

不同储存、加工条件下辣木籽抗菌肽的抑菌稳定性

宋贤娟,鲁媛媛,王雪峰,和 丽,范江平,黄艾祥,田 洋

(云南农业大学 食品科学技术学院,昆明 650201)

摘要:旨在为辣木籽抗菌肽的储存、加工提供参考,以实验室前期筛选的具有较好抑制金黄色葡萄球菌生长的辣木籽肽 F2 和 F3 为原料,测定其在不同储存、加工条件下的相对抑菌率,分析抑菌稳定性。结果表明:低温储存有利于辣木籽抗菌肽 F2 和 F3 抑菌活性的保留,且储存温度为 -20°C 时,其抑菌活性受储存时间影响较小;F2、F3 随 pH 增大相对抑菌率先升高后降低,F2、F3 适宜的 pH 分别为 6 和 8;加工温度、超声波功率升高,F2、F3 相对抑菌率降低;相比于 Na^+ 和 K^+ , Mg^{2+} 对 F2、F3 相对抑菌率的降低作用更大。实际加工和储存过程中应选择合适的条件,以保证辣木籽抗菌肽抑菌活性的保留。

关键词:辣木籽抗菌肽;抑菌活性;储存条件;加工条件;稳定性

中图分类号:TS202.1;TS201.2 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2023)05-0026-04

Antimicrobial stability of *Moringa oleifera* seed antimicrobial peptides under different storage and processing conditions

SONG Xianjuan, LU Yuanyuan, WANG Xuefeng, HE Li,
FAN Jiangping, HUANG Aixiang, TIAN Yang

(College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: In order to provide reference for the storage and processing of antimicrobial peptides from *Moringa oleifera* seeds, the *Moringa oleifera* seed peptide F2 and F3 with good anti-*Staphylococcus aureus* activity screened in the laboratory were used as raw materials to determine their relative bacterial inhibition rates under different storage and processing conditions and to analyze antimicrobial stability. The results showed that low temperature storage was beneficial to the retention of antimicrobial activity of F2, F3, and the antimicrobial activity was less affected by the storage time when the storage temperature was -20°C . The relative bacterial inhibition rate of F2 and F3 increased and then decreased with the increase of pH, and the suitable pH of F2 and F3 were 6 and 8, respectively. The relative bacterial inhibition rate of F2 and F3 decreased with the increase of processing temperature and ultrasonic power. Compared with Na^+ and K^+ , Mg^{2+} had a greater effect on reducing the relative bacterial inhibition rate of F2 and F3. The suitable conditions should be selected during actual processing and storage to ensure the retention of the antimicrobial activity of *Moringa oleifera* seeds antimicrobial peptide.

Key words: *Moringa oleifera* seed antimicrobial peptide; antimicrobial activity; storage condition; processing condition; stability

收稿日期:2021-12-30;修回日期:2023-01-29

基金项目:国家自然科学基金地区项目(31960462);云南省基础研究计划面上项目(2019FB052);云南省农业联合专项(2018FG001-040)

作者简介:宋贤娟(1999),女,硕士研究生,研究方向为食品加工与安全(E-mail)2867384336@qq.com。

通信作者:王雪峰,副教授,博士(E-mail)364135728@qq.com。

辣木,为辣木科辣木属多年生热带、亚热带落叶乔木,在我国台湾、海南、云南等地均有种植,其中云南种植面积达到全国的70%,是云南优势特色植物资源^[1-2]。辣木籽是辣木树的种子,其作为高蛋白植物资源(辣木籽粉中蛋白质含量高达37%)^[3]引起了国内外研究人员的关注。随着研究的深入,近年来发现通过酶解将辣木籽蛋白水解制备的小分子

肽,具有抗氧化^[4]、抑菌^[5]、降压^[6]等功效。目前,对辣木籽抗菌肽的研究主要集中在辣木籽抗菌肽的制备及其抑菌效果^[4-6],而对辣木籽抗菌肽抑菌稳定性的研究较少。

抗菌肽又称抗微生物肽,是一类具有广谱抑菌活性的小分子短肽^[7],具有广谱的抑菌、抗病毒、抗生物膜以及免疫调控等功能^[8-9]。目前已制备多种动植物源抗菌肽^[10-12],由于其特殊的抑菌功能可被应用于农业、医药业与食品业。但由于抗菌肽特殊的氨基酸组成和结构,其在储存、加工过程中受温度、pH、超声波以及金属离子作用,可能会发生聚集或者降解从而降低甚至丧失抑菌活性^[13],因此抗菌肽的储存、加工稳定性成为其在食品加工、保鲜以及防腐中应用的技术瓶颈^[14]。

