

响应面试验优化复合酶法制备青刺果抗菌肽的工艺研究

和 丽,熊海涛,王雪峰,赵 琼,施娅楠,黄艾祥,田 洋

(云南农业大学 食品科学技术学院,昆明 650201)

摘要:以青刺果脱脂粕为原料,利用复合酶法制备抗菌肽。筛选了最佳的复配水解酶种类及添加比例,在单因素实验的基础上,以青刺果蛋白酶解物对金黄色葡萄球菌的抑制率为响应值,利用响应面分析法优化制备青刺果蛋白酶解物的工艺条件。结果表明,最佳工艺条件为采用复合蛋白酶与木瓜蛋白酶以2:1进行复配、酶添加量4.5%、酶解温度60℃、料液比1:35、pH 6.9、酶解时间4.7 h,该条件下青刺果蛋白水解度为23.92%,青刺果蛋白酶解物的抑菌率为31.62%。该研究为后续青刺果抗菌肽的分离鉴定及应用提供参考,对青刺果副产物的综合利用具有重要意义。

关键词:青刺果;抗菌肽;复配酶解;响应面试验;抑菌率

中图分类号:TS229;TQ936.2 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2021)06-0033-05

Optimization of preparation of antimicrobial peptides from *Prinsepia utilis* Royle by compound enzymes using response surface methodology

HE Li, XIONG Haitao, WANG Xuefeng, ZHAO Qiong,
SHI Yanan, HUANG Aixiang, TIAN Yang

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

Abstract: The antimicrobial peptide was prepared from defatted *Prinsepia utilis* Royle meal by compound enzyme method. The best compound hydrolase types and ratio were screened. Based on single factor experiment, taking the inhibition rate of the hydrolysate of *Prinsepia utilis* Royle protein against *Staphylococcus aureus* as the response value, the enzymatic preparation process of hydrolysate of *Prinsepia utilis* Royle protein was optimized using response surface methodology. The results showed that the optimal process conditions were obtained as follows: compound protease and papain mixed in a ratio of 2:1, enzyme addition amount 4.5%, enzymolysis temperature 60℃, material-liquid ratio 1:35, pH 6.9, and enzymolysis time 4.7 h. Under these conditions, the hydrolysis degree of the *Prinsepia utilis* Royle protein was 23.92%, and the antibacterial rate of the hydrolysate of *Prinsepia utilis* Royle protein was 31.62%. The study provided a reference for the subsequent separation, identification and application of antimicrobial peptides from *Prinsepia utilis* Royle, and was of great significance to the comprehensive utilization of the by-products of *Prinsepia utilis* Royle.

Key words: *Prinsepia utilis* Royle; antimicrobial peptide; compound enzymatic hydrolysis; response surface methodology; antibacterial rate

收稿日期:2020-08-12;修回日期:2021-03-02

基金项目:国家自然科学基金地区科学基金项目(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);田洋丽江专家工作站项目

作者简介:和 丽(1995),女(藏族),在读硕士,研究方向为食品加工与安全(E-mail)18288842687@qq.com。

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

青刺果(*Prinsepia utilis* Royle)属蔷薇科,是一种食药两用的油料植物,分布于云南、贵州等地^[1]。云南丽江、大理等地的人们将青刺果油作为护肤品已有很长的历史^[2]。青刺果中含有酚类、黄酮类、粗脂肪、粗蛋白质、粗纤维等营养物质^[3-4]。张瑞琳

等^[5]研究表明,青刺果果实中蛋白质含量高达46.97%,是优良的植物蛋白资源。目前对于青刺果的开发集中于油脂^[6]、黄酮^[7-8]等的研究,对青刺果蛋白的研究鲜有报道。

近年来抗生素的耐药性已成为人们关注的热点问题,亟待解决^[9]。抗菌肽(AMPs)是由氨基酸组成的多肽类物质,对细菌、真菌具有高效、广谱的抗菌活性^[10],是一种天然抗菌剂,具有较好的抑菌效果且不产生抗药性^[11]。为了更全面地开发青刺果资源,更深入地利用青刺果蛋白,发挥其最大的生物利用价值,本文以青刺果脱脂粕为原料,通过单因素试验和响应面试验优化青刺果抗菌肽的复合酶法制备工艺,以期获得最佳的工艺参数,为青刺果抗菌肽的分离和后续加工利用提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

