

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

王雪峰¹, 陈越², 赵琼¹, 赵存朝¹, 施亚楠¹, 黄艾祥¹, 何荣³

(1. 云南农业大学食品科学技术学院, 云南昆明 650201) (2. 云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所, 云南昆明 650223) (3. 南京财经大学食品科学与工程学院, 江苏南京 210023)

摘要: 以辣木籽蛋白粉为原料, 首先筛选蛋白水解效果较佳的蛋白酶, 其次考察酶添加量(酶底质量百分比)、料液比、酶解温度及酶解时间对蛋白水解度和肽得率的影响, 并结合响应面法优化辣木籽多肽制备工艺, 最后研究该酶解产物的抑菌活性。实验结果表明, 碱性蛋白酶具有较好的蛋白水解度, 酶法制备辣木籽多肽的最佳工艺条件为碱性蛋白酶添加量 5.50%、pH 9.0、料液比 1:30 (g/mL)、酶解温度 62.50 °C、酶解时间 143 min, 在此条件下肽得率实际值为 (84.43±2.31) %、蛋白水解度为 (20.69±0.46) %。该辣木籽蛋白酶解产物对单增李斯特菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌等 4 种致病菌株均有抑制作用, 最小抑菌浓度依次为 3.00 mg/mL、0.75 mg/mL、0.38 mg/mL、0.75 mg/mL, 对培养至 4.5 h 后的金黄色葡萄球菌呈现较好抑制效果。

关键词: 辣木籽多肽; 响应面法; 抑菌率; 最小抑菌浓度

文章编号: 1673-9078(2019)01-173-181

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.1.025

Optimization of Enzymatic Hydrolysis of *Moringa oleifera* Seed Protein by Response Surface Methodology and the Antibacterial Activity of Peptides of Protein Hydrolysate

WANG Xue-feng¹, CHEN Yue², ZHAO Qiong¹, ZHAO Cun-chao¹, SHI Ya-nan¹, HUANG Ai-xiang¹, HE Rong³

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

(2.Biotechnology and Genetic Resources Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223, China)

(3.College of Food Science and Engineering, Nanjing University of Finances & Economics, Nanjing 210023, China)

Abstract: *Moringa oleifera* seed protein powder was used as raw material to prepare for peptides by enzymatic hydrolysis. Firstly, the protease with better proteolysis effect was screened as the optimal enzyme. Secondly, the effects of enzyme addition amount (enzyme-substrate mass percentage), material-liquid ratio, hydrolysis temperature and hydrolysis time on the degree of hydrolysis (DH) and peptide yield were investigated. The process for enzymatic preparation of *Moringa oleifera* seed peptides was optimized by response surface methodology (RSM). Finally, the antibacterial activity of the hydrolysates was evaluated. Results showed that alkaline protease was the optimal enzyme. The optimal process for enzymatic preparation of *Moringa oleifera* seed peptides was founded to be alkaline protease addition of 5.50%, pH of 9.0, solid-liquid ratio of 1:30 (g/mL), hydrolysis temperature of 62.50 °C and hydrolysis time of 143 min. Under these conditions, the actual peptide yield was (84.43±2.31)%, and the degree of hydrolysis was (20.69±0.46)%. The hydrolysates had inhibitory effects on *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium*, and the minimum inhibitory concentrations against these above four pathogens were 3.00 mg/mL, 0.75 mg/mL, 0.38 mg/mL and 0.75 mg/mL, respectively. The hydrolysates had better inhibitory effects on *Staphylococcus aureus* after incubation for 4.5 h.

Key words: *Moringa oleifera* seed peptides; response surface methodology (RSM); antibacterial rate; minimum inhibitory concentration

收稿日期: 2018-10-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (1560431)

作者简介: 王雪峰 (1986-), 男, 讲师, 研究方向: 食品蛋白质资源利用

通讯作者: 黄艾祥 (1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品资源与乳品科学; 何荣 (1983-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 蛋白质化学、功能性质和生物活性肽

辣木 (*Moringa oleifera*) 为辣木科辣木属多年生热带落叶乔木, 在我国的热带和亚热带地区如云南、福建、广东等地被广泛种植^[1]。辣木以高蛋白质、高钙、高维生素以及具有特殊的营养保健作用^[2]而著名, 辣木叶、籽是辣木中营养成分和经济价值较高的部位^[3], 据报道^[4,5], 辣木叶片干粉中含有 27.5% 的粗蛋白、2.30% 钙及 0.41% 维生素 A, 辣木籽干粉中更是含有 37.80% 的粗蛋白。由于辣木含有如此高的营养成分, 辣木叶已被我国卫生部 (2012 年第 19 号公告) 批准为新资源食品, 辣木籽也经常被当作品茶常伴佳品食用。

辣木全身是“宝”, 国内外进行了较深入的研究, 其中在辣木籽研究方面, 主要集中在其净水功能及机理、活性成分提取及功效以及辣木籽油 (可与橄榄油、茶油相媲美的高档健康植物油) 提取、利用等^[6,7]。有研究^[8]表明辣木籽中的一种小分子蛋白-凝集素 (分子量约为 2 ku) 具有絮凝沉淀净化水和杀菌的作用, 可作为饮用水杀菌剂使用。天然蛋白往往蕴含许多具有生物活性的氨基酸序列, 用特异的蛋白酶水解就有可能释放出有活性的肽段^[9], 如 Sabrine 等^[10]利用胃蛋白酶水解苜蓿汁中的 RuBisCO 蛋白得到了三种新的活性肽。因此, 酶法制备活性肽因其反应条件温和、反应过程容易控制、制备的活性肽安全性较高, 已被认为是大批量生产蛋白活性肽最有前途的方法之一^[11]。

