

暗纹东方鲀鱼精蛋白的纯化及抑菌活性研究

Study on purification and antibacterial activity of protamine from *Takifugu obscurus*

张家源

陈舜胜

张洪才

ZHANG Jia-yuan CHEN Shun-sheng ZHANG Hong-cai

(上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

(Shanghai Ocean University College of Food Science and Technology, Shanghai 201306, China)

摘要:采用葡聚糖凝胶(Sephadex G-50)层析和羧甲基琼脂糖凝胶 FF(CM Sepharose Fast Flow)离子交换层析对暗纹东方鲀鱼精蛋白进行纯化,利用精氨酸显色反应鉴定鱼精蛋白,并测定了鱼精蛋白对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和沙门氏菌的最小抑菌浓度、抑菌圈直径和生长曲线的影响。结果表明,暗纹东方鲀鱼精蛋白在 217、273 nm 处各有 1 个吸收峰且 217 nm 处的吸收峰较高,经 SDS-PAGE 电泳发现纯化后的鱼精蛋白白条带较纯化前的细且无拖尾现象;暗纹东方鲀鱼精蛋白对革兰氏阴性菌(沙门氏菌和大肠杆菌)和革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌)均具有抑制作用,可以延缓菌种的生长,对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和沙门氏菌的最小抑菌浓度分别为 500、1 000、1 000 mg/L。

关键词:暗纹东方鲀;鱼精蛋白;纯化;紫外吸收峰;抑菌性

Abstract: In this study, Sephadex G-50 and CM Sepharose Fast Flow were used to purify the spermatozoa of *Takifugu obscurus*. Identification of protamine by arginine color reaction. The effects of protamine on the minimum inhibitory concentration, inhibition zone diameter and growth curve of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella* were determined. The results showed that: The spermatozoa of *Takifugu obscurus* had an absorption peak at 217 and 273 nm, respectively, and the absorption peak at 217 nm was higher. The purified protamine was found to be better than the protamine before purification by SDS-PAGE electrophoresis. The strips were fine and had no tailing. The *Takifugu obscurus* protamine had inhibitory effects on Gram-negative bacteria (*Salmonella* and *Escherichia coli*) and Gram-

positive bacteria (*Staphylococcus aureus*), which could delay the bacteria growth, and the minimum inhibitory concentrations against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella* were 500, 1 000 and 1 000 mg/L, respectively.

Keywords: *Takifugu obscurus*; protamine; purification; ultraviolet absorption peak; bacteriostasis

鱼精蛋白是一种主要存在于鱼类精巢组织中的碱性蛋白质,分子量较小,具有广谱抑菌性、降血压、抑制肿瘤生长和促消化等功能,还可以恢复肝素的抗凝血作用,是美国食品和药物管理局批准的唯一一种逆转心脏或血管手术后聚阴离子肝素的抗凝血作用的药物^[1-3]。鱼精蛋白的抑菌性早在 1937 年就被 McClean 等^[4]发现,随后被人们广泛研究。由于鱼精蛋白的特殊组成,并且具有较好的生物活性,其在食品和医学领域都有较好的应用前景。

数据^[5]显示,膳食鲑鱼鱼精蛋白可以改善高脂血症、动脉粥样硬化和肥胖症等症状。但鱼精蛋白的来源有限,大多从鲱鱼和鲑鱼等鱼类中分离提取,而中国鲱鱼和鲑鱼的产量并不高。此外,不同种类鱼精蛋白对菌种的抑制效果也存在一定差异。律海伦等^[6]采用离子交换层析法对粗粉红马哈鱼鱼精蛋白进行分离纯化,研究发现该蛋白对金黄色葡萄球菌(革兰氏阳性菌)具有较好的抑菌效果,但未涉及其对革兰氏阴性菌的抑菌效果研究。曹文红等^[7]研究发现,中巨石斑鱼鱼精蛋白对枯草芽孢杆菌的抑菌活性较大肠杆菌显著。刘淑集等^[8]对菊黄东方鲀鱼精蛋白的提取工艺进行优化,在最优条件下提取率为 19.07%,但并未探究其抑菌活性。目前,鲜有报道河鲀鱼精蛋白的纯化方法及抑菌活性。因此,为获得纯度高和活性好的暗纹东方鲀鱼精蛋白,试验拟采用葡聚糖凝胶层析和羧甲基琼脂糖凝胶 FF 离子交换层析对该精蛋白进行纯化,并通过测定其对金黄

