

花椒籽蛋白抗菌肽的抑菌作用及其稳定性研究

姜太玲, 吴红洋, 申光辉, 董小华, 张志清

(四川农业大学食品学院, 四川雅安 625014)

摘要: 本研究采用菌落计数法对花椒籽蛋白抗菌肽的抑菌效果及稳定性进行了研究。结果表明: 抗菌肽对大肠杆菌、沙门氏菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌均具有抑制作用; 抗菌肽的抑菌活性随浓度的升高而增强; 经不同温度、加热时间处理后, 抗菌肽的抑菌活性与对照相比无显著差异 ($p > 0.05$); 抗菌肽在经 pH 2.0~12.0 处理后仍有抑菌活性, pH 2.0 时的抑菌率最低 (58.13%), pH 12.0 时的抑菌率最高 (79.17%); 随着金属离子浓度的增加, 经 K^+ 、 Ca^{2+} 和 Fe^{3+} 处理后的抗菌肽的抑菌活性分别呈降低、增加、变化平缓的趋势, 经 0.1 mol/L K^+ 处理后的抗菌肽的抑菌活性明显增强; 经有机溶剂处理后, 抗菌肽的抑菌活性有所降低; 经吐温 20、吐温 80 处理后, 抗菌肽的抑菌活性极显著增强 ($p < 0.01$), SDS 对抑菌活性的增加不显著。因此, 抗菌肽具有很好的热、酸碱、金属离子和有机溶剂稳定性, 而表面活性剂 (吐温 20、吐温 80) 能使抗菌肽的抑菌活性显著增强。

关键词: 花椒籽; 抗菌肽; 抑菌活性; 稳定性

文章编号: 1673-9078(2015)8-129-135

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.8.022

Antibacterial Activity and Stability of Antimicrobial Peptides in Chinese Prickly Ash Seed Proteins

JIANG Tai-ling, WU Hong-yang, SHEN Guang-hui, DONG Xiao-hua, ZHANG Zhi-qing

(College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: Colony count method was used to evaluate the stability of antimicrobial peptides from prickly ash seed proteins and their antimicrobial activity. The results revealed that the peptides showed inhibitory effects on *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Bacillus subtilis*, and *Staphylococcus aureus*. The antimicrobial activity of these peptides increased in a dose-dependent manner. After treating at different temperatures and heating time, the antibacterial activity of the peptides showed no significant differences when compared with that of the control ($p > 0.05$). The peptides retained excellent antibacterial activity even after the treatment at pH values between 2.0 and 12.0, with lowest activity at pH 2.0 (58.13%) and the highest activity at pH 12.0 (79.17%). With increasing concentration of metal ions, the antibacterial activity decreased, increased, and changed slightly after treatment with K^+ , Ca^{2+} , and Fe^{3+} , respectively. However, the antibacterial activity increased significantly after treatment with 0.1 mol/L K^+ . The antibacterial activity decreased slightly after treatment with organic solvents, whereas it increased significantly ($p < 0.01$) when treated separately with Tween 20 and Tween 80, while the increase was not significant after treatment with SDS. Therefore, the antimicrobial peptides had excellent stability against changes in temperature, pH, metal ion content, and organic solvent concentration, while surfactants (Tween 20 and Tween 80) could significantly improve the antibacterial activity.

Key words: prickly ash seed; antimicrobial peptides; antimicrobial activity; stability

食品在加工、保藏、消费过程中容易受到微生物的侵染而导致腐败, 这决定了食品防腐剂在食品工业中的重要性。目前所使用的食品防腐剂主要为山梨酸、苯甲酸及其盐类等化学防腐剂, 这些防腐剂虽然防腐效果稳定且价格价廉, 但是近年来化学添加剂的滥用和超量使用, 消费者对其使用安全性的担忧与日俱增, 一些研究也发现长期过量食用会对人体造成累积性

收稿日期: 2014-11-02

作者简介: 姜太玲 (1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 功能性食品

通讯作者: 张志清 (1976-), 男, 博士, 教授, 主要从事粮油副产物开发利用

慢性伤害, 甚至带来致畸、诱癌或食源性疾病等问题^[1-3], 研究安全、无毒的新型食品防腐剂迫在眉睫。天然防腐剂由于具有天然、无毒、安全、水溶性好等化学防腐剂无法比拟的优点而成为食品防腐剂今后的发展趋势^[4]。其中, 抗菌肽作为目前广泛研究的天然防腐剂之一, 由于其安全高效、抑菌谱广、热稳定性好、杀菌速度快等优点, 逐渐成为研究的热点^[5-6]。研究表明, 在肉制品中添加很少剂量的昆虫抗菌肽, 可以控制细菌的生长, 保持食品的色泽和风味, 而乳酸链球菌素(Nisin)作为新型的天然食品防腐剂也已被世界上 50 多个国家和地区批准使用^[7-8]。