2016 年 1 月 8 日, 中国辣木产业联盟正式成立, 指出辣木产业是具有发展前景的新兴产业, 但在我国仍处于起步阶段, 有关辣木的许多科学问题亟待解决, 如辣木蛋白生物学价值低的问题, 辣木 (籽、叶) 蛋白活性肽的生物活性 (抗菌、抗氧化等) 及其作用机制等目前尚不完全清楚, 已成为辣木资源深度利用的瓶颈。本试验拟筛选具有较佳蛋白水解效果的蛋白酶, 以蛋白水解度和肽得率为评价指标, 通过单因素试验和响应面法优化辣木籽多肽的酶解制备工艺, 进一步研究其抑菌活性, 为辣木籽蛋白活性肽的高效制备及抗菌肽等高附加值产品的研发提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

辣木籽, 产自云南德宏州, 由云南天佑科技开发有限公司提供, 样品经粉碎过 60 目筛, 避光常温保存备用; 供试菌种: 单增李斯特菌 *Listeria monocytogenes* ATCC 19114、大肠杆菌 *Escherichia coli* ATCC 25922、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* MCCC(B) 26003 和鼠伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhimurium*

MCCC(B) 50115, 由云南农业大学食品科技学院微生物实验室提供。

牛血清白蛋白、LB 培养基, 美国 Sigma 公司; 胃蛋白酶 (活力 250 U/mg)、胰蛋白酶 (活力 250 U/mg)、碱性蛋白酶 (活力 200 U/mg), 北京索莱宝科技有限公司; 贯筋藤蛋白酶 (活力相当于 200 U/mg), 实验室自制; 三氯乙酸、甲醛、考马斯亮蓝 G-250、氯化钠、盐酸、氢氧化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠等均为分析纯, 天津市风船化学试剂科技有限公司。

1.2 仪器与设备

TH12-5 超临界 CO₂ 萃取装置, 上海震樾机电科技发展有限公司; FW-200 高速万能粉碎机, 北京中兴伟业仪器有限公司; UV-1800CP 紫外分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; TGL20M 高速冷冻离心机, 北京中兴伟业仪器有限公司; RE-52A1A 旋转蒸发仪, 上海亚荣生化精密科学仪器厂; SCIENTZ-18N 真空冷冻干燥机, 上海比朗仪器制造有限公司; HPX-9272ME 恒温培养箱, 上海博讯实业有限公司; SW-CJ-IF 单人双面超净无菌操作台, 苏州江东精密仪器有限公司; GMSX-280 压力蒸汽灭菌器, 北京市永光明医疗仪器有限公司; FD-1A-50 真空冷冻干燥机, 上海比朗仪器制造有限公司生产; AMR-100 微孔板酶标仪, 杭州奥盛仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 辣木籽脱脂粉的制备

辣木籽脱脂处理参照段琼芬等^[12]方法并修改。将辣木籽用粉碎机粉碎过 60 目筛。称取辣木籽粉, 通过超临界 CO₂ 萃取装置在萃取压力 30 MPa、萃取分离温度 40 °C 的条件下脱脂处理得到辣木籽脱脂粉。

1.3.2 辣木籽蛋白质的提取

称取 5.00 g 脱脂辣木籽粉, 加入 320 mL 0.20 mol/L NaCl 溶液, 30 °C 条件下水浴搅拌 90 min, 静置冷却, 4000 r/min 离心 30 min, 取上清液, 残渣反复提取 2 次, 合并上清液并调节 pH 至 11.0, 静置 30 min, 4000 r/min 离心 30 min, 沉淀加入少量超纯水溶解后透析 (截留分子质量为 3.5 ku) 脱盐处理 36 h, -20 °C 低温冷冻 12 h 后经真空冷冻干燥得到辣木籽蛋白粉 (蛋白质含量为 86.57%), 4 °C 冷藏备用。

1.3.3 最适蛋白酶的筛选

选取胃蛋白酶、胰蛋白酶、碱性蛋白酶及贯筋藤蛋白酶, 以酶底质量百分比 2.5% 为酶添加量, 在适宜酶解条件 (表 1) 下分别酶解辣木籽蛋白 30 min, 考

察不同蛋白酶对辣木籽蛋白的水解度影响, 筛选蛋白水解效果较佳的蛋白酶。

表1 试验选用的蛋白酶及性质

Table 1 Protease selected and their properties for the experiment

蛋白酶名称	适宜温度/℃	适宜 pH
胃蛋白酶	45	2.5
胰蛋白酶	37	7.5
碱性蛋白酶	60	9.0
贯筋藤蛋白酶	80	8.5

1.3.4 辣木籽多肽的制备

1.3.4.1 工艺流程

辣木籽蛋白粉→加水溶解→匀浆 5 min→水浴酶解, 酶解过程维持酶解液 pH=9→95℃灭酶 10 min, 静置 30 min 沉淀蛋白酶及部分未分解蛋白→4000 r/min 离心 20 min→上清液 45℃旋转蒸发浓缩→透析(截留分子质量为 100 u)处理 24 h→真空冷冻干燥→酶解产物冻干粉

1.3.4.2 单因素试验

相关研究报道表明^[13-15], 蛋白酶解过程受酶添加量、料液比、酶解温度、酶解时间的影响。因此, 考察酶添加量(酶底质量百分比 2.50%、3.50%、4.50%、5.50%、6.50%)、料液比(1:10、1:20、1:30、1:40、1:50 g/mL)、酶解温度(45℃、50℃、55℃、60℃、65℃)、酶解时间(30 min、60 min、90 min、120 min、150 min) 4 个因素对辣木籽蛋白水解度及肽得率的影响, 分别进行单因素试验, 确定最佳的因素水平。

1.3.4.3 响应面法优化设计

根据单因素试验结果, 固定酶添加量(酶底质量百分比) 5.5%、pH 9.0, 选取酶解温度、料液比和酶解时间为考察因素, 以肽得率为响应值, 通过响应面分析法优化辣木籽多肽的酶解制备工艺条件。