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:31471685)

作者简介:张家源,女,上海海洋大学在读硕士研究生。

通信作者:陈舜胜(1956—),男,上海海洋大学教授,博士。

E-mail: sschen@shou.edu.cn

收稿日期:2019-08-18

色葡萄球菌、大肠杆菌和沙门氏菌的最小抑菌浓度、抑菌圈直径以及菌种的生长曲线来探究暗纹东方鲑鱼精蛋白的抑菌效果,旨在为暗纹东方鲑鱼精蛋白的高效利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

暗纹东方鲑鱼精蛋白:上海海洋大学食品学院实验室自制(暗纹东方鲑精巢由江苏中洋集团股份有限公司提供);

葡聚糖凝胶 G-50(Sephadex G-50):美国 GE Health 公司;

羟甲基琼脂糖凝胶 FF(CM Sepharose Fast Flow)、透析袋:上海源叶生物有限公司;

Real Band 蛋白预染 Marker:Bio Basic Inc (BBI);

SDS-PAGE 预制胶(4%~20%):上海碧云天生物技术有限公司;

三氟乙酸、盐酸、氢氧化钠:分析纯,国药集团上海化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

紫外检测仪:HD-3 型,上海沪西仪器厂有限公司;

电泳仪:DYY-6C 型,北京六一仪器厂;

紫外可见分光光度计:UV-2450 型,日本岛津公司;

高速分散均质机:FJ-200 型,上海标本模型厂;

立式高速冷冻离心机:GL-26M/MI 型,上海赵迪生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 暗纹东方鲑鱼精蛋白最大紫外吸收峰检测 为确定暗纹东方鲑鱼精蛋白的最大紫外吸收波长,先将暗纹东方鲑鱼精蛋白配制成 0.1% 的溶液,再于波长 200~500 nm 下进行吸收光谱扫描。

1.3.2 葡聚糖凝胶层析 参照徐明生等^[9]的方法,稍作修改。称取 15 g Sephadex G-50,轻轻搅拌,充分溶胀。用 25 mmol/L 的乙酸—乙酸钠缓冲液(pH=5.4)浸泡 3 次后装入层析柱(Φ 1.1 cm $\times$ 50 cm),恒流泵流速为 1.0 r/min,调整紫外检测记录仪波长为 220 nm,灵敏度 0.5,用约 2~3 个柱体积的乙酸—乙酸钠缓冲液平衡凝胶柱,待基线平衡后上样。每 3 min 收集一管,合并相同组分,坂口反应检测目标蛋白。冷冻干燥浓缩。

1.3.3 羧甲基琼脂糖凝胶 FF 离子交换层析 参照胡晓璐等^[10]的方法,稍作修改。羧甲基琼脂糖凝胶作为填料,先用纯水清洗 4~5 次,以去除填料内的酒精,再用 50 mmol/L 的甘氨酸—氢氧化钠缓冲液(pH=8.0)浸泡 2~3 次后,将填料装入层析柱(Φ 1.6 cm $\times$ 35 cm),用 4~5 个柱床体积的甘氨酸—氢氧化钠缓冲液平衡柱子,调整紫外检测仪波长为 220 nm,灵敏度 0.5,恒流泵流速

3.2 r/min,待基线平稳后上样。用甘氨酸—氢氧化钠缓冲液(pH=8.0)配置的 0.3~1.8 mol/L 的 NaCl 进行梯度洗脱,3 min/管,合并相同组分后进行坂口反应检测,将目标溶液透析脱盐,冷冻干燥浓缩。

