

## 盐渍凡纳滨对虾抗菌肽 PV-M7 对副溶血性弧菌的抑菌活性

戴静怡<sup>1</sup>, 金日天<sup>1,2,3</sup>, 林蓉<sup>1,2,3</sup>, 翁武银<sup>1,2,3</sup>, 邓尚贵<sup>4</sup>, 杨燊<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>集美大学海洋食品与生物工程学院 福建厦门 361021

<sup>2</sup>福建省食品微生物与酶工程重点实验室 福建厦门 361021

<sup>3</sup>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

<sup>4</sup>浙江兴业集团 浙江舟山 316014)

**摘要** 抗菌肽是食品工业的新型生物防腐剂,而盐渍发酵食品是抗菌肽的来源之一。采用超高效液相色谱-质谱联用技术从盐渍凡纳滨对虾中鉴定小分子多肽序列,利用生物信息学分析筛选潜在的抗菌肽。通过最低抑菌浓度、时间-杀灭曲线、细胞膜通透性和圆二色谱等试验评价抗菌肽对副溶血性弧菌的抑菌活性及机制。结果表明:盐渍凡纳滨对虾中一种新型抗菌肽(PV-M7)对副溶血性弧菌的最低抑菌质量浓度为 15.6 μg/mL,其在 1 h 内即可产生很好的抑菌作用。PV-M7 作用于副溶血性弧菌后,可使细胞膜通透性增加,胞内大分子物质(核酸、蛋白质)泄露,同时,细胞膜表面模糊,细胞质密度减小。当 PV-M7 接触细胞膜时,它的二级结构由无规则卷曲转变成 α-螺旋,这种结构转换是其发挥抑菌活性的关键作用机制。

**关键词** 凡纳滨对虾; 副溶血性弧菌; 抗菌肽; 结构转换; 抑菌机制

文章编号 1009-7848(2024)05-0182-08 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.05.014

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是广泛存在于海洋食品中的食源性细菌之一,海洋中甲壳类动物、软体动物和贝类等高等生物是传播这种致病菌的主要媒介<sup>[1]</sup>。食用被副溶血性弧菌污染的生或未煮熟的海鲜可能导致急性胃肠炎,其特征是腹泻、头痛、呕吐、恶心和腹部痉挛等症状<sup>[2]</sup>。近年来,由副溶血性弧菌引起的食物中毒发生率正在逐年上升,据估计,每年因副溶血性弧菌感染人数约为 495 万人次,已严重威胁人类健康<sup>[3]</sup>。

食品中致病微生物的防控主要以防腐剂为主。然而,随着防腐剂使用强度的不断增加,导致具有强耐药性的细菌频频出现<sup>[4]</sup>。抗菌肽是一种先天免疫反应的产物,与传统防腐剂相比,具有抑菌谱广,不易产生耐药性,细胞毒性低等优点,被认为是传统化学防腐剂的潜在替代物<sup>[5]</sup>。据报道,海洋无脊椎动物抗菌肽的作用机制非常多样化,例如,对革兰氏阳性细菌具有活性的软体动物抗菌肽(Cg-Defh1、Cg-Defh2、Cg-Defm)能够通过与其细菌脂质 II(肽聚糖的前体)结合,产生抑菌作用<sup>[6]</sup>。

从节肢动物中鉴定的抗菌肽(DAN2)能够与细胞壁脂多糖(LPS)结合,最终对革兰氏阴性菌产生抑制效果<sup>[7]</sup>。甲壳类动物中鉴定的抗菌肽(rAaCrus1)可使细菌质膜通透,从而抑制细菌生长<sup>[8]</sup>。阐明抗菌肽的作用机制对于实际应用具有重要意义。

凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)是一种全世界分布最广、产量最高的经济对虾<sup>[9]</sup>。盐渍加工是水产品传统加工方式之一,除了延长食品保质期外,盐渍过程还能产生大量小分子多肽。曾有报道,在盐渍肉制品中发现对单增李斯特菌产生抑菌效果的抗菌肽<sup>[10]</sup>。目前,关于盐渍凡纳滨对虾抗菌肽的研究少有报道。本研究采用超高效液相质谱联用技术鉴定具有抑菌活性的小分子多肽,并探讨其对食源性致病菌(副溶血性弧菌)的抑菌活性及机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、菌种与试剂

金黄色葡萄球菌(ATCC 27217)、大肠杆菌(ATCC 15224)、副溶血性弧菌(ATCC 17802)、蜡样芽胞杆菌(ATCC 14579)保藏于福建省微生物与酶工程重点实验室。凡纳滨对虾购买自福建省厦门市永辉超市。营养肉汤(Nutrient broth, NB)培养基、肉膏蛋白胨(Luria bertani, LB)培养基,

