

黄粉虫抗菌肽的分离纯化及生物活性研究

张建新, 孙长江

(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 本研究以黄粉虫为试材, 采用碱性蛋白酶酶解黄粉虫蛋白制备获得了抗菌肽, 并对其分离纯化, 比较了不同组分及纯化后抗菌肽的抑菌活性、热稳定性及分子量。结果表明: 大孔吸附树脂对蛋白酶酶解液动态吸附并梯度洗脱后得到 5 个组分, 抑菌试验表明无水乙醇洗脱组分的抑菌活性最强。采用制备型 HPLC 对无水乙醇洗脱组分进一步纯化, 得到两个组分 (H-1, H-2), 其中组分 H-2 对大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌均表现出较强的抑菌活性, 且其最小抑菌浓度 (MIC) 为 0.512 mg/mL。热稳定性试验表明, H-2 具有较好的热稳定性, 121 °C 加热 20 min 仍能保持较高活性。液质联用 (LC-MS) 结果表明, H-2 的分子量为 756.82 Da。本研究为黄粉虫抗菌肽的高效分离和纯化提供了科学依据, 为黄粉虫抗菌肽在食品防腐中的应用提供了基础数据。

关键词: 黄粉虫; 抗菌肽; 分离纯化; 生物活性

文章编号: 1673-9078(2016)1-116-121

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.1.019

Separation, Purification and Biological Activity Evaluation of Antimicrobial Peptides from *Tenebrio molitor*

ZHANG Jian-xin, SUN Chang-jiang

(College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: Antibacterial peptides were prepared by hydrolysis of the proteins from *Tenebrio molitor* using alkaline protease. The antibacterial peptides were further separated and purified. Five fractions were obtained from the dynamic adsorption of the protease hydrolysate on macroporous adsorption resin and gradient elution. The antibacterial activity, thermostability, and molecular weight of different fractions of the peptides were compared. The antimicrobial susceptibility test indicated that the ethanol-eluted fraction exhibited the strongest antimicrobial activity. This fraction was further separated into two subfractions (H-1 and H-2) by preparative high-performance liquid chromatography (HPLC). The H-2 subfraction showed relatively strong antimicrobial activities on *E. coli*, *Salmonella* and *Staphylococcus aureus*, with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 0.512 mg/mL. The thermostability tests indicated that H-2 was heat stable and could maintain a relatively strong antimicrobial activity after being heated to 121 °C for 20 minutes. The liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) results indicated the molecular weight of H-2 was 756.82 Da. The results of this study provide a scientific basis for efficient separation and purification of antibacterial peptides from *Tenebrio molitor* and provide data supporting the application of antibacterial peptides from *Tenebrio molitor* as food preservatives.

Key words: *Tenebrio molitor*; antibacterial peptides; separation and purification; biological activity

黄粉虫 (*Tenebrio molitor*) 是一种高蛋白、高脂肪、氨基酸含量较全面的昆虫资源, 生长迅速、繁殖周期短, 被誉为“动物的营养宝库”^[1]。黄粉虫不但含有大量的优质蛋白质和脂肪, 氨基酸种类齐全, 还含有多种矿物质、维生素和微量元素^[2-4]。另外, 向黄粉虫饲料中添加一些无机盐类, 可经虫体吸收并转化为机体活性物质, 制成富含某些微量元素的保健食品, 以补充人体中缺乏的某些微量元素^[5]。近年来, 以黄粉虫为基础材料开发的高营养价值产品有黄粉虫罐