1.3.4 坂口反应 取 2 mL 的离心管,加入 0.5 mL 待检测蛋白溶液,再依次加入 250 μ L 10% 氢氧化钠溶液和 50 μ L 0.2% α -萘酚,充分混匀,加入 50 μ L 次氯酸钠溶液,观察溶液颜色变化,同时取 0.5 mL 精氨酸溶液(0.01%),重复上述操作,作为对照观察。含有鱼精蛋白的溶液会由无色变为红色。

1.3.5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对暗纹东方鲑鱼精蛋白进行鉴定。

1.3.6 细菌生长曲线的测定 取鱼精蛋白溶液,分别加入含有金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和沙门氏菌的试管中,用无菌水作对照,37 $^{\circ}$ C、150 r/min 摇床培养,每隔 2 h 取样一次,测定 600 nm 处的吸光值。以 $OD_{600\text{ nm}}$ 作为纵坐标,培养时间为横坐标,绘制生长曲线^[11]。

1.3.7 鱼精蛋白的最小抑菌浓度(MIC) 采用试管法测定鱼精蛋白的最小抑菌浓度。取 0.1 mL 细菌量为 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL 的各菌悬液,加入到含有 1.4 mL 液体培养基的试管中,加入不同浓度的鱼精蛋白溶液 1 mL,混匀。37 $^{\circ}$ C 培养 24 h,无菌水做空白对照,测定 600 nm 处的吸光值。

1.3.8 抑菌圈直径的测定 用无菌生理盐水配成一定浓度的菌悬液,细菌量约为 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL。准备直径为 5 mm 的圆形滤纸片若干,灭菌后用不同浓度的鱼精蛋白溶液浸泡 15 min,沥干备用。将灭菌的培养基放入超净工作台中冷却至 40~50 $^{\circ}$ C 后倒入含有 0.1 mL 的各菌种菌悬液的平板中,每皿约 20 mL,与菌悬液充分混匀后冷却凝固。将制备的滤纸片贴在含菌平板上,每个平板中贴 4 张滤纸片。无菌水浸泡的滤纸片作为对照组。37 $^{\circ}$ C 培养 24 h,测定抑菌圈直径大小^[12-13]。

2 结果与讨论

2.1 暗纹东方鲑鱼精蛋白紫外吸收光谱

从图 1 可以看出,在波长 217,273 nm 处各有一个吸收峰且 217 nm 处的吸收峰较高,主要原因是该蛋白中肽键引起的紫外吸收较芳香氨基酸明显^[14]。而且 17 种氨基酸在 220 nm 附近均有较大的吸收峰^[15],因此选择蛋白检测波长为 220 nm。

2.2 暗纹东方鲑鱼精蛋白的纯化

2.2.1 葡聚糖凝胶层析 根据鱼精蛋白的大致分子量,选择葡聚糖凝胶——Sephadex G-50 作为层析填料,暗纹东方鲑鱼精蛋白凝胶层析分析图谱如图 2 所示,图谱中有两个蛋白峰,合并相同组分,坂口反应检测目标蛋白,

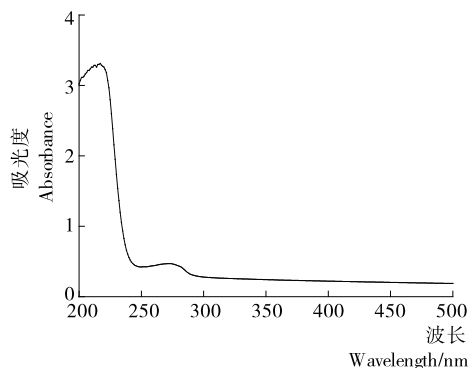


图1 暗纹东方鲀鱼精蛋白紫外吸收光谱图

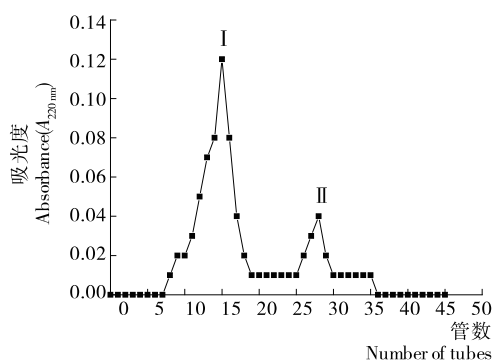
Figure 1 The UV absorption spectra of *Takifugu obscurus* protamine