收稿日期: 2023-05-20

基金项目: 国家重点研发计划项目(2020YFD09009)

第一作者: 戴静怡,女,硕士

通信作者: 杨燊 E-mail: yangshen@jmu.edu.cn

北京兰博利德生物技术有限公司;邻硝基苯基- $\beta$ -D-半乳糖苷(2-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside, ONPG)、十二烷基苯磺酸钠(Sodium dodecyl sulfate, SDS)、碘化丙啶(Propidium iodide, PI)、羧苄青霉素钠、阿莫西林, Sigma-Aldrich(中国上海)公司。抗菌肽由天津诺康信达科技有限公司合成,纯度高于99%。

## 1.2 设备与仪器

BOXUN 立式压力蒸汽灭菌器,上海博迅医疗生物仪器股份有限公司;SW-CJ-2D 洁净工作台,苏州净化设备有限公司;LRH-250F 生化培养箱,上海有丰科学仪器有限公司;ZWY-100H 智城恒温振荡器,上海智城分析仪器有限公司;H1650-W 医用离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;800TS 酶标仪,美国 BioTek 仪器有限公司;Chirascan V100 圆二色谱仪,英国 Applied Photophysics 公司;H-7650 透射电子显微镜,日立高新技术有限公司。

## 1.3 试验方法

### 1.3.1 凡纳滨对虾的盐渍发酵及抗菌序列的筛选

将清洗干净的凡纳滨对虾整虾置于 20% NaCl 溶液中,自然发酵 15 d。发酵液离心(10 000 r/min, 10 min)取上清液,将样品置于超滤离心(3 ku)在 4 °C 下离心(10 000 r/min, 20 min),用胰蛋白酶于 37 °C 下消化过夜。使用 C18 小柱对样品进行脱盐,脱盐后的样品注入超高效液相色谱-质谱仪(UPLC-MS)中进行分析。进样量为 5.0  $\mu$ L,流动相 A 为 0.1%甲酸水溶液,B 为乙腈。梯度洗脱程序:0~1 min,98% A;1~55 min,98% A~70% A;55~60 min,70% A~10% A。质谱条件参考 Banu 等<sup>[11]</sup>的方法,设置喷雾电压:3.0 kV;毛细管温度:300 °C。扫描模式为正离子,一级扫描:分辨率 70 000,范围 350~1 600  $m/z$ ;二级扫描:分辨率 17 500,最后将得到的质谱数据通过 MAXQUANT v1.6.5.0 软件在 uniprot 搜索凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)数据库进行匹配。

利用在线生物信息学软件预测鉴定的多肽的抗菌潜力。使用 APD3(<http://aps.unmc.edu/AP/>)计算肽的电荷和疏水性。最后使用 I-TASSER(<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>)在线服务器对多肽的三维结构进行从头计算建模。

### 1.3.2 抗菌肽抑菌性测定

1.3.2.1 抗菌肽最低抑菌浓度(MIC)测定 采用平板菌落计数法测定 PV-M7 对副溶血性弧菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和蜡样芽胞杆菌的 MIC 值<sup>[12]</sup>。细菌在 NB 培养基中于 37 °C 培养 6~12 h 至对数生长期,用无菌水分别稀释菌液至浓度为  $10^3$  CFU/mL。将 PV-M7 用无菌水进行梯度稀释(质量浓度为 7.8~1 000  $\mu$ g/mL),50  $\mu$ L 菌液与 PV-M7 溶液等体积混合 2 h,取 20  $\mu$ L 进行涂布,于 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h 后对菌落进行计数,抑制 80%细菌生长的 PV-M7 溶液质量浓度为 MIC 值。

1.3.2.2 时间杀伤曲线 时间杀伤曲线的测定参考之前报道的方法<sup>[13]</sup>。将生长至对数期的副溶血性弧菌悬液与 PV-M7 混合(菌液浓度为  $10^3$  CFU/mL, PV-M7 质量浓度为 15.6  $\mu$ g/mL),无菌水作为空白对照。将各处理组置于 37 °C 培养至不同时间点(0, 1, 2, 3, 4, 5 h),取 20  $\mu$ L 涂布,培养皿放入培养箱中于 37 °C 培养 24 h 后进行菌落计数。

### 1.3.3 抗菌肽抑菌机制测定

1.3.3.1 细菌细胞膜渗透性测定 副溶血性弧菌膜完整性使用 ONPG 方法测定<sup>[14]</sup>。将对数生长期的副溶血性弧菌菌液于 2 700 $\times$ g 离心 10 min,菌体沉淀用 PBS 洗涤 3 次。用 10 mL 无菌 M9 乳糖诱导培养基重悬,于 37 °C 培养至  $OD_{600nm} > 0.4$ 。加入 100  $\mu$ L PV-M7(终质量浓度为  $1 \times MIC$ )和 30  $\mu$ L ONPG(0.5 mg/mL)至 100  $\mu$ L 菌液中充分混匀。37 °C 培养 2 h 后,170 r/min 温育 8 h,记录其  $OD_{420nm}$  值, PBS 作为空白对照。

