凡纳滨对虾丝氨酸蛋白酶基因(*Lv – SP*)的克隆及表达分析

宋巧珍[1],邹枘峰[1],张亦陈[1],耿绪云[2],刘逸尘[1] *

(1. 天津市动植物抗性重点实验室/天津师范大学生命科学学院,天津 300387;2. 天津市水生动物疫病预防控制中心,天津 300221)

摘要 [目的]研究丝氨酸蛋白酶基因(*Lv – SP*)在凡纳滨对虾天然免疫应答过程中的作用。[方法]利用 PCR 技术克隆凡纳滨对虾丝氨酸蛋白酶基因(*Lv – SP*),并进行生物信息学分析,进一步通过实时荧光定量 PCR(qRT – PCR)方法对其进行组织表达分析以及白斑杆状病毒(WSSV)刺激后的表达变化分析。[结果]成功从凡纳滨对虾体内克隆了 *Lv – SP* 基因的开放阅读框 ORF,碱基数为 1 104 bp,共编码 367 个氨基酸,在线分析软件预测其蛋白分子量为 41 kD,等电点 PI 为 6.93;在线分析软件预测显示:*Lv – SP* 基因预测的氨基酸序列保守性很高,含有 1 个 clip 结构域和 1 个高度保守的 SP 结构域(Tryp – SPc);系统进化发生分析表明:Lv – SP 氨基酸序列与中国明对虾以及中华绒螯蟹的丝氨酸蛋白酶(SP)同源性较高,而与按蚊、小蜂窝甲虫的 SP 同源性较低;qRT – PCR 分析结果显示:*Lv – SP* 基因在凡纳滨对虾不同组织中均有表达,并且在鳃和血中表达量较高,而在心和肝中表达量较低,病毒 WSSV 刺激后,*Lv – SP* 基因在 48.0 h 和 72.0 h 有显著的上调表达趋势。[结论]*Lv – SP* 基因保守性比较高,并且其在一定程度上参与了对虾应答病毒侵染的免疫反应,推测它有可能作为重要的免疫调控基因在对虾的防御应答过程中发挥作用。

关键词 凡纳滨对虾;丝氨酸蛋白酶;基因克隆;免疫应答;WSSV 刺激

中图分类号 S96 **文献标识码** A **文章编号** 0517 – 6611(2018)12 – 0102 – 05

Molecular Cloning and Expression Analysis of *Lv – SP* Gene from *Litopenaeus vannamei*

SONG Qiao-zhen, ZOU Rui-feng, ZHANG Yi-chen et al (Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance/College of Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin 300387)

Abstract [Objective] Functional research of *serine protease* (*SP*) gene(*Lv-SP*) from *Litopenaeus vannamei* in innate immunity response. [Method] *Lv-SP* gene was cloned by PCR. The bioinformatics analysis was performed by online software. Expression profiles of *Lv-SP* gene in tissue and in response to WSSV challenge were analyzed by qRT-PCR. [Result] The length of the open reading frame (ORF) of *Lv-SP* gene contained 1 104 bp, encoding 367 amino acids. The predicted protein molecular weight and calculated isoelectric point was 41 kD and 6.93, respectively. Analyzed by online bioinformatics software, *Lv-SP* was highly conservative. It contained a clip domain and a highly conserved SP domain (Tryp-SPc). Phylogenetic analysis showed that comparing to the SP protein in *Fenneropenaeus chinensis* and *Eriocheir sinensis*. , Lv-SP had highest homologous. However, Lv-SP had lowest homology comparing to SP in *Anopheles gambiae* and *Aethina tumida*. qRT-PCR results showed that *Lv-SP* gene were expressed in different tissues of *L. vannamei*. *Lv-SP* gene had high expression level in gill and hemocytes and had low expression level in heart and hepatopancreas. The expression of *Lv-SP* was up-regulated significantly in 48.0 h and 72.0 h after WSSV infection. [Conclusion] *Lv-SP* has a typical clip domain and is highly conserved with other SPs with immunological functions. *Lv-SP* from *L. vannamei* might plays an important role in the immune response according to the infection of pathogen.

Key words *Litopenaeus vannamei*; Serine proteinase; Gene cloning; Immune response; WSSV infection

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)又称南美白对虾(Pacific White Shrimp),隶属于节肢动物门、甲壳纲,其具有生长快、繁殖期长、含肉率高和便于活虾运输等特点,是世界范围内对虾养殖的三大品种之一[1]。但近年来,在病原活跃、养殖环境恶化和宿主抵抗力下降三方面因素共同作用下,对虾病害频发,给我国养殖产业造成了巨大的经济损失,因此深入开展对虾免疫防御机制研究,增强其抗病能力,显得尤为重要。