图2 暗纹东方鲀鱼精蛋白葡聚糖凝胶层析图谱

Figure 2 Sephadex G-50 gel chromatography of *Takifugu obscurus* protamine

结果表明峰Ⅰ出现红色显色反应,峰Ⅱ未出现显色反应,因此峰Ⅰ为目标峰,它也是葡聚糖凝胶层析的主峰。将目标蛋白组分冷冻干燥。

2.2.2 羟甲基琼脂糖凝胶 FF 离子交换层析 鱼精蛋白是一种碱性蛋白,所以选择阳离子交换层析填料——羟甲基琼脂糖凝胶为离子交换层析填料,暗纹东方鲀鱼精蛋白离子交换层析紫外吸收图谱如图3。从图3可以看出,1~20管为穿透峰,不做分析,20~100管是用含0.3~1.8 mol/L的NaCl缓冲液进行线性洗脱,出现3个峰,分别命名为峰Ⅰ、峰Ⅱ和峰Ⅲ,鉴定后发现峰Ⅰ和峰Ⅱ无显色反应,峰Ⅲ坂口反应显著,因此峰Ⅲ为目标蛋白峰。将目标蛋白组分冷冻干燥。

2.3 暗纹东方鲀鱼精蛋白的鉴定

2.3.1 坂口反应 经坂口反应鉴定,含鱼精蛋白的组分呈现红色,其余为无色。说明葡聚糖凝胶层析图谱中,峰Ⅰ为目标峰;羟甲基琼脂糖凝胶 FF 离子交换层析图谱中,峰Ⅲ为目标峰。

2.3.2 SDS-PAGE 凝胶电泳 从图4可以看出,纯化后的暗纹东方鲀鱼精蛋白仍出现两个条带,说明该纯化方法并不能很好地将它分离开,但得到的条带较原条带细,

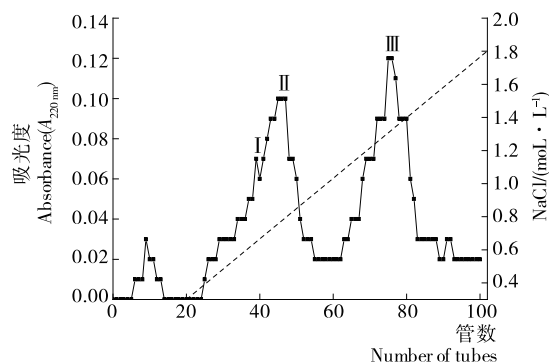
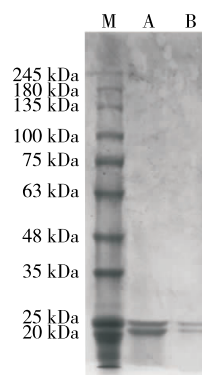


图3 暗纹东方鲀鱼精蛋白羟甲基琼脂糖凝胶 FF

离子交换层析图谱

Figure 3 CM sepharose fast flow ion exchange chromatography of *Takifugu obscurus* protamine

M. 蛋白 Marker A. 粗鱼精蛋白 B. CM Sepharose FF Ⅲ峰

图4 纯化暗纹东方鲀鱼精蛋白 Tricine-SDS-PAGE 电泳图谱

Figure 4 Tricine-SDS-PAGE electrophotogram of purified *Takifugu obscurus* protamine

颜色较浅且无拖尾现象。

2.4 鱼精蛋白溶液对细菌生长曲线的影响

由图5~7可知,各组的生长情况均呈现S型,且鱼精蛋白溶液处理组较对照组迟滞,始终处于较低水平状态,可见其抑菌效果明显。

2.5 鱼精蛋白的最小抑菌浓度

从表1可以看出,鱼精蛋白对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度为500 mg/L,对大肠杆菌和沙门氏菌的最小抑菌浓度为1 000 mg/L。刘燕妮^[16]研究得出鲑鱼鱼精蛋白对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度为250 mg/L,对大肠杆菌的最小抑菌浓度与试验结果一致,为1 000 mg/L。总的来看,鱼精蛋白对革兰氏阳性菌的最小抑菌浓度明显小于革兰氏阴性菌。可能是由于革兰氏阳性菌的细胞壁表面带有较多的负电荷具有较强的负电性,具有正电性的鱼精蛋白更容易通过静电作用扰乱革兰氏阳性菌的细胞壁,实现抑菌作用^[17]。