我国花椒籽产量丰富, 每年约达 110 万 t, 长期以来一直被当作燃料或回入田中充当肥料, 造成了资源的浪费^[9], 花椒籽中的蛋白质是一种来源广泛、亟待开发的植物蛋白质资源。利用花椒籽蛋白制备具有抗菌、抗氧化、降血压功能的活性肽, 既可以提高花椒籽的精深加工水平, 开发高附加值的产品, 又可以为食品行业发掘新型安全无毒的食品添加剂。目前国内对花椒籽蛋白的利用研究还较少^[10-11], 尤其是花椒籽蛋白制备抗菌肽的研究还未见报道。本课题组前期对花椒籽蛋白的提取及其抗氧化性已作大量研究^[12-13], 并发现采用胃蛋白酶对花椒籽蛋白进行水解, 可获得具有抗菌活性的抗菌肽^[14], 所以本研究进一步对其抑菌活性及其稳定性进行了系统研究, 以期为开发安全、天然的食品防腐剂提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

花椒籽收集自四川省金阳县青花椒产区; 大肠杆菌 (ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌 (ATCC 25923)、沙门氏菌 (CICC 21482)、枯草芽孢杆菌 (CICC 20612), 由四川农业大学食品学院微生物实验室提供; 胃蛋白酶, 比活力 1:3000~1:3500, 如吉生物科技有限公司; 十二烷基硫酸钠 (SDS), 成都科龙化工试剂厂; 细菌固体培养基: 氯化钠 5 g、蛋白胨 10 g、牛肉膏 3 g、琼脂 17 g、蒸馏水 1000 mL, 调 pH 至 7.2~7.4, 121 °C 高压蒸汽灭菌 15 min。

CP225D 型电子天平, 德国赛多利斯股份公司; SCIENTZ-12N 冷冻干燥机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; SYQ-DSX-280B 型手提式不锈钢压力蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂; SW-CJ 型洁净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; HZQ-A 型恒温振荡培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; Thermo ST16R 冷冻离心机, 美国赛默飞有限公司; 超滤离心管, 截留分子量 5、10 ku。

1.2 方法

1.2.1 花椒籽蛋白的提取

参考寇明钰 (2006)^[10]的方法提取花椒籽蛋白备用, 具体工艺如下:

脱脂花椒籽→NaOH 溶液提取→离心去沉淀→HCl 溶液进行酸析→离心去上清液→水洗沉淀→调 pH 值至中性→真空冷冻干燥→花椒籽蛋白

1.2.2 花椒籽蛋白抗菌肽的制备

将花椒籽蛋白按底物浓度为 4.9% 溶于去离子水

中, 在恒温水浴锅中预热, 达到反应温度 32 °C 后调节溶液的 pH 为 2.0, 然后按酶与底物比为 0.9:100 加入胃蛋白酶反应 3 h 后, 取出放入 90 °C 水浴锅中灭酶 15 min, 冷却, 4 °C、8000 r/min 离心 10 min, 上清液调 pH 至中性, 用截留分子量 5 ku 和 10 ku 的超滤离心管将上清液进行初步纯化和分段分离, 取抑菌效果较好的 5~10 ku 组分的溶液进行真空冷冻干燥, 冻干粉保存备用。

1.2.3 抑菌活性的测定

抑菌活性的测定参考王战勇 (2010)^[15]。取 0.250 g 冻干粉溶于 2 mL 去离子水中, 调节溶液的 pH 至近中性, 用 0.22 μm 的滤膜过滤除菌后进行抑菌试验。将指示菌接种于 LB 液体培养基中, 37 °C 恒温培养 24 h。取过滤除菌后的样液 100 μL, 加 LB 培养基 30 μL 和菌悬液 70 μL (菌悬液浓度为 10³~10⁴ CFU/mL), 混匀, 37 °C、150 r/min 摇床孵育 1 h, 取 100 μL 倾注于固体培养基平板, 37 °C 培养过夜, 计算菌落数。以去离子水为对照组。计算抑菌率。试验重复 3 次, 结果取平均值。

$$\text{抑菌率 (\%)} = \frac{\text{对照组菌落数} - \text{试验组菌落数}}{\text{对照组菌落数}} \times 100$$

1.2.4 抗菌肽对食品中常见 4 种微生物的抑菌效果分析

以大肠杆菌、沙门氏菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌这 4 种食品中常见的细菌为指示菌, 在抗菌肽的浓度为 125 mg/mL 的条件下, 按照 1.2.2 方法对 4 种微生物进行抑菌试验。

1.2.5 抗菌肽抑菌稳定性分析

1.2.5.1 浓度对抗菌肽抑菌活性的影响

分别取浓度为 250、125、62.5、31.25 mg/mL 的样品 1.0 mL, 分装到 4 个离心管中, 以大肠杆菌为指示菌, 按照 1.2.2 方法进行抑菌试验。