头、蛋白饼干、酸奶、保健酱油和黄粉虫冲剂等^[6-8]。近年来, 抗生素滥用及细菌耐药性的产生引起了社会广泛关注, 抗菌肽高效的抗菌活性及其特殊的作用机制使其成为抗生素最理想的替代品^[9]。除了能抗细菌、真菌、病毒、寄生虫和癌细胞生长以外, 还参与很多细胞功能, 如趋化作用、伤口愈合等^[10-13]。迄今为止, 昆虫中发现的抗菌肽有 200 多种^[14,15]。抗菌肽不仅能防治人类疾病, 还能用于植物疾病的控制^[16]。同时, 由于抗菌肽具有广谱的抑菌能力, 且其本身是一种比较安全的营养素^[17,18], 因此, 其高效能低风险的特征赋予了抗菌肽天然食品防腐剂的潜在应用价值。

本研究以黄粉虫为基础材料, 采用碱性蛋白酶酶

收稿日期: 2015-04-25

基金项目: 陕西省农业科技攻关项目 (2012K02-14)

作者简介: 张建新 (1959-), 男, 教授, 研究方向: 食品营养安全与标准化

解黄粉虫蛋白制备抗菌肽,利用大孔吸附树脂对水解物进行分离,通过制备液相对活性较强的组分进一步纯化,比较了不同组分的抑菌活性;评价了黄粉虫抗菌肽对几种常见细菌的最低抑菌浓度(MIC)、热稳定性,并通过液质联用(LC-MS)法确定了黄粉虫抗菌肽的分子量,以期为黄粉虫抗菌肽的高效分离和纯化提供科学依据,为黄粉虫抗菌肽在食品防腐剂中的应用提供理论依据和基础数据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

黄粉虫,50~60日龄幼虫,陕西秦虫黄粉虫科技发展有限公司;大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌标准菌株,购于中国工业微生物菌种保藏管理中心;碱性蛋白酶,上海佳禾生物科技有限公司;LB培养基,天津百浩生物科技有限公司;DA201-C型大孔吸附树脂,西安蓝晓科技有限公司;乙腈(色谱纯)、三氟乙酸(色谱纯),美国Fisher公司。

1.2 主要仪器与设备

UV-2550型紫外分光光度计,日本岛津公司;FD5508型冷冻干燥机,韩国Hanil公司;HWS-150恒温恒湿细菌培养箱,上海森信实验仪器有限公司;LC-20A型高效液相色谱仪,日本岛津公司;LC-8A型制备液相色谱仪,日本岛津公司。

1.3 试验方法

1.3.1 黄粉虫蛋白的提取

黄粉虫→禁食24h→冷冻致死→50℃烘干→研磨粉碎→索氏脱脂→粉碎→过70目筛→碱提酸沉法提蛋白→冷冻干燥→4℃冰箱保存

1.3.2 酶解

取一定量的蛋白粉,加入适量蒸馏水制成质量浓度为10%蛋白溶液,按照440U/g比例加入碱性蛋白酶,54℃恒温水浴锅中保温反应4.4h,使黄粉虫蛋白充分水解。在酶解过程中加入2mol/L的NaOH维持水解液pH值为9.5。酶解结束后,将pH值调回中性,升温至90℃并保持10min灭酶。对获得的蛋白酶解液3500r/min条件下离心20min,取上清液即为酶解粗提液。

1.3.3 抗菌肽纯化

采用大孔吸附树脂法对黄粉虫抗菌肽进行初步纯化。

树脂活化及预处理:将DA201-C型大孔吸附树脂

浸泡于无水乙醇中处理24h,使其充分溶胀,装柱并用无水乙醇洗至220nm处无吸收峰,用去离子水充分洗涤至无醇味;用5%的HCl溶液洗涤,再用去离子水洗至中性;最后用2%的NaOH溶液洗涤,再去离子水洗至中性备用。

抗菌肽动态吸附及梯度洗脱:调整酶解液至多肽浓度为70mg/mL,室温条件下,将酶解液以1BV/h的流速上样;然后分别以2BV的去离子水、25%乙醇、50%乙醇、75%乙醇、无水乙醇进行洗脱,速度1BV/h,以10mL/管收集洗脱液,并以去离子水为对照,测其电导率及其在220nm处的吸光度(潘道东和林璐2009)。分别收集各组分并浓缩至一定浓度,测定各组分的抑菌活性。

