

抗菌肽及其在果蔬病害控制中的应用

Antimicrobial peptides and its application in the control of fruit and vegetable diseases

王文军¹ 曾凯芳^{1,2} 邓丽莉^{1,2} 姚世响^{1,2}

WANG Wen-jun¹ ZENG Kai-fang^{1,2} DENG Li-li^{1,2} YAO Shi-xiang^{1,2}

(1. 西南大学食品科学学院, 重庆 400715; 2. 重庆市特色食品工程技术研究中心, 重庆 400715)

(1. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Chongqing Special Food Engineering and Technology Research Center, Chongqing 400715, China)

摘要:抗菌肽广泛存在于生物体内,是由基因编码、核糖体合成的具有抗菌、真菌、病毒等多种生物学功能多肽,是生物体非特异性免疫功能的重要组成部分。随着人们对抗菌肽研究的深入,发现其有望成为抗生素、杀菌剂等的优良替代品。文章介绍了抗菌肽的来源分类、作用机制及其在果蔬病害控制中的应用,并展望了当前抗菌肽研究应用存在的问题。

关键词:抗菌肽;作用机制;果蔬;病害控制

Abstract: Antimicrobial peptides are widely present in the organism, which are gene-encoded, ribosomal synthesized polypeptides. Antimicrobial peptides have anti bacteria, fungi, viruses and other biological functions. They are the important part of non-specific immune function of organism. With the development of the research on the antimicrobial peptides, they are expected to be excellent substitutes for antibiotics, fungicides. This review briefly introduces the classification, mechanism and application in the control of fruits and vegetables diseases of antimicrobial peptides, and prospects the problems existing in the research and widely application.

Keywords: antimicrobial peptides; mechanism of action; fruit and vegetable; diseases control

抗菌肽 (antimicrobial peptides, AMPs) 是由基因编码、核糖体合成的多肽,广泛存在于细菌、真菌、植物、动物体内,是生物体非特异性免疫功能的重要组成部分,具有抗菌、

真菌、病毒等多种生物学功能,通常有以下几种共同的特征:小肽,分子量大约 4 000 道尔顿,强阳离子 (pI 8.9~10.7),热稳定 (100 ℃, 15 min),无抗药性,对真核细胞无影响。果蔬在人们日常生活中占据重要地位,但由于病原菌导致果蔬品质下降和腐烂,严重影响果蔬品质和商品价值。传统抗生素、化学杀菌剂的大量使用不仅存在安全问题,使病原菌产生耐药性,且易造成环境污染^[1]。近年来,抗菌肽的应用研究得到越来越多的关注,人们期待能找到可替代抗生素和化学杀菌剂的新型药物或防治方法。本研究拟就抗菌肽来源、分类、作用机理、在果蔬病害控制的应用以及存在问题进行综述。

1 抗菌肽的来源

目前为止已经报道了超过 2 700 多种不同来源的 AMPs,种类繁多,分类尚无统一的标准^[2]。根据抗菌肽的来源可分为昆虫抗菌肽、动物抗菌肽(两栖类抗菌肽、水生动物类抗菌肽、哺乳动物类抗菌肽)、微生物抗菌肽、化学合成抗菌肽、基因工程来源抗菌肽^[3]。

1.1 昆虫抗菌肽

自 1980 年 Hultmark 等^[4]从诱导的惜古比天蚕 (*Hyalophora cecropia*) 蛹淋巴液中分离到第一种抗菌肽——天蚕素 (cecropins) 后,众多的抗菌肽相继被发现报道。目前,昆虫抗菌肽的数量及研究应用相对较多^[5]。根据氨基酸序列和抗菌活性的不同,一般分为:天蚕素、防御素、富含脯氨酸的抗菌肽、富含甘氨酸的抗菌肽和溶菌酶^[6]。

1.1.1 天蚕素 天蚕素广泛存在于动物界,其最早在惜古比天蚕 (*H. cecropia*) 中被发现^[7]。天蚕素分子质量小,一般不含半胱氨酸 (Cys),分子内无二硫键, N 端强碱性, C 端有很强的疏水性, C 端酰胺化,呈 α -螺旋结构,能够攻击细菌的细胞膜,主要作用于革兰氏阴性菌^[8]。目前,天蚕素是在转基因

基金项目:“十二五”国家科技支撑计划项目课题(编号:2015BAD16B07);重庆市科委柑桔主题专项课题(编号:cstc2016shms-ztzz80005)

