

# 毛蚶蛋白对益生菌抗生素胁迫的保护作用

梁铮洋, 周苗, 陶春霖, 侯传丽, 任娇艳

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510641)

**摘要:** 长期摄入抗生素残留的水产品可引起肠道菌群稳态失调。该研究基于恩诺沙星对四种益生菌(两歧双歧杆菌 BBi32、鼠李糖乳杆菌 LGG、植物乳杆菌 LP45 和乳双歧杆菌 Probio-M8)的抑菌作用,建立了抗生素胁迫的益生菌生长模型,评价了红三文鱼、黄颡和毛蚶蛋白粗提物及其不同分离纯化组分对益生菌抗生素胁迫的保护作用。在四种益生菌中,乳双歧杆菌 Probio-M8 对抗生素胁迫最为敏感,三种原料中毛蚶蛋白粗提物表现出对抗生素胁迫保护作用;毛蚶蛋白粗提物经过阴离子交换柱(SepharoseFastFlow)分离得到四个组分(Fr0、Fr1、Fr2 和 Fr3),其分子量分别为 14.3~44.3 ku (Fr0)、20.1~29.0 ku (Fr1)、14.3~97.2 ku (Fr2) 和 <14.3 ku (Fr3),其中 Fr0 可更有效地提高 Probio-M8 菌液的 OD<sub>600</sub> 从 0.80 提升至 1.56, Fr3 可将其生长代时缩短至 0.98 h。毛蚶蛋白可促进乳双歧杆菌在恩诺沙星胁迫下增殖的活性,表明毛蚶蛋白具有保护益生菌免受抗生素生长胁迫、促进益生菌增殖的功能,该研究为毛蚶蛋白对肠道稳态的调节功能提供理论依据,并提出了应对体内抗生素残留的应对方案。

**关键词:** 恩诺沙星; 益生菌; 毛蚶; 阴离子交换柱; SDS-PAGE

文章编号: 1673-9078(2023)12-114-121

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.12.1510

## Protective Effect of *Arca subcrenata* Protein on Probiotics against Antibiotic Stress

LIANG Zhengyang, ZHOU Miao, TAO Chunlin, HOU Chuanli, REN Jiaoyan

(College of Food Science and Technology, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

**Abstract:** Long-term intake of aquatic products with antibiotic residues can cause intestinal flora homeostasis imbalance. In this study, based on the inhibitory effects of enrofloxacin on four probiotics (*Bifidobacterium bifidum* BBi32, *Lactobacillus rhamnosus* LGG, *Lactobacillus plantarum* LP45 and *Bifidobacterium lactis* Probio-M8), a probiotic growth model for examining antibiotic stress was established to evaluate the protective effects of crude protein extracts of *Nemipterus virgatus*, *Corbicula fluminea* and *Arca subcrenata* as well as their purification fractions on the enrofloxacin-induced antibiotic stress towards probiotics. Among the four probiotics, *Bifidobacterium lactis* Probio-M8 showed the highest sensitivity to antibiotic stress. The *Arca subcrenata* crude protein extract exhibited a protective effect against antibiotic stress among the three raw materials. Such a crude protein extract was then separated by an anion-exchange column to obtain four fractions (Fr0, Fr1, Fr2 and Fr3) with molecular weights of 14.3~44.3 (Fr0), 20.1~29.0 (Fr1), 14.3~97.2 (Fr2) and <14.3 (Fr3) ku, respectively. Among them, Fr0 showed greater effectiveness in increasing the OD<sub>600</sub> of the Probio-M8 culture solution from 0.80 to 1.56, whilst Fr3 significantly shortened the growth generation time of Probio-M8 to 0.98 hour. The *Arca subcrenata* protein extract promoted the proliferation of *Bifidobacterium lactis* under enrofloxacin-induced stress, indicating that the protein extract is capable of protecting probiotic bacteria against antibiotic growth stress while promoting probiotic proliferation. This study provides a theoretical basis for the regulatory function of trichothecene protein on intestinal homeostasis and proposes a solution for dealing with antibiotic residues *in vivo*.

**Key words:** enrofloxacin; probiotic; *Arca subcrenata*; anion-exchange column; SDS-PAGE

引文格式:

梁铮洋,周苗,陶春霖,等.毛蚶蛋白对益生菌抗生素胁迫的保护作用[J].现代食品科技,2023,39(12):114-121

LIANG Zhengyang, ZHOU Miao, TAO Chunlin, et al. Protective effect of *Arca subcrenata* protein on probiotics against antibiotic stress [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(12): 114-121

收稿日期: 2022-11-28

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0901101)

作者简介: 梁铮洋(1998-),男,硕士研究生,研究方向:食品营养与健康, E-mail: 2330047065@qq.com

通讯作者: 任娇艳(1980-),女,博士,教授,研究方向:食品营养与健康, E-mail: jyren@scut.edu.cn

水产品的抗生素残留可导致人体摄入后引起肠道菌群紊乱的问题。恩诺沙星是被报道在水产品中检出残留率最高的抗生素(超过 11%)<sup>[1]</sup>,在局部地区检出率高达 62.5%<sup>[2]</sup>。研究表明,该抗生素可引发肠道益生菌(双歧杆菌和乳酸杆菌)丰度下降,导致肠道菌群趋向抗生素耐药化,并削弱对病原菌的定植抗性<sup>[3]</sup>,且对大鼠保护性免疫的产生造成损害<sup>[4]</sup>。持续低剂量摄入恩诺沙星可导致病原菌对喹诺酮类抗生素(恩诺沙星、环丙沙星等)的耐药性,对人体和环境造成不可逆的影响<sup>[5]</sup>。