青刺果脱脂粕,购自香格里拉碧罗雪山生物科技有限公司;PBS缓冲液、LB培养基,购自广东环凯微生物科技有限公司;胃蛋白酶(10 000 U/g)、木瓜蛋白酶(800 U/g)、胰蛋白酶(250 SPU/mg)、碱性蛋白酶(200 U/mg)、复合蛋白酶(120 U/mg),购自上海源叶生物科技有限公司;氯化钠、氢氧化钠、盐酸等均为分析纯;金黄色葡萄球菌,由云南农业大学食品科学技术学院微生物实验室提供。

Thermo Scientific Multiskan FC型酶标仪,LDZX-50KBS型高压蒸汽灭菌锅,JC-SY型电热恒温水浴锅,PHS-3型pH计,752N型紫外分光光度计,Scientz-18N型真空冷冻干燥机,TG16-WS型高速冷冻离心机。

1.2 实验方法

1.2.1 青刺果蛋白的提取

参照王雪峰等^[12]辣木籽蛋白的提取方法并进行适当修改。取100 g粉碎的青刺果脱脂粕,加1 L 0.3 mol/mL的NaCl溶液,调节pH至7.15,30℃水浴搅拌30 min后抽滤,40℃水浴蒸发浓缩至原体积的1/3,-80℃冻结,真空冷冻干燥后收集样品,放入-20℃冰箱备用。

1.2.2 青刺果多肽的制备工艺

参考王雪峰等^[12]的方法,并做一定的修改。青刺果蛋白粉→添加酶并加水溶解(筛选酶添加量和料液比)→匀浆5 min→水浴酶解(筛选最佳pH、酶解时间、酶解温度)→95℃水浴灭酶10 min→离心(4 000 r/min,20 min)→取上清液于45℃旋转蒸发浓缩→透析24 h(截留相对分子质量为100 u)→真

空冷冻干燥→酶解物冻干粉。

1.2.3 酶解液中总蛋白质含量测定

参照王雪峰等^[12]的研究。取1 mL酶解上清液于10 mL试管中,加入5.00 mL 0.01%考马斯亮蓝G-250染液,空白组用蒸馏水代替酶解上清液,混匀后室温静置5 min,用酶标仪在595 nm波长下测定酶解液的吸光值。以牛血清白蛋白为标准品绘制标准曲线,得到以吸光值为纵坐标,牛血清白蛋白质量浓度为横坐标的标准曲线方程 $y = 0.129 1x - 0.004 6$, $R^2 = 0.992 7$ 。根据标准曲线方程计算酶解液中总蛋白质含量。

1.2.4 蛋白质水解度的测定

蛋白质水解度为酶解液中氨基酸态氮含量与酶解液中总蛋白质含量的比值^[13]。

氨基酸态氮含量的测定参照GB/T 5009.39—2003进行。

1.2.5 复合酶酶解物抑菌率测定

参考唐文婷^[14]的方法考察酶解物的抑菌活性。取培养至对数生长期的金黄色葡萄球菌,用PBS缓冲液(10 mmol/L,pH 7.4)洗涤并重悬至 10^6 CFU/mL。将青刺果蛋白酶解液(2 mg/mL)加入到等体积的受试菌悬液中,37℃恒温培养12 h,用酶标仪测定600 nm波长下的吸光值,按下式计算抑菌率^[15]。

$$Y = (A_0 - A) / A_0 \quad (1)$$

式中:Y为抑菌率; A_0 和A分别为空白和样品在600 nm处的吸光值。

1.2.6 数据分析

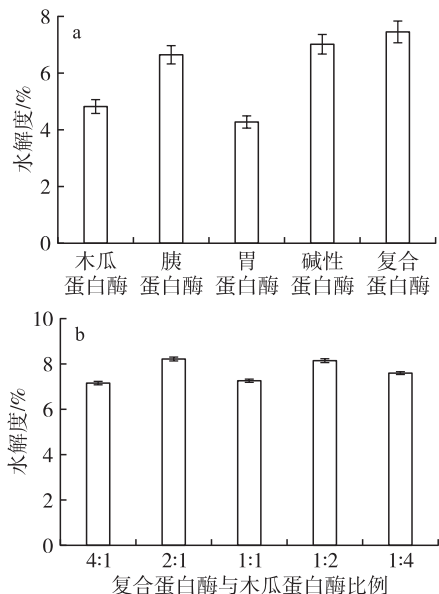
实验至少进行3次,各项指标均为3次平行。采用Excel 2010进行数据统计,IBM SPSS Statistics 25和Design-Expert 8.0.6对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 最适蛋白酶种类及添加比例的筛选

