

响应面法优化芝麻蛋白酶解工艺及其产物 抑菌活性的研究

郭莹莹, 窦丽雪, 郝梦圆, 董田田, 王 聪, 隋 晓*

(青岛大学生命科学学院, 青岛 266071)

摘 要: **目的** 为了得到芝麻蛋白双酶分步酶解的最佳工艺参数以及酶解产物的抑菌活性。**方法** 采用响应面法优化双酶分步酶解芝麻蛋白的工艺参数, 并以抑菌圈直径大小为指标, 考察芝麻蛋白酶解产物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌活性以及最小抑菌浓度。**结果** 响应面优化得到双酶分步酶解的最适酶解条件为: 总酶量 6200 U/g, 碱性蛋白酶:木瓜蛋白酶=3:1, 先加入碱性蛋白酶后反应 1.6 h 后加入木瓜蛋白酶, 总反应时间为 4 h。在此条件下, 芝麻蛋白水解度实测值为 29.673%, 与预测值 30.622%相近。芝麻蛋白酶解产物对大肠杆菌无抑制作用, 但是具有抑制金黄色葡萄球菌的活性, 得到其最小抑菌活性浓度为 25.29 mg/mL。**结论** 响应面分析法优化芝麻蛋白双酶分步酶解工艺是可行的, 芝麻蛋白酶解产物具有抑制金黄色葡萄球菌的活性。

关键词: 芝麻蛋白; 双酶分步酶解; 响应面分析法; 金黄色葡萄球菌; 抑菌活性

Study on the optimum hydrolytic process of sesame protein by response surface method and the antibacterial activity of its hydrolysate

GUO Ying-Ying, DOU Li-Xue, HAO Meng-Yuan, DONG Tian-Tian, WANG Cong, SUI Xiao*

(College of Life Science, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

ABSTRACT: Objective To obtain the maximum enzymatic hydrolysis efficiency of the stepwise double-enzyme hydrolysis of sesame protein and the antibacterial activity of its hydrolysate. **Methods** The process parameters of stepwise double-enzyme hydrolysis of sesame protein were optimized by response surface method. The size of inhibition zone diameters was measured to investigate the antimicrobial activity and minimal inhibitory concentration of sesame protein hydrolysate on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Results** The optimum enzymatic hydrolysis conditions of the stepwise double-enzyme hydrolysis were as follows: total enzyme was 6200 U/g, the dosage of alkaline protease to papain was 3:1, the papain was added after the alkaline protease reacted with 1.6 h, and the total reaction time was 4 h. Under these conditions, the measured value of sesame protein hydrolysis degree was 29.673%, and the predicted value was 30.622%. Two kinds of values were almost identical. The sesame protein hydrolysate had no inhibitory effect on *Escherichia coli*, but it had the activity of inhibiting *Staphylococcus aureus*, and the minimum inhibitory activity was 25.29 mg/mL. **Conclusion** It is feasible to optimize the enzymatic hydrolysis process of

基金项目: 青岛市科技计划基础研究项目(13-1-4-137-jch)

Fund: Supported by Basic Research Project of Science and Technology Program of Qingdao City (13-1-4-137-jch)

*通讯作者: 隋晓, 副教授, 主要研究方向为天然产物研究与开发。E-mail: suixiaoqd@sina.com

*Corresponding author: SUI Xiao, Associate Professor, College of Life Science, Qingdao University, Qingdao 266071, China. E-mail: suixiaoqd@sina.com

sesame protein by using response surface analysis, and the sesame protein hydrolysate has the activity of inhibiting *Staphylococcus aureus*.

KEY WORDS: sesame protein; stepwise double-enzyme hydrolysis; response surface analysis; *Staphylococcus aureus*; antibacterial activity

1 引言

芝麻(*Sesamum indicum* L.)属胡麻科胡麻属,是一种重要的油料种子作物,主要生长在热带地区,以及在北纬 40°N 和 40°S 之间的温带地区,在亚洲和非洲已种植几个世纪。据统计,全世界芝麻年产量是 400 万吨,其中,亚洲占 250 万吨,非洲占 130 万吨,分别占全球总产量的 60%和 33%。芝麻在我国广泛种植,是我国四大油料作物之一。除直接食用外,芝麻大部分都用来榨油,榨油后副产物芝麻渣或饼粕中的蛋白质含量为 38%~50%,是一种优质的食品蛋白质;目前,芝麻饼粕主要当做饲料和肥料使用,我国每年约有 50 万吨的芝麻粕没有得到很好利用,极大浪费了这一蛋白资源。已有研究表明,蛋白质酶解一直是蛋白质高值化利用的有效途径,国内外已有学者利用芝麻蛋白酶解技术来制备具有生物活性的芝麻活性肽,如董英等^[1]采用碱性蛋白酶酶解芝麻蛋白得到的芝麻肽具有抗氧化活性,陈晓刚^[2]、李干红^[3]等分别以中性蛋白酶和胰蛋白酶酶解芝麻蛋白,发现其酶解产物具有良好的抗氧化性能,日本科学家小仓亨一等^[4]在芝麻粕的嗜热菌蛋白酶消化物中发现了具有 ACE 抑制活性降血压肽, Wang 等^[5]从芝麻粕的胰蛋白酶水解产物分离出金属螯合肽,而关于芝麻抗菌肽的研究,国内外未见报道。

