



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110156884 A

(43)申请公布日 2019.08.23

(21)申请号 201910429898.7

A23B 4/20(2006.01)

(22)申请日 2019.05.22

C12R 1/84(2006.01)

(71)申请人 天津科技大学

地址 300457 天津市滨海新区经济技术开  
发区第十三大街29号

(72)发明人 孟德梅 樊振川 石林玥 李文娟  
刘泽松

(74)专利代理机构 北京瑞盛铭杰知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11617

代理人 栗华楠

(51)Int.Cl.

C07K 14/435(2006.01)

C07K 1/22(2006.01)

C12N 15/12(2006.01)

C12N 15/81(2006.01)

权利要求书1页 说明书13页

序列表2页 附图10页

(54)发明名称

一种重组Mytichitin-CB抗菌肽的应用

(57)摘要

本发明属生物技术领域,具体涉及一种重组Mytichitin-CB抗菌肽(rMytichitin-CB)的应用。所述抗菌肽的氨基酸序列如序列表SEQ ID NO:1所示,具有良好的温度稳定性、pH稳定性、相对的蛋白酶稳定性;对人红细胞、小鼠红细胞及鸡红细胞的溶血活性小,具备在食品、畜牧、医药等领域的应用的可能性;还可广泛应用于生鲜的防腐保鲜,抑制微生物的繁殖,降低营养物质的流失。

1. 重组抗菌肽rMytichitin-CB在防腐保鲜中的应用,其特征在于,所述rMytichitin-CB抗菌肽的氨基酸序列如序列表SEQ ID NO:1所示。

2. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,应用方法如下:将新鲜肉类分割成3-5g/块的小块,浸泡在rMytichitin-CB保鲜液中3~5分钟后取出,晾干10分钟,然后保鲜膜封存,置于4℃冰箱中贮藏。

3. 如权利要求2所述的应用,其特征在于,所述rMytichitin-CB保鲜液为浓度6-12 $\mu$ g/mL的rMytichitin-CB水溶液。

4. 如权利要求3所述的应用,其特征在于,所述rMytichitin-CB保鲜液为浓度12 $\mu$ g/mL的rMytichitin-CB水溶液。

5. 如权利要求2所述的应用,其特征在于,所述rMytichitin-CB保鲜液为由rMytichitin-CB、Nisin以及壳聚糖复配而成的溶液,溶剂是浓度为1%的醋酸,其中每毫升溶液中含有4-12 $\mu$ g rMytichitin-CB、300-600 $\mu$ g Nisin以及10-20mg壳聚糖。

6. 如权利要求5所述的应用,其特征在于,所述rMytichitin-CB保鲜液为由rMytichitin-CB、Nisin以及壳聚糖复配而成的溶液,溶剂是浓度为1%的醋酸,其中每毫升溶液中含有4 $\mu$ g rMytichitin-CB、300 $\mu$ g Nisin以及10mg壳聚糖。

7. 如权利要求5所述的应用,其特征在于,所述rMytichitin-CB保鲜液为由rMytichitin-CB、Nisin以及壳聚糖复配而成的溶液,溶剂是浓度为1%的醋酸,其中每毫升溶液中含有6 $\mu$ g rMytichitin-CB、600 $\mu$ g Nisin以及20mg壳聚糖。

8. 如权利要求5所述的应用,其特征在于,所述rMytichitin-CB保鲜液为由rMytichitin-CB、Nisin以及壳聚糖复配而成的溶液,溶剂是浓度为1%的醋酸,其中每毫升溶液中含有12 $\mu$ g rMytichitin-CB、600 $\mu$ g Nisin以及10mg壳聚糖。

## 一种重组Mytichitin-CB抗菌肽的应用

### 技术领域：

[0001] 本发明属生物技术领域，具体涉及一种重组Mytichitin-CB抗菌肽 (rMytichitin-CB) 及其高效制备方法。

### 背景技术：

[0002] 由于抗菌肽 (AMPs) 具有广谱抗菌作用，其对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、真菌均有抑杀作用，还可以抗原虫、抗病毒以及杀伤动物体内的肿瘤细胞却不破坏动物体内的正常细胞，而且抗菌肽在快速杀菌的同时，还具有不易产生耐药性，不会导致脓毒症，同时中和内毒素等特性，广泛应用于医药、禽畜养殖、水产养殖及食品领域。Mytichitin-CB属于富含半胱氨酸抗菌肽家族的一种，属于抗菌肽中防御素中的一种，是2014年从贻贝的血淋巴细胞中分离并鉴定出来的，对革兰氏阳性细菌和真菌及病毒都有很强的抑菌活性。然而，由于生物体自身合成的抗菌肽总量较低，用于工业化生产成本较高。因此，为满足抗菌肽工业化生产需要，我们试图通过基因工程方法获得抗菌肽产品。毕赤酵母因其表达外源蛋白的水平较高且成本低廉，成为目前应用最广泛的表达外源蛋白的真核表达系统。

[0003] 本发明是自发现天然抗菌肽Mytichitin-CB后，首次通过基因工程的方法获得的高产量、高活性、高稳定性的重组抗菌肽rMytichitin-CB。本发明采用的巴斯德毕赤酵母表达系统，具有如下特点：一、自身分泌的蛋白少，且表达的外源蛋白可通过信号肽分泌至培养基或发酵液中，由于培养基中含的蛋白较少，这使得发酵液上清中主要蛋白为目的蛋白，方便了后续的目的蛋白的分离与纯化。二、含有目前最强的启动子之一——醇氧化酶启动子 (AOX1)，可受甲醇的严格诱导调控，从而高水平表达外源蛋白。三、与酿酒酵母相比，毕赤酵母在分泌蛋白的糖基化方面占有优势，因为不会使其过糖基化，而且多次传代后酵母仍能稳定表达外源蛋白，具有良好的遗传稳定性。四、培养基价格低廉，发酵工艺成熟，适用于工业化生产。

[0004] 本发明将rMytichitin-CB抗菌肽基因导入毕赤酵母GS115细胞中，以甲醇为唯一碳源进行诱导表达，之后经镍柱亲和纯化，获得rMytichitin-CB抗菌肽产品。抑菌实验表明，不仅对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌标准菌株有良好的抑菌作用，还对耐药菌株有很好的抑制作用。rMytichitin-CB的溶血活性和细胞毒性也被测定。经检索本发明在国内外未见公开报道，在国内外未见公开使用。

### 发明内容：

[0005] 本发明的目的在于提供一种重组Mytichitin-CB抗菌肽rMytichitin-CB在防腐保鲜中的应用，特别是在新鲜肉制品防腐保鲜中的应用。

[0006] 所述rMytichitin-CB抗菌肽的氨基酸序列如序列表SEQ ID NO:1所示；核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0007] rMytichitin-CB抗菌肽在新鲜肉制品防腐保鲜中的应用，方法具体如下：

[0008] 将新鲜肉类分割成3-5g/块的小块，浸泡在rMytichitin-CB保鲜液中3~5分钟后

取出,晾干10分钟,然后保鲜膜封存,置于4℃冰箱中贮藏。

[0009] 进一步地,所述rMytichitin-CB保鲜液为浓度6-12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的rMytichitin-CB水溶液,可将新鲜肉品的保质期延长至5-6天,较未经处理的肉品延长1~2天;

[0010] 优选地,所述rMytichitin-CB保鲜液为12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的rMytichitin-CB水溶液,可将新鲜肉品的保质期延长至6天;

[0011] 进一步地,所述rMytichitin-CB保鲜液是由rMytichitin-CB、Nisin以及壳聚糖复配而成的溶液,溶剂是浓度为1%的醋酸,其中每毫升溶液中含有4-12 $\mu\text{g}$  rMytichitin-CB、300-600 $\mu\text{g}$  Nisin以及10-20mg壳聚糖,可将新鲜肉品的保质期延长至8-11天,较未经处理的肉品延长4~7天;

[0012] 优选地,所述rMytichitin-CB保鲜液是由rMytichitin-CB、Nisin以及壳聚糖复配而成的1%醋酸溶液,其中每毫升溶液中含有4 $\mu\text{g}$  rMytichitin-CB、300 $\mu\text{g}$  Nisin以及10mg壳聚糖,可将新鲜肉品的保质期延长至11天;

[0013] 优选地,所述rMytichitin-CB保鲜液是由rMytichitin-CB、Nisin以及壳聚糖复配而成的1%醋酸溶液,其中每毫升溶液中含有6 $\mu\text{g}$  rMytichitin-CB、600 $\mu\text{g}$  Nisin以及20mg壳聚糖;

[0014] 优选地,所述rMytichitin-CB保鲜液是由rMytichitin-CB、Nisin以及壳聚糖复配而成的1%醋酸溶液,其中每毫升溶液中含有12 $\mu\text{g}$  rMytichitin-CB、600 $\mu\text{g}$  Nisin以及10mg壳聚糖。

[0015] 通过将rMytichitin-CB抗菌肽基因导入毕赤酵母细胞中,获得rMytichitin-CB抗菌肽的表达菌株;以甲醇为唯一碳源对其进行诱导表达,取发酵液上清进行亲和纯化,获得rMytichitin-CB抗菌肽产品。

[0016] 具体制备方法如下:

[0017] (1) 重组表达载体的构建

[0018] 将rMytichitin-CB抗菌肽基因片段(SEQ ID NO:2所示)连接到pPICZ $\alpha$ A表达载体上构建重组表达载体;

[0019] 进一步地,所述rMytichitin-CB抗菌肽基因片段是将Mytichitin-CB抗菌肽(氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示)基因根据毕赤酵母表达系统偏好性进行密码子优化后,在5'端依次插入起始密码子,6 $\times$ His,以及“GATGACGATGACAAG”15个碱基,C端依次插入终止密码子获得的。

[0020] (2) 构建重组菌株

[0021] 重组表达载体经SacI酶线性化处理,并将线性化处理后的重组表达载体转入甲醇利用型毕赤酵母GS115宿主细胞,获得rMytichitin-CB抗菌肽的表达菌株。

[0022] (3) 抗菌肽的表达

[0023] 将rMytichitin-CB抗菌肽的表达菌株进行发酵培养,以甲醇为唯一碳源对其进行诱导表达,取发酵液上清进行亲和纯化,获得rMytichitin-CB抗菌肽产品。

[0024] 进一步地,所述发酵培养的方法为:取rMytichitin-CB抗菌肽的表达菌株于BMGY培养基中,28℃,220rpm摇床培养,待OD<sub>600</sub>达到6-8时,把BMGY培养基等体积更换为BMMY培养基,28℃,220rpm摇床培养,每24h补充经过滤除菌的100%甲醇至终浓度0.5-2%,连续培养96-120h。

[0025] 优选地, BMGY、BMMY培养基的pH为6.0, 每次甲醇补充量占发酵液的体积百分比为2.0%, 诱导时间为120h, 通过ELISA方法测定上清液中目的蛋白的含量达到63.7 $\mu$ g/mL。

[0026] 进一步地, 所述亲和纯化采用镍柱亲和纯化法纯化发酵液上清中的目的蛋白, 获得rMytichitin-CB抗菌肽纯品。

[0027] 更进一步的, 镍柱亲和纯化时, 依次使用20, 40, 60mM的低浓度咪唑进行梯度漂洗去除杂蛋白, 使用500mM的高浓度咪唑进行洗脱, 每次洗脱1mL, 当洗脱6次时, 目的蛋白洗脱完全。1L上清中目的蛋白最高产量达到9.12mg。

[0028] 本发明所使用的rMytichitin-CB抗菌肽产品特性如下:

[0029] (1) 抑菌性: 经测定rMytichitin-CB抗菌肽具有广谱抑菌性, 对金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)、单增李斯特菌(ATCC 21633)、沙门氏菌(ATCC 10467)、荧光假单胞菌(CGMCC 1.1802)、枯草芽孢杆菌L300-1、产气杆菌、大肠杆菌O157(ATCC 35150)、坂崎肠杆菌及大肠埃希氏菌(ATCC 10305)的最小抑菌浓度分别为4、4、6、6、6、6、6、12、12 $\mu$ g/mL;

[0030] 此外, 发酵液上清及纯化后的rMytichitin-CB抗菌肽对来源于猪病变脏体的大肠菌属、金黄色葡萄球菌及巴氏杆菌等耐药性致病菌都具有良好的抑制作用, 其效果优于常用抗生素。

[0031] (2) 稳定性:

[0032] ①温度稳定性: rMytichitin-CB抗菌肽在4 $^{\circ}$ C放置60天时, 活性基本保持不变, 此后随着时间的延长, 在放置180天后, 6 $\mu$ g/mL的rMytichitin-CB对金黄色葡萄球菌的抑制率仍高于90%; 室温放置的rMytichitin-CB活性在前45天活性保持不变, 在180天后, 6 $\mu$ g/mL的rMytichitin-CB对金黄色葡萄球菌的抑制率为82%, 低于90%, 效果变差; 经40、60、80、100 $^{\circ}$ C烘干后的rMytichitin-CB, 在浓度为6 $\mu$ g/mL和12 $\mu$ g/mL时, 对金黄色葡萄球菌的抑制率低于60%, 活性大大降低, 而当rMytichitin-CB的浓度提高至60 $\mu$ g/mL时, 抑制率才达到95%; 水浴加热对rMytichitin-CB的活性基本无影响, 但是烘干加热却显著降低了rMytichitin-CB的抑菌活性, 这表明, 烘干加热对rMytichitin-CB的稳定性有一定影响。

[0033] ②pH稳定性: rMytichitin-CB抗菌肽分别经pH分别为2、4、6、8、10的不同缓冲液溶解至30 $\mu$ g/mL后在37 $^{\circ}$ C处理4h后进行抑菌实验, 抑菌圈直径无显著性差异, 均大约为17mm;

[0034] ③蛋白酶稳定性: 分别向溶解在不同pH的缓冲液的rMytichitin-CB中加入胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、蛋白酶K、胰蛋白酶各0.126U, 37 $^{\circ}$ C处理2h后做抑菌圈实验, rMytichitin-CB浓度为30 $\mu$ g/mL, 经胃蛋白酶、蛋白酶K和胰蛋白酶处理后的抑菌圈与不经酶处理的对照无显著性差异; 木瓜蛋白酶处理后的抑菌圈为对照的79%。

[0035] 本研究表明, 经本发明生产的抗菌肽rMytichitin-CB具有良好的温度稳定性、pH稳定性、相对的蛋白酶稳定性。

[0036] (3) 溶血性: 分别将10 $\mu$ L不同浓度的抗菌肽rMytichitin-CB同90 $\mu$ L浓度为4% (v/v) 的红细胞在37 $^{\circ}$ C作用30min后离心测定上清的吸光度值。抗菌肽rMytichitin-CB的浓度分别为: 1、5、10、50、100、200 $\mu$ g/mL。当rMytichitin-CB的浓度低于5 $\mu$ g/mL时, 对于人的红细胞不具备溶血性, 在最大浓度200 $\mu$ g/mL时, rMytichitin-CB对人的红细胞的溶血性达到14%的溶血性。rMytichitin-CB在浓度低于50 $\mu$ g/mL时, 对小鼠的红细胞不具有溶血性, 在最大浓度200 $\mu$ g/mL时只有不到1.5%的溶血性; rMytichitin-CB在最大浓度200 $\mu$ g/mL时, 对鸡只有不到1%的溶血性。

[0037] 因此,此研究表明了抗菌肽rMytichitin-CB对人红细胞、小鼠红细胞及鸡红细胞的溶血活性小,说明了其在食品、畜牧、医药等领域的应用具有一定的可能性。

[0038] 有益效果:

[0039] (1) 保鲜实验数据表明,rMytichitin-CB具有良好的防腐保鲜效果,在低温贮藏下,可广泛应用于鲜猪肉的防腐保鲜,抑制微生物的繁殖,降低营养物质的流失,维持猪肉良好的感官形态。因此rMytichitin-CB具有成为一种新型天然食品防腐保鲜剂的巨大潜力。

[0040] (2) 本发明利用毕赤酵母系统成功高效表达抗菌肽rMytichitin-CB,在发酵液上清中的含量高达63.7 $\mu$ g/mL,有利于抗菌肽工业化生产。

[0041] (3) 活性鉴定实验表明,rMytichitin-CB发酵液上清及纯品对金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌、荧光假单胞菌、大肠杆菌、沙门氏菌、枯草L300-1、产气杆菌等都有很强的抑制作用,最小抑菌浓度均在6 $\mu$ g/mL左右。而且更重要的是,抗菌肽rMytichitin-CB对来源于猪病变脏体的大肠菌属、金黄色葡萄球菌及巴氏杆菌等耐药性致病菌都具有良好的抑制作用,这为禽畜养殖、医药等行业提供了新的希望。

#### 附图说明:

[0042] 图1为本发明技术路线;

[0043] 图2为不同甲醇浓度诱导下的目的蛋白表达量

[0044] (a):不同甲醇浓度诱导的培养液上清的Tricine-SDS-PAGE胶图;(b):不同甲醇浓度诱导的培养液上清的目的蛋白总量,其中不同字母表示的是差异显著性;M:预染超低分子量蛋白Marker;1:0.5%甲醇诱导浓度;2:1%甲醇诱导浓度;3:1.5%甲醇诱导浓度;4:2%甲醇诱导浓度;

[0045] 图3为不同诱导时间下的目的蛋白表达量

[0046] (a):2%的甲醇浓度诱导下不同时间的培养液上清的Tricine-SDS-PAGE胶图

[0047] (b):2%的甲醇浓度诱导下不同时间的培养液上清的目的蛋白总量

[0048] 其中不同字母表示的是差异显著性;M:蛋白Marker;1:诱导0h;2:诱导24h;3:诱导48h;4:诱导72h;5:诱导96h;6:诱导120h;

[0049] 图4为Ni柱纯化rMytichitin-CB电泳结果

[0050] 其中,M:蛋白Marker;1:漂洗液(60mM咪唑);2:第一次洗脱液(500mM咪唑);3:第二次洗脱液(500mM咪唑);4:第三次洗脱液(500mM咪唑);5:第四次洗脱液(500mM咪唑);6:第五次洗脱液(500mM咪唑);7:第六次洗脱液(500mM咪唑);

[0051] 图5为rMytichitin-CB对耐药菌株的抑菌活性试验

[0052] (a-i) 发酵液上清及rMytichitin-CB抗菌肽对从猪病变脏体中分离的1-9号大肠菌属的抑菌活性试验,(j-o) 上清及目的蛋白分别对大肠分离耐药菌、沙门分离耐药菌、金葡分离耐药菌、链球菌、副猪嗜血弧菌、巴氏杆菌的抑菌活性试验;

[0053] 其中,1:盐酸林克霉素(50 $\mu$ g/mL,50 $\mu$ L);2:粘杆菌素(50 $\mu$ g/mL,50 $\mu$ L);3:环丙沙星(25 $\mu$ g/mL,50 $\mu$ L);4:头孢噻吩钠(50 $\mu$ g/mL,50 $\mu$ L);5:发酵液上清(50 $\mu$ L);6:纯化后的rMytichitin-CB(50 $\mu$ g/mL,50 $\mu$ L);

[0054] 图6为不同温度及加热方式对rMytichitin-CB活性的影响

[0055] (a)为不同温度下烘干对不同浓度rMytichitin-CB抑菌活力的影响;(b)为不同加热方式在不同温度下对6 $\mu$ g/mL的rMytichitin-CB抑菌活力的影响;

[0056] 图7为抗菌肽rMytichitin-CB的pH、酶稳定性

[0057] 其中,(a)为pH值稳定性平板:1,2,3,4,5分别为pH值为2,4,6,8,10缓冲液处理下的rMytichitin-CB;6,7,8,9,10分别对应不同pH值缓冲液,作为阴性对照;(b)为蛋白酶稳定性平板:1,2,3,4分别为胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、蛋白酶K和胰蛋白酶处理的rMytichitin-CB;5为不加蛋白酶的rMytichitin-CB;6,7,8,9,10分别为溶解胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、蛋白酶K和胰蛋白酶的缓冲液,作为阴性对照;(c)、(d)是分别对应(a)、(b)中1-5号抑菌圈直径。

[0058] 图8为抗菌肽rMytichitin-CB的溶血活性研究

[0059] 其中,(a):rMytichitin-CB对人红细胞的溶血性研究,(b):rMytichitin-CB对仓鼠的红细胞的溶血活性研究;(c):rMytichitin-CB对鸡的红细胞的溶血活性;P:以1% Triton X-100作为阳性对照;N:以PBS作为阴性对照。

[0060] 图9为rMytichitin-CB处理下的鲜猪肉在贮藏期内的感官变化

[0061] 其中,(a)为不同处理下猪肉样品的感官形态;(b)为第四天感官评价雷达图。

[0062] 图10为rMytichitin-CB处理下的鲜猪肉在贮藏期内各理化指标的变化

[0063] 其中,(a)为菌落总数;(b)为汁液流失率;(c)为pH值;(d)为TVBN值;(e)为TBARS值。

[0064] 图11为金黄色葡萄球菌侵染对猪肉感官及品质的影响

[0065] 其中,(a)为不同处理下样品的感官形态;(b)为稀释 $10^7$ ×下金黄色葡萄球菌的菌落数量;(c)为苏木精-伊红(HE)染色(200×);(d)为金黄色葡萄球菌的菌落计数结果(\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ )。

[0066] 图12为大肠杆菌0157侵染对猪肉感官及品质的影响

[0067] 其中,(a)为不同处理下样品的感官形态;(b)为稀释 $10^7$ ×下大肠杆菌0157的菌落数量;(c)为苏木精-伊红(HE)染色(200×);(d)为金黄色葡萄球菌的菌落计数结果(\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ )。

[0068] 图13为复配保鲜剂处理下的鲜猪肉在贮藏期内各理化指标的变化

[0069] 其中,(a)为菌落总数;(b)为汁液流失率;(c)为pH值;(d)为TVBN值;(e)为TBARS值。

### 具体实施方式:

[0070] 本文将结合具体附图详细描述本发明具体流程,发明技术路线如图1所示。应当注意的是,下述实施例中描述的技术特征或者技术特征的组合不应该被认为是孤立的,它们可以被相互组合从而达到更好的技术效果。

[0071] 实施例1 rMytichitin-CB抗菌肽的制备

[0072] (1)重组表达载体的构建

[0073] 在Mytichitin-CB目的基因的5'端依次添加EcoRI和BamHI酶切位点、起始密码子、6×His,以及“GATGACGATGACAAG”15个碱基,3'端依次添加终止密码子和XhoI、KpnI酶切位点。将SEQ ID NO:4所示基因序列送公司(苏州金唯智生物科技有限公司)合成,并通过EcoRI和KpnI两个酶切位点与表达载体pPICZ $\alpha$ A连接,连接体系为:pPICZ $\alpha$ A 20ng,

rMytichitin-CB 8ng, T4连接酶0.8 $\mu$ L, 总体系12 $\mu$ L, 4 $^{\circ}$ C, 4h。

[0074] 将连接成功的重组质粒转化至大肠杆菌感受态细胞中进行扩增。利用限制性内切酶EcoRI和KpnI进行双酶切验证。

[0075] 验证正确的菌株进行测序分析, 测序正确即可获得重组质粒pPICZ $\alpha$ A-rMytichitin-CB。

[0076] (2) 构建重组菌株

[0077] 目的基因电击转入毕赤酵母GS115——参考Lin等(2005)中的电转方法进行(J.Lin-Cereghino, W.W.Wong, S.Xiong, W.Giang, L.T.Luong, J.Vu, S.D.Johnson, G.P.Lin-Cereghino, Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *Biotechniques* 38 (2005), 44, 46, 48.)。