1.3.4 抗菌肽液相分析及组分分离

样品经大孔吸附树脂分离纯化后,首先用分析型HPLC对抑菌活性最强的组分进行初步分析,为制备液相进一步纯化做准备。色谱条件为:C18色谱柱(4.6mm×250mm,5μm);检测波长220nm;流速0.8mL/min;进样量10μL;柱温30℃;流动相A:0.1%三氟乙酸(TFA);流动相B:乙腈(含0.1%TFA);梯度洗脱70min,洗脱程序如表1所示。

样品经分析型HPLC初步分析后,再用制备型RP-HPLC对抑菌活性最强的组分进一步分离纯化。色谱条件为:半制备型C18色谱柱(C18-300);检测波长220nm;流速5mL/min;上样量2mL;流动相:乙腈(含0.1%TFA);等浓度洗脱30min。采用自动收集器收集样品,每分钟收集一管,多次上样,合并相同保留时间的样品,浓缩后测定各组分的抑菌活性。

再次用分析型液相相对上述制备型RP-HPLC分离得到抑菌活性最强的组分进行分析,以确定目标多肽的纯度。色谱条件为:C18色谱柱(4.6mm×250mm,5μm);检测波长220nm;流速1.0mL/min,流动相:乙腈(含0.1%TFA);等浓度洗脱30min。

表1 分析型HPLC洗脱程序

时间/min	B 浓度/%	流速/(mL/min)
0	0	0.8
5	0	0.8
30	30	0.8
50	60	0.8
60	100	0.8
70	100	0.8

1.3.5 抗菌肽活性评价

1.3.5.1 最小抑菌浓度测定

选取制备液相纯化后抑菌活性最强的组分, 分别测定其对大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度 (MIC)。

MIC 板制备: 取 12 支无菌试管, 第 1 管中加入 2 mL 抗菌肽浓缩液 (初始浓度 10.24 mg/mL); 2-12 号管先中加入 1 mL MH 肉汤培养基, 然后从 1 号管中吸取 1 mL 至第 2 管中, 混匀, 以此倍比稀释至第 11 管, 最后从第 11 管中吸取 1 mL 弃去, 第 12 管为不含样品的阴性对照。此时, 各管中抗菌肽的浓度依次为 10240、5120、2560、1280、640、320、160、80、40、20、10 μg/mL。然后将各浓度的抗菌肽样品分别加入到灭菌的 96 孔细菌培养板中, 第 1 至第 11 孔加样品, 第 12 孔为不含样品的 MH 肉汤培养基, 每孔 20 μL。同样的方法制备青霉素钠 MIC 板, 并将青霉素钠 MIC 板的第一孔作为阳性药物对照。

接种及培养: 采用 MH 肉汤培养基将活化的菌悬液 (1×10⁸ CFU/mL) 稀释 100 倍, 每孔加入 100 μL。此时, 第 1 孔至第 11 孔中抗菌肽的浓度分别为 1024、512、256、128、64、32、16、8、4、2、1 μg/mL。将 96 孔板置于 37 °C 培养箱中培养 18 h, 酶标仪 (595 nm) 测定吸光值, 并评价抑菌效果。将抑菌率大于 95% 的最低浓度计为 MIC (臧红新等 2011)。具体表示如下:

$$Y = \frac{X_N OD_{595nm} - X_S OD_{595nm}}{X_N OD_{595nm} - X_P OD_{595nm}} \times 100\% \quad (1)$$

注: Y 为抑菌率, %; X_P 为阳性对照, X_N 为阴性对照,

X_S 为待测样品。

1.3.5.2 抗菌肽热稳定性研究

选取制备液相纯化后抑菌活性最强的组分, 将其浓度调整至 2.5 mg/mL, 置于高压灭菌锅中, 121 °C 条件下分别加热 5 min、10 min、15 min、20 min、25 min, 然后以大肠杆菌为指示菌, 打孔法测定其抑菌活性, 结果以抑菌圈直径表示, 对比加热前后抑菌活性的变化。

