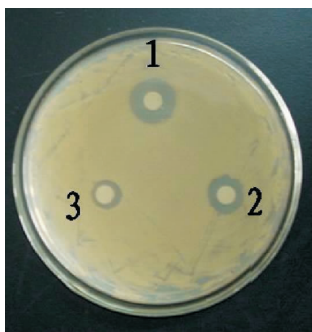
表 2 不同蛋白酶酶解产物的抑菌活性

Table 2 The antimicrobial activity of different hydrolysates against various bacteria

酶种类 Proteases	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter(mm)					
	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	四联微球菌 <i>M. tetragenus</i>	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	啤酒酵母 <i>S. cerevisiae</i>
胃蛋白酶 Pepsin	16.2	14.2	12.2	—	8.5	10.0
酸性蛋白酶 Acid protease	12.3	9.8	10.2	—	—	9.8
菠萝蛋白酶 Bromelin	10.3	—	—	—	—	—
胰蛋白酶 Trypsin	—	—	—	—	—	—
木瓜蛋白酶 Papain	—	—	—	—	—	—

### 2.2 正交试验结果

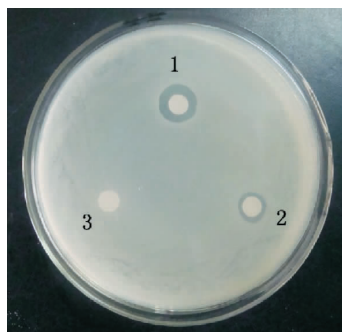
选取时间、加酶量、温度、pH、料水比 5 个因素(表 3),以胃蛋白酶为实验用酶,进行酶解工艺优化试验确定制备菲律宾蛤仔抑菌酶解产物的最佳酶解条件。正交试验结果见表 4,由表 4 的极差  $R$  值可以得出  $R_C > R_E > R_A > R_D > R_B$ ,说明 pH 对抑菌活性的影响最大,其次是料水比和酶解时间,温度对抑菌活性的影响最小。试验结果表明,最优水平组合为  $A_2B_1C_2D_3E_4$ ,即酶解时间 2h,温度 35°C, pH 2.0,加酶量 3 000U/g,料水比 1 : 4。在此条件下进行验证试验,菲律宾蛤仔酶解产物对金黄色葡萄球菌生长产生的抑菌圈直径为 17.7mm,大于优化前的抑菌圈直径 16.2mm。实验结果证明,优化得到的水解条件是可行的。



1. 胃蛋白酶;2. 酸性蛋白酶;3. 菠萝蛋白酶  
1. Pepsin;2. Acid protease;3. Bromelin

图1 3种酶水解产物对金黄色葡萄球菌的抑菌活性

Fig.1 The antimicrobial activity of three hydrolysates against *S. aureus*



1. 胃蛋白酶;2. 酸性蛋白酶;3. 菠萝蛋白酶  
1. Pepsin;2. Acid protease;3. Bromelin

图2 3种酶水解产物对枯草芽孢杆菌的抑菌活性

Fig.2 The antimicrobial activity of three hydrolysates against *B. subtilis*

表3 正交试验表

Table 3 Orthogonal experiment

水平 Level	因素 Factors				
	时间 Time(h)	加酶量 Dosage of enzyme(U)	温度 Temperature (°C)	pH	料水比 Solid liquid ratio
1	1	1 000	35	1.5	1 : 1
2	2	2 000	40	2.0	1 : 2
3	3	3 000	45	2.5	1 : 3
4	4	4 000	50	3.0	1 : 4

表4 正交试验结果

Table 4 The result of orthogonal experiment

试验编号 Group	时间 Time A	温度 Temperature B	pH C	加酶量 Dosage of enzyme D	料水比 Solid liquid ratio E	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone(mm)
2	1	2	2	2	2	15.0
3	1	3	3	3	3	13.5
4	1	4	4	4	4	13.5
5	2	1	2	3	4	17.5
6	2	2	1	4	3	14.5
7	2	3	4	1	2	13.5
8	2	4	3	2	1	14.2
9	3	1	3	4	2	15.0
10	3	2	4	3	1	13.5
11	3	3	1	2	4	15.5
12	3	4	2	1	3	15.3
13	4	1	4	2	3	11.5
14	4	2	3	1	4	14.5
15	4	3	2	4	1	14.3
16	4	4	1	3	2	15.0
均值 k1	14.500	15.000	15.250	14.825	14.500	
均值 k2	14.925	14.375	15.525	14.050	14.625	
均值 k3	14.825	14.200	14.300	14.875	13.700	
均值 k4	13.825	14.500	13.000	14.325	15.250	
极差 R	1.100	0.800	2.525	0.825	1.550	