金黄色葡萄球菌是一种具有多种毒力因子的革兰氏阳性食源性致病菌,在乳品、水产品、肉类等食品中较常见^[15],严重危害人体健康。在实验室前期筛选出两种能有效抑制金黄色葡萄球菌生长的辣木籽抗菌肽 F2、F3 基础上,本文对这两种辣木籽抗菌肽在储存、加工过程中的抑菌活性变化进行研究,考察其抑菌稳定性,以期辣木籽抗菌肽的后续开发利用提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

辣木籽抗菌肽 F2、F3 粉末,纯度大于 95%,对金黄色葡萄球菌的抑菌率分别为 74.00%、79.60%,实验室自制。LB 肉汤,广东环凯微生物科技有限公司;磷酸盐(PBS)缓冲液,赛默飞世尔科技有限公司。

Multiskan Go 酶联免疫检测仪,Thermo Scientific 公司;Merck Millipore 超滤杯;HWS24 电热恒温水浴锅;Mini 10 k 迷你离心机;DHP-600 电热恒温培养箱;LDZM-60KCS 立式压力蒸汽灭菌锅;STARTER3100 pH 计;EPED-ESL-10TH 纯水器;DW-HL398S 超低温冰箱。

1.2 实验方法

1.2.1 金黄色葡萄球菌活化

配制 120 mL LB 肉汤培养基进行灭菌处理后,接入 1 mL 金黄色葡萄球菌,于 37℃ (120 r/min) 摇床培养 14 h 后,于 10 000 r/min 离心 3 min,收集菌体,用 PBS 缓冲液洗涤 3 次后将菌体稀释至 10⁶ CFU/mL,制成待测菌液,保存于 4℃ 冰箱备用。

1.2.2 不同储存条件下辣木籽抗菌肽的抑菌活性分析

1.2.2.1 储存温度

参考肖建辉^[16]的方法并作一定修改。将辣木籽抗菌肽加无菌水配制成 10 mg/mL 的抗菌肽溶液(现用现配),取 3 份抗菌肽溶液分别于 -20、4℃ 以

及室温(25℃)下放置 4 h 后,分别取 50 μL 与 190 μL LB 肉汤和 10 μL 待测菌液加入 96 孔板混匀,于 37℃ 恒温培养箱中培养 12 h,用酶联免疫检测仪测定其在 600 nm 处吸光值,其中以无菌水代替抗菌肽溶液作为空白对照,不加菌液的作为实验对照。按下式计算辣木籽抗菌肽的相对抑菌率(x_1)。

$$x_1 = (A_0 - A_1) / (A_0 - A_2) \times 100\% \quad (1)$$

式中: A_0 、 A_1 、 A_2 分别为空白对照组、实验组和实验对照组在 600 nm 处的吸光值。

1.2.2.2 储存时间

取一定量辣木籽抗菌肽于 -20℃ 分别储存 7、14、21、28 d,加无菌水复溶。取 50 μL 复溶后的辣木籽抗菌肽溶液与 190 μL LB 肉汤和 10 μL 待测菌液加入 96 孔板混匀,再按照 1.2.2.1 方法测定不同储存时间的辣木籽抗菌肽的相对抑菌率。

1.2.3 不同加工条件下辣木籽抗菌肽的抑菌活性分析

1.2.3.1 pH

将辣木籽抗菌肽加无菌水配制成 10 mg/mL 的抗菌肽溶液(现用现配),参考杨叶梅等^[17]的方法测定初始 pH,再分别用浓度为 1 mol/L 的 NaOH 和 HCl 调节辣木籽抗菌肽溶液的 pH 为 2、4、6、8、10、12,处理 4 h 后调回中性,分别取 50 μL 上述溶液与 190 μL LB 肉汤培养基和 10 μL 待测菌液加入 96 孔板混匀,再按照 1.2.2.1 方法测定不同 pH 下辣木籽抗菌肽的相对抑菌率。其中以初始 pH 下抗菌肽溶液作为实验对照,无菌水作为空白对照。