凡纳滨对虾属于无脊椎动物,缺乏获得性免疫系统,只能依靠天然免疫系统(细胞免疫和体液免疫)来抵御和杀死入侵的病原[2-3]。其体液免疫主要利用凝血级联反应、酚氧化酶激活系统等一系列效应因子参与免疫应答反应[4]。此外,虾蟹类体内的一些其他组分如丝氨酸蛋白酶、丝氨酸蛋白酶抑制剂等分子会作为级联反应中的调控因子参与免疫反应。丝氨酸蛋白酶家族作为一种蛋白水解酶,其以丝氨酸为活性中心,在生物有机体中起着重要的作用[5-6]。clip – SP 家族在氨基端含有 1 个 clip 结构域,此结构域最初在马蹄蟹的凝固酶原中被发现,研究结果发现它在免疫反应中具有重要调节功能[7],其中 6 个半胱氨酸可形成 3 个链内二硫键[8-9];羧基端含有丝氨酸蛋白酶样结构域(SP 结构域),其中丝氨酸、组氨酸和天冬氨酸这 3 个氨基酸会形成催化三联体发挥作用。无脊椎动物中,丝氨酸蛋白酶家族在胚胎发育和防御反应的信号级联反应中发挥重要作用,例如马蹄蟹的凝血反应[10]、果蝇抗菌肽的合成[11]、昆虫和甲壳纲动物中酚氧化酶原系统的激活等[12-13]。同时,补体系统(包括经典途径、凝集素途径和旁路途径)必须先通过一系列丝氨酸蛋白酶(serine proteases, SP)的酶促级联反应激活后才能发挥生物学效应。经典途径中,对抗原抗体复合物(IC)的识别由 C1q 介导,其中的 SP 主要是 C1r 和 C1s;凝集素途径中,识别分子是甘露糖结合凝集素(mannose-binding lectin, MBL)[14-15],MBL 识别并结合外源病原物质,进一步与 MBL 相关的 SP(MBL Associated Serine Proteinase, MASP)结合形成复合物并激活补体因子 C3,形成膜攻击复合物(MAC),导致异源微生物裂解死亡,进而发挥免疫作用[16-17]。该研究拟获得凡纳滨对虾 *Lv – SP* 基因,探讨序列特点及组织分布特征,并分析其应答病毒侵染的表达变化模式,以期为深入探讨其作为免疫调控基因在对虾防御应答过程中的作用机制

基金项目 国家自然科学基金项目(31472299);天津市应用基础与前沿技术研究计划(15JCZDJC33800);天津市水产生态及养殖重点实验室开放基金项目(TJAE2015005)。

作者简介 宋巧珍(1992—),女,山西大同人,硕士研究生,研究方向:水生动物分子生物学。*通讯作者,副教授,博士,硕士生导师,从事海洋动物分子免疫学研究。

收稿日期 2018 – 02 – 04

奠定基础,并应用于对虾的健康养殖和病害防治。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　研究材料。健康的凡纳滨对虾(购于天津市西青区对虾养殖基地),体长 11 ~ 14 cm,体重 9 ~ 14 g,于实验室循环养殖系统中(16 ℃,盐度 10‰,氧气充足)暂养 4 ~ 5 d 再进行试验。

1.1.2　载体和菌株。pMD18 – T – Vector (TaKaRa),大肠杆菌 DH5α 菌种由天津师范大学水生生物学研究室保存。

1.1.3　主要试剂。SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒(生工)、Ex*Taq* 酶(TaKaRa)、2 × *Taq* PCR Master Mix (Promega)、LB 液/固体培养基(生工)、M – MLV Reverse Transcriptase (Promega)、Go*Taq*® MasterMix (Promega)、T_4 DNA 连接酶(TaKaRa)等。

1.1.4　主要仪器。PCR 仪(BIO – RAD)、电泳仪(DYY – 6C)、超净工作台(SW – CJ – 1FD)、7500 Fast Real – Time PCR system(Applied Biosystems)、移液器(Eppendorf)等。

1.2　方法

1.2.1　凡纳滨对虾总 RNA 提取及 cDNA 合成。利用 Trizol 方法提取凡纳滨对虾血细胞、肝、鳃等组织的 RNA,用于后期基因克隆操作,经 1% MOPs 琼脂糖凝胶电泳进行定性检测,再通过 NANO Drop 2000 分光光度计进行定量检测,确认 RNA 浓度和完整性后利用 M – MLV Reverse Transcriptase 反转录体系并且加入接头引物 BDA、AOLP(表 1)进行 cDNA 的合成。

1.2.2　引物设计与 *Lv – SP* ORF 区域的扩增。从实验室前期凡纳滨对虾转录组测序结果中筛选出 *SP* 基因进行引物设计(生工),引物包括 *Lv – SP* F1、*Lv – SP* R1 和 *Lv – SP* F2、*Lv – SP*R2(表 1)共 2 对。利用 PCR 技术扩增目的基因,电泳检测后将 PCR 产物利用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒进行纯化后连接到 pMD18 – T – Vector 上,转入到大肠杆菌 DH5α 中,送英潍捷基公司进行测序,利用 Bioedit 软件和在线 BLAST 程序分析测序结果与目的基因是否一致,进而确定是否获得 *Lv – SP* 基因 ORF 区。

1.2.3　生物信息学分析。首先利用 Expasy 的在线分析工具(http://web.expasy.org)对 *Lv – SP* 基因 ORF 区进行翻译获得蛋白质序列、预测其分子量及等电点、利用其 SMART 程序分析 Lv – SP 蛋白的功能结构域,并利用其 SignalP 4.1 Server 分析其是否含有信号肽,通过 TMHMM 2.0 对 Lv – SP 蛋白序列进行跨膜分析。使用 Bioedit、ClustalX 1.83 以及 MEGA 6.0软件对 Lv – SP 氨基酸和其他物种如中国明对虾、中华绒螯蟹、果蝇等的 SP、SPH 氨基酸序列进行多重比对,并使用 Neighbour – Joining 法构建系统进化树(Bootstrap = 10000)。

