

网络出版时间:2012-12-21 17:27

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20121221.1727.001.html

牛乳酪蛋白酶解物的分离纯化及 抗菌肽乳基料的制备研究

熊清权,李志成,童伟,郑晓莹,苏晋文,葛武鹏,任娇

(西北农林科技大学 食品科学与工程学院,陕西 杨凌 712100)

[摘要] **【目的】**分离纯化牛乳酪蛋白酶解物,检测酶解物及其分离组分的抑菌活性,并制备抗菌肽乳基料。**【方法】**从中性蛋白酶、碱性蛋白酶、胰蛋白酶及木瓜蛋白酶中筛选一种蛋白酶水解牛乳酪蛋白,将其酶解产物经大孔吸附树脂和凝胶过滤色谱分离、纯化后,以对大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径、最小抑菌浓度(MIC)、最小杀菌浓度(MBC)为指标,分析酶解物和分离组分的抑菌活性。**【结果】**(1)木瓜蛋白酶水解牛乳酪蛋白 4.5 h,其酶解物对大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌均有较好的抑制作用。(2)大孔吸附树脂将牛乳酪蛋白酶解物分离成 4 个组分,其中以体积分数 75%乙醇洗脱组分的抑菌作用较强。(3)凝胶过滤色谱将体积分数 75%乙醇洗脱组分分离成 4 个色谱峰,其中 A 峰对大肠杆菌和沙门氏菌抑制作用较强,B 峰对金黄色葡萄球菌抑制作用较强,A 峰和 B 峰经冷冻干燥后成功制备了 2 种抗菌肽乳基料。**【结论】**牛乳酪蛋白酶解物经大孔吸附树脂和凝胶过滤色谱分离、纯化后,其分离组分的抑菌活性逐步增强,能够用于抗菌肽乳基料的制备。

[关键词] 牛乳酪蛋白酶解物;乳基料;分离纯化;抗菌肽

[中图分类号] Q814.9;TQ464.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2013)01-0200-07

Isolation, purification of bovine casein hydrolyzates and preparation of antimicrobial peptide dairy ingredients

XIONG Qing-quan, LI Zhi-cheng, TONG Wei, ZHENG Xiao-ying,
SU Jin-wen, GE Wu-peng, REN Jiao

(College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】**Bovine casein hydrolyzates were isolated and purified, and their antimicrobial activities were detected. Antimicrobial peptide dairy ingredients were prepared as well. **【Method】**A protease was chosen from neutral protease, alcalase, trypsin and papain to hydrolyze bovine casein, and its hydrolyzates were isolated and purified by macroporous resin and gel filtration chromatography. Diameter of antimicrobial circle, MIC and MBC against *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Staphylococcus aureus* were used to analyze the antimicrobial activities of hydrolyzates and their separated components. **【Result】**(1) Bovine casein was hydrolyzed for 4.5 h by papain, and its hydrolyzates had stronger antimicrobial effects against *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Staphylococcus aureus*. (2) Macroporous resin was used to separate bovine casein hydrolyzates into 4 groups, and group eluted by ethanol with a volume ratio of 75% showed the strongest antibacterial effects. (3) The group of hydrolyzing components eluted by ethanol with a volume

[收稿日期] 2012-04-18

[基金项目] 陕西省农业攻关项目(2011K01-04);陕西省科技统筹创新工程计划项目(2011KTCL02-11);国家“十二五”科技支撑计划项目(2012BAD12B07)

[作者简介] 熊清权(1986—),男,湖南常德人,在读硕士,主要从事乳品加工研究。E-mail: cocoqingquan@yahoo.com.cn

[通信作者] 李志成(1966—),男,陕西长武人,副教授,硕士生导师,主要从事乳肉蛋贮藏与加工研究。E-mail: lzc20000@163.com

ratio of 75% were further isolated to 4 fractions by gel filtration chromatography. Fraction A showed strong antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Salmonella*, and fraction B showed strong antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. Two dairy ingredients of antimicrobial peptide from fractions A and B had been prepared successfully by lyophilization. 【Conclusion】 Antimicrobial activities of fractions from bovine casein hydrolyzates increased gradually after isolation and purification by macroporous absorption resin and gel filtration chromatography. The bovine casein hydrolyzates could be used to prepare antimicrobial peptide dairy ingredients.

