



咸鸭蛋清胃蛋白酶水解产物的抗菌性及抗氧化性

李晶晶, 蔡为荣*, 李安琪, 朱樱, 王璐

安徽工程大学生物与食品工程学院, 安徽 芜湖 241000

李晶晶, 蔡为荣, 李安琪, 朱樱, 王璐. 咸鸭蛋清胃蛋白酶水解产物的抗菌性及抗氧化性. 微生物学报, 2022, 62(11): 4505–4516.

Li Jingjing, Cai Weirong, Li Anqi, Zhu Ying, Wang Lu. Antibacterial and antioxidant activities of pepsin hydrolysate from salted duck egg white. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(11): 4505–4516.

摘要: 【目的】提高对咸鸭蛋清的综合利用, 制备具有生物活性的蛋白水解产物。【方法】采用超滤对咸鸭蛋清进行脱盐及分级, 利用胃蛋白酶对不同分子量范围的咸鸭蛋清蛋白组分进行酶解, 并对不同组分的水解产物进行体外抑菌试验, 测定其最低抑菌浓度(MIC)、最低杀菌浓度(MBC)、细菌细胞膜完整性及抗氧化活性。【结果】超滤后得到 3 种不同分子量的组分, 组分 A ($M_w > 50$ kDa)、组分 B (50 kDa $> M_w > 20$ kDa) 和组分 C (20 kDa $> M_w > 5$ kDa)。其中, 组分 A 和组分 B 的水解产物对大肠杆菌的生长有抑制作用。2 种组分的 MIC 分别为 $1\ 024\ \mu\text{g/mL}$ 和 $2\ 048\ \mu\text{g/mL}$, MBC 均为 $2\ 048\ \mu\text{g/mL}$ 。大肠杆菌进入稳定期 OD_{600} 值约为 1.15, 添加 2 种水解产物浓度达 $1 \times \text{MIC}$ 时, OD_{600} 值降至 0.79 和 0.86, 浓度达 $2 \times \text{MIC}$ 时, OD_{600} 值降至 0.50 和 0.68。2 种水解产物可破坏大肠杆菌细胞膜, 达到较好的抑菌效果。而金黄色葡萄球菌对 3 种水解产物均不敏感, 抑菌效果较差。另外, 3 种水解产物均具有抗氧化活性, 它们对 DPPH 自由基清除能力分别达 0.5 倍 Trolox (水溶性维生素 E)、0.67 倍 Trolox、0.38 倍 Trolox。【结论】超滤可同时实现咸蛋清脱盐及富集不同目标蛋白的目的。目标蛋白酶解组分具备抗菌活性和抗氧化活性, 同时可作为一种营养添加剂, 提高了咸鸭蛋清的附加价值和利用率。

关键词: 咸鸭蛋清; 水解产物; 抗菌性; 抗氧化活性

基金项目: 安徽省重点研发项目(202004a06020022)

Supported by the Key Research and Development Program of Anhui Province (202004a06020022)

*Corresponding author. E-mail: caiweirong0781@163.com

Received: 21 March 2022; Revised: 22 April 2022; Published online: 14 June 2022

Antibacterial and antioxidant activities of pepsin hydrolysate from salted duck egg white

LI Jingjing, CAI Weirong*, LI Anqi, ZHU Ying, WANG Lu

College of Biological and Food Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, Anhui, China

Abstract: [Objective] To improve the comprehensive utilization of salted duck egg white, bioactive proteolytic products were prepared. [Methods] In this study, salted duck egg white was desalted and graded by ultrafiltration. The protein fractions of salted duck egg white within different molecular weight ranges were hydrolyzed by pepsin. The bacterial inhibition and antioxidant activities of the hydrolysates were determined *in vitro*, including the determination of minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), and cell membrane integrity. [Results] Three fractions of different molecular weights were obtained from salted duck egg white by ultrafiltration, which were fraction A with $M_w > 50$ kDa, fraction B with $50 \text{ kDa} > M_w > 20$ kDa and fraction C with $20 \text{ kDa} > M_w > 5$ kDa. Among them, the hydrolysates of fractions A and B had inhibitory effects on the growth of *Escherichia coli*. The MICs of the two fractions were $1\ 024 \mu\text{g/mL}$ and $2\ 048 \mu\text{g/mL}$, respectively, and the MBCs were both $2\ 048 \mu\text{g/mL}$. The OD_{600} value of *E. coli* was about 1.15 after entering the stationary phase. When the hydrolytic peptide was added at a concentration of $1 \times \text{MIC}$, the OD_{600} values of the bacterial solution in stationary phase decreased to 0.79 (A) and 0.86 (B), respectively. When the hydrolytic peptide was added at a concentration of $2 \times \text{MIC}$, the OD_{600} values decreased to 0.5 (A) and 0.68 (B), respectively. The two hydrolysates had good antibacterial effects, which were attributed to the destruction of *E. coli* cell membrane. However, *Staphylococcus aureus* was not sensitive to all three hydrolysates, and the inhibitory effect was poor. Moreover, the hydrolysates of fractions A, B and C all had antioxidant activities, and their scavenging ability against DPPH radicals reached 0.50, 0.67 and 0.38 times Trolox, respectively. [Conclusion] The salted duck egg white could be simultaneously desalted and enriched to obtain different target proteins by ultrafiltration. The hydrolysates of the obtained target proteins possessed antibacterial and antioxidant activities, and could be used as nutritional additives, which improved the added value and utilization of salted duck egg white.