1.2.4　*Lv – SP* 基因组织表达分析。根据克隆的 *Lv – SP* 基因序列,设计荧光定量 PCR 试验组引物 *Lv – SP* qf,*Lv – SP* qr 和对照组引物 *β – actin* f,*β – actin* r(表 1),将凡纳滨对虾各组织提取的 RNA 反转成浓度相近的 cDNA,参考 Go*Taq*® MasterMix 说明,利用荧光定量 PCR 方法检测 *Lv – SP* 基因在凡纳滨对虾不同组织中表达量的差异。定量 PCR 反应体系设计为 Go*Taq*® MasterMix 12.5 μL, Nuclease-Free Water 8.50 μL,引物 1 μL,cDNA 2 μL,总体积 25 μL。定量 PCR 反应程序:95 ℃预变性 2 min;95 ℃变性 15 s,60 ℃退火 60 s,40 个循环;最后进行融解曲线分析。所获得的数据利用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法和 *t* 检验方法进行统计分析并计算 *Lv – SP* 基因相对表达量的显著性差异。

1.2.5　人工感染白斑杆状病毒(WSSV)对凡纳滨对虾 *Lv – SP* 基因表达的影响。人工感染克氏原螯虾富集足量的 WSSV 病毒,并稀释到 10^5 拷贝数/μL。从试验组和对照组各选取 50 只经检测的健康凡纳滨对虾,分别注射 10 μL WSSV 和 Tris – NaCl 缓冲液(TN – buffer,用于稀释 WSSV),分别在注射后 0、0.5、5.0、12.0、24.0、48.0 和 72.0 h 抽取对虾血淋巴,提取血细胞 RNA 并反转录制备 cDNA,设计对照组引物 *TPI* – qf,*TPI* – qr(表 1),利用 qPCR 分析凡纳滨对虾 *Lv – SP* 基因的表达变化特征(方法同"**1.2.4**")。