Key words: bovine casein hydrolyzates; dairy ingredients; isolation and purification; antimicrobial peptide

乳基料是以全乳或部分乳成分为原料加工而成的可用作乳品及其他食品加工配料的配料型产品,可分为浓缩液态乳基料、干制乳基料(如酪蛋白、酪氨酸盐、乳蛋白浓缩物、乳清制品等)、酶改性乳基料、发酵乳基料等^[1]。

目前,对于较大宗的乳基料,如乳糖、浓缩乳清蛋白等,国内外研究均较成熟,对于从牛奶中提炼出来的具有生理活性功能和高附加值新型乳基料,如美国、日本和韩国重点研究的抗高血压肽现已实现产业化,而有些乳基料正在进行技术攻关,如抗氧化肽和抗菌肽,二者的研发现面临两大问题,即如何提高其生理活性和降低生产成本^[2-4]。在国内,该类新型乳基料的研究虽刚刚起步,但发展却较为迅速。郭鸽等^[5]在 2007 年以 KLDS3.315 为发酵剂,以脱脂乳和乳清蛋白为发酵原料,制备出了低致敏乳源蛋白基料。任大喜等^[6]利用胰蛋白酶,在 45℃、E/S 的质量分数为 0.5% 的条件下水解脱脂乳蛋白 1 h,制备出了母乳化蛋白基料。

近年来,我国乳品研发主要集中在终端消费品上,而乳业及其他食品行业所用的新型功能性乳基料几乎全部依赖进口。因此,开发乳基料既可以缓解乳基料进口的压力,又可以解决乳品暂时过剩时原料乳的消化问题,还可以突破乳业发展瓶颈,优化产业结构。因此,在今后相当长的时间内,新型功能性乳基料的研究,仍是乳品加工的发展趋势和必然选择^[7]。

本试验以新鲜牛乳为原料提取酪蛋白,选用中性蛋白酶、碱性蛋白酶、胰蛋白酶和木瓜蛋白酶分别水解牛乳酪蛋白,采用对比试验方法确定最佳水解酶,再将酶解产物先后经大孔吸附树脂和凝胶过滤色谱分离、纯化,研究其分离组分的抑菌活性,并将抑菌活性较强的组分制备成抗菌肽乳基料,以期抗菌肽乳基料的研究和生产提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜牛乳,购于西北农林科技大学畜牧场。

大肠杆菌(*Escherichia coli* ACTT25922)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* 26111)、沙门氏菌(*Salmonella* LT₂),均由西北农林科技大学食品科学与工程学院保藏。

中性蛋白酶(40 000 U/g)、碱性蛋白酶(8 000 U/g)、胰蛋白酶(80 000 U/g)、木瓜蛋白酶(40 000 U/g),美国 Sigma 公司;考马斯亮蓝 G-250,美国 Amresco 公司;LS106 大孔吸附树脂(比表面积 1 200~1 600 m²/g),西安蓝深公司。其他试剂均为分析纯。

1.2 设备与仪器

PK121R 型低温冷冻离心机,意大利 ALC 公司;UV-1700 双光束紫外分光光度计,日本岛津公司;ES315 高压蒸汽灭菌锅,日本 TOMY 公司;SW-CJ-1F 超净工作台,苏净集团安泰公司;PB-10 pH 计,德国 Sartorius 公司;HES-380 智能恒温恒湿培养箱,宁波海曙赛福实验仪器厂;RE-52AA 旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂;AKTA 蛋白层析系统,美国 Amersham 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 牛乳酪蛋白的制备 新鲜无抗牛乳用孔径 74 μm 的滤网过滤除杂,于 4~5℃、5 000 r/min 离心 20 min 脱脂,用 2 mol/L HCl 溶液调 pH 至 4.6,静置 30 min;5 000 r/min 离心 10 min 去除上清液,沉淀用 0.05 mol/L HAc-NaAc 缓冲液(pH 4.6)洗涤 3 次,每次洗涤后 4 000 r/min 离心 10 min,所得沉淀物即为酪蛋白粗品^[8-9]。采用文献[10]的方法测定其蛋白含量。

1.3.2 酪蛋白酶解物的制备 称取适量酪蛋白于

三角瓶中,用 0.1 mol/L NaOH 助溶后,加水定容到刻度,放在恒温水浴锅中,待调节 pH 及温度至最适后,准确加入蛋白酶,水解过程中滴加 2 mol/L NaOH,以保持 pH 值的恒定。酶解结束后,95 ℃灭酶活 10 min。冷却到室温后,10 000×g 离心 20 min,取上清液过滤,滤液于 95 ℃灭菌 5 min,冷藏保存^[11-13]。