固定酶添加量为3.5%,料液比为1:10,5种酶在适宜的酶解条件下分别酶解青刺果蛋白3.5 h,考察不同蛋白酶对青刺果蛋白水解度的影响,筛选水解效果较佳的两种蛋白酶,并以不同比例复配使用,考察其对青刺果蛋白的水解效果。结果如图1所示。

由图1a可知,5种酶对青刺果蛋白的水解效果依次为复合蛋白酶>碱性蛋白酶>胰蛋白酶>木瓜蛋白酶>胃蛋白酶。综合考虑酶复配时最佳pH的范围,选择复合蛋白酶和木瓜蛋白酶作为最佳复配酶。由图1b可知,当复合酶与木瓜蛋白酶的比例为2:1时,水解效果最佳,水解度为8.23%。



注:胃蛋白酶. 酶解温度 38℃, pH 2;木瓜蛋白酶. 酶解温度 55~60℃, pH 5~7;胰蛋白酶. 酶解温度 37℃, pH 7.5;碱性蛋白酶. 酶解温度 45℃, pH 9;复合蛋白酶. 酶解温度 50~60℃, pH 5.5~7.5。

图1 不同酶种类及比例对青刺果蛋白水解效果的影响

2.2 单因素实验

2.2.1 酶添加量对青刺果蛋白水解度与酶解物抑菌率的影响

在料液比 1:10、pH 6、酶解温度 50℃、酶解时间 3.5 h 的条件下,考察不同酶添加量对青刺果蛋白水解度和酶解物抑菌率的影响,结果见图 2。

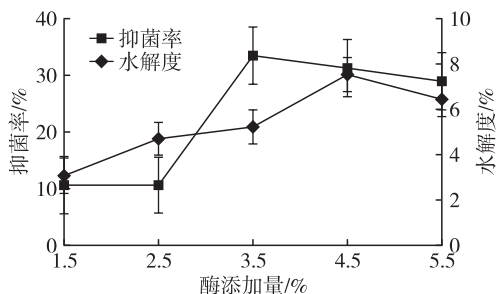


图2 酶添加量对青刺果蛋白水解度及酶解物抑菌率的影响

由图 2 可知,青刺果蛋白水解度和酶解物抑菌率均随着酶添加量的增加呈先升后降的趋势。随着酶添加量的增加,提高了酶与底物的接触概率,促进了底物的水解进程^[16]。酶添加量为 4.5% 时青刺果蛋白的水解度达到最大,而酶添加量为 3.5% 时,青刺果蛋白酶解物对金黄色葡萄球菌的抑制效果达到最大。此时酶解物中可能已含有较多具有抑菌活性的多肽分子。当酶添加量继续升高时,抑菌率下降,可能的原因是多肽进一步水解成小分子短肽或游离氨基酸^[17]。综合考虑,选取 4.5% 为最佳酶添加量。

2.2.2 酶解时间对青刺果蛋白水解度与酶解物抑菌率的影响

在料液比 1:10、pH 6、酶添加量 4.5%、酶解温度 50℃ 的条件下,考察不同酶解时间对青刺果蛋白水解度和酶解物抑菌率的影响,结果见图 3。

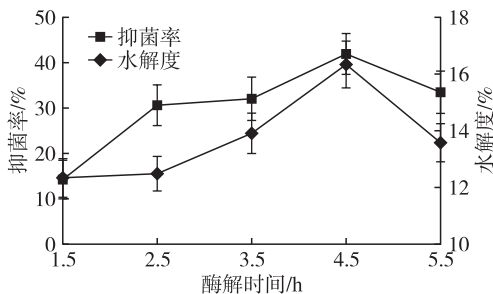


图3 酶解时间对青刺果蛋白水解度及酶解物抑菌率的影响

由图 3 可知,随着酶解时间的延长,抑菌率和水解度都呈先增后减的趋势,在酶解时间 1.5~4.5 h 范围内,抑菌率和水解度均呈现增长趋势,这可能是由于在一定的酶解时间内,蛋白质开始被酶解成为肽类物质。而随着酶解时间的继续延长水解度和抑菌率下降,可能是由于肽类物质进一步水解为小分子的肽或游离氨基酸所致^[18]。因此,选取 4.5 h 为最佳酶解时间。