1.2.5.2 温度对抗菌肽抑菌活性的影响

取浓度为 125 mg/mL 的样品 1.0 mL, 分装到 5 个离心管, 分别在 0、20、40、60、80 °C 的条件下水浴 10 min, 另取 1 个离心管装未处理的样品做对照, 以大肠杆菌为指示菌, 按照 1.2.2 方法进行抑菌试验。

1.2.5.3 加热时间对抗菌肽抑菌活性的影响

取浓度为 125 mg/mL 的样品 1.0 mL, 分装到 5 个离心管中, 分别在 60 °C 的水浴中加热 20、30、40、50、60 min。另取 1 个离心管装未处理的样品做对照, 以大肠杆菌为指示菌, 按照 1.2.2 方法进行抑菌试验。

1.2.5.4 pH 对抗菌肽抑菌活性的影响

取浓度为 125 mg/mL 的样品 1.0 mL, 分装到 6 个离心管中, 用调配好的 pH 值为 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、

12.0的溶液1.0 mL加入到离心管中, 混匀, 另取1试管则加入去离子水做对照, 室温放置1 h后, 以大肠杆菌为指示菌, 按照1.2.2方法进行抑菌试验。

1.2.5.5 金属离子对抗菌肽抑菌活性的影响

配置浓度为0.1、0.2、0.3 mol/L的KCl、CaCl₂、FeCl₃溶液, 分别依次加入到装有1.0 mL水的离心管和1 mL浓度为125 mg/mL样品的离心管中, 混匀, 另取1个离心管加入去离子水做对照, 室温放置1 h后, 以大肠杆菌为指示菌, 按照1.2.2方法进行抑菌试验。

1.2.5.6 有机溶剂对抗菌肽抑菌活性的影响

取10% (V/V) 的甲醇、乙醇、异丙醇、丙三醇、正辛醇各1.0 mL, 分别依次加入到装有1.0 mL水的离心管和1 mL浓度为125 mg/mL样品的离心管中, 混匀, 另取1个离心管加入去离子水做对照, 室温放置1 h后, 以大肠杆菌为指示菌, 按照1.2.2方法进行抑菌试验。

1.2.5.7 表面活性剂对抗菌肽抑菌活性的影响

取10% (m/V) 的SDS, 10% (V/V) 吐温20、吐温80各1.0 mL, 分别依次加入到装有1.0 mL水的离心管和1 mL浓度为125 mg/mL样品的离心管中, 混匀, 另取1个离心管加入去离子水做对照, 室温放置1 h后, 以大肠杆菌为指示菌, 按照1.2.2方法做抑菌试验。

1.3 数据统计分析

采用Excel对数据进行初步处理, 然后利用软件SPSS20进行方差分析, 用LSD和Duncan法进行多重比较, p<0.01表示极显著, 0.01<p<0.05表示显著。

2 结果与讨论

2.1 抗菌肽对4种微生物的抑制作用

本试验选择了4种微生物, 其中革兰氏阴性菌(大肠杆菌、沙门氏菌)和阳性菌(枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌)各2种, 由图1可知, 花椒籽抗菌肽对枯草芽孢杆菌的抑菌能力最强, 抑菌率为96.79%; 其次为大肠杆菌和沙门氏菌, 其抑菌率分别为60.47%和59.32%; 对金黄色葡萄球菌的抑菌能力相对较弱, 抑菌率为42.93%。由此可见, 花椒籽蛋白抗菌肽对受试的4种微生物均有抑菌效果, 枯草芽孢杆菌在生长代谢过程中能产生脂肽类抗生素和羊毛硫抗生素等多种抗菌物质, 属于一种非致病性细菌^[6], 但花椒籽蛋白抗菌肽对其生长表现出很强的抑制作用, 所以该抗菌肽不适用于含有枯草芽孢杆菌的食品中。实验选择大肠杆菌作为指示菌, 进行抗菌肽抑菌稳定性的研究。

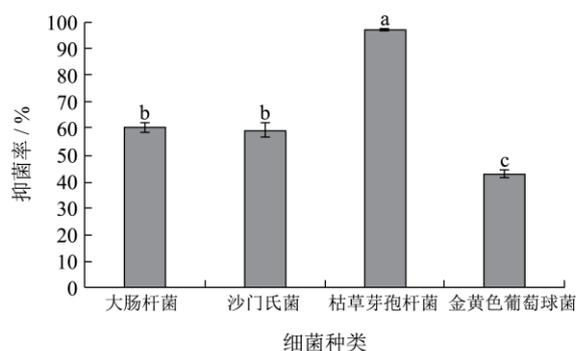


图1 花椒籽蛋白抗菌肽对常见菌的抑制作用

Fig.1 Inhibitory effect of antimicrobial peptides from prickly ash seed proteins on four common microbes

