DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250722001
引用格式: 蒋慧亮, 吴平, 刘萍, 等. 超声波辅助酶解法提取鲫鱼鱼鳞抗菌肽工艺优化[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(1): 287–294.
JIANG HL, WU P, LIU P, *et al*. Optimization of the extraction process of antibacterial peptides from *Carassius auratus* scales by ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(1): 287–294. (in Chinese with English abstract).

超声波辅助酶解法提取鲫鱼鱼鳞抗菌肽工艺优化

蒋慧亮[1], 吴　平[1], 刘　萍[1*], 姚媛媛[2], 张　震[1]

(1. 江苏农牧科技职业学院食品与健康学院, 泰州　225300; 2. 南京卡文思检测技术有限公司, 南京　210000)

摘　要: 目的　优化鲫鱼鱼鳞抗菌肽的超声波辅助酶解提取工艺。**方法**　本研究以对大肠杆菌的抑菌圈直径和多肽回收率为评价指标, 对比分析胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和中性蛋白酶对鲫鱼鱼鳞的酶解效果, 筛选最佳酶解用酶。通过单因素实验, 系统分析底物浓度、酶活力、酶解时间和超声波功率对鱼鳞抗菌肽提取效果的影响, 在此基础上, 选择酶活力、酶解时间和超声波功率 3 个关键因素进行正交优化实验。**结果**　胃蛋白酶为最佳酶解用酶, 在底物质量浓度 200 mg/mL、酶解时间 4 h、超声波功率 120 W、酶活力 5000 U/g 的酶解工艺下, 获得的抗菌肽抑菌效果最佳, 对大肠杆菌的抑菌圈直径可达(2.66±0.66) cm, 多肽回收率为 22.52%±1.64%。**结论**　采用超声波辅助酶解得到鲫鱼鱼鳞抗菌肽液为后续的抗菌肽分离、纯化及提取提供了重要的理论基础。

关键词: 鲫鱼鱼鳞; 超声波; 酶解; 抗菌肽

Optimization of the extraction process of antibacterial peptides from *Carassius auratus* scales by ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis

JIANG Hui-Liang[1], WU Ping[1], LIU Ping[1*], YAO Yuan-Yuan[2], ZHANG Zhen[1]

(1. *School of Food Science and Health*, *Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College*, *Taizhou* 225300, *China*; 2. *Nanjing Cavendish Testing Technology Co*., *Ltd*., *Nanjing* 210000, *China*)

ABSTRACT: Objective　To optimize ultrasonic assisted enzymatic extraction of antimicrobial peptides from *Carassius auratus* scales. **Methods**　In this study, the diameter of inhibition zone against *Escherichia coli* and peptide recovery rate were used as evaluation indicators. The enzymatic effects of pepsin, trypsin, papain, and neutral protease on *Carassius auratus* scales were compared and analyzed to screen the optimal enzyme for enzymolysis. Through single-factor experiments, the effects of substrate concentration, enzyme activity, enzymolysis time, and ultrasonic power on the extraction efficiency of antimicrobial peptides from crucian carp scales were systematically analyzed. On this basis, three key factors (enzyme activity, enzymolysis time, and ultrasonic power) were selected for orthogonal optimization experiments. **Results**　Pepsin was identified as the optimal enzyme for enzymolysis. Under

收稿日期: 2025-07-22
基金项目: 泰州市科技支撑计划(农业)项目(TN202220); 江苏农牧科技职业技术学院科研项目(NSF2022ZR12)
第一作者: 蒋慧亮(1987—), 女, 硕士, 副教授, 主要研究方向为水产品加工和保鲜。E-mail: 408631798@qq.com
***通信作者:** 刘萍(1982—), 女, 博士, 教授, 主要研究方向为功能性食品研究。E-mail: 12404989@qq.com

the enzymatic hydrolysis process with a substrate mass concentration of 200 mg/mL, enzymatic hydrolysis time of 4 h, ultrasonic power of 120 W, and enzyme activity force of 5000 U/g, the antibacterial effect of the obtained antimicrobial peptide was the best, with a inhibition zone diameter of (2.66±0.66) cm against *Escherichia coli* and a short peptide recovery rate of 22.52%±1.64%. **Conclusion** The ultrasonic assisted enzymatic extract of antimicrobial peptides from *Carassius auratus* scales provides a critical theoretical foundation for subsequent separation and purification.

KEY WORDS: *Carassius auratus* scales; ultrasonic wave; enzymatic hydrolysis; antimicrobial peptides

0 引 言

抗菌肽是一类广泛存在于水产品类和其他动植物体内的天然活性多肽, 具有分子量小(通常小于 5 kDa, 氨基酸残基数小于 100 个)、生物活性强、功能谱广以及广谱杀菌等特点[1−2]。作为带正电荷的生物活性肽, 抗菌肽在多数生物体的先天免疫防御系统中发挥了关键作用, 是抵御外界病原微生物入侵的首要屏障[3]。已有大量研究证实抗菌肽的高效抑菌活性, 徐宇辰等[4]从杂交斑纹鲈鱼中提取的抗菌肽对腐败希瓦氏菌有显著的抑菌效果, 李若冰等[5]从酒糟大黄鱼中分离获得的抗菌肽对食源性致病菌副溶血性弧菌表现出良好的抑制效果。这些研究进一步验证了抗菌肽对微生物有很好的抑制效果。