表 1　试验所用引物

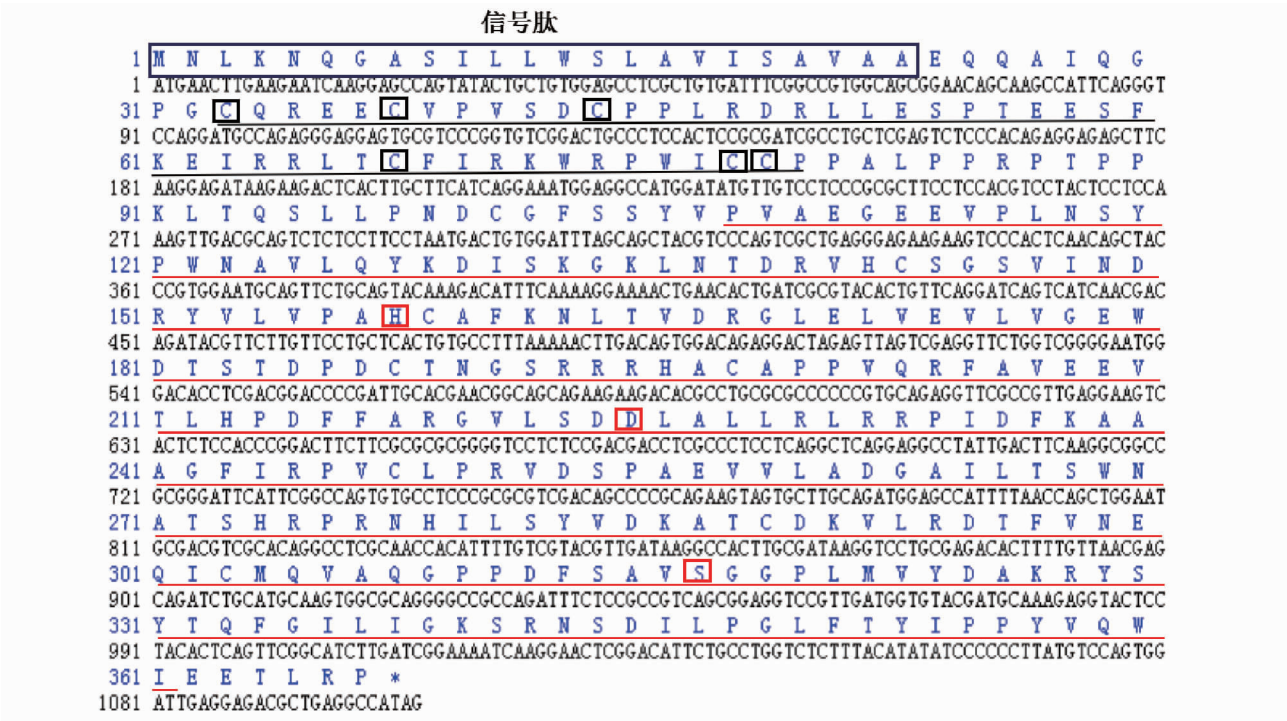
Table 1　Primers of experiments

引物名称 Primer names	引物序列(5′ – 3′) Sequences(5′ – 3′)	注释 Comments
BDA	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAAGTACGCGGG	接头引物
AOLP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T)16(A/C/G)	接头引物
Lv – SP F1	CAGCGGAACAGCAAGCC	*Lv – SP* 基因克隆用引物
Lv – SP R1	TGCCGAACTGAGTGTAGGAG	*Lv – SP* 基因克隆用引物
Lv – SP F2	ATGAACTTGAAGAATCAA	*Lv – SP* 基因克隆用引物
Lv – SP R2	CTATGGCCTCAGCGTCTC	*Lv – SP* 基因克隆用引物
Lv – SP qf	AGCGGAACAGCAAGCCA	*Lv – SP* 基因 qPCR 分析用引物
Lv – SP qr	ACTCACTTGCTTCATCAGGA	*Lv – SP* 基因 qPCR 分析用引物
TPI – qf	GGTCACGTGTTGTCTTGGCTTATGAACC	感染试验分析内参基因用引物
TPI – qr	CTGAACAAAGTCTGGCTTGAGAGCTGC	感染试验分析内参基因用引物
β – actin f	GAAGTAGCCGCCCTGGTTG	组织表达分析内参基因用引物
β – actin r	CGGTTAGCCTTGGGGTTGAGGGGAG	组织表达分析内参基因用引物

2　结果与分析

2.1　*Lv – SP* 基因 cDNA 序列特征及生物信息学分析　*Lv – SP* 基因包含 1 个 1 104 bp 的 ORF 区,编码 367 个氨基酸(图 1),预测其蛋白分子量为 41 kD,等电点为 6.93。SignalP 4.1 Server 预测结果显示:Lv – SP 氨基酸序列氨基端含有 23 个氨基酸的信号肽,同时 TMHMM 2.0 预测显示 Lv – SP 蛋白位

于细胞外发挥作用。SMART 预测结果显示 Lv－SP 蛋白含有 1 个 clip 结构域和 1 个高度保守的 TryP－SPc 结构域。在 clip 结构域中，包含 6 个半胱氨酸，可以形成 3 个二硫键；在 TryP－SPc 结构域中，包含 SP 家族中 3 个典型的氨基酸组氨酸（His）、天冬氨酸（Asp）和丝氨酸（Ser），形成催化三联体发挥功能。



注：蓝色方框表示信号肽，黑色下划线表示 clip 结构域，红色下划线表示 TryP－SPc 结构域，黑色方框表示 6 个半胱氨酸（C），红色方框表示组氨酸（H）、天冬氨酸（D）和丝氨酸（S）

Note：The sequence in blue box represents the signal peptide，the clip domain is underlined by black line，the TryP－SPc domain is underlined by red line，the bases（C）in black box represents six cysteines and the bases in red box represents histidine（H），aspartic acid（D）and serine（S）

图 1 *Lv－SP* 基因的 cDNA 序列及相应蛋白的氨基酸序列

Fig. 1 The ORF cDNA sequence and the corresponding amino acid sequence of *Lv－SP*

2.2 Lv－SP 的多重序列比对及进化发生分析 将 Lv－SP 氨基酸序列与其他物种 SP 氨基酸序列进行多重比对（图 2）发现，这 12 种 SP 及 SPH 序列在蛋白水平上具有较高序列相似性。进一步构建系统发生树显示：Lv－SP 蛋白与南美白对虾、中华绒螯蟹相似性比较高，亲缘关系比较近，进化上为一个亚群；而与按蚊、小蜂窝甲虫亲缘关系比较远（图 3）。