1.2.3.2 加工温度

将辣木籽抗菌肽加无菌水配制成 10 mg/mL 的抗菌肽溶液(现用现配),分别于 40、60、80℃ 及 90℃ 水浴加热 30 min 后冷却至室温,分别取 50 μL 上述溶液与 190 μL LB 肉汤和 10 μL 待测菌液加入 96 孔板混匀,再按照 1.2.2.1 方法测定不同加工温度下辣木籽抗菌肽的相对抑菌率。其中以无菌水作为空白对照,未热处理的抗菌肽溶液作为实验对照。

1.2.3.3 金属离子

将辣木籽抗菌肽加无菌水配制成 10 mg/mL 的抗菌肽溶液(现用现配),再配制 0.05 mol/L 的 NaCl、KCl、MgSO₄、MgCl₂ 的金属离子溶液,加入等体积的辣木籽抗菌肽溶液,室温静置 2 h,分别取 50 μL 上述溶液与 190 μL LB 肉汤和 10 μL 待测菌液加入 96 孔板混匀,再按照 1.2.2.1 方法测定不同金属离子处理下辣木籽抗菌肽的相对抑菌率。其中以无菌水作为空白对照,未加入金属离子的抗菌肽溶液作为实验对照。

1.2.3.4 超声波功率

将辣木籽抗菌肽加无菌水配制成 10 mg/mL 的抗菌肽溶液(现用现配),用超声萃取仪分别在 150、250、350、450 W 的功率下处理 2 h,分别取 50 μ L 上述溶液与 190 μ L LB 肉汤和 10 μ L 待测菌液加入 96 孔板混匀,再按照 1.2.2.1 方法测定不同超声波功率下辣木籽抗菌肽的相对抑菌率。其中以无菌水作为空白对照,未被超声波处理的抗菌肽溶液作为实验对照。

1.2.4 数据统计与分析

所有实验均重复 3 次,利用 Microsoft Office Excel 2019 进行数据收集整理,采用 IBM SPSS Statistics 25 对数据进行统计学分析,采用 Origin 2018 作图。

2 结果与分析

2.1 不同储存条件下的抑菌稳定性

2.1.1 不同储存温度下的抑菌活性(见图 1)

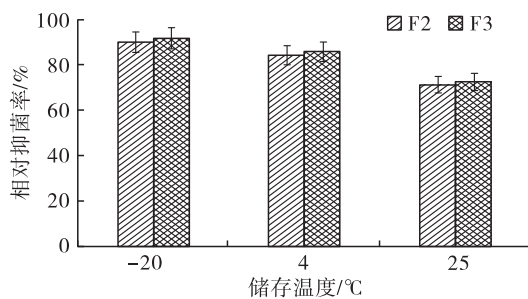


图 1 不同储存温度下的抑菌活性

由图 1 可知,F2、F3 的相对抑菌率均随储存温度的升高而逐渐降低。F2、F3 在 -20°C 储存 4 h,其相对抑菌率分别达到 89.91% 和 91.54%,说明辣木籽抗菌肽适于低温条件下储存。

2.1.2 不同储存时间下的抑菌活性(见图 2)

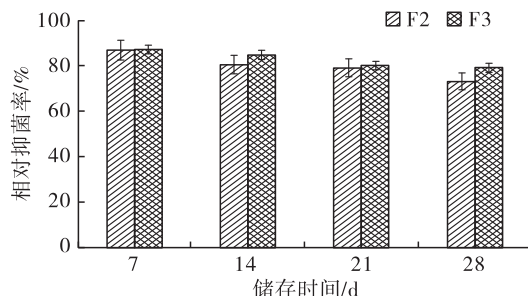


图 2 不同储存时间下的抑菌活性

由图 2 可知,随着储存时间的延长,F2、F3 相对抑菌率缓慢降低。F2 和 F3 在 -20°C 储存 7 d 时,其相对抑菌率最高,分别为 86.70%、87.04%,储存 28 d 时二者的相对抑菌率分别降至 73.03% 和 78.99%,仍然呈现较好的抑菌效果,说明 F2 和 F3

在 -20°C 都具有良好的储存稳定性。

2.2 不同加工条件下的抑菌稳定性

2.2.1 不同 pH 下的抑菌活性(见图 3)