1.3.3.2 细菌 PI 摄取测定 参考 Patil 等<sup>[15]</sup>的方法进行 PI 摄取试验。将对数生长期的副溶血性弧菌稀释至  $OD_{600nm} = 0.25$ ,将细菌悬浮液(200  $\mu$ L)与等体积 PV-M7(终质量浓度为  $1/2 \sim 2 \times MIC$ )混合后孵育 2 h,然后加入 150  $\mu$ L PI(终浓度 10  $\mu$ mol/L)避光孵育 15 min。在激发波长为 550 nm 和发射波长为 570 nm 时检测 PI 荧光强度。

1.3.3.3 透射电子显微镜(TEM) 参考 Al-Mohammadi 等<sup>[16]</sup>的方法。将 500  $\mu$ L 对数生长期副溶血性弧菌菌液加入等体积 PV-M7(终浓度  $2 \times MIC$ ),在 37 °C 培养 2 h。培养结束后于 2 700 $\times$ g 离心 2 min,收集菌体沉淀用 PBS 洗涤 3 次。使用 2.5%戊二醛固定 12 h。使用乙醇(30%~100%)脱

水,再用丙酮处理 20 min 后,将样品在 70 ℃下 24 h,制备 70~90 nm 的薄片。使用柠檬酸铅和乙酸铀酯染色后观察。

1.3.4 抗菌肽的二级结构测定 使用 CD 光谱法测定 PV-M7 的二级结构<sup>[17]</sup>。分别将 PV-M7 溶于 25 mmol/L SDS 和 PBS 中,使其质量浓度为 0.2 mg/mL。取 200 μL 样品加到 1 mm 石英比色皿中。利用 Chirascan V100 圆二色谱仪在 25 ℃下以 100 nm/min 的扫描速度测定,从 190~280 nm 连续扫描 3 次样品光谱,结果扣除 SDS 空白溶液的影响后取平均值。

#### 1.4 数据统计与分析

所有试验均进行 3 次重复试验,试验数据 GraphPad Prism 8.3 软件进行统计分析,以平均值±标准差表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗菌肽的预测与筛选

为了得到盐渍凡纳滨对虾中小分子多肽的氨

基酸序列,利用超高效液相色谱-质谱联用仪对分子质量小于 3 000 u 的对虾肽段进行质谱鉴定。如表 1 所示,共得到 13 个多肽片段,在鉴定的多肽中,片段平均长度为 15 个氨基酸,分子质量在 728.5~2 233.1 u,疏水性分布于 20%~58%范围,电荷数在-3~+2 范围。

由于细菌细胞膜的磷脂双分子层带有负电荷,阳离子肽可以通过静电吸附与其产生相互作用,从而发挥抑菌活性<sup>[18]</sup>。因此,抗菌肽电荷往往在+2~+9 范围,且抑菌活性会随着电荷数的增加而增加<sup>[19]</sup>。此外,抗菌肽的疏水性也是其与细胞膜相互作用的重要因素,一般认为疏水性在 30%~60%范围的抗菌肽具有更好的抑菌活性<sup>[20]</sup>。然而,与正电荷数不同的是,过高的疏水性会影响多肽的溶解性,进而影响抑菌活性<sup>[21]</sup>。多肽序列 MQKEITSLAPSTLKIK(命名为 PV-M7)具有 2 个净正电荷,疏水性为 37%,符合阳离子抗菌肽的特点,因此对其抑菌性进行进一步研究。

表 1 盐渍凡纳滨对虾中多肽的鉴定

Table 1 Identification of peptides from salt *Penaeus vannamei*

名称	序列	分子质量/u	电荷	疏水性/%
PV-M1	SLSDEERMDALENQLKEAR	2 233.1	-3	31
PV-M2	LVLEVAQHLGENTVR	1 676.9	0	46
PV-M3	VLSDIEEMQLQVER	1 687.8	-3	42
PV-M4	LAARLEEAELQIEQLNVK	2 066.1	-2	50
PV-M5	VNFTVVEEIRELMDK	1 721.9	-2	42
PV-M6	AFEKSPGKIEAEQFR	1 735.8	0	33
PV-M7	MQKEITSLAPSTLKIK	1 787.1	+2	37
PV-M8	LLPGELAKHAVSEGTK	1 761.9	+1	41
PV-M9	IVTAWESIQQPGYCR	1 768.9	0	46
PV-M10	LLERAK	728.5	+1	50
PV-M11	TVTAMDVVYALK	1 309.7	0	58
PV-M12	DRWMNIGYEDDELK	1 782.8	-3	28
PV-M13	NYSTEHFRLK	1 293.6	+2	20