我国是水产养殖大国, 在鱼类和水产品加工中会产生大量的副产物(如鱼鳞、鱼皮、鱼骨等)。这些副产物若得不到合理的处置, 不但会对生态环境造成污染, 还会危害人体健康[6]。然而, 已有研究证实, 鱼类副产物中富含丰富的蛋白质和肽类物质, 在功能性食品开发、天然药物研发等领域具有显著的潜在应用前景[7]。其中鱼类来源的抗菌肽因其具有低分子量、良好的耐热性、广泛的抗菌能力以及不易产生耐药性等优势, 不仅可发挥免疫保护功能, 还展现出良好的医药应用前景[6]。因此近年来成为天然活性肽领域的研究热点, 已有多种鱼类抗菌肽被成功提取并开展功能研究。在抗菌肽的诸多提取方法中, 酶解法因能高效降解蛋白原料并定向获得活性肽, 是目前制备蛋白水解物及抗菌肽最常用的方法。例如, 李远慧等[8]以舟山带鱼为原料, 采用复合酶解法制备得到稳定性较好的带鱼蛋白抗菌肽; 此外, 研究者还先后利用不同的蛋白酶从鲤鱼[9]、黄姑鱼[10]、金鲳鱼[11]、黑鲈[12]、草鱼[13]等鱼类副产物中成功分离纯化出高活性抗菌肽。另外, 超声波技术作为高效的酶解辅助手段, 可通过适当频率的超声作用提高酶解的效果, 已有研究(刘超等[14]、陶磊等[15])证实, 采用超声波辅助酶解法可有效获取目标活性物质。

基于上述背景, 本研究以鲫鱼鱼鳞作为原材料, 采用超声波辅助蛋白酶对鱼鳞进行酶解, 以对大肠杆菌的抑菌性和酶解的多肽回收率为评价指标, 深入分析并确定最佳酶解工艺, 期望获得具有较强抑菌活性的抗菌肽, 为淡水鱼下脚料的高效利用以及抗菌肽的进一步发展提供可靠的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 材料与试剂

鲫鱼(产自于泰州水域)购于泰州市大海陵区大润发超市; 大肠杆菌(二代)购于中国微生物菌种保藏中心。

NaOH(分析纯, 纯度≥96.0%)、乙二胺四乙酸二钠(disodium ethylenediaminetetraacetate, EDTA-2Na)、二水柠檬酸(分析纯, 纯度≥99.5%)、琼脂培养基、营养肉汤、胃蛋白酶(生物试剂, 酶活力≥1200 U/mg)、胰蛋白酶(生物试剂, 酶活力≥50000 U/mg)、木瓜蛋白酶(生物试剂, 酶活力≥6000 U/mg)、中性蛋白酶(生物试剂, 酶活力≥50 U/mg)(国药集团化学试剂有限公司); 牛津杯(7.8 mm×6 mm×10 mm, 上海三孺实业有限公司)。

1.1.2 仪器与设备

85-1 恒温加热磁力搅拌器(江苏杰瑞尔电器有限公司); HH 数显恒温水浴锅(金坛市国胜试验仪器厂); B-260 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); 5810R 高速冷冻离心机(艾本德实验室科技有限公司); PHS-3E 酸度计(上海雷磁科学仪器厂); DHG-202-0A 恒温干燥箱(绍兴亿纳电热智能干燥箱); WKS900B/3S 超声波发生器(江苏江大五棵松生物科技有限公司); KDN-520 全自动凯氏定氮仪(青岛路博建业环保有限公司); AL204 电子天平(精度 0.1 mg)、EL602 电子天平(精度 0.01 g)(上海梅特勒托利多仪器有限公司); Thermo 702 超低温冰箱(美国赛默飞世尔科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 鲫鱼鱼鳞抗菌肽粗酶液提取

取新鲜的鲫鱼鱼鳞, 清洗至无表面的污垢黏液, 置于干燥箱 40 ℃烘干后冷藏备用。参照顾晨涛等[16]实验方法, 称取 5 g 干燥鲫鱼鱼鳞, 剪碎后加入 0.5 mol/L NaOH 溶液, 磁力搅拌后加入 0.2 mo1/L EDTA-2Na 溶液, 利用超声波辅助脱钙加入 10%柠檬酸溶液, 50 ℃恒温水浴锅。加入蛋白酶, 采用超声波辅助酶解, 恒温水浴, 4 ℃下 4000 r/min 离心 20 min 取上清液。40 ℃旋转蒸发浓缩, 得到鲫鱼鱼鳞抗菌肽粗酶液, –80 ℃冻藏备用。

1.2.2　抑菌性能测定

以大肠杆菌为指示菌, 采用双层牛津杯抑菌圈法测定抗菌肽粗酶液的抑菌性能。吸取 1 mL 的大肠杆菌菌悬液(1×10^6 CFU/mL)于琼脂培养基溶液中, 摇匀, 制成混有受试菌的琼脂培养基, 平皿中放入无菌牛津杯, 倾倒琼脂培养基摇匀, 待凝固后, 取出牛津杯, 吸取 100 μL 鱼鳞抗菌肽粗酶液试样放入孔中。37 ℃培养 24 h 后, 测量抑菌圈直径大小, 同时以生理盐水作空白对照。

1.2.3　蛋白酶的确定

按照 1.2.1 实验流程进行鱼鳞酶解, 按照底物质量浓度 150 mg/mL、酶活力 5000 U/g、酶解时间 4 h、酶解 pH 和酶解温度(表 1)的酶解条件, 分别使用胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和中性蛋白酶制备鲫鱼鱼鳞粗酶液, 以抑菌圈直径和多肽回收率为指标, 分析确定最适宜的蛋白酶。

