

酒糟大黄鱼抗菌肽 FAH34 的抑菌活性及热稳定性

李若冰¹, 刘嘉鑫¹, 金日天^{1,3}, 翁武银^{1,3}, 张志刚², 杨 燊^{1,3*}

(¹集美大学海洋食品与生物工程学院 福建厦门 361021

²厦门银祥集团有限公司 肉食品安全生产技术国家重点实验室 福建厦门 361100

³大连工业大学 海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心 辽宁大连 116034)

摘要 副溶血性弧菌为常见的食源性致病菌,是影响海洋食品安全性的主要危害因子。本研究从酒糟大黄鱼中鉴定一种抗菌肽 FAH34(氨基酸序列为 KTISFILK),研究其对副溶血性弧菌的抑菌活性及热稳定性。结果表明,肽 FAH34 对副溶血性弧菌的最低抑菌浓度(MIC)值为 7.80 $\mu\text{g/mL}$,在 FAH34 作用 3 h 后,细菌数从 5.06 lg (CFU/mL)降至 0 lg (CFU/mL),显示出很强的抑菌活性。透射电镜观察发现,肽 FAH34 是通过破坏细菌细胞膜结构,使胞内物质外渗,从而达到杀菌的效果。经 80 $^{\circ}\text{C}$ 、30 min 及 121 $^{\circ}\text{C}$ 、15 min 处理后,肽 FAH34 仍能保持原有的抑菌活性,对人体 LO2 细胞活力(>90%)无显著影响。FAH34 应用在鱼肉及腌制液中,可将其中副溶血性弧菌数量控制在 0~0.40 lg(CFU/mL)范围。结论:FAH34 是一种对溶血性弧菌具有热稳定性的新型抗菌肽,可作为生物防腐剂应用于水产腌制食品中。

关键词 大黄鱼; 热稳定性; 抗菌肽; 副溶血性弧菌; 抑菌机制

文章编号 1009-7848(2023)12-0247-08 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.12.026

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)是我国重要的经济鱼类之一,也是中国网箱养殖产量最大的鱼类^[1]。据中国渔业年鉴统计,2020 年中国大黄鱼产量约 30.01 万 t,在中国渔业中的地位举足轻重^[2]。糟制是一种传统的发酵加工方式,不仅能够赋予食品独特的风味,还是抗菌肽的良好来源^[3],例如,发酵鳕鱼抗菌肽 Kenojeinin I,对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌以及酿酒酵母均有抑制作用^[4],而酒糟大黄鱼抗菌肽目前鲜有报道。

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种革兰氏阴性菌,广泛分布于近岸海水、海底沉淀物以及海产品中,是沿海地区最容易引起食物中毒的食源性致病菌之一^[5]。副溶血性弧菌感染导致人体出现的症状包括腹泻、呕吐、腹痛等急性肠胃炎症状,甚至会造成死亡,极大地危害人体健康^[6]。副溶血性弧菌被视为是海洋食品主要的公共卫生风险来源^[7]。

抗菌肽作为生物体内自身合成或存在于母体蛋白质中的一种具有抗菌活性的小分子肽段,被认为是抗生素的潜在替代品,它具有水溶性好,对

高等动物无伤害、无残留的特点^[8-9]。然而,食品加工中涉及对原料的热加工和高温杀菌处理,因此,热稳定性是评价抗菌肽能否实际应用于生产的一个重要指标^[10]。目前已发现短链抗菌肽 Brevilactin V 在 100 $^{\circ}\text{C}$ 条件下处理 2 h 仍有良好的稳定性^[11]。

本研究采用超高压液相色谱-质谱联用技术鉴定酒糟大黄鱼中的多肽序列,并利用生物信息学技术对所鉴定多肽序列的抑菌可能性进行预测和筛选。研究抗菌肽对副溶血性弧菌的抑菌活性、抑菌机制以及热稳定性,为酒糟大黄鱼抗菌肽在食品防腐与保鲜中的应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜大黄鱼,购自厦门高崎海鲜批发市场。

副溶血性弧菌(ATCC 17802),福建省微生物与酶工程重点实验室保存菌种;营养肉汤培养基、技术琼脂粉,广东环凯微生物科技有限公司;葡萄酒专用酵母,安琪酵母股份有限公司;甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯)、甲酸(质谱级);碳酸铵(质谱级)、戊二醛、乙醇(分析纯)、柠檬酸铅(分析纯)、PBS(0.01 mol/L、pH 7.6),上海麦克林生化科技有限公司;醋酸双氧铀,美国 SPI 公司;3-(4,5-二甲

收稿日期: 2022-12-23

基金项目: 国家重点研发计划项目(2020YFD09009)

第一作者: 李若冰,男,硕士生

通信作者: 杨燊 E-mail: yangshen@jmu.edu.cn

基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、碘乙酰胺、二硫苏糖醇(DTT)、正常人肝细胞(LO2),上海 Sigma-Aldrich 公司;BCA 试剂盒,碧云天生物技术公司。