[0078] 目的基因电击转入毕赤酵母——参考J.Lin et al. (2005)中的电转方法进行。首先将重组质粒pPICZ $\alpha$ A-rMytichitin-CB用Sac I进行单酶切(单一酶切位点)。酶切体系为: 10 $\times$ Buffer 20 $\mu$ L; Sca I酶2.5 $\mu$ L; pPICZ $\alpha$ A-rMytichitin-CB 1.5 $\mu$ g; 无菌水补至总体积200 $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C酶切4h, 然后用DNA产物纯化试剂盒进行纯化。将纯化后的线性化质粒(1-2 $\mu$ g)电转化入GS115感受态细胞。电转参数: 电转杯2mm, 电压1500kV, 电容25 $\mu$ F, 电阻200 $\Omega$ 。涂至含有Zeocin(100 $\mu$ g/mL)的YPDS板, 30 $^{\circ}$ C恒温箱培育2-3d至单菌落长出。

[0079] PCR验证阳性转化子——挑取6-10个长势较好的的单克隆于30 $\mu$ L 0.2%的SDS中, 沸水浴10min, 12000g离心10min, 取上清为PCR模板。PCR验证体系为: 10 $\times$ Buffer 2 $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub>(25mM) 1.2 $\mu$ L, dNTPS(2.5mM) 2 $\mu$ L, 5mM上游引物(5'-GAAGCTGTCATCGGTTACTCA-3') 0.5 $\mu$ L, 5mM下游引物(5'-TCCGCACAAACGAAGTC-3') 0.5 $\mu$ L, 25%Triton X-100 0.8 $\mu$ L, 模板1 $\mu$ L, DNA聚合酶0.4 $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O补至总体系20 $\mu$ L; PCR反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 8min, 95 $^{\circ}$ C 45s, 57 $^{\circ}$ C 30s、57 $^{\circ}$ C 30s、72 $^{\circ}$ C 40s、72 $^{\circ}$ C 10min(35个循环), 16 $^{\circ}$ C 90min。PCR结束后通过琼脂糖凝胶电泳验证, 在216bp附近出现阳性条带即为阳性转化子。

[0080] 阳性转化子诱导表达条件的确定——采用250mL三角瓶, 挑取rMytichitin-CB抗菌肽的表达菌株于30mL BMGY培养基中, 28 $^{\circ}$ C, 220rpm摇床培养, 待OD<sub>600</sub>达到6-8时, 把BMGY培养基等体积更换为BMMY培养基, 28 $^{\circ}$ C, 220rpm摇床培养, 每24h补充经过滤除菌的100%甲醇, 使不同的三角瓶中的甲醇浓度分别为0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 连续培养至96h, 诱导结束后, 通过Tricine-SDS-PAGE以及银染确定诱导最佳甲醇浓度为2%, 结果如图2。

[0081] 挑取阳性转化子于30mL/60mL(250mL/500mL锥形瓶) BMGY培养基(甘油为唯一碳源)中, 28 $^{\circ}$ C、220r/min培养。OD<sub>600</sub>达到6-8后, 将BMGY培养基更换为等量BMMY培养基(甲醇为唯一碳源), 28 $^{\circ}$ C、220r/min继续培养。每隔24h添加经过滤除菌的100%甲醇至终体积为2.0%, 并取样离心, 保存样品的发酵液上清, 连续培养至120h, 最后将所有样品一起进行Tricine-SDS-PAGE以及银染实验, 确定最佳诱导时长为120h, 结果如图3。

[0082] Elisa法测定目的蛋白浓度——取发酵液上清用包被液(1.6g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2.9g NaHCO<sub>3</sub>, 加H<sub>2</sub>O至1L, 调pH至9.6, 过膜除菌)稀释20倍, 取200 $\mu$ L加入96孔板中, 4 $^{\circ}$ C过夜包被, PBST溶液(0.05%Tween-20的PBS溶液)清洗3次。用5%PBST-牛奶溶液常温孵育2h封闭特异性结合位点, PBST溶液清洗3次。一抗使用his-tag, 稀释2000倍, 每孔加入100 $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C孵育1h, 用PBST溶液清洗3次。二抗使用HRP-Goat-anti-mouse, 稀释5000倍, 每孔加入100 $\mu$ L, 37



℃孵育1h,用PBST溶液清洗3次。每孔加入150μL TMB显色液,室温避光显色30min,加入50μL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止液终止反应,使用酶标仪测定OD<sub>450</sub>值,代入标曲公式,计算蛋白浓度值,确定经过2.0%甲醇诱导120h后的上清液中目的蛋白rMytichitin-CB的含量可达63.7μg/mL。

[0083] 镍柱亲和纯化——取50mL rMytichitin-CB发酵液上清过膜除菌后置换为等量结合液(300mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,10mM咪唑,pH=7.4),加入到填充有1mL beads (Ni Sepharose 6 Fast Flow)的20mL Bio-Rad柱中,于4℃100rpm/min摇床结合过夜。分别用含20mM,40mM,60mM咪唑的5mL漂洗液(300mM NaCl,20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)依次洗脱杂蛋白,最后用含500mM咪唑的1mL洗脱缓冲液洗脱纯化柱,洗脱5次,收集洗脱液,得到单一目的蛋白条带,如图4中泳道2、3、4、5、6所示。经过2.0%甲醇诱导120h后的1L发酵液上清中目的蛋白产量达到9.12mg。

[0084] 实施例2 rMytichitin-CB抗菌肽性能测定

[0085] 最小抑菌浓度MIC值的测定——将上述纯化后的抗菌肽rMytichitin-CB真空冷冻干燥成粉末状,用无菌Tris-HCl缓冲液(50mM Tris,100mM NaCl pH 7.4)溶解后,将浓度分别稀释到2μg/mL、4μg/mL、6μg/mL、12μg/mL,分别取20μL加入96孔板的不同孔中,做三个平行;另设置20μL浓度为6μg/mL的庆大霉素。受试菌37℃摇床培养至OD<sub>600</sub>为1.0-1.5,稀释至2-5×10<sup>7</sup>CFU/mL,取100μL加入上述孔中。设置100μL无菌培养基加20μL无菌Tris-HCl缓冲溶液为阳性对照,100μL菌液加20μL无菌Tris-HCl缓冲溶液为阴性对照,做三个平行。全部加完后将该96孔板用封口膜封好放置37℃、220rpm摇床培养约12-16h后用酶标仪测定OD<sub>600</sub>,阳性对照的OD<sub>600</sub>值记作A<sub>1</sub>,阴性对照的OD<sub>600</sub>值记作A<sub>0</sub>,处理组的OD<sub>600</sub>值记作A,按式(1)计算庆大霉素和抗菌肽的抑制率。计算结果时,首先计算6μg/mL的庆大霉素的抑制率,当抑制率高于90%时,此次结果可靠。抑制率大于90%时的抗菌肽处理组浓度即为该抗菌肽对此细菌的最小抑菌浓度(MIC)。

$$[0086] \quad \text{抑制率} = \frac{A_0 - A}{A_0 - A_1} \times 100\% \quad \text{式(1)}$$

[0087] 结果如表1所示,对金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)、单增李斯特菌(ATCC 21633)、沙门氏菌(ATCC 10467)、荧光假单胞菌(CGMCC 1.1802)、枯草芽孢杆菌L300-1、产气杆菌、大肠杆菌0157(ATCC 35150)、坂崎肠杆菌及大肠埃希氏菌(ATCC 10305)的最小抑菌浓度分别为4、4、6、6、6、6、6、12、12μg/mL。

[0088] 表1 rMytichitin-CB对标准受试菌的最小抑菌浓度(MIC) 试验

[0089]

受试菌	抑制率 (%)			
	rMytichitin-CB ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	2	4	6	12
金黄色葡萄球菌 (ATCC 25923)	24.57	97.93	99.30	99.86
单增李斯特氏菌(ATCC 221633)	38.01	98.59	99.04	100
沙门氏菌 (ATCC 10467)	0	87.77	98.29	99.29
荧光假单胞菌 (CGMCC 1.1802)	0	80.26	99.07	99.89
枯草芽孢杆菌 L300-1	4.41	63.94	93.96	100
产气杆菌	0	49.37	94.06	99.58
大肠杆菌 O157 (ATCC 35150)	12.47	33.41	99.87	99.63
坂崎肠杆菌	31.69	38.95	63.17	99.91
大肠埃希氏菌 (ATCC 10305)	0	28.75	77.36	99.89
粪肠球菌	0	4.88	53.82	87.42

[0090] 抑菌圈实验——将耐药菌株(9株从猪病变脏器中分离的大肠菌以及大肠分离耐药菌、沙门分离耐药菌、金葡分离耐药菌、链球菌、副猪嗜血弧菌、巴氏杆菌),培养受试菌至 $OD_{600}$ 达到1.0左右,稀释至 $2 \times 10^5$ - $2 \times 10^7$ CFU/mL,取500 $\mu\text{L}$ 均匀涂布于LB平板上,用直径6mm的无菌打孔器打孔。分别取50 $\mu\text{L}$ 发酵液上清(rMytichitin-CB浓度为52.8 $\mu\text{g/mL}$ )及纯化后的rMytichitin-CB样品(50 $\mu\text{g/mL}$ )加入孔内,对照组分别是50 $\mu\text{L}$ 的盐酸林可霉素(50 $\mu\text{g/mL}$ ),粘杆菌素(50 $\mu\text{g/mL}$ ),环丙沙星(50 $\mu\text{g/mL}$ ),头孢噻唑钠(50 $\mu\text{g/mL}$ ),37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养16-18h后,可观察抑菌圈。结果如图5,说明无论是培养液上清还是纯化后的rMytichitin-CB都表现出对9种病变脏器分离株及大肠分离耐药菌株、沙门分离耐药菌、金葡分离耐药菌、链球菌、副猪嗜血弧菌及巴氏杆菌15种耐药菌株具有一定的抑菌活性,而盐酸林可霉素,粘杆菌素,环丙沙星,头孢噻唑钠对15种耐药受试菌株的抑菌活性具有选择性。结果说明抗菌肽rMytichitin-CB代替抗生素的具有一定的可能性。

[0091] 温度处理:将发酵液上清过0.22 $\mu\text{m}$ 的水系滤膜,分别置于6个无菌离心管中,每管20mL,封好放于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱(3管)和室温环境(3管)下,每隔一定的日期对发酵液上清进行Elisa定量,然后将发酵液上清稀释至rMytichitin-CB的浓度为6 $\mu\text{g/mL}$ ,检测其对金黄色葡萄球菌的抑制效率(20 $\mu\text{L}$ 肽液+100 $\mu\text{L}$ 浓度为 $2-5 \times 10^7$ CFU/mL的菌液),结果如表2所示,可见含rMytichitin-CB的发酵液上清在4 $^{\circ}\text{C}$ 及常温下可较长时间保存,低温较常温更有利于rMytichitin-CB的长期存放;

[0092] 表2低温及常温对rMytichitin-CB活性的影响

[0093]

时长	抑制率 (%) (4℃)	抑制率 (%) (室温)	时长	抑制率 (%) (4℃)	抑制率 (%) (室温)
1 d	>99	>99	45 d	>99	>99
3 d	>99	>99	60 d	>99	98
7 d	>99	>99	90 d	98	95
15 d	>99	>99	120 d	96	90
30 d	>99	>99	180 d	94	82