1.3.5.3 抗菌肽分子量测定

选取制备液相纯化后抑菌活性最强的组分, 采用液质联用 (LC-MS) 测定抗菌肽的分子量。液相条件:

表 2 不同组分的含量及抑菌活性

Table 2 Contents and antibacterial activities of different components

乙醇浓度	0%	25%	50%	75%	无水
肽含量/mg	854.32	1123.74	1219.21	124.11	100.71
调整后浓度/(mg/mL)	80	80	80	8	8
抑菌圈直径/mm	-	-	-	15.17	26.20

注: “-”表示未观测到抑菌活性。

分别收集各洗脱组分, 浓缩后将 0%、25%、50%

Thermo Fisher HPLC 色谱仪; C18 型色谱柱 (4.6 mm×200 mm, 5 μm); 流速 0.8 mL/min; 进样量 10 μL。质谱仪: Thermo Fisher LTQ-XL MS; 离子方式 ESI+; 毛细管电压 40 Volts; 毛细管温度 320 °C。

1.3.6 数据分析

每个试验重复 3 次, 数据采用 Excel 进行处理。

2 结果与分析

2.1 黄粉虫抗菌肽的大孔吸附树脂纯化

黄粉虫酶解过程中需要加入盐酸或者氢氧化钠溶液调节反应体系的 pH 值, 导致样品中残留了大量的无机盐。这些盐分的存在会影响抗菌肽的生物活性, 因此应该对黄粉虫蛋白酶解液进行脱盐处理。本研究中以不同浓度梯度的乙醇溶液进行目标物的洗脱, 洗脱过程中电导率变化及吸光度变化如图 1 所示: 不同浓度的乙醇洗脱液中均出现了吸收峰, 去离子水洗脱液中也出现了吸收峰, 说明有部分抗菌肽未被吸附; 水洗阶段, 洗脱液电导率先增大再降低, 说明去离子水洗脱能将无机盐除去。一般来说, 抗菌肽的一级结构中含有较多的疏水性氨基酸, 抗菌肽的抑菌活性与其疏水性密切相关。本研究中以不同浓度的乙醇溶液进行洗脱时, 洗脱液极性不同, 其与不同疏水性肽段的亲和力也不同。因此, 通过不同浓度的乙醇进行梯度洗脱, 在脱盐的同时可以实现抗菌肽的初步分离。

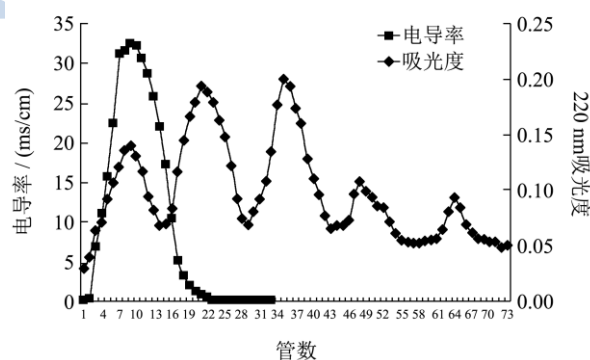


图 1 洗脱过程中电导率及吸光度变化

Fig.1 Changes in the electrical conductivity and absorbance during elution

乙醇洗脱液中抗菌肽浓度调至 80 mg/mL; 由于 75%、

无水乙醇洗脱液较少, 将其浓度调整为 8 mg/mL。以大肠杆菌为指示菌, 青霉素为阳性对照, 不同洗脱组分的抑菌活性结果见表 2。从表 2 可知, 无水乙醇洗脱组分对大肠杆菌抑制活性最高, 抑菌圈直径可达 26.20 mm。