2.2.3 料液比对青刺果蛋白水解度与酶解物抑菌率的影响

在 pH 6、酶添加量 4.5%、酶解温度 50℃、酶解时间 4.5 h 条件下,考察不同料液比对青刺果蛋白水解度和酶解物抑菌率的影响,结果见图 4。

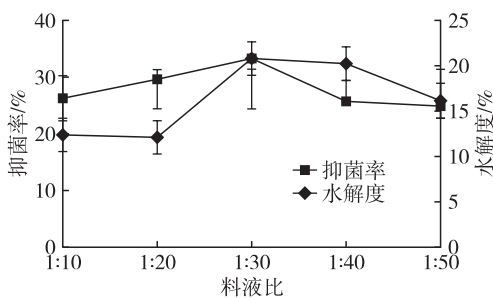


图4 料液比对青刺果蛋白水解度及酶解物抑菌率的影响

由图 4 可知,料液比为 1:10~1:30 时,抑菌率和水解度均上升,原因可能是在一定水分含量范围内有利于酶与底物的充分接触,从而加速酶解反应进程。当料液比超过 1:30 时,抑菌率降低,水解度缓慢降低,可能是底物浓度过低,降低了酶和底物的接触概率,不利于酶解反应发生^[19]。因此,选取 1:30 为最佳料液比。

2.2.4 pH 对青刺果蛋白水解度与酶解物抑菌率的影响

在料液比 1:30、酶添加量 4.5%、酶解温度 50℃、酶解时间 4.5 h 条件下,考察不同 pH 对青刺果蛋白水解度和酶解物抑菌率的影响,结果见图 5。

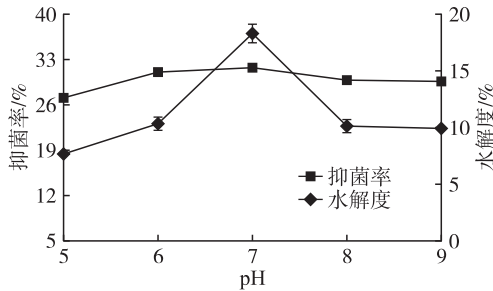


图 5 pH 对青刺果蛋白水解度及酶解物抑菌率的影响

由图 5 可知,随 pH 增加青刺果蛋白水解度和酶解物抑菌率呈先增后减的趋势,pH 为 7 时均达到最佳。这可能是由于过酸或过碱会破坏酶的空间结构,使酶活力减弱甚至失活导致的^[23]。因此,选取 7 为最佳 pH。

2.2.5 酶解温度对青刺果蛋白水解度与酶解物抑菌率的影响

在料液比 1:30、pH 7、酶添加量 4.5%、酶解时间 4.5 h 条件下,考察不同酶解温度对青刺果蛋白水解度和酶解物抑菌率的影响,结果见图 6。

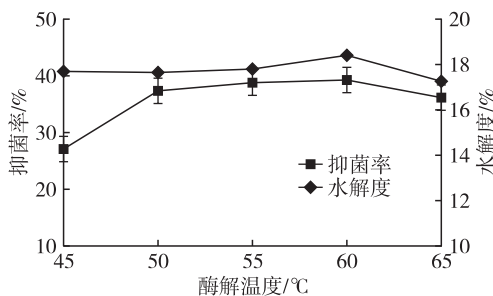


图 6 酶解温度对青刺果蛋白水解度及酶解物抑菌率的影响

由图 6 可知,随着酶解温度的升高,抑菌率和水解度都呈先增后减的趋势,当酶解温度为 60℃ 时水解度和抑菌率均达到最大。这是因为适宜的温度能够有效促进酶解反应,温度过低影响酶解进程。当酶解温度高于 60℃ 时两个评价指标均下降,可能是维持酶分子结构的次级键断裂,导致酶活性降低,延缓了酶解进程^[21]。因此,选取 60℃ 为最佳酶解温度。