[0094] 将发酵液上清过膜,取1mL置于直径为25mm的玻璃平皿和EP管中,平皿和EP管分别设置4组,每组3个平行。

[0095] 将玻璃平皿放置于不同温度(40、60、80、100℃)的烘箱中烘干,在超净台中用1mL无菌水溶解,Elisa定量后,将稀释至rMytichitin-CB的浓度分别为6、12、60μg/mL,分别检测其对金黄色葡萄球菌的抑制效率(20μL肽液+100μL浓度为 $2-5 \times 10^7$ CFU/mL的菌液)。

[0096] 将EP管置于金属浴上,分别在40、60、80、100℃下加热2h,稀释rMytichitin-CB的浓度至6μg/mL,检测其对金黄色葡萄球菌的抑制效率(20μL肽液+100μL浓度为 $2-5 \times 10^7$ CFU/mL的菌液)。

[0097] 结果如图6所示,从图中可知,rMytichitin-CB对温度具有较好的耐受性,水浴加热对rMytichitin-CB的影响较小,烘干处理不利于rMytichitin-CB的稳定性。

[0098] pH处理:用pH分别为2、4、6、8、10的不同缓冲液溶解抗菌肽至30μg/mL,37℃处理4h后做抑菌圈实验(采用金黄色葡萄球菌作为受试菌株,具体过程同前述“抑菌圈实验”)。结果如图7(a),说明经不同pH溶液处理后的rMytichitin-CB与对照(未经pH处理的rMytichitin-CB,即用Tris-HCl(pH7.4)溶液溶解后的rMytichitin-CB)相比抑菌圈直径无显著性差异,均为17mm左右。

[0099] 蛋白酶处理:分别用pH=2的Glycine-HCl,pH=6的PBS,pH=7的PBS,pH=8的Tris-HCl溶解rMytichitin-CB至30μg/mL,并分别加入胃蛋白酶(pH=2)、木瓜蛋白酶(pH=6)、蛋白酶K(pH=7)、胰蛋白酶(pH=8)各0.126U,37℃处理2h后做抑菌圈实验(采用金黄色葡萄球菌作为受试菌株,具体过程同前述“抑菌圈实验”)。结果如图7(b),说明经胃蛋白酶、蛋白酶K和胰蛋白酶处理后的抑菌圈与对照(未经酶处理的rMytichitin-CB,即用Tris-HCl(pH7.4)溶液溶解后的rMytichitin-CB)无显著性差异。木瓜蛋白酶处理后的抑菌圈为对照的79%。

[0100] 上述采用发酵液上清测定的特性,与采用同等rMytichitin-CB浓度的rMytichitin-CB纯品相同。

[0101] 溶血活性研究——通过眼球取血方法获得小鼠新鲜血液,用真空采血管采取人和鸡的新鲜血液,1500rpm,离心10min,去除血清,收集红细胞。将红细胞用10mM的PBS(PH=7.4)洗三遍,1500rpm离心10min,以彻底清除血清。将收集到的红细胞用10mM的PBS(PH=7.4)稀释到4%(v/v)的浓度,每个EP管中加入90μL。取1、5、10、50、100、200μg/mL的rMytichitin-CB各10μL分别加入上述红细胞中,取0.2%的Triton×100和10mM的PBS(PH=7.4)各10μL加入稀释好的红细胞中分别作为阳性对照和阴性对照。然后放入含有5%CO<sub>2</sub>培

养箱中培养1h。1500rpm/min离心10min,对其进行拍照后取上清加入到96孔板中,575nm处测吸光值。根据公式计算出溶血率。

[0102] 结果如图8所示,(a)图显示了当rMytichitin-CB的浓度低于5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对于人的红细胞不具备溶血性,在最大浓度200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,rMytichitin-CB对人的红细胞的溶血性达到14%。(b)图显示了rMytichitin-CB在浓度低于50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对小鼠的红细胞不具有溶血性,在最大浓度200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时只有不到1.5%的溶血性;(c)图显示了rMytichitin-CB在最大浓度200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对鸡只有不到1%的溶血性。因此,此研究表明了抗菌肽rMytichitin-CB人红细胞和小鼠红细胞及鸡红细胞的溶血活性小。

[0103] 实施例3保鲜实验

[0104] 各指标测定方法:

[0105] (1) 感官评价——根据GB 2707—2016《食品安全国家标准鲜(冻)畜、禽产品》中对感官要求的规定,将样品放置于白色底盘中,感官评价员在自然光下按下表对样品进行评分,满分10分。

[0106] 感官评分表

[0107]

感官指标	分值(分)			
[0108]	8~10 (一级鲜)	6~7.9 (二级鲜)	3~5.9 (轻微变质)	0~2.9 (变质)
色泽	鲜(亮)红	微红(褐)色	暗红(褐)色	灰白色
气味	良好	可接受	很难接受	完全不能接受
组织状态	有弹性,不黏手	弹性不足,汁液少量	松弛,汁液量较多	粘手,汁液量多
整体	鲜猪肉,极佳	良好,可接受	稍不能接受	很难接受

[0109] (2) 菌落总数——按照GB 4789.2—2016《食品微生物学检验菌落总数测定》中的方法,作适当调整,对不同贮藏时间下的肉样进行菌落总数测定。每天定时随机取样,每个处理组分别取5g肉样置于50mL离心管中,用25mL生理盐水对其作均质处理,按10倍系列梯度稀释均质液后,根据对样品污染状况的估计,取2~3个稀释度(包括原液)涂布于PCA平板,每个稀释度涂布2个平板,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养24~36个小时,选取菌落数在30~300个之间、无蔓延菌落生长的平板计数(菌落总数越高,腐败程度越大)。

[0110] (3) pH的测定——按照GB 5009.237—2016《食品pH值的测定》中的方法,作适当调整,对不同贮藏时间下的肉样进行pH测定。在室温约20 $^{\circ}\text{C}$ 的环境下,分别用pH为4.01和7.00的标准缓冲液校正pH计,然后将pH计探头放入均质液中,待数值稳定后,直接读数(pH值高于6.2时,为变质肉)。

[0111] (4) 汁液流失率的测定——每天定时固定选取样品,在称重之前,先用灭菌后的吸水纸吸除表面水分,然后放于千分之一天平上,称量样品质量,精确至小数点后三位,按以下公式进行计算(汁液流失率越大,保鲜效果越差)。

[0112] 汁液流失率(%) = (初始质量 - 取样时质量) / 初始质量 \* 100%

[0113] (5) 挥发性盐基氮的测定——按照GB 5009.228—2016《食品中挥发性盐基氮的测定》中第二法自动凯氏定氮仪法,对不同贮藏时间下的肉样进行菌落总数测定。每个处理组分别取2g肉样置于50mL离心管中,用10mL无菌水对其作均质处理,将纱布过滤后的滤液加于蒸馏管内,打开全自动凯氏定氮仪,先测定空白对照值,然后向含有样品的蒸馏管中加入1g氧化镁,将其连接到蒸馏器上,测定TVBN值(TVBN值越高,腐败程度越大,TVBN值高于15mg/100g时,为变质肉)。

[0114] (6) 硫代巴比妥酸的测定——取2g肉样研细,加10mL 7.5%的三氯乙酸(含0.1% EDTA),研磨后振摇30分钟,双层滤纸过滤两次。取5mL上清液于15mL离心管中,再向其加入5mL 0.02mol/L的2-硫代巴比妥酸溶液,充分混匀后,在沸水浴中温浴60分钟,取出样品,室温冷却1小时后,1600rpm离心5分钟,吸取上清液,与5mL氯仿混匀,静置分层后取上清液,测定上清液在532nm和600nm处的吸光值,并根据以下公式进行计算(TBARS值以每100g肉中丙二醛(MDA)的mg数来表示)(TBARS值越高,脂肪酸败程度越高)。

[0115] TBARS值(mg/100g) =  $(A_{532} - A_{600}) / 155 / 10 \times 72.6 \times 100$

[0116] (7) 组织学分析——使用苏木精-伊红(H&E)染色方法。取已用福尔马林浸泡24小时的样品,用流水冲洗1h以上。梯度酒精脱水,二甲苯透明,浸蜡。将组织放入包埋盒,以最大切面朝下,轻轻压平。切片时,调节厚度控制器,在10-30 $\mu$ m进行蜡块粗修,组织平面完全暴露。调至3 $\mu$ m厚度,进行切片。将切下的蜡片置于展片机水面上,全面展开,将无刀痕、无折叠、无气泡、完整切片粘附在洁净载玻片上。水温在40-50 $^{\circ}$ C之间。捞片后吸去载玻片上多余水分。在65-75 $^{\circ}$ C的干燥箱内或者烤片台上放置至少1h。依次用透明脱蜡液(I)(II)(III)脱蜡,各15min。用无水乙醇(I)处理5min,无水乙醇(II)处理3min。95%和85%乙醇各3min,75%乙醇1min。水洗2min。苏木精染色5min。水洗5s。1%盐酸乙醇分化1s。水洗15s。1%氨水1min。水洗1min。伊红染3min。水洗15s。95%乙醇1s。无水乙醇(I)10s;无水乙醇(II)1min。透明脱蜡液(I)(II)(III)依次透明10min。封片剂封固。进行拍照。

[0117] rMytichitin-CB抗菌肽的防腐保鲜应用——用无菌水将rMytichitin-CB抗菌肽稀释至4、6、12 $\mu$ g/mL浓度制备保鲜液,过0.22 $\mu$ m水膜后置于无菌烧杯中,每个烧杯含有100mL溶液,每组三个平行。阴性对照组为无菌水,阳性对照为50 $\mu$ g/mL的Nisin。

[0118] 先将当天清晨购买的新鲜精后腿肉的猪皮、皮下脂肪、筋腱和暴露于空气中的表层瘦肉去除,再将其分割成若干个5g的肉块,置于上述保鲜液中浸泡3~5分钟,并保证每块肉样得到充分浸润。浸泡结束,将肉样取出放到洁净的保鲜膜上晾干5分钟,然后将其翻面,再晾干5分钟。晾干完成后,将肉样分装到盘中,用保鲜膜封闭后,置于4 $^{\circ}$ C冰箱中冷藏,每隔24小时进行感官评价,并取样检测菌落总数、pH以及TVBN等指标的变化。

[0119] 从表3和图9中可以看出,水处理组、50 $\mu$ g/mL Nisin处理组与4 $\mu$ g/mL rMytichitin-CB处理组在贮藏至第4天时,感官评分低于6分,猪肉样品表面有黏腻感,气味发酸,发生轻微变质,而6、12 $\mu$ g/mL rMytichitin-CB处理组样品状态保持良好,评分高于6分。图10为各处理组在贮藏期间内五种理化指标的变化情况,从图中可以看出,rMytichitin-CB抗菌肽具有较好的防腐保鲜效果,并且随着抗菌肽浓度的增加,防腐能力增强。

[0120] 表3 rMytichitin-CB处理下的鲜猪肉在贮藏期内的感官评分结果

[0121]

天数	H <sub>2</sub> O	50 μg/mL Nisin	4 μg/mL CB	6 μg/mL CB	12 μg/mL CB
1 d	8.5±0.5 <sup>a</sup>	9.16±0.28 <sup>b</sup>	9.33±0.28 <sup>bc</sup>	9.66±0.28 <sup>bc</sup>	9.83±0.28 <sup>c</sup>

[0122]