人摄入水产品抗生素残留可对肠道稳态造成破坏,但水产蛋白也对肠道益生菌有一定保护作用。蛋白质是食物重要的营养基质之一,前期研究发现,蛋白质及其消化道降解产物小分子肽等组分,对于肠道益生菌增殖及黏附具有重要促进作用<sup>[6]</sup>。鱼粉蛋白会上调小鼠盲肠中鼠李糖乳杆菌的丰度,影响肠道菌群中腐败化合物如丁酸盐和乳酸的产生<sup>[7]</sup>;鳕鱼蛋白替换培养基中的氮源可促进益生菌植物乳杆菌 LP45 增殖,并辅助其在肠组织上黏附<sup>[6]</sup>。蛋白质对益生菌的作用机制可能包括提供必需氨基酸,提高益生菌的抗逆能力和促进益生菌蛋白酶、肽酶分泌的活性等<sup>[8]</sup>,这些研究表明水产蛋白在促进益生菌增殖,维持肠道微环境稳态方面具有巨大的潜力。

目前研究表明,毛蚶蛋白和多肽具有良好的生物活性。Guo 等<sup>[9]</sup>发现毛蚶蛋白 ASP-3 对人肝癌细胞 HepG2 具有较强的抑制作用,IC<sub>50</sub> 值为 (171.18±18.59) μg/mL;Chen 等<sup>[10]</sup>纯化出具有抗氧化活性的多肽 H3,并通过电喷雾电离质谱仪分析出该多肽的 117 个氨基酸序列;从毛蚶中鉴定出的多肽 D2-G1S-1 和 G2-G1S-2 在秀丽隐杆线虫上展现出延缓衰老的功效,并可缓解由百草枯诱导的氧化应激<sup>[11]</sup>。尽管对于毛蚶蛋白和多肽的生物活性已有了初步研究,其对人体肠道与益生菌的作用仍未明晰。

本研究基于恩诺沙星对四种益生菌的生长胁迫,建立了抗生素胁迫的益生菌生长模型,以红三文、黄颡和毛蚶作为原料,经过低温超声辅助水提取制备三种水溶性蛋白粗提物,在模型中评价水产蛋白改善恩诺沙星对益生菌生长胁迫效果。在此基础上,对具有较高生物活性的毛蚶蛋白进行分离纯化,通过蛋白电泳分析每个组分的分子量分布,并对组分生物活性进行评价,为毛蚶蛋白的生物活性研究提供了新方向。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 原料和试剂

红三文、黄颡和毛蚶样品均从广州黄沙水产市场

购买,4℃运输 30 min,在-20℃保存。抗生素恩诺沙星购买自罗恩生物(上海),其余化学试剂均为分析纯。乳双歧杆菌 Probio-M8、植物乳杆菌 LP45、鼠李糖乳杆菌 LGG 和两歧双歧杆菌 BB132 来自于本实验室,这些益生菌均于 MRS 培养基上培养。酵母浸膏、牛肉浸膏,上海生工生物工程技术有限公司。

### 1.2 培养基的配制

MRS 培养基的配方包括酵母浸膏 5 g/L、牛肉浸膏 5 g/L、蛋白胨 10 g/L、D-葡萄糖 20 g/L、吐温 80 1 mL/L、柠檬酸三铵 2 g/L、无水乙酸钠 5 g/L、磷酸二氢钠 2 g/L、硫酸锰 0.02 g/L 和硫酸镁 0.01 g/L。其中,葡萄糖与其余物质分开灭菌,灭菌并冷却后,于超净台内混合制成 MRS 培养基。

依据 Bradford 等<sup>[12]</sup>的方法测定样品中的蛋白含量,样品于超净台内过膜除菌后,按目标浓度调整样品添加量,用若干体积样品和无菌水将 5×MRS 培养基稀释至正常浓度,即完成蛋白添加组培养基的配制。在各组实验中,抗生素恩诺沙星和蛋白样品的干预均于微生物开始生长前添加至基础 MRS 培养基。

### 1.3 生长曲线的测定

使用酶标仪(Model SYNERGY H1, BioTek Instruments Co. Ltd., Vermont, America)测定益生菌 0~30 h 的生长曲线。以每孔 200 μL 的量将培养液转移至 96 孔板中,每个实验设置 3 组平行,加完后置于酶标仪中,以连续振板方式培养并设置每 10 min 记录 600 nm 处的吸光值(OD<sub>600</sub>),培养 30 h 后,统计数据并绘制生长曲线。下文中生长曲线的吸光值数据均为原始吸光值减去空白 MRS 培养基的吸光值。

### 1.4 生长代时和曲线积分的计算

按照 Liu 等<sup>[6]</sup>的方法计算生长代时和曲线积分。生长代时的计算:将所测得生长曲线的 OD<sub>600</sub> 值进行以自然对数转化,按 1~5 h 的时间间隔分别在生长的 1~20 h 内,进行线性拟合,筛选其中 R<sup>2</sup>>0.8 的回归方程。然后通过线性拟合的斜率计算生长代时,计算公式为:

$$g = \frac{\ln 2}{k} \quad (1)$$

式中:

g——生长代时;

k——斜率。

曲线积分的计算:首先将整个生长曲线与逻辑斯蒂方程(Logistic Equation)拟合,然后计算其积分面

积。逻辑斯蒂方程如下所示:

$$N = \frac{K}{1 + \left( \frac{K - N_0}{N_0} \right) \cdot e^{-rt}} \quad (2)$$

式中:

$N_0$ ——初始生物量 ( $OD_{600}$ );

$K$ ——最大可能细菌数量 (环境承载力);

$r$ ——生长速率。

逻辑斯蒂方程将从生长曲线中拟合出  $K$ 、 $r$ 、 $N_0$  的值。

### 1.5 粗蛋白的提取制备

毛蚶样品取斧足部肌肉,红杉鱼样品取背部肌肉,黄蚬取可食用部分作为原料样品。如图 3a 所示,称取 20 g 水产原料,剪碎后与 60 mL 蒸馏水混合,在豆浆机(九阳,中国)中匀浆 2 min,在 4 °C 下超声辅助提取 1 h, 10 000 r/min 离心 15 min,弃去沉淀,所得上清液即为样品中提取出的水溶性蛋白。