1.2 仪器与设备

Nano Acuity 超高压升级液相色谱,美国 Waters 公司;Q Exactive 质谱仪,美国赛默飞有限公司;ZWY-100H 智城恒温培养振荡器,上海浦东荣丰科学仪器有限公司;SynergyH1MF 多功能酶标仪,美国 Biotek 公司;H-7650 透射电子显微镜,日本日立有限公司;H1650-W 型离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司。

1.3 酒糟黄鱼制备与质谱鉴定

酒糟制备方法:新鲜糯米蒸熟沥干后加入红酒曲密封发酵 48 h 后于 4℃ 冷藏备用。酒糟黄鱼制备方法:将新鲜大黄鱼去鳞、去内脏后使用自来水清洗 3 遍。将大黄鱼与红酒糟按 1:1(质量比)逐层摆放,并于容器内带盖密封,在(20±5)℃ 温度条件下进行糟制 30 d^[12]。

将上步糟制好的酒糟黄鱼整鱼样品破碎后于 11 000 g 离心力于 4℃ 离心 20 min 后收集上清液并冻干。使用 BCA 测定冻干粉蛋白浓度,并取适量样品(含 200 μg 蛋白质)溶解于 15 μL 0.1 mol/L DTT 中,于 56℃ 孵育 30 min。然后加入 15 μL 0.5 mol/L 的碘乙酰胺,于室温(25±2)℃ 放置黑暗处孵育 30 min。然后,将样品置于 10 ku 超滤管中 4℃ 温度下 14 000 g 离心 20 min,向收集到的≤10 ku 样品中加入 100 μL 0.05 mol/L 碳酸铵。最后,使用加入胰蛋白酶(酶和蛋白质质量比为 1:50)于 37℃ 下消化过夜。得到的样品经 C18 脱盐小柱脱盐处理后于真空离心浓缩机中浓缩至干,复溶于 0.1% 甲酸用于质谱分析。

液相色谱条件:Ultimate 3000 系统(Thermo Fisher Scientific);分析柱为 C18 分析色谱柱(Thermo Acclaim PepMap, 75 μm×25 cm);进样量为 5.0 μL;流动相 A 为 0.1% 甲醇水溶液,B 为 100% 乙腈,流速为 0.25 mL/min。液相洗脱程序为 0~1 min,98%A、2%B;1~23 min,70%A、30%B;23~25 min,10%A、90%B;25~30 min, 98%A、2%B。

质谱条件:使用 LTQ Orbitrap Elite 质谱仪(Thermo Scientific)进行肽段分析,喷雾电压为

2.2 kV,毛细管温度为 270℃,MS 分辨率为 60 000 进行全扫描采集(100~1 500 *m/z*)。搜库软件为 MAXQUANT(v1.6.5.0),数据库为 uniprot 中大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)蛋白库对所得肽段质谱图进行鉴定^[13]。

1.4 酒糟大黄鱼中抗菌肽的筛选与合成

利用抗菌肽预测在线服务器 APD(<http://aps.unmc.edu/AP/>) 计算预测抗菌肽的电荷和亲水性,CAMP (<http://www.camp.bicnirrh.res.in/index.php>) 对酒糟大黄鱼蛋白序列中可能存在的抗菌肽序列进行预测^[14]。

多肽委托北京中科亚光生物科技有限公司合成,并利用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)纯化,纯度≥99%。合成的多肽用 PBS 配制成为 1 mg/mL 的溶液,并于-20℃ 备用。本研究中热处理抗菌肽得处理条件分别为 80℃ 加热 30 min、121℃ 加热 15 min。

1.5 抗菌肽结构的预测

利用在线软件 I-TASSER(<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>) 对抗菌肽的结构进行预测,并利用 PyMol 2.5 软件进行编辑修改,最终得到抗菌肽结构。

1.6 最低抑菌浓度(MIC)测定

采用平板菌落计数法测定抗菌肽对副溶血性弧菌的 MIC 值^[15]。将副溶血性弧菌在 37℃、170 r/min 摇床活化至对数生长期,再用 PBS 稀释至 10⁵~10⁶ CFU/mL 备用。将稀释好的菌液与肽等体积混合至肽的最终质量浓度为 500,250,125,62.5,31.2,15.6,7.80,3.90,1.95 μg/mL,于 37℃ 孵育 2 h,等体积的 PBS 溶液作为空白组。采用涂布法将副溶血性弧菌接种到营养琼脂培养基中,于 37℃ 恒温培养箱培养 10 h。将对副溶血性弧菌抑制率达到 80% 的浓度确定为 MIC。

1.7 时间杀伤曲线(Time-kill)绘制

取提前活化至对数生长期的副溶血性弧菌,稀释至 10⁵~10⁶ CFU/mL,取 500 μL 菌液与肽(终浓度为 1×MIC) 等体积混合,空白组加入等体积 PBS,于 37℃ 恒温培养箱培养,在 0,0.5,1,1.5,2,2.5,3 h 分别取样 25 μL 接种,将样品涂布接种后的培养皿置于 37℃ 恒温隔夜培养^[16]。