1.3.3 酶的筛选及水解时间的确定 根据预试验

表 1 4 种供试蛋白酶的酶解参数
Table 1 Enzymatic hydrolysis parameters of four proteases

名称 Name	酶解温度/℃ Temperature	pH	加酶量/(U·g ⁻¹) Quantity of protease
中性蛋白酶 Neutral protease	50	7.0	3 000
碱性蛋白酶 Alcalase	55	8.0	200
胰蛋白酶 Trypsin	40	7.0	3 000
木瓜蛋白酶 Papain	60	6.0	5 000

1.3.4 牛乳酪蛋白酶解物的大孔吸附树脂分离

(1) 吸附前酶解物质量浓度的确定。大孔吸附树脂对酪蛋白酶解物的吸附性能,是由大孔树脂的极性、比表面积和平均孔径等因素综合决定的^[18]。根据预试验,选用非极性、比表面积和平均孔径均较大的 LS-106 树脂,按文献[19]的方法进行预处理,在 5 个 50 mL 具塞锥形瓶中分别加入 10 mL 处理过的湿树脂,再分别加入 10 mL 质量浓度分别为 2.73, 5.46,10.92,21.85 和 43.70 mg/mL 的牛乳酪蛋白酶解物(V(湿树脂):V(酶解物)=1:1),放入 25 ℃摇床中 160 r/min 振荡 12 h。采用文献[11]的方法测定平衡吸附量和吸附率,确定动态吸附时样品的最佳质量浓度。(2)大孔吸附树脂对牛乳酪蛋白酶解物的动态吸附与解吸试验。牛乳酪蛋白酶解物以 0.5 mL/min 的流速经过 LS-106 大孔吸附树脂层析柱,检测流出液的吸光值 A_{220nm},以 A_{220nm}≤0.05为透过点。当多肽完全吸附后,用一定量的去离子水洗涤层析柱,再以 1.0 mL/min 的流速,用体积分数 25%,50%,75%,100%的乙醇溶液依次洗脱,分别收集各洗脱组分,经旋转蒸发仪浓缩后分析其抑菌活性^[11-13]。

1.3.5 牛乳酪蛋白酶解物乙醇洗脱组分的凝胶过滤色谱分离与纯化 凝胶色谱条件:柱子型号为 Superdex TM peptide 10/300 GL;检测波长为 220 nm;流动相为 0.05 mol/L(pH4.6)HAc-NaAc 缓冲液;流速为 0.8 mL/min;加样量为 0.3 mL。

1.3.6 牛乳酪蛋白功能性乳基料的制备 收集凝胶过滤色谱分离纯化后抑菌作用较强的洗脱峰,采用冷冻干燥法制备功能性乳基料。

和相关资料^[14-17],分别选用中性蛋白酶、碱性蛋白酶、胰蛋白酶和木瓜蛋白酶,并在其最优条件下(表 1)水解底物质量浓度为 60 g/L 的牛乳酪蛋白 1.5, 2.5,3.5,4.5 和 5.5 h,测定各酶酶解物对大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈平均直径,以 8.5 g/L 生理盐水为阴性对照,以质量浓度1 280 μg/mL 青霉素钠为阳性对照。根据抑菌圈大小,筛选水解效果较好的蛋白酶,并确定其水解时间。

1.3.7 抑菌活性测定 在测定牛乳酪蛋白酶解物的抗细菌活性时,一般选择不同类型细菌的典型代表进行试验。因此,本研究采用大肠杆菌、沙门氏菌作为革兰氏阴性(G⁻)菌的代表,用金黄色葡萄球菌作为革兰氏阳性(G⁺)菌的代表进行试验。参考文献[20]的方法测定分离组分对大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的的抑菌圈直径,但略有修改;按文献[21-22]的方法分别测定最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC);用文献[23]的方法测定多肽含量。

1.3.8 数据处理 采用 DPS 7.55 对试验数据进行统计与分析,结果以“平均值±标准偏差($\bar{x}\pm s$)”的形式表示。每组试验进行 3 个重复,必要时采用 Duncan’s 新复极差法进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 酶的筛选及水解时间的确定

4 种蛋白酶多时段水解牛乳酪蛋白,其酶解物对大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用差异较大(表 2),其中中性蛋白酶多时段水解牛乳酪蛋白的酶解物与阴性对照(生理盐水)一样,对 3 株供试菌均无抑制作用;胰蛋白酶和碱性蛋白酶酶解牛乳酪蛋白 2.5 h 的酶解物,分别对大肠杆菌和沙门氏菌具有一定抑制作用;木瓜蛋白酶酶解牛乳酪蛋白 4.5 h 的酶解物,对 3 株菌均有显著抑制作用。因此筛选木瓜蛋白酶为最适蛋白酶,水解时间为 4.5 h。后续试验的酶解物按照该方法制备。