2.2 抗菌肽液相分析和纯化

液相分析结果如图 2 所示: 无水乙醇洗脱液中组分比较简单, 且容易分开, 最后一个组分的保留时间在 68 min 左右, 可用制备型液相进行进一步分离纯化。

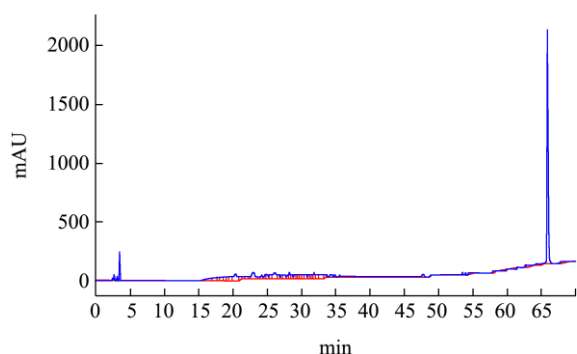


图 2 无水乙醇组分液相图谱

Fig.2 HPLC profiles of anhydrous ethanol-eluted fraction

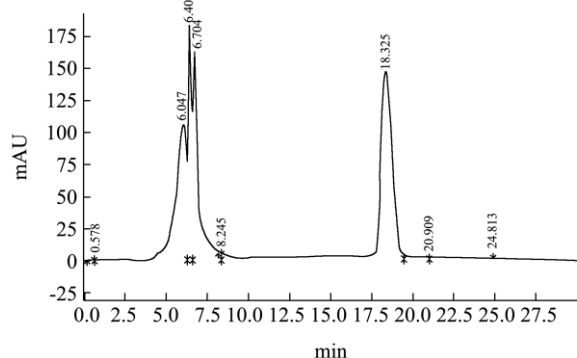


图 3 无水乙醇组分制备液相分离图谱

Fig.3 Preparative HPLC profile of anhydrous ethanol-eluted fraction

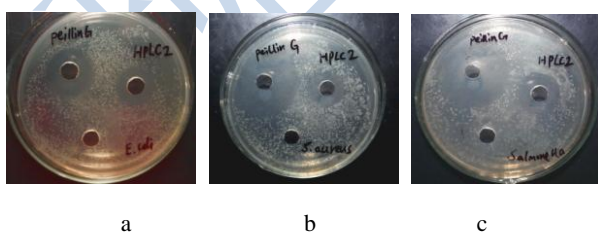


图 4 H-2 的抑菌活性

Fig. 4 Antibacterial activity of H-2

注: a:大肠杆菌, b: 金黄色葡萄球菌, c: 沙门氏菌。

通过制备型 RP-HPLC 对抑菌活性最强的无水乙醇洗脱组分进一步纯化, 得到 H-1、H-2 两个组分(图

3)。将其浓度均调整为 2.5 mg/mL, 以青霉素为阳性对照, 0.9%生理盐水为阴性对照, 打孔法测其抑菌活性, 结果表明 H-2 对大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌表现出较强的抑菌活性(图 4)。

将组分 H-2 通过分析型液相色谱结果如图 5 所示, 目标肽的出峰时间在 5~6 min 之间, 通过 LC-20A 型高效液相色谱系统软件分析, 目标峰的峰面积占比 93.348%, 即组分 H-2 的纯度为 93.348%。

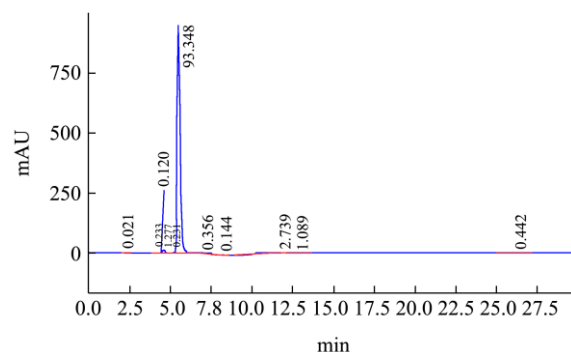


图 5 H-2 液相分析图谱

Fig.5 HPLC profile of H-2 fraction

2.3 抗菌肽活性评价

2.3.1 MIC 测定结果

表 3 MIC 测定结果

Table 3 Determination of MIC for H-2 (mg/mL)