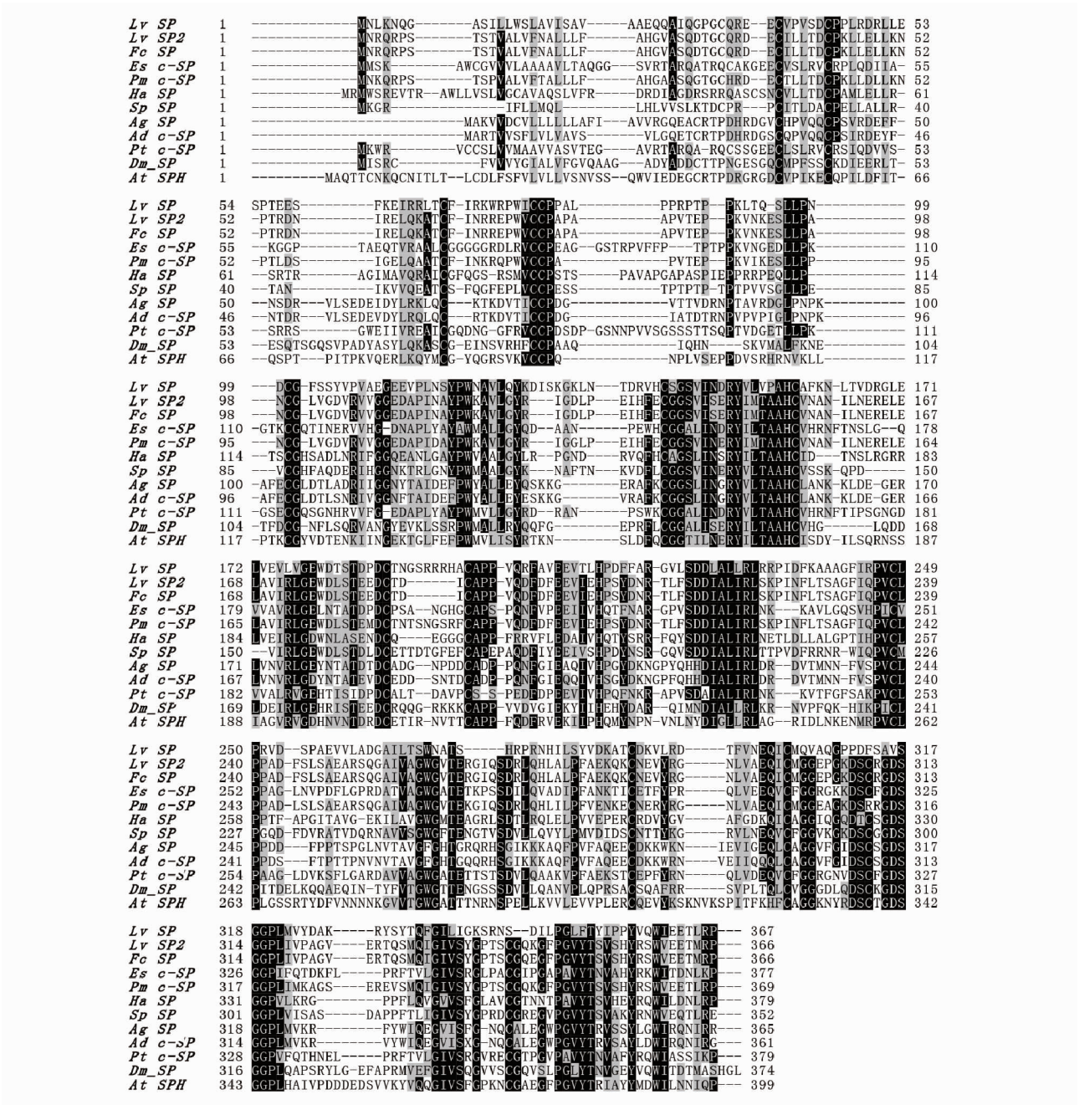
2.3 *Lv－SP* 基因的组织表达分析 利用 RT－PCR 分析 *Lv－SP* 基因在不同组织中的表达水平，结果显示：该基因在凡纳滨对虾的血细胞、肝、鳃、胃等 9 个组织中均有表达，其中在鳃和血细胞中的表达量较高，在心和肝中表达量较低（图 4）。

2.4 WSSV 侵染对凡纳滨对虾 *Lv－SP* 基因表达的影响 WSSV的体内人工感染试验结果显示，注射 WSSV 后 24 h之内 *Lv－SP* 基因在试验组和对照组的表达均没有明显变化，但在感染后 48.0 h 和 72.0 h，*Lv－SP* 基因的表达量均有极显著上调趋势（$P<0.01$）（图 5）。由此推测 *Lv－SP* 基因可能在病毒感染晚期参与了应答 WSSV 的免疫防御反应。

3 结论与讨论

在无脊椎动物中，含 clip 结构域的丝氨酸蛋白酶家族成员在胚胎发育和防御反应的信号级联反应中都发挥着重要作用，目前对于丝氨酸蛋白酶在节肢动物中的作用机理报道还比较少。已有研究表明丝氨酸蛋白酶中 clip 结构域都含有 6 个保守的半胱氨酸，可以形成 3 个二硫键，在该研究中，克隆得到的 *Lv－SP* 基因编码的氨基酸具有一个典型的信号肽结构，表明它在胞外执行功能，其氨基端的 clip 结构域含有 6 个保守的半胱氨酸，可以形成 3 个二硫键，预测形成的 3 个二硫键在稳定蛋白结构中可能发挥一定的作用，clip 结构域可能提供了一个用于蛋白酶和其上游激活剂、下游蛋白底物或调节酶活力的辅因子相互作用的位点，使得在局部损伤和感染源的部位可以形成酶复合物。利用在线分析软件 SMART 预测：*Lv－SP* 的 C 端含有的 Tryp－SPc 结构域中，其催化三联体是由 His、Asp 和 Ser 这 3 个氨基酸形成的，该结构域主要执行着消化和催化的功能。该研究获得的 *Lv－SP* 可能属于丝氨酸蛋白酶基因家族中的新成员。将 Lv－SP 蛋白序列在 NCBI 中进行 Blast P 比对，结果发现：该蛋白与其他物种的 SP 蛋白大致有 40% ～80% 的相似度，在虾类中相似度都为 60% 以上，并且均具有较保守的 clip 结构域和 SP 结构域（Tryp－SPc）。之前有研究显示，普通的 SP 家族成员通常仅具有消化的功能，而含有 clip 结构域的 SP 主要参与免疫应答过程。Lv－SP 与其他对虾 SP 和已报道的凡纳滨对虾 Lv－SP2 在氨基酸序列上的差异，表明它们在特征和功能上可能同样存在着显著区别，该研究中的 *Lv－SP* 基因可

能在免疫调控过程中发挥着不可替代的重要作用。



注:*Lv SP*2(凡纳滨对虾 AFW98996. 1);*Fc SP*(中国明对虾,AFW98989. 1);*Es c-SP*(中华绒螯蟹,AKN46053. 1);*Pm c-SP*(斑节对虾,ACP19561. 1);*Ha SP*(端足虫,XP_018023883. 1);*Sp SP*(拟穴青蟹,AUC65357. 1);*Ag SP*(按蚊,AAD38334. 1);*Ad c-SP*(大劣按蚊,ABE97918. 1);*Pt c-SP*(三疣梭子蟹,AFA42362. 1);*Dm SP*(果蝇,XP_017144359. 1);*At SPH*(小蜂窝甲虫,XP_019880096. 1)