1.3.5 酶解液中总蛋白含量测定

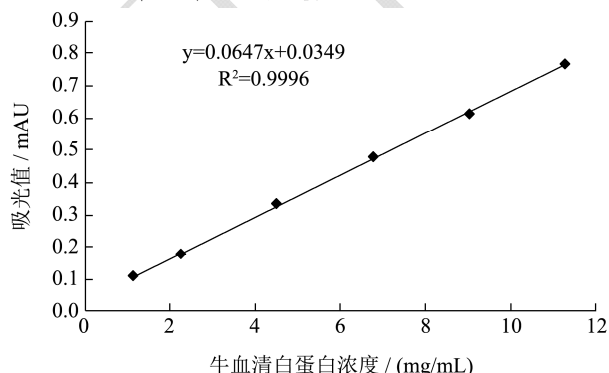


图1 牛血清白蛋白标准曲线

Fig.1 Standard curve of bovine serum albumin

参照祝婧等^[16]方法: 取 1 mL 酶解上清液于 10 mL 试管中, 再加入 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, 室温静置 5 min, 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(见图 1), 根据标准曲线得到酶解液总蛋白含量。

1.3.6 蛋白质水解度(DH)的测定

参照刘振锋等^[17]方法计算蛋白质水解度。

水解度(DH)/% = 氨基酸态氮含量/酶解液中总蛋白含量 × 100%

游离氨基酸态氮含量的测定根据 GB/T 5009.39-2003 采用甲醛值法。

1.3.7 肽得率的测定

参照易起达等^[18]方法: 取 5 mL 酶解上清液测定其蛋白质含量; 另取 5 mL 酶解上清液, 加入 5 mL 20% 三氯乙酸溶液, 摇匀, 静置 30 min, 4℃下 4000 r/min 离心 20 min, 取上清液测定蛋白质含量。

肽得率/% = (水解后酸溶蛋白含量 - 水解前酸溶蛋白含量) / 总蛋白含量

1.3.8 酶解产物抑菌活性试验

1.3.8.1 菌种活化

分别取 2 mL 菌液接种于 100 mL 灭菌 MRS 肉汤培养基中, 旋涡混匀于 37℃恒温培养箱中培养 24 h 得到一代菌悬液。按 5% 接种量将一代菌悬液接种于 MRS 肉汤培养基中, 37℃恒温培养 24 h 得二代菌悬液。重复上述步骤 37℃恒温培养 18 h, 进行第三次活化得到三代活化菌悬液, 4℃冰箱保存备用。

1.3.8.2 酶解产物抑菌活力测定

采用液体培养法^[19]考察酶解产物的抑菌活力, 用抑菌率表示。4 种致病菌株(单增李斯特菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌)分别培养至对数期, 4℃下 4000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用磷酸盐缓冲溶液(PBS, 10 mmol/L, pH=7.4)反复洗涤并重悬到 10^6 CFU/mL。将灭菌的酶解产物(5、10、15、20、25 mg/mL, PBS 配制)经 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 依次将 100 μL 不同浓度的酶解产物和等体积受试菌液加入到灭菌平底 96 孔板中, 37℃培养 12 h。PBS 缓冲液代替酶解产物作空白对照。培养结束后, 在 600 nm 波长处测量其 A_{600} 值。

抑菌率计算公式为: 抑菌率(%) = $(A_0 - A) / A_0 \times 100$

式中: A 和 A_0 分别代表样品和空白的 A_{600} 值。

1.3.8.3 酶解产物对 4 种致病菌株的最小抑菌浓度测定

采用微量稀释法^[20]测定酶解产物对 4 种致病菌株的最小抑菌浓度(Minimal inhibitory concentration, MIC)。

对培养至对数期的 4 种致病菌株离心收集菌体,

采用灭菌的 PBS 缓冲液 (10 mmol/L, pH=7.4) 清洗、重悬至 A_{600} 在 0.15~0.35 之间。将酶解产物用 PBS 缓冲液配制成 12.000 mg/mL 的母液后, 经 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 依次取 100 μL 经倍比稀释后的酶解产物和等体积受试菌液加入到灭菌平底 96 孔板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h, 酶标仪测定每孔内 A_{600} 值。对照组采用等量 PBS 缓冲液代替酶解产物。与初始值相比, A_{600} 值不再增加时为酶解产物对 4 种致病菌株的最小抑菌浓度。

1.3.8.4 细菌生长曲线抑制动力学测定

参照 Xiao Jianhui 等^[21]方法, 以金黄色葡萄球菌为指示菌, 考察酶解产物对金黄色葡萄球菌生长曲线的影响。离心收集对数期金黄色葡萄球菌菌体, 灭菌 PBS 缓冲液 (10 mmol/L, pH=7.4) 重复洗涤菌体沉淀, 重悬至 A_{600} 在 0.05~0.15 之间; 分别将 100 μL 的菌悬液和等体积的酶解产物 (终浓度 MIC) 加入灭菌平底 96 孔板, 振荡均匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 每隔 0.5 h 采用酶标仪测定每孔的 A_{600} 值, 同时以 100 μL PBS 缓冲液代替酶解产物作空白对照。

1.3.9 数据处理

每个样品至少 3 次重复数据, 以平均值 ($\bar{x}$) $\pm$ 标准差 (SD) 表示。通过 SPSS 17.0 软件对数据进行统计分析, Design-Expert 8.0.6 软件进行响应面优化分析。