本文在前期实验基础上,采用 Box-Behnken 响应面法对芝麻蛋白双酶分步酶解工艺参数进行优化,并对酶解产物的体外抑菌活性进行初步研究,为芝麻蛋白酶解产物的开发利用以及制备芝麻抑菌肽的可行性进行有益的探讨。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

白芝麻:市售;

碱性蛋白酶(14500 U/g,上海蓝季科技发展有限公司);木瓜蛋白酶(12000 U/g,上海三杰生物科技有

限公司);营养琼脂培养基(生化试剂,99%,北京路桥技术有限责任公司);琼脂粉(99%以上,上海蓝季科技发展有限公司);NaCl(分析纯,南京化学试剂厂)。

实验菌种:金黄色葡萄球菌(*S.aureu*)、大肠杆菌(*E.coli*),由青岛大学生命科学院微生物实验室提供。

2.2 主要仪器

CP413 电子天平(上海奥豪斯仪器有限公司);79-2 双向磁力加热搅拌器(江苏中大仪器厂);S-54 紫外分光光度计(上海棱光分析仪器厂);DHG-9023A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海-恒科技有限公司);SHB-III 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);CHA-S 气浴恒温振荡器(江苏省金坛市医疗仪器厂);TGL-16LG 台式高速冷冻离心机(湖南星科科学仪器有限公司);YXQ-LS-50SII 立式蒸汽灭菌锅(上海博讯实业有限公司);502 型电热鼓风干燥箱(山东龙口市先科仪器公司);DNP-9082 型电热恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司);SW-CJ-2C 型双人净化工作台(苏州净化设备有限公司)。

2.3 试验方法

2.3.1 水解度的测定

按照袁斌等^[6]方法测定酶解液的水解度。

2.3.2 芝麻蛋白的制备方法

按照 Inyang 等^[7]方法制备芝麻蛋白,具体方法如下。

将芝麻粕按照料液比 1:20 添加 pH12 NaOH 溶液,在 70~80 °C 条件下,提取 4 h,过滤,滤渣继续用 pH12 NaOH 溶液浸提 2 遍,过滤,合并滤液,在滤液中加入 0.05 mol/L HCl 溶液,调至 pH 为 4.5,使蛋白质沉淀析出,离心,冷冻干燥,得到粉末状的芝麻蛋白。经凯氏定氮法测定蛋白含量为 81.12%。

2.3.3 芝麻蛋白双酶分步酶解工艺

取上述芝麻蛋白溶液(0.005 g/mL)100 mL,调至 pH 9,65 °C,加入定量碱性蛋白酶恒温酶解一定时间,然后调节酶解液的 pH 至 7、温度为 60 °C,加入定量

木瓜蛋白酶酶解一定时间后, 经沸水浴灭酶 15 min 后, 按照 2.3.1 方法测定其水解度。同一条件进行 3 次平行试验, 取平均值, 使相对标准偏差(RSD)小于 5%。

2.3.4 Box-Benhnken 试验设计

通过前期芝麻蛋白酶解工艺试验, 得到碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶的双酶分步酶解芝麻蛋白的单因素影响结果^[8], 其中, 影响其水解度的主要因素为碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶的总酶用量(简称总酶量)、碱性蛋白酶用量和木瓜蛋白酶用量的配比(简称酶的配比)、加入木瓜蛋白酶的时间(简称加酶时间)和总的酶解反应时间(简称总时间)。在此基础上, 基于 Box-Behnken 的中心组合设计原理^[9], 设计 4 因素 3 水平的响应面试验, 试验因素水平编码见表 1。

表 1 响应面试验设计因素与水平
Table 1 Factors and levels of response surface methodology

因素	代码	编码水平		
		-1	0	1
总酶量/U/g	X_1	5000	6000	7000
酶的配比	X_2	2:1	3:1	4:1
加酶时间/h	X_3	1	1.5	2
总时间/h	X_4	3.5	4	4.5

2.3.5 芝麻肽含量的测定

按照鲁伟等^[10]方法, 测定响应面优化工艺下酶解产物中多肽的含量。

2.3.6 芝麻蛋白酶解产物抑菌试验

(1) 菌种活化和菌悬液的制备

参考周德庆^[11]方法, 分别对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌活化, 并制备菌悬液。

(2) 琼脂培养基平板的制备

参考车振明等^[12]方法制备。

琼脂培养基平板 6 个, 其中 3 个平板接种金黄色葡萄球菌, 其余 3 个平板涂布大肠杆菌, 用直径为 5 mm 的打孔器对 6 个平板分别打孔 6 个, 用封口膜封口, 备用。

(3) 测试样品制备

芝麻蛋白酶解产物: 以响应面优化工艺参数制备酶解产物 100 mL, 离心, 取上清液, 用微孔滤膜(0.45 μm)除菌, 待用。

碱性蛋白酶对照溶液: 称取 0.310 g 碱性蛋白酶, 溶于 100 mL pH 9 Tris-HCl 缓冲溶液, 混匀、离心, 取上清液, 用微孔滤膜(0.45 μm)除菌, 待用。

木瓜蛋白酶对照溶液: 称取 0.125 g 木瓜蛋白酶, 溶于 100 mL pH 9 Tris-HCl 缓冲溶液, 混匀、离心, 取上清液, 用微孔滤膜(0.45 μm)除菌, 待用。

芝麻蛋白对照溶液: 称取芝麻蛋白 0.500 g 溶于 100 mL pH 9 Tris-HCl 缓冲溶液, 搅拌均匀、离心, 取上清液, 用微孔滤膜(0.45 μm)除菌, 待用。