表 1　蛋白酶酶解条件

Table 1　Enzymatic hydrolysis conditions of protease

蛋白酶	酶解 pH	酶解温度/℃
胃蛋白酶	2.0	37
胰蛋白酶	8.0	50
木瓜蛋白酶	6.0	50
中性蛋白酶	7.0	50

1.2.4　酶解工艺单因素实验设计

以底物质量浓度 150 mg/mL、酶活力 5000 U/g、超声波功率 120 W、酶解时间 4 h 为基本酶解工艺。在其他因素不变的前提下, 以抑菌圈直径和多肽回收率为评价指标, 分别分析酶活力(3000、4000、5000、6000 和 7000 U/g), 底物质量浓度(50、100、150、200 和 250 mg/mL), 酶解时间(2、3、4、5 和 6 h), 超声功率(90、105、120、135 和 150 W)对鲫鱼鱼鳞中抗菌肽提取效果的影响。

1.2.5　正交实验优化酶解工艺

基于单因素实验结果, 综合考虑各因素对抗菌肽提取效果的影响, 为获得最佳超声波辅助酶解工艺, 选择酶解时间、酶活力、超声波功率作为实验因素, 采用正交 $L_9(3^4)$ 实验设计(表 2), 空白列作为误差列, 以抑制圈直径和多肽回收率为指标, 优化鲫鱼鱼鳞抗菌肽酶解工艺。

表 2　正交实验设计

Table 2　Orthogonal experimental design

水平	因素		
	A(酶解时间)/h	*B*(超声功率)/W	*C*(酶活力)/(U/g)
1	3	105	4000
2	4	120	5000
3	5	135	6000

1.2.6　多肽回收率的测定

按照 GB 5009.5—2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》中凯氏定氮法分别测定干燥鱼鳞和酶解后抗菌肽液中的蛋白质含量, 以酶解后抗菌肽液中蛋白质含量占原料鱼鳞中的蛋白质含量比例来表示多肽回收率(peptide recovery rate, PPR), 计算见公式(1):

$$\mathrm{PPR}=\frac{M_1}{M_0}\times100\% \tag{1}$$

式中: PPR 为多肽回收率, %; M_1 为酶解后抗菌肽液中蛋白质质量浓度, mg/L; M_0 为原料鱼鳞中的蛋白质质量浓度, mg/L。

1.3　数据处理

数据以平均值±标准偏差表示, 采用 Excel 2023 软件进行数据分析和绘图, SPSS 22.0 软件对正交实验数据进行方差分析。

2　结果与分析

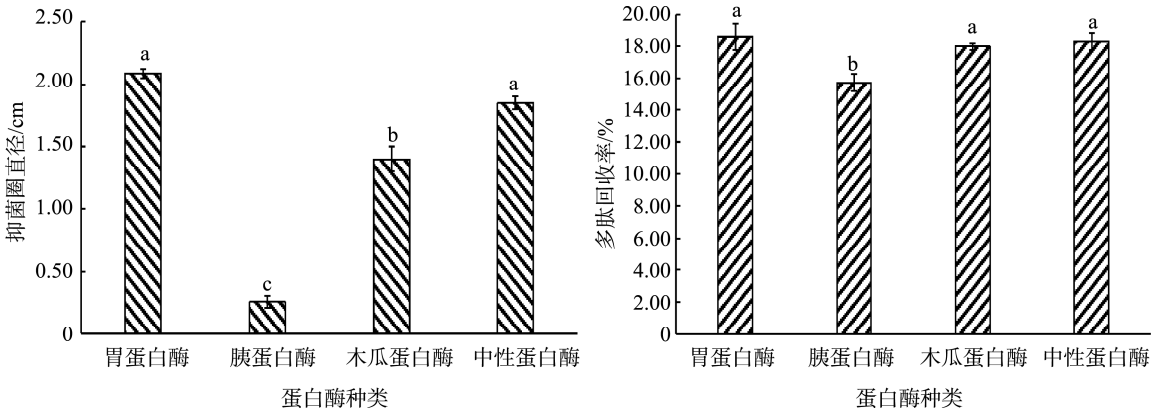
2.1　蛋白酶的确定结果分析

4 种蛋白酶对鲫鱼鱼鳞抗菌肽的提取效果如图 1 所示。相较于其他 3 种蛋白酶, 胃蛋白酶酶解得到的多肽回收率最高为 18.60%±0.83%, 且粗酶液对大肠杆菌的抑菌特性最佳, 抑菌圈直径为(2.09±0.04) cm。由于各蛋白酶的切割位点不相同, 因此水解得到的肽段也不相同, 相比胰蛋白酶酶解后的多肽回收率虽达到 15.72%±0.54%, 但是酶解液的抑菌圈直径仅为(0.26±0.05) cm, 说明胰蛋白酶不能有效将鲫鱼鱼鳞中的抗菌肽有效分离。综合多肽回收率和抑菌性, 胃蛋白酶可作为鱼鳞抗菌肽提取的优选酶。孙慧等[17]在金枪鱼暗色肉蛋白肽的制备中, 采用了风味蛋白酶和胃蛋白酶混合酶解的方案。施永清等[18]的研究中也同样通过胃蛋白酶与碱性蛋白酶复合酶解工艺制备鱼鳞抗菌肽。