Note:*Lv SP*2 (*Litopenaeus vannamei*, AFW98996. 1); *Fc SP* (*Fenneropenaeus chinensis*, AFW98989. 1); *Es c-SP* (*Eriocheir sinensis*, AKN46053. 1); *Pm c-SP* (*Penaeus monodon*, ACP19561. 1); *Ha SP* (*Hyalella azteca*, XP_018023883. 1); *Sp SP* (*Scylla paramamosain*, AUC65357. 1); *Ag SP* (*Anopheles gambiae*, AAD38334. 1); *Ad c-SP* (*Anopheles dirus*, ABE97918. 1); *Pt c-SP* (*Portunus trituberculatus*, AFA42362. 1); *Dm SP* (*Drosophila miranda*, XP_017144359. 1); *At SPH* (*Aethina tumida*, XP_019880096. 1)

图 2　凡纳滨对虾 Lv – SP 与其他物种氨基酸序列多重比对

Fig. 2　Multi-alignment of Lv-SP with other SPs from different species

Lv – SP 基因的组织表达特征分析能为预测其基因功能提供有价值的参考。*Lv – SP* 基因在凡纳滨对虾中具有一定的组织表达特异性,在血细胞和鳃组织中表达量较高,而在心中表达量最低,血细胞和鳃都是重要的免疫器官或组织,鳃在对虾中作为病原微生物的过滤器,是一个非常重要的免疫防御器官,这种器官上明显的表达差异也许暗示着某种功能上的差异,*Lv – SP* 基因在其中的高表达可能与宿主自身的免疫防御作用有关[18-20],组织表达特征也间接表明了其在对虾免疫调控过程中的作用。