Keywords: salted duck egg white; hydrolysate; antibacterial activity; antioxidant activity

咸鸭蛋清以蛋清蛋白为主，蛋白组成与新鲜鸭蛋清无异^[1]，所含不同蛋白组分具有不同生物活性^[2]；但因含盐量高，利用率较低，仅有少量被加工为添加剂或饲料^[3]。咸鸭蛋清的综合利用多集中于脱盐利用、分离咸鸭蛋清中的活性成分及酶解制备具有生物活性的蛋白肽等^[4]。其中，蛋白酶酶解蛋清制备活性肽，是目前的研究热点。如唐文婷等^[5]以卵白蛋白为原

料，酶解制备了具有抗菌及抗氧活性的蛋白肽；郑健^[6]以卵转铁蛋白为原料酶解制备抗菌肽；朱伶俐^[7]通过酶解蛋清制备得抗菌肽。

超滤技术通过膜孔大小对目标物进行不同分子量的脱分级，已被广泛地应用于食品加工工业中。如 Thammasena 等^[8]利用超滤对咸蛋清进行脱盐，实现蛋清不同分子量组分的分离；赵荣文等^[9]利用超滤获得溶菌酶；Jovanović 等^[10]

和 Xue 等^[11]利用超滤对酶解蛋清肽分级再结合液相技术以实现活性肽的分离纯化。

基于此, 本研究用超滤技术对咸鸭蛋清原料进行脱盐和分级, 采用胃蛋白酶对不同分级成分进行酶解, 评价各组分水解产物的抗菌活性、最低抑菌浓度、最低杀菌浓度、细菌细胞膜通透性及抗氧化活性, 旨在为提高咸鸭蛋清的综合利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

咸鸭蛋清, 取自市售生咸鸭蛋; 胃蛋白酶(pepsin, 3 000–3 500 NFU/mg), 合肥博美生物公司; LB 培养基、营养琼脂, 上海博微; PI 染色试剂盒, 上海生工生物; Trolox(水溶性维生素 E), 合肥博美有限公司; DPPH, 沃凯有限公司; 大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC 25922、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 6538, 北京生物保藏中心。

1.2 仪器

胶体磨, 南洋防爆电机有限公司; L550 离心机, 湘仪离心机有限公司; MultiskanFC 型酶标仪, 赛默飞世尔(上海)仪器有限公司; 真空冷冻干燥机, 松源华兴科技发展有限公司; PHSJ-5 雷磁 pH 计, 上海雷磁仪器厂; 陶瓷膜小试设备 5CeraMem0100, 厦门福美科技有限公司; 荧光倒置显微镜, 徕卡公司; HPLC 色谱系统, 安捷伦公司。

1.3 样品处理

样品预处理: 咸鸭蛋清洗表面后、擦干, 分离蛋清蛋黄, 蛋清经 3 层纱布过滤除去颗粒杂质, 经胶体磨(刻度调制 1 μm)均质化处理得到鲜咸蛋清, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏备用。

设置超滤参数为压力 0.3×10^4 Pa、流速 50 LPH、循环式超滤接冷凝水, 取 500 mL 均质后的咸蛋

清液稀释 10 倍, 50 kDa 膜管超滤至超滤最小体积, 该截留液为分子量大于 50 kDa 的组分 A。滤出液利用超纯水将体积补至 5 L, 经 20 kDa 膜管超滤至超滤最小体积, 该截留液为分子量在 20–50 kDa 的组分 B。滤出液补至 5 L, 经 5 kDa 膜管超滤至超滤最小体积, 该截留液为分子量在 5–20 kDa 的组分 C, 滤出液主要是咸蛋清中盐分。各组分冻干收集。各组分蛋白提取率为提取各组分蛋白质质量与咸蛋清蛋白的质量比。

1.3.1 咸蛋清不同组分蛋白水解产物的制备

取各组分蛋清粉超纯水底物浓度 4% 的溶液, 混匀后以 NaOH/HCl 调节 pH=2.0, 加入蛋白溶液中蛋白质量 1.0% 的胃蛋白酶, 40 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温酶解 2 h。水解结束后, 沸水浴 15 min 灭酶, 冷却后调节 pH 7.0, 4 000 r/min 离心 15 min, 取上清液冻干得不同组分水解产物^[6]。

采用三氯乙酸沉淀法(SN-TCA)测定水解度(degree of hydrolysis, DH)^[12], 取 5 mL 水解上清液加入等体积 10% 三氯乙酸(TCA)溶液, 混匀后静置 30 min, 4 000 r/min 离心 10 min, 测定上清液中氮含量。氮含量采用 GB/T5009.5-2016 测定(公式 1)。

$$DH(\%) = \frac{N_2 - N_1}{N_3 - N_1} \times 100 \quad (1)$$

式中, N_1 为水解前蛋清液中可溶性氮, mg/mL; N_2 为水解后上清液可溶性总氮, mg/mL; N_3 为蛋清液中总氮, mg/mL。

1.3.2 不同组分水解产物相对分子量测定

酶解样品配成溶液, 经 0.22 μm 滤膜过滤后采用 HPLC 测定相对分子量分布。

色谱条件: TSKgel 2000SWXL 柱(300 mm \times 7.8 mm, 5 μm); 流动相 A 为纯水(含 0.05% TFA), 流动相 B 乙腈溶液(含 0.05% TFA); 等度洗脱; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 流速: 0.5 mL/min; 检测波长为 220 nm。

1.3.3 不同组分水解产物抑菌性质的测定

大肠杆菌、金黄色葡萄球菌在 37 °C 振荡培养至对数期,制成 10⁶ CFU/mL 菌悬液,吸取 200 μL 菌悬液均匀涂布至 LB 琼脂培养基上。将不同组分水解产物分别配置成梯度浓度为 0.25、0.50、1.00、2.50、5.00 mg/mL 的溶液,以无菌水为空白对照,取 6 mm 的灭菌滤纸片分别浸泡于上述溶液中,取出置于含菌平板上,37 °C 培养箱倒置培养 16–20 h,培养结束后利用游标卡尺测定抑菌圈的直径^[5]。

1.3.4 最低抑菌浓度(MIC)及最低杀菌浓度(MBC)的测定

参考文献利用二倍稀释法对 MIC 进行测定^[13–14],将倍比稀释后不同浓度的咸蛋清肽溶液分别加到无菌的 96 孔板中,第 1 至第 11 孔加咸蛋清肽溶液,每孔 100 μL,第 12 孔不加蛋清肽作为空白对照。具体操作如下:配制咸蛋清肽浓度分别为 8 192、4 096、2 048、1 024、512、256、128、64、32、16、8 μg/mL 的 MIC 板,每孔含蛋清肽 100 μL。在此基础上,将用 LB 培养基培养的菌体调整 OD₆₀₀=0.5,按照体积比 1:100,将细菌培养物稀释,再吸取 100 μL 菌液添加至含蛋清肽的 MIC 板,并设置不含蛋清肽的生长对照。最后,以孔内完全抑制细菌生长的最低药物浓度为 MIC 值。

