

超声辅助提取紫贻贝加工下脚料抗菌肽工艺优化

Optimization of ultrasound-assisted extraction process of antimicrobial peptides from the by-products of *Mytilus edulis*

张 玥 杨玉霞 时光宇 赵莘芷 潘渊博 徐琼怡

ZHANG Yue YANG Yu-xia SHI Guang-yu ZHAO Xin-zhi PAN Yuan-bo XU Qiong-yi

(浙江海洋大学东海科学技术学院, 浙江 舟山 316000)

(Donghai Science and Technology College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, Zhejiang 316000, China)

摘要:采用超声辅助乙酸法提取紫贻贝加工下脚料抗菌肽,并优化其工艺条件。结果表明,最适提取工艺条件为超声功率 200 W、乙酸质量分数 0.8%、液料比($V_{\text{乙酸}} : m_{\text{紫贻贝}}$)6:1 (mL/g)、超声提取时间 16 min,此条件下抗菌肽得率为 1.55%,提取物对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径为 7.52 mm,均显著高于传统乙酸法($P < 0.05$),说明此优化工艺可行,该抗菌肽具有一定的抑菌活性。

关键词:紫贻贝;下脚料;抗菌肽;超声辅助提取

Abstract: The use of ultrasonic-assisted acetate extraction to improve the efficiency of the conventional acetate extraction technique with the aim of extracting antimicrobial peptides from *Mytilus edulis* by-product using acetate solution was investigated. Based on the single factor experiment, response surface methodology was used to optimize experimental conditions for extraction of antimicrobial peptides. The optimum extraction conditions for maximum antimicrobial peptide yield were established to be ultrasonic power of 200 W, acetate concentration of 0.8%, liquid-material ratio of 6:1 (mL/g), and ultrasonic extraction time of 16 min. Under abovementioned conditions, the yield and the zone of inhibition against *Staphylococcus aureus* were 1.55% and 7.52 mm, respectively. The antimicrobial peptides yield and the relative of inhibition zones were significantly higher than those of the traditional acetic acid extraction method ($P < 0.05$). The optimized technology was feasible and the antimicrobial peptides had antibacterial activity.

Keywords: *Mytilus edulis*; by-product; antimicrobial peptide; ultrasound-assisted extraction

紫贻贝(*Mytilus edulis* Linnaeus)俗称“海红”“淡菜”,广泛分布于中国黄海、渤海、东海和南海北部,是中国主要的海洋经济贝类。紫贻贝生产季节性较强、产量大、鲜活易腐不耐贮藏,会产生大量的加工下脚料——含闭壳肌的熟贝壳、蒸煮液、受损的和规格(<6 cm)的紫贻贝(蛋白含量为 10%~23%)等^[1]。目前,该下脚料的利用研究主要集中于贝壳和蒸煮液,如贝壳粉(CaCO_3)/贝壳煅烧粉(CaO)作为聚丙烯塑料填充料^[2]和食源性致病菌抑菌剂^[3]等,蒸煮液制备海鲜调味品^[4]等,而受损/小规格紫贻贝的利用研究相对较少,Beaulieu 等^[5]利用复合蛋白酶水解受损/小规格紫贻贝制备抗增殖活性多肽。

近年来,随着细菌对抗生素耐药性、抗生素残留等问题日益严重,亟需寻找新型抗菌活性物质。滤食性动物贻贝长期生活在富含各种微生物水环境中(菌落总数高达 6 lg CFU/mL)^[6],由于贻贝缺乏特异性的免疫系统,所以其免疫防御主要通过细胞(吞噬、包裹和呼吸爆发等)和体液(凝集素、溶酶体酶、抗菌因子等)进行免疫防御^[7]。相对于其他双壳贝类而言,抗菌肽在贻贝抵御致病菌侵袭中发挥着重要作用^[8]。抗菌肽具有抑菌活性强、抑菌谱广、不产生耐药性以及无有害残留等优点。目前,从贻贝的血细胞、鳃和消化腺中鉴定出多种抗菌肽,按其序列特征可分为 6 个家族^[9],即 defensins、myticins、mytilins、mytimycins、big defensins 和 mytimacins。常见的贻贝抗菌肽制备方法有:① 利用甲醇^[10]、乙酸溶液^[11]、三氟乙酸溶液^[12]、Tris-HCl/磷酸盐缓冲液^[13]等试剂浸渍提取贻贝抗菌肽,该方法可完全保持抗菌肽原有生物活性,但得率低且需大量原材料;② 采用化学合成法^[14-15],该方法存在成本高以及溶剂残留等问题。