作者简介:王文军,男,西南大学在读硕士研究生。

通信作者:曾凯芳(1972—),女,西南大学教授,博士。

E-mail: zengkaiyang@163.com

收稿日期:2016—12—26

因动植物、抗菌肽重组表达及分子设计与改良、肽抗生素药物开发研究中使用频率最多的抗菌肽。

1.1.2 防御素 防御素作为天然免疫的效应分子,可对传染病病原体进行有效的防御。防御素是独特的富含半胱氨酸的阳离子抗菌肽,呈 β -折叠结构,一般有3或4对分子内二硫键。昆虫防御素主要作用于革兰氏阴性菌,对一些革兰氏阳性菌、丝状真菌、酵母和原生动物也有抑制作用^[9-10]。

1.1.3 富含脯氨酸的抗菌肽 先从昆虫、而后在哺乳动物中分离得到富含脯氨酸的抗菌肽,主要对革兰氏阴性菌有抑制作用,包括植物病害相关的细菌和一些人类病原体。富含脯氨酸的抗菌肽可以渗透到敏感的细胞内,然后作用于胞内物质^[11],其杀菌作用方式不涉及细菌膜的溶解。

1.1.4 富含甘氨酸的抗菌肽 目前,可从不同的昆虫中分离鉴定到多种富含甘氨酸残基(14%~22%)的抗菌肽。其可通过破坏细胞膜从而杀死真菌、革兰氏阴性细菌以及一些癌细胞。蜂毒素是主要的富含甘氨酸残基的抗菌肽^[12]¹²,可显著抑制肿瘤生长^[13],对指状青霉的生长也有明显抑制效果^[14]。

1.2 动物抗菌肽

随着研究的深入,哺乳动物、两栖动物、鱼类体内都相继发现各种抗菌肽。这些肽一般都有不同的序列与结构,并且有特异性目标。在脊椎动物的皮肤上皮层的分泌物^[15]、肠道^[16]、唾液^[17]中都存在多种活性肽。

1.3 微生物抗菌肽

微生物来源的抗菌肽主要由细菌产生。乳链菌肽 Nisin 是其中研究最为清楚的抗菌肽,它由乳酸链球菌(*Streptococcus lactis*)和乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)合成、分泌,目前已实现 Nisin 的产业化,在世界各国作为一种天然防腐剂用于食品防腐保鲜。另外,放线菌作为一种生产抗生素的主要药源微生物,其能产生如万古霉素等多肽类抗生素^[18]。有关酵母菌和霉菌产生抗菌肽的报道较少,一些由真菌产生的抗菌肽,主要由木霉属产生,有研究人员^[19]从哈茨木霉中分离得到了 peptaibol 类抗菌肽。

1.4 化学合成抗菌肽和基因工程菌抗菌肽

生物体内抗菌肽含量很低,提取分离工艺繁琐复杂,故抗菌肽的生产一般借助体外化学合成和转基因工程菌生产。化学合成法主要为多肽固相合成法,可合成人工设计的活性肽,产物易被分离,但其较高的成本是限制其商业化应用的主要原因,故目前主要在实验室中应用,如 PAF26^[20]、Cecropins A 和 B^[21]等。

目前,利用重组方法异源表达抗菌肽是非常经济和具有研究价值的^[22]。大肠杆菌因其良好的表达系统和高效快速的生长率作为最普遍有效的重组生物反应器,但对其有毒害作用的肽类的表达生产是很困难的。同时,人们已经开发应用了毕赤酵母表达系统,是不同于蛋白质、肽类大量生产的优良系统^[23]。国内外已有大量抗菌肽成功经毕赤酵母重组表达,并应用在研究中,如:CM4^[24-25]、Cecropins A^[26]、

CecropinsD^[27]等。

2 抗菌肽作用机制

最初,影响细胞膜的通透性被认为是抗菌肽的主要作用机制,但随后发现抗菌肽还可以在进入细胞,通过与细胞内靶标的特异性结合干扰细胞代谢,达到抑制和杀灭细菌的目的。目前还没用普遍适用的抗菌肽作用机理的假设模式,但抗菌肽的活性普遍依赖于与靶细胞细胞膜的相互作用^[28]。

2.1 抗菌肽与细胞膜的相互作用

抗菌肽与细胞膜的相互作用的研究较多,其是决定抗菌肽活性的关键因素^[29]。图1所示为已经提出的几种常用的作用模型:聚合体模型(Aggregate channel model),环孔模型(Toroidal pore model),桶板模型(Barrel-stave model)和地毯模型(Carpet model)^[30]。