2.2　酶解工艺单因素实验结果

2.2.1　底物质量浓度对鱼鳞抗菌肽提取效果的影响

底物质量浓度直接影响酶与底物的接触面积[19], 由图 2 可知, 在固定其他酶解条件的情况下, 随着底物质量浓度的增加, 使得酶解获得的多肽尤其是抑菌肽片段随之增多, 抗菌肽的释放速度加快。抑菌圈直径和多肽回收率均存在显著性差异($P<0.05$), 且二者变化趋势具有一致性: 随着底物浓度升高, 多肽回收率同步上升, 抑菌圈直径亦随之增大。当底物质量浓度达到 200 mg/mL 时, 多肽回收率达到最大值为 17.93%±0.23%, 抑菌圈直径同时达到峰值为(2.59±0.04) cm。此条件下, 酶与底物反应达到平衡状态, 二者充分结合并发挥作用, 酶解反应进行得较为彻底。然而, 当底物质量浓度继续升高时, 多肽回收率出现下降趋势, 而抑菌圈直径无明显变化。这一结果表明, 底物质量浓度的继续增加对抗菌肽的提取并没有促进作用。韦雅虹等[20]的研究也表明, 当底物浓度和蛋白酶的反应达到平衡后, 继续增加底物对酶促反应没有促进作用; 张喆等[21]研究酶解鱿鱼片制备 ACE 抑制肽的工艺也发现, 底物浓度超过饱和时, 酶促速率不再继续提高。



注: 同系列中标有不同小写字母的数值间差异显著(P<0.05), 标有相同小写字母的数值间间差异不显著(P>0.05), 下同。

图 1 4 种蛋白酶对鱼鳞抗菌肽提取效果的影响

Fig.1 Effects of 4 kinds of proteases on the extraction efficiency of antimicrobial peptides from fish scales

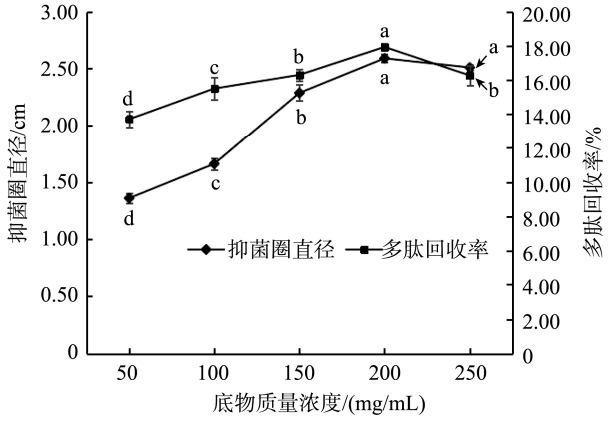


图 2 底物质量浓度对鱼鳞抗菌肽提取效果的影响

Fig.2 Effects of substrate concentration on the extraction efficiency of antimicrobial peptides from fish scales

2.2.2 酶活力对鱼鳞抗菌肽提取效果的影响

酶活力对鱼鳞抗菌肽提取效果的影响由图 3 可知, 在其他酶解条件固定的情况下, 酶活力对鱼鳞抗菌肽的提取效果具有显著影响。随着酶活力的提升, 多肽回收率与抑菌圈直径均呈逐步上升趋势, 且不同酶活力组间的抑菌圈直径和多肽回收率存在显著性差异(P<0.05)。当酶活力为 5000 U/g 时, 多肽回收率为 18.10%±0.17%, 抑菌圈直径达到最大值为(2.18±0.03) cm, 此时酶解所得的抗菌肽抑菌效果最优。但当酶活力继续增加时, 多肽回收率未呈现进一步上升趋势, 抑菌圈直径出现下降。这一现象的原因在于: 当酶与底物的活性作用位点达到饱和后, 继续提高酶活力, 并不会使分离得到的抗菌肽量随酶活力增加而增多; 相反, 过量的酶可能会将已生成的抗菌肽进一步分解为更小分子的短肽或游离氨基酸, 导致具有抑菌活性的抗菌肽含量降低, 进而使抑菌圈直径下降。该结果与已有研究结论一致: 林登峰等[22]采用复合酶酶解三文鱼的研究中也发现, 当酶活力达到饱和后, 继续增加酶活力对酶解效果无促进作用; 冯晓焕等[23]的研究也指出, 随着酶添加量的增加, 更多的肽段会发生水解, 造成蛋白质分子稳定性下降, 导致目标肽段的提取率降低。

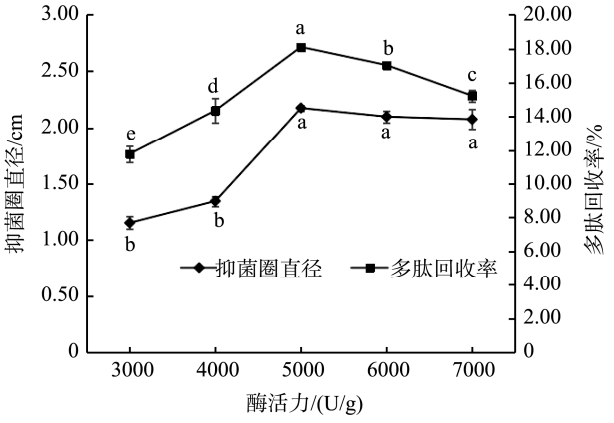


图 3 酶活力对鱼鳞抗菌肽提取效果的影响

Fig.3 Effects of enzyme activity on the extraction efficiency of antimicrobial peptides from fish scales