(4) 酶解产物抑菌活性试验方案

将上述芝麻蛋白酶解产物、碱性蛋白酶对照溶液、木瓜蛋白酶对照溶液、芝麻蛋白对照溶液、无菌 pH 9 Tris-HCl 缓冲溶液及无菌生理盐水分别编号为 1~6, 各取 25 μL 注入已制备好的琼脂培养基平板的六个孔中, 将平板放入 37 ℃ 培养箱培养 24 h 左右。取出平板, 观察抑菌现象, 测量抑菌圈直径大小。每个菌种做 3 组平行试验。

(5) 稀释法测定最小抑菌浓度(MIC)

按照 2.3.5 方法, 测定芝麻蛋白酶解产物中芝麻肽含量, 为 134.9 mg/mL。用 pH 9 Tris-HCl 缓冲液分别将其稀释成一系列浓度梯度的溶液, 随后将各稀释酶解产物进行抑菌活性测定, 观察比较抑菌圈直径大小, 出现抑菌圈的最低浓度即为最小抑菌浓度。

3 结果与分析

3.1 响应面试验结果

响应面优化试验结果如表 2 所示。

3.2 RSM 模型拟合及方差分析

利用软件 Design Expert.V8.0.6, 通过表 2 中试验数据进行多元拟合, 获得总酶量(X_1)、酶的配比(X_2)、加酶时间(X_3)和总时间(X_4)与水解度的回归方程:

水解度 (%) = $30.29+1.73X_1+0.28X_2+0.95X_3+0.10X_4+0.11X_1X_2-0.45X_1X_3-0.50X_1X_4+0.35X_2X_3+2.31X_2X_4+0.016X_3X_4-3.10X_1^2-3.50X_2^2-2.29X_3^2-1.44X_4^2$

回归方程中各因素及其之间交互作用的显著分析见表 3。由表 3 可知, 回归方程复相关系数 $r^2=0.8782$, 复相关系数大于 0.8, 说明拟合程度良好, 实验误差较小。该模型校正决定系数 $R_{Adj}^2=0.7564$, 表明有 75.64%的响应值(产物的水解度值)变异分布在所研究的 4 个变量中, 即总酶量、酶的配比、加酶时间和总时间, 该回归方程拟合度良好, 可以较好地

表 2 Box-Benhken 试验设计及结果
Table 2 Design and results of response surface methodology

试验号	X_1	X_2	X_3	X_4	水解度/%
1	0	0	1	1	30.421
2	-1	0	0	1	23.74
3	1	-1	0	0	25.02
4	1	0	0	-1	27.43
5	0	0	0	0	33.14
6	-1	0	1	0	22.22
7	0	1	1	0	24.86
8	-1	0	-1	0	21.193
9	-1	1	0	0	24.39
10	0	1	0	1	27.484
11	0	-1	-1	0	23.509
12	1	1	0	0	25.96
13	0	1	0	-1	23.098
14	0	-1	0	1	22.097
15	0	0	1	-1	29.372
16	0	1	-1	0	23.021
17	0	0	0	0	27.086
18	-1	0	0	-1	22.923
19	0	0	-1	-1	24.975
20	0	-1	1	0	23.952
21	1	0	1	0	26.823
22	0	0	0	0	30.39
23	0	0	-1	1	25.961
24	0	0	0	0	30.937
25	-1	-1	0	0	23.904
26	1	0	0	1	26.25
27	1	0	-1	0	27.605
28	0	-1	0	-1	26.95
29	0	0	0	0	29.921

反映实验结果。模型 P 值为 0.0097, 小于 0.0100, 说明该模型极显著, 不同条件下水解度的差异极显著, 实验方法可行。失拟项 $P=0.6807>0.1000$, 即方程模型失拟不显著, 说明该方程可以很好描述各酶解条

件和水解度的关系。

由 P 值大小可知, 在所选各因素水平范围内, 对结果的影响大小为总酶量>加酶时间>酶的配比>总时间。一次项 X_1 的 P 值为 0.0088($P<0.0500$)显著, X_2 、

表 3 响应面实验回归模型方差分析
Table 3 ANOVA for DH response surface quadratic model

数据来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	201.58	14.00	14.40	3.72	0.01
X_1	35.77	1.00	35.77	9.24	0.01
X_2	0.95	1.00	0.95	0.25	0.63
X_3	10.80	1.00	10.80	2.79	0.12
X_4	0.12	1.00	0.12	0.03	0.86
X_1X_2	0.05	1.00	0.05	0.01	0.91
X_1X_3	0.82	1.00	0.82	0.21	0.65
X_1X_4	1.00	1.00	1.00	0.26	0.62
X_2X_3	0.49	1.00	0.49	0.13	0.73
X_2X_4	21.34	1.00	21.34	5.52	0.03
X_3X_4	0.00	1.00	0.00	0.00	0.99
X_1^2	62.20	1.00	62.20	16.08	0.00
X_2^2	79.38	1.00	79.38	20.52	0.00
X_3^2	34.02	1.00	34.02	8.79	0.01
X_4^2	13.48	1.00	13.48	3.48	0.08
参差	54.17	14.00	3.87		
失拟项	35.22	10.00	3.52	0.74	0.68
纯误差	18.95	4.00	4.74		
总离差	255.75	28.00			