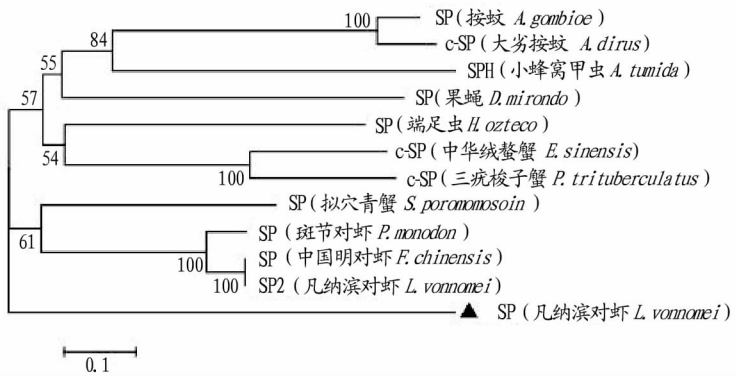


图 3 凡纳滨对虾 Lv－SP 与其他物种 SP 的进化发生分析

Fig. 3 Phelogenetic analysis of the Lv－SP with other SPs from different species

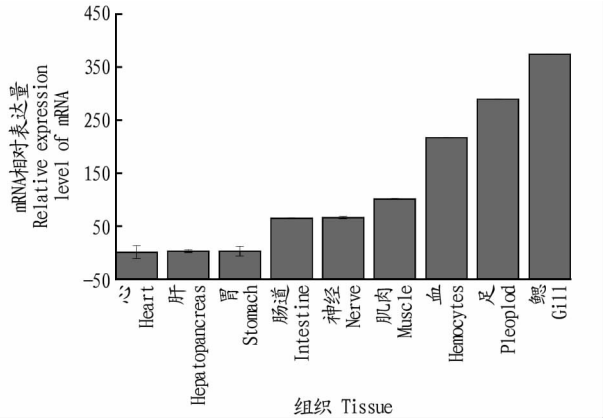


图 4 凡纳滨对虾 *Lv－SP* 基因组织表达分析

Fig. 4 Expression analysis of *Lv－SP* gene in different tissues

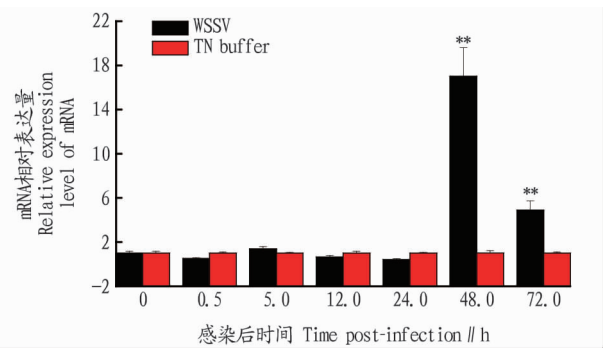


图 5 WSSV 感染后凡纳滨对虾血细胞 *Lv－SP* 基因的相对表达量

Fig. 5 Relative expression of *Lv－SP* gene after WSSV challenge in hemocytes

甲壳动物缺乏获得性免疫系统，只能依靠自身天然免疫系统来抵抗外界各种病原体的入侵。对虾 WSSV 是一种死亡率极高的病毒，实验室条件下人工感染 48.0 h 内就会出现较高的死亡率。探讨对虾关键免疫基因应答 WSSV 侵染的表达变化特征，将有助于研究该基因在抗病毒免疫应答过程中的作用。天津师范大学水生生物学研究室前期转录组分析结果显示 *Lv－SP* 基因具有较灵敏的应答病毒侵染的特征，该研究利用 qPCR 技术，以 WSSV 感染后具有较稳定表达水平的磷酸丙糖异构酶基因（*TPI*）作为内参基因，进一步在凡纳滨对虾活体感染 WSSV 后不同时期精确分析了其血细胞中 *Lv－SP* 基因的表达变化特征。研究结果表明病毒感染的早期和中期，该基因对病原的刺激没有显著应答变化，但在病毒感染晚期（48.0 h 和 72.0 h），*Lv－SP* 呈现极显著上调表达（$P < 0.01$），该基因在对虾血细胞中呈组成型表达，WSSV 可以在一定范围内诱导其转录水平的增强，*Lv－SP* 可能通过上调自身表达，调控其所在的酚氧化酶激活途径，进而参与到作用于病原的防御应答过程。

该研究克隆了凡纳滨对虾血细胞中的 *Lv－SP* 基因，探讨了其序列及保守性特点，分析了其组织分布特征以及应答病毒侵染的表达变化模式。作为一种分布较为广泛的蛋白，它在免疫过程中的诸多应答和级联反应中可能具有重要功能，未来可进一步探讨其精细的调节作用及在进化上的意义。

参考文献

[1] 王兴强，马甡，董双林. 凡纳滨对虾生物学及养殖生态学研究进展[J]. 海洋湖沼通报，2004(4)：94－100.

[2] MURUGASU-OEI B，RODRIGUES V，YANG X，et al. Masquerade：A novel secreted serine protease-like molecule is required for somatic muscle attachment in the *Drosophila* embryo[J]. Genes & development，1995，9(2)：139－154.

[3] IWANAGA S，KAWABATA S，MUTA T. New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph：Their structures and functions[J]. Journal of biochemistry，1998，123(1)：1－15.

[4] 郭慧芝. 中华绒螯蟹 cDNA 文库的构建及免疫相关基因的克隆与表达[D]. 武汉：华中农业大学，2010.

[5] 张智明. 凝血酶的研究进展[J]. 海峡药学，2006，18(6)：1－3.

[6] 陈晓翔，杨程德，顾越英. 纤溶酶功能研究进展[J]. 诊断学理论与实践，2005，4(5)：430－432.

[7] LEE K Y，ZHANG R，KIM M S，et al. A zymogen form of masquerade-like serine proteinase Homologue is cleaved during pro-phenoloxidase activation by Ca^{2+} in coleopteran and *Tenebrio molitor* larvae [J]. European journal of biochemistry，2002，269(17)：4375－4383.

[8] YU X Q，JIANG H B，WANG Y，et al. Nonproteolytic serine proteinase homologs are involved in prophenoloxidase activation in the tobacco hornworm，*Manduca sexta*[J]. Insect biochemistry&molecular biology，2003，33(2)：197－208.

[9] ASGARI S，ZHANG G，ZAREIE R，et al. A serine proteinase homolog venom protein from an endoparasitoid wasp inhibits melanization of the host hemolymph[J]. Insect biochemistry and molecular biology，2003，33(10)：1017－1024.

[10] KAWABATA S，TOKUNAGA F，KUGI Y，et al. Limulus factor D，a 43-kDa protein isolated from horseshoe crab hemocytes，is a serine protease homologue with antimicrobial activity[J]. FEBS Letters，1996，398(2/3)：146－150.

（下转第 181 页）

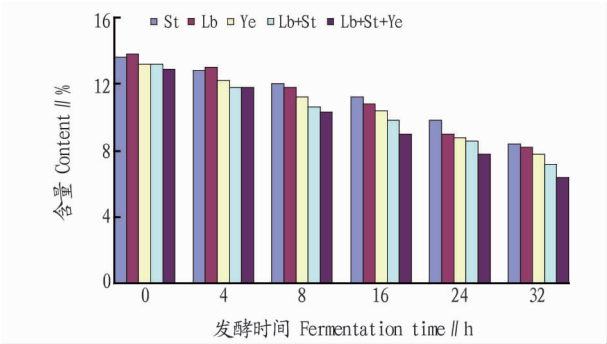


图 4　普洱茶发酵过程中糖的变化

Fig. 4　Change of sugar during the Pu'er Tea fermentation

检测不到,到贮藏后期(180 d)可检测出 2 个/mL。从微生物总体数量的变化情况可分析得出,茶饮料的保质期可达到 180 d 左右。

表 6　不同贮藏期饮料中微生物的检测结果

Table 6　Results of microbiological detection under different storing periods

贮藏时间 Storage time // d	细菌总数 Total number of bacteria 个/mL	霉菌总数 Total number of moulds 个/mL	大肠菌群数 Number of coliform groups 个/mL
0	2	0	0
30	8	6	0
60	29	12	0
90	51	20	0
120	81	28	1
180	98	30	2