1.8 透射电镜观察

将副溶血性弧菌培养至对数生长期,用 PBS 制备菌悬液,调整至浓度为 $OD_{600} = 0.2$ 。将稀释至 $2 \times MIC$ 浓度的抗菌肽与菌悬液等体积混合后于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 2 h。孵育结束后用 $2\ 700\ \text{g}$ 离心力离心 $10\ \text{min}$,然后用 PBS 冲洗沉淀两次后用 2.5% 戊二醛于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 隔夜固定。固定好的样品依次用梯度体积分数 (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%) 乙醇浸泡 $10\ \text{min}$ 后移出,再加入丙酮处理 $20\ \text{min}$ 后离心。将收集到的样品于 $70\text{ }^\circ\text{C}$ 烘干 24 h 后在铜网格上制备 $70\sim 90\ \text{nm}$ 的薄片,用柠檬酸溶液和醋酸双氧铀 50% 乙醇饱和溶液染色。使用透射电子显微镜 (Hitachi 日立 H-7650) 观察样品^[17]。

1.9 抗菌肽细胞毒性测定

采用 MTT 法对抗菌肽的细胞毒性进行测定^[18]。首先取 LO2 细胞 (1 000 个/孔) 于 96 孔板中, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 12 h 直至细胞贴壁。接下来每孔加入 1% 质量浓度分别为 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 的抗菌肽, 培养 24 h 后加入 MTT (5.0 mg/mL) 继续孵育 4 h 后终止培养。弃去培养基后向每孔加入 $150\ \mu\text{L}$ DMSO (二甲基亚砜), 在摇床上振荡 $10\ \text{min}$, 然后在 $490\ \text{nm}$ 处测吸光值。细胞活力公式如下:

$$\text{细胞存活率}/\% = \frac{OD_{\text{样品组}} - OD_{\text{溶剂}}}{OD_{\text{空白组}} - OD_{\text{溶剂}}} \times 100 \quad (1)$$

样品组为 1% 不同浓度抗菌肽培养的细胞, 空白组为 1% PBS 培养的细胞, 溶剂组仅含有培养基。

1.10 在鱼肉以及腌制液中的应用

将新鲜大黄鱼采用 3% 的 NaCl 腌制 24 h 后, 取腌制液灭菌并分装, 取搅碎的鱼肉灭菌后分装, 分别于鱼肉以及腌制液接种浓度为 $10^5\sim 10^6$ CFU/mL 的副溶血性弧菌菌液, 分别加入终浓度为 MIC 的热处理后的抗菌肽在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下保藏, 每隔 24 h 进行涂平板观察计数, 连续进行试验 7 d。

1.11 统计分析

每个试验重复 3 次独立平行试验, 每个试验设置 3 个平行 ($n = 3$), 试验结果显示为平均值 \pm 标准差, 使用 Graphpad prism 8.2.1 作图。

2 结果与讨论

2.1 酒糟大黄鱼抗菌肽的鉴定结果

本研究利用超高效液相质谱联用技术对酒糟大黄鱼体内分子质量小于 $1\ 500\ \text{u}$ 的多肽序列进行鉴定, 共得 10 个肽段, 多肽序列平均为 10 个氨基酸序列长度, 分子质量从 $753\sim 1\ 474\ \text{u}$ 。利用在线服务器 APD3 和 CAMP 对鉴定肽段的电荷、疏水性、抗菌肽可能性进行计算和预测 (表 1), 其净电荷数从 $+1\sim +3$, 疏水率范围从 $29\%\sim 57\%$, 10 个肽段的抗菌肽可能性范围从 $0.795\sim 0.915$ 。

一般来说, 在 $1\ 500\ \text{u}$ 以下的肽段多为小分子肽类, 具有结构简单、合成成本低、功能速度快等特点, 并且相较于长肽链多肽, 小分子肽类具有更好的稳定性和安全性^[19-20]。净电荷是抗菌肽的一个重要特征, 大多数抗菌肽一级结构富含赖氨酸、精氨酸、组氨酸等带正电荷的氨基酸残基。正电荷可以使抗菌肽取代革兰氏阴性菌外膜中的 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} , 从而使抗菌肽与细菌细胞膜吸附, 达到紊乱细胞膜结构的效果, 一般认为, 抗菌肽电荷在 $+2\sim +9$ 其抑菌活性较强^[21-22]。此外, 抗菌肽的抑菌活性与结构中疏水基团有较大关系, 疏水性过低则会降低抗菌肽对膜的插入结合能力, 抗菌活性也会下降, 而过高的疏水性会使抗菌肽本身聚集沉淀析出导致抗菌活性降低, 抗菌肽的疏水性往往在 $30\%\sim 60\%$ ^[23-24]。本研究发现的氨基酸序列 KTIS-FILK (命名为 FAH34), 质谱图如图 1 所示。具有 $+2$ 正电荷, 疏水性为 50%, 是唯一具有典型抗菌肽特征的序列, 抗菌肽预测可能性也最高为 0.958。其中序列首尾中的赖氨酸提供的正电荷, 可以增加其与细胞膜相互吸引的静电引力, 而异亮氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸等非极性氨基酸残基组成该抗菌肽序列的疏水性核心, 可能是一种潜在的新型抗菌肽, 因此, 对其抑菌活性进一步进行测定。