2.3 响应面优化

2.3.1 响应面实验设计及结果

在单因素实验基础上,固定酶解温度 60℃、酶添加量 4.5%,以酶解时间、料液比和 pH 为自变量,

抑菌率为响应值,根据 Box - Behnken 实验设计原理,利用 Design - Expert 8.0.6 软件进行三因素三水平的响应面实验,响应面实验因素水平见表 1,响应面实验设计及结果见表 2。

表 1 响应面实验因素水平

水平	A 酶解时间/h	B 料液比	C pH
-1	3.5	1:20	6
0	4.5	1:30	7
1	5.5	1:40	8

表 2 响应面实验设计及结果

实验号	A	B	C	抑菌率/%
1	0	-1	-1	24.65 ± 0.024
2	0	0	0	32.94 ± 0.027
3	1	1	0	26.41 ± 0.027
4	0	1	1	24.23 ± 0.016
5	0	0	0	31.76 ± 0.036
6	0	0	0	31.17 ± 0.047
7	0	-1	1	18.53 ± 0.078
8	0	0	0	34.11 ± 0.090
9	0	1	-1	27.41 ± 0.038
10	1	-1	0	25.82 ± 0.016
11	-1	0	-1	15.76 ± 0.036
12	-1	1	0	23.18 ± 0.014
13	-1	-1	0	13.23 ± 0.029
14	1	0	1	20.94 ± 0.044
15	1	0	-1	24.35 ± 0.052
16	0	0	0	32.25 ± 0.012
17	-1	0	1	15.35 ± 0.020

2.3.2 模型建立及显著性检验

利用 Design - Expert 8.0.6 软件对表 2 数据进行多元回归拟合,得到回归模型方程为: $Y = 32.45 + 2.38A + 3.75B - 1.64C - 2.34AB + 0.73AC - 0.75BC - 2.84A^2 - 7.45B^2 - 5.90C^2$ 。对回归模型进行方差分析,结果见表 3。

由表 3 可知,该模型中一次项 A、B、C,二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 和交互项 AB 对青刺果蛋白酶解物抑菌率的影响极显著,说明各实验因素对响应值的影响并非简单的线性关系。模型 $P < 0.0001$,表明该回归模型极显著;模型失拟项 P 为 0.4169,大于 0.05,表明失拟项不显著,方程拟合度高,该模型可用于预测酶解时间、料液比和 pH 对青刺果蛋白酶解物抑菌率的影响。模型的决定系数 (R^2) 为 0.985,调整决定系数 (R^2_{Adj}) 为 0.9666,说明该模型的实际测量值与预测值拟合较好、误差小。该模型 CV 值为 4.76%,比较低,表明实验操作的可信度高,具有实际指导意义。由 F 值可看出,各因素对青刺果蛋白

酶解物抑菌率的影响顺序依次为 A(酶解时间) > C(pH) > B(料液比)。

表3 回归模型方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	660.38	9	73.38	52.51	<0.000 1	**
A	112.50	1	112.50	80.51	<0.000 1	**
B	21.52	1	21.52	15.40	0.005 7	**
C	45.12	1	45.12	32.30	0.000 7	**
AB	21.90	1	21.90	15.68	0.005 5	**
AC	2.25	1	2.25	1.61	0.245 0	
BC	2.16	1	2.16	1.55	0.253 7	
A ²	233.41	1	233.41	167.05	<0.000 1	**
B ²	33.97	1	33.97	24.31	0.001 7	**
C ²	146.59	1	146.59	104.91	<0.000 1	**
残差	9.78	7	1.40			
失拟项	4.63	3	1.54	1.20	0.416 9	
纯误差	5.15	4	1.29			
总和	670.16	16				

注: * 表示差异显著, $P < 0.05$; ** 表示差异极显著, $P < 0.01$ 。

2.3.3 最佳条件的确定和回归模型的验证

对回归模型进行响应面分析,得到青刺果抗菌肽的最佳酶解工艺条件为酶解时间 4.71 h、料液比 1:33.14、pH 6.87,考虑实际操作性与设备条件,确定青刺果蛋白的酶解条件为酶解时间 4.7 h、料液比 1:35、pH 6.9,此条件下青刺果蛋白酶解物的抑菌率预测值为 33.32%。在最佳条件下进行 3 次验证实验,得到青刺果蛋白酶解物的抑菌率为 31.62%,青刺果蛋白的水解度为 23.92%,抑菌率实测值与预测值吻合度达到 94.9%。