2.2.3 酶解时间对鱼鳞抗菌肽提取效果的影响

在其他酶解条件固定的情况下, 酶解时间直接决定酶与底物作用的时长, 适当延长酶解时间, 可为酶分解底物提供更充足的条件, 进而促进更多的抗菌肽释放。由图 4 可知, 酶解时间对抑菌圈直径和多肽回收率均存在显著性影响(P<0.05)。在 2~4 h 的酶解反应阶段, 多肽回收率和抑菌圈直径均呈现上升趋势; 当酶解时间为 4 h 时, 二者同步达到最大值, 多肽回收率为 18.11%±0.23%, 抑菌圈直径为(2.09±0.13) cm。但当酶解时间继续延长时, 短肽回收率未出现进一步提升, 抑菌圈直径开始下降。这一现象的原因在于: 酶解反应在 4 h 时已达到平衡状态, 底物中可提取的抗菌肽被完全分解出; 若继续延长反应时间, 蛋白酶会将已生成的抗菌肽进一步降解为无抑菌活性的小分

子短肽或者游离氨基酸, 最终导致其抑菌效果下降[24]。该结论与已有研究结果一致: 殷海洋等[25]的实验发现, 随着酶解时间增加, 抗菌肽的抑菌性呈现“先上升后下降”的变化趋势; 虞丹丹等[26]的研究还发现, 过长的酶解时间所产生的复合物浓度增加, 致使蛋白酶的活性中心被覆盖, 反而抑制了酶解反应, 最终导致蛋白水解度的下降。

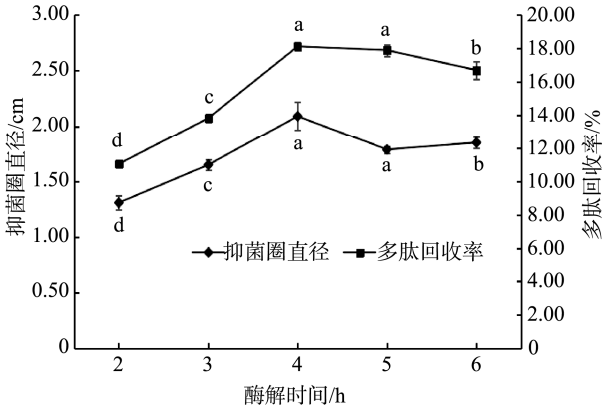


图 4　酶解时间对鱼鳞抗菌肽提取效果的影响
Fig.4　Effects of enzymatic hydrolysis time on the extraction efficiency of antimicrobial peptides from fish scales

2.2.4　超声功率对鱼鳞抗菌肽提取效果的影响

由图 5 可见, 超声功率对抑菌圈直径和多肽回收率均存在显著性影响(P<0.05), 二者随超声功率的变化趋势一致: 随着超声功率升高, 多肽回收率和抑菌圈直径同步上升; 在超声功率达到 120 W 时, 抑菌圈直径和多肽回收率均达到了最大值, 即抑菌圈直径为(2.31±0.11) cm、多肽回收率为 21.07%±0.81%。但当超声功率的继续增加时, 二者则呈现下降的趋势。具体而言, 当超声功率处于 90~120 W 的范围时, 超声波可显著增强水分子的振动强度, 有效破坏鱼鳞的细胞, 为蛋白酶和底物的接触及反应创造更有利条件, 从而强化酶解反应的效果[27], 促使鱼鳞中的抗菌肽被快速分解释放, 因此多肽回收率和抑菌圈直径均呈递增趋势。然而, 若超声功率过大, 会产生声波屏障效应, 阻碍声波正常传递, 进而导致鱼鳞中蛋白质的原有结构[28–29], 一方面导致抗菌肽的提取量减少, 直接表现为抑菌圈的直径下降; 另一方面, 部分抗菌肽会被分解成小分子短肽或氨基酸, 而此类物质仍会被计入多肽回收率的测定结果中, 因此多肽回收率的数值变化并不明显。该规律与已有研究结论相符: 张永芳等[30]在黄芪叶茶黄酮提取研究中发现, 适度增大超声波功率可以破坏细胞结构, 提高黄酮的提取率, 但当超声波功率继续增大, 超声波的空化作用会产生大量空化泡, 破坏黄酮分子结构, 反而导致提取率降低。

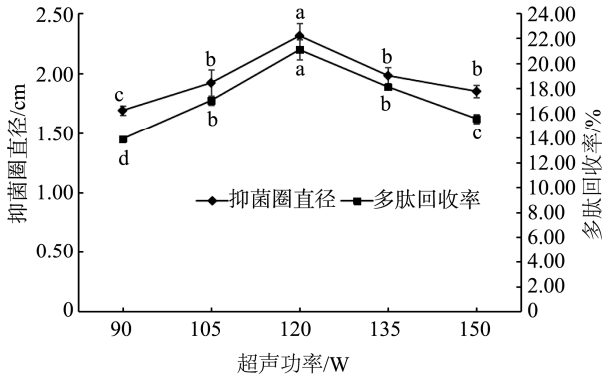


图 5　超声功率对鱼鳞抗菌肽提取效果的影响
Fig.5　Effects of ultrasound power on the extraction efficiency of antimicrobial peptides from fish scales