MBC 的测定:将含有不同蛋白肽浓度的菌悬液于 LB 固体培养基上培养 24 h,以不长菌落的浓度为该抑菌剂的最小杀菌浓度。

1.3.5 生长曲线测定

生长曲线用于评估蛋清肽的抑菌作用,通过抑菌圈实验及 MIC 测定的数据,实验设置 3 个浓度处理大肠杆菌(ATCC 25922): 0×MIC、1×MIC、2×MIC。取适量培养至对数期的大肠杆菌菌悬液,分别加入 3 种浓度的蛋清肽,于 37 °C 的振荡培养箱(220 r/min)中培养。每 2 h 用酶标仪测定上清液在 600 nm 波长处的吸光

度,所有测量进行 3 次,其中 0×MIC 组的曲线为大肠杆菌的生长曲线^[15]。

1.3.6 蛋白水解产物对细胞膜通透性的影响

取过夜培养的菌液 10 mL 离心,用 PBS (pH=7.0)洗涤菌体 2 次后离心去上清,重新悬浮,分别添加咸鸭蛋清水解产物,使其最终浓度分别达到 1×MIC 和 2×MIC,以无菌液体培养基为空白对照组,37 °C 摇床振荡培养 4 h 后,吸收 100 μL 样液常温下加入 PI 避光染色 30 min,在荧光倒置显微镜下观察细菌染色情况^[15]。

1.3.7 蛋白水解产物的体外自由基清除能力

DPPH 清除率测定^[16]:在 96 孔酶标板中每孔中先后加入样品 100 μL 和 0.5 mmol/L DPPH 甲醇溶液 100 μL,室温下,暗处反应 30 min,517 nm 处检测吸光度,记作实验组 A_s;以甲醇溶液替代 DPPH 甲醇溶液,记作对照组 A_c;以甲醇替代样品,记作空白组 A_b(公式 2)。

$$\text{自由基清除率}(\%) = \frac{A_b - (A_s - A_c)}{A_b} \times 100 \quad (2)$$

1.4 统计分析

图表绘制采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件完成,数据采用 SPSS 25.0 进行统计,差异性显著采用 ANOVA 分析,结果以平均值±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 咸鸭蛋清各组分提取率

蛋清的几种主要组分蛋白分子量分别为:卵类粘蛋白(约 110 000 Da)、卵转铁蛋白(76 000–80 000 Da)、卵白蛋白(约 45 000 Da)、卵类粘蛋白(约 28 000 Da)、溶菌酶(14 000–14 600 Da)^[17]。根据分子量判断,3 种组分蛋白提取率分别为 65.20%、15.50%、1.80%,各组分占比差异较大,组分 A 主要包含卵转铁蛋白,组分 B 主要包含卵白蛋白,组分 C 主要以蛋清中活性小分子蛋白溶菌酶为主,卵白蛋白是蛋清主要成分,约占蛋清 50%–60%,因此,组分 B

提取率最高(表 1)。且经 5kDa 膜管超滤, 咸鸭蛋清盐分大部分被脱除, 3 种组分所得水解产物水解度分别为 14.82%、15.95%、17.61%。

2.2 咸鸭蛋清各组分水解产物相对分子量

为判断水解产物活性肽分布范围, 测定 3 种组分水解产物相对分子量。从图 1 中可明显看出,

表 1 3 种超滤组分的蛋白提取率

Table 1 Extraction rates of protein from three ultrafiltration fraction

| Samples | Molecular weight/kDa | Protein extraction/% | DH/% |
|------------|----------------------|----------------------|------------|
| Fraction A | >50 | 65.20±1.10 | 14.82±0.21 |
| Fraction B | 20–50 | 15.50±0.25 | 15.95±0.73 |
| Fraction C | 5–20 | 1.80±0.13 | 17.61±0.11 |