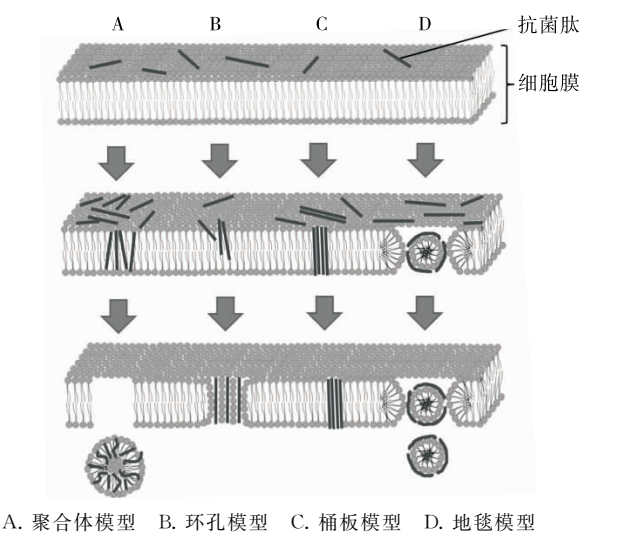


图1 抗菌肽与细胞膜的相互作用^[25]
Figure 1 The interaction of antimicrobial peptides and cell membrane

2.1.1 聚合体模型(Aggregate channel model) 由图1A可知,聚合体模型中,抗菌肽与细胞膜上的磷脂分子可形成聚合体,聚合体中的抗菌肽没有特定形态,此聚合体提供了通过该膜的离子泄漏通道,如澳大利亚树蛙的抗菌肽 Maculatin1.1(M1.1)^[31]的杀菌机制为此模型。

2.1.2 环孔模型(Toroidal pore model) 由图1B可知,环孔模型指出,细胞膜上不断聚集的肽可以垂直插入磷脂双分子层,其疏水区的位移可以使细胞膜疏水中心形成裂口,诱导磷脂单分子层不断向内弯曲,形成一个环孔。最近的研究^[32]证明肽促进磷脂分子层的弯曲,脂质同时可以调节肽的构象,利于孔的形成。也有研究^[33]提出了抗革兰氏阳性菌的细菌素导致的环形孔可以使膜脂质体和细胞内大分子物质发生泄漏。环孔模型不仅在线性肽中发现,环形肽也可在磷脂双分子膜上打个直径1~2 nm的孔^[34-35]。

2.1.3 桶板模型(Barrel-stave model) 由图1C可知,许多 α -螺旋肽的作用方式是桶板模型, α -螺旋的两亲性肽聚集在细胞膜表面形成低聚物束,方向固定排列,以使其疏水端与

膜脂质端相互作用,干扰了细胞膜正常功能形成了跨膜离子通道,细胞内外物质可相互渗透,也可激活水解酶导致细胞壁分解,例如抗菌肽 Ctx-Ha^[36]和 Hf-1^[37]。

2.1.4 地毯模型(Carpet model) 由图 1D 可知,地毯模型中,抗菌肽平行排布于细胞膜表面,膜局部形成“地毯式”的肽覆盖层,当达到阈值浓度时,以类似洗涤剂方式作用,造成细胞膜局部缺失,形成孔洞,从而导致细胞死亡^[38]。诸多有双亲特性的阳离子抗菌肽在高浓度下就是以此模型作用,它也是大多数抗菌肽杀死革兰氏阴性菌和寄生虫的共有模型,如抗菌肽 Pln149a^[39]。

2.2 抗菌肽作用于胞内物质

越来越多的肽已被证明能穿过细胞膜,积累到细胞内,它们的目标是各种重要的细胞组织。这种理论同样也可以解释一些抗菌肽在很低的浓度下依旧可以杀死细胞的原因。如图 1 所示,目前已被证明的抗菌肽作用于胞内物质的作用方式包括抑制核酸的转录与复制^[40]、蛋白质的合成、酶的活性^[41]和细胞壁合成^[42]。

3 抗菌肽在果蔬病害控制上的应用

3.1 抗菌肽在果蔬采前病害控制的应用

抗菌肽应用于果蔬采前病害控制的研究,主要依托于基因重组技术,将抗菌肽基因转入植株,抗菌肽的成功表达将增强植物抗病性,以此培养出抗病性优良的植株。在国内外诸多研究中,抗菌肽转基因植物技术已经成功实现。

邹修平等^[43]人工合成了两个含有信号肽的 Cecropin B 抗菌肽基因 PR1aCB 和 AATCB,进一步构建了 CaMV 35S 调控 PR1aCB 和 AATCB 基因的植物表达载体,导入血橙成功获得转基因植株,其抗病性显著强于非转基因植株。He 等^[44]将抗菌肽基因 Shiva A 和 Cecropin B 成功导入甜橙得到转基因植株,发现转基因植株对柑橘溃疡病耐性提高。Osusky 等分别将 MsrA1^[45](杂合肽,修饰 N 端的 cecropin-melittin)、MsrA2^[46](dermaseptin B1 的类似物)、MsrA3^[47](temporin A 的 N-末端修饰的类似物),成功表达于马铃薯内提高了马铃薯对晚疫病和粉腐腐烂等病害的抗性。此外,番茄成功表达外源基因 MJ-AMP1^[48]、pep11^[49]可分别增强植株对早、晚疫病的抗性。Chakrabart 等^[50]研究表明,转基因香蕉表达 MSI-99 可显著提高对由尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*f.sp. *Cubense*)引起的枯萎病、褐条斑小球壳菌(*Mycosphaerellamusicola*)引起的叶斑病的抗性。