2 结果与讨论

2.1 最适蛋白酶的筛选

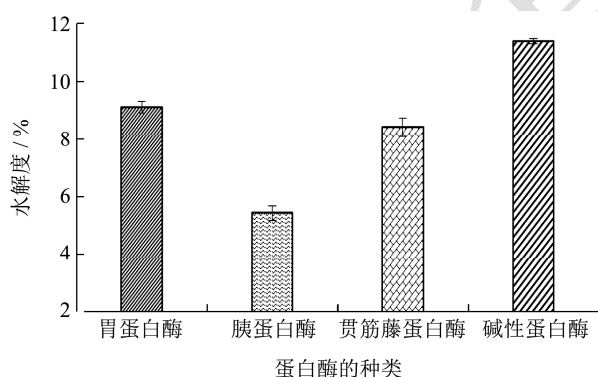


图2 不同蛋白酶对辣木籽蛋白的水解效果

Fig.2 Hydrolysis of *Moringa oleifera* seed protein by different proteases

由图2可知, 不同蛋白酶对辣木籽蛋白水解度的大小分别为碱性蛋白酶>胃蛋白酶>贯筋藤蛋白酶>胰蛋白酶, 其中以碱性蛋白酶对辣木籽蛋白质的水解效果较佳, 水解度达 11.42%, 说明碱性蛋白酶能有效水解辣木籽蛋白分子肽链生成小分子肽或氨基酸, 故选取碱性蛋白酶为辣木籽蛋白肽制备的最佳水解用酶。

2.2 单因素试验结果

2.2.1 酶添加量对辣木籽蛋白水解效果的影响

在料液比 1:20 (g/mL)、酶解温度 55 $^{\circ}\text{C}$ 、酶解时间 30 min 条件下, 考察酶添加量 (酶底质量百分比) 对辣木籽肽得率和蛋白水解度的影响。由图3可知, 随着酶添加量的增加, 肽得率和蛋白水解度均呈现增长趋势, 表明酶添加量的增加可以增大底物与酶的接触面积, 能有效加速酶解反应进程, 从而提高酶解效果^[22]。当酶添加量为 5.50% 时肽得率和蛋白水解度趋于平稳, 分别为 55.50%、16.90%, 可能原因是随着酶添加量的增大, 底物与酶的接触面积趋于饱和, 减缓了水解进程, 肽得率和蛋白水解度均达到较大值。因此, 选取最适酶添加量为 5.50%。

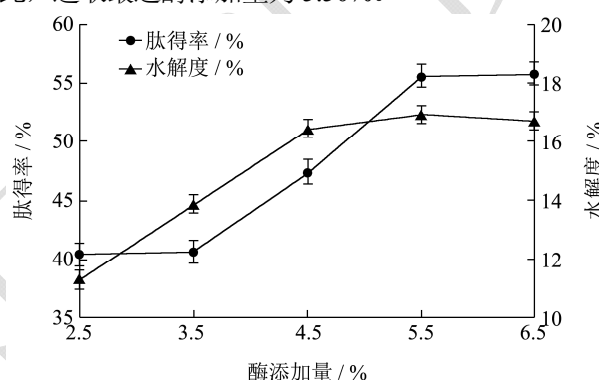


图3 酶添加量对辣木籽肽得率和蛋白水解度的影响

Fig.3 Effect of enzyme addition on peptide yield and DH of *Moringa oleifera* seed protein

2.2.2 料液比对辣木籽蛋白水解效果的影响

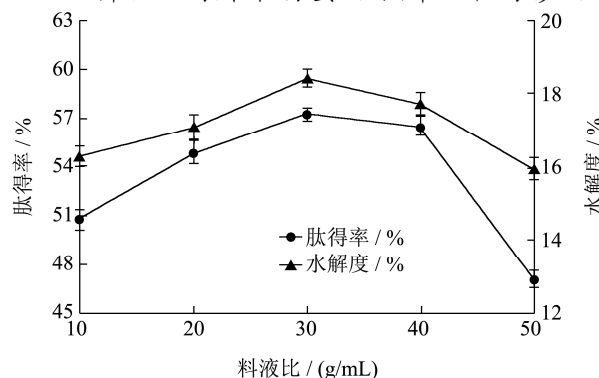


图4 料液比对辣木籽肽得率和蛋白水解度的影响

Fig.4 Effect of liquid-to-liquid ratio on peptide yield and DH of *Moringa oleifera* seed protein

在酶添加量 5.50%、酶解温度 55 $^{\circ}\text{C}$ 、酶解时间 30 min 条件下, 考察料液比对辣木籽肽得率和蛋白水解度的影响。图4可以看出, 肽得率和蛋白水解度随着料液比的增加均先升高后降低, 在料液比 10~30 g/mL 时, 2 个指标出现上升趋势的原因是水分含量的

增加提高了蛋白的溶解度,有利于酶和底物的充分接触,从而加速酶解反应进程;料液比 30~50 g/mL 时,底物浓度过于降低造成酶和底物的接触几率变低,不利于酶解反应^[23],酶解效果变差,指标降低。综上所述,在料液比为 30 g/mL 时肽得率和蛋白水解度均达到最高值,选为适宜料液比。

2.2.3 酶解温度对辣木籽蛋白水解效果的影响

在酶添加量 5.50%、料液比 1:30 (g/mL)、酶解时间 30 min 条件下,考察酶解温度对辣木籽肽得率和蛋白水解度的影响。温度会影响酶解反应体系内的物质运动速度和酶分子结构的稳定性^[24]。由图 5 可知,45~60 ℃时,温度的升高加速了反应体系内的物质运动,有利于酶和底物接触几率的提高,进一步加速酶解反应进程,肽得率和蛋白水解度 2 个指标都得到明显增高;60~65 ℃时,过高的温度影响了酶分子结构的稳定性,导致酶活性下降,酶解效率降低。因此,选取 60 ℃为最适酶解温度。

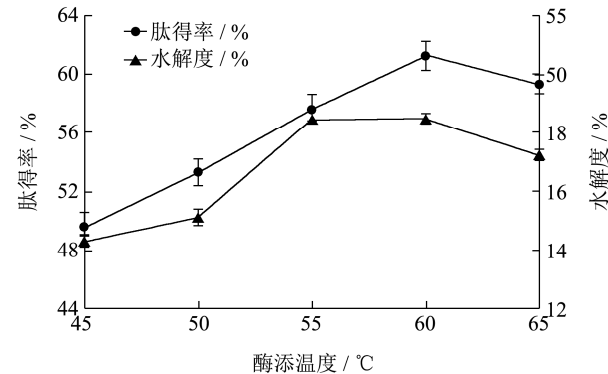


图 5 酶解温度对辣木籽肽得率和蛋白水解度的影响

Fig.5 Effect of hydrolysis temperature on peptide yield and DH of *Moringa oleifera* seed protein