3 结论

本研究以青刺果脱脂粕为原料,通过酶解制备抗菌肽,采用单因素实验与响应面优化实验,得到青刺果蛋白酶解物最佳制备工艺条件为采用复合蛋白酶与木瓜蛋白酶以 2:1 进行复配,酶添加量 4.5%、酶解温度 60℃、料液比 1:35、酶解时间 4.7 h、pH 6.9,在此条件下水解度为 23.92%,抑菌率为 31.62%。研究表明,青刺果酶解物中有抑制金黄色葡萄球菌的活性肽,为青刺果抗菌肽的分离鉴定及后续开发利用提供理论参考。

参考文献:

[1] 和建平,李燕,王宇萍,等. 丽江木本油料青刺果资源调查[J]. 农学学报,2020,10(3):55-63.
 [2] 鲁丽梅,和泽伟. 丽江发展高原特色青刺果产业现状及对策[J]. 绿色科技,2017(5):73-75.
 [3] 高凡丁,张成庭,蔡圣宝. 青刺果种子和油粕中的营养成

分对比及酚类物质组成和抗氧化活性分析[J]. 食品与发酵工业,2019,45(2):151-158.

- [4] 和琼姬,和加卫,王宇萍,等. 青刺果研究概述[J]. 中国农学通报,2016,32(7):74-78.
 [5] 张瑞琳,吴文惠,张静怡,等. 还原性青刺果果实蛋白生物化学特性的研究[J]. 天然产物研究与开发,2017,29(9):1595-1601.
 [6] 陈国艳,刘付英,郭颖,等. 青刺果及其油的理化性质和其油的脂肪酸组成研究[J]. 粮食与油脂,2020,33(1):69-71.
 [7] 曲丽萍. 青刺果仁总黄酮的脱脂优化工艺及其抗氧化活性初步研究[J]. 中国药师,2019,22(8):1384-1387.
 [8] 刘招娣,刘祥义,张水滔,等. 青刺果总黄酮超声波辅助提取及其抗氧化活性[J]. 食品研究与开发,2018,39(1):20-24.
 [9] 程古月,李俊,谷宇锋,等. 世界卫生组织、欧盟和中国抗生素耐药性监测现状[J]. 中国抗生素杂志,2018,43(6):665-674.
 [10] 张溪,弓磊. 抗菌肽抗菌机制及研究热点[J]. 中国组织工程研究,2020,24(10):1634-1640.
 [11] 李云香,姚倩,任玫,等. 抗菌肽作用机制研究进展[J]. 动物医学进展,2019,40(9):98-103.
 [12] 王雪峰,陈越,赵琼,等. 响应面法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):173-214.
 [13] 刘振锋,戴圣佳,黄小鸣,等. 酶法制备鲑鱼皮胶原蛋白肽工艺的条件优化[J]. 食品研究与开发,2016,37(5):72-76.
 [14] 唐文婷. 基于肽-膜相互作用的模拟细胞膜法筛选抗菌肽的研究[D]. 江苏 无锡:江南大学,2014.
 [15] HU Z X, ZHANG W N, HE H B, et al. Magnesia-zirconia based mimetic biomembrane chromatography for predicting human drug absorption[J]. J Chromatogr B, 2005, 827(2): 173-181.
 [16] 黄群,杨万根,余佶,等. 杜仲籽粕蛋白酶解制备抗氧化肽工艺优化[J]. 食品科学,2013,34(17):205-209.
 [17] 余敏,黄晶晶,付瑞燕,等. 响应曲面法优化酶解豆粕蛋白制备降糖肽的工艺[J]. 食品工业科技,2018,39(6):108-113.
 [18] 高义霞,周向军,魏苇娟,等. 豆渣蛋白肽的酶解工艺、抗氧化作用及其特性研究[J]. 中国粮油学报,2014,29(4):48-49.
 [19] 张杨,胡磊,汪少芸,等. 响应面优化酶解法制备蒲公英籽蛋白抗氧化肽工艺[J]. 食品工业科技,2016,37(5):258-262.
 [20] 冯小敏,杨锡洪,解万翠,等. 响应面分析法优化复合酶解南美白对虾虾头的工艺条件[J]. 食品科学,2009,30(22):66-69.
 [21] 顾锦. 小米糠蛋白的酶法提取及性质研究[D]. 南京:南京农业大学,2013.