2.2 抗菌肽 FAH34 对副溶血性弧菌的最低抑菌浓度

对抗菌肽 FAH34 的进行抑菌试验及活性验证, 结果表明抗菌肽 FAH34 具有较好的抑菌活性, 抗菌肽 FAH34 的最低抑菌浓度 (MIC) 测定结果为 $7.80\ \mu\text{g/mL}$ 。热处理组抗菌肽 FAH34 在 $80\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $30\ \text{min}$ (巴氏杀菌) 和 $121\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $15\ \text{min}$ (商业无

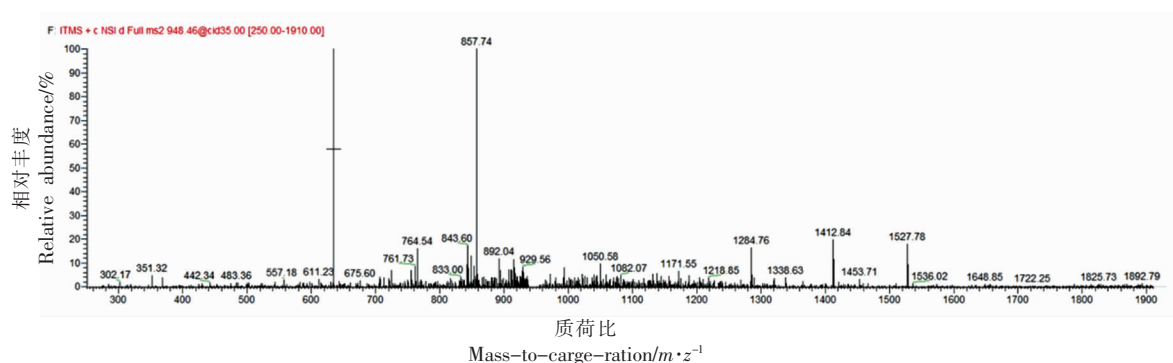


图1 抗菌肽 FAH34 质谱分析图

Fig.1 Mass spectrometry analysis of antimicrobial peptide FAH34

表1 酒糟大黄鱼中抗菌肽的预测与筛选

Table 1 Prediction and screening of antimicrobial peptides in large yellow croaker fermented with distiller's grains

序号	肽序列	分子质量/u	疏水率/%	抗菌肽可能性	电荷
1	KPVLKQK	840	29	0.880	+3
2	RAAPALR	753	57	0.831	+2
3	KVPKLQK	840	29	0.894	+3
4	MAALQLMQQKANK	1 474	54	0.819	+2
5	KTISFILK	949	50	0.915	+2
6	MGNIFGNLLK	1 106	50	0.896	+1
7	QDSRALLSTK	1 231	36	0.884	+1
8	MDASRVQPIK	1 144	40	0.795	+1
9	RNGVALK	756	43	0.890	+2
10	VLTKEIYGK	1 050	33	0.874	+1
11	VLTKEIYGKLR	1 319	36	0.844	+2

菌)两种热处理条件下, MIC 仍为 $7.80 \mu\text{g}/\text{mL}$, 说明抗菌肽 FAH34 高温处理后仍然具有较好的抑菌活性, 其热稳定性良好。

目前已在 大黄鱼中鉴定出多种抗菌肽家族, 包括 Piscidin、NK-lysin 等^[25-26]。这些抗菌肽大多对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和大肠杆菌具有抗菌活性, 但对副溶血弧菌不具有活性^[27]。随后改良抗菌肽 Lc-NKlysin-1a, 对副溶血弧菌具有抗菌活性, 其 MIC 为 $31.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ^[28]。此外, 本课题组在大黄鱼血红蛋白中发现抗菌肽 LCH4, 包含 16 个氨基酸残基, 其对副溶血性弧菌的 MIC 为 $25.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ ^[29]。相比较于这几种抗菌肽, 肽 FAH34 有着更强的抗菌活性, 且较短的氨基酸序列使其热稳定性更高。

热处理是食品加工中一个重要的杀菌手段, 因此, 热稳定性也是抗菌肽应用于加工食品的一

个重要指标。本研究表明, 在经过 $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 、30 min 和 $121 \text{ }^\circ\text{C}$ 、15 min 处理后, 与无处理组的 MIC 相同, 均为 $7.80 \mu\text{g}/\text{mL}$, 说明在经过热处理后抗菌肽 FAH34 依然保持了很好的抑菌活性。利用从头计算方法对肽 FAH34 结构进行预测, 结果显示肽 FAH34 不能形成特定的二级结构, 主要呈无规则卷曲结构(图 2)。该结构有利于保护抗菌肽不受外界环境变化的影响, 从而提高抗菌肽的稳定性^[30]。