超声波辅助提取法因超声波机械效应和空化效应等特性具有得率高、提取时间短、溶剂使用量少等特点而被广泛应用于蛋白质及酶的提取^[16]。黄占旺等^[17]对鲤鱼鱼卵中鱼精蛋白的超声波辅助硫酸提取工艺进行了优

基金项目:浙江省自然科学基金(编号:LY19C200007);国家级大学生创新创业训练计划项目(编号:201810340038)

作者简介:张玥,女,浙江海洋大学在读本科生。

通信作者:杨玉霞(1961—),女,浙江海洋大学副教授。

E-mail: 344173730@qq.com

收稿日期:2020-05-06

化,结果表明,超声波辅助提取技术可使硫酸浓度和提取时间分别由 7.5%、2 h 减至 5.0%、20 min,且获得的鱼精蛋白具有较高抑菌活性;Yuan 等^[18]研究解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens* strain NJN-6)发酵液中抗真菌脂肽(iturin A 和 fengycin)的超声波辅助正丁醇提取工艺,发现在超声波功率 200 W、提取时间 8 min、提取次数 2 次、正丁醇与发酵液体积比 3 : 25 条件下抗真菌脂肽得率最高。而有关超声辅助提取贻贝抗菌肽的研究尚未见报道。试验拟采用超声辅助乙酸提取紫贻贝加工下脚料中的抗菌肽,并对其提取工艺进行优化,以期建立一种工艺操作便捷合理、得率高和抑菌活性好的提取工艺,为紫贻贝加工下脚料的开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

紫贻贝加工下脚料:受损的和规格的紫贻贝,收集后速冻并装入碎冰泡沫箱,舟山市某水产公司;

金黄色葡萄球菌(GIM1.178):广东省微生物菌种保藏中心;

胰酪大豆胨液体培养基(Trypticase Soy Broth Medium, TSB)、胰酪大豆胨琼脂培养基(Trypticase Soy Agar Medium, TSA):杭州微生物试剂有限公司;

冰乙酸:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

组织捣碎机:Waring-8010S 型,美国 Waring 公司;

超声波清洗器:SK5210HP 型,上海科导超声仪器有限公司;

冷冻干燥机:LGJ-10 型,北京松原华兴科技发展有限公司;

立式压力蒸汽灭菌器:BXN-50M 型,上海博迅医疗生物仪器股份有限公司;

生化培养箱:SPX-150B-Z 型,上海博迅医疗生物仪器股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 抗菌肽的制备

(1) 超声辅助乙酸法:采用先煮沸,再匀浆,然后超声辅助提取工艺。紫贻贝加工下脚料(受损的和规格的紫贻贝)半解冻后取肉、清洗、沥干。准确称取 40 g 紫贻贝肉加入至 500 mL 蓝盖螺口试剂瓶中,加入一定体积的预热至 80 ℃ 的一定质量分数的乙酸溶液,沸水浴 30 min,冰水浴中冷却至室温,混合物倒入匀浆器中,18 000 r/min 匀浆 20 s,倒入烧杯中,置于冷却水循环的超声波清洗器内,超声提取抗菌肽,12 000 r/min 离心 30 min,上清液冻干后即为紫贻贝抗菌肽。

(2) 传统乙酸法:下脚料预处理同超声辅助乙酸法,准确称取 40 g 紫贻贝肉加入至 500 mL 蓝盖螺口试剂瓶

中,加入一定体积的预热至 80 ℃ 的一定质量分数的乙酸溶液,沸水浴 30 min,冰水浴中冷却至室温,18 000 r/min 匀浆 20 s,倒入烧杯中,置于冷却水循环的超声波清洗器内,浸渍提取一定时间后,12 000 r/min 离心 30 min,上清液冻干后即为紫贻贝抗菌肽。其中,乙酸质量分数、液料比和提取时间均为相应超声辅助乙酸法的优化工艺条件。