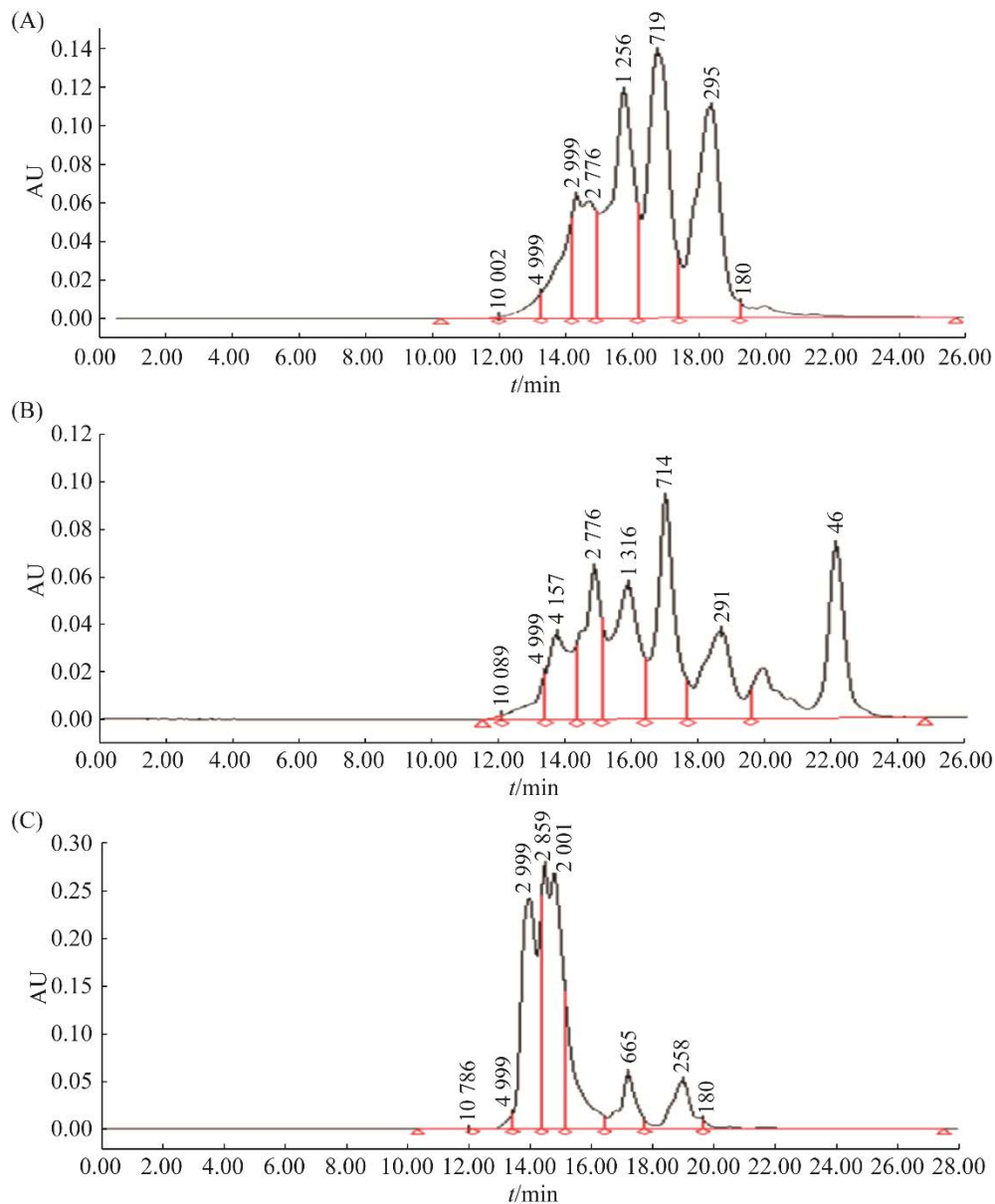


图 1 不同水解产物的相对分子量分布图

Figure 1 Relative molecular weight distribution of different hydrolysates. A: fraction A; B: fraction B; C: fraction C.

3个组分分子量大多集中在5 kDa以下,组分B的酶解产物还含有游离氨基酸,肽的分子量大小可能影响其功能特性。这也与已发表研究中,具有抗氧化活性的肽分子量一般在1–2 kDa或更小^[18],具有抗菌活性的肽一般由12–100个氨基酸组成,分子质量小于10 kDa^[19]的观点一致。

2.3 不同组分水解产物抑菌活性检测结果

在图2中,0号为空白对照,1、2、3、4、5号样品浓度分别为0.25、0.50、1.00、2.50、5.00 mg/mL。图中可以看出咸鸭蛋清的水解产物对大肠杆菌有较为明显的抑菌圈,对金黄色葡萄球菌无明显的抑菌作用。有抑菌效果的组分A和组分B在不同浓度下对大肠杆菌的抑菌圈直径见表2,2种组分的抑菌圈直径均随浓度上升而增加,当样品浓度达5 mg/mL时,组分A抑菌圈直径为(12.87±0.42) mm,组分B抑菌圈为(10.47±0.91) mm,有较好的抑菌效果。组分

A和组分B对大肠杆菌(G^-)有较好的抑菌效果,而对金黄色葡萄球菌(G^+)抑菌效果较差。组分C水解产物对2种菌抑制作用均较差,可能是由于预处理及反复超滤使得组分C中目标蛋白溶菌酶有所流失,酶解后所得肽段不具备抗菌能力。

在Wang等^[20]的研究中,发现天然抗菌肽可直接作用于细胞膜,与脂多糖结合,增加细胞膜通透性,导致细胞膜破裂和细菌死亡。革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌细菌膜结构不论是分子组成和分层形态上均有差异,阴性菌膜外层有特有的脂质物质^[21]。Ibrahim等^[22]也证实了卵转铁蛋白酶解得到的抗菌肽可以穿越大肠杆菌外膜并破坏细胞膜的生物功能,致大肠杆菌死亡。Kobayashi等^[23]所得的酶解蛋源抗菌肽能与大肠杆菌特异结合,起到抑制大肠杆菌生长的作用。在其他蛋清源抗菌肽的研究中,唐文婷等^[5]的研究中也发现蛋清肽对大肠杆菌及沙

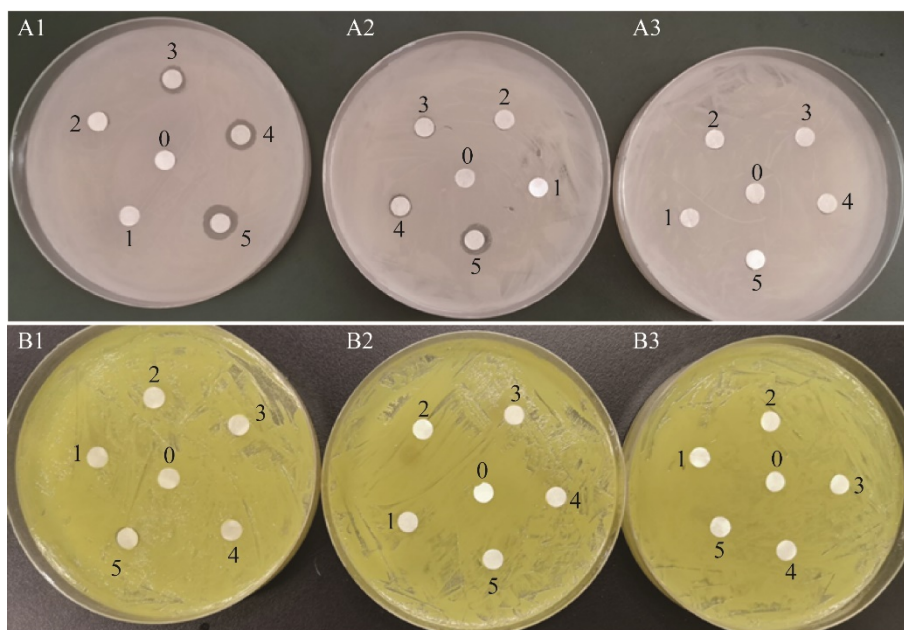


图2 不同水解产物的体外抑菌活性检测

Figure 2 *In vitro* antibacterial activity assay of different hydrolysates. A1: fraction A (*Escherichia coli*); A2: fraction B (*Escherichia coli*); A3: fraction C (*Escherichia coli*); B1: fraction A (*Staphylococcus aureus*); B2: fraction B (*Staphylococcus aureus*); B3: fraction C (*Staphylococcus aureus*).