样品	大肠杆菌	沙门氏菌	金黄色葡萄球菌
HPLC-2	0.512	0.512	0.512
青霉素钠	0.128	0.016	0.016

以制备获得的 H-2 组分进行抑菌试验和活性评价, MIC 测定结果如表 3。研究结果表明: 制备获得的抗菌肽 H-2 组分对大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌的 MIC 均为 0.512 mg/mL。虽然大肠杆菌和沙门氏菌为革兰氏阴性菌, 金黄色葡萄球菌为革兰氏阳性菌, 但 H-2 对它们的 MIC 没有差别, 这可能与抗菌肽特殊的抗菌机理有关, 抗菌肽作用于细胞膜, 无特异性受体, 因此本研究中制备获得的抗菌肽具有广谱、稳定的抗菌效果。同时, 青霉素钠对大肠杆菌的 MIC 为 0.128 mg/mL, 对沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的 MIC 为 0.016 mg/mL。根据现有报道, 双乙酸钠和山梨酸钾对肉葡萄球菌的 MIC 分别为 2 mg/mL 和 4 mg/mL, 苯甲酸钠对大肠杆菌的 MIC 为 6.4 mg/mL。因此, 尽管黄粉虫抗菌肽对三种指示菌的抑菌效果略低于青霉素钠, 但与常用防腐剂相比, 黄粉虫抗菌肽依然具有比较好的抑菌效果。因此, 黄粉虫抗菌肽作为食品添加剂在食品领域具有潜在的应用价值。

2.3.2 黄粉虫抗菌肽热稳定性

黄粉虫抗菌肽热稳定结果如图 6 所示: 121 °C 加热 20 min, 黄粉虫抗菌肽的活性几乎没有变化; 121 °C 加热 25 min, 黄粉虫抗菌肽的活性略有降低, 但仍能达到相当的强度。说明黄粉虫抗菌肽是一种热稳定比较好的活性肽, 具备昆虫源抗菌肽的一般特征。同时黄粉虫抗菌肽的热稳定性使其在食品防腐剂的应用方面具备一定的潜力。

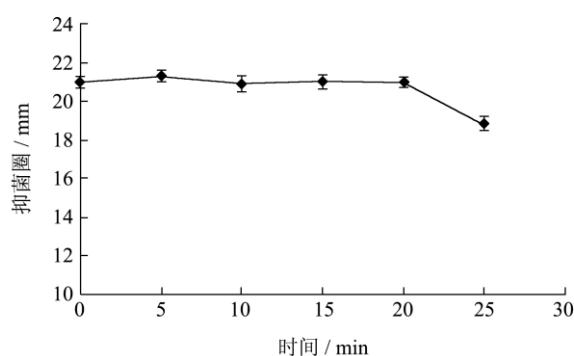


图 6 加热后抑菌活性的变化

Fig.6 Change of antibacterial activity with heating

2.3.3 黄粉虫抗菌肽分子量测定

黄粉虫抗菌肽的一级质谱图如图 7 所示, 分析结果表明: 黄粉虫抗菌肽的离子峰为单电荷峰, 质荷比为 757.82, 因此分子量为 756.82 u, 说明黄粉虫抗菌肽是一个小分子肽。