2.3　正交优化实验

基于单因素实验结果, 固定底物质量浓度为 200 mg/mL, 选择酶解时间、超声波功率和酶活力 3 个关键因素, 采用正交实验对鲫鱼鱼鳞抗菌肽的超声辅助酶解工艺进行优化, 结果如表 3 所示。通过极差分析(表 3)可知, 各因素对不同评价指标的影响主次存在差异: 对抑菌圈直径而言, 影响强度排序为酶活力>酶解时间>超声波功率; 对多肽回收率而言, 影响强度排序为酶解时间>酶活力>超声波功率。值得注意的是, 两指标对应的各因素最优水平仅在酶解时间上存在差异; 以抑菌圈直径为优化目标时, 最优水平组合为酶解时间 4 h、超声波功率 120 W、酶活力 5000 U/g; 以多肽回收率为优化目标时, 最优水平组合为酶解时间 5 h、超声波功率 120 W、酶活力 5000 U/g。综合单因素实验结果可解释上述差异: 酶解时间作为反应持续时长的关键参数, 直接决定底物与酶的作用的充分性, 因此对多肽回收率的影响更为显著; 而对于抑菌活性, 当酶解反应达到平衡状态时, 即可得到所需要的抗菌肽, 并非酶解时间越长, 具有抑菌功能的活性肽释放量越多。相反, 若酶解时间过长(如 5 h), 已生产的抗菌肽会被蛋白酶进一步降解为无抑菌活性的小分子肽或氨基酸, 导致有效抗菌成分含量降低, 故以抑菌圈直径为优化目标时, 最优酶解时间短于以多肽回收率为目标的时长。

采用 SPSS 22.0 软件对正交实验数据进行方差分析, 结果如表 4(抑菌圈直径)、表 5(多肽回收率)所示: 3 个因素对两评价指标的影响均达到显著性水平(P<0.05), 表明各因素对实验结果的影响具有统计学意义, 进一步验证了极差分析结果的可靠性。

为确定兼顾抑菌活性与提取效率的最优工艺, 对上述两指标对应的最优水平组合分别进行验证实验, 实验结果如表 6 所示。在水平组合 B 的酶解条件下, 抗菌肽的多肽回收率略高于水平组合 A, 但其抑菌圈直径小于水平组合 A。本研究以筛选抗菌肽的最佳酶解工艺为核心目标,

而抗菌肽的核心功能属性与应用价值直接取决于其抑菌活性，若仅追求较高的多肽提取率而牺牲抑菌活性，所得产物将难以满足后续应用需求。因此，在最佳工艺筛选过程中，优先保障抗菌肽的高抑菌活性，相较于单纯提升多肽提取率，更符合本研究的核心定位与实际应用导向。因此最终确定超声波辅助酶解最佳工艺为：酶解时间 4 h、超声波功率 120 W、酶活力 5000 U/g，既保证了较高的抑菌活性[抑菌圈直径平均为 2.66 cm，计算相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 0.66%]，又实现了较理想的提取效率(多肽回收率平均为 22.52%, RSD 为 1.64%)；且两项指标的 RSD 均小于 2%，表明该工艺具有良好的稳定性与重复性。

表 3　正交实验结果

Table 3　Results of orthogonal experiment

组号	*A*(酶解时间)/h	*B*(超声波功率)/W	*C*(酶活力)/(U/g)	*D*(误差列)	抑菌圈直径/cm	多肽回收率/%
1	1	1	1	1	1.55	14.15
2	1	2	2	2	2.26	18.82
3	1	3	3	3	1.91	16.72
4	2	1	2	3	2.31	19.94
5	2	2	3	1	2.35	20.95
6	2	3	1	2	1.92	17.62
7	3	1	3	2	2.06	18.82
8	3	2	1	3	2.01	19.94
9	3	3	2	1	2.45	21.50
极差分析						
抑菌圈直径	*K*1	5.72	5.92	5.48	6.35	
	*K*2	6.58	6.62	7.02	6.24	
	*K*3	6.52	6.28	6.32	6.23	
	R	0.28	0.24	0.51	0.04	
多肽回收率	*K*1	49.69	52.91	51.71	56.60	
	*K*2	58.51	59.71	60.26	55.26	
	*K*3	60.26	55.84	56.49	56.60	
	R	3.53	2.26	2.85	0.45	

表 4　正交实验方差结果(抑菌圈直径)

Table 4　Variance results of orthogonal experiment (antibacterial circle diameter)

方差来源	离差平方和	自由度	均方	*F*	*P*	显著性
A(酶解时间)	0.15	2	0.08	52.00	0.02	*
B(超声波功率)	0.08	2	0.04	27.64	0.03	*
C(酶活力)	0.40	2	0.20	134.11	0.01	*
D(误差列)	0.00	2	0.00			

注：*表示与对照组有显著性差异(P<0.05)，下同。

表 5　正交实验方差结果(多肽回收率)

Table 5　Variance results of orthogonal experiment (recovery rate of shot peptides)

方差来源	离差平方和	自由度	均方	*F*	*P*	显著性
A(酶解时间)	21.40	2	10.70	53.63	0.02	*
B(超声波功率)	7.76	2	3.88	19.44	0.05	*
C(酶活力)	12.24	2	6.12	30.68	0.03	*
D(误差列)	0.40	2	0.20	1.00	0.50	

表 6　验证实验结果
Table 6　Results of verification experiments

水平组合	抑菌圈直径/cm	RSDs/%	多肽回收率/%	RSDs/%
A	2.66	0.66	22.52	1.64
B	2.53	1.60	22.59	1.00

注: 水平组 A 组酶解条件: 酶解时间 4 h、超声波功率 120 W、酶活力 5000 U/g; 水平组 B 组酶解条件: 酶解时间 5 h、超声波功率 120 W、酶活力 5000 U/g。

3　结　论

本研究利用鲫鱼副产物鱼鳞为原料, 采用超声波辅助酶法获得鲫鱼鱼鳞抗菌多肽粗酶液, 通过单因素实验和正交优化实验, 以抑菌圈直径和多肽回收率作为实验指标, 得到最佳工艺酶解条件为: 底物质量浓度为 200 mg/mL、酶解时间 4 h、超声波功率 120 W、酶活力量 5000 U/g。研究表明, 在此工艺下, 酶解得到的抗菌肽粗酶液对大肠杆菌的抑菌性可达到抑菌圈直径为(2.66±0.66) cm, 多肽回收率 22.52%±1.64%。本研究为后续研究奠定了研究基础, 后续的研究中, 将进一步探讨抗菌肽的分离纯化, 以及抗菌肽结构和功能鉴定。

参考文献

[1] YEAMAN MR, YOUNT NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance [J]. Pharmacological Reviews, 2003, 55(1): 27–55.