注: 字母不同表示差异显著 P<0.05, 下同。

2.2 花椒籽蛋白抗菌肽抑菌稳定性分析

2.2.1 浓度对抗菌肽抑菌活性的影响

由表1可知, 经超滤后的花椒籽蛋白抗菌肽对大肠杆菌的抑菌活性随着浓度的增加而增强, 在浓度为31.25 mg/mL时仍具有明显的抑菌作用。根据表1中数据, 用浓度对数和抑菌率作图可知, 抑菌率(y)和抗菌肽浓度对数(x)为直线关系, 方程为 $y = 27.011x + 8.5492$ ($r = 0.9924$), 符合典型的抗生素作用方程。这与陈彤彤(2006)^[7]对美国红栲抗菌肽浓度的性质研究相一致。

表1 梯度浓度抗菌肽所产生的抑菌率

Table 1 Inhibitory rate of antimicrobial peptides at various concentrations

浓度/(mg/mL)	浓度对数	抑菌率/%
250	2.39794	73.79±1.71 ^a
125	2.09691	63.71±1.14 ^b
62.5	1.79588	58.60±1.93 ^b
31.25	1.49485	48.39±1.14 ^c

2.2.2 温度对抗菌肽抑菌活性的影响

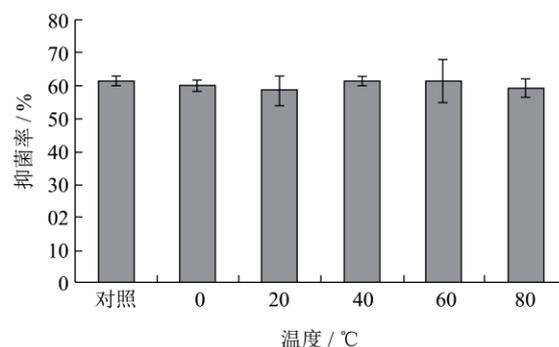


图2 温度对抗菌肽抑菌活性的影响

Fig.2 The effect of temperature on the activity of antimicrobial peptides

不同处理温度对花椒籽蛋白抗菌肽抑菌活性的影响如图2所示。抗菌肽在0~80℃范围内处理10 min后,对大肠杆菌的抑菌率随温度的升高呈先降低后升高再降低的趋势,不过抑菌率基本保持在58%~62%之间。方差分析表明,不同温度处理后的抗菌肽的抑菌活性差异性不显著($p>0.05$);LSD表明,处理组与对照相比没有显著性差异,说明起作用的抗菌肽无论在低温还是高温条件下都具有极好的稳定性。这一稳定性的特点表明,当花椒籽蛋白抗菌肽应用于食品加工时,在热加工或冷加工食品均可以起到抑菌作用。

2.2.3 加热时间对抗菌肽抑菌活性的影响

由图3可以看出,抗菌肽在60℃条件下处理不同时间后,对大肠杆菌的抑菌率随着处理时间的延长呈先降低后升高的趋势,不过其抑菌率保持在57%~61%之间。方差分析表明,抗菌肽经不同加热时间处理后,其抑菌活性的差异不显著($p>0.05$);LSD表明,处理组与对照相比没有显著性差异,表明抗菌肽具有良好的稳定性。但随着加热时间的延长会略有下降,可能是随着加热时间的增加,抗菌肽的稳定性会有所降低,而在60 min时有上升的趋势,原因可能是抗菌肽在长时间的热处理过程中多肽结构发生构象变化,从而增强了抑菌活性。抗菌肽在受到不同温度及长时间加热处理后对大肠杆菌的抑菌稳定性的特点与草鱼肠道抗菌肽稳定性类似^[18]。

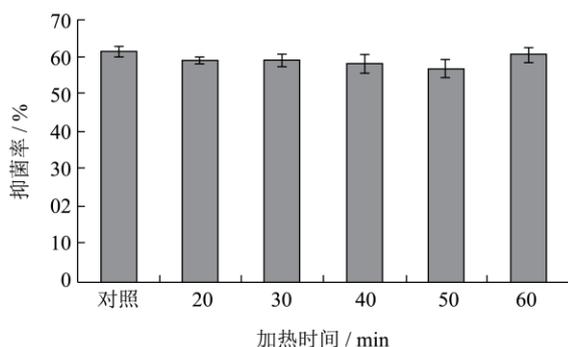


图3 加热时间对抗菌肽抑菌活性的影响

Fig.3 The effect of heating time on the activity of antimicrobial peptides

2.2.4 pH 对抗菌肽抑菌活性的影响

pH值对抗菌肽抑菌作用的影响见图4,从图中可以看出,抗菌肽在pH为2.0~12.0的条件下均具有较高的抑菌活性(抑菌率为58.13%~79.17%),表明该抗菌肽具有很强的耐酸碱性。在 $pH\leq 4$ 的条件下,抑菌活性较对照组有所降低,原因可能是抗菌肽在酸性条件下的构象发生了改变,导致抑菌率的下降,不过与对照相比没有表现出显著性差异($p>0.05$),说明该抗菌肽在酸性条件下能保持很好的稳定性;在 $pH\geq 8$ 的条件下,抗