注: $r^2=0.8782$ $R_{adj}^2=0.7564$

X_3 和 X_4 不显著($P>0.0500$)。二次项 X_1^2 、 X_2^2 和 X_3^2 对水解度的影响极显著($P<0.0100$), X_4^2 对水解度的影响显著性不明显($P>0.0500$)。交互项 X_1X_2 、 X_1X_3 、 X_1X_4 、 X_2X_3 、 X_3X_4 不显著($P>0.0500$), X_2X_4 显著($P<0.0500$), 表明, 酶的配比和总时间之间存在显著交互作用, 酶的配比和总时间的交互作用对水解度的影响具有显著性。

3.3 响应面 3D 图与等高线图分析

以表 2 响应面试验结果及数学模型为基础, 运用软件 Design-Expert.V8.0.6 做出相应值水解度与总酶量、酶的配比、加酶时间、总时间的响应面图。

由图 1 看出, 当加酶时间 1.5 h, 总时间为 4.0 h 时, 在总酶量约为 6050 U/g、酶的配比约为 3.1:1 时, 水解度达最高点。沿总酶量方向的响应面的坡度与酶

的配比相比更陡峭, 说明总酶量对水解度的影响要大于酶的配比, 总酶量和酶的配比的交互作用不显著。

图 2 显示的是, 当酶的配比为 3:1、总时间为 4 h 时, 总酶量与加酶时间对水解度共同作用效果的响应面图及等高线图。从图(a)中可以看出水解度的最高点出现在总酶量约为 6050 U/g 和加酶时间约为 1.5 h 的条件下。由图(b)可以看出沿总酶量方向等高线密度大于沿加酶时间方向, 说明总酶用量对水解度的影响要大于加酶时间, 总酶用量和加酶时间的交互作用不显著。

图 3 为当酶的配比为 3:1、加酶时间为 1.5 h 时, 总酶量与总时间对水解度共同作用效果的响应面图及等高线图。从图中可以看出, 响应值随总酶量的增

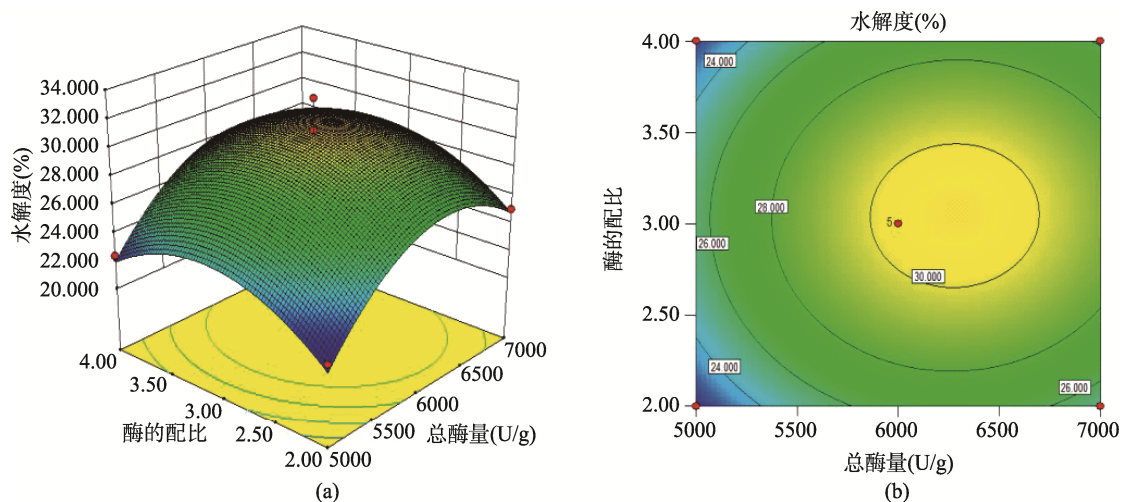


图 1 总酶量与酶的配比的交互作用的响应面(a)和等高线图(b)

Fig. 1 Response surface plot (a) and contour plot (b) of the interactive effect of total enzyme dosage and enzymatic ratio

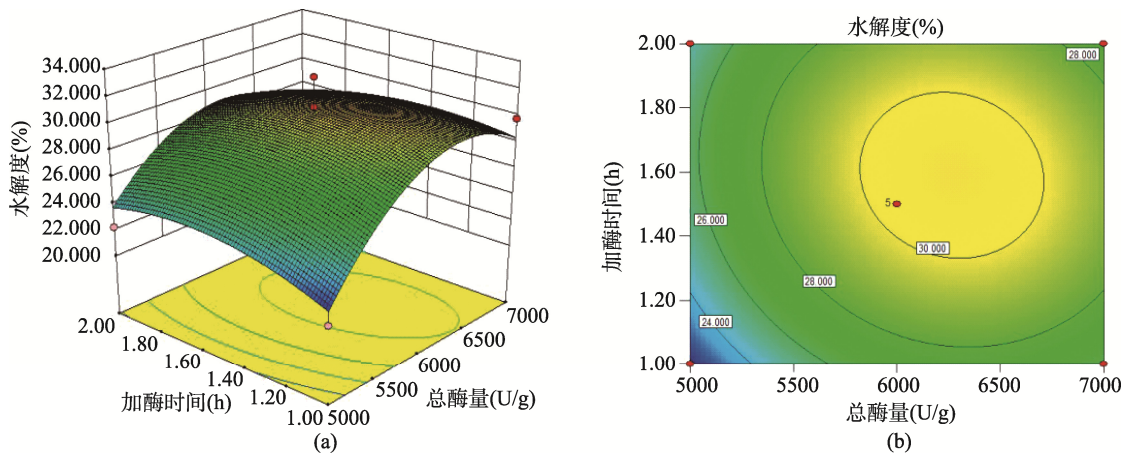


图 2 总酶量与加酶时间的交互作用的响应面(a)和等高线图(b)