1.3.2 超声辅助乙酸法提取工艺优化

(1) 单因素试验:考察不同乙酸质量分数、超声提取时间、液料比对抗菌肽得率的影响,其基本提取条件为超声功率 200 W、乙酸质量分数 1.0%、超声提取时间 15 min、液料比($V_{\text{乙酸}} : m_{\text{紫贻贝}}$)6 : 1 (mL/g),分别考察乙酸质量分数(0.2%, 0.4%, 0.8%, 1.6%, 2.0%)、超声提取时间(5, 10, 15, 20, 25 min)、液料比[$V_{\text{乙酸}} : m_{\text{紫贻贝}}$ 分别为 2 : 1, 4 : 1, 6 : 1, 8 : 1, 10 : 1 (mL/g)]对多肽得率和抑菌活性的影响。

(2) 响应面优化试验:在单因素试验基础上,选取乙酸质量分数、超声提取时间、液料比为自变量,抗菌肽得率为响应值,采用 Box-Behnken 中心组合原理,设计三因素三水平的响应面试验,优化超声辅助乙酸提取紫贻贝下脚料抗菌肽工艺。

1.3.3 抗菌肽得率测定 采用 Bradford 等^[19]的方法测定上清液中总蛋白含量,以牛血清蛋白作为标准物,绘制标准曲线($y = 0.0036x + 0.286$, $R^2 = 0.9951$)。按式(1)计算抗菌肽得率。

$$Y = \frac{c \cdot v}{1000m} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

Y——抗菌肽得率, %;

c——上清液中总蛋白浓度, mg/L;

v——上清液体积, mL;

m——紫贻贝肉质量, g。

1.3.4 抑菌试验 采用琼脂打孔法检测紫贻贝加工下脚料抗菌肽的抗菌活性。用 0.02 mol/L pH 为 4.0 的乙酸—乙酸钠缓冲液将冻干抗菌肽配制成 10 mg/mL 多肽溶液。活化的敏感菌接种于 100 mL TSB 培养基中, 37 ℃ 振荡培养 7~8 h ($OD_{600\text{ nm}} = 0.6 \sim 0.8$), 取 100 μ L 菌液加入 45 ℃ 已灭菌 TSA 培养基中, 混匀, 倒平板。待凝固后用灭菌打孔器($\varnothing 10$ mm)打孔, 每孔分别加入 100 μ L 抗菌肽溶液, 4 ℃ 放置 60 min, 37 ℃ 培养 16~18 h 后, 采用十字交叉法用游标卡尺测量抑菌圈直径。以 0.02 mol/L pH 为 4.0 的无菌乙酸—乙酸钠缓冲液为阴性对照, 用抑菌圈直径(mm)表示抑菌活性。

1.4 数据处理

试验结果以平均值 $\pm$ SD 表示, 利用 SPSS 19.0 软件进行 One-Way ANOVA 分析, 采用 Duncan 法检验多组数据间的差异显著性($P < 0.05$), 利用 OriginPro 9.1 软件

进行绘图,字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

预试验结果显示,紫贻贝加工下脚料抗菌肽对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均有抑菌效果,且对金黄色葡萄球菌的抑菌效果最好,而对枯草芽胞杆菌却无抑菌效果(抑菌圈直径 < 2 mm)。因此,后续试验中选择金黄色葡萄球菌为敏感菌。

2.1.1 乙酸质量分数 由图1可知,当乙酸质量分数为 $0.2\% \sim 0.8\%$ 时,抗菌肽得率随乙酸质量分数的增大显著提高($P < 0.05$),提高了 61.36% ;进一步增大乙酸质量分数,抗菌肽得率却无显著提高($P > 0.05$)。同时,随着乙酸质量分数的增大,抗菌肽的抑菌活性先升高后降低,但均无显著变化($P > 0.05$),其中,乙酸质量分数为 0.8% 时所获得的抗菌肽的抑菌活性最高,即抑菌圈直径为 7.54 mm。这可能是贻贝抗菌肽多为带 $2 \sim 7$ 个正电荷的碱性蛋白^[20],且酸性条件下其溶解度高^[21]。由于高浓度乙酸溶液具有较高渗透压,使细胞中非抗菌肽的蛋白等物质溶出,与抗菌肽得率的结果一致。综合考虑,选取质量分数为 0.8% 左右的乙酸溶液为宜。