菌肽的抑菌活性随pH值的增大呈升高的趋势,经pH12.0处理后,平均抑菌率达到79.17%,与对照相比明显升高了,表现出显著性差异($p<0.05$),分析原因一是在碱性条件下抗菌肽的溶解性较好,具有抑菌活性成分的物质充分溶出;二是处理1 h后,部分抗菌肽的结构发生了改变,产生了具有抑菌活性的其他成分,在对大肠杆菌的抑菌作用中两者共同发挥了抑菌作用。研究表明,酪蛋白抗菌肽、Spinigerin α 抗菌肽在酸性条件下对大肠杆菌的抑菌活性最高^[19-20],而本研究的抗菌肽抑菌活性最高是在pH12.0,这可能与抗菌肽的溶解性相关,也可能与指示菌有关,据报道,0.036 g/L的人工合成蚯蚓29肽在pH11的碱性条件下对地衣芽孢杆菌的抑菌率可高达90%以上,0.048 g/L的29肽在pH2.2的条件下则对酿酒酵母表现出很强的抑制作用^[21]。

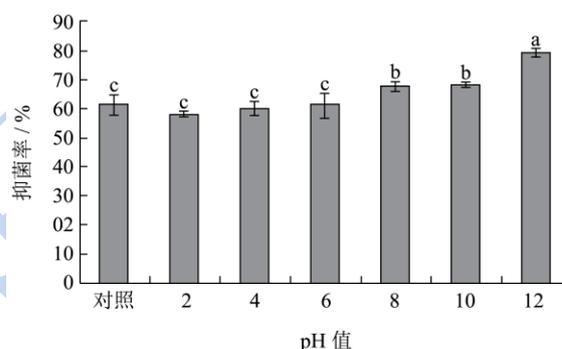


图4 pH 对抗菌肽抑菌活性的影响

Fig.4 The effect of pH on the activity of antimicrobial peptides

2.2.5 金属离子对抗菌肽抑菌活性的影响

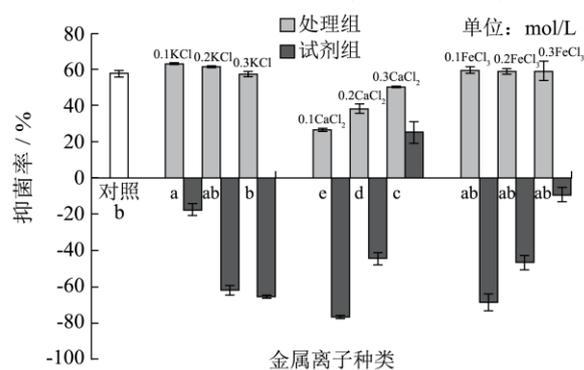


图5 金属离子对抗菌肽抑菌活性的影响

Fig.5 The effect of metal ions on the activity of antimicrobial peptides

不同金属离子对抗菌肽抑菌效果的影响如图5所示。由图中可以看出,在实验所设定的0.1~0.3 mol/L浓度范围内,除了0.3 mol/L的Ca²⁺水溶液对大肠杆菌具有抑菌活性外,其余浓度的K⁺、Ca²⁺和Fe³⁺的水溶液均对大肠杆菌生长的有促进作用。K⁺水溶液对大肠杆菌生长的促进作用随着浓度的升高而增加;Ca²⁺和

Fe³⁺水溶液对大肠杆菌生长的促进作用则随着浓度的升高而降低。K、Ca、Fe是微生物生长的必需元素，在低浓度时对微生物能起到促进生长的作用，而当金属离子浓度超过某个阈值时就会影响甚至抑制微生物的生长及代谢活动^[21]。

经不同浓度的K⁺、Ca²⁺和Fe³⁺处理后，抗菌肽仍具有很强的抑菌性能。K⁺处理后的抗菌肽对大肠杆菌的抑菌活性随着其浓度的升高而下降，处理组（0.2 mol/L和0.3 mol/L）对大肠杆菌的抑菌率与对照组（抑菌率为57.65%）相比没有显著差异（p>0.05）；处理组（0.1 mol/L）对大肠杆菌的抑菌率则明显升高，与对照组相比具有显著性差异（p<0.05），其原因可能是0.1 mol/L的K⁺与抑菌成分发生了螯合作用，即使K⁺水溶液对大肠杆菌生长有促进作用，但还是提高了其抑菌性能。Ca²⁺处理后的抗菌肽对大肠杆菌的抑菌活性随着其浓度的增加而升高，与对照组（抑菌率为57.65%）相比呈现出极显著差异（p<0.01），抑菌率明显降低，原因可能是：（1）Ca²⁺在0.1~0.2 mol/L时对大肠杆菌的生长有促进作用，致使处理后的抗菌肽的抑菌活性较对照组低，而Ca²⁺浓度在0.3 mol/L时对大肠杆菌有抑制作用，导致抑菌活性增大；（2）Ca²⁺处理抗菌肽后会在多肽间形成“桥”，从而影响了抗菌肽对大肠杆菌的活性。比较对照组和处理组对大肠杆菌的抑菌活性，结果表明Ca²⁺和抗菌肽对大肠杆菌的抑菌作用没有显示出协同作用。Fe³⁺处理后的抗菌肽对大肠杆菌的抑菌活性随着其浓度的升高变化较小，与对照组的抑菌活性（抑菌率为57.65%）没有差异显著性（p>0.05），这可能是抗菌肽与Fe³⁺发生了相互作用，即使Fe³⁺水溶液有促进大肠杆菌生长的作用，但两者的相互作用起着主要作用。由此可以得出，抗菌肽经金属离子K⁺和Fe³⁺处理后有很好的稳定性，经Ca²⁺处理后的抑菌活性有所降低，也只有在适当的浓度下，金属离子才会对抗菌肽的抑菌作用产生积极的作用，这与金属离子对蛋白质活性的影响规律相符^[23]。