Fig. 2 Response surface plot (a) and contour plot (b) of the interactive effect of total enzyme dosage and the adding time of papain

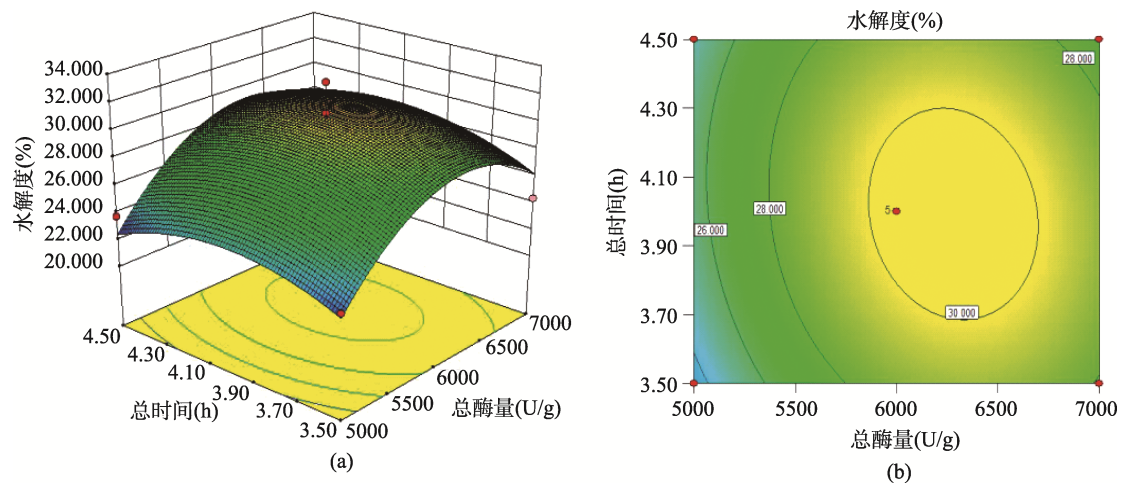


图 3 总酶量与总时间的交互作用的响应面(a)和等高线图(b)

Fig. 3 Response surface plot (a) and contour plot (b) of the interactive effect of total enzyme dosage and total reaction time

加而增加, 当上升到极值点后, 若继续增加总酶量反而导致响应值下降, 最大响应值出现在总酶量 0 水平左右, 说明酶在该反应体系的最适总酶量在 6000 U/g 左右。总时间变化的趋势较之总酶量更缓, 说明总酶量对水解度的影响比总时间更大, 总酶量和总时间的交互作用不显著。

图 4 为当总酶量为 6000 U/g、总时间为 4 h 时, 酶的配比与加酶时间对水解度共同作用效果的响应面图及等高线图。从图中可知, 随着酶的配比和加酶时间的增加, 水解度均呈现先增大后减小的趋势, 酶的配比和加酶时间的交互作用不显著。

图 5 显示当总酶量为 6000 U/g、加酶时间为 1.5 h 时, 酶的配比和总时间对水解度共同作用效果的响

应面图及等高线图。其中图(a)显示, 总时间和酶的配比都呈现先增加后减小的趋势, 但酶的配比变化的趋势相对总时间更大, 说明酶的配比响应值的影响相对较大。从图(b)中椭圆的形状可以看出总时间和酶的配比的交互作用显著。

图 6 为当总酶量为 6000 U/g、酶的配比为 3:1 时, 加酶时间和总时间对水解度共同作用效果的响应面图及等高线图。由图可知当总时间和加酶时间改变时, 水解度的变化不大, 二者交互作用不显著。

3.4 响应面工艺优化及验证实验

根据所建立的数学模型进行参数最优化分析, 得到最优酶解条件为总酶量 6263 U/g, 碱性蛋白酶

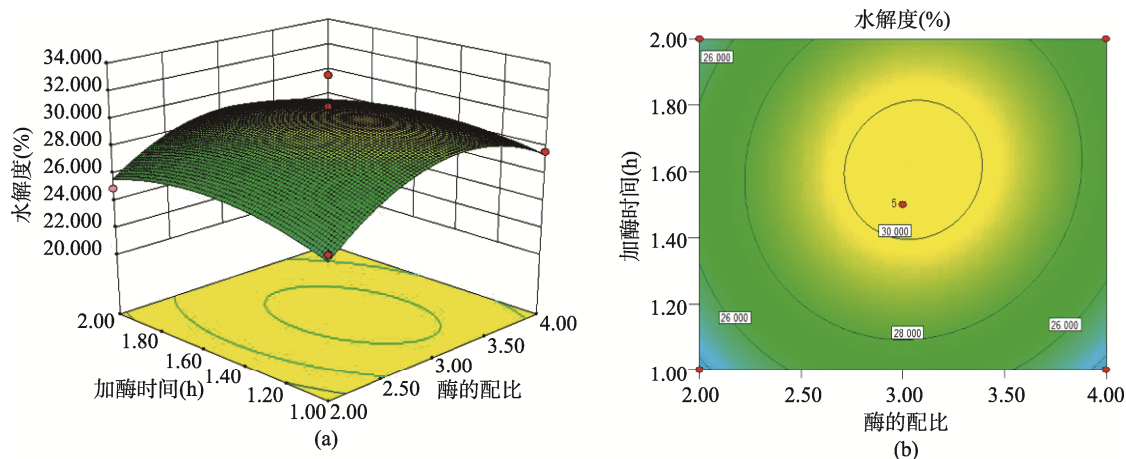


图 4 酶配比与加酶时间的交互作用的响应面(a)和等高线图(b)