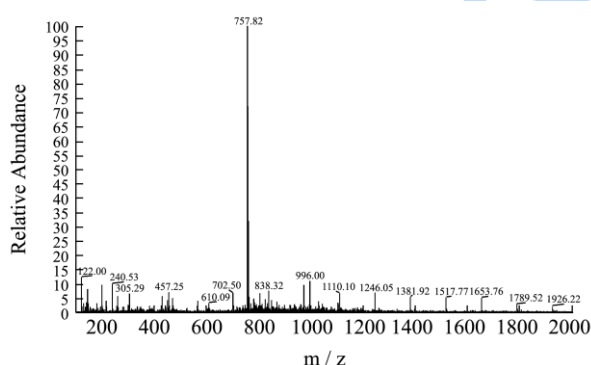


图 7 黄粉虫抗菌肽质谱图

Fig.7 Mass spectrum of antimicrobial peptides from *Tenebrio molitor*

刘汉灵等^[19]从黄粉虫蛋白中制备了抗菌肽, 并通过 HPLC 凝胶层析法检测其分子量分布, 认为黄粉虫抗菌肽的分子量在 1000 u 以下, 本研究的结果与其一致。

3 结论

功能性抗菌肽一直是研究的热点。本研究以黄粉虫为基础原料, 采用 DA201-C 型大孔吸附树脂对蛋白酶解液动态吸附并梯度洗脱后得到 5 个组分, 经抑菌试验表明无水乙醇洗脱组分的抑菌活性最强。无水乙

醇洗脱组分经制备型 HPLC 进一步纯化后的到两个组分 (H-1, H-2), 抑菌试验表明 H-2 对大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌均表现出较强的抑菌活性。经测定, H-2 对大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度 (MIC) 均为 0.512 mg/mL。热稳定性试验表明, H-2 对热稳定, 121 °C 加热 20 min 仍能基本保持活性。液质联用 (LC-MS) 结果表明, H-2 的分子量为 756.82。本研究结果为黄粉虫抗菌肽的高效分离和纯化提供科学依据, 为黄粉虫抗菌肽在食品防腐剂中的应用提供理论依据和基础数据。

参考文献

- [1] 白耀宇,程家安.我国黄粉虫的营养价值和饲养方法[J].昆虫知识,2003,40(4):317-322
BAI Yao-yu, CHENG Jia-an. Nutritive value and rearing methods of *Tenebrio molitor* in China [J]. Entomological Knowledge, 2003, 40(4): 317-322
- [2] 汪璇,张建新,孙长江,等.响应面法优化黄粉虫黄酮提取工艺[J].食品科学,2013,34(4):11-16
WANG Xuan, ZHANG Jian-xin, SUN Chang-jiang, et al. Optimization of extraction of flavonoids from *tenebrio molitor* by response surface methodology [J]. Food Science, 2013, 34(4): 11-16
- [3] 汪璇,张建新,孙长江,等.大孔吸附树脂分离黄粉虫黄酮及其抗氧化活性研究[J].中国食品学报,2014,11(4):81-88
WANG Xuan, ZHANG Jian-xin, SUN Chang-jiang, et al. Macroporous adsorption resin for purification of total flavonoids from *tenebrio molitor* and their antioxidant activity in vitro [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 11 (4): 81-88
- [4] 孙长江,张建新,汪璇,等.响应面法优化黄粉虫抗菌肽酶解工艺[J].食品科学,2013,34(7):234-239
SUN Chang-jiang, ZHANG Jian-xin, WANG Xuan, et al. Optimization of enzymatic preparation of antibacterial peptides by response surface methodology [J]. Food Science, 2013, 34(7): 234-239
- [5] 代春华,马海乐,沈晓昆,等.黄粉虫幼虫及蛹中营养成分分析[J].食品工业科技,2009,30(4):315-318
DAI Chun-hua, MA Hai-le, SHEN Xiao-kun, et al. Analysis on the nutrient composition in the larva and pupa of *Tenebrio molitor* (L) [J]. Science and Technology of Food Industry, 2009, 30(4): 315-318
- [6] 梁大伟,朱萍,郑晓琼,等.黄粉虫酸奶的研制[J].山东食品发酵,2011(4):19-23
LIANG Da-wei, ZHU Ping, ZHENG Xiao-qiong, et al.