2.2.6 有机溶剂对抗菌肽抑菌活性的影响

不同有机溶剂对抗菌肽抑菌效果的影响如图6所示。在实验设定的10%（V/V）的有机溶剂中，正辛醇溶液对大肠杆菌有抑菌作用，其余四种有机溶剂对大肠杆菌的生长起到促进作用。经甲醇、乙醇、异丙醇、丙三醇处理后的抗菌肽，其抑菌效果与对照（抑菌率为60.46%）相比呈极显著性差异（p<0.01），抑菌率明显降低，但仍具有抑菌效果；经正辛醇处理后的抗菌肽对大肠杆菌的抑菌率为73.53%，与对照（60.46%）相比抑菌率升高，具有显著性差异（p=0.01），这可能与正辛醇溶液对大肠杆菌的抑制作用有关。比

较对照、正辛醇溶剂及经正辛醇处理抗菌肽的抑菌活性发现，前两者的抑菌率之和（75.16%）与处理后的抗菌肽（73.53%）的抑菌率无显著性差异（p=0.60），这说明抗菌肽与正辛醇对大肠杆菌的抑制作用没有表现出协同增效作用。由此可见，抗菌肽在有机溶剂中有较好的稳定性，与竹叶抗菌肽相比其对有机溶剂的稳定性更好^[24]。

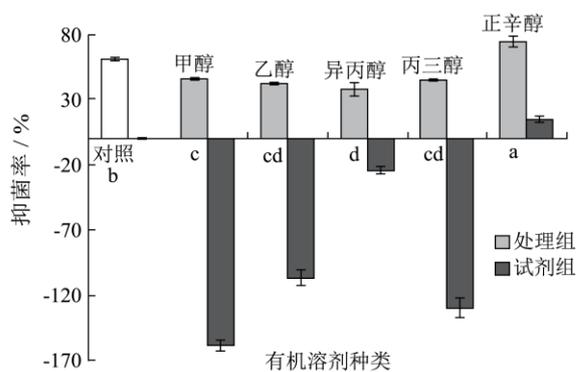


图6 有机溶剂对抗菌肽抑菌活性的影响

Fig.6 The effect of organicsolvents on the activity of antimicrobial peptides

2.2.7 表面活性剂对抗菌肽抑菌活性的影响

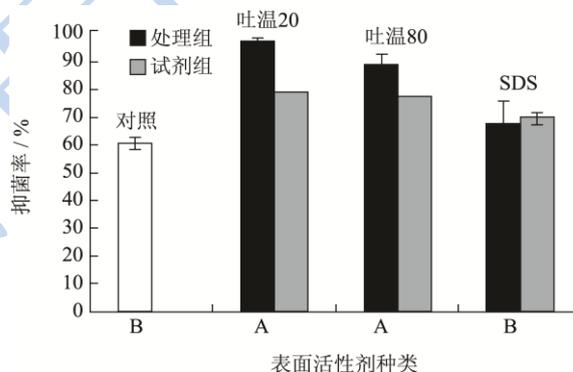


图7 表面活性剂对抗菌肽抑菌活性的影响

Fig.7 The effect of surfactants on the activity of antimicrobial peptides

不同表面活性剂对抗菌肽抑菌效果的影响如图7所示。由图可以看出，3种表面活性剂溶液对大肠杆菌的抑制作用较对照（抑菌率为60.46%）强，对照的抑菌率与吐温20、吐温80、SDS溶液的抑菌率呈极显著性差异（p<0.01）。经吐温20、吐温80处理后的抗菌肽的抑菌活性比试剂组强，且呈显著性差异（p<0.05）；经SDS处理的抗菌肽的抑菌率比SDS溶液低，且无显著性差异（p>0.05）；经吐温20、吐温80处理后的抗菌肽的抑菌活性大于对照组，且呈极显著性差异（p<0.01），经SDS处理的抗菌肽的抑菌率大于对照组，不过无显著性差异（p>0.05）。这可能是由于抗菌肽经吐温20和吐温80处理后，其部分表面亲水基团发生了构象改变，导致抑菌活性增强；而经