Fig. 4 Response surface plot(a) and contour plot(b) of the interactive effect of enzymatic ratio and the adding time of papain

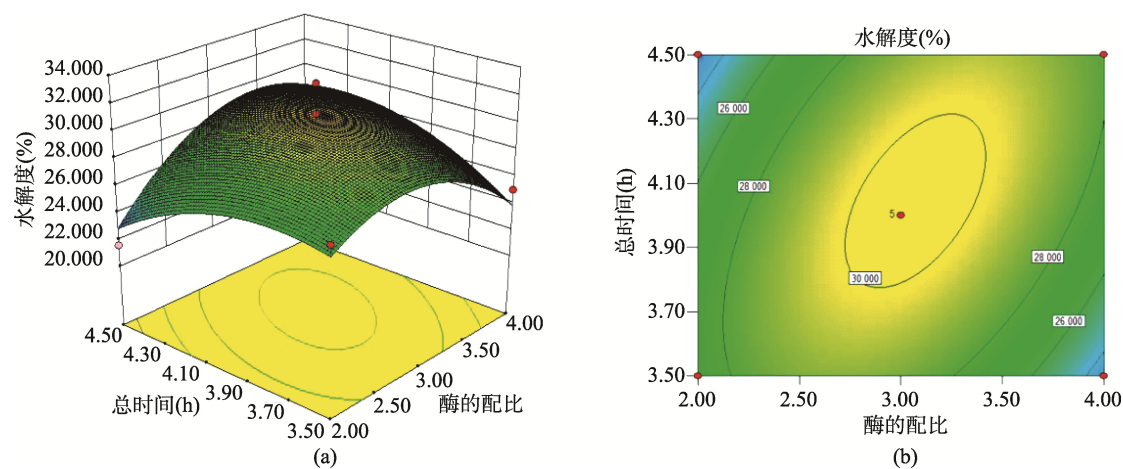


图 5 酶的配比与总时间的交互作用的响应面(a)和等高线图(b)

Fig. 5 Response surface plot (a) and contour plot (b) of the interactive effect of enzymatic ratio and total reaction time

与木瓜蛋白酶比为 3.07:1, 碱性蛋白酶反应 1.59 h 后加入木瓜蛋白酶, 总反应时间为 4.02 h。考虑到实际的操作方便选取总酶量为 6200 U/g, 碱性蛋白酶与木瓜蛋白酶的配比为 3:1, 碱性蛋白酶反应为 1.6 h 后加入木瓜蛋白酶, 总反应时间为 4 h, 在此条件下, 对最佳工艺进行验证, 结果见表 4。经 3 组平行实验, 得到水解度为平均值 29.673%, 与理论水解度值 30.622%相近, 说明此方法可行。

3.5 酶解产物抑菌活性的试验结果

3.5.1 酶解产物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌结果

芝麻蛋白酶解产物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌作用结果见图 7, 从(a)图可以看出, 芝麻蛋白酶解产物以及各空白对照样品对大肠杆菌的生长没有产生抑菌圈, 说明芝麻蛋白酶解产物无抑制大肠杆菌的作用, 从(b)图可以看出, 芝麻蛋白、碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶等空白对照样品对金黄色葡萄球菌生长没有抑制作用, 芝麻蛋白酶解产物对金黄色葡萄球菌生长有明显的抑制作用, 经测量其抑菌圈直径为 18.5 mm。这说明芝麻蛋白中含有具有抑制金黄色葡萄球菌的酶解肽, 在此水解条件下隐藏在其中的抗菌肽片段被释放出来。本研究得到的结果在国内外还未有相关报道。已有的研究表明, 植物自身可

以合成能够防御微生物侵袭的一类多肽, 被称为植物防御素, 不同的植物可以产生不同的抗菌肽, 从植物中获得抗菌肽是目前制取抗菌肽的主要途径^[13]。如江慧^[14]从竹叶中分离得到抑制金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌的抗菌肽; 陈文芳等^[15]采用复合风味蛋白酶水解伴大豆球蛋白, 结果显示, 水解产生的酶解肽具有抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌活性的作用。

3.5.2 酶解产物对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度测定结果

芝麻蛋白酶解产物最小抑菌浓度的测定结果见表 5, 从表中可以看出, 芝麻肽含量为 25.29 mg/mL 是一个分界点。当浓度大于或等于 25.29 mg/mL 时, 酶解产物具有抑菌活性, 当浓度小于 25.29 mg/mL 时, 酶解产物已没有抑菌效果。因此, 确定芝麻酶解产物抑制金黄色葡萄球菌活性的最小抑菌浓度 MIC 为 25.29 mg/mL。本试验获得的具有抑菌活性的酶解产物为粗品, 随后应进一步分离纯化以提高其抑菌活性, 如张建荣等^[16]将鲢鱼骨蛋白酶解液通过超滤和 Sephadex G-15 凝胶层析分离纯化后, 酶解产物的抑菌活性要比酶解粗品提高 1 倍左右; 王战勇等^[17]采用 Sephadex G-25 和 Sephadex G-50 对中国桂蛙皮中的抗菌肽进行纯化, 使纯化后抗菌肽抑菌率从粗提