2.1.2 液料比 由图2可知,当液料比($V_{\text{乙酸}} : m_{\text{紫贻贝}}$)为 $2:1 \sim 6:1$ (mL/g)时,抗菌肽得率随液料比的提高显著增加($P < 0.05$),增加了 83.33% ;进一步提高液料比,抗菌肽得率却无显著变化。同时,抗菌肽的抑菌活性随液料比的提高先升高后降低,但均无显著变化($P > 0.05$)。高液料比可降低体系黏度,加快传质过程,促进胞内抗菌肽的释放,因而提高得率^[18]。当大部分目标肽已释放时,进一步提高液料比,得率缓慢增长。因此液料比($V_{\text{乙酸}} : m_{\text{紫贻贝}}$)选择 $6:1$ (mL/g)左右较合理。

2.1.3 超声提取时间 由图3可知,当超声提取时间为 $5 \sim 15$ min时,抗菌肽得率随超声提取时间的延长显著增加($P < 0.05$),提高了 70.59% ,而抗菌肽的抑菌活性却无

显著变化($P > 0.05$);当超声提取时间 > 15 min时,抗菌肽得率随超声提取时间的延长逐渐下降,但无显著变化,而抗菌肽的抑菌活性却显著降低($P < 0.05$)。超声波产生的空化效应破坏细胞组织,从而促使胞内抗菌肽释放并扩散至胞外溶剂中^[16],破碎细胞内大部分抗菌肽在最初的 15 min左右释放并扩散至提取溶剂中,因此抗菌肽得率显著增加。而超声时间过长会引起局部过热,导致部分蛋白结构与贻贝抗菌肽二级结构被破坏^[22],使得抗菌肽得率和抑菌活性随之下降。因此,初步确定较适宜的超声提取时间为 15 min左右。

2.2 响应面优化

2.2.1 回归方程的建立 利用 Design-Expert 10.0.7 软件进行响应面 Box-Behnken 中心组合试验设计,试验因素与水平见表1,试验方案及结果见表2。通过 Design-Expert 软件对试验结果进行最小二乘法拟合回归,得二次多元回归方程为:

$$Y = 1.518 + 0.011 \ 25A + 0.036 \ 25B + 0.112 \ 5C + 0.025AB + 0.022 \ 5AC - 0.002 \ 5BC - 0.111 \ 5A^2 - 0.116 \ 5B^2 - 0.099C^2. \quad (2)$$

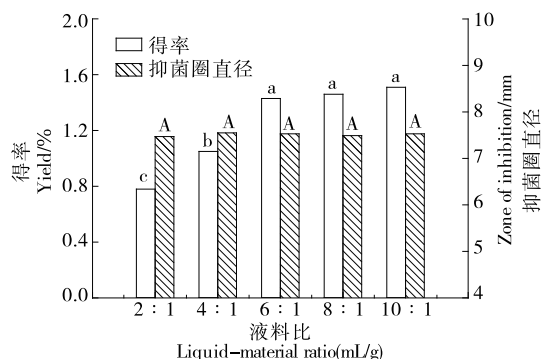


图2 液料比对抗菌肽得率与抑菌活性的影响

Figure 2 Effect of liquor-to-material ratio on the yield and antimicrobial activity of antimicrobial peptides from *Mytilus edulis* by-product

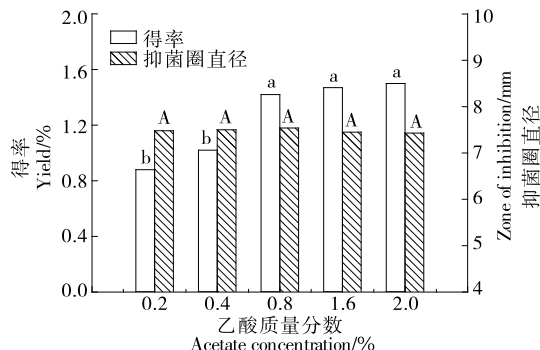


图1 乙酸质量分数对抗菌肽得率与抑菌活性的影响

Figure 1 Effect of acetate concentration on the yield and antimicrobial activity of antimicrobial peptides from *Mytilus edulis* by-product