2 d	7±0.5 <sup>a</sup>	8.33±0.28 <sup>b</sup>	7.83±0.28 <sup>b</sup>	9.16±0.28 <sup>c</sup>	9.33±0.28 <sup>c</sup>
3 d	6.16±0.28 <sup>a</sup>	7±0.86 <sup>a</sup>	7±0.5 <sup>a</sup>	8.16±0.76 <sup>b</sup>	8.16±0.28 <sup>b</sup>
4 d	5.16±0.28 <sup>a</sup>	5.5±0.5 <sup>a</sup>	5.66±0.28 <sup>a</sup>	7.33±0.28 <sup>b</sup>	7.66±0.28 <sup>b</sup>
5 d	3.83±0.28 <sup>a</sup>	4.83±0.28 <sup>b</sup>	5.16±0.57 <sup>b</sup>	6.33±0.28 <sup>c</sup>	6.66±0.28 <sup>c</sup>
6 d	2.66±0.57 <sup>a</sup>	3.33±0.28 <sup>b</sup>	3.83±0.28 <sup>b</sup>	5.33±0.28 <sup>c</sup>	5.66±0.28 <sup>c</sup>
7 d	2.16±0.28 <sup>a</sup>	2.33±0.28 <sup>a</sup>	3.16±0.28 <sup>b</sup>	4.5±0.5 <sup>c</sup>	4.83±0.57 <sup>c</sup>
8 d	—	—	—	—	—

[0123] 注：(1) 同行间不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )，相同字母表示差异不显著 ( $P > 0.05$ )；

[0124] (2) “—”表示鲜猪肉已完全变质。

[0125] 微生物侵染鲜猪肉腐败模型——挑取单菌落(分别用金黄色葡萄球菌和大肠杆菌0157)于10mL LB液体培养基中,37度摇床振荡培养至OD600=0.8左右,稀释10000倍,置于4度冰箱,备用;将精后腿肉分割成3g的样品,总共24块,将其随机分成6组,每组4小块。向第1~5组的肉样上分别均匀注射60μL的菌悬液(细菌数约为 $6.3 \times 10^3$ CFU),再依次向前四组的肉样上继续注射5、10、15、20μg(终体积为140μL)的rMytichitin-CB,作实验组;向第5组的肉样上继续注射140μL无菌水,作阴性对照;向第6组的肉样上均匀注射200μL无菌水,作阳性对照;将肉样置于玻璃盘中,保鲜膜封闭,37℃存放24小时,对其进行感官评价、菌落计数和组织学分析。从图11和图12中可以看出,rMytichitin-CB可有效减少鲜猪肉腐败模型中金黄色葡萄球菌和大肠杆菌0157的数量,随着抗菌肽剂量的增加,猪肉的腐败程度也随之降低;从组织学上分析,也可看出随着抗菌肽剂量的增加,肌肉组织的完整性越好,20mg/3kg的rMytichitin-CB处理组效果最好,在此处理下的肌肉组织状态与未接种细菌的无菌水处理组相接近。

[0126] 复配保鲜实验——将rMytichitin-CB、Nisin以及壳聚糖三者进行复配,研究复配保鲜剂的防腐能力。复配保鲜液的溶剂为1%醋酸,复合保鲜液1的配方为每毫升溶液中含有4μg rMytichitin-CB、300μg Nisin以及10mg壳聚糖;复合保鲜液2的配方为每毫升溶液中含有6μg rMytichitin-CB、600μg Nisin以及20mg壳聚糖;复合保鲜液3的配方为每毫升溶液中含有12μg rMytichitin-CB、600μg Nisin以及10mg壳聚糖。

[0127] 取以上复配保鲜液各100mL置于无菌烧杯中,无菌水处理组和1%醋酸处理组做对照。将新鲜分割的肉块(3g/块)浸泡于上述溶液中3~5分钟,并保证每块肉样得到充分浸润。浸泡结束,将肉样取出放到洁净的保鲜膜上晾干5分钟,然后将其翻面,再晾干5分钟。晾干完成后,将肉样分装到盘中,用保鲜膜封闭后,置于4℃冰箱中冷藏,每隔24小时进行感官评价,并取样检测菌落总数、pH以及TVBN等指标的变化。

[0128] 从图13中可以看出,经三组复合保鲜液处理后的鲜猪肉在贮藏期间,各指标均优于两个对照组。菌落总数和TVBN值是判断肉类能否继续食用的最重要指标,如图13(a)所

示,当肉样中菌落总数的对数值大于4.0时,不可食用,水处理在第5天时菌落总数对数值超过4.0,1%醋酸处理组在第7天时菌落总数对数值超过4.0,三组复合保鲜液则是在贮藏第11天时,才超过4.0;图13(d)是各处理组样品在贮藏期间TVBN值的变化趋势图,水处理在第5天时TVBN值超过了国家标准的上限15mg/100g,为变质肉,1%醋酸处理组在第7天时TVBN值超过限定,三组复合保鲜液则是在贮藏第9天时,才超过国家标准;汁液流失率、pH值以及TBARS值三个指标越高,腐败程度越是严重,从图13(b)、(c)和(e)中,可以看出三组复合保鲜液处理组的值均明显低于两个对照组。以上结果表明了复合保鲜液有效抑制了微生物的繁殖,减缓了蛋白质和脂质的氧化进程,起到了显著的防腐保鲜效果,较水处理组延长贮藏期4~6天,较1%醋酸处理组延长贮藏期2~4天。

[0129] 本文虽然已经给出了本发明的一些实施例,但是本领域的技术人员应当理解,在不脱离本发明精神的情况下,可以对本发明的实施例进行改变。上述实施例只是实例性的,不应以本文的实施例作为本发明权利范围的限定。





Phe Tyr Thr Asp Thr Cys Asp Lys Asn Val Phe Tyr Arg Cys Val Trp  
 20 25 30  
 Gly Arg Pro Val Lys Lys His Cys Gly Arg Gly Leu Val Trp Asn Pro  
 35 40 45  
 Arg Gly Phe Cys Asp Tyr Ala  
 50 55

<210> 4

<211> 228

<212> DNA

<213> 人工序列()

<400> 4

gaattcggat ccatgcatca tcatcatcat catgatgacg atgacaagac cgtgaaatgc 60  
 ggtatgaatg gtaaaatgcc gtgcaaacat ggtgcctttt ataccgatac ctgcgataaa 120  
 aatgtgtttt atcgttgcgt gtggggtcgt ccggtgaaaa aacattgcgg tcgtggtctg 180  
 gtgtggaatc cgcgtggttt ttgcgattat gcctgactcg aggttacc 228