粗蛋白得率的计算:依据 Bradford 等<sup>[12]</sup>的方法测定液体样品中的粗蛋白浓度,根据以下公式计算蛋白质得率:

$$P_c = \frac{C \times V}{m} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

$P_c$ ——粗蛋白得率, %;

$C$ ——粗蛋白样品质量浓度, mg/mL;

$V$ ——粗蛋白样品体积, mL;

$m$ ——原料质量, mg。

### 1.6 毛蚶蛋白的分离纯化

按照 Chen 等<sup>[13]</sup>的方法,稍微进行修改,对毛蚶粗蛋白(CE)进行层析分离。调节粗提溶液 pH 值至 8.0,装入用 Tris-HCl 缓冲液平衡两个柱体积的 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换柱。用相同缓冲液配制的 0、0.1、0.3 和 2 mol/L 的氯化钠逐步洗脱,每个浓度洗脱 30 管,每管收集 5 mL,流速为 1 mL/min。依据 Bradford 等<sup>[12]</sup>的测定每管蛋白质含量,并以此为依据收集组分。

纯化组分蛋白回收率的计算:依据 Bradford 等<sup>[12]</sup>的方法测定每个试管样品粗蛋白浓度,根据以下公式计算纯化蛋白组分回收率:

$$P_p = \frac{m_1}{m_0} \times 100\% \quad (4)$$

式中:

$P_p$ ——纯化组分蛋白回收率, %;

$m_1$ ——各组分蛋白质质量, mg;

$m_0$ ——粗蛋白蛋白质质量, mg。

### 1.7 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

用 SDS-PAGE 凝胶电泳分析毛蚶粗提物和各个组分的蛋白分子量分布情况。浓缩胶中聚丙烯酰胺的质量分数为 5%,分离胶中聚丙烯酰胺的质量分数为 12%。在电泳仪(Bio-Rad, 美国)中以 80 V 恒压电泳至溴酚蓝染色条靠近凝胶底端。电泳凝胶用考马斯亮蓝 R-250 染色后分析。

### 1.8 数据分析

所有实验均重复三次,所有值都表示为平均值。使用 Prism 8.0 软件进行统计分析。采用单向方差分析(ANOVA),使用 Tukey 分析比较所有组之间的显著性差异。差异在  $P < 0.05$  时被认为是显著的。