### 2.2 PV-M7 的抑菌活性分析

PV-M7、羧苄青霉素钠、阿莫西林和乳酸链球菌素对革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌、蜡样芽胞杆菌)和革兰氏阴性菌(副溶血性弧菌、大肠杆菌)的 MIC 值列于表 2 中。PV-M7 对革兰氏阳性菌抑

菌活性较弱,而对革兰氏阴性菌(副溶血性弧菌和大肠杆菌)的抑菌活性很强,MIC 分别为 15.6 μg/mL 和 62.5 μg/mL。羧苄青霉素钠对革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌、蜡样芽胞杆菌)和革兰氏阴性菌(副溶血性弧菌、大肠杆菌)的 MIC 为 250 μg/

mL 和 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。阿莫西林对上述 4 种致病菌的 MIC 均为 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。乳酸链球菌素对革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌、蜡样芽胞杆菌)的 MIC 为 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 62.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 而对革兰氏阴性菌抑菌活性很弱。结果表明, PV-M7 对革兰氏阴性菌的抑菌活性远优于乳酸链球菌素、羧苄青霉素钠和阿莫西林等食品防腐剂和抗生素。进一步利用时间杀伤曲线分析 PV-M7 对副溶血性弧菌的抑菌活性, 结果如图 2 所示, 与初始细菌数量相比, 副溶血性弧菌数量随着 PV-M7 的作用时间的增加而显著减少, 当 PV-M7 为 1 $\times$ MIC 作用 5 h 后, 细菌数量减少了 99%, 并且具有浓度依赖性。

PV-M7 对革兰氏阴性菌的抑菌效果优于革兰氏阳性菌, 表现为选择性抑菌效应。事实上, 并

非所有的抗菌肽都具有广谱抗菌活性。例如抗菌肽 Magainin, 可以有效抑制革兰氏阴性菌, 而其对革兰氏阳性细菌的抑菌活性较弱<sup>[22]</sup>。PV-M7 的选择性抑菌效应可能是由于革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌细胞外膜组成成分的差异导致。革兰氏阳性菌具有更厚的肽聚糖层, 不利于抗菌肽的进入<sup>[23]</sup>, 而革兰氏阴性菌具有更大的周质空间, 这利于抗菌肽空间结构的变化, 从而增强抑菌性。此外, PV-M7 对副溶血性弧菌的 MIC 值低于之前报道的抗菌肽 AMPNT-6 (MIC = 1.25 mg/mL) 和抗菌肽 SsNKLP27 (MIC = 169.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 表明 PV-M7 具有抑制革兰氏阴性致病菌(尤其是副溶血性弧菌)的潜力<sup>[24-25]</sup>。

表 2 肽 PV-M7 对 4 种食源性致病菌的抑菌活性

Table 2 Antibacterial activity of peptide PV-M7 against four food-pathogenic bacteria

	革兰氏阴性菌 MIC/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$		革兰氏阳性菌 MIC/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	
	副溶血性弧菌	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	蜡样芽胞杆菌
PV-M7	15.6	62.5	>500	>500
羧苄青霉素钠	500	500	250	250
阿莫西林	250	250	250	250
乳酸链球菌素	500	500	125	62.5

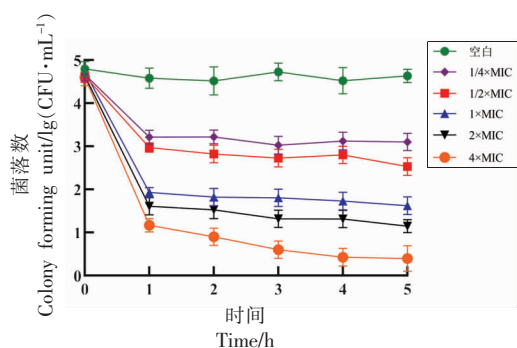


图 1 抗菌肽 PV-M7 对副溶血性弧菌的时间杀伤动力学曲线

Fig.1 Time-kill kinetics of antimicrobial peptide PV-M7 against *Vibrio parahaemolyticus*