SDS 处理后,对大肠杆菌的抑菌活性无显著变化。由此可见,在一定浓度条件下,经吐温 20、吐温 80 处理后对抗菌肽的抑菌活性影响较大,能使抗菌肽的抑菌活性显著增强,利用这一性质可以有效提高抗菌肽在食品中的防腐保鲜效果。

3 结论

本研究考察了花椒籽蛋白抗菌肽对食品中 4 种常见细菌的作用,探讨了浓度、温度、加热时间、pH、金属离子、有机溶剂、表面活性剂对抗菌肽抑制大肠杆菌活性的影响,由此可以得出以下结论:(1)花椒籽蛋白抗菌肽对食品中 4 种常见细菌均具有一定的抑制作用,其抑菌效果大小顺序为枯草芽孢杆菌>大肠杆菌>沙门氏菌>金黄色葡萄球菌,对大肠杆菌的抑菌活性随着浓度的增加而增强,抑菌率与浓度的直线关系符合典型的抗生素作用方程。(2)以大肠杆菌作为指示菌,研究花椒籽蛋白抗菌肽抑菌效果的稳定性表明,抗菌肽经温度处理(0~80℃)、加热时间(20~60 min)、pH(2.0~12.0)、金属离子(K⁺和 Fe³⁺)和有机溶剂(甲醇、乙醇、异丙醇、丙三醇、正辛醇)处理后对大肠杆菌的抑菌活性影响较小,经金属离子 Ca²⁺处理后对大肠杆菌的抑菌活性有所降低,经表面活性剂(吐温 20、吐温 80)处理后对大肠杆菌的抑菌活性显著增强,说明抗菌肽具有很好的热、酸碱、金属离子和有机溶剂稳定性,而表面活性剂(吐温 20、吐温 80)能使抗菌肽的抑菌活性显著增强。

参考文献

- [1] 王晓波.中草药提取物在食品保鲜中的应用[J].中国食物与营养,2010,12:39-41
WANG Xiao-bo. Application of Chinese herbs extract in foodstuff preservation [J]. Food and Nutrition in China, 2010, 12: 39-41
- [2] 唐春红.天然防腐剂与抗氧化剂[M].北京:中国轻工业出版社,2010
TANG Chun-hong. Natural preservatives and antioxidants [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2010
- [3] 邓浩,尹青春,谢桂勉,等.天然食品防腐剂的研究和开发利用[J].轻工科技,2014,2:21-22,70
DENG Hao, YIN Qing-chun, XIE Gui-mian, et al. Research and exploitation of natural food preservatives [J]. Light Industry Science and Technology, 2014, 2: 21-22, 70
- [4] 蒋佐龙,赵谋明.蛋白天然防腐剂在肉类保鲜中的应用进展[J].广东农业科学,2011,21:100-102
JIANG Zuo-long, ZHAO Mou-ming. Application development of natural protein antiseptics in meat preservation [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2011, 21: 100-102
- [5] 李冠楠,夏雪娟,隆耀航,等.抗菌肽的研究进展及其应用[J].动物营养学报,2014,26(1):17-25
LI Guan-nan, XIA Xue-juan, LONG Yao-hang, et al. Research progresses and applications of antimicrobial peptides [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2014, 26(1): 17-25
- [6] Li Y, Xiang Q, Zhang Q, et al. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application [J]. Peptides, 2012, 37(2): 207-215
- [7] Hisako Saïdo. *In vitro* and *in vivo* activity of antimicrobial peptide synthesized based on the insect defension [J]. Peptides, 2004, 25: 19-27
- [8] 杜琨.乳酸链球菌素的稳定性及抑菌特性研究[J].食品工业,2012,1:99-101
DU Kun. The stability of nisin and antibacterial properties [J]. Food Industry, 2012, 1: 99-101
- [9] 王志勇,邹洪.花椒籽的开发应用[J].北京教育学院学报(自然科学版),2007,12(3):15-21
WANG Zhi-yong, ZOU Hong. Development and utilization of pricklyash seed [J]. Journal of Beijing Institute of Education (Natural Science), 2007, 12(3): 15-21
- [10] 寇明钰.花椒籽蛋白质分离提取及功能性质的研究[D].重庆:西南大学,2006
KOU Ming-yu. Study on the extraction of protein from chinese prickly ash seed and its functions properties [D]. Chongqing: Xinan University, 2006
- [11] 宋燕.花椒籽膳食纤维、蛋白质的分离提取及抗氧化肽的制备研究[D].雅安:四川农业大学,2012
SONG Yan. Study on the extraction of dietary fiber, protein from prickly ash seed and preparation of antioxidation peptide [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2012
- [12] 张志清,宋燕,刘翔.响应面法优化提取花椒籽蛋白质工艺研究[J].核农学报,2013,27(7):988-995
ZHANG Zhi-qing, SONG Yan, LIU Xiang. Optimization of protein extraction from prickly ash seed by response surface methodology [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2013, 27(7): 988-995
- [13] 张志清,宋燕,姜太玲,等.Alcalase 蛋白酶水解花椒籽蛋白制备抗氧化肽的条件优化[J].食品工业科技,2014,35(11): 179-187
ZHANG Zhi-qing, SONG Yan, JIANG Tai-ling, et al.