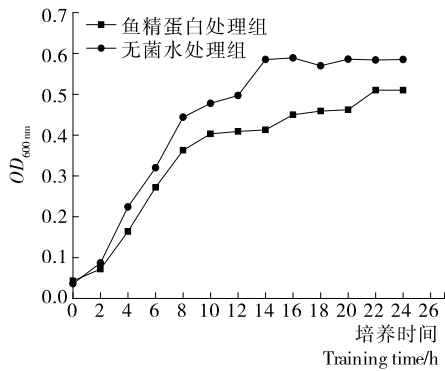


图 5 暗纹东方鲀鱼精蛋白对沙门氏菌生长曲线的影响
Figure 5 Effect of *Takifugu obscurus* protamine solution on the growth curves of *Salmonella*

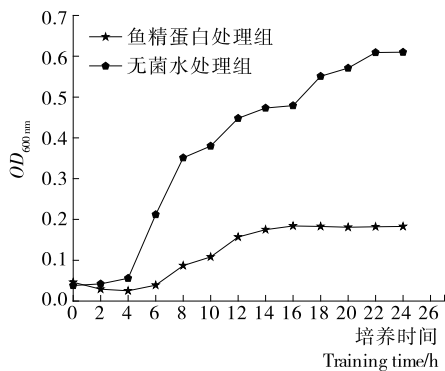


图 6 暗纹东方鲀鱼精蛋白对金黄色葡萄球菌生长曲线的影响
Figure 6 Effect of *Takifugu obscurus* protamine solution on the growth curves of *Staphylococcus aureus*

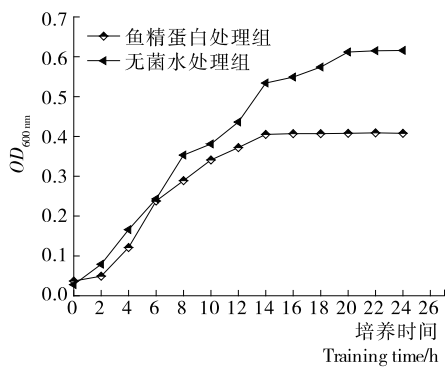


图 7 暗纹东方鲀鱼精蛋白对大肠杆菌生长曲线的影响
Figure 7 Effect of *Takifugu obscurus* protamine solution on the growth curves of *E. coli*

2.6 抑菌圈直径

抑菌圈直径 >7 mm 可判定为有抑菌效果^[18]。通过对沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌 3 种细菌的抑菌圈直径测定(见表 2)发现,20 mg/mL 的鱼精蛋白溶液

对金黄色葡萄球菌的抑菌效果最好,抑菌圈直径为 8.9 mm。该蛋白抑菌效果的差异可能是由菌种的细胞壁组成和构造差异引起的。

表 1 鱼精蛋白的最小抑菌浓度[†]

Table 1 Determination of minimum inhibitory concentration of protamine

鱼精蛋白浓度/ (mg · L ⁻¹)	沙门氏菌	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌
2 000.0	—	—	—
1 000.0	—	—	—
500.0	+	—	+
250.0	+	+	+
125.0	+	+	+
62.5	+	+	+

† “—”表示无菌体生长;“+”表示有菌体生长。

表 2 鱼精蛋白的抑菌圈直径

Table 2 Inhibitory ring diameter of protamine

鱼精蛋白浓度/ (mg · L ⁻¹)	抑菌圈直径/mm		
	沙门氏菌	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌
20.00	8.1	8.9	8.2
10.00	5.9	6.2	6.1
5.00	5.7	—	5.9
2.50	—	—	—
1.25	—	—	—