2.2.4 酶解时间对辣木籽蛋白水解效果的影响

在酶添加量 5.50%、料液比 1:30 (g/mL)、酶解温度 60 ℃条件下,由图 6 所示,随着酶解时间的延长,肽得率和蛋白水解度都产生较大影响,其中肽得率影响明显。在 30~120 min 范围内,肽得率上升趋势明显,水解度也有增高,这是由于一定时间内的蛋白

质可以被充分的酶解,且以小肽的形式存在^[14]。120~150 min 内,水解度继续增高,但肽得率出现下降,可能是因为过度酶解造成一些多肽进一步被水解成小分子短肽或游离氨基酸^[25]。综合考虑,确定 120 min 为最适酶解时间。

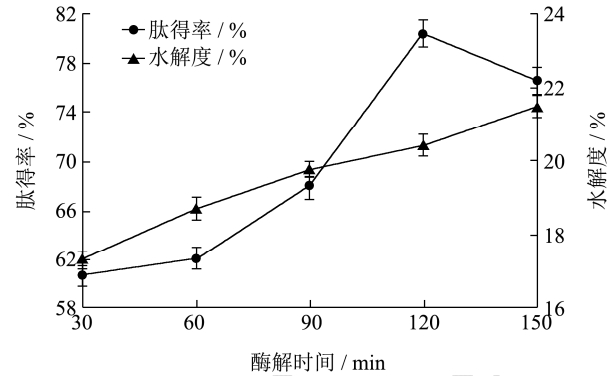


图 6 酶解时间对辣木籽肽得率和蛋白水解度的影响

Fig.6 Effect of hydrolysis time on peptide yield and DH of *Moringa oleifera* seed protein

2.3 响应面优化酶解制备工艺

2.3.1 响应面试验设计及结果

在单因素试验基础上,以酶解温度(A)、料液比(B)和酶解时间(C)为自变量,肽得率为响应值,按低、中、高 3 个水平,将每一个自变量分别进行编码为 1、0、-1,根据 Box-Behnken 试验设计原理,利用 Design-Expert 8.0.6 软件进行三因素三水平的响应面分析试验,试验因素及水平设计见表 2,试验设计方案与结果如表 3 所示。

表 2 响应面试验因素及水平

Table 2 Coded levels for independent variables used in response

surface analysis			
水	因素		
平	A 酶解温度/℃	B 料液比/(g/mL)	C 酶解时间/min
-1	55	1:20	90
0	60	1:30	120
1	65	1:40	150

表 3 响应面试验设计方案及结果

Table 3 Experimental design with response variable for response surface analysis

试验号	A 酶解温度/℃	B 料液比/(g/mL)	C 酶解时间/min	肽得率/%
1	55	1:30	90	64.02±0.02
2	60	1:20	90	66.87±0.08
3	60	1:30	120	78.62±0.06
4	60	1:40	150	77.76±0.01
5	60	1:30	120	80.61±0.03
6	55	1:20	120	61.86±0.05

转下页

接上页

7	60	1:30	120	81.26±0.02
8	60	1:20	150	76.89±0.03
9	60	1:30	120	84.28±0.01
10	55	1:40	120	61.86±0.02
11	55	1:30	150	72.96±0.04
12	65	1:30	150	83.20±0.01
13	60	1:30	120	82.77±0.01
14	60	1:40	90	76.89±0.01
15	65	1:30	90	77.11±0.02
16	65	1:40	120	76.24±0.01
17	65	1:20	120	65.79±0.01

表4 回归模型的方差分析

Table 4 Analysis of variance of regression equation

来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	913.28	9	101.48	29.84	<0.0001	**
A	216.74	1	216.74	63.74	<0.0001	**
B	56.92	1	56.92	16.74	0.0046	**
C	83.98	1	83.98	24.70	0.0016	**
AB	27.30	1	27.30	8.03	0.0253	*
AC	2.03	1	2.03	0.60	0.4649	
BC	20.93	1	20.93	6.16	0.0421	*
A ²	248.04	1	248.04	72.95	<0.0001	**
B ²	230.27	1	230.27	67.72	<0.0001	**
C ²	1.01	1	1.01	0.30	0.6027	
残差	23.80	7	3.40			
失拟项	5.32	3	1.77	0.38	0.7714	
纯误差	18.49	4	4.62			
总方差	937.08	16				

注: * $p < 0.05$, 差异显著; ** $p < 0.01$, 差异极显著。

2.3.2 模型建立及显著性检验

利用 Design-Expert 8.0.6 软件对表 4 进行多元回归拟合, 得到辣木籽肽得率 3 个因子 (A 酶解温度、B 料液比和 C 酶解时间) 的回归模型方程为:

$$Y = 81.508 + 5.205A + 2.6675B + 3.24C + 2.6125AB - 0.7125AC - 2.2875BC - 7.67525A^2 - 7.39525B^2 + 0.48975C^2$$

回归模型方差分析结果见表 4 可知, 该模型中一次项 A、B、C 和二次项 A²、B² 对辣木籽肽得率的影响极显著, 交互项 AB、BC 影响显著, 说明各试验因素对响应值的影响过程较为复杂, 并非简单的线性关系。模型显著性检测 p 值 < 0.0001, 表明该回归模型极显著; 模型失拟项 p 值为 0.7714, 表明失拟项不显著, 方程拟合度高, 该模型可用于预测料液比、酶解温度和酶解时间对辣木籽肽得率的影响。模型的决定系数 $R^2 = 0.9746$, 调整决定系数 $R^2_{Adj} = 0.9419$, 说明该模型