## 2 结果与讨论

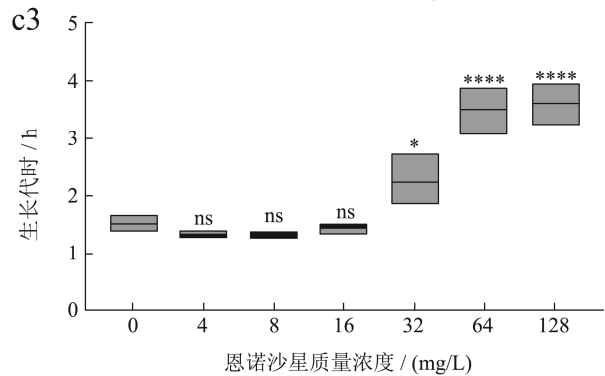
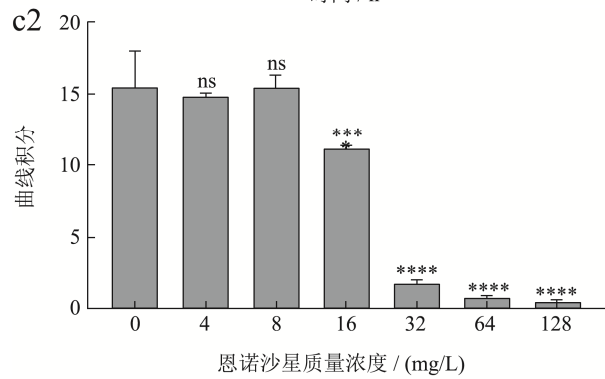
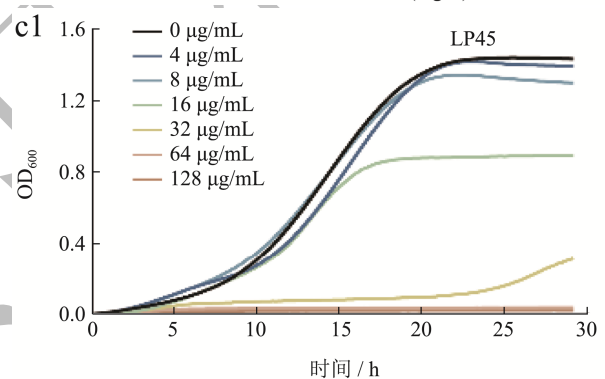
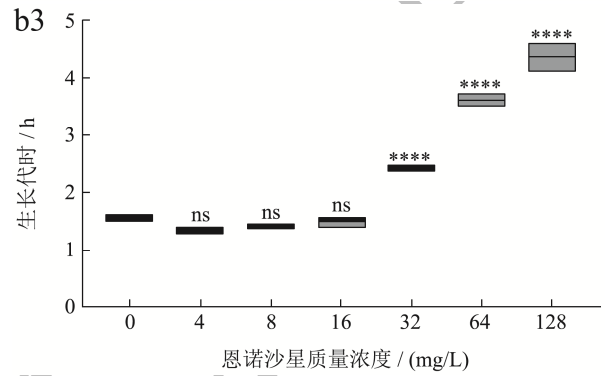
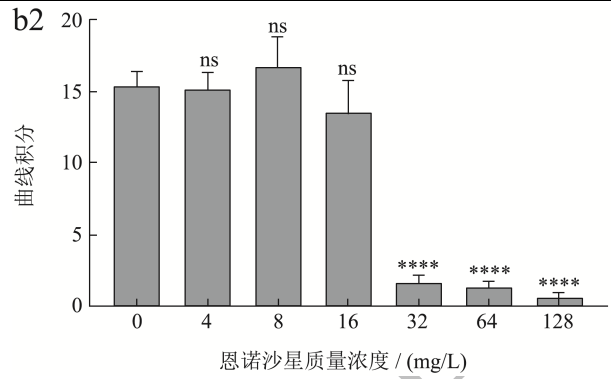
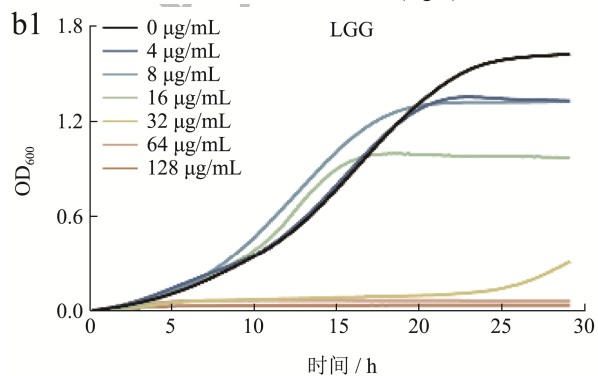
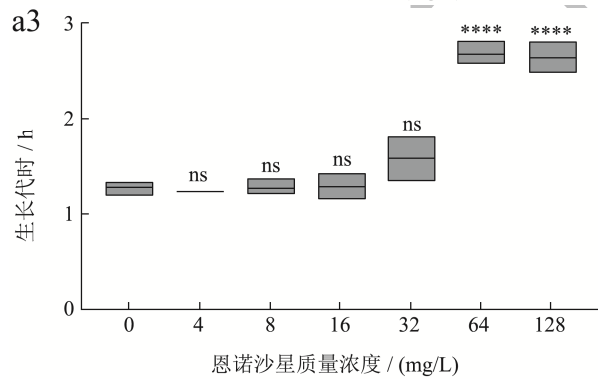
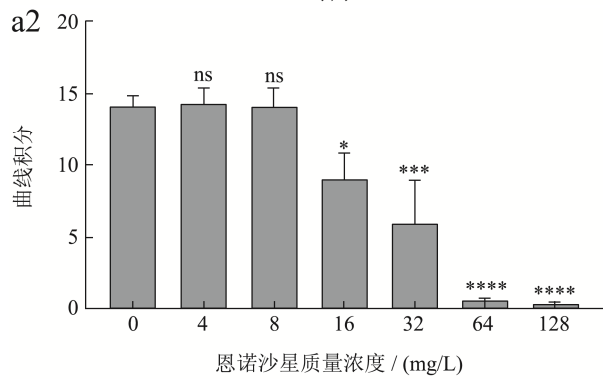
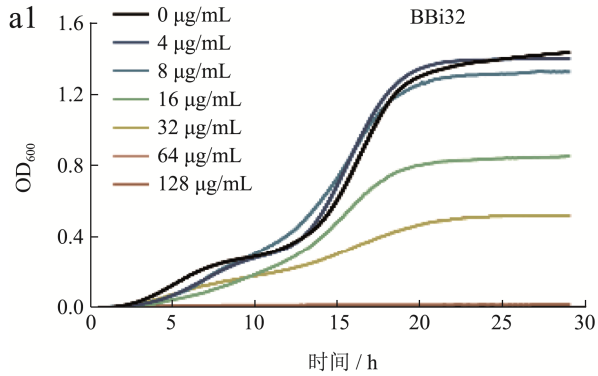
### 2.1 恩诺沙星对不同益生菌的生长胁迫效应探究

恩诺沙星能抑制 DNA 解旋酶和 DNA 拓扑异构酶 IV 的作用,阻止细菌的 DNA 复制,起到抑菌的作用<sup>[14]</sup>。为了研究恩诺沙星对不同益生菌的生长胁迫作用,按照 Wiegand 等<sup>[15]</sup>设计的方法,设置了从 0.03  $\mu\text{g/mL}$  到 1 024  $\mu\text{g/mL}$  的抗生素质量浓度梯度,图 1 仅展示了能表现微生物生长状态明显差异的几个质量浓度。如图 1 所示,当恩诺沙星的质量浓度为 64  $\mu\text{g/mL}$  或更高时,所有微生物的生长均受明显抑制,相较于对照组(0  $\mu\text{g/mL}$ )曲线积分显著下降( $P < 0.001$ ),且生长代时显著延长( $P < 0.001$ );而当抗生素的质量浓度为 8  $\mu\text{g/mL}$  或更低时,四种益生菌的生长趋势均与对照组相近,于同一时间进入生长对数期,且生长代时未见显著变化,除 Probio-M8 菌外,生长曲线积分未发生显著变化。由此可见,当抗生素质量浓度较高( $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ )或较低( $\leq 8 \mu\text{g/mL}$ )时,四种益生菌对抗生素的反应差异不大。

当抗生素质量浓度为 32  $\mu\text{g/mL}$  时,BBi32 菌生长受到抑制, $OD_{600}$  相较对照组(1.43)降低至 0.52,且曲线积分显著降低( $P < 0.005$ ),生长代时相较于对照组略微延长,但不具有统计学意义;当质量浓度降低

至 16  $\mu\text{g/mL}$  时,该菌的生长代时未见显著变化,OD<sub>600</sub> 上升至 0.86, 曲线积分提升至 9.01, 但与对照组仍存在显著差异 ( $P < 0.05$ ) (图 1a)。

对于 LGG 菌, 32  $\mu\text{g/mL}$  抗生素可明显抑制其生长, 生长延滞期延长至 20 h 以上, 在 30 h 内未进入生长平台期, 生长代时相较于对照组 (1.28 h) 显著延长至 2.22 h; 16  $\mu\text{g/mL}$  质量浓度下, 该菌的生长受到轻微抑制, 吸光值达 0.97, 低于对照组 (1.62), 曲线积分和生长代时均未发生显著变化 (图 1b)。