2.3 抗菌肽 FAH34 对副溶血性弧菌的时间杀伤曲线

利用时间杀伤曲线分析抗菌肽 FAH34 的杀菌动力学, 来表征其对副溶血性弧菌的杀菌效率。结果显示, 肽 FAH34 杀菌活性与时间呈正相关, 随着时间的增加, 细菌的死亡率增高。浓度为 $1 \times \text{MIC}$ 时, 在 0.5 h 内细菌数从 $5.06 \lg (\text{CFU}/\text{mL})$ 降

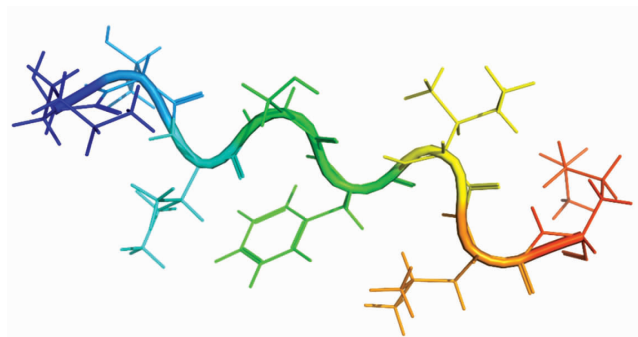


图 2 抗菌肽 FAH34 的三维结构预测

Fig.2 Three dimensional structure prediction of antimicrobial peptide FAH34

至 2.91 lg (CFU/mL)。在 1.5~3.0 h 内,细菌死亡率逐渐增加,细菌的最终浓度降至 0 lg (CFU/mL)。而在热处理组的 FAH34 的时间杀伤曲线中,抗菌肽 FAH34 也呈现出了抑菌活性与时间正相关的规律。在 80 °C、30 min 处理组和 121 °C、15 min 处理组的抗菌肽时间杀伤曲线中,细菌数在 0~3 h 内均降至 0 lg(CFU/mL)(图 3),表明肽 FAH34 的抑菌活性并未受到两种杀菌工艺的影响,进一步表明抗菌肽对高温具有良好的耐受性。

2.4 透射电镜观察抗菌肽 FAH34 处理后的副溶血性弧菌

利用透射电子显微镜观察抗菌肽 FAH34 对细菌细胞造成的损伤。如图 4a 所示,未经抗菌肽处理的副溶血性弧菌细菌形态清晰可见,结构完整,细胞膜和细胞壁均较为光滑,且界限较不明显。然而分别在经过未进行热处理的抗菌肽 FAH34 以及两种热处理后的抗菌肽 FAH34 作用后,细胞结构遭到破坏,细胞膜破损,内容物流出。

膜破坏模式是抗菌肽杀伤细菌的主要机制之一^[31]。膜破坏模式即抗菌肽所带正电荷与带负电的细菌细胞壁吸附,通过两亲性结构特点与细胞膜结合,进而破坏细胞膜完整性,导致细胞内容物外渗从而死亡^[32-33]。透射电镜结果表明抗菌肽 FAH34 正是通过膜破坏模式发挥抗菌性。此外,高温热处理不会影响抗菌肽 FAH34 与细菌细胞膜的结合。

2.5 抗菌肽 FAH34 的细胞毒性分析

采用 MTT 法测定肽 FAH34 对 LO2 细胞的细胞毒性,来探究抗菌肽 FAH34 的应用安全性。在肽 FAH34 的添加质量浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 时,