与实际情况拟合度较好、误差小, 能较好反映各因素与辣木籽肽得率之间关系。CV 值表示试验本身的精度, CV 值越小, 试验的可靠性越高, 该模型 CV 值为 2.47%, 比较低, 表明试验操作的可信度高, 具有实际指导意义; F 值一般用于评价各因素对试验指标的影响, F 值越大, 影响越显著, 该模型中各因素对辣木籽肽得率的影响顺序依次为 A (酶解温度) > C (酶解时间) > B (料液比)。

2.3.3 响应面分析

响应面图可以直观反映各因素与响应值之间的关系, 以及两因素间交互作用的显著性, 与回归模型的方差分析结果相呼应^[26]。等高线的形状反映各因素交互作用是否显著, 椭圆等高线代表两因素交互作用显著, 圆形等高线则代表交互作用不显著^[27]。由图 7 可知, AB、BC 两个等高线均表现为椭圆形, 表明酶解

温度和料液比、料液比和酶解时间的两因素交互作用显著。三维响应面图坡度陡峭或平缓,代表响应值对于试验因素的改变是否敏感^[28]。各因素中,酶解温度对辣木籽肽得率的影响最为显著,响应曲面坡度陡峭,随着酶解温度的升高肽得率出现先增后减的趋势;其次,酶解时间比料液比的影响相对显著些,料液比响应曲面坡度相比酶解时间稍微平缓。该结论与方差分析结果一致:各因素对辣木籽肽得率的影响顺序为酶解温度>酶解时间>料液比。

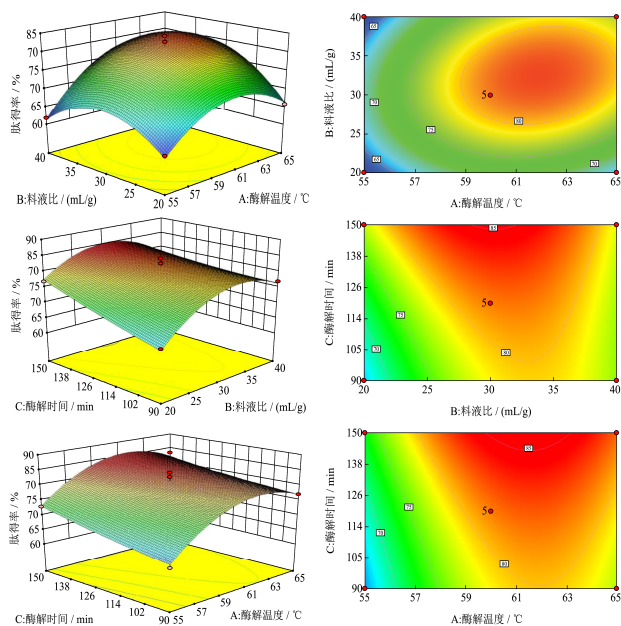


图7 各因素交互作用对辣木籽肽得率影响的响应面及等高线图

Fig.7 Response surface and contour plots showing the interactive effects of variables on *Moringa oleifera* seed peptide yield

2.3.4 最佳参数确定及回归模型验证

通过响应面法优化得到酶法制备辣木籽多肽的最佳工艺条件为:料液比 1:29.9 (g/mL)、酶解温度 62.6 °C、酶解时间 142.8 min,在此条件下肽得率达 84.58%。结合实际操作简便性,调整为料液比 1:30 (g/mL)、酶解温度 62.50 °C、酶解时间 143 min,在此条件下进行 5 组平行实验,辣木籽肽得率为 $(84.43 \pm 2.31)\%$,蛋白水解度为 $(20.69 \pm 0.46)\%$,肽得率与理论值非常接近,说明该回归模型得到的优化参数准确性高。

2.4 辣木籽蛋白酶解产物抑菌活性试验结果

2.4.1 酶解产物对 4 种致病菌株的抑菌率

由图 8 可知,不同浓度的辣木籽蛋白酶解产物对 4 种致病菌株均产生了抑制作用。当酶解产物浓度为 5 mg/mL 时,抑菌率最小,对单增李斯特菌、大肠杆菌、

金黄色葡萄球菌和沙门氏菌的抑菌率分别为 21.52%、23.91%、21.34%、25.25%;随着酶解产物浓度的增加抑菌率逐渐增大,当其浓度为 25 mg/mL 时,对 4 种致病菌株的抑菌率分别达到 32.30%、29.77%、37.38%、35.15%。由此可见,辣木籽蛋白酶解产物具有一定的抑菌能力,且对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌均有抑制效果,是潜在的抗菌肽资源。

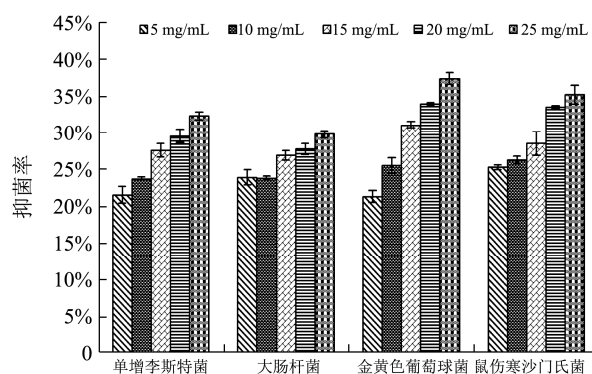


图8 酶解产物对 4 种致病菌株的抑菌率

Fig.8 Antibacterial rate of hydrolysates against four kinds of pathogenic strains