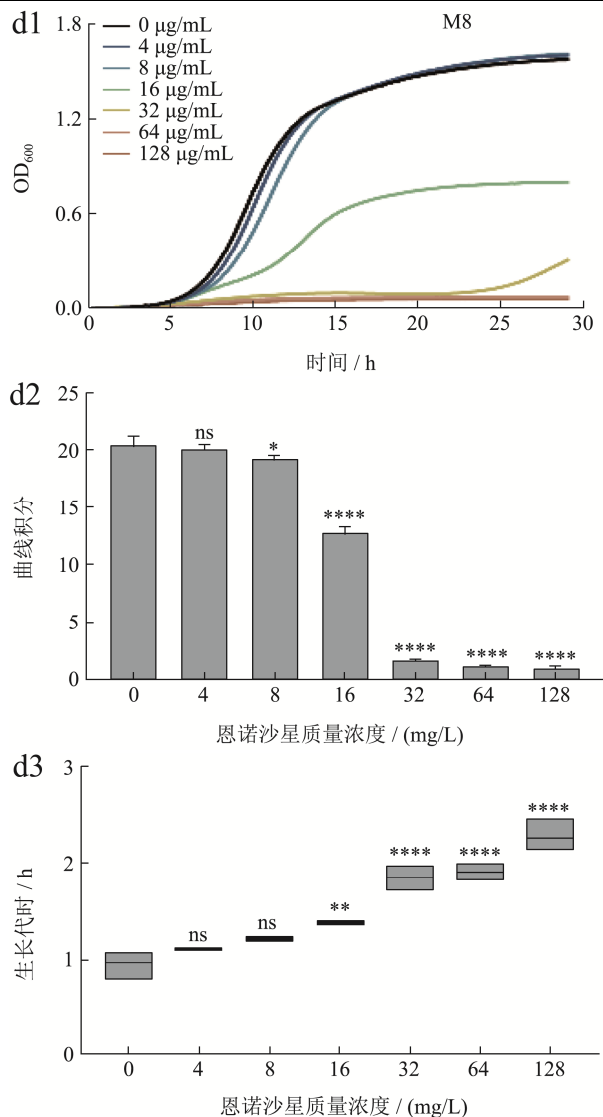


图1 恩诺沙星对不同益生菌的生长胁迫效应

Fig.1 Growth stress effect of enrofloxacin on different probiotics

注：四种益生菌 a 为两歧双歧杆菌 BBi32、b 为鼠李糖乳杆菌 LGG、c 为植物乳杆菌 LP45、d 为乳双歧杆菌 Probio-M8，分别在不同浓度恩诺沙星胁迫下的生长曲线、曲线积分和生长代时。显著性表示方法为 ns 为无显著性差异，\* 为  $P<0.05$ ，\*\* 为  $P<0.01$ ，\*\*\* 为  $P<0.005$ ，\*\*\*\* 为  $P<0.001$ ，下同。

在 32 μg/mL 质量浓度下，LP45 菌与 LGG 菌相似，生长延滞期被延长至 20 h 以上，生长代时较对照组 (1.52 h) 被延长至 2.22 h ( $P<0.05$ )，曲线积分显著降低 ( $P<0.001$ )；当恩诺沙星的质量浓度降至 16 μg/mL 时，该菌的曲线积分显著降低 ( $P<0.005$ )，在抗生素的影响下提前进入生长平台期，20 h 后 OD<sub>600</sub> 维持在 0.97，生长代时未见明显延长 (图 1c)。

对于 Probio-M8 菌，在 32 μg/mL 和 16 μg/mL 的抗生素下生长延滞期受到不同程度的延长，吸光值均有所下降，曲线积分显著降低，生长代时相较于对照

组 (0.96 h) 均显著延长 ( $P<0.01$ )，分别为 1.86 h 和 1.43 h (图 1d)。

上述实验结果表明，在这四种益生菌中乳双歧杆菌 Probio-M8 对恩诺沙星最为敏感。之前的研究中，该抗生素对数十株双歧杆菌的最小抑菌浓度 (MIC) 分布在 2~64 μg/mL<sup>[16]</sup>；当抗生素的质量浓度为 12.5 μg/mL 时，体外培养的肠道菌群中乳酸杆菌和双歧杆菌的丰度降低<sup>[3]</sup>。考虑到低浓度抗生素对益生菌带来的不利影响，用 Probio-M8 菌分别在 16 μg/mL 和 32 μg/mL 恩诺沙星胁迫的生长模型对水产蛋白及其组分活性进行研究。

## 2.2 水产粗提蛋白的活性评价

红三文、黄蚬和毛蚶是三种常见的养殖水产品，也是人们经常摄入的几种水产品。利用 Probio-M8 菌在 32 μg/mL 的恩诺沙星胁迫下的生长模型对红三文、黄蚬和毛蚶粗提蛋白活性探究。红三文、黄蚬和毛蚶蛋白的粗提取得率分别为 1.35%、0.27%、0.99%。如图 3 所示，对照组为 Probio-M8 菌在 MRS 培养基中正常生长，模型组为该菌在有 32 μg/mL 质量浓度恩诺沙星的 MRS 培养基中生长，往含有该抗生素的培养基中分别添加 0.1 g/L 和 0.2 g/L 的不同水产蛋白对其进行活性评价。实验结果表明，当蛋白添加量为 0.1 g/L 时，三种蛋白粗提物均可提高曲线的 OD<sub>600</sub>，其中毛蚶蛋白粗提物可将生长延滞期缩短至 5 h 以内，且相较于模型组 (2.48 h) 显著降低生长代时至 1.49 h ( $P<0.05$ )，展现出更好的生物活性。当蛋白添加量为 0.2 g/L 时，毛蚶蛋白仍展现出良好的保护效果，相对于模型组，可将生长代时缩短至 1.51 h。综合生长曲线、曲线积分及生长代时分析，三种水产品中毛蚶蛋白对益生菌的保护效果最优，其生物活性在 0.1~0.2 g/L 范围内呈现剂量依赖性。