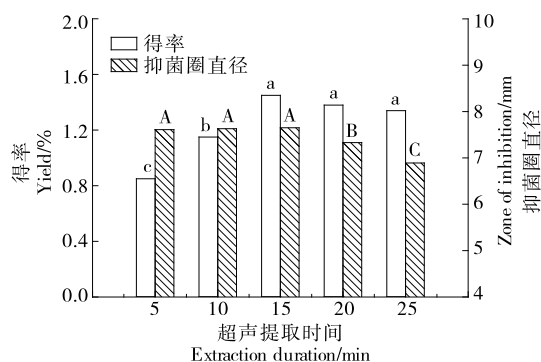


图3 超声提取时间对抗菌肽得率与抑菌活性的影响

Figure 3 Effect of extraction duration on the yield and antimicrobial activity of antimicrobial peptides from *Mytilus edulis* by-product

表 1 响应面试验因素与水平表

Table 1 Factors and levels of response surface analysis

水平	A 乙酸质量 分数/%	B 液料比 (mL/g)	C 超声提取 时间/min
-1	0.6	5 : 1	13
0	0.8	6 : 1	15
1	1.0	7 : 1	17

表 2 响应面试验方案及结果

Table 2 Response surface design matrix and experimental results

试验号	A	B	C	Y/%
1	-1	-1	0	1.26
2	0	-1	-1	1.16
3	1	0	1	1.45
4	0	1	-1	1.23
5	0	0	0	1.52
6	0	-1	1	1.38
7	1	1	0	1.37
8	0	0	0	1.53
9	1	-1	0	1.24
10	1	0	-1	1.18
11	0	0	0	1.54
12	-1	0	1	1.39
13	0	0	0	1.52
14	-1	1	0	1.29
15	0	0	0	1.48
16	-1	0	-1	1.21
17	0	1	1	1.44

2.2.2 模型方差分析 由表 3 可知,回归模型 $P<0.000\ 1$, 差异极显著,说明该模型有意义;失拟项 $P=0.907\ 2>0.05$,无显著差异,表明该模型与纯误差无显著关联;决定系数 $R^2=0.991\ 7$,调整后决定系数 $R_{adj}^2=0.981\ 0$,说明回归方程拟合度较好;模型变异系数 $CV=1.34\%$,说明试验数据可靠^[23-24]。各因素对抗菌肽得率的影响程度依次为 $C>B>A$;B、C、 A^2 、 B^2 、 C^2 对抗菌肽得率有极显著影响 ($P<0.01$),AB、AC 对抗菌肽得率显著影响 ($P<0.05$)。综上,所建模型的准确性和可信度较高,可用于预测分析紫贻贝加工下脚料抗菌肽得率。

2.2.3 因素间交互作用 由图 4~6 可知,乙酸质量分数与液料比和乙酸质量分数与超声提取时间对抗菌肽得率的影响显著,其响应曲面坡度陡峭,等高线宽度大;液料比与超声提取时间的交互作用对抗菌肽得率的影响不显著 ($P>0.05$),其响应曲面弯曲不明显,等高线宽度较小^[25-26],与方差分析结果一致。

2.2.4 工艺确定及验证实验 由响应面法获得抗菌肽的最佳提取工艺为乙酸质量分数 0.825% 、液料比 ($V_{\text{乙酸}}:m_{\text{紫贻贝}}$) $6.163:1$ (mL/g)、超声提取时间 $16.138\ \text{min}$,预测抗菌肽得率为 1.553% 。为便于实际操作,将抗菌肽提取工艺修正为乙酸质量分数 0.8% 、液料比 ($V_{\text{乙酸}}:m_{\text{紫贻贝}}$) $6:1$ (mL/g)、超声提取时间 $16\ \text{min}$,此条件下的抗菌肽得率为 $(1.549\pm0.036)\%$ ($n=3$),与预测值相对误差 $<0.3\%$,说明利用响应面法优化获得的抗菌肽提取工艺具有一定的可靠性。此外,传统乙酸法提取抗菌肽得率为 $(0.982\pm0.041)\%$,表明超声辅助提取可使抗菌肽得率提高 57.74% ($P<0.05$)。