2.4.2 酶解产物对 4 种致病菌株的最小抑菌浓度

由图 9 可以看出,辣木籽蛋白酶解产物对 4 种致病菌株的最小抑菌浓度大小分别为单增李斯特菌 3.00 mg/mL<鼠伤寒沙门氏菌 0.75 mg/mL=大肠杆菌 0.75 mg/mL<金黄色葡萄球菌 0.38 mg/mL,其中以金黄色葡萄球菌对酶解产物较为敏感,这可能是由于不同种类致病菌细胞膜组成的细微差异对酶解产物呈现出不同的亲和特性^[29]。

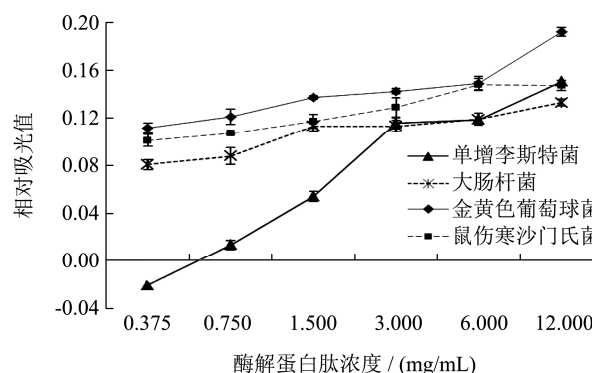


图9 酶解产物对 4 种致病菌株的最小抑菌浓度

Fig.9 Minimum inhibitory concentration of hydrolysates against four kinds of pathogenic strains

2.4.3 细菌生长曲线抑制动力学变化

基于抑菌率试验和最小抑菌浓度试验结果,以对辣木籽蛋白酶解产物较为敏感的金黄色葡萄球菌为指示菌,考察酶解产物对金黄色葡萄球菌生长曲线的影响,结果如图 10 所示。

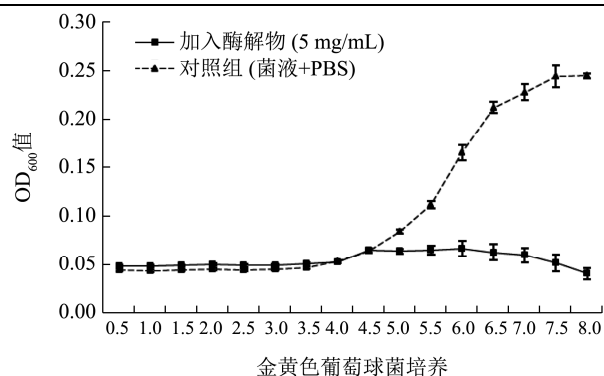


图 10 酶解产物对金黄色葡萄球菌生长曲线的影响

Fig.10 Effect of hydrolysates on the growth curve of *Staphylococcus aureus*

由图 10 可知,在培养至 0.5~4.5 h 范围内,对照组金黄色葡萄球菌菌液 A_{600} 值基本维持在 0.045 左右,而添加酶解产物的金黄色葡萄球菌菌液 A_{600} 值则维持在 0.049 左右;但培养至 4.5~8.0 h 范围内,随着培养时间的延长,添加酶解产物的菌液 A_{600} 值呈缓慢下降趋势,而对照组菌液 A_{600} 值逐渐增大,且上升趋势明显,说明酶解产物对培养至 4.5 h 后的金黄色葡萄球菌产生了有效抑制,可能原因是辣木籽蛋白酶解产物对金黄色葡萄球菌产生了一定的膜损伤作用,造成细菌细胞膜通透性增加、细胞膜功能发生变化^[30],从而抑制其生长。

3 结论

本试验以辣木籽蛋白粉为原料,首先筛选蛋白水解效果较佳的蛋白酶,确定碱性蛋白酶具有较好的蛋白水解度;其次考察酶添加量、料液比、酶解温度及酶解时间对蛋白水解度和肽得率的影响,并结合响应面法优化酶法制备辣木籽多肽的最佳工艺为碱性蛋白酶添加量 5.50%、pH 9.0、料液比 1:30 (g/mL)、酶解温度 62.50 °C、酶解时间 143 min,在此条件下肽得率实际值为 (84.43±2.31) %、蛋白水解度为 (20.69±0.46) %;最后通过抑菌活性试验表明该辣木籽蛋白酶解产物对单增李斯特菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌等 4 种致病菌株均有抑制作用,最小抑菌浓度分别为 3.00 mg/mL、0.75 mg/mL、0.38 mg/mL、0.75 mg/mL,且对金黄色葡萄球菌的生长曲线在培养 4.5 h 后呈现较好抑制效果。该研究为辣木籽蛋白活性肽的高效制备及抗菌肽等高附加值产品的研发提供理论依据。

参考文献

[1] 许敏,赵三军,宋晖,等.辣木的研究进展[J].食品科学,2016,37(23):291-301

XU Min, ZHAO San-jun, SONG Hui, et al. Advances in knowledge of *Moringa oleifera* [J]. Food Science, 2016, 37(23): 291-301

[2] Lakshmipriya G, Kruthi D, Devarai S K. *Moringa oleifera*: A review on nutritive importance and its medicinal application [J]. Food Science and Human Wellness, 2016, 5: 49-56

[3] 刘凤霞,王苗苗,赵有为,等.辣木中功能性成分提取及产品开发生的研究进展[J].食品科学,2015,36(19):282-286

LIU Feng-xia, WANG Miao-miao, ZHAO You-wei, et al. Extraction of functional components from *Moringa oleifera* and development of *Moringa oleifera*-based products [J]. Food Science, 2015, 36(19): 282-286

[4] Brilhante R S N, Sales J A, Pereira V S. Research advances on the multiple uses of *Moringa oleifera*: A sustainable alternative for socially neglected population [J]. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2017, 10(7): 621-630

[5] 樊建麟,邵金良,叶艳萍,等.辣木籽营养成分含量测定[J].中国食物与营养,2016,22(5):69-72

FAN Jian-lin, SHAO Jin-liang, YE Yan-ping, et al. Determination on nutritional components in seeds of *Moringa oleifera* [J]. Food and Nutrition in China, 2016, 22(5): 69-72