表 2 水解产物对大肠杆菌的抑制活性
Table 2 Inhibitory activity of the hydrolysates against *Escherichia coli*

| Concentration/ (mg/mL) | Diameter of inhibition zone for <i>Escherichia coli</i> /mm | |
|---------------------------|--|------------|
| | Fraction A | Fraction B |
| 0.00 | 0 | 0 |
| 0.25 | 0 | 0 |
| 0.50 | 6.06±0.12 | 0 |
| 1.00 | 8.73±0.68 | 6.50±0.30 |
| 2.50 | 10.00±0.21 | 7.20±0.26 |
| 5.00 | 12.87±0.42 | 10.47±0.91 |

门氏菌(G⁻)的抑菌效果明显, 对大肠杆菌抑菌效果显著, 郑健^[6]酶解卵转铁蛋白制备抗菌肽也得到相似结论。早期的研究中也验证得到卵转铁蛋白对多种细菌具有抗菌性但对金黄色葡萄球菌不敏感。因此猜测蛋清蛋白酶解多肽对革兰氏阴性菌具有更高的抑制活性。

2.4 最低抑菌浓度(MIC)及最低杀菌浓度(MBC)

不同浓度下, 3 种水解产物对金黄色葡萄球菌抑制结果见表 3, 对大肠杆菌抑制结果见表 4, 结果表明, 相对于另外 2 种组分, 组分 A 对大肠杆菌抑制效果最好, 其 MIC 值为 1 024 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 组分 B 的 MIC 值为 2 048 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、组分 C 的 MIC 值为 4 096 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在抑菌活性实验中添加水解产物浓度为 5 mg/mL 时, 对金黄色葡萄球菌抑菌圈试验效果仍然不明显。而设置 3 种组分水解产物对黄色葡萄球菌的 MIC 测定浓度均高于大肠杆菌抑菌浓度, 较高浓度下 3 种水解产物添加后仍有金黄色葡萄球菌生长, 总体来说对金黄色葡萄球菌抑菌活性较差。从蒋雨晴^[24]、方军^[25]等的研究中可以知道卵白蛋白、卵转铁蛋白水解产物对金黄色葡萄球菌不敏感, 与本研究结果相似。因此, 后续的实验中主要测定蛋清蛋白酶解多肽对大肠杆菌的抑制效果。

表 3 不同水解产物对金黄色葡萄球菌的 MIC 测定结果

Table 3 Results of MIC determination of different hydrolysates on *Staphylococcus aureus*

| Concentration/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | <i>Staphylococcus aureus</i> | | |
|---|------------------------------|------------|------------|
| | Fraction A | Fraction B | Fraction C |
| 16 384 | + | + | ++ |
| 8 192 | + | + | ++ |
| 4 096 | ++ | + | ++ |
| 2 048 | ++ | ++ | ++ |
| 1 024 | ++ | ++ | ++ |
| 512 | ++ | ++ | ++ |
| 256 | ++ | ++ | ++ |
| 128 | ++ | ++ | ++ |
| 64 | ++ | ++ | ++ |
| 32 | ++ | ++ | ++ |
| 16 | ++ | ++ | ++ |

-: sterile growth; +: a small amount of bacteria growth; ++: a large amount of bacteria growth.

表 4 不同水解产物对大肠杆菌的 MIC 测定结果

Table 4 Results of MIC determination of different hydrolysates on *Escherichia coli*

| Concentration/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | <i>Escherichia coli</i> | | |
|---|-------------------------|------------|------------|
| | Fraction A | Fraction B | Fraction C |
| 4 096 | - | - | - |
| 2 048 | - | - | + |
| 1 024 | - | + | ++ |
| 512 | + | ++ | ++ |
| 256 | + | ++ | ++ |
| 128 | ++ | ++ | ++ |
| 64 | ++ | ++ | ++ |
| 32 | ++ | ++ | ++ |
| 16 | ++ | ++ | ++ |
| 8 | ++ | ++ | ++ |
| 4 | ++ | ++ | ++ |

-: sterile growth; +: a small amount of bacteria growth; ++: a large amount of bacteria growth.

3 种组分对大肠杆菌的 MBC 测定结果见表 5, 从表可知, 组分 A 和组分 B 的 MBC 均为 2 048 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 组分 C 的 MBC 为 8 192 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 与 MIC 测定结果相符。综合上述结果, 我们可以看出对大肠杆菌抑制效果上, 组分 A 的效果

表 5 不同水解产物对大肠杆菌的 MBC 测定结果
Table 5 Results of MBC determination of different hydrolysates on *Escherichia coli*

| Concentration/($\mu\text{g}/\text{mL}$) | MIC | MBC |
|---|-------|-------|
| Fraction A | 1 024 | 2 048 |
| Fraction B | 2 048 | 2 048 |
| Fraction C | 4 096 | 8 192 |

最好, 组分 B 次之, 组分 C 最差。这也与我们抑菌活性的检测结果相符合(图 2)。

2.5 生长曲线

为了进一步探究咸蛋清肽的抗菌活性, 对抑菌效果较好的组分 A 和组分 B 进行生长曲线的测定(图 3)。细菌生长曲线显示, 随着培养时间延长, 对照组($0\times\text{MIC}$)的细菌数量快速增加, 并在 18–20 h 进入稳定期, OD_{600} 值约为 1.15, 整体呈现典型 S 型增长。组分 A 和组分 B 的抑菌活性呈剂量依赖性, 当 2 种组分水解产物添加浓度达到 $1\times\text{MIC}$ 时, 细菌生长速率均下降, 生长被抑制, 细菌对数生长期延长至 20 h, 20 h 后才进入稳定期, 稳定期 OD_{600} 值较对照组分别降至 0.79 和 0.86, 组分 B 的抑菌效果略低于

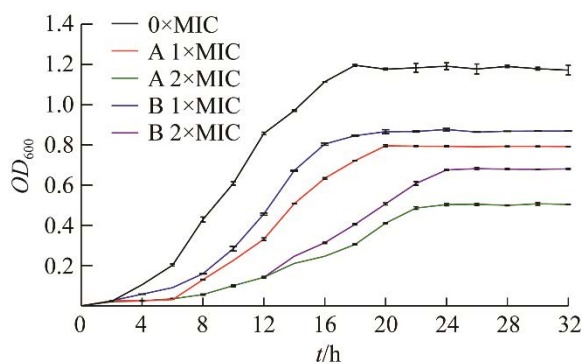


图 3 不同浓度添加下咸鸭蛋清肽对大肠杆菌生长曲线的影响

Figure 3 Effect of different concentrations of salted duck egg white peptide on the growth curve of *Escherichia coli*. Error bars indicate the standard deviation of the means ($n=3$).