2.3 抑菌性质

由图 7 可知,超声辅助乙酸法提取的抗菌肽的抑菌

表 3 回归模型方差分析[†]

Table 3 Variance analysis of the regression model

方差来源	平方和	自由度	均方差	F 值	P 值	显著性
模型	0.280	9	0.031	92.89	$<0.000\ 1$	* *
A	$1.013\text{E}-03$	1	$1.013\text{E}-03$	3.01	0.126 4	
B	0.011	1	0.011	31.25	0.000 8	* *
C	0.097	1	0.097	287.73	$<0.000\ 1$	* *
AB	$2.500\text{E}-003$	1	$2.500\text{E}-003$	7.43	0.029 5	*
AC	$2.250\text{E}-003$	1	$2.250\text{E}-003$	6.02	0.043 9	*
BC	$2.500\text{E}-005$	1	$2.500\text{E}-005$	0.07	0.793 0	
A^2	0.052	1	0.052	155.59	$<0.000\ 1$	* *
B^2	0.057	1	0.057	169.86	$<0.000\ 1$	* *
C^2	0.041	1	0.041	122.66	$<0.000\ 1$	* *
残差	$2.355\text{E}-003$	7	$3.364\text{E}-004$			
失拟项	$2.750\text{E}-004$	3	$9.167\text{E}-005$	0.18	0.907 2	
纯误差	$2.080\text{E}-003$	4	$5.200\text{E}-004$			
总离差	0.280	16				

[†] * * 差异极显著 ($P<0.01$); * 差异显著 ($P<0.05$); $R^2=0.991\ 7$, $R_{adj}^2=0.981\ 0$ 。

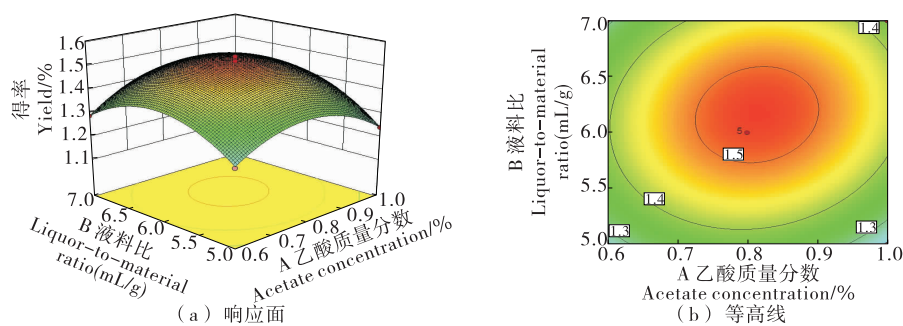


图4 乙酸质量分数与液料比的交互作用

Figure 4 The interaction effect and contour on the yield of antimicrobial peptides between acetate concentration and liquor-to-material ratio

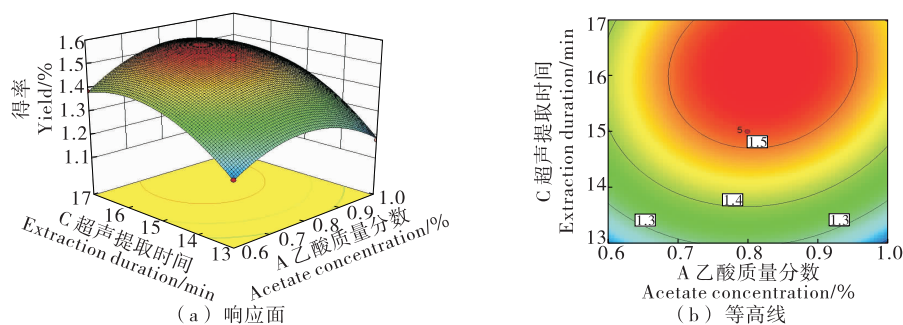


图5 乙酸质量分数与超声提取时间的交互作用

Figure 5 The interaction effect and contour on the yield of antimicrobial peptides between acetate concentration and extraction duration