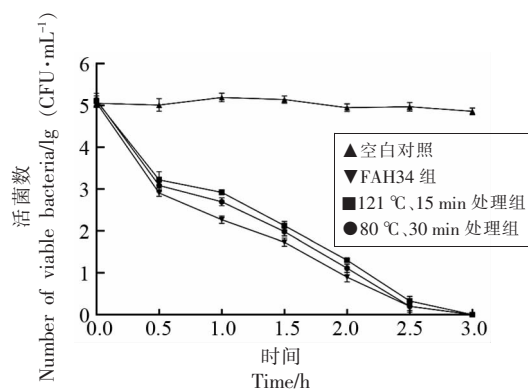


图 3 FAH34 的时间杀伤曲线

Fig.3 Time-kill analysis of FAH34

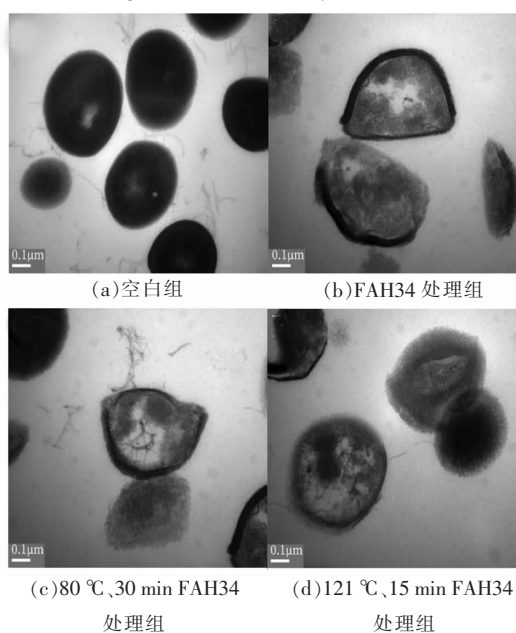


图 4 副溶血性弧菌超微结构

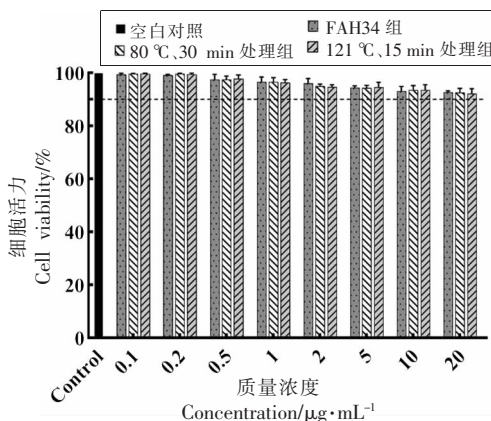
Fig.4 Ultrastructural images of *Vibrio parahaemolyticus*

图 5 FAH34 对 LO2 细胞活力的影响

Fig.5 The effect of FAH34 on the cell viability of LO2 cells

FAH34组以及2种条件热处理组的细胞存活率仍高于90%，表明肽FAH34对LO2细胞的生长没有显著性影响，表明在MIC浓度下肽FAH34具备良好的安全性(图5)。

2.6 FAH34在鱼肉以及腌制液中的应用

通过探索抗菌肽FAH34对鱼肉及其腌制液中副溶血性弧菌的抑制作用来验证其抑菌能力。结果显示，对照组的腌制液中细菌数从初始的6.58 lg (CFU/mL)增长为7 d后的6.62 lg (CFU/mL)，鱼肉中细菌数从初始的6.71 lg (CFU/mL)增长至6.81 lg (CFU/mL)，两组样品的细菌数均有所增长。在经过抗菌肽FAH34处理后，副溶血性弧菌的生长受到抑制，腌制液中的细菌数从初始的6.63 lg (CFU/mL)降至7 d后的0.20 lg (CFU/

mL)，而鱼肉中的细菌数从初始的6.46 lg (CFU/mL)降至7 d后的0 lg (CFU/mL)。在经过2种热处理后，FAH34仍可抑制鱼肉以及腌制液中副溶血性弧菌的生长。80 °C、30 min处理的抗菌肽FAH34使腌制液中的细菌数从6.62 lg (CFU/mL)降至7 d后的0.30 lg (CFU/mL)，鱼肉中的细菌数从6.68 lg (CFU/mL)降至7 d后的0.40 lg (CFU/mL)。121 °C、15 min处理的抗菌肽FAH34使腌制液中的细菌数从初始6.64 lg (CFU/mL)降至7 d后的0.36 lg (CFU/mL)，鱼肉中的细菌数从6.82 lg (CFU/mL)降至7 d后的0.30 lg (CFU/mL)。这些结果表明，抗菌肽FAH34能高效杀灭大黄鱼腌制液以及鱼肉中的副溶血性弧菌。

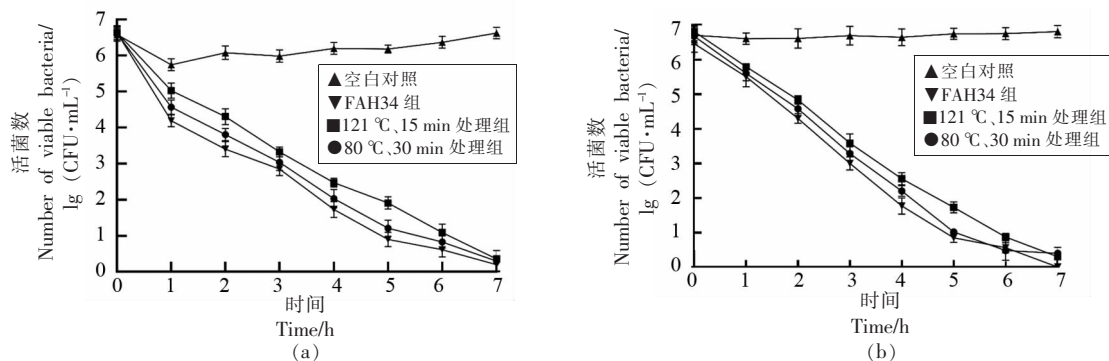


图6 FAH34对腌制液以及鱼肉中副溶血性弧菌生长的影响

Fig.6 The effect of FAH34 on the growth of *Vibrio parahaemolyticus* in fermentation broth

3 结论

本研究从酒糟黄鱼中鉴定了一种新的抗菌肽FAH34(KTISFILK)。FAH34对副溶血性弧菌有很强的抑菌活性，破坏细菌细胞膜是其对副溶血性弧菌的主要抑制机制。抗菌肽FAH34对LO2细胞没有细胞毒性，经过80 °C、30 min和121 °C、15 min两种高温处理后，抗菌肽FAH34的抑菌活性没有影响，具有良好的热稳定性。此外，抗菌肽FAH34能够高效杀灭鱼肉以及其腌制液中的副溶血性弧菌。因此，抗菌肽FAH34作为生物防腐剂在食品防腐领域有着广阔的应用前景。

参 考 文 献

[1] LI M, LIN S Y, WANG R C, et al. Inhibitory ef-

fect and mechanism of various fruit extracts on the formation of heterocyclic aromatic amines and flavor changes in roast large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)[J]. Food Control, 2022, 131: 108410.