组分 A。当添加浓度达到 $2\times\text{MIC}$ 时, 细菌生长受到抑制, 最大生长速率降低, 细菌生长至 24 h 才进入稳定期。稳定期 OD_{600} 值较对照组分别降至 0.50 和 0.68。

由此表明, 2 种水解产物抑菌作用主要在对数生长期, 达稳定期后对微生物生长周期影响不大^[26]。2 种水解产物处理下生长趋势几乎相同, 但从 OD_{600} 值变化上能明显看出, 组分 A 能更有效地抑制大肠杆菌的生长。添加浓度达 $2\times\text{MIC}$ 时即 MBC, 细菌的抑菌曲线有较明显的变化, 培养 24 h 才进入稳定期, 可能是达到一定浓度破坏了细菌的生长规律。在一些关于抑菌剂对菌体生长曲线影响的报道中, 如宋丽雅等^[26]研究了花椒提取物对细菌的抑制, 发现抑菌作用主要在细菌的对数生长期; 曹阳阳^[27]的研究中收集了不同大肠杆菌生长曲线数据, 也得到在对数期抑菌剂杀菌效果最好的结论。

2.6 对细胞膜完整性的影响

PI 是一种只能透过受损细胞膜的核酸染料, 细菌死亡时细胞膜受损, PI 能透过细胞膜使膜内核酸 DNA 染色, 呈红色的荧光^[15]。根据对细胞膜完整性进一步判断其抑菌性能。图 4 中, A、B、C 分别为添加组分 A 浓度在 $0\times\text{MIC}$ 、 $1\times\text{MIC}$ 及 $2\times\text{MIC}$ 的荧光显微镜观察抑菌处理大肠杆菌的图片, D、E、F 分别为添加组分 B 浓度在 $0\times\text{MIC}$ 、 $1\times\text{MIC}$ 及 $2\times\text{MIC}$ 下荧光显微镜观察抑菌处理大肠杆菌的图片。

A、D 为对照组图片($0\times\text{MIC}$), 4 h 培养后并无细菌死亡, 受损坏死细胞很少。在经 $1\times\text{MIC}$ 及 $2\times\text{MIC}$ 水解产物处理后, 有明显红色荧光, 且随浓度上升, 细菌死亡数目增多, B、C 中染色数目较 E、F 密集, 组分 A 处理下细菌死亡数目更多, 组分 A 所得水解产物对大肠杆菌抑制效果更明显。所得结论也与 2 种水解产物对

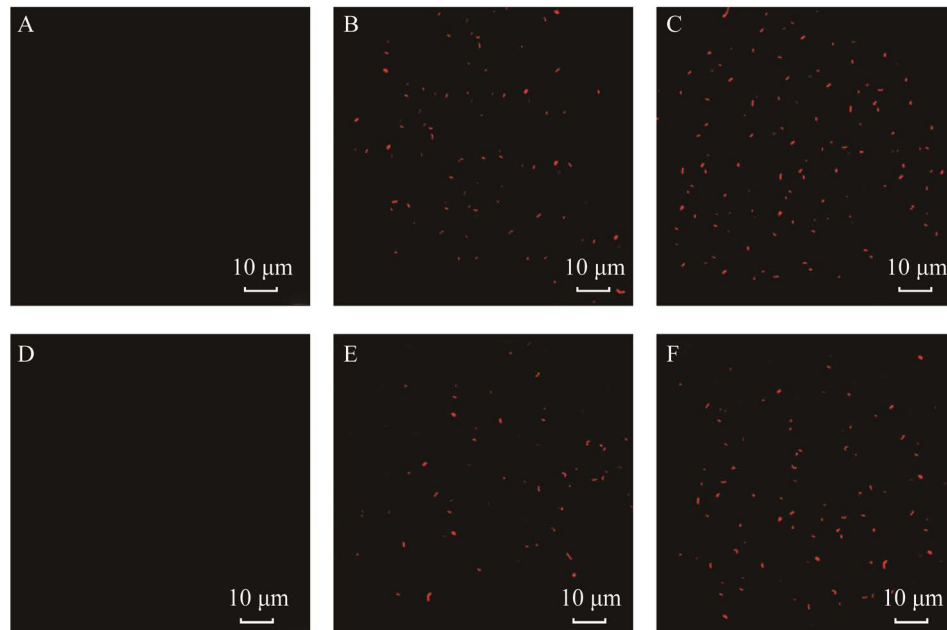


图 4 不同水解产物对大肠杆菌细胞膜完整性的影响

Figure 4 Effect of different hydrolysates on cell membrane integrity of *Escherichia coli*. A: fraction A (0×MIC); B: fraction A (1×MIC); C: fraction A (2×MIC); D: fraction B (0×MIC); E: fraction B (1×MIC); F: fraction B (2×MIC).

大肠杆菌生长曲线抑制结论一致。在一些关于蛋源肽抑菌的研究中, Lv 等^[28]的研究发现, 杂合肽可通过透过细菌细胞膜破坏膜完整性导致细菌死亡; 蒋雨晴等^[24]发现, 卵白蛋白水解产物具有良好地抑制革兰氏阴性菌的作用, 且对大肠杆菌细胞膜通透性影响最为明显; Ibrahim 等^[22]在实验中所获得的蛋源抗菌肽可以穿越大肠杆菌外膜并破坏细胞膜的生物功能, 致大肠杆菌死亡。因此, 结合上述实验推测, 本研究获得的蛋清源肽通过抑制大肠杆菌的生长, 破坏大肠杆菌细胞膜的完整性, 来达到抑菌的目的。

2.7 不同水解产物的自由基清除能力

蛋白经酶解后可能具有多种生物活性, 蛋清是制备生物活性肽的重要原料之一, 蛋清酶解物多具备抗氧化活性、抗菌等生物活性^[29]。图 5 中可看出, 3 种不同分子量蛋白组分的水解产物均具有 DPPH·清除能力, 且随浓度上升

而提高。以食品中常见抗氧化剂 Trolox 为对照组, 样品浓度一致时水解产物对 DPPH·清除能力虽低于 Trolox, 但 3 种水解产物清除能力分别可达到 Trolox 的 0.50 倍、0.67 倍和 0.38 倍, 均具有一定的抗氧化活性。