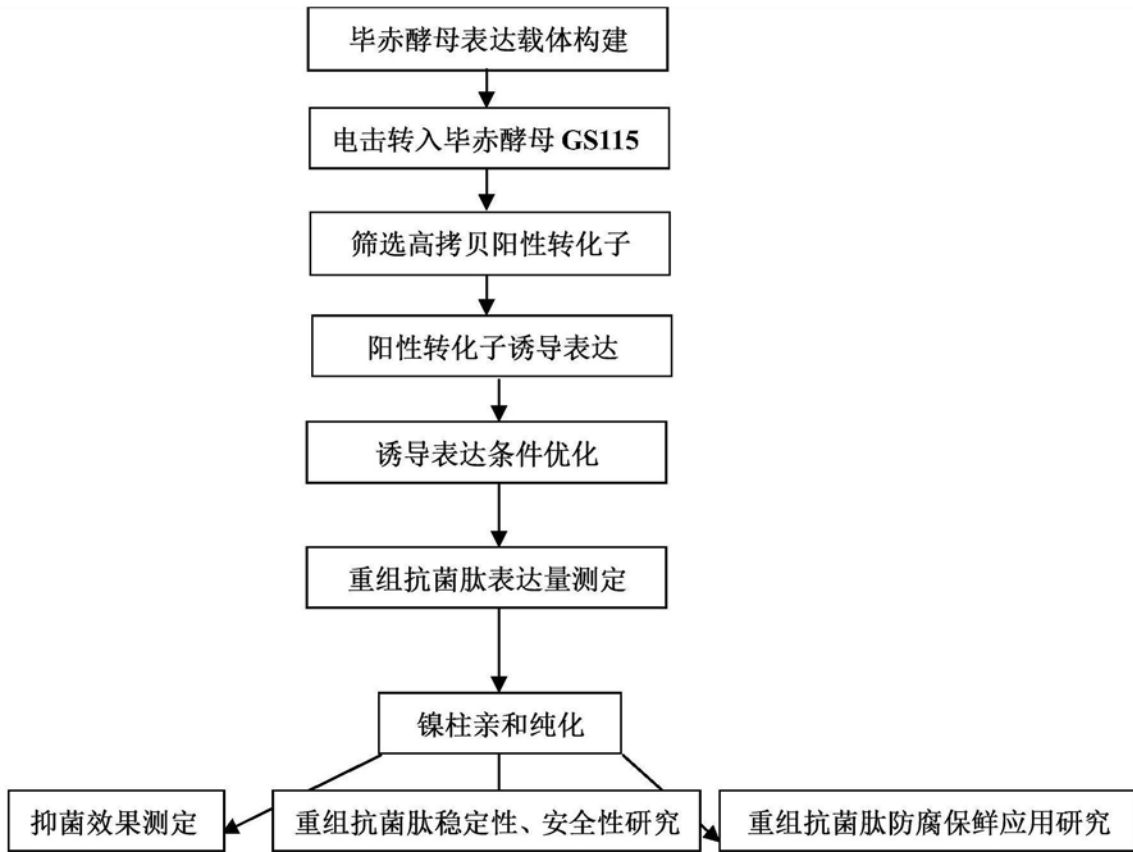


图1

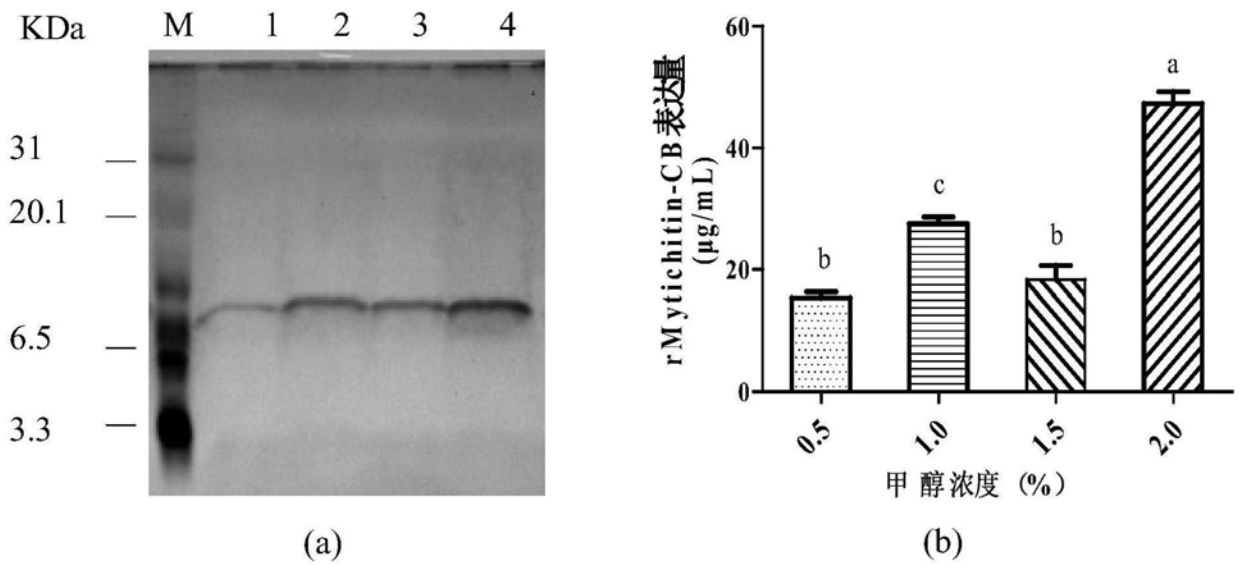


图2

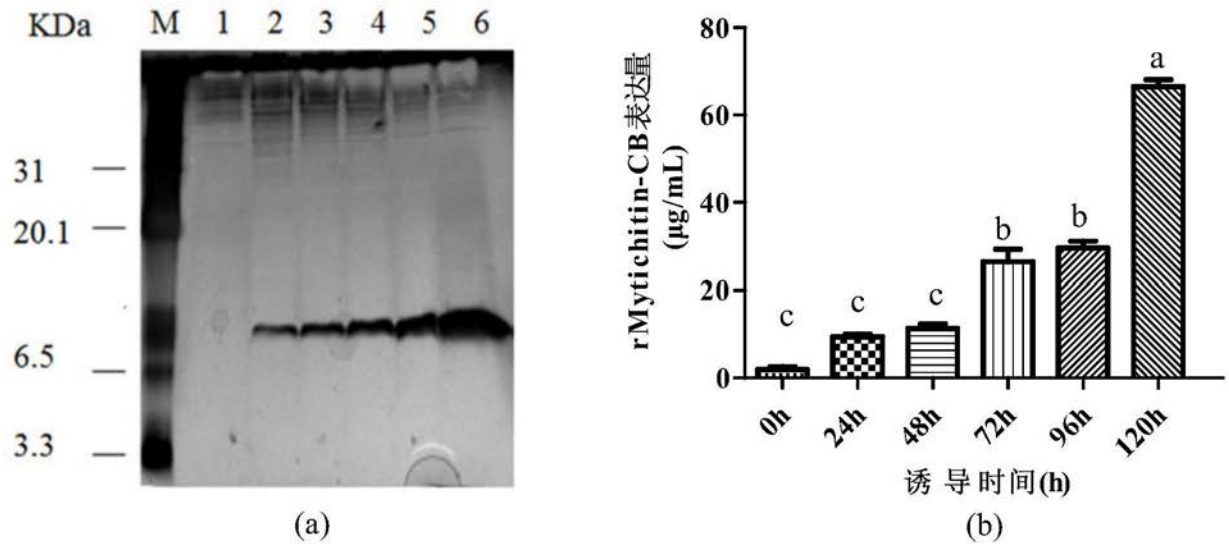


图3

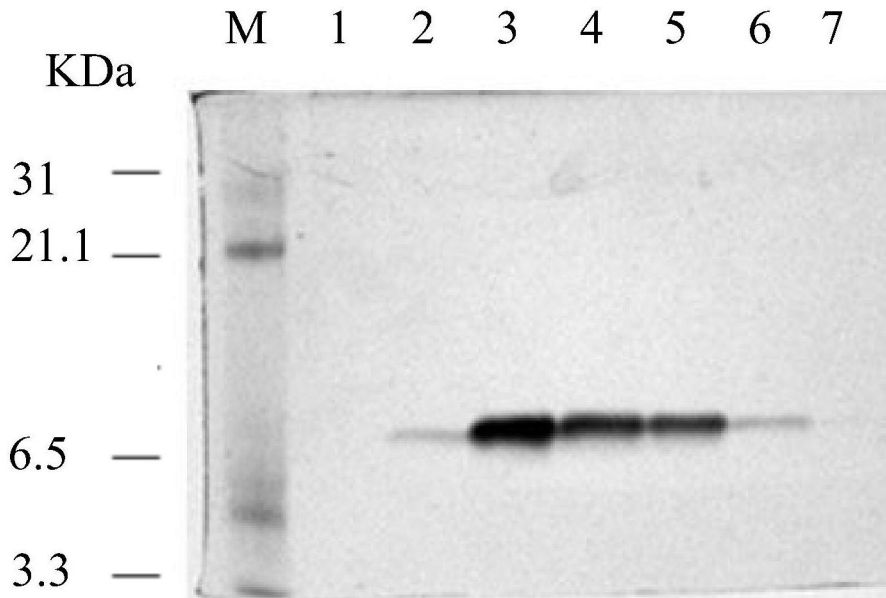


图4

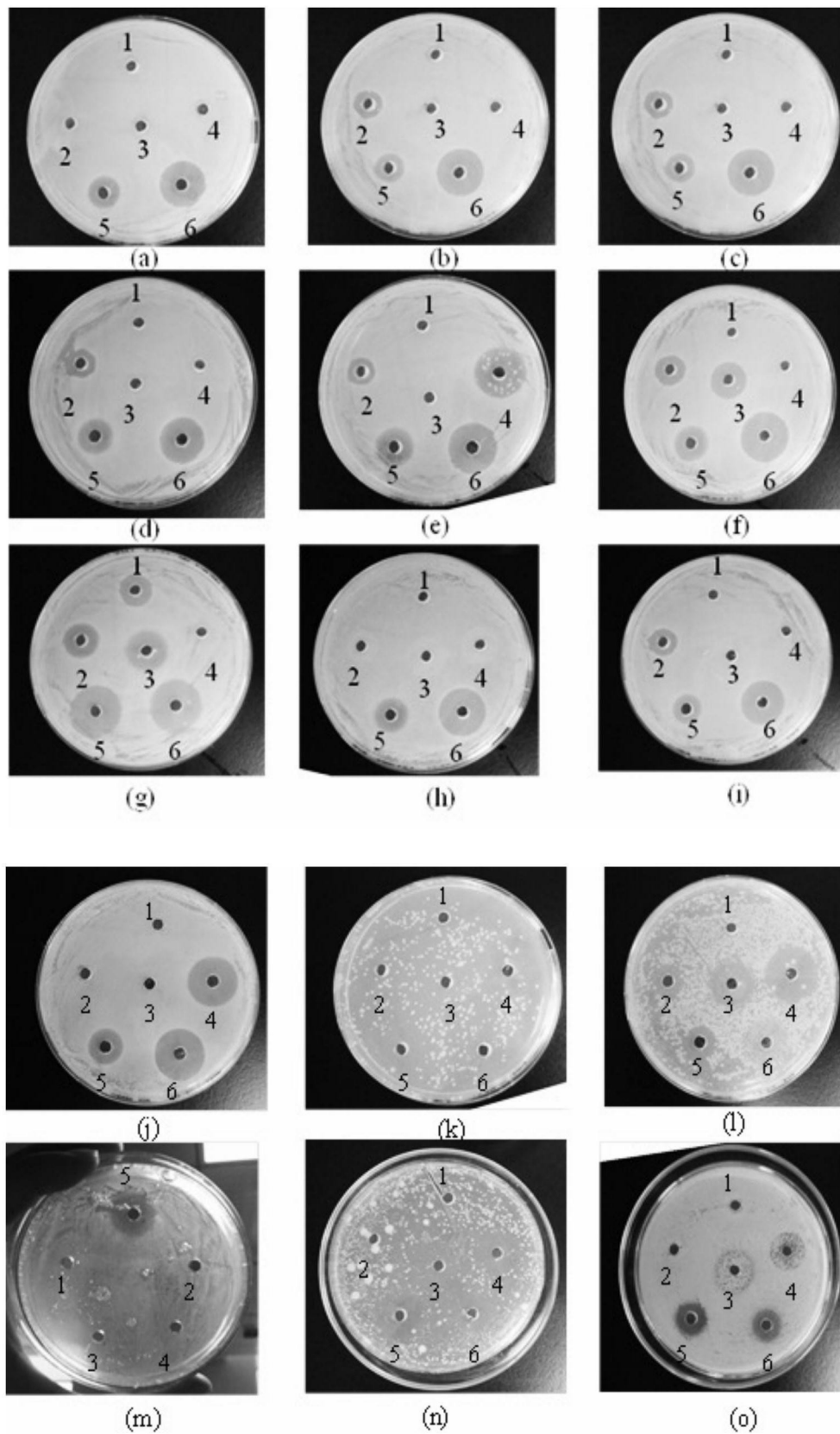


图5