† “—”表示培养基中无抑菌圈产生,滤纸片直径为 5 mm。

3 结论

采用葡聚糖凝胶层析和羟甲基琼脂糖凝胶 FF 离子交换层析对粗提的暗纹东方鲀鱼精蛋白进行纯化,然后通过精氨酸特征反应确定了羟甲基琼脂糖凝胶 FF 离子交换层析的峰Ⅲ为目标蛋白峰,收集目标蛋白峰,依次进行透析除盐、减压蒸馏浓缩和冷冻干燥后得目标蛋白。经 Tricine-SDS-PAGE 电泳后发现,纯化前后的电泳条带中,后者的鱼精蛋白条带较纯化前细且无拖尾现象。但未能得到单条带的蛋白组分,说明纯化效果不理想。鱼精蛋白对金黄色葡萄球菌、沙门氏菌和大肠杆菌的最小抑菌浓度分别为 500,1 000,1 000 mg/L,可有效延缓金黄色葡萄球菌、沙门氏菌和大肠杆菌的生长且对金黄色葡萄球菌的抑制效果最好。但其抑菌机理与差异有待进一步研究。

参考文献

[1] 朱永乐,李通,孟志云,等. 鱼精蛋白模拟肽的体外代谢稳定性和代谢酶表型研究[J]. 国际药学研究杂志,2018, 45 (4): 295-300.

(下转第 197 页)