2.7　饮料的质量标准评价

2.7.1　感官评价。发酵型普洱茶饮料的色泽红褐色,油状,明亮度好,醇厚滑爽、酸甜适中,具醇香和茶香、无异味,无分层、无褐变现象。

2.7.2　理化指标。发酵型普洱茶饮料茶多酚含量约 584.0 mg/L,可溶性糖含量 228.0 mg/L,氨基酸含量 152.0 mg/L。

2.7.3　卫生指标。发酵型普洱茶饮料细菌总数≤62 个/mL,大肠杆菌≤2 个/mL,致病菌未检出。

3　结论

通过该试验得到了乳酸菌和酵母菌共生发酵制作发酵型普洱茶饮料的最佳工艺条件:浸提 pH 5.5 ~ 6.0,茶水比 1∶80,浸提温度 90 ℃,浸提时间 15 min;Lb 和 St 按 1∶1接入,接种量 4%,38 ℃下发酵 8 h 后接入 0.2% 酵母菌,28 ℃下发酵 24 h;调配 pH 4.5,蜂蜜添加量为 4%;温度 135 ℃,5 min 瞬时灭菌。该加工工艺较为简单,生产成本较低,制作的茶饮料不仅能保持普洱茶的本质特征,还具有发酵型饮料的品质特点,是一类新型的保健功能性饮料,有一定的市场前景。

参考文献

[1] 柏雪宇. 论我国茶饮料市场现状及发展策略[J]. 福建茶叶,2016(3):40-41.
[2] 陈锋. 茶饮料的市场现状及发展前景[J]. 福建茶叶,2015,37(5):25-27.
[3] 李静,王安建,刘丽娜,等. 植物乳杆菌发酵法制取香菇柄膳食纤维的研究[J]. 保鲜与加工,2017,17(2):83-88.
[4] 刘文丽,张兰威,JOHN SHI,等. 乳酸菌细菌素纯化技术的检测及研究进展[J]. 食品工业科技,2012,33(22):414-418.
[5] 杜静芳,缪璐欢,白凤翎,等. 乳酸菌素分离纯化和特性及在食品领域的应用研究进展[J]. 食品工业科技,2016,37(10):391-395,400.
[6] 赵福利,钟葵,佟立涛,等. 燕麦发酵饮料乳酸菌菌种的筛选[J]. 现代食品科技,2015,31(11):263-270.
[7] 鲁明,付欣,王小鹤,等. 响应面法优化乳酸菌发酵黑米饮料工艺研究[J]. 保鲜与加工,2016,16(6):54-60.
[8] 汪开拓. 食品化学实验指导[M]. 长沙:中南大学出版社,2016:41.
[9] 何照范,张迪清. 保健食品化学及其检测技术[M]. 北京:中国轻工业出版社,1998:107,141.
[10] 张英. 食品理化与微生物检测实验[M]. 北京:中国轻工业出版社,2004:248-252.
[11] 张正竹. 茶叶生物化学实验教程[M]. 北京:中国农业出版社,2016:35-39,42-48,79-90.

(上接第 106 页)

[11] JOHANSSON M W,KEYSER P,SRITUNYALUCKSANA K,et al. Crustacean haemocytes and haematopoiesis[J]. Aquaculture,2000,191(1):45-52.
[12] LEE S Y,SÖDERHÄLL K. Characterization of a pattern recognition protein,a masquerade-like protein,in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*[J]. Journal of immunology,2001,166(12):7319-7326.
[13] KWON T H,KIM M S,CHOI H W,et al. A masquerade-like serine proteinase homologue is necessary for phenoloxidase activity in the coleopteran insect,*Holotrichia diomphalia* larvae [J]. FEBS Journal,2000,267(20):6188-6196.
[14] HOLMSKOV U,THIEL S,JENSENIUS J C. Collectins and ficolins:Humoral lectins of the innate immune defense [J]. Annual review of immunology,2003,21(1):547-578.
[15] PRESANIS J S,KOJIMA M,SIM R B. Biochemistry and genetics of mannan-binding lectin (MBL) [J]. Biochemical society transactions,2003,31(4):748-752.
[16] PENG M X,NIU D H,WANG F,et al. Complement *C3* gene:Expression characterization and innate immune response in razor clam *Sinonovacula constricta*[J]. Fish & shellfish immunology,2016,55:223-232.
[17] MEGYERI M,JANI P K,KAJDÁCSI E,et al. Serum MASP-1 in complex with MBL activates endothelial cells [J]. Molecular immunology,2014,59(1):39-45.
[18] SRIPHAIJIT T,FLEGEL T W,SENAPIN S. Characterization of a shrimp serine protease homolog,a binding protein of yellow head virus[J]. Developmental & comparative immunology,2007,31(11):1145-1158.
[19] NICHOLL S M,ROZTOCIL E,DAVIES M G. Urokinase-induced smooth muscle cell responses require distinct signaling pathways:A role for the epidermal growth factor receptor [J]. Journal of vascular surgery,2005,41(4):672-681.
[20] LI X C,ZHU L,LI L G,et al. A novel myeloid differentiation factor 88 homolog,*Sp*MyD88,exhibiting *Sp* Toll-binding activity in the mud crab *Scylla paramamosain* [J]. Developmental & comparative immunology,2013,39(4):313-322.

本刊提示　参考文献只列主要的、公开发表的文献,序号按文中出现先后编排。著录格式(含标点)如下:(1)期刊——作者(不超过 3 人者全部写出,超过者只写前 3 位,后加"等"). 文章题名[J]. 期刊名,年份,卷(期):起止页码. (2)图书——编著者. 书名[M]. 版次(第一版不写). 出版地:出版者,出版年:起止页码. (3)论文集——析出文献作者. 题名[C]//. 主编. 论文集名. 出版地:出版者,出版年:起止页码。