2.2 大孔吸附树脂吸附前酶解物质量浓度的确定 大孔吸附树脂对牛乳酪蛋白酶解物的平衡吸附

量与吸附率见图 1。从图 1 可以看出,随着酶解物质量浓度的增加,平衡吸附量呈线性增加,吸附率却呈反 S 型降低。这是因为随着吸附的进行,体系中样品的质量浓度增加,平衡吸附量随之增加,但洗脱时大量的样品又被洗脱下来,总吸附率反而降低。

表 2 牛乳酪蛋白酶解物对大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径

Table 2 Diameter of antimicrobial circle of bovine casein hydrolysates agains

Escherichia coli, *Salmonella* and *Staphylococcus aureus*

mm

菌株 Strains	胰蛋白酶 酶解物(2.5 h) Hydrolysates of trypsin (2.5 h)	中性蛋白酶 酶解物 Hydrolysates of neutral protease	碱性蛋白酶 酶解物(2.5 h) Hydrolysates of alcalase (2.5 h)	木瓜蛋白酶 酶解物(4.5 h) Hydrolysates of papain (4.5 h)	生理盐水 Normal saline	青霉素钠 Penicillin-Na
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	11.0±0.2 c	—	—	12.5±0.5 b	—	38.0±1.2 a
沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	—	—	10.5±0.5 c	11.5±0.5 b	—	39.3±1.7 a
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	—	—	—	11.0±0.2 b	—	36.3±0.7 a

注:数据后的 a、b、c 表示组间差异显著性,字母不同表示差异显著($n=3, P<0.05$);琼脂孔直径为 8.0 mm;“—”表示无抑菌圈。下同。

Note: After the data a, b and c show significance of difference between groups, and different letters showed significant difference ($n=3, P<0.05$); Hole diameter of agar is 8.0 mm; “—” means no antibacterial circle. The following tables are the same.

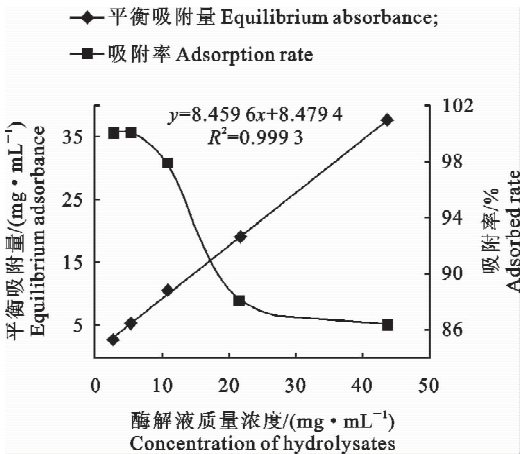


图 1 LS-106 大孔吸附树脂对牛乳酪蛋白酶解物的平衡吸附量与吸附率

Fig. 1 Equilibrium adsorbances and adsorption rates of bovine casein hydrolyzates using LS-106 macroporous resin

2.3 大孔吸附树脂乙醇洗脱组分的抑菌活性

牛乳酪蛋白酶解物经 LS-106 大孔吸附树脂洗脱后,其乙醇洗脱组分的抑菌效果见表 3。根据文献[24]的判定标准:抑菌圈直径>15 mm 为高度敏感,10~15 mm 为中度敏感,8~10 mm 为低度敏感,无抑菌圈者为不敏感。从表 3 可以看出,阳性对照青霉素钠对 3 株供试菌均高度敏感,阴性对照生理盐水对 3 株菌均不敏感,体积分数 25%和 50%乙醇洗脱组分对 3 株供试菌低度敏感或不敏感,体积分数 100%乙醇洗脱组分对 3 株菌均中度敏感,体积分数 75%乙醇洗脱组分对大肠杆菌和沙门氏菌高度敏感,对金黄色葡萄球菌中度敏感,且其与其他 3 种乙醇洗脱组分的抑菌活性均存在显著差异($P<0.05$),说明体积分数 75%乙醇洗脱组分的抑菌作用较强,其对大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径分别是酪蛋白酶解物的 1.24、1.33 和 1.27 倍。

表 3 牛乳酪蛋白酶解物不同体积分数乙醇洗脱组分对大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径

Table 3 Diameter of antimicrobial circle of ethanol with different volume ratios of against *Escherichia coli*,