## 2.3 PV-M7 对副溶血性弧菌的抗菌机制

### 2.3.1 PV-M7 对细胞膜通透性的影响

ONPG 能够被细菌内膜  $\beta$ -半乳糖苷酶水解成黄色的邻-硝基苯酚, 故通过测定反应体系中邻-硝基苯酚含量

( $\text{OD}_{420\text{nm}}$  值) 即可反映抗菌肽对细菌细胞膜通透性的影响<sup>[26]</sup>。图 2a 显示, 细胞膜通透性随抗菌肽质量浓度的增加而增加。ONPG 在 PV-M7 作用 1 h 内被迅速水解, 随后趋于稳定, 这与图 1 时间杀伤曲线的结果一致, 表明抗菌肽 PV-M7 在 1 h 内就能够发挥抑菌活性。PI 染料能在细胞膜被破坏的情况下进入细胞与核酸结合, 因此, 可通过对 PI 荧光强度的测定表征肽诱导细胞膜破坏的程度。图 2b 显示, 与对照相比 PV-M7 处理的细菌 PI 荧光信号显著增加, 这表明抗菌肽破坏了细胞膜的完整性, 当 PV-M7 质量浓度为 2 $\times$ MIC 时细胞膜损坏程度最大。

上述结果表明 PV-M7 可以显著增加副溶血性弧菌细胞膜的通透性。有研究表明, 抗菌肽可以替代革兰氏阴性菌膜外脂多糖层中的  $\text{Mg}^{2+}$  离子, 从而使细菌外表面不稳定, 这种外膜的失稳会促进抗菌肽的穿透, 导致细胞内膜的破坏<sup>[27]</sup>。另外,

由于抗菌肽的阳离子特性,可以干扰带负电荷的细菌细胞之间胞外聚合物的形成,引起细菌细胞内膜通透性改变,达到抑制或杀死细胞的效果<sup>[28-29]</sup>。抗菌肽通常以“桶状”排列或“环形”的形式在细菌

细胞膜表面形成通道,或者肽聚集在膜表面上并在膜中引起脂质的重新排序<sup>[30-31]</sup>。这些情况,会引起细胞电化学梯度变化,最终导致细胞裂解。

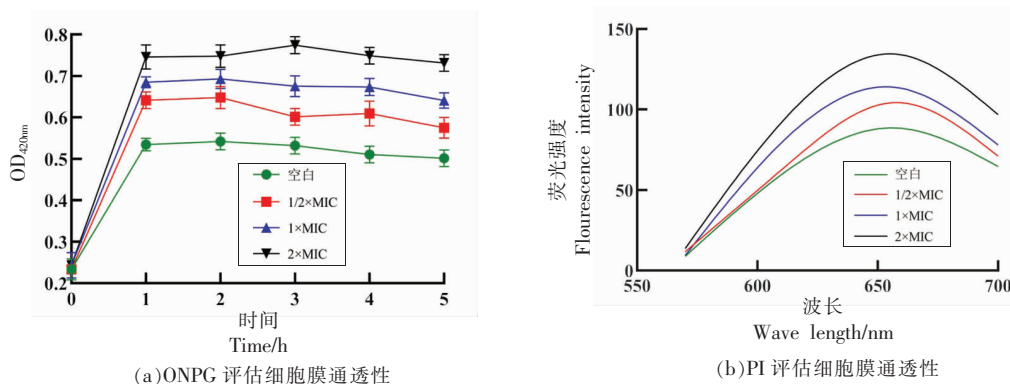


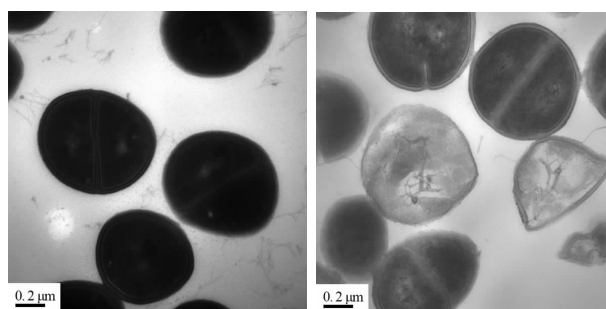
图2 抗菌肽 PV-M7 对副溶血弧菌细胞膜通透性的影响

Fig.2 Effects of antibacterial peptide PV-M7 on membrane permeability of *Vibrio parahaemolyticus*

2.3.2 PV-M7 对细胞膜超微结构的影响 利用 TEM 观察 PV-M7 对副溶血性弧菌细胞膜超微结构的影响。如图 3 所示,用 PBS 处理的副溶血性弧菌细胞膜结构光滑完整、无破损,细胞内容物充实致密(图 3a)。与对照组相比,当 2×MIC 的 PV-M7 作用菌体 2 h 后细胞质密度降低,细胞膜破损变形(图 3b)。这进一步证实 PV-M7 作用于细胞膜后,通过改变细胞膜通透性,导致细胞内容物流出,使细胞呈囊泡状结构,从而杀灭细菌<sup>[32]</sup>。