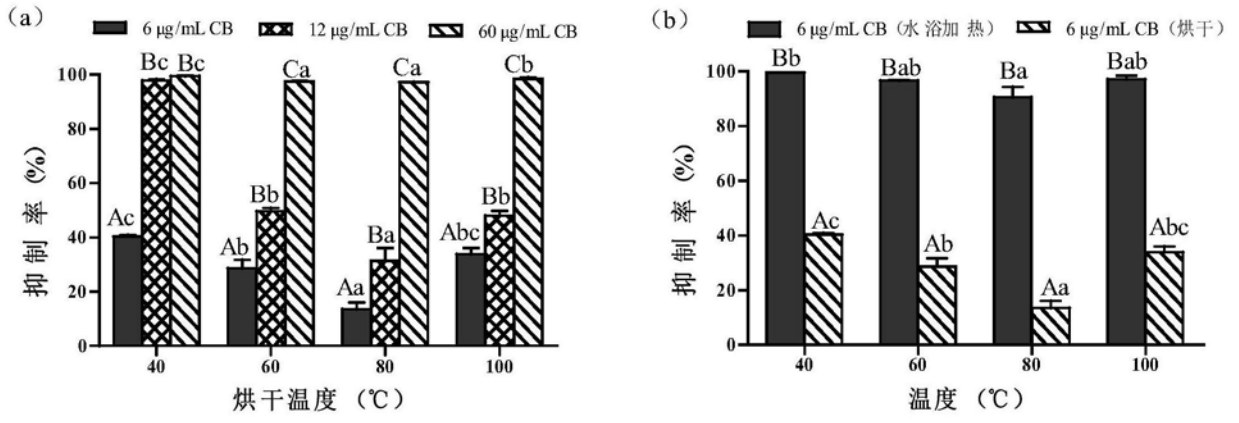


图6

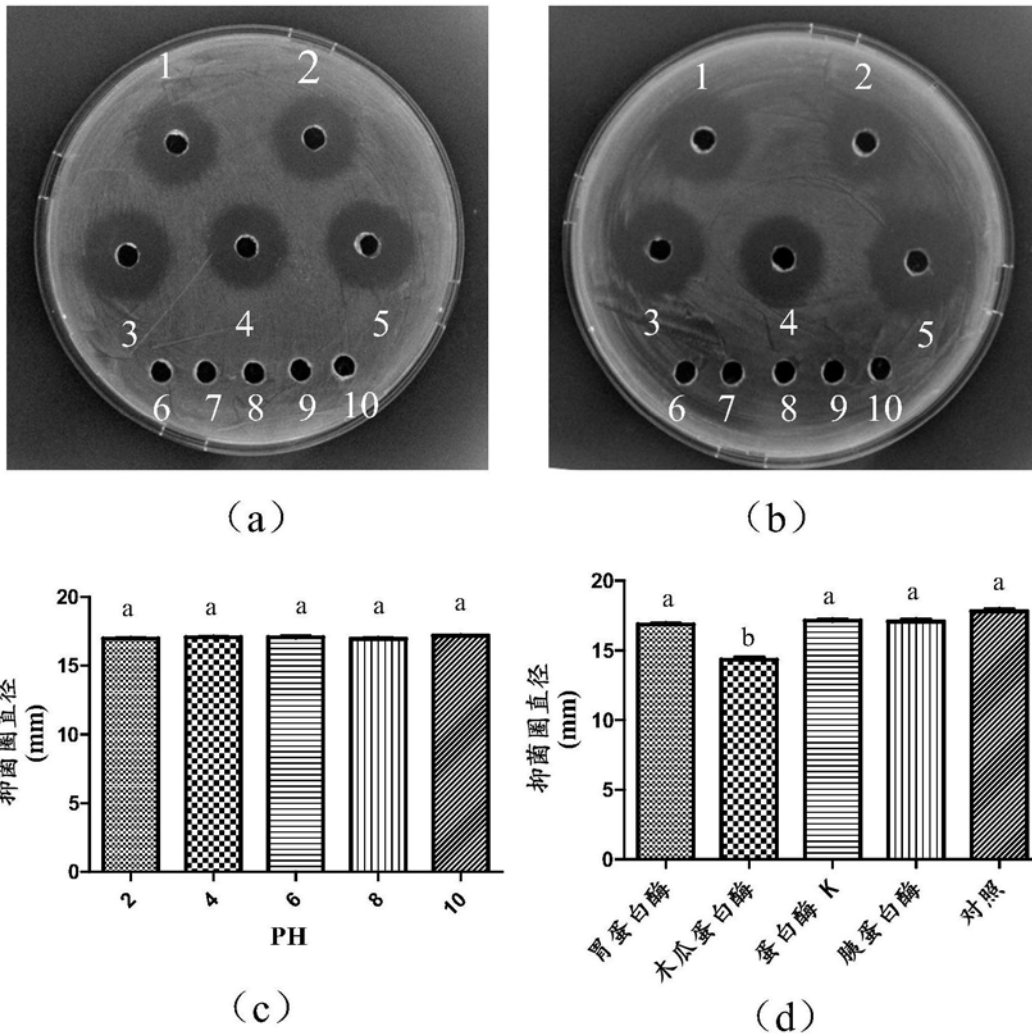
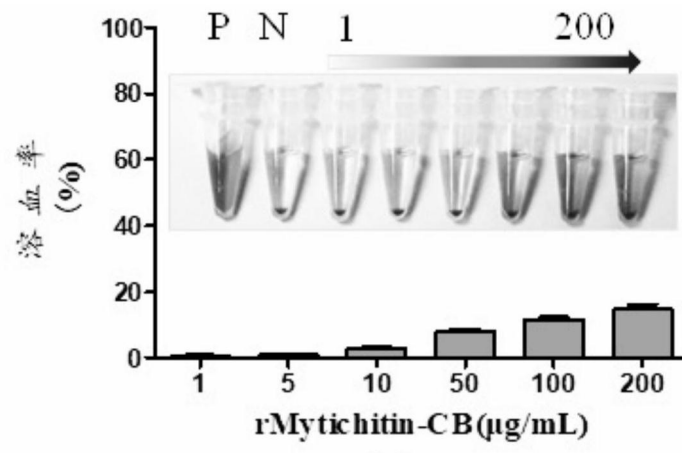
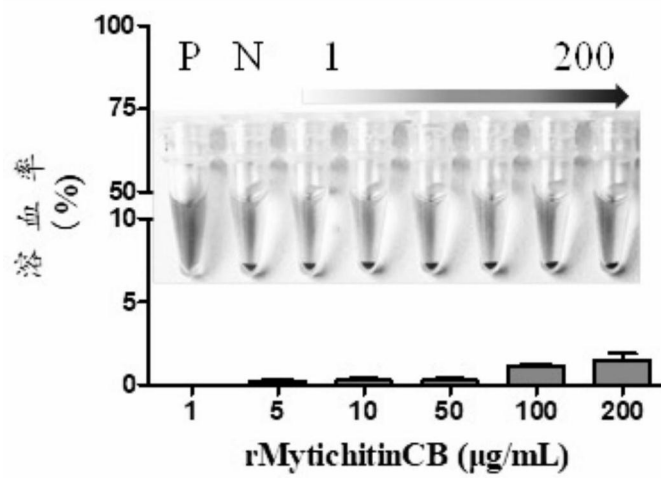


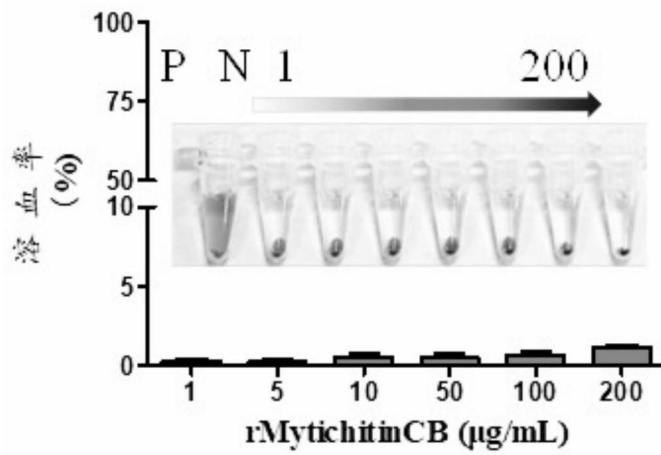
图7



(a)



(b)



(c)