抗菌肽转基因植株的培育不仅在果蔬中应用,同时在棉花、水稻等经济农作物中也有应用。Sharma 等^[51]将 Cecropin B 基因和水稻几丁质酶信号肽基因转入水稻植株中,转基因水稻植株抗白叶枯病能力显著增强;Rahnamaeian 等^[52]研究表明,在转基因的大麦中表达抗菌肽 metchinkowin 基因能提高大麦对白粉病的抗病性。

3.2 抗菌肽在果蔬采后病害控制的应用

采后病原菌导致的果蔬质量下降或完全腐烂将造成巨大的经济损失。由于杀菌剂的安全性和病原体耐药性的逐渐形成,应用化学杀菌剂控制果蔬采后病害越来越受到限

制^[53]。抗菌肽代替保鲜剂的应用将有很大发展前景。生物体直接提取抗菌肽、化学合成抗菌肽和利用基因重组技术改造微生物表达抗菌肽是目前抗菌肽在采后果蔬病害控制研究中的主要方式。

Liu 等^[54]发现牡蛎(*Crassostreagigas*)酶解液提取到的抗菌肽 CgPep33 可有效控制由灰霉菌(*Botrytis cinerea*)引起的草莓灰霉病。由意大利青霉(*Peniciliumitalicum*)和指状青霉(*Peniciliumdigitatum*)引起的柑橘青、绿霉最为普遍,Muñoz A 等^[55]对比了 8 种抗菌肽(PAF26、PAF38、PAF40、BM0、melittin、indolicidin、BP15 和 BP76)对柑橘绿霉病的控制效果,结果表明 PAF26 控病效果良好。López-Garci 等^[56]也对比了合成抗菌肽 PAF19、PAF26 和 LfcinB₁₋₉及化学保鲜剂对柑橘绿霉病的控制效果,结果也表明 PAF26 抑菌效果显著。Badosa 等^[57]合成了几种杂合肽 cecropin A-melittin 并应用于苹果青霉病防控,其中 BP22 效果最好。

相对于化学保鲜剂,生防酵母应用于果蔬采后保鲜有诸多的优点,但是目前,由于生防效力较弱的原因,投入商业化使用的酵母生防保鲜剂还很少。其中,基因改造是提高酵母生防效力的众多方法之一。Jones 等^[58]将 cecropin A 的部分基因导入到酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中表达,重组酵母可有效抑制导致番茄腐烂的炭疽菌(*Colletotrichum-coccodes*)的生长。Wisniewski 等^[59]将桃的防御基因 rDFN1 重组于毕赤酵母(*Pichia pastoris*),显著提高了酵母对苹果主要病原菌扩展青霉(*Penicilliumexpansum*)和灰霉(*Botrytis cinerea*)孢子生长的抑制能力。任雪艳等^{[12]43-61[26]}将抗菌肽基因 Psd 及 Cecropin A 基因重组于巴斯德毕赤酵母 GS115,并用于几种采后水果果实真菌病害(番茄灰霉病和黑斑病、苹果与梨的青霉病及柑橘酸腐病)的生物防治。康苏等^[60]通过酿酒酵母培养诱导表达并纯化获得新疆家蚕抗菌肽(CecropinXJ),将其添加到鲜榨的番茄汁和葡萄汁中可显著延长鲜榨番茄汁和葡萄汁保鲜期。部分抗菌肽的来源及氨基酸序列等信息见表 1。

4 展望

目前,抗菌肽研究虽然取得了一定进展,但要广泛应用于果蔬病害控制,仍然存在很多待解决的问题。首先,抗菌肽大规模应用受阻于其制备方式:天然抗菌肽一般含量比较低,提取工艺复杂;化学合成抗菌肽成本很高,且难以保证合成物的活性与一致性;利用基因工程技术合成抗菌肽,表达效率较低,由于抗菌肽的杀菌性,原核表达系统一般不如真核表达系统,但提取纯品时由于融合蛋白表达的缘故很难实施。其次,抗菌肽的活性、稳定性依旧不如传统抗生素、杀菌剂,仍需提高和改善;最后,抗菌肽应用存在一定未知的安全性问题,抗菌肽药剂和转基因果蔬的安全性仍需继续研究证实。