2.3.3 不同条件下 PV-M7 的二级结构变化 利用圆二色谱测定 PV-M7 在 PBS 溶液和模拟细胞膜溶液(SDS 溶液)下的二级结构变化。如图 4a 所示,PV-M7 处于 PBS 体系中时,波长 200 nm 附近有唯一负吸收峰,符合无规则卷曲的特征吸收峰。当 PV-M7 处于 SDS 体系中时,波长 190 nm 处附近有一处正吸收峰,200 nm 和 220 nm 处附近有两处负吸收峰,是典型的  $\alpha$ -螺旋特征吸收峰,表明 PV-M7 在 2 种不同溶液环境下二级结构发生的转换。此外,利用从头计算在线软件 I-TASSER 对肽 PV-M7 的 3D 结构进行建模,也显示其具有  $\alpha$ -螺旋结构。

抗菌肽在 PBS 体系中的二级结构通常以无规卷曲为主,而在 SDS 体系中抗菌肽的氢键或者疏水键会被打开,这改变了非极性侧链间相互作用,



(a) 未处理的副溶血性弧菌 (b) PV-M7 处理的副溶血性弧菌

图3 副溶血性弧菌的 TEM 图像

Fig.3 TEM images of *Vibrio parahaemolyticus*

形成聚合物,进而有效的诱导了螺旋结构的生成<sup>[33]</sup>。肽 PV-M7 一级序列结构中有一段为 MQKEITSL,这段序列中的谷氨酰胺、苏氨酸和丝氨酸是带有极性基团的氨基酸。甲硫氨酸、异亮氨酸和亮氨酸是具有非极性疏水侧链的氨基酸,在 SDS 的诱导下,使得带有极性基团的氨基酸形成氢键,带有非极性疏水侧链的氨基酸相互聚集,进而卷曲折叠形成  $\alpha$ -螺旋<sup>[34]</sup>。因此,可以推断当 PV-M7 在与细菌细胞膜脂质体接触后,其二级结构会由无规卷曲结构转变成  $\alpha$ -螺旋结构(图 5b),这种结构转换会促进 PV-M7 与细菌细胞膜相结合,从而破坏细菌细胞,最终导致细菌死亡<sup>[35]</sup>。

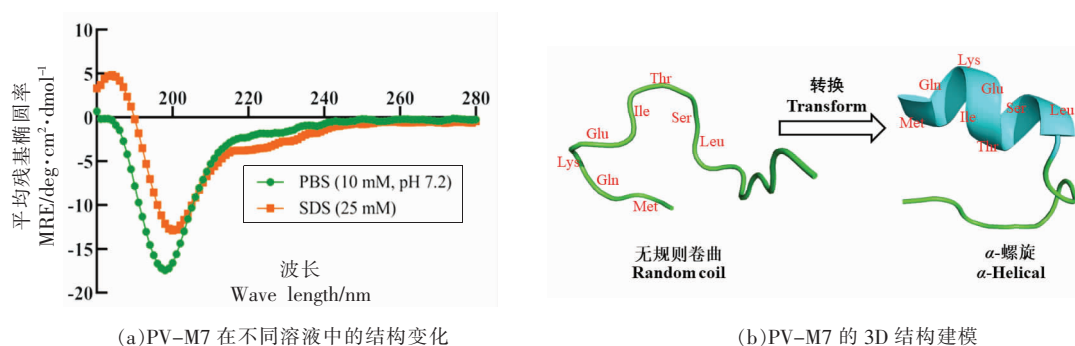


图 4 肽 PV-M7 的二级结构

Fig.4 Secondary structure of peptide PV-M7

### 3 结论

本研究从盐渍凡纳滨对虾中筛选得到一个新型抗菌肽 PV-M7(MQKEITSLAPSTLKIK),其对副溶血性弧菌的 MIC 值为 15.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,在作用细菌 5 h 后能杀灭 99%的副溶血性弧菌。抗菌肽 PV-M7 是通过增加细胞膜通透性和破坏细胞膜完整性来实现抑菌活性的。此外,抗菌肽 PV-M7 在 PBS 溶液下呈现无规则卷曲结构,而在接触细菌细胞膜时则转变成  $\alpha$ -螺旋结构,这一结构转换可以促进其与细胞膜的结合,是其发挥抑菌活性的关键作用机制。