其中, 组分 B 水解产物的 DPPH·清除能力在各浓度下均优于其他组分, 可能是由于组分 B 中含有蛋清蛋白含量最高的成分卵白蛋白, 且根据水解产物分子量可看出, 组分 B 水解产物小于 1 kDa 分子量的肽段占比较多, 已有研究证实, 具有抗氧化活性的肽段分子量均较小。且王倩等^[30]的研究中证实, 卵清蛋白即卵白蛋白本身就具有一定抗氧化能力, 在酶解作用下, 可获得抗氧化效果更好的蛋白肽。在蛋源抗氧化肽的研究中, 发现胃蛋白酶水解所得杂肽具有自由基清除能力, 如秦婧^[31]利用胃蛋白酶水解卵白蛋白, 所得水解产物具有较优的 DPPH 自

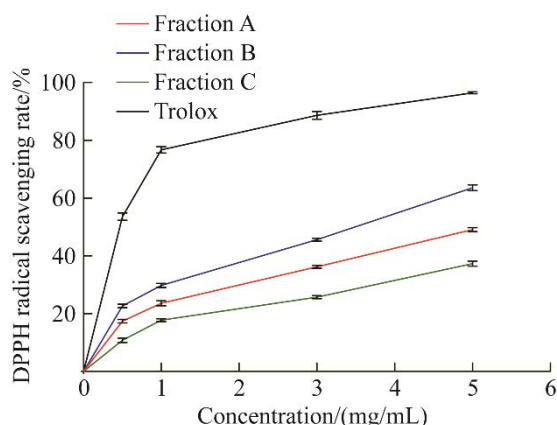


图5 不同水解产物的 DPPH·清除能力
Figure 5 DPPH· scavenging ability of different hydrolysates. Error bars indicate the standard deviation of the means ($n=3$).

由基清除能力；薛海燕等^[32]优化了胃蛋白酶的水解条件，得到具有较高自由基清除能力的蛋白肽。本研究通过胃蛋白酶水解 3 种不同分子量的蛋清，酶解所得的水解杂肽也具备一定的抗氧化活性。

3 结论

本研究利用超滤对咸蛋清进行脱盐并分级，根据分子量分级并富集了不同目标蛋白，对不同目标蛋白水解得到多种杂肽。得到以下结果，本研究采用胃蛋白酶对咸鸭蛋清不同分子量的蛋白组分进行酶解，发现 3 种不同分子量的组分中，组分 A ($M_w > 50$ kDa)和组分 B (50 kDa $> M_w > 20$ kDa)所得水解产物能有效地抑制大肠杆菌的生长，MIC 分别为 $1\ 024\ \mu\text{g/mL}$ 和 $2\ 048\ \mu\text{g/mL}$ ，MBC 均为 $2\ 048\ \mu\text{g/mL}$ 。2 种水解产物可通过破坏大肠杆菌细胞膜达到抑菌目的。以上 2 种组分水解产物及组分 C (20 kDa $> M_w > 5$ kDa)的水解产物，3 种水解产物对金黄色葡萄球菌抑制效果均较差，猜测蛋清蛋白酶解多肽对革兰氏阴性菌具有更高的抑制活性。此

外，3 种水解产物均有自由基清除能力，清除能力达 0.5 倍 Trolox、0.67 倍 Trolox、0.38 倍 Trolox。

本研究以市售咸鸭蛋清作为原料加工处理，超滤富集了不同目标蛋白，提高废弃蛋清资源的综合利用，所得杂肽不仅具有抗菌活性和抗氧化活性，同时还可以作为一种营养添加剂，提高咸鸭蛋清的附加价值和利用率，在蛋类资源加工副产物处理方面有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] Kaewmancee T, Benjakul S, Visessanguan W. Effect of salting processes on chemical composition, textural properties and microstructure of duck egg. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2009, 89(4): 625–633.
- [2] 王明媚. 咸鸭蛋清的超滤脱盐及脱盐蛋清功能性质的研究. 江南大学硕士学位论文, 2009.
- [3] Xiao N, Huang X, He W, Yao Y, Wu N, Xu M, Du H, Zhao Y, Tu Y. A review on recent advances of egg byproducts: preparation, functional properties, biological activities and food applications. *Food Research International: Ottawa, Ont*, 2021, 147: 110563.
- [4] 李逢振. 咸蛋清资源化综合利用的研究. 农产品加工, 2020(5): 85–86, 90.
Li FZ. Study on the comprehensive utilization of salted egg white. *Farm Products Processing*, 2020(5): 85–86, 90. (in Chinese)
- [5] 唐文婷, 张晖, 王立, 钱海峰. 卵白蛋白水解产物的抗菌性及抗氧化性. 食品与生物技术学报, 2014, 33(3): 241–247.
Tang WT, Zhang H, Wang L, Qian HF. Antimicrobial and antioxidant activities of ovalbumin hydrolyzate. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2014, 33(3): 241–247. (in Chinese)
- [6] 郑健. 卵转铁蛋白抗菌活性肽的制备及其抑菌活性的研究. 吉林大学硕士学位论文, 2011.
- [7] 朱伶俐. 溶菌酶抗菌肽的制备、分离与鉴定. 江南大学硕士学位论文, 2012.
- [8] Thammasena R, Fu CW, Liu JH, Liu DC. Evaluation of nutrient content, physicochemical and functional properties of desalted duck egg white by ultrafiltration