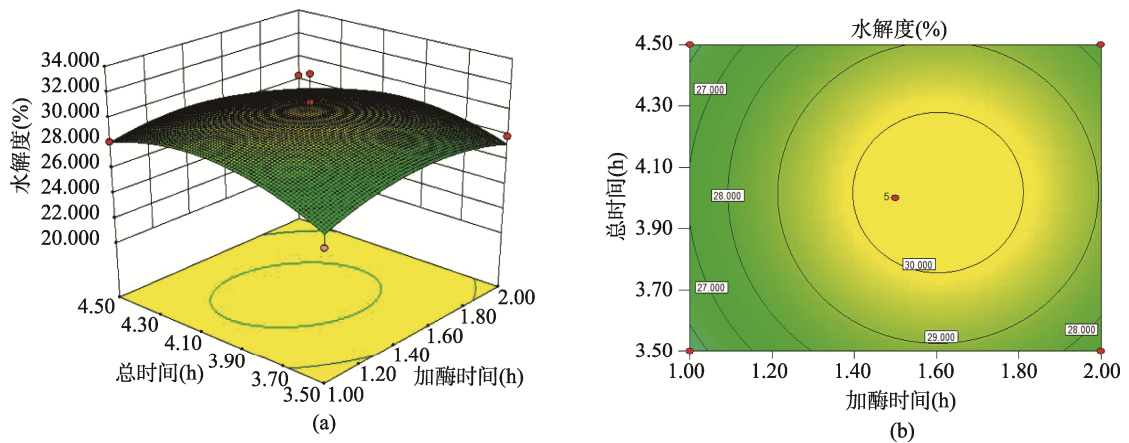


图 6 加酶时间与总时间的交互作用的响应面(a)和等高线图(b)

Fig. 6 Response surface plot(a) and contour plot(b) of the interactive effect of adding time of papain and total reaction time

表 4 酶解反应优化条件验证试验结果(n=3)
Table 4 Test results of optimum condition of enzymatic reaction (n=3)

实验号	1	2	3	平均值	RSD(%)
水解度(%)	29.761	29.588	29.670	29.673	0.29

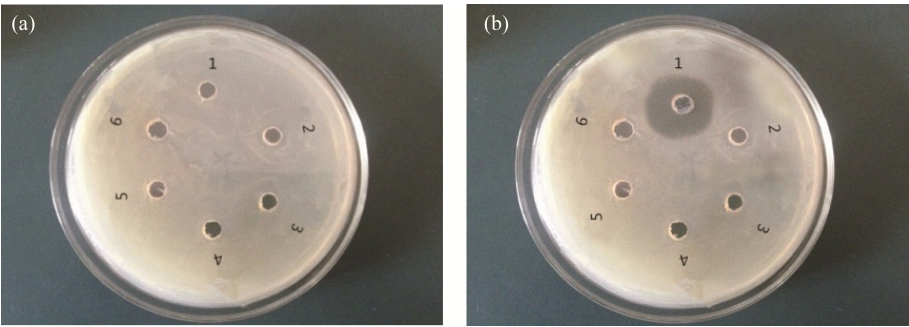


图 7 芝麻蛋白酶解产物对大肠杆菌(a)和金黄色葡萄球菌(b)的抑菌效果

Fig. 7 Antibacterial effect of sesame protein hydrolysate on *Escherichia coli* (a) and *Staphylococcus aureus* (b)
1. 芝麻蛋白酶解产物; 2. 碱性蛋白酶对照溶液; 3. 木瓜蛋白酶对照溶液; 4. 芝麻蛋白对照溶液; 5. pH 9 Tris-HCl 缓冲溶液; 6. 生理盐水
1. sesame protein hydrolysate; 2. control solution of alkaline protease; 3. control solution of papain; 4. control solution of sesame protein; 5. pH9 Tris-HCl buffer solution; 6. physiological saline

表 5 芝麻蛋白酶解产物最小抑菌浓度的测定结果
Table 5 Results of minimum inhibitory concentration of sesame protein hydrolysate

酶解产物浓度(mg/mL)	抑菌圈直径(mm)	抑菌作用
134.9	25.59	+
67.45	18.65	+
33.73	7.873	+
25.29	5.229	+
16.86	5	-
8.43	5	-
4.22	5	-
2.11	5	-

注: “+”表示有抑菌活性; “-”表示无抑菌活性

取物的 70.7%提高到 90.2%。与传统抗生素相比, 抗菌肽具有抗菌能力强、抗菌谱广、不易产生耐药性, 对正常的细胞无害, 且对机体不产生毒副作用, 无残留等明显的优点, 能够有效解决当前传统抗生素日益严重的耐药性问题, 因此, 抗菌肽在食品添加剂、生物饲料添加剂、医药等领域都具有极其广阔的发展前景, 对芝麻抗菌肽的研究是符合当前日益加快的绿色生产趋势。

4 结 论

通过响应面优化试验建立了双酶分步酶解芝麻蛋白工艺中总酶量、酶的配比、加酶时间和总时间 4 个因素的回归方程, 此模型在试验范围内能较准确地预测芝麻蛋白双酶分步酶解的水解度; 4 个因素影

响大小顺序为: 总酶量>加酶时间>酶的配比>总时间; 该工艺的最佳提取工艺参数为: 总酶量 6200 U/g, 碱性蛋白酶与木瓜蛋白酶比为 3:1, 碱性蛋白酶反应 1.6 h 后加入木瓜蛋白酶, 总反应时间为 4 h; 在此优化条件下得到水解度为 29.673%。