### 参 考 文 献

- [1] SILVA I P, DE SOUZA CARNEIRO C, SARAIVA M A F, et al. Antimicrobial resistance and potential virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from water and bivalve mollusks from Bahia, Brazil[J]. Marine Pollution Bulletin, 2018, 131: 757-762.
- [2] MATSUDA S, HIYOSHII H, TANDHAVANANT S, et al. Advances on *Vibrio parahaemolyticus* research in the postgenomic era [J]. Microbiology and Immunology, 2020, 64(3): 167-181.
- [3] 韩小龙, 张海燕, 曹明秀, 等. 我国海产品中副溶血性弧菌的污染现状与控制策略分析[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(7): 263-267.  
HAN X L, ZHANG H Y, CAO M X, et al. Analysis on current pollution of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood in China and its controlling strategy[J]. Food and Fermentation Industry, 2015, 41(7): 263-267.
- [4] RUDRAMURTHY G R, SWAMY M K, et al. Nanoparticles: Alternatives against drug-resistant pathogenic microbes [J]. Molecules, 2016, 21 (7): 836.
- [5] SEMREEN M H, EI-GAMAL M I, ABDIN S, et al. Recent updates of marine antimicrobial peptides [J]. Saudi Pharm J, 2018, 26(3): 396-409.
- [6] SCHMITT P, WILMES M, PUGNIÈRE M, et al. Insight into invertebrate defensin mechanism of action: Oyster defensins inhibit peptidoglycan biosynthesis by binding to lipid II[J]. J Biol Chem, 2010, 285(38): 29208-29216.
- [7] DUWADI D, SHRESTHA A, YILMA B, et al. Identification and screening of potent antimicrobial peptides in arthropod genomes[J]. Peptides, 2018, 103: 26-30.
- [8] ZHANG W, XU X H, ZHANG J, et al. Discovery and characterization of a new crustin antimicrobial peptide from *Amphibalanus amphitrite*[J]. Pharmaceutics, 2022, 14(2): 413.
- [9] SHEN W, HE P, XIAO C S, et al. From antimicrobial peptides to antimicrobial poly ( $\alpha$ -amino acid)s[J]. Advanced Healthcare Materials, 2018, 7 (20): 1800354.
- [10] YU H H, CHIN Y W, PAIK H D. Application of natural preservatives for meat and meat products against food-borne pathogens and spoilage bacteria: A review[J]. Foods, 2021, 10(10): 2418.
- [11] BANU S H, KUMAR M C. caP4: A 2.97 KDa cationic antibacterial peptide from *Curcuma pseudomontana* L.[J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2020, 26(2): 755-765.
- [12] MAO F, BAO Y, WONG N K, et al. Large-scale plasma peptidomic profiling reveals a novel, nontox-

- ic, *Crassostrea hongkongensis*-derived antimicrobial peptide against foodborne pathogens[J]. *Marine Drugs*, 2021, 19(8): 420.
- [13] MARTINEZ M, GONCALVES S, FELÍCIO M R, et al. Synergistic and antibiofilm activity of the antimicrobial peptide P5 against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2019, 1861(7): 1329-1337.
- [14] LEE H, LIM S I, SHIN S H, et al. Conjugation of cell-penetrating peptides to antimicrobial peptides enhances antibacterial activity[J]. *ACS Omega*, 2019, 4(13): 15694-15701.
- [15] PATIL S M, KUNDA N K. Anticancer activity of D-LAK-120A, an antimicrobial peptide, in non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. *Biochimie*, 2022, 201: 7-17.
- [16] AL-MOHAMMADI A R, OSMAN A, ENAN G, et al. Powerful antibacterial peptides from egg albumin hydrolysates[J]. *Antibiotics*, 2020, 9(12): 901.
- [17] KRISHNAN M, CHOI J, JANG A, et al. A novel peptide antibiotic, Pro10-1D, designed from insect defensin shows antibacterial and anti-inflammatory activities in sepsis models[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(17): 6216.
- [18] QUEMÉ-PEÑA M, JUHÁSZ T, MIHÁLY J, et al. Manipulating active structure and function of cationic antimicrobial peptide CM15 with the polysulfonated drug suramin: A step closer to *in vivo* complexity[J]. *Chem Bio Chem*, 2019, 20(12): 1578-1590.
- [19] CIUMAC D, GONG H N, HU X Z, et al. Membrane targeting cationic antimicrobial peptides [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2019, 537: 163-185.
- [20] SOUZA P F N, MARQUES L S M, OLIVEIRA J T A, et al. Synthetic antimicrobial peptides: From choice of the best sequences to action mechanisms [J]. *Biochimie*, 2020, 175: 132-145.
- [21] ABRAHAM T, PRENNER E J, LEWIS R N A H, et al. Structure-activity relationships of the antimicrobial peptide gramicidin S and its analogs: Aqueous solubility, self-association, conformation, antimicrobial activity and interaction with model lipid membranes[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2014, 1838(5): 1420-1429.
- [22] BAHAR A A, REN D. Antimicrobial peptides [J]. *Pharmaceuticals*, 2013, 6(12): 1543-1575.
- [23] HAN D B, YAN Y R, BIAN X T, et al. A novel electrochemical biosensor based on peptidoglycan and platinum-nickel-copper nano-cube for rapid detection of Gram-positive bacteria [J]. *Microchimica Acta*, 2020, 187(11): 1-10.
- [24] XU D F, WANG Y L, SUN L J, et al. Inhibitory activity of a novel antibacterial peptide AMPNT-6 from *Bacillus subtilis* against *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp[J]. *Food Control*, 2013, 30(1): 58-61.
- [25] HAO D, WANG G, LI N, et al. Antimicrobial and immunoregulatory activities of the derived peptide of a natural killer lysin from black rockfish (*Sebastes schlegelii*) [J]. *Fish Shellfish Immun*, 2022, 123: 369-380.
- [26] YI L H, LI X, LUO L L, et al. A novel bacteriocin BMP11 and its antibacterial mechanism on cell envelope of *Listeria monocytogenes* and *Cronobacter sakazakii*[J]. *Food Control*, 2018, 91: 160-169.
- [27] AGGARWAL B, SAINI V, MEHTA D, et al. Dimeric cholic acid peptide conjugates act as effective antibiotic adjuvants against multidrug resistance (MDR) Gram-negative bacterial infections[J]. *Advanced Therapeutics*, 2023, 6(4): 2200231.
- [28] BATONI G, MAISETTA G, ESIN S. Antimicrobial peptides and their interaction with biofilms of medically relevant bacteria[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2016, 1858(5): 1044-1060.
- [29] ZHANG B, ZHANG M, LIN M, et al. Antibacterial copolypeptoids with potent activity against drug-resistant bacteria and biofilms, excellent stability, and recycling property[J]. *Small*, 2022, 18(11): 2106936.
- [30] HUANG Y B, HUANG J F, CHEN Y X. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: Relationships of structure and function[J]. *Protein & Cell*, 2010, 1(2): 143-152.
- [31] BERTRAND B, MUNUSAMY S, ESPINOSA-ROMERO J F, et al. Biophysical characterization of the insertion of two potent antimicrobial peptides-Pin2 and its variant Pin2 [GVG] in biological model membranes[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2020, 1862(2): 183105.
- [32] HARTMANN M, BERDITSCH M, HAWECKER J, et al. Damage of the bacterial cell envelope by antimicrobial peptides gramicidin S and PGLa as re-