参考文献

- [1] 王立, 杨炜, 钱海峰, 等. 麦麸非淀粉多糖对烘焙品质的影响[J]. 食品与机械, 2015, 31(4): 253-260.
- [2] 宋莹莹, 徐文迪, 曹栋. 醇提大豆磷脂副产品对面包品质的影响[J]. 食品与机械, 2016, 32(10): 178-182.
- [3] 宁芊, 游佩琼, 吴先辉, 等. 复配亲水胶体对面团流变特性及全麦面包品质的影响[J]. 食品与机械, 2019, 35(9): 32-38.
- [4] 田海娟, 朱珠, 张传智, 等. 紫苏叶超微粉对面团特性及面包品质的影响[J]. 食品与机械, 2016, 32(1): 194-197.
- [5] 熊凤萍, 赵亚军. 氧化剂在面包生产中的应用[J]. 河北农业大学学报, 1992(4): 91-94.
- [6] 张舒, 王瑞丽, 卢林, 等. 竹叶抗氧化物对面包品质及其抗氧化特性的影响[J]. 中国食品添加剂, 2018(6): 130-136.
- [7] 冯卫华, 黄诗琪, 李冰, 等. 外源抗氧化剂对面包品质及保藏的影响[J]. 中国食品学报, 2016, 16(8): 178-185.
- [8] 代雅杰, 黑雪, 邓莉梅, 等. 橘皮粉对面包烘焙品质及其酚类物质抗氧化能力的影响[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(4): 154-158.
- [9] OHI Y, NAMIKI T, KATATAE M, et al. Effects of the Addition of the natural carotenoid astaxanthin from microalgae *Haematococcus pluvialis* on the physical properties of bread[J]. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 2009, 56(11): 579-584.
- [10] 刘琦. 两种微藻喷雾干燥工艺优化及微藻面包的制作[D]. 大连: 大连海洋大学, 2015.
- [11] 欧阳琴, 陈兴, 黄亚治, 等. 雨生红球藻提取虾青素不同机械破壁方法的研究[J]. 福州大学学报, 2005, 33(1): 111-115.
- [12] 罗柳茵, 刘晖, 刘瑞, 等. 蛋白核小球藻面包的加工工艺研究[J]. 粮食与油脂, 2017, 42(3): 148-154.
- [13] 程丽丽, 朱海霞. 螺旋藻面包配方和工艺及其品质研究[J]. 食品科技, 2018, 43(1): 174-178.
- [14] WANG Bao-bei, ZHANG Zhen, HU Qiang, et al. Cellular capacities for high-light acclimation and changing lipid profiles across life cycle stages of the green alga *Haematococcus pluvialis*[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e106679.
- [15] GWAK Y, HWANG Y S, WANG Bao-bei, et al. Comparative analyses of lipidomes and transcriptomes reveal a concerted action of multiple defensive systems against photooxidative stress in *Haematococcus pluvialis*[J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65(15): 4 317.
- [16] 王宝贝, 加晶, 孙辉, 等. 烘焙温度对小球藻脂脂肪酸、色素及乙醇提取物抗氧化活性的影响[J]. 食品与机械, 2018, 34(7): 29-33.
- [17] 庄海宁, 高林林, 冯涛. 猴头菇/香菇 β -葡聚糖对面包品质和淀粉消化性的影响[J]. 食品工业科技, 2017, 38(4): 152-157.
- [18] 杨萍芳. 油脂在焙烤食品中的作用[J]. 农产品加工, 2008(8): 12.
- [19] 张园园, 温白娥, 卢宇, 等. 藜麦粉对小麦面团、面包质构特性及品质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2017(10): 197-202.
- [2] LUNGILE N T, SULAY T, FEDERICO B, et al. Protamine nanocapsules as carriers for oral peptide delivery[J]. Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society, 2018, 291: 157-168.
- [3] GRIFFIN M J, RINDER H M, SMITH B R, et al. The effects of heparin, protamine, and heparin/protamine reversal on platelet function under conditions of arterial shear stress[J]. Anesthesia and Analgesia, 2001, 93(1): 20-27.
- [4] MC CLEAN M, DEBEVERE J. Evaluation of antimicrobial activities of protamine[J]. Food Microbiology, 1994(11): 417-427.
- [5] HOSOMI R, MIYAUCHI K, YAMAMOTO D, et al. Salmon protamine decreases serum and liver lipid contents by inhibiting lipid absorption in an in vitro gastrointestinal digestion model and in rats[J]. Journal of Food Science, 2015, 80(10): H2 346-H2 353.
- [6] 律海伦, 马家驹, 胡晓飞, 等. 粉红马哈鱼鱼精蛋白的提取纯化及抑菌性初探[J]. 食品科技, 2019, 44(3): 239-243.
- [7] 曹文红, 刘忠嘉, 林芸, 等. 中巨石斑鱼精巢鱼精蛋白提取工艺优化及其抗菌活性的初步研究[J]. 食品科技, 2017(11): 267-271.
- [8] 刘淑集, 陈梧英, 许旻, 等. 菊黄东方鲀鱼精蛋白提取工艺优化研究[J]. 渔业现代化, 2019, 46(2): 75-82.
- [9] 徐明生, 陈锦屏, 上官新展. 鲤鱼抗菌精蛋白的分离纯化及鉴定[J]. 食品工业科技, 2004, 25(10): 51-54.
- [10] 胡晓璐, 刘淑集, 吴成业. 鲑鱼鱼精蛋白的提取工艺优化研究[J]. 渔业研究, 2013, 35(6): 434-440.
- [11] 朱艳蕾. 细菌生长曲线测定实验方法的研究[J]. 微生物学杂志, 2016(5): 108-112.
- [12] TAO Yan, ZHAO Dong-mei, WEN Ya. Expression, purification and antibacterial activity of the channel catfish hepcidin mature peptide [J]. Protein Expression and Purification, 2014, 94: 73-78.
- [13] 张佳, 王莹, 张峰, 等. 滤纸片法测定黄花蒿提取物对霉菌的抑制活性[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(5): 1 153-1 154.
- [14] 胡晓璐. 柔鱼鱼精蛋白的提取纯化及抑菌特性研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2012: 35-38.
- [15] 董欣, 王丽燕. 氨基酸紫外光谱的再测定[J]. 德州学院学报, 2015(2): 44-46.
- [16] 刘燕妮. 鱼精蛋白的制备、纯化及其絮凝和抑菌活性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015: 46-52.
- [17] 刘红玉, 姜学芬, 崔洪斌. 大马哈鱼鱼精蛋白的提取及抑菌作用的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(2): 37-39.
- [18] 张黎丽, 马梦琳, 李晨熙, 等. 蛋清溶菌酶的分离纯化及其抑菌活性研究[J]. 生物化工, 2017, 3(1): 13-16.

(上接第 174 页)