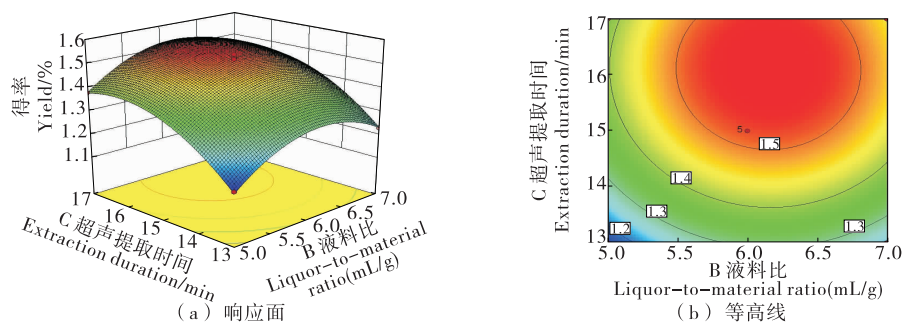
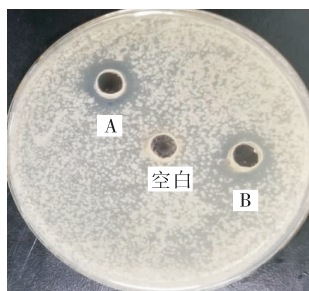


图6 液料比和超声提取时间的交互作用

Figure 6 The interaction effect and contour on the yield of antimicrobial peptides between liquor-to-material ratio and extraction duration



A. 超声辅助乙酸法 B. 传统乙酸法

图7 紫贻贝抗菌肽的抑菌效果

Figure 7 Antimicrobial activity of antimicrobial peptides from *Mytilus edulis* by-product using the two different methods

圈直径为 (7.52 ± 0.08) mm,而传统乙酸法提取的抗菌肽的抑菌圈直径为 (6.48 ± 0.05) mm,表明超声辅助提取可显著提高抗菌肽的抑菌活性($P < 0.05$)^[27]。进一步表明超声辅助乙酸提取紫贻贝下脚料抗菌肽的工艺是可行的。

3 结论

采用超声辅助提取的方法,以乙酸溶液为提取液,通过响应面试验优化获得紫贻贝加工下脚料抗菌肽的最适提取工艺条件为超声功率 200 W、乙酸质量分数 0.8%、液料比 ($V_{\text{乙酸}} : m_{\text{紫贻贝}}$) 6 : 1 (mL/g)、超声提取时间 16 min,该条件下抗菌肽得率和抑菌圈直径分别为1.55%

和 7.52 mm,均显著高于传统乙酸法($P<0.05$),表明该超声辅助乙酸提取紫贻贝下脚料抗菌肽的工艺是可行的。后续将考察原料贮藏条件(温度、时间)、提取剂类型和超声波功率,以提高抗菌肽得率,同时对抗菌肽稳定性(热、酸碱、冻融次数、蛋白酶)进行考察。