目前研究发现毛蚶蛋白的生物活性包括抗肿瘤<sup>[9]</sup>、抗氧化和金属结合能力<sup>[17]</sup>，其对益生菌的作用仍不明确，上述实验结果表明，毛蚶蛋白可保护乳酸杆菌免受抗生素生长胁迫，具有调节肠道稳态的潜在功能。

## 2.3 毛蚶蛋白的分离纯化

毛蚶蛋白的纯化结果如图 3b 所示，毛蚶蛋白粗提物在 0、0.1、0.3 和 2.0 mol/L 四个浓度的 NaCl 通过阴离子交换柱 DEAE Sepharose Fast Flow 中被洗脱出四个组分，分别为 Fr0、Fr1、Fr2 和 Fr3。Fr0、Fr1、Fr2、Fr3 的蛋白回收率分别为 10.9%、4.03%、6.27% 和 1.54%。由 SDS-PAGE 分析结果可知，粗提物的分子量主要分布在 14.3~66.4 ku 之间，分别在 35.0、23.0

和 14.3 ku 左右处观察到明显的条带。Fr0 的蛋白分子量分布在约 14.3 ku 和 43.0 ku 处, Fr1 的分子量分布于 20.1~29.0 ku 之间, Fr2 的分子量分布较广, 分布于 14.3~97.2 ku, 而 Fr3 则集中于分布于小于 14.3 ku 的

范围。其中, Fr0 和 Fr3 均在约 14.3 ku 处有出现条带, 而仅有 Fr1 组分则在约 23.0 ku 和 27.0 ku 处出现明显条带(图 3c)。上述结果表明, 毛蚶蛋白的分离纯化效果良好, 能明显区分组分之间的蛋白差异。

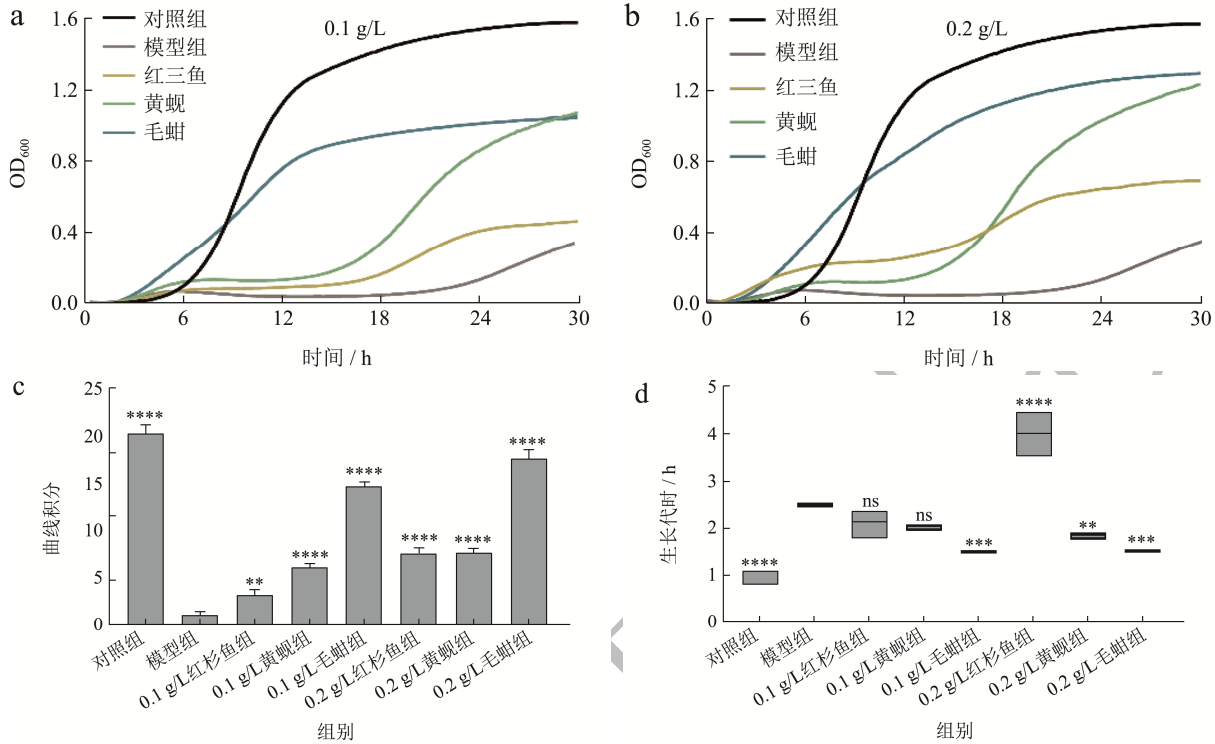


图 2 不同水产粗提蛋白的活性评价

Fig.2 The activity of different aquatic crude extract proteins

注: 红三鱼、黄蚬和毛蚶蛋白粗提物添加量分别为 0.1 g/L 和 0.2 g/L 时, 益生菌在恩诺沙星胁迫下的 (a、b) 生长曲线、(c) 曲线积分和 (d) 生长代时。