- [2] 农业部渔业渔政管理局编. 中国渔业统计年鉴, 2021[M]. 北京: 中国农业出版社, 2021: 22-39.
Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs. China fishery statistical yearbook: 2021[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2021: 22-39.
- [3] LIU J X, CHEN J L, WANG S, et al. Effects of *Monascus* application on *in vitro* digestion and fermentation characteristics of fish protein [J]. Food Chemistry, 2022, 377: 132000.
- [4] CHO S H, LEE B D, AN H J, et al. Kenojeinin I, antimicrobial peptide isolated from the skin of the fermented skate, *Raja kenoei* [J]. Peptides,

- 2005, 26(4): 581–587.
- [5] FAN Q, YUAN Y, ZHANG T, et al. Inhibitory effects of lactobionic acid on *Vibrio parahaemolyticus* planktonic cells and biofilms[J]. Food Microbiology, 2022, 103: 103963.
- [6] ZHU W X, GAO J Z, LIU H L, et al. Antibiofilm effect of sodium butyrate against *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Food Control, 2022, 131: 108422.
- [7] XIE T F, WU Q P, ZHANG J M, et al. Comparison of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from aquatic products and clinical by antibiotic susceptibility, virulence, and molecular characterisation [J]. Food Control, 2017, 71: 315–321.
- [8] SILA A, HEDHILI K, PRZYBYLSKI R, et al. Antibacterial activity of new peptides from barbel protein hydrolysates and mode of action via a membrane damage mechanism against *Listeria monocytogenes*[J]. Journal of Functional Foods, 2014, 11: 322–329.
- [9] SOUZA P FN. Synthetic antimicrobial peptides for controlling fungi in foods[J]. Current Opinion in Food Science, 2022, 45: 100819.
- [10] TANG W T, YUAN H N, ZHANG H, et al. An antimicrobial peptide screened from casein hydrolyzate by *Saccharomyces cerevisiae* cell membrane affinity method[J]. Food Control, 2015, 50: 413–422.
- [11] CHEN Z, WANG X X, HAN P P, et al. Discovery of novel antimicrobial peptides, Brevilaterin V, from *Brevibacillus laterosporus* S62–9 after regulated by exogenously-added L-valine[J]. LWT, 2022, 155: 112962.
- [12] 蔡瑞康, 吴佳佳, 戴志远, 等. 大黄鱼糟制过程中宏基因组学研究[J]. 中国食品学报, 2019, 19(1): 190–199.
- CAI R K, WU J J, DAI Z Y, et al. Analysis of metagenomics in the muscle of fermented large yellow croaker[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(1): 190–199.
- [13] YANG S, LI J, AWEYA J J, et al. Antimicrobial activity of PvH4a, a peptide derived from histone H4 of *Penaeus vannamei*[J]. Aquaculture, 2022, 549: 737807.
- [14] SHWAIKI L N, LYNCH K M, ARENDT E K. Future of antimicrobial peptides derived from plants in food application—A focus on synthetic peptides [J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 112: 312–324.
- [15] YANG S, HUANG H, WANG F, et al. Prediction and characterization of a novel hemocyanin-derived antimicrobial peptide from shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Amino acids, 2018, 50(8): 995–1005.
- [16] YANG S, HUANG H, AWEYA J J, et al. PvHS9 is a novel in silico predicted antimicrobial peptide derived from hemocyanin of *Penaeus vannamei* [J]. Aquaculture, 2021, 530: 735926.
- [17] LUO L L, YI L H, CHEN J X, et al. Antibacterial mechanisms of bacteriocin BM1157 against *Escherichia coli* and *Cronobacter sakazakii* [J]. Food Control, 2021, 123: 107730.
- [18] YANG S, LI J, AWEYA J J, et al. Antimicrobial mechanism of *Larimichthys crocea* whey acidic protein-derived peptide (LCWAP) against *Staphylococcus aureus* and its application in milk [J]. International Journal of Food Microbiology, 2020, 335: 108891.
- [19] 柏昌旺. 可控酶解制备牡蛎短肽工艺及其产品开发 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2019.
- BAI C W. Study on the process of controlled enzymatic hydrolysis of oyster oligopeptides and its product development [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2019.
- [20] BHAT R A H, KHANGEMBAM V C, THAKURIA D, et al. Antimicrobial activity of an artificially designed peptide against fish pathogens[J]. Microbiological Research, 2022, 260: 127039.
- [21] LEI J, SUN L J, HUANG S Y, et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications[J]. American Journal of Translational Research, 2019, 11(7): 3919.
- [22] LIMA B, RICCI M, GARRO A, et al. New short cationic antibacterial peptides. Synthesis, biological activity and mechanism of action[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Biomembranes, 2021, 1863(10): 183665.
- [23] CHATURVEDI P, BHAT R A H, PANDE A. Antimicrobial peptides of fish: Innocuous alternatives to antibiotics [J]. Reviews in Aquaculture, 2020, 12(1): 85–106.
- [24] 何佳宁, 梁东生, 梁悦娥, 等. 新型抗菌肽 KR-1 的设计、筛选及抗菌活性评价[J]. 南方医科大学学报, 2021, 41(6): 923–930.