对芝麻蛋白的酶解产物进行大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的体外抑菌活性研究, 结果表明, 芝麻蛋白酶解产物对大肠杆菌无抑制作用, 对金黄色葡萄球菌具有一定的抑制作用, 其最小抑菌浓度 MIC 为 25.29 mg/mL, 因此, 可进一步研究开发为抑菌肽。

参考文献

[1] 董英, 徐斌, 敬璞, 等. 芝麻抗氧化多肽组合物及其生产方法: 中国, CN101423860A[P]. 2009, 05, 06.
Dong Y, Xu B, Jing P, et al. Sesame antioxidant peptides composite and its production method, China, CN101423860A [P]. 2009, 05, 06.
[2] 陈晓刚, 刘爱文, 陈忻等. 芝麻蛋白酶解液的抗氧化性能[J]. 食品科学, 2010, 31(21): 85-88.
Chen XG, Liu AW, Chen X, et al. Optimization of enzymatic properties of antioxidant black sesame protein hydrolysate [J]. Food Sci, 2010, 31(21): 85-88.
[3] 李干红, 丁晓雯. 芝麻蛋白酶解条件控制及其产物抗氧化研究[J]. 中国粮油学报, 2006, 21(6): 104-108.
Li GH, Ding XW. Protease hydrolysis of sesame protein and hydrolysate antioxidation [J]. J Chin Cereals Oils Assoc, 2006, 21(6): 104-108.
[4] 小仓亨一, 饭野妙子, 浅见纯生. 血管紧张素转化酶抑制肽: 中国, CN 1780639A[P]. 2006, 05, 31.
Torui O, Taeko L, Corn P. Angiotensin converting enzyme inhibitory peptide, China, CN1780639A [P]. 2006, 05, 31.

- [5] Wang C, Li B, Ao J. Separation and identification of zinc-chelating peptides from sesame protein hydrolysate using IMAC-Zn²⁺ and LC-MS/MS [J]. Food Chem, 2012, (13): 1231-1238.
- [6] 袁斌, 吕桂善, 刘小玲. 蛋白质水解度的简易测定方法[J]. 广西农业生物科学, 2002, 21(2): 113-115.
Yuan B, Lv GS, Liu XL. The simple method of determining for the degree of hydrolysis of proteins [J]. J Guangxi Agric Biolog Sci, 2002, 21(2): 113-115.
- [7] Inyang UE, Idun AO. Influence of pH and salt concentration on protein solubility, emulsifying and foaming properties of sesame protein concentrate [J]. J Am Oil Chem Soc, 1996, 73(12): 1663-1667.
- [8] 郭莹莹, 窦雨雪, 郝梦圆, 等. 不同工艺条件对芝麻蛋白酶解效率的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(6): 2109-2114.
Guo YY, Dou LX, Hao MY, et al. Effect of enzymatic efficiency of sesame protein by different process conditions [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(6): 2109-2114.
- [9] 隋允康, 宇慧平. 响应面方法的改进及其对工程优化的应用[M]. 北京: 科学出版社, 2011.
Sui YK, Yu HP. Improvement of response surface methodology and its application to engineering optimization [M]. Beijing: Science Press, 2011.
- [10] 鲁伟, 任国谱, 宋俊梅. 蛋白水解液中多肽含量的测定方法[J]. 食品科学, 2005, 26(7): 169-171.
Lu W, Ren GP, Song JM. Determination of content of peptides in protein hydrolysate [J]. Food Sci, 2005, 26(7): 169-171.
- [11] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2001.
Zhou DQ. Experimental manual of microbiology [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2001.
- [12] 车振明, 李玉峰, 焦士蓉. 微生物学实验指导书[M]. 成都: 西华大学生物工程学院, 2007.
Che ZM, Li YF, Jiao SR. The institute of biological engineering [M]. Chengdu: Xihua University, 2007.
- [13] 尹昆仑, 王嘉榕, 孙红宾. 抗菌肽的研究进展及应用前景[J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(5): 181-185.
Yin KL, Wang JR, Sun HB. Progress of antimicrobial peptides research and application [J]. Chin J Biochem Pharm, 2015, 35(5): 181-185.
- [14] 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 H. Purification, antimicrobial activity and mechanism of a natural antimicrobial peptide from bamboo leaf [D]. Chengdu: Xihua University, 2011.
- [15] 陈文芳, 左伟勇, 李倬, 等. 伴大豆球蛋白酶解肽抑菌活性研究[J]. 畜牧与兽医, 2012, 44(12): 010-012.
Chen WF, Zuo WY, Li Z, et al. Antibacterial activity of peptides from hydrolyzed soybean conglycinin [J]. Anim Husband Vet Med, 2012, 44(12): 010-012.
- [16] 张建荣, 马俪珍, 梁鹏. 鲶鱼骨蛋白酶解物中抗菌活性物质的初步分离纯化[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(02): 048-052.
Zhang JR, Ma LZ, Liang P. Primary purification of antibacterial substance from catfish bone hydrolysates [J]. Food Ferment Ind, 2009, 35(02): 048-052.
- [17] 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(03): 132-135.
Wang ZY, Li N, Su TT. Purification and anti-bacterial peptides from skin of *Rana chensinensis* [J]. Food Sci, 2010, 31(03): 132-135.

(责任编辑: 李振飞)

作者简介



郭莹莹, 主要研究方向为食品科学。
E-mail: 2389590146@qq.com



隋晓, 副教授, 主要研究方向为天然产物研究与开发。
E-mail: suixiaoqd@sian.com