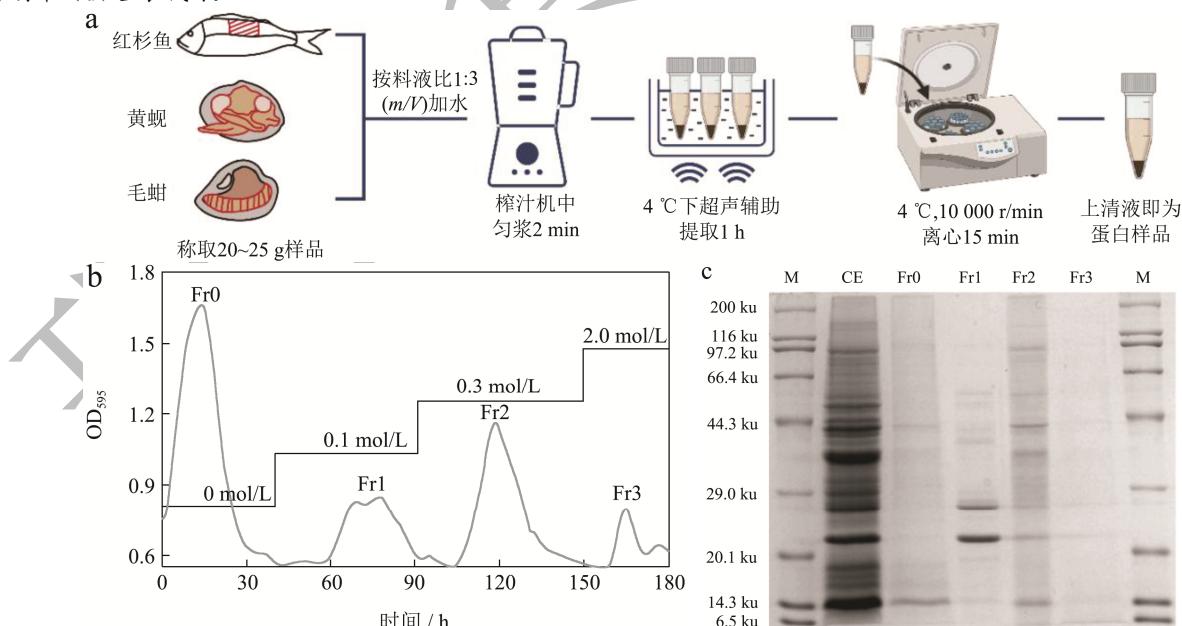


图 3 水产蛋白的提取和毛蚶蛋白的分离纯化

Fig.3 Extraction of aquatic proteins and isolation and purification of *Arca subcrenata* proteins

注: a 为水产蛋白的提取流程图, 其中红色部分为用于蛋白提取的部分; b 为毛蚶蛋白在 DEAE Sepharose Fast Flow 的洗脱曲线; c 为毛蚶蛋白粗提物和各蛋白组分的分子量分布。其中 M 表示 Marker, CE 表示蛋白粗提物。

## 2.4 毛蚶蛋白组分的活性评价

将蛋白粗提物和纯化得到的组分以 0.1 g/L 的质量浓度添加至含有 16  $\mu\text{g/mL}$  恩诺沙星的 MRS 培养基中, 通过乳双歧杆菌 Probio-M8 在该混合培养基中的生长状态对组分的活性进行评价。由图 4 所示, 所有蛋白组分均提高了培养体系的  $\text{OD}_{600}$ 。与模型组相比, 除 Fr2 组外, 其余实验组的曲线积分均显著提高 ( $P < 0.005$ ), 生长代时也均显著下降 ( $P < 0.001$ )。其中, Fr0 可使益生菌的最大吸光值从模型组 0.80 提升至 1.56, 提高生物量至接近对照组, 相较于模型组显著提高曲线积分 ( $P < 0.001$ )。Fr3 可使 Probio-M8 菌的生长代时恢复至 0.98 h, 与对照组接近。综合以上结果判断, 毛蚶蛋白的组分均能缓解恩诺沙星对 Probio-M8 的生长胁迫, 其中 Fr0 可显著提高培养体系中的细菌总数, Fr3 可显著降低益生菌的生长代时, 具有良好的生物活性。

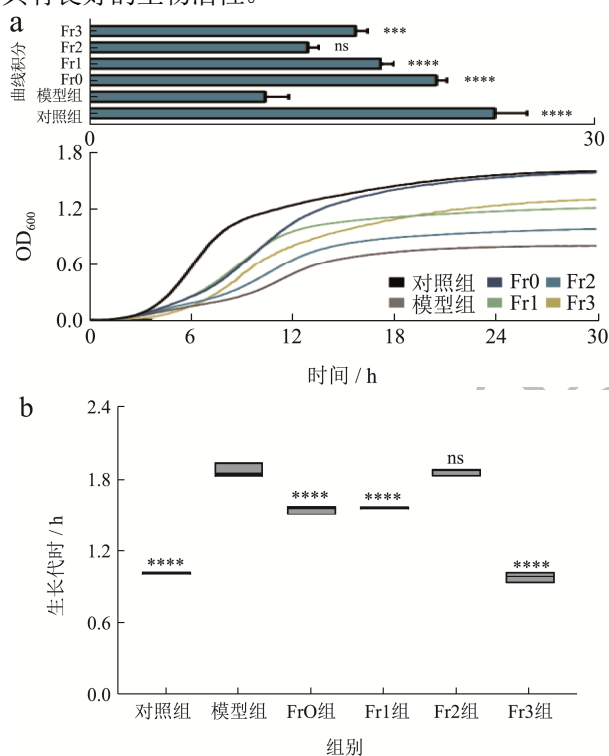


图4 毛蚶蛋白组分的活性评价

### Fig.4 Activity evaluation of protein fractions of *Arca subcrenata*

注: 以 0.1 g/L 的质量浓度添加毛蚶蛋白粗提物和各蛋白组分后, Probio-M8 菌在抗生素胁迫下的 (a) 生长曲线和曲线面积以及 (b) 生长代时。

小分子蛋白和多肽是乳酸菌生长发育所依赖的主要氮源<sup>[8]</sup>, 乳酸菌需通过分泌胞外蛋白酶将酪蛋白降解为寡肽, 再对其吸收并利用<sup>[18]</sup>, 有研究表明, 大豆蛋白和多肽均能促进双歧杆菌的生长和代谢, 且多肽的生物活性高于蛋白<sup>[19]</sup>。从 SDS-PAGE 分析的结果可