- HE J N, LIANG D S, LIANG Y E, et al. Design, screening and antibacterial activity evaluation of the novel antibacterial peptide KR-1[J]. Journal of Southern Medical University, 2021, 41(6): 923-930.
- [25] BUONOCORE F, RANDELLI E, CASANI D, et al. A piscidin-like antimicrobial peptide from the icefish *Chionodraco hamatus* (Perciformes: Channichthyidae): molecular characterization, localization and bactericidal activity[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 33(5): 1183-1191.
- [26] ZHOU Q J, WANG J, MAO Y, et al. Molecular structure, expression and antibacterial characterization of a novel antimicrobial peptide NK-lysin from the large yellow croaker *Larimichthys crocea* [J]. Aquaculture, 2019, 500: 315-321.
- [27] ZHOU Q J, WANG J, LIU M, et al. Identification, expression and antibacterial activities of an antimicrobial peptide NK-lysin from a marine fish *Larimichthys crocea*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 55: 195-202.
- [28] LUO W J, ZHONG H R, SHAO J Q, et al. Lc-NKlysin-1A, a multifunctional antimicrobial peptide [J]. Toxicon, 2019, 158: S70.
- [29] YANG S, DONG Y T, AWEYA J J, et al. A hemoglobin-derived antimicrobial peptide, LCH4, from the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) with potential use as a food preservative[J]. LWT, 2020, 131: 109656.
- [30] LI L R, SHI Y H, SU G F, et al. Selectivity for and destruction of *Salmonella typhimurium* via a membrane damage mechanism of a cell-penetrating peptide ppTG20 analogue[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2012, 40(4): 337-343.
- [31] TONG J R, ZHANG Z H, WU Q, et al. Antibacterial peptides from seafood: A promising weapon to combat bacterial hazards in food[J]. Food Control, 2021, 125: 108004.
- [32] LE C F, FANG C M, SEKARAN S D. Intracellular targeting mechanisms by antimicrobial peptides [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2017, 61(4): e02340-16.
- [33] YANG S, DONG Y T, AWEYA J J, et al. Antimicrobial activity and acting mechanism of *Tegillarca granosa* hemoglobin-derived peptide (TGH1) against *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Microbial Pathogenesis, 2020, 147: 104302.

Antibacterial Activity, Mechanism and Thermal Stability of Antibacterial Peptide FAH34 from Distiller's Grains *Larimichthys crocea*

Li Ruobing¹, Liu Jiabin¹, Jin Ritian^{1,3}, Weng Wuyin^{1,3}, Zhang Zhigang², Yang Shen^{1,3*}

¹College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, Fujian

²State Key Laboratory of Food Safety Technology for Meat Products, Xiamen Yinxiang Group Co., Ltd., Xiamen 361100, Fujian

³Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian 116034, Liaoning)

Abstract *Vibrio parahaemolyticus* is a foodborne pathogen of high risk in marine foods. In this study, an antimicrobial peptide designated FAH34 (amino acid sequence: KTISFILK) was identified from distiller's grains *Larimichthys crocea*, and its thermal stability, antibacterial activity, and mechanism of action against *V. parahaemolyticus* explored. Peptide FAH34 had a minimum inhibitory concentration (MIC) of 7.80 $\mu\text{g/mL}$, while time-kill analysis showed that bacteria numbers decreased time-dependently from 5.06 lg(CFU/mL) to 0 lg(CFU/mL) within 3 h upon treatment with FAH34. Transmission electron microscopy examination revealed that FAH34 caused the destruction of bacteria membranes resulting in the leakage of bacterial contents. Besides, heat treatment (80 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min or 121 $^{\circ}\text{C}$ for 15 min) of FAH34 did not significantly affect its antibacterial activity. Moreover, peptide FAH34 (with and without heat treatment) did not significantly affect the viability of LO2 cells. Additionally, FAH34 could reduce bacteria (*V. parahaemolyticus*) counts to 0-0.40 lg (CFU/mL) in fish and marinade. These findings indicate that peptide FAH34 can be used as a biological preservative against *V. parahaemolyticus* in fermented foods or thermally processed foods.

Keywords *Larimichthys crocea*; thermal stability; antimicrobial peptides; *Vibrio parahaemolyticus*; antibacterial mechanism