随着对抗菌肽作用机理、生产及其转基因技术的不断深入研究和应用,广谱、高效、安全的抗菌肽药剂和优良的抗病植株将会广泛应用于果蔬病害控制。同时,抗菌肽也将在农业、食品工业、畜牧业、制药业发挥其重要作用。

表 1 抗菌肽在果蔬病害控制中的应用

Table 1 Application of antimicrobial peptides in the control of fruit and vegetable diseases

抗菌肽名称	来源	序列	控制病害种类
PAF26	合成	RKKWFW	柑橘绿霉病
PAF38	合成	RRKKWFW	柑橘绿霉病
PAF40	合成	HRKKWFW	柑橘绿霉病
BM0	合成	RFWWFRRR	柑橘绿霉病
BP15	合成	KKLFKKILKVL	柑橘绿霉病
BP22	合成	FKLFKKILKVL	苹果青霉病
BP76	合成	KKLFKKILKFL	柑橘绿霉病
MsrA1	合成	MALEHMKWKLFFKKIGIGAVLKVLTTGL-PALKLTK	马铃薯晚疫病和粉红腐烂等
MsrA2	合成	MAMWKDVLKKIGITVALHAGKAALGA-VADTISQ	马铃薯晚疫病和粉红腐烂等
MsrA3	合成	MASRHMFLPLIGRVLSGIL	马铃薯晚疫病和粉红腐烂等
MSI-99	合成	MLLAIAFLASVCVSSMGIGKFLHSAKKF-GKAF-VGEIMNS	香蕉枯萎病和叶斑病
MJ-AMP1	紫茉莉(<i>M.jalapa</i>)	CICNGGRCNENVGPPYCCSGFCLRQPG-QGYGYCK-NR	番茄早疫病
metchinkowin	果蝇(<i>D.melanogaster</i>)	HRHQGPFDTRPSPFNPNQPRPGPIY	大麦白粉病
CecropinXJ	家蚕(<i>B.mori</i>)	RWKIFKKIEKMGRNIRDGIVKAGPAIEV-LGSA- KAIGK	番茄汁和葡萄汁菌落总数
Cecropin B	天蚕(<i>H. cecropia</i>)	KWKVFKKIEKMGRNIRNGIVKAGPAIA- VLGEAKAL	柑橘溃疡病
Cecropin B	家蚕(<i>B.mori</i>)	RWKIFKKIEKMGRNIRDGIVKAGPAIEV-LGSAKAI	水稻抗白叶枯病
Cecropin A	天蚕(<i>H. cecropia</i>)	MNFYNIFVFVALILAITIGQSEAGWLKKI-GKKI- ERVGQHTRDATIQGLGIAQQAAN-VAATARG	番茄灰霉病和黑斑病、苹果与梨 的青霉病及柑橘酸腐病

参考文献

[1] SCHIRRA M, D’AQUINO S, CABRAS P, et al. Control of postharvest diseases of fruit by heat and fungicides: efficacy, residue levels, and residue persistence. A review[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(16): 8 531-8 542.

[2] 刘石宝, 倪孟祥, 罗学刚. 抗菌肽研究进展[J]. 药物生物技术, 2011(5): 466-470.

[3] 刘秀, 郭中坤, 王可洲. 抗菌肽来源、分类方式、生物学活性、作用机制及应用研究进展[J]. 中国医药生物技术, 2016, 11(6): 539-543.

[4] HULTMARK D, STEINER H, RASMUSON T, et al. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of Hyalophoracecropia[J]. European Journal of Biochemistry, 1980, 106 (1): 7-16.

[5] 卢晓凤, 杨星勇, 程惊秋, 等. 昆虫抗菌肽及其研究进展[J]. 药学报, 1999, 34(2): 156-160.

[6] JAESAM H, JUNEYOUNG L, YEONJU K, et al. Isolation and characterization of a defensin-like peptide (Coprism) from the dung beetle, Copristripartitus.[J]. International Journal of Peptides, 2009, 2009(57): 89-99.

[7] CHOI Y S, CHOO Y M, LEE K S, et al. Cloning and expression profiling of four antibacterial peptide genes from the bumblebee Bombusignitus[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2008, 150 (2): 141-146.

[8] 王义鹏, 赖切. 昆虫抗菌肽结构、性质和基因调控[J]. 动物学研究, 2010, 31(1): 27-34.

[9] CHAPUISAT M, OPPLIGER A, MAGLIANO P, et al. Wood ants use resin to protect themselves against pathogens[J]. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 2007, 274(1 621): 2 013-2 017.

[10] VILJAKAINEN L, PAMILO P. Selection on an antimicrobial peptide defensin in ants[J]. Journal of Molecular Evolution, 2008, 67(6): 643-652.

[11] SCOCCHI M, TOSSI A, GENNARO R. Proline-rich antimicrobial peptides: converging to a non-lytic mechanism of action [J]. Cellular & Molecular Life Sciences, 2011, 68(13): 2 317-2 330.