- Optimization of prickly ash seed protein hydrolyzing by alcalase proteases to prepare antioxidative peptides [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(11): 179-187
- [14] 姜太玲,吴红洋,王微,等.响应面法优化胃蛋白酶制备花椒籽蛋白抗菌肽的研究[J].食品工业科技,2014,35(20): 226-231
JIANG Tai-ling, WU Hong-yang, WANG Wei, et al. Optimization of antibacterial peptides preparation using pepsin from prickly ash seed protein by response surface methodology [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(20): 226-231
- [15] 王战勇,李宁,苏婷婷.中国林蛙皮抗菌肽的提取纯化及抑菌活性检测[J].食品科学,2010,31(3):132-135
WANG Zhan-yong, LI Ning, SU Ting-ting. Purification and antibacterial activity evaluation of antibacterial peptides from skin of rana chensinensis [J]. Food Science, 2010, 31(3): 132-135
- [16] 高兆建,樊陈,鞠民友,等.枯草芽孢杆菌抗菌肽在食品防腐中的应用性研究[J].徐州工程学院学报(自然科学版),2013, 28(2):67-72
GAO Zhao-jian, FAN Chen, JU Min-you, et al. Study on applications of antimicrobial peptides from bacillus subtilis in food preservation [J]. Journal of Xuzhou Institute of Technology (Natural Sciences Edition), 2013, 28(2): 67-72
- [17] 陈彤彤.美国红栲(*Fraxinus pennsylvanica* March.)抗菌肽活性物质的筛选及研究[D].济南:山东师范大学,2006
CHEN Tong-tong. Purification and characterization of an antimicrobial peptide from fraxinus pennsylvanica fruits [D]. Jinan: Shandong Normal University, 2006
- [18] 黄平,陈韬,彭宽,等.草鱼肠道抗菌肽对细菌形态结构的影响及理化性质研究[J].湖南农业大学学报(自然科学版), 2010,36(1):69-72
HUANG Ping, CHEN Tao, PENG Kuan, et al. Effects of antimicrobial peptide from intestine of grass carp on morphology of bacteria and its physicochemical properties [J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2010, 36(1): 69-72
- [19] 杜军,袁永俊,侯恩娟,等.酪蛋白酶解物中抗菌肽的抑菌性及稳定性研究[J].中国乳品工业,2012,40(1):22-24
DU Jun, YUAN Yong-jun, HOU En-juan, et al. Studied on the stability of antibacterial peptides of the casein hydrolysate and their antibacterial performance [J]. China Dairy Industry, 2012, 40(1): 22-24
- [20] 崔敬爱,宋玉涛,詹冬玲,等.Spinigerin α 抗菌肽的理化特性研究[J].食品与发酵科技,2013,49(1):55-57
CUI Jing-ai, SONG Yu-tao, ZHAN Dong-ling, et al. Physical and chemical nature research of antibacterial peptide spinigerin α [J]. Food and Fermentation Technology, 2013, 49(1): 55-57
- [21] 赵晓瑜,李建国,倪志华,等.人工合成蚯蚓 29 肽的特性[J].河北大学学报(自然科学版),2009,29(1):76-84
ZHAO Xiao-yu, LI Jian-guo, NI Zhi-hua, et al. Properties of synthesized 29-peptides from lumbricus rubellus [J]. Journal of Hebei University (Natural Science Edition), 2009, 29(1): 76-84
- [22] 孙雪菲.金属离子在好氧微生物颗粒上的界面作用[D].济南:山东大学,2011
SUN Xue-fei. Interfacial interaction of heavy metal ions and aerobic microbial granules [D]. Jinan: Shandong University, 2011
- [23] 张茜,林洪,胥亚夫,等.金属离子、壳聚糖以及山梨酸钾对于腐臭假单胞菌(*Pseudomonas taetrolens*)卵黄抗体抑菌活性的影响 [C]. 2010 First International Conference on Cellular, Molecular Biology, Biophysics and Bioengineering(CMBB 2010):中国黑龙江齐齐哈尔,2010
ZHANG Qian, LIN Hong, XU Ya-fu, et al. Effects of metal ions, chitosan and potassium sorbet on the antimicrobial activity of egg yolk immunoglobulin against pseudomonas taetrolens [C]. 2010 First International Conference on Cellular, Molecular Biology, Biophysics and Bioengineering(CMBB 2010): Qiqihar in Heilongjian China, 2010
- [24] 江惠.竹叶天然抗菌肽的分离纯化、抑菌活性与抑菌机理研究[D].成都:西华大学,2011
JIANG Hui. Purification, antimicrobial activity and mechanism of a natural antimicrobial peptide from bamboo leaf [D]. Chengdu: Xihua University, 2011