[6] Ramesh K S, Iyyakkannu S, Young S K. Phytochemicals of *Moringa oleifera*: A review of their nutritional, therapeutic and industrial significance [J]. Journal of Biotechnology, 2016, 6: 203

[7] 郭刚军,龙继明,黄艳丽,等.多油辣木不同部位营养成分分析及评价[J].食品工业科技,2016,37(22):354-364

GUO Gang-jun, LONG Ji-ming, HUANG Yan-li, et al. Analysis and evaluation of nutritional components in different locations of *Moringa oleifera* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(22): 354-364

[8] Ferreira R S, Napoleao T H, Santons A F, et al. Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from *Moringa oleifera* [J]. Letters in Applied Microbiology, 2011, 53(2): 186-192

[9] Abeyrathne E D, Lee H Y, Jo C, et al. Enzymatic hydrolysis of ovalbumin and the functional properties of the hydrolysates [J]. Poultry Science, 2014, 93(10): 2678-2686

[10] Sabrine K, Rafik B, Ali B, et al. Antibacterial activity of novel peptides isolated from protein hydrolysates of RuBisCO purified from green juice alfalfa [J]. Journal of Functional Foods, 2015, 18: 703-713

[11] Assaad S, Karima H, Remi P, et al. Antibacterial activity of new peptides from barbel protein hydrolysates and mode of

- action via a membrane damage mechanism against *Listeria monocytogenes* [J]. Journal of Functional Foods, 2014, 11: 322-329
- [12] 段琼芬,刘飞,罗金岳,等.辣木籽油的超临界 CO₂ 萃取及其化学成分分析[J].中国油脂,2010,35(2):76-79
DUAN Qiong-fen, LIU Fei, LUO Jin-yue, et al. Extraction of *Moringa oleifera* seed oil by SCF-CO₂ and analysis of its constituent [J]. China Oils and Fats, 2010, 35(2): 76-79
- [13] 丛艳君,于晓凤,陈澍.响应面法优化草鱼内脏蛋白质酶解工艺[J].食品科学,2015,36(10):43-48
CONG Yan-jun, YU Xiao-feng, CHEN Shu. Optimization of enzymatic hydrolysis conditions of grass carp visceral proteins by response surface methodology [J]. Food Science, 2015, 36(10): 43-48
- [14] 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
GAO Yi-xia, ZHOU Xiang-jun, WEI Wei-juan, et al. Enzymolysis technology and antioxidant activities of bean dregs protein peptides and its partial properties [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2014, 29(4): 48-49
- [15] Naqash S Y, Nazeer R A. Optimization of enzymatic hydrolysis conditions for the production of antioxidant peptides from muscles of *Nemipterus japonicus* and *Exocoetus volitans* using response surface methodology [J]. Amino Acids, 2012, 43(1): 337-345
- [16] 祝婧,刘磊,张名位,等.不同分子量海鲈鱼胶原蛋白肽组分的功能特性比较[J].现代食品科技,2014,30(12):113-118
ZHU Jing, LIU Lei, ZHANG Ming-wei, et al. Comparing the functional properties of sea bass collagen peptides (SBCP) with different molecular weights [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(12): 113-118
- [17] 刘振锋,刘东红,黄小鸣,等.酶法制备鱿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
LIU Zhen-feng, DAI Sheng-jia, HUANG Xiao-ming, et al. Optimization of enzymatic preparation of collagen peptides from squid skin [J]. Food Research and Development, 2016, 37(5): 72-76
- [18] 易起达,王茜茜,王立峰,等.酶解制备菜籽蛋白肽条件的优化[J].食品科学,2013,9(30):167-169
YI Qi-da, WANG Xi-xi, WANG Li-feng, et al. Optimization of enzymatic preparation of rapeseed peptides [J]. Food Science, 2013, 9(30): 167-169
- [19] Tang W T, Zhang H, Wang L, et al. Antimicrobial peptide isolated from ovalbumin hydrolysate by immobilized liposome-binding extraction [J]. European Food Research and Technology, 2013, 237(4): 591-600
- [20] Tang W T, Zhang H, Wang L, et al. New cationic antimicrobial peptide screened from boiled-dried anchovies by immobilized bacterial membrane liposome chromatography [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(7): 1564-1571
- [21] Xiao J H, Zhang H, Shao D D. Thermodynamics of antimicrobial peptide JCpep8 binding to living staphylococcus aureus as pseudostationary phase in capillary electrochromatography and consequences for antimicrobial activity [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60: 4535-4541
- [22] 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
HUANG Qun, YANG Wan-gen, YU Ji, et al. Process optimization for antioxidant peptide preparation from *Eucommia* seed meal protein by enzymatic hydrolysis [J]. Food Science, 2013, 34(17): 205-209
- [23] 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
ZHANG Yang, HU Lei, WANG Shao-yun, et al. Optimization of enzymolysis technology for preparation of antioxidant peptides from dandelion seeds-derived proteins by response surface methodology [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(5): 258-262
- [24] 吕小京,操德群,徐年军.响应面试验优化酶解法制备海洋微藻微拟球藻抗氧化肽工艺[J].食品科学,2018,39(6):183-188
LYU Xiao-jing, CAO De-qun, XU Nian-jun. Optimization of enzymatic preparation of antioxidant peptides from protein hydrolysate of the marine microalgae nannochloropsis by response surface methodology [J]. Food Science, 2018, 39(6): 183-188
- [25] 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
YU Min, HUANG Jing-jing, FU Rui-yan, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis preparation of hypoglycemic peptide from soybean meal protein by response surface methodology [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(6): 108-113
- [26] Kadam S U, Tiwari B K, Smyth T J, et al. Optimization of ultrasound assisted extraction of bioactive components from brown seaweed *Ascophyllum nodosum* using response surface methodology [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2015, 23: 308-316

现代食品科技