[2] SOUZA PFN, VASCONCELOS IM, SILVA FDA, *et al*. A 2S Albumin from the seed cake of *Ricinus communis* inhibits trypsin and has strong antibacterial activity against human athogenic bacteria [J]. Journal of Natural Products, 2016, 79(10): 2423–2431.

[3] LUO Y, SONG YZ. Mechanism of antimicrobial peptides: antimicrobial, anti-inflammatory and antibiofilm activities [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(21): 11401.

[4] 徐宇辰, 励建荣, 李婷婷, 等. 抗菌肽 Piscidin 1 PG/聚乳酸电纺纳米纤维膜的制备及其对海鲈鱼的保鲜作用[J]. 现代食品科技, 2021, 37(4): 102–109.
XU YC, LI JR, LI TT, *et al*. Preparation of antimicrobial peptide Piscidin 1 PG/polylactic acid electrospun nanofiber membrane and its fresh-keeping effect on sea bass [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(4): 102–109.

[5] 李若冰, 刘嘉鑫, 金日天, 等. 酒糟大黄鱼抗菌肽 FAH34 的抑菌活性及热稳定性[J]. 中国食品学报, 2023, 23(12): 247–254.
LI RB, LIU JX, JIN RT, *et al*. Antibacterial activity and thermal stability of antimicrobial peptide FAH34 from Distiller's grains-processed large *Larimichthys crocea* [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2023, 23(12): 247–254.

[6] 蔡路昀, 张滋慧, 李秀霞, 等. 鱼类下脚料在工业中应用的研究进展[J]. 食品工业科技, 2017, 38(8): 356–363.
CAI LY, ZHANG ZH, LI XX, *et al*. Research progress on the industrial application of fish by-products [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(8): 356–363.

[7] SILA A, BOUGATEF A. Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review [J]. Journal of Functional Foods, 2016, 21(10): 10–26.

[8] 李远慧, 郑霖波, 谢超, 等. 带鱼蛋白抗菌肽抑菌效果的影响因素[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(20): 66–72.
LI YH, ZHENG LB, XIE C, *et al*. Influencing factors on the antibacterial effect of antimicrobial peptides from *Trichiurus lepturus* protein [J]. Food Research and Development, 2022, 43(20): 66–72.

[9] 王焙, 张登科, 史咏梅, 等. 鳕鱼暗色肉抗菌肽的制备及分离纯化[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(19): 104–111.
WANG B, ZHANG DK, SHI YM, *et al*. Preparation, isolation and purification of antimicrobial peptides from *Katsuwonus pelamis* meat [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(19): 104–111.

[10] 吴宝兰. 黄姑鱼抗菌肽和凝集素基因的免疫功能研究[D]. 厦门: 集美大学, 2021.
WU BL. Study on immune functions of antimicrobial peptide and lectin genes in *Nibea albiflora* [D]. Xiamen: Jimei University, 2021.

[11] ZHANG ZS, ZHOU YC, ZHANG H, *et al*. Antibacterial activity and mechanisms of TroHepc2-22, a derived peptide of hepcidin2 from golden pompano (*Trachinotus ovatus*) [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(11): 1–20.

[12] WU YX, HU SY, LU XJ, *et al*. Identification and characterization of two novel antimicrobial peptides from Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) with antimicrobial activity and MO/M43 activation capability [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2023, 145: 1–12.

[13] 王雪燕, 陈瑛, 张嘉敏, 等. 草鱼鱼鳞抗菌肽与肉桂精油联合抑菌作用及机理[J]. 食品科学, 2020, 41(23): 100–106.
WANG XY, CHEN Y, ZHANG JM, *et al*. Combined antibacterial effect and mechanism of antimicrobial peptides from *Ctenopharyngodon idella* scales and cinnamon essential oil [J]. Food Science, 2020, 41(23): 100–106.

[14] 刘超, 马遥, 刘艳秋, 等. 超声波-酶法协同制备梅花鹿鹿血肽及其体内抗疲劳活性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(6): 22–29.
LIU C, MA Y, LIU YQ, *et al*. Study on ultrasonic-enzyme synergistic preparation of sika deer blood peptides and their anti-fatigue activity *in vivo* [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(6): 22–29.

[15] 陶磊, 吴谦诚, 胡逸鹏, 等. 超声辅助酶解对鱿鱼内脏感官特性与代谢组学的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(12): 175–183.
TAO L, WU QC, HU YP, *et al*. Effect of ultrasound-assisted enzymolysis on sensory characteristics and metabolomics of squid viscera [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(12): 175–183.

[16] 顾晨涛, 黄酒, 王雪燕, 等. 鲫鱼鱼鳞抗菌多肽的制备纯化及其抑菌活性[J]. 食品科学, 2019, 40(22): 193–198.
GU CT, HUANG S, WANG XY, *et al*. Preparation, Purification and Antibacterial Activity of Antibacterial Polypeptides from *Carassius auratus* scales [J]. Food Science, 2019, 40(22): 193–198.