- as desalination. *Animal Science Journal*, 2020, 91(1): e13339.
- [9] 赵荣文, 谭丽萍, 刘同军. 溶菌酶及其应用研究进展. 齐鲁工业大学学报, 2021, 35(1): 12–18.
Zhao RW, Tan LP, Liu TJ. Research progress of lysozyme and its application. *Journal of Qilu University of Technology*, 2021, 35(1): 12–18. (in Chinese)
- [10] Jovanović J, Stefanović A, Žuža M, Jakovetić S, Šekuljica N, Bugarski B, Knežević-Jugović Z. Improvement of antioxidant properties of egg white protein enzymatic hydrolysates by membrane ultrafiltration. *Hemjska Industrija*, 2016, 70(4): 419–428.
- [11] Xue H, Wang J, Xie J, Xiong C, Li J, Tu Y, Zhao Y. Isolation, purification, and structure identification of antioxidant peptides from embryonated eggs. *Poultry Science*, 2019, 98(6): 2360–2370.
- [12] 李皖光, 汪桃花, 王新文, 季一顺. 4 种大米蛋白水解度测定方法比较. 粮食科技与经济, 2017, 42(5): 35–37.
Li WG, Wang TH, Wang XW, Ji YS. The comparison of four methods in testing degree of hydrolysis. *Grain Science and Technology and Economy*, 2017, 42(5): 35–37. (in Chinese)
- [13] 胡欢, 左国营, 张泽萍. 36 种中药材体外抗菌活性筛选研究. 广西植物, 2018, 38(4): 428–440.
Hu H, Zuo GY, Zhang ZP. Screening of antimicrobial activities of 36 Chinese herbal medicines *in vitro*. *Guihaia*, 2018, 38(4): 428–440. (in Chinese)
- [14] 王玲, 郭志廷, 杨峰, 王文莉, 莫亚霞, 郭爱民, 罗小琴, 魏小娟, 吕亚楠. 中药常山散的体外抑菌作用研究. 中国畜牧兽医, 2017, 44(2): 594–600.
Wang L, Guo ZT, Yang F, Wang WL, Mo YX, Guo AM, Luo XQ, Wei XJ, Lü YN. Bacteriostatic test *in vitro* of traditional Chinese medicine *Radix Dichroa* powder on common pathogens. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2017, 44(2): 594–600. (in Chinese)
- [15] 张添菊. 植物源抑菌剂抗食源性致病菌活性及机理研究. 南京师范大学硕士学位论文, 2017.
- [16] Li X. Comparative study of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH·) scavenging capacity of the antioxidant xanthenes family. *Chemistry Select*, 2018, 3(46): 13081–13086.
- [17] Abeyrathne EDNS, Huang X, Ahn DU. Antioxidant, angiotensin-converting enzyme inhibitory activity and other functional properties of egg white proteins and their derived peptides – a review. *Poultry Science*, 2018, 97(4): 1462–1468.
- [18] 黄明, 王璐莎. 动物蛋白源抗氧化肽的研究进展. 中国农业科学, 2013, 46(22): 4763–4773.
Huang M, Wang LS. A review of the antioxidant peptides derived from animal protein. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(22): 4763–4773. (in Chinese)
- [19] 王俊杰, 赵燕, 涂勇刚, 罗序英, 李建科, 杨有仙, 邓文辉. 蛋源性抗菌肽的研究进展. 食品科学, 2013, 34(9): 399–403.
Wang JJ, Zhao Y, Tu YG, Luo XY, Li JK, Yang YX, Deng WH. Research progress on antimicrobial peptides derived from egg protein. *Food Science*, 2013, 34(9): 399–403. (in Chinese)
- [20] Wang C, Shao C, Fang Y, Wang J, Dong N, Shan A. Binding loop of sunflower trypsin inhibitor 1 serves as a design motif for proteolysis-resistant antimicrobial peptides. *Acta Biomaterialia*, 2021, 124: 254–269.
- [21] 单安山, 田昊天, 邵长轩, 谭鹏, 来振衡. 抗菌肽抗细菌机理研究进展. 东北农业大学学报, 2018, 49(3): 84–94.
Shan AS, Tian HT, Shao CX, Tan P, Lai ZH. Research advance on antibacterial mechanism of antimicrobial peptides. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2018, 49(3): 84–94. (in Chinese)
- [22] Ibrahim HR, Sugimoto Y, Aoki T. Ovotransferrin antimicrobial peptide (OTAP-92) kills bacteria through a membrane damage mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2000, 1523(2/3): 196–205.
- [23] Kobayashi K, Hattori M, Hara-Kudo Y, Okubo T, Yamamoto S, Takita T, Sugita-Konishi Y. Glycopeptide derived from hen egg ovomucin has the ability to bind enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(18): 5740–5746.
- [24] 蒋雨晴, 迟玉杰. 卵白蛋白源抗菌肽的分离纯化与结构鉴定. 食品与机械, 2019, 35(7): 1–6, 86.
Jiang YQ, Chi YJ. Isolation, purification and identification of antimicrobial peptides from ovalbumin. *Food & Machinery*, 2019, 35(7): 1–6, 86. (in Chinese)
- [25] 方军. 鸡蛋孵化早期蛋清抗微生物特点及其作用机制. 华中农业大学博士学位论文, 2012.
- [26] 宋丽雅, 倪正, 樊琳娜, 李婷, 于群. 花椒抑菌成分提取方法及抑菌机理研究. 中国食品学报, 2016, 16(3): 125–130.
Song LY, Ni Z, Fan LN, Li T, Yu Q. Antibacterial effect and extraction method from Chinese prickly ash.

- Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2016, 16(3): 125–130. (in Chinese)
- [27] 曹阳阳. 细菌生长曲线的模型拟合及聚类分析. 华东师范大学硕士学位论文, 2020.
- [28] Lv Y, Wang J, Gao H, Wang Z, Dong N, Ma Q, Shan A. Antimicrobial properties and membrane-active mechanism of a potential α -helical antimicrobial derived from cathelicidin PMAP-36. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86364.
- [29] 张燕, 魏汝君, 潘风光, 刘珍, 王寒松, 刘静波. 蛋清源活性肽抗氧化及抗炎活性. *食品科学*, 2018, 39(13): 153–158.
Zhang Y, Wei RJ, Pan FG, Liu Z, Wang HS, Liu JB. Antioxidant and anti-inflammatory effects of bioactive peptides derived from egg white proteins. *Food Science*, 2018, 39(13): 153–158. (in Chinese)
- [30] 王倩, 贺萍, 林如歌, 曾凡珂, 刘琪, 赖富饶, 张晓元, 吴晖. 鸭蛋卵清蛋白的结构、组成分析及其功能活性研究. *食品工业科技*, 2020, 41(8): 67–73.
Wang Q, He P, Lin RG, Zeng FK, Liu Q, Lai FR, Zhang XY, Wu H. Structure, composition analysis and functional activity of duck egg ovalbumin. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(8): 67–73. (in Chinese)
- [31] 秦婧. 卵白蛋白源抗氧化活性肽的酶法制备及分离鉴定. 陕西科技大学硕士学位论文, 2014.
- [32] 薛海燕, 王战勇, 宋宏新, 李珊. 卵清蛋白水解及抗氧化肽制备工艺研究. *陕西科技大学学报: 自然科学版*, 2016, 34(3): 126–131.
Xue HY, Wang ZY, Song HX, Li S. Preparation and antioxidant activity of peptides derived from ovalbumin. *Journal of Shaanxi University of Science & Technology: Natural Science Edition*, 2016, 34(3): 126–131. (in Chinese)