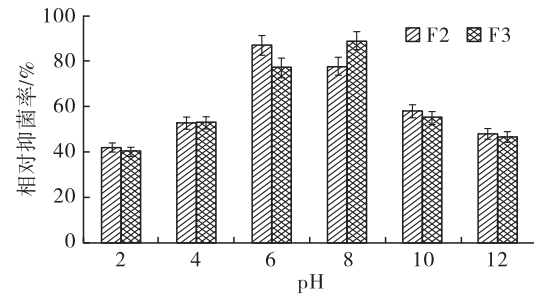


图 3 不同 pH 下的抑菌活性

由图 3 可知,随 pH 的升高,F2、F3 的相对抑菌率呈先升高后降低的趋势,当 pH 为 6 时,F2 的相对抑菌率最高,为 87.22%,当 pH 为 8 时,F3 的相对抑菌率最高,为 88.86%,说明 pH 对 F2 和 F3 的抑菌稳定性影响较大,且 F2 的最适加工 pH 为 6,F3 的最适加工 pH 为 8。

2.2.2 不同加工温度下的抑菌活性(见图 4)

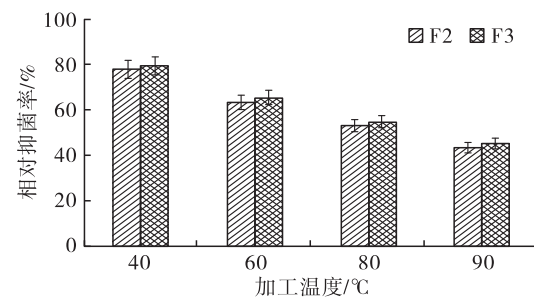


图 4 不同加工温度下的抑菌活性

由图 4 可知,随加工温度的升高,F2、F3 的相对抑菌率逐渐降低,这可能与高温破坏了多肽分子结构有关^[18]。在加工温度为 40°C 时,F2、F3 相对抑菌率均最高,分别为 77.82%、79.35%,在加工温度为 90°C 时,其相对抑菌率分别仅为 43.37%、45.18%,二者相对抑菌率较 40°C 时均下降 40% 以上,说明 F2、F3 均不适宜在高温条件下加工。

2.2.3 不同金属离子下的抑菌活性(见图 5)

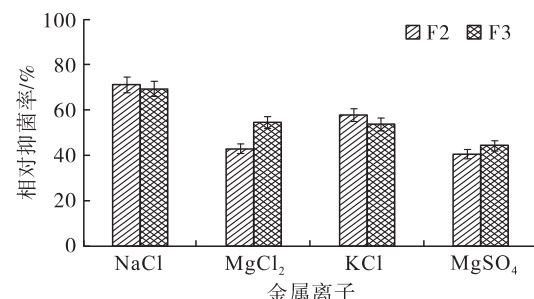


图 5 不同金属离子下的抑菌活性

由图 5 可知,F2 和 F3 总体对 Na^+ 和 K^+ 的耐受性较强,对 Mg^{2+} 的耐受性较弱。F2 在 NaCl 和 KCl

处理下相对抑菌率分别为 71.24% 和 58.02%，在 $MgCl_2$ 和 $MgSO_4$ 处理下相对抑菌率仅为 43.04% 和 40.68%。F3 在 NaCl 和 KCl 处理下相对抑菌率分别为 69.44% 和 54.03%，在 $MgCl_2$ 和 $MgSO_4$ 处理下相对抑菌率分别为 54.56% 和 44.43%。结果表明，F2 和 F3 在生产加工过程可以与 Na^+ 和 K^+ 同时加工处理，但应避免与 Mg^{2+} 同时加工处理。

2.2.4 不同超声波功率下的抑菌活性(见图6)

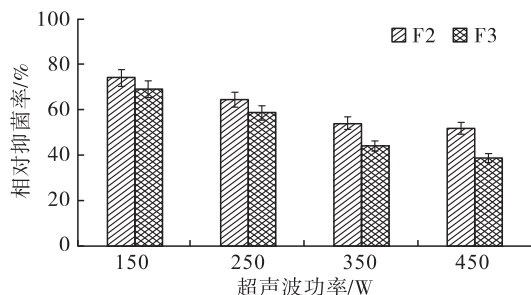


图6 不同超声波功率下的抑菌活性

由图6可知，F2、F3的相对抑菌率随超声波功率的增大而逐渐降低，分别从超声波功率为150W时的73.88%、68.94%降至超声波功率为450W时的51.56%、38.68%，相对抑菌率分别降低30.21%、43.89%，说明F3对超声波的稳定性低于F2，这可能是因为超声波对F3的细胞结构影响较大。