[12] 任雪艳. 重组酵母 GS115/PSD,GS115/CEC 的构建及其对水果采后病害抑制效果的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2012.

[13] 朱伟, 王本祥, 朱迅. 蜂毒素的研究进展[J]. 吉林大学学报医学版, 2001, 27(2): 212-214.

[14] MUÑOZ A, LÓPEZ-GARCÍA B, MARCOS J F. Comparative study of antimicrobial peptides to control citrus postharvest decay caused by Penicilliumdigitatum[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(20): 8 170-8 176.

[15] 赵华, 张艳艳, 汤加勇, 等. 重组鲢鱼抗菌肽 parasin I 原核表

- 达、纯化与抗菌活性[J]. 动物营养学报, 2012, 24(9): 1 731-1 736.
- [16] 马卫明. 猪小肠抗菌肽分离鉴定及其生物活性研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2004: 41-59.
- [17] PETRUZZELLI R, CLEMENTI M E, MARINI S, et al. Respiratory inhibition of isolated mammalian mitochondria by salivary antifungal peptide histatin-5 [J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2003, 311(4): 1 034-1 040.
- [18] 严伟. 万古霉素的分离纯化工艺研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2014: 7-45.
- [19] 潘顺, 刘雷, 王为民. 哈茨木雷发酵液中 peptaibols 抗菌肽的鉴定及活性研究[J]. 中国生物防治学报, 2012, 28(4): 528-536.
- [20] MUÑOZ A, LÓPEZ-GARCÍA B, PÉREZ-PAYÁ E, et al. Antimicrobial properties of derivatives of the cationic tryptophan-rich hexapeptide PAF26 [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, 354(1): 172-177.
- [21] BOMAN H C, BOMAN I A, ANDREU D, et al. Chemical synthesis and enzymic processing of precursor forms of cecropins A and B[J]. Journal of Biological Chemistry, 1989, 264(10): 5 852-5 860.
- [22] GUERREIRO C I P D, FONTES C M G A, GAMA M, et al. Escherichia coli expression and purification of four antimicrobial peptides fused to a family 3 carbohydrate-binding module (CBM) from Clostridium thermocellum[J]. Protein Expression and Purification, 2008, 59(1): 161-168.
- [23] NIU Ming-fu, LI Xiang, WEI Jian-chao, et al. The molecular design of a recombinant antimicrobial peptide CP and its in vitro activity[J]. Protein Expression and Purification, 2008, 57(1): 95-100.
- [24] 吴希. 重组家蚕抗菌肽 CM4 抗真菌作用机理的研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2006: 24-63.
- [25] ZHANG Jie, ZHANG Shuang-quan, WU Xi, et al. Expression and characterization of antimicrobial peptide ABP-CM4 in methylotrophic yeast Pichia pastoris[J]. Process Biochemistry, 2006, 41(2): 251-256.
- [26] REN Xue-yan, KONG Qing-jun, WANG Hui-li, et al. Biocontrol of fungal decay of citrus fruit by Pichia pastoris recombinant strains expressing cecropinA[J]. Food Chemistry, 2012, 131(3): 796-801.
- [27] 尹娜, 李鸿钧, 彭梅, 等. 抗菌肽 Cecropin D 在毕赤酵母中的表达、纯化及活性鉴定[J]. 中国生物制品学杂志, 2008, 21(3): 185-189.
- [28] HANCOCK R E W, ROZEK A. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides [J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 206(2): 143-149.
- [29] PANDEY B K, SRIVASTAVA S, SINGH M, et al. Inducing toxicity by introducing a leucine-zipper-like motif in frog antimicrobial peptide, magainin 2[J]. Biochemical Journal, 2011, 436(3): 609-620.
- [30] JENSSEN H, HAMILL P, HANCOCK R E W. Peptide antimicrobial agents[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2006, 19(3): 491-511.
- [31] BOND P J, PARTON D L, CLARK J F, et al. Coarse-grained simulations of the membrane-active antimicrobial peptide maculatin1.1[J]. Biophysical Journal, 2008, 95(8): 3 802-3 815.
- [32] BOZELLI J C, SASAHARA E T, PINTO M R S, et al. Effect of head group and curvature on binding of the antimicrobial peptide tritripticin to lipid membranes [J]. Chemistry and Physics of Lipids, 2012, 165(4): 365-373.
- [33] SHENKAREV Z O, BALANDIN S V, TRUNOV K I, et al. Molecular mechanism of action of β -hairpin antimicrobial peptide arenicin: oligomeric structure in dodecylphosphocholine micelles and pore formation in planar lipid bilayers[J]. Biochemistry, 2011, 50(28): 6 255-6 265.
- [34] DUVIC B, JOUAN V, ESSA N, et al. Cecropins as a marker of Spodoptera frugiperda immunosuppression during entomopathogenic bacterial challenge[J]. Journal of Insect Physiology, 2012, 58(6): 881-888.
- [35] YONEYAMA F, IMURA Y, OHNO K, et al. Peptide-lipid huge toroidal pore, a new antimicrobial mechanism mediated by a lactococcal bacteriocin, lacticin Q [J]. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2009, 53(8): 3 211-3 217.
- [36] FERREIRA CESPEDES G, NICOLAS LORENZON E, FES-TOZO VICENTE E, et al. Mechanism of action and relationship between structure and biological activity of Ctx-Ha: a new ceratotoxin-like peptide from Hypsiboas albopunctatus[J]. Protein and Peptide Letters, 2012, 19(6): 596-603.
- [37] HOU Li-xia, SHI Yong-hui, ZHAI Pei, et al. Inhibition of foodborne pathogens by Hf-1, a novel antibacterial peptide from the larvae of the housefly (Musca domestica) in medium and orange juice[J]. Food Control, 2007, 18(11): 1 350-1 357.
- [38] JEAN-FRANÇOIS F, ELEZGARAY J, BERSON P, et al. Pore Formation Induced by an Antimicrobial Peptide: Electrostatic Effects[J]. Biophysical Journal, 2008, 95(12): 5 748-5 756.
- [39] LOPES J L, GÓMARA M J, HARO I, et al. Contribution of the tyr-1 in plantaricin149a to disrupt phospholipid model membranes[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14(6): 12 313-12 328.
- [40] LAN Yun, YE Yan, KOZLOWSKA J, et al. Structural contributions to the intracellular targeting strategies of antimicrobial peptides [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2010, 1 798(10): 1 934-1 943.
- [41] VINCENT P A, MORERO R D. The structure and biological aspects of peptide antibiotic microcin J25[J]. Current Medicinal Chemistry, 2009, 16(5): 538-549.
- [42] GUT I M, BLANKE S R, WA V D D. Mechanism of inhibition of Bacillus anthracis spore outgrowth by the lantibiotic nisin[J]. ACS Chemical Biology, 2011, 6(7): 744-752.
- [43] 邹修平, 彭爱红, 刘琦琦, 等. 分泌型 Cecropin B 抗菌肽基因转化血橙提高其抗溃疡病水平[J]. 园艺学报, 2014, 41(3): 417-428.
- [44] HE Yong-rui, CHEN Shan-chun, PENG Ai-hong, et al. Production and evaluation of transgenic sweet orange (Citrus sinensis, Osbeck) containing bivalent antibacterial peptide