- vealed by transmission and scanning electron microscopy[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010, 54(8): 3132–3142.
- [33] MCKAY M J, AFROSE F, KOEPPE II R E, et al. Helix formation and stability in membranes [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 2018, 1860(10): 2108–2117.
- [34] PIRTSKHALAVA M, VISHNEPOLSKY B, GRIGOLAVA M, et al. Physicochemical features and peculiarities of interaction of AMP with the membrane[J]. *Pharmaceuticals*, 2021, 14(5): 471.
- [35] LU C, QUAN G L, SU M, et al. Molecular architecture and charging effects enhance the *in vitro* and *in vivo* performance of multi-arm antimicrobial agents based on star-shaped poly (*L*-lysine)[J]. *Advanced Therapeutics*, 2019, 2(12): 1900147.

### Antibacterial Activity of Salted *Penaeus vannamei* Antimicrobial Peptide PV-M7 against *Vibrio parahaemolyticus*

Dai Jingyi<sup>1</sup>, Jin Ritian<sup>1,2,3</sup>, Lin Rong<sup>1,2,3</sup>, Weng Wuyin<sup>1,2,3</sup>, Deng Shanggui<sup>4</sup>, Yang Shen<sup>1,2,3\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, Fujian

<sup>2</sup>Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Xiamen 361021, Fujian

<sup>3</sup>Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning

<sup>4</sup>Zhejiang Xingye Group Co., Ltd., Zhoushan 316014, Zhejiang)

**Abstract** Antimicrobial peptides are novel biological preservatives in the food industry, and salted fermented foods are one of the sources of antimicrobial peptides (AMPs). In this study, ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS) was used to identify small molecule peptide sequences from salted *Penaeus vannamei*, and potential antimicrobial peptides were analyzed and screened by bioinformatics. Antibacterial activity and mechanism of AMPs against *Vibrio parahaemolyticus* were evaluated by minimum inhibitory concentration, time-kill curve, cell membrane permeability, and circular dichroism. The results showed that the minimum inhibitory concentration of the novel AMP (PV-M7) from salted *Penaeus vannamei* was 15.6  $\mu\text{g/mL}$  against *Vibrio parahaemolyticus*, and the antibacterial activity was exerted within 1 h. After PV-M7 acted on *Vibrio parahaemolyticus*, it could increase the permeability of the cell membrane, leak the macromolecular substances (nucleic acid, protein) in the cell, at the same time, the surface of the cell membrane was blurred, and the density of the cytoplasm decreased. When PV-M7 contacts the cell membrane, its secondary structure changed from random coil to  $\alpha$ -helical, this structural transformation was the key mechanism of its antibacterial activity.

**Keywords** *Penaeus vannamei*; *Vibrio parahaemolyticus*; antimicrobial peptide; structure shifts; antibacterial mechanism