参考文献

- [1] HARNEDY P A, FITZGERALD R J. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish; A review[J]. Journal of Functional Foods, 2012, 4(1): 6-24.
- [2] HAMESTER M R, BALZER P S, BECKER D, et al. Characterization of calcium carbonate obtained from oyster and mussel shells and incorporation in polypropylene [J]. Materials Research-ibero-american Journal of Materials, 2012, 15(2): 204-208.
- [3] 胡兴娟, 沈飏, 余辉, 等. 不同贝壳煨烧粉的杀菌及抑菌效果[J]. 食品工业科技, 2018, 39(24): 82-85.
- [4] CROSS, IGNOT B L, RAZAFINTSALAMA C, et al. Electrodialysis desalination and reverse osmosis concentration of an industrial mussel cooking juice: Process impact on pollution reduction and on aroma quality[J]. Journal of Food Science, 2006, 69(6): C435-C442.
- [5] BEAULIEU L, THIBODEAU J, BONNET C, et al. Evidence of anti-proliferative activities in blue mussel (*Mytilus edulis*) by-products[J]. Marine Drugs, 2013, 11(4): 975-990.
- [6] HAUG T, STENSVAG K, OLSEN O M, et al. Antibacterial activities in various tissues of the horse mussel, *Modiolus modiolus*[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2004, 85(2): 112-119.
- [7] CANESI L, GALLO G, GAVIOLI M, et al. Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves[J]. Microscopy Research and Technique, 2002, 57(6): 469-476.
- [8] GESTAL C, ROCH P, RENAULT T, et al. Study of diseases and the immune system of bivalves using molecular biology and genomics[J]. Reviews in Fisheries Science, 2008, 16(S1): 133-156.
- [9] GRIENKE U, SILKE J, TASDEMIR D, et al. Bioactive compounds from marine mussels and their effects on human health[J]. Food Chemistry, 2014, 142: 48-60.
- [10] CHANDRAN B, RAMESHKUMAR G, RAVICHANDRAN S. Antimicrobial activity from the gill extraction of *Perna viridis* (Linnaeus, 1758)[J]. Global Journal of Biotechnology & Biochemistry, 2009, 4(2): 88-92.
- [11] MERCADO L, SCHMITT P, MARSHALL S H, et al. Gill tissues of the mussel *Mytilus edulis chilensis*: A new source for antimicrobial peptides[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2005, 8(3): 284-290.
- [12] MITTA G, HUBERT F, NOEL T, et al. Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis* [J]. FEBS Journal, 1999, 265(1): 71-78.
- [13] HERNROTH B, BADEN S P, TASSIDIS H, et al. Impact of ocean acidification on antimicrobial activity in gills of the blue mussel (*Mytilus edulis*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 55: 452-459.
- [14] DOMENEGHETTI S, FRANZOI M, DAMIANO N, et al. Structural and antimicrobial features of peptides related to myticin c, a special defense molecule from the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(42): 9 251-9 259.
- [15] LEONI G, DE POLI A, MARDIROSSIAN M, et al. Myticins: A novel multigenic family of linear, cationic antimicrobial peptides from marine mussels (*Mytilus spp.*) [J]. Marine Drugs, 2017, 15(8): 261-283.
- [16] CHEMAT F, ROMBAUT N, SICAIRE A, et al. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications; A review[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2017, 34: 540-560.
- [17] 黄占旺, 上官新晨, 沈勇根, 等. 鲤鱼精蛋白的提取与抗菌稳定性研究[J]. 农业工程学报, 2005, 21(2): 165-168.
- [18] YUAN Jun, RAZA W, HUANG Qi-wei, et al. The ultrasound-assisted extraction and identification of antifungal substances from *B. amyoliquefaciens* strain NJN-6 suppressing *Fusarium oxysporum* [J]. Journal of Basic Microbiology, 2012, 52(6): 721-730.
- [19] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(12): 248-254.
- [20] HANCOCK R E, DIAMOND G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences[J]. Trends in Microbiology, 2000, 8(9): 402-410.
- [21] 金莉莉, 丁忠福, 王秋雨. 中国林蛙皮抗菌肽提取条件的优化研究[J]. 食品科学, 2008, 29(10): 223-227.
- [22] ROCH P, YANG Yin-shan, TOUBIANA M, et al. NMR structure of mussel mytilin, and antiviral-antibacterial activities of derived synthetic peptides[J]. Developmental and Comparative Immunology, 2008, 32(3): 227-238.
- [23] 刘延波, 张世凯, 赵志军, 等. 高产淀粉酶细菌的分离鉴定及产酶条件优化[J]. 食品与机械, 2020, 36(1): 65-71.
- [24] 洪晶, 陈涛涛, 唐梦茹, 等. 响应面法优化韭菜籽蛋白质提取工艺[J]. 中国食品学报, 2013, 13(12): 89-96.
- [25] 吴瑛, 王秀芳, 袁守亮. 响应面分析昆仑雪菊水溶性黄酮类化合物的提取工艺[J]. 食品科学, 2013, 34(6): 129-133.
- [26] 葛智超, 李燕, 施文正, 等. 裸藻多糖提取工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2020, 36(1): 186-191.
- [27] WU Xi, NARSIMHAN G. Synergistic effect of low power ultrasonication on antimicrobial activity of melittin against *Listeria monocytogenes* [J]. LWT, 2017, 75: 578-581.