genes (Shiva A and Cecropin B) via a novel Agrobacterium - mediated transformation of mature axillary buds[J]. Scientia Horticulturae, 2011, 128(2): 99-107.

[45] OSUSKY M, ZHOU Guo-qing, OSUSKA L, et al. Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogens[J]. Nature Biotechnology, 2000, 18(11): 1 162-1 166.

[46] OSUSKY M, OSUSKA L, KAY W, et al. Genetic modification of potato against microbial diseases; in vitro and in planta activity of a dermaseptin B1 derivative, MsrA2[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2005, 111(4): 711-722.

[47] OSUSKY M, OSUSKA L, HANCOCK R E, et al. Transgenic potatoes expressing a novel cationic peptide are resistant to late blight and pink rot[J]. Transgenic Research, 2004, 13(2): 181-190.

[48] SCHAEFER S C, GASIC K, CAMMUE B, et al. Enhanced resistance to early blight in transgenic tomato lines expressing heterologous plant defense genes[J]. Planta, 2005, 222(5): 858-866.

[49] JONES R W, OSPINA-GIRALDO M, CLEMENTE T. Prosystemin-antimicrobial-peptide fusion reduces tomato late blight lesion expansion[J]. Molecular Breeding, 2004, 14(1): 83-89.

[50] CHAKRABARTI A, GANAPATHI T R, MUKHERJEE P K, et al. MSI-99, a magainin analogue, imparts enhanced disease resistance in transgenic tobacco and banana[J]. Planta, 2003, 216(4): 587-596.

[51] SHARMA A, SHARMA R, IMAMURA M, et al. Transgenic expression of cecropin B, an antibacterial peptide from Bombyxmori, confers enhanced resistance to bacterial leaf blight in rice[J]. FEBS letters, 2000, 484(1): 7-11.

[52] RAHNAMAEIAN M, VILCINSKAS A. Defense gene expression is potentiated in transgenic barley expressing antifungal peptide metchnikowin throughout powdery mildew challenge [J]. Journal of Plant Research, 2012, 125(1): 115-124.