### 2.3 菲律宾蛤仔抗菌肽的相对分子质量分布

胃蛋白酶最优酶解条件下酶解产物的分子量分布图谱见图3。经计算得,菲律宾蛤仔胃蛋白酶酶解产物的相对分子质量主要分布在5 000以下,其中相对分子质量在1 000~3 000的组分含量最多,占42.19%;相对分子质量在3 000~5 000的组分占28.49%;相对分子质量<1 000的组分占27.13%;相对分子质量在10 000以上的组分仅占1.91%。各组分的抗菌活性还有待进一步研究。

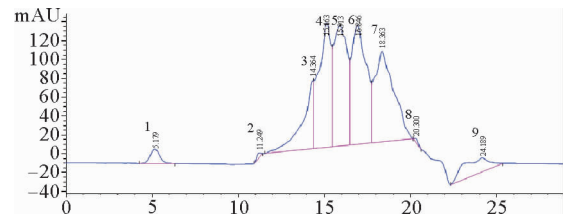


图3 胃蛋白酶酶解产物的分子量分布  
Fig. 3 The molecular weight distribution of hydrolysates by pepsin

### 3 结论

1) 菲律宾蛤仔胃蛋白酶酶解产物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、酿酒酵母和副溶血弧菌均有一定的抑菌活性,且对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的生长抑制效果显著,对四联微球菌未见明显的抑菌活性;酸性蛋白酶和菠萝蛋白酶酶解产物也有一定的抑菌活性;而胰蛋白酶和木瓜蛋白酶的酶解产物对6株菌均未见明显的抑菌活性。

2) 菲律宾蛤仔胃蛋白酶最优酶解工艺条件为:酶解时间2h,温度35℃,pH 2,加酶量3 000U/g,料水比1:4。

3) 菲律宾蛤仔胃蛋白酶酶解产物的相对分子质量主要分布在5 000以下。其中相对分子质量在1 000~3 000的组分含量最多,占42.19%;相对分子质量在3 000~5 000的组分占28.49%;相对分子质量<1 000的组分占27.13%。

### 参 考 文 献

- 刘青,张越,付鑫,马师荟. 2011. 菲律宾蛤仔的研究进展. 河北渔业, (1): 56-59
- 刘尊英,董士远,曾名勇,宋宏霞,刘政. 2007. 紫贻贝酶解产物抗菌活性及其工艺优化研究. 食品科技, (2): 145-147
- 刘蕾,魏玉西,刘淇,赵玲,王凌燕. 2011. 坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)中抑菌活性肽的制备与初步纯化. 现代生物医学进展, 11(3): 476-481
- 李晔,苏秀榕,李太武,宋林生. 2004. 贝类等无脊椎动物抗菌肽的研究进展. 水产科学, 23(9): 40-43
- 宋茹,韦荣编,汪东风. 2009. 食物源蛋白酶解制备抗菌肽研究进展. 食品科学, 30(11): 284-288
- 吴林泽,李从发. 2007. 罗非鱼下脚料酶解产物中抗菌肽的初步研究. 科技信息, 17: 283-284
- 郁迪,许新建,杨最素,杨永芳,曾军勇,莫青青. 2011. 菲律宾蛤仔木瓜蛋白酶水解物抗氧化活性研究. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 30(6): 515-519
- 郁迪,杨永芳,王加斌,杨最素,黄芳芳,郑玉寅,李荣,丁国芳. 2011. 菲律宾蛤仔糖蛋白提取及体外抗肿瘤活性研究. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 30(4): 336-339
- 赵玲,曹荣,刘淇,魏玉西,薛勇. 2011. 南极磷虾酶解多肽的抑菌活性. 渔业科学进展, 32(4): 113-116
- 姚兴存,邱春江. 2010. 文蛤蛋白抗菌肽制备工艺优化与抗菌活性研究. 安徽农业科学, 38(31): 17729-17730
- 焉翠蔚,徐睿,孙妍,庞军玲. 2009. 菲律宾蛤仔提取物抑制酪氨酸酶活性的研究. 中国海洋大学学报, 39(6): 1233-1236
- 魏玉西,郭道森,李荣贵,陈皓文,陈培勋. 2003. 菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinensis*)血浆中防卫素的纯化及其抑菌功能. 生物化学与生物物理学报, 35(12): 1145-1148
- Bolscher JGM, van Der Kraan MIA, Nazmi K and 5 others. 2006. A one-enzyme strategy to release an antimicrobial peptide from the LFampin-domain of bovine lactoferrin. Peptide 27(1): 1-9
- Liu ZY, Zeng MY, Dong SY and 3 others. 2007. Effect of an antifungal peptide from oyster enzymatic hydrolysates for control of gray mold (*Botrytis cinerea*) on harvested strawberries. Postharvest Biology & Technology 46(1): 95-98