- Study on development of yogurt with *Tenebrio Molitor* [J]. Shandong Food Fermentation, 2011(4): 19-23
- [7] 李西波,李爱江.黄粉虫保健酱油的酿制[J].中国调味品, 2008, 12:72-74
LI Xi-bo, LI Ai-jiang. Study on brewage of soy sauce with yellow mealworm [J]. China condiment, 2008, 12: 72-74
- [8] 张建新,张立佳,王临宾,等.黄粉虫油对高脂血症小鼠血脂水平及抗氧化能力的影响[J].食品科学, 2011, 32(5): 263-266
ZHANG Jian-xin, ZHANG Li-jia, WANG Lin-bin, et al. Effect of *Tenebrio molitor* oil on blood lipid and antioxidant function in hyperlipidemic mice [J]. Food Science, 2011, 32(5): 263-266
- [9] 苗建银,柯畅,郭浩贤,等.抗菌肽的提取分离及抑菌机理研究进展[J].现代食品科技,2014,30(1):233-240
MIAO Jian-yin, KE Chang, GUO Hao-xian, et al. Extraction, isolation and antibacterial mechanism of antibacterial peptides [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(1): 233-240
- [10] Boulanger N, Bulet P, Lowenberger C. Antimicrobial peptides in the interactions between insects and flagellate parasites [J]. Trends Parasitol, 2006, 22: 262-268
- [11] Kim A Brogden. Antimicrobial Peptides :pore formers or metabolic inhibitors in bacteria [J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3: 238-250
- [12] Tam HH. Topical antibacterial treatments for *scne vulgaris* :comparative review and guide to selection [J]. Am. J. Clin. Dermatol., 2004, 2: 79-84
- [13] Wu Y, He Y, Ge X. Functional characterization of the recombinant antimicrobial peptide Trx-Ace-AMP1 and its application on the control of tomato early blight disease [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2011, 90: 1303-1310
- [14] 穆利霞,廖森泰,肖更生,等.昆虫蛋白的综合利用研究进展[J].现代食品科技,2011,27(12):1507-1512
MU Li-xia, LIAO Sen-tai, XIAO Geng-sheng, et al. Research status of development and utilization for insect protein [J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 27(12): 1507-1512
- [15] Mei HF, Jin XB, Zhu JY, et al. Defensin 2 as an adjuvant promotes anti-melanoma immune responses and inhibits the growth of implanted murine melanoma *in vivo* [J]. PLoS One, 2012, 7: e31328
- [16] Carballar-Lejarazú R, Rodríguez MH, Cruz Hernández-Hernández F, Ramos-Castaneda J, Possani LD, Zurita-Ortega M. Recombinant scorpine: a multifunctional antimicrobial peptide with activity against different pathogens [J]. Cell Mol. Life Sci., 2008, 65: 3081-3092
- [17] 秦鹏,赵培静,梁淑娃,等.天蚕素抗菌肽发酵培养基优化[J].现代食品科技,2012,28(8):1046-1048
QIN Peng, ZHAO Pei-jing, LIANG Shu-wa, et al. Optimization of the fermentation medium of cecropins production [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(8): 1046-1048
- [18] Bulet P, Stöcklin R.. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation [J]. Protein Pept. Lett., 2005, 12: 3-11
- [19] 刘汉灵,潘扬昌,王孝英,等.黄粉虫蛋白抗菌肽酶解工艺研究[J].食品科学,2009,30(15):156-159
LIU Han-ling, PAN Yang-chang, WANG Xiao-ying, et al. Response surface methodology as an approach to optimize enzymatic preparation of antibacterial peptides from *Tenebrio molitor* protein [J]. Food Science, 2009, 30(15): 156-159