3 结论

通过研究辣木籽抗菌肽F2、F3在不同储存、加工条件下相对抑菌率的变化，考察其抑菌稳定性，结果表明：低温储存有利于辣木籽抗菌肽F2、F3抑菌活性的保留，且在-20℃储存时相对抑菌率受储存时间影响较小；加工过程中F2适宜的pH为6，F3适宜的pH为8，加工温度过高不利于F2、F3抑菌效果发挥，F2、F3抑菌效果受 Na^+ 和 K^+ 的影响较小，应避免与 Mg^{2+} 同时进行加工，超声波功率越高越不利于F2、F3抑菌效果的发挥。因此，辣木籽抗菌肽F2、F3在储存及加工过程中应选择合适的条件，以保证其抑菌活性稳定，确保其在产品中抑菌效果的最大发挥。

参考文献：

[1] 涂行浩,杜丽清,魏芳,等.我国7种典型热带木本油料加工研究现状[J].热带农业科学,2019,39(4):114-122.
 [2] KOU X, LI B, OLAYANJU J B, et al. Nutraceutical or pharmacological potential of *Moringa oleifera* Lam[J/OL]. *Nutrients*, 2018, 10(3):343 [2021-12-30]. <https://doi.org/10.3390/nu10030343>.

[3] 唐诗琦,刘小玲,林莹,等.响应面法优化辣木籽蛋白质提取工艺的研究[J].粮食与饲料工业,2020(2):34-41.
 [4] 郭其洪,李兴丽,范江平,等.辣木籽抗氧化肽的分离鉴定及其稳定性分析[J].食品工业科技,2022,43(5):41-47.
 [5] 王雪峰,陈越,赵琼,等.响应面试验优化酶法制备辣木籽多肽工艺及其抑菌活性分析[J].现代食品科技,2019,35(1):173-181,214.
 [6] 钟玉旺,徐万莉,范尧珠,等.辣木籽ACE抑制肽的分离纯化、结构鉴定及其体外活性评价[J/OL].食品科学:1-13 [2023-01-28]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20221207.1518.008.html>.
 [7] MAHLAPUU M H, KANSSON J, RINGSTAD L, et al. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents[J/OL]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2016(6):194 [2021-12-30]. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00194>.
 [8] UMNIAKOVA E S, ZHARKOVA M S, BERLOV M N, et al. Human antimicrobial peptides in autoimmunity[J]. *Autoimmunity*, 2020,53(3):137-147.
 [9] 时志琪,连凯琪,林正丹,等.抗菌肽杀菌效果、机制研究方法进展[J].中国畜禽种业,2020,16(11):52-53.
 [10] 李远慧,郑霖波,谢超,等.带鱼蛋白抗菌肽抑菌效果的影响因素[J].食品研究与开发,2022,43(20):66-72.
 [11] 朱薪,康山明,张天雄,等.青刺果抗菌肽组分的分离筛选及其稳定性分析[C]//中国食品科学技术学会第十九届年会论文摘要集.北京:中国食品科学技术学会,2022.
 [12] 王丽芳,叶良,谢忠稳,等.茶叶抗菌肽粗提物的抑菌活性及其对冷却肉保鲜的影响[J].浙江农业学报,2022,34(10):2268-2276.
 [13] 陈晨.抗菌肽生物活性及其影响因素[J].化工设计通讯,2020,46(8):1,53.
 [14] 陈亮,秦素雅,衡军影.微生物抗菌肽在食品工业中的应用研究进展[J].河南工业大学学报(自然科学版),2018,39(5):119-126.
 [15] KAWADA - MATSUO M, LE M N T, KOMATSUZAWA H. Antibacterial peptides resistance in *Staphylococcus aureus*: various mechanisms and the association with pathogenicity[J/OL]. *Genes (Basel)*, 2021, 12: 1527 [2021-12-30]. <https://doi.org/10.3390/genes12101527>.
 [16] 肖建辉.麻疯树籽粕脱毒及其抗菌肽细胞膜色谱制备法和抗菌机理的研究[D].江苏无锡:江南大学,2012.
 [17] 杨叶梅,刘志云,曾兵,等.辣椒籽抗菌肽的抑菌活性及其稳定性研究[J].动物营养学报,2019,31(9):4322-4330.
 [18] 张炜,杭柏林,司素锦,等.抗菌肽BSN-37的抑菌活性及其稳定性分析[J].中国畜牧兽医,2019,46(1):287-295.