图8

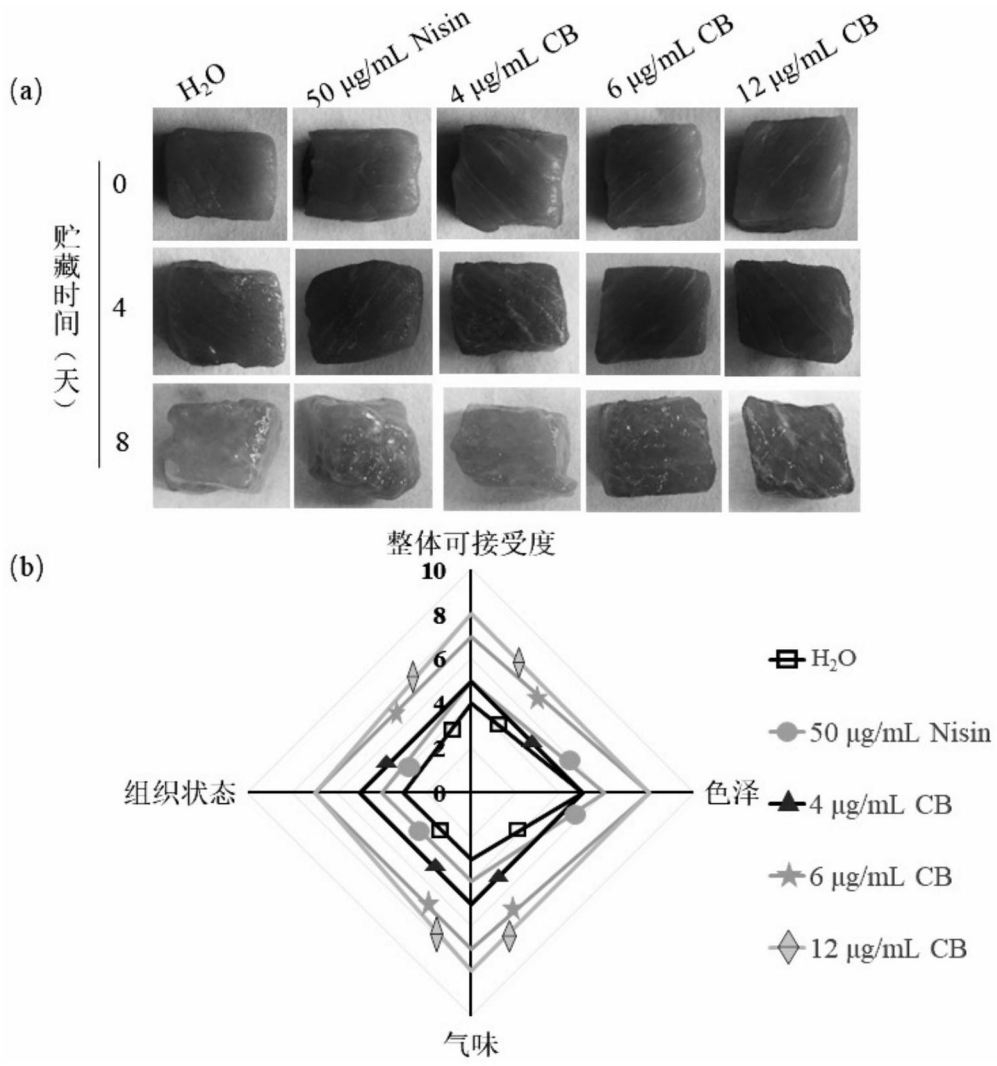


图9

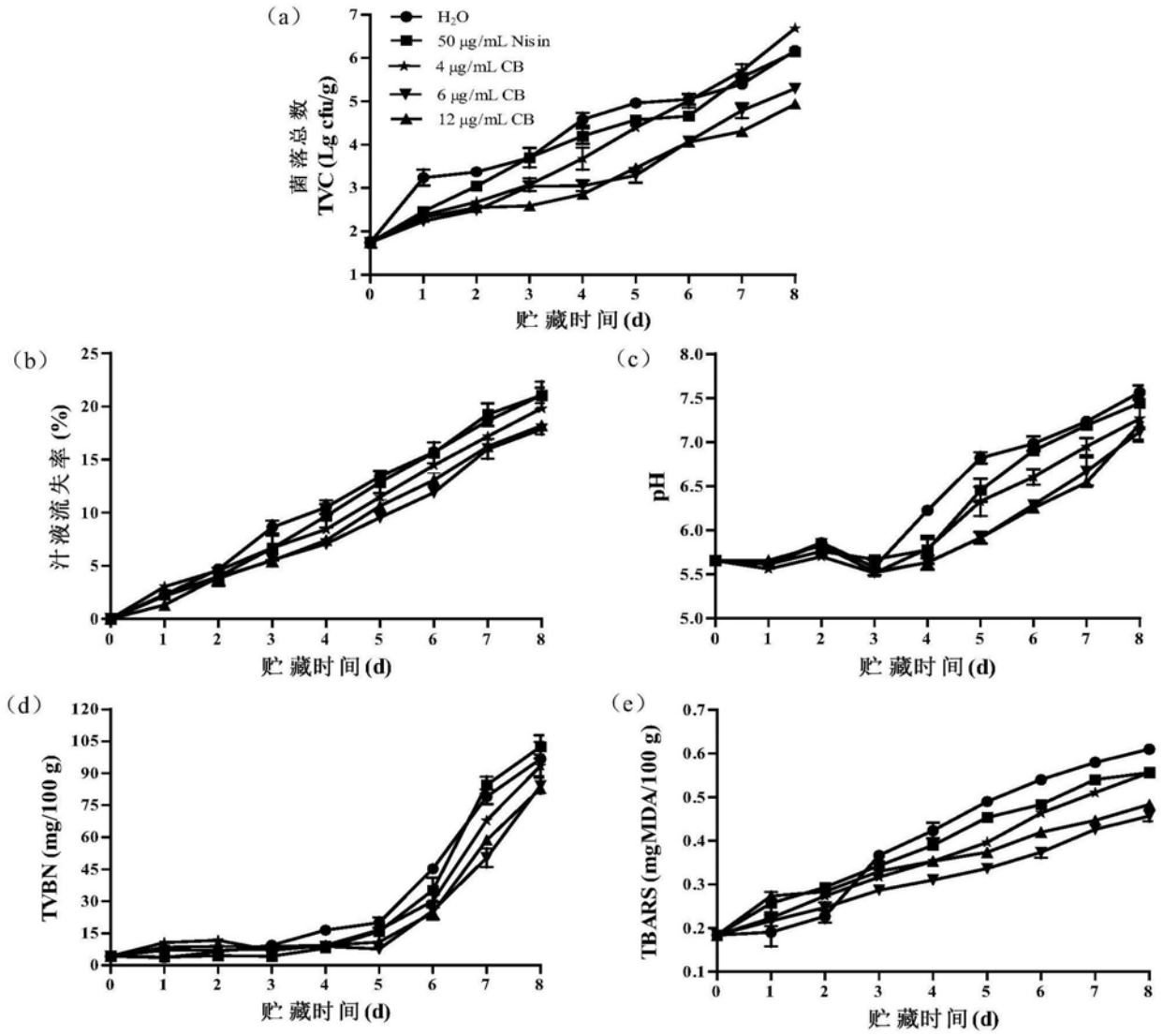


图10



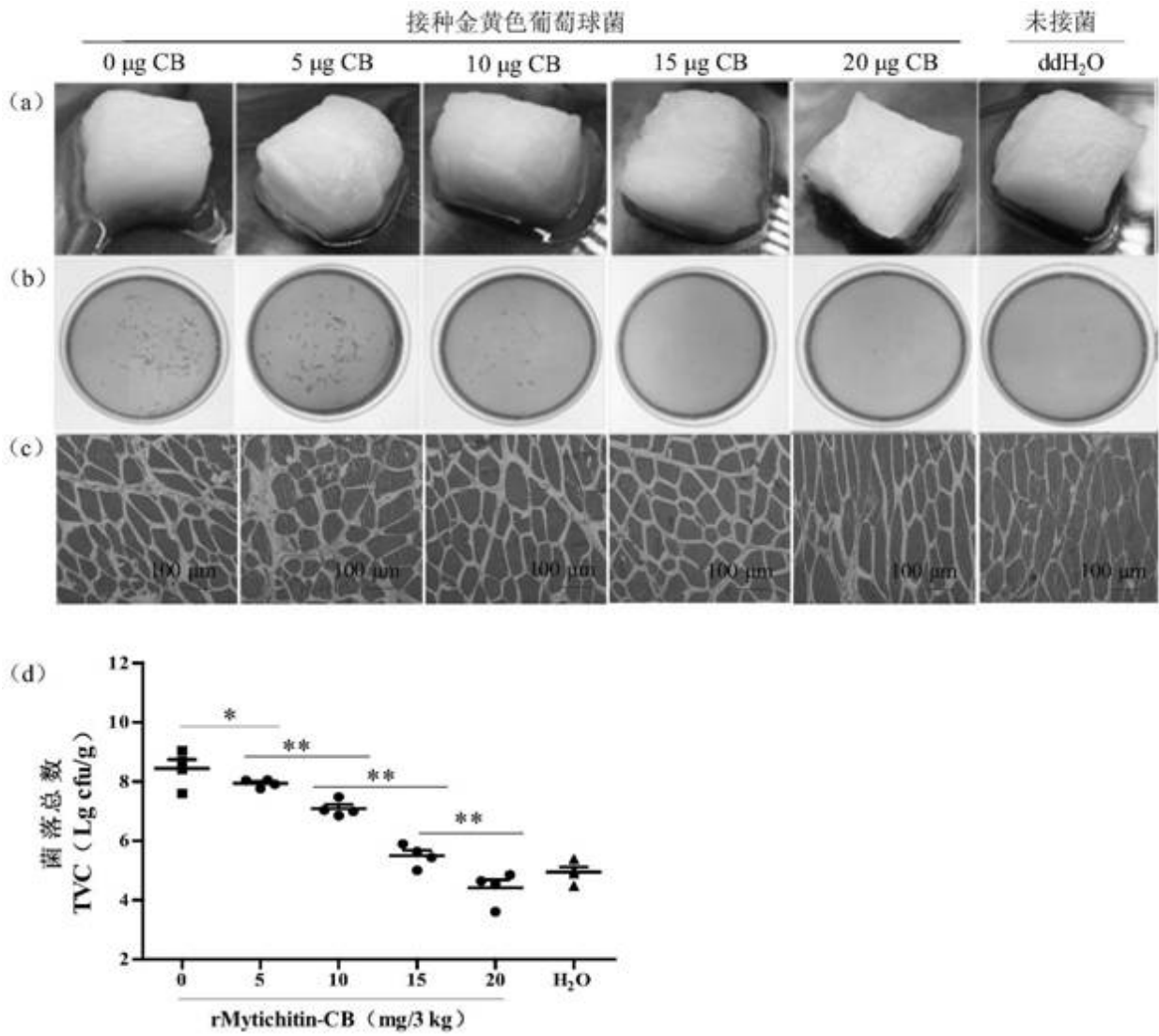


图11

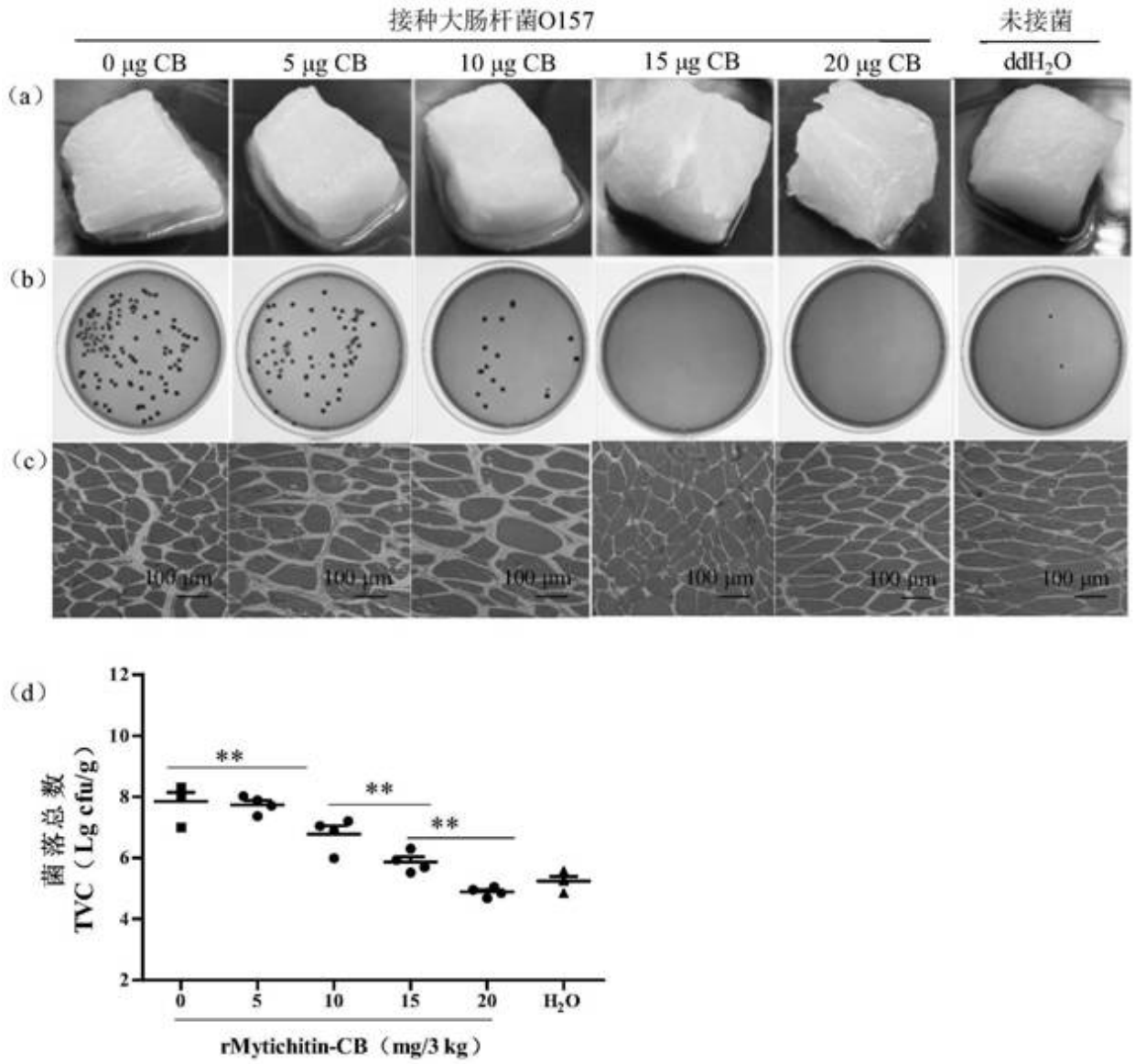


图12

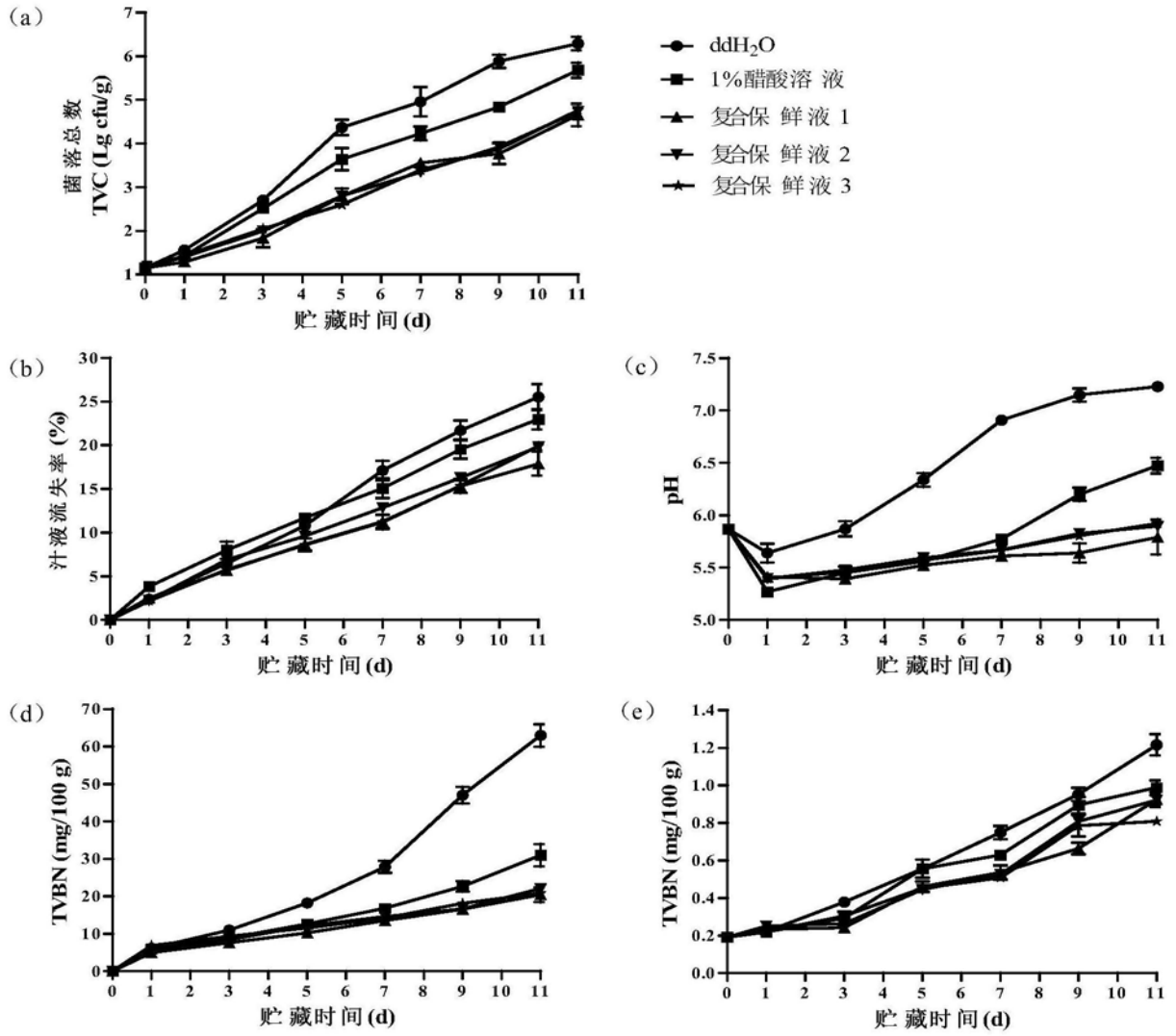


图13