[53] SCHIRRA M, D’ AQUINO S, CABRAS P, et al. Control of postharvest diseases of fruit by heat and fungicides; efficacy, residue levels, and residue persistence: A review[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(16): 8 531-8 542.

[54] LIU Zun-ying, ZENG Ming-yong, DONG Shi-yuan, et al. Effect of an antifungal peptide from oyster enzymatic hydrolysates for control of gray mold (Botrytis cinerea) on harvested strawberries[J]. Postharvest Biology & Technology, 2007, 46(1): 95-98.

[55] MUÑOZ A, LÓPEZ GARCÍA B, MARCOS J F. Comparative Study of Antimicrobial Peptides To Control Citrus Postharvest Decay Caused by Penicillium digitatum [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2007, 55(20): 8 170-8 176.

[56] LÓPEZ-GARCÍ B, VEYRAT A, PÉREZ-PAYÁ E, et al. Comparison of the activity of antifungal hexapeptides and the fungicides thiabendazole and imazalil against postharvest fungal pathogens [J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 89(2): 163-170.

[57] BADOSA E, FERRÉ R, FRANCÈS J, et al. Sporicidal activity of synthetic antifungal undecapeptides and control of Penicillium rot of apples[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2009, 75(17): 5 563-5 569.

[58] JONES R W, PRUSKY D. Expression of an antifungal peptide in Saccharomyces; a new approach for biological control of the postharvest disease caused by Colletotrichum coccodes[J]. Phytopathology, 2002, 92(1): 33-37.

[59] WISNIEWSKI M, BASSETT C, ARTLIP T, et al. Overexpression of a peach defensin gene can enhance the activity of postharvest biocontrol agents[J]. Acta Horticulturae, 2005, 682: 1 999-2 006.

[60] 康苏, 夏丽洁, 马纪, 等. 新疆家蚕抗菌肽对鲜榨果汁防腐效果的影响[J]. 食品科技, 2014(6): 247-251.

(上接第 147 页)

[3] 吕海宁, 折改梅, 吕扬. 核桃和核桃楸的化学成分及生物活性的研究进展[J]. 华西药学杂志, 2010, 25(4): 489-493.

[4] 毕敏, 尹政. 核桃仁提取物抗脑衰老作用的实验研究[J]. 现代中药研究与实践, 2006, 20(3): 35-37.

[5] SAYES C M, GOBIN A M, AUSMAN K D, et al. Nano-C₆₀ cytotoxicity is due to lipid peroxidation [J]. Biomaterials, 2005, 26(36): 7 587-7 595.

[6] 孙丽芹, 董新伟, 刘玉鹏, 等. 脂类的自动氧化机理[J]. 中国油脂, 1998, 23(5): 56-57.

[7] PIFFAUT B, METCHE M. Properties of peroxidase and polyphenol oxidase innatural complexes from walnuts (*Juglans regia*) and in active DL-DOPA copolymers [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1991, 57(4): 493-506.

[8] 蔡琨, 方云, 夏咏梅, 等. 植物脂氧合酶的研究进展[J]. 现代化工, 2003(23): 23-27.

[9] 张继刚, 丁之恩, 梁进, 等. 适宜微波处理保持山核桃贮藏品质 [J]. 农业工程学报, 2016, 32(14): 284-292.

[10] SENTER S, FORBUS W, NELSON S, et al. Effects of dielectric and steam heating treatments on the storage stability of pecan kernels[J]. Journal of Food Science, 1984, 49(3): 893-895.

[11] BURANASOMPOB A, TANG J, POWERS J R, et al. Lipxygenase activity in walnuts and almonds[J]. LWT-Food Food Science and Technol, 2007, 40(5): 893-899.

[12] 朱广廉. 植物生理学实验[M]. 北京: 北京大学出版社, 1990.

[13] 王绍林. 微波钝化酶的机理及其设备开发[J]. 农业工程学报, 1996, 12(13): 168-171.

[14] RAMESH M, RAO P H, RAMADOSS C S. Microwave treatment of groundnut: extractability and quality of oil and its relation to lipase and lipxygenase activity [J]. LWT-Food Science and Technology, 1995, 28(1): 96-99.

[15] 李云飞, 殷涌光, 徐树来, 等. 食品物性学[M]. 上海: 中国轻工业出版社, 2015: 220-221.

[16] 蔡琨, 方云, 夏咏梅, 等. 大豆脂肪氧合酶的提取及影响酶活因素的研究[J]. 林产化学与工业, 2004, 24(2): 52-56.

[17] ZACHEO G, CAPPELLO M, GALLO A, et al. Changes associated with post-harvest ageing in almond seeds [J]. LWT-Food Science and Technology, 2000, 33(6): 415-423.