知, 具有更高生物活性的 Fr0 和 Fr3 组分中含有更多小分子蛋白和多肽。相对于大分子蛋白, 益生菌对小分子蛋白和多肽具有更高利用率, 这可能是该组分具有更高生物活性的原因之一。

目前研究表明, 不同肠段均存在肠道微生物, 不同肠段所定植菌的数量和种类有所不同, 其中结肠部分所含的菌数量最多, 在蛋白质主要吸收的小肠部分也存在肠道微生物如乳酸菌和链球菌<sup>[20]</sup>。蛋白质进入人体胃肠后, 大部分于胃消化在小肠吸收, 仍有一些残留蛋白质不能被吸收而进入到结肠, 并与肠道环境发生交互<sup>[21]</sup>。

## 3 结论

本研究基于恩诺沙星对四种益生菌抑菌作用差异, 建立了乳双歧杆菌 Probio-M8 在抗生素胁迫下的生长模型, 在该模型下, 毛蚶蛋白粗提物展示出保护益生菌免受抗生素生长胁迫的生物活性; 毛蚶蛋白经分离纯化得到四个组分 (Fr0、Fr1、Fr2 和 Fr3), 其中蛋白组分 Fr0 (14.3~43.0 ku) 可将益生菌在抗生素胁迫下的  $\text{OD}_{600}$  从 0.80 提高至 1.56, Fr3 (<14.3 ku) 可将 Probio-M8 菌的生长代时降低至 0.98 h, 缓解抗生素对益生菌的生长胁迫。综上所述, 毛蚶蛋白组分可促进乳双歧杆菌在抗生素胁迫下增殖, 表明毛蚶蛋白具有调节肠道稳态的功能, 本研究为水产蛋白对肠道稳态的调节功能研究提供理论基础。后续研究将聚焦于优化毛蚶蛋白的提取工艺, 提高活性蛋白得率, 并利用生物酶水解毛蚶蛋白得到具有生物活性的多肽与寡肽, 结合蛋白组学分析方法, 优化可溶性蛋白的生物活性。

## 参考文献

- [1] Liu X, J C Steele, Meng X Z, et al. Usage, residue, and human health risk of antibiotics in Chinese aquaculture: A review [J]. Environmental Pollution, 2017, 223: 161-169.
- [2] Liu X, Lu S, Meng W, et al. Residues and health risk assessment of typical antibiotics in aquatic products from the Dongting Lake, China-"Did you eat "Antibiotics" today?" [J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2018, 25(4): 3913-3921.
- [3] Chen T, Yuan J, Feng X, et al. Effects of enrofloxacin on the human intestinal microbiota *in vitro* [J]. Int J Antimicrob Agents, 2011, 37(6): 567-571.
- [4] Endt K, Maier L, Kappeli R, et al. Peroral ciprofloxacin therapy impairs the generation of a protective immune response in a mouse model for *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* diarrhea, while parenteral ceftriaxone therapy

- does not [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(5): 2295-2304.
- [5] Badawy S, Yang Y, Liu Y, et al. Toxicity induced by ciprofloxacin and enrofloxacin: oxidative stress and metabolism [J]. *Crit Rev Toxicol*, 2021, 51(9): 754-787.
- [6] Liu G, Chu M, Xu P, et al. Effects of *Ilisha elongata* proteins on proliferation and adhesion of *Lactobacillus plantarum* [J]. *Food Chem X*, 2022, 13: 100206.
- [7] An C, Kuda T, Yazaki T, et al. Caecal fermentation, putrefaction and microbiotas in rats fed milk casein, soy protein or fish meal [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(6): 2779-2787.
- [8] Zhang C, Zhang Y, Li H, et al. The potential of proteins, hydrolysates and peptides as growth factors for *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*: current research and future perspectives [J]. *Food Funct*, 2020, 11(3): 1946-1957.
- [9] Guo Z, Shi H, Li C, et al. Identification and characterization of a novel protein ASP-3 purified from *Arca subcrenata* and its antitumor mechanism [J]. *Mar Drugs*, 2019, 17(9): 528.
- [10] Chen L L, Song L Y, Li T F, et al. A new antiproliferative and antioxidant peptide isolated from *Arca subcrenata* [J]. *Mar Drugs*, 2013, 11(6): 1800-1814.
- [11] Shi H, Hu X, Zheng H, et al. Two novel antioxidant peptides derived from *Arca subcrenata* against oxidative stress and extend lifespan in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Journal of Functional Foods*, 2021, 81: 104462.
- [12] 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(1): 248-254.
- [13] Chen Y, Li C, Zhu J, et al. Purification and characterization of an antibacterial and anti-inflammatory polypeptide from *Arca subcrenata* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 96: 177-184.
- [14] Hooper D C, Jacoby G A. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2015, 1354: 12-31.
- [15] Wiegand I, Hilpert K, Hancock R E, et al. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances [J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(2): 163-175.
- [16] Mao Y H, Song A X, Yao Z P, et al. Protective effects of natural and partially degraded konjac glucomannan on *Bifidobacteria* against antibiotic damage [J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 181: 368-375.
- [17] Meng C, Wang K, Zhang X, et al. Purification, secondary structure and antioxidant activity of metallothionein zinc-binding proteins from *Arca subcrenata* [J]. *Protein Expr Purif*, 2021, 182: 105838.
- [18] Pritchard G G, Coolbear T. The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 1993, 12(1-3): 179-206.
- [19] Li W H, Li H, Zhang Y X, et al. Different effects of soybean protein and its derived peptides on the growth and metabolism of *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* JCM 1190 [J]. *Food & Function*, 2021, 12(13): 5731-5744.
- [20] Mowat A M, Agace W W. Regional specialization within the intestinal immune system [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(10): 667-685.
- [21] Reese A T, Pereira F C, Schintlmeister A, et al. Microbial nitrogen limitation in the mammalian large intestine [J]. *Nat Microbiol*, 2018, 3(12): 1441-1450.