[17] 孙慧, 赵永强, 于刚, 等. 金枪鱼暗色肉蛋白肽制备工艺及理化性质研究[J]. 食品与机械, 2025, 41(1): 186–194.
SUN H, ZHAO YQ, YU G, *et al*. Study on preparation process and physicochemical properties of protein peptides from tuna dark meat [J]. Food & Machinery, 2025, 41(1): 186–194.

[18] 施永清, 王巧巧, 吴丹丽, 等. 响应面试验优化双酶酶解法制备鱼鳞抗菌肽工艺及其抑菌性能分析[J]. 食品科学, 2018, 39(6): 155–161.
SHI YQ, WANG QQ, WU DL, *et al*. Optimization of preparation process of antimicrobial peptides from fish scales by dual-enzyme hydrolysis using response surface methodology and analysis of its antibacterial properties [J]. Food Science, 2018, 39(6): 155–161.

[19] DHAKAL D, KOOMSAP P, LAMICHHANE A, *et al*. Optimization of collagen extraction from chicken feet by papain hydrolysis and synthesis of chicken feet collagen based iopolymeric fibres [J]. Food Bioscience, 2018, 23: 23–30.

[20] 韦雅虹, 刘康乾, 王皓毅, 等. 响应面法优化碱性蛋白酶解制备核桃抗氧化肽[J]. 食品工业, 2024, 45(6): 19–24.
WEI YH, LIU KQ, WANG HY, *et al*. Optimization of preparation of walnut antioxidant peptides by alkaline protease hydrolysis using response surface methodology [J]. The Food Industry, 2024, 45(6): 19–24.

[21] 张喆, 马凌云, 尚凡凡, 等. 酶解鱿鱼皮制备 ACE 抑制肽的工艺优化及产物特性研究[J/OL]. 食品工业科技, 1-14. [2025-02-17]. https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024090253
ZHANG Z, MA LY, SHANG FF, *et al*. Optimization of enzymatic hydrolysis of squid skin for preparing ACE-inhibitory peptides and study on product characteristics [J/OL]. Science and Technology of Food Industry, 1-14. [2025-02-17]. https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024090253

[22] 林登峰, 李珊慧, 赵洪雷, 等. 响应面法优化三文鱼骨排酶解工艺的研究[J]. 中国调味品 2024, 49(8): 90–97.
LIN DF, LI SH, ZHAO HL, *et al*. Study on optimization of enzymatic hydrolysis process for salmon bone rows by response surface methodology [J]. China Condiment, 2024, 49(8): 90–97.

[23] 冯晓焕, 罗毅皓, 蒋琳, 等. 青稞酒糟多肽的工艺优化及其体外 ADH 激活与抗氧化作用[J/OL]. 食品与发酵工业, 1-13. [2025-02-17]. https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.041695
FENG XH, LUO YH, JIANG L, *et al*. Process optimization of highland barley Distiller's grains polypeptides and their *in vitro* ADH activation and antioxidant effects [J/OL]. Food and Fermentation Industries, 1-13. [2025-02-17]. https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.041695

[24] 任洪飞, 逄梦玉, 隋昕怡, 等. 反复冻融法制备灵芝多糖工艺优化、结构表征及抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2024, 45(8): 11–20.
RENG HF, XIANG MY, SUI XY, *et al*. Process optimization, structural characterization and antioxidant activity analysis of *Ganoderma lucidum* polysaccharides prepared by repeated freezing-thawing method [J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(8): 11–20.

[25] 殷海洋, 刘振春, 张世康, 等. 响应面优化超声波辅助酶法提取油莎豆 ACE 抑制肽的工艺[J]. 食品工业科技, 2021, 42(14): 182–187.
YIN HY, LIU ZC, ZHANG SK, *et al*. Optimization of ultrasonic-assisted enzymatic extraction process of ACE-inhibitory peptides from *Cyperus esculentus* by response surface methodology [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(14): 182–187.

[26] 虞丹丹, 魏文志, 关利, 等. 复合酶酶解法制备中华草龟皮胶原蛋白肽的工艺优化[J]. 中国调味品, 2024, 49(8): 28–33.
YU DD, WEI WZ, GUAN L, *et al*. Process optimization for preparing collagen peptides from *Chinemys reevesii* skin by complex enzyme hydrolysis [J]. China Condiment, 2024, 49(8): 28–33.

[27] LI YX, HE Y, ZHANG H, *et al*. Effects of ultrasonic-enzymatic-assisted ethanol precipitation method on the physicochemical characteristics, antioxidant and hypoglycemic activities of *Remella fuciformis* polysaccharides [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2023, 1001: 6682–106682.

[28] 杜珂. 超声辅助酶解麦胚清蛋白制备多肽及其微胶囊化的研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2023.
DU K. Study on preparation of polypeptides from wheat germ albumin by ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis and their microencapsulation [D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2023.

[29] 杨盛茹, 张秋双, 侯银臣, 等. 超声辅助麦胚蛋白提取、酶解工艺优化及抗氧化性研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2023, 44(6): 18-25.
YANG SR, ZHANG QS, HOU YC, *et al*. Ultrasound-assisted extraction, enzymolysis optimization and antioxidant activity of wheat germ protein [J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2023, 44(6): 18-25.

[30] 张永芳, 杨文华, 张东旭, 等. 超声波法提取恒山黄芪叶茶黄酮最佳工艺研究[J]. 山西大同大学学报(自然科学版), 2024, 40(4): 85–90.
ZHANG YF, YANG WH, ZHANG DX, *et al*. Study on optimal extraction process of flavonoids from *Astragalus membranaceus* leaf tea of Hengshan by ultrasonic method [J]. Journal of Shanxi Datong University (Natural Science Edition), 2024, 40(4): 85–90.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)