Salmonella and *Staphylococcus aureus*

mm

菌株 Strains	不同体积分数乙醇洗脱组分 Different volume fraction of ethanol fractions				酪蛋白酶解物 Bovine casein hydrolyzates	生理盐水 Normal saline	青霉素钠 Penicillin-Na
	25%	50%	75%	100%			
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	—	—	15.5±1.0 b	12.3±0.7 c	13.5±0.5 c	—	38.0±1.2 a
沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	—	9.0±0.5 d	15.3±1.2 b	12.0±0.5 c	13.5±0.5 bc	—	49.3±1.7 a
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	9.3±0.2 e	9.5±0.5 e	14.0±0.5 b	11.3±0.2 d	13.0±0.2 c	—	36.3±0.7 a

进而对体积分数 75%乙醇洗脱组分进行 MIC 和 MBC 试验,结果表明,其对大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的 MIC 分别为 2.60,2.93 和 2.60 mg/mL,MBC 分别为 5.21,10.41 和 5.21 mg/mL。由于体积分数 75%乙醇洗脱组分的抑菌效果较好,选择其作进一步的分离。而对体积分数 25%,50%和 100%的乙醇洗脱组分,一是可以作为一般抗菌原料直接使用,二是可以开发为抗氧化和低过敏的乳基料。

2.4 牛乳酪蛋白酶解物 75%乙醇洗脱组分的分离与纯化

牛乳酪蛋白酶解物的体积分数 75%乙醇洗脱组分的凝胶过滤色谱见图 2。从图 2 可以看出,从牛乳酪蛋白酶解物体积分数 75%乙醇洗脱组分中共分离出 A、B、C 和 D 4 个色谱峰,其相对含量分别占总分离物的 57.38%,32.29%,6.62%和 3.71%,其中 A 峰和 B 峰所占比例较大,C 峰和 D 峰所占比例较小。

凝胶过滤色谱各峰洗脱液对沙门氏菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径见表 4。从表 4 可以看出,A 峰对大肠杆菌和沙门氏菌的抑菌作用较强,其抑菌圈直径分别是酪蛋白酶解物的 1.62 和

1.52 倍,是体积分数 75%乙醇洗脱组分的 1.31 和 1.13 倍;B 峰对金黄色葡萄球菌抑菌作用较强,其抑菌圈直径是酪蛋白酶解物的 1.59 倍,是体积分数 75%乙醇洗脱组分的 1.31 倍;C 峰对 3 株菌的抑制作用均弱于 A 峰和 B 峰;D 峰与阴性对照生理盐水一样,对 3 株菌均没有抑制作用。因此选择 A 峰和 B 峰进行 MIC 和 MBC 试验,其试验结果见表 5。

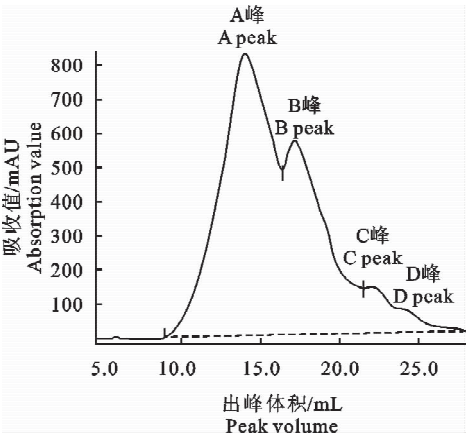


图 2 牛乳酪蛋白酶解物体积分数 75%乙醇洗脱组分的凝胶过滤色谱

Fig. 2 Gel filtration chromatography profile of bovine casein hydrolyzates eluted by ethanol of 75% volume ratio

表 4 牛乳酪蛋白酶解物凝胶过滤色谱组分对大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径								
Table 4 Diameter of antimicrobial circle of bovine casein hydrolyzates selected by gel filtration chromatography against <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> and <i>Staphylococcus aureus</i> mm								
菌株 Strains	凝胶过滤色谱组分 Fractions by gel filtration chromatography				酪蛋白酶解物 Bovine casein hydrolyzates	体积分数 75%乙醇洗脱组分 75% volume fraction of ethanol fractions	生理盐水 Normal saline	青霉素钠 Penicillin-Na
	A	B	C	D				
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	20.3±1.2 b	15.5±1.0 c	12.0±0.5 d	—	13.5±0.5 d	15.5±1.0 c	—	38.0±1.2 a
沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	17.3±0.7 b	14.5±0.5 cd	10.0±0.5 e	—	13.5±0.5 d	15.3±1.2 c	—	36.3±0.7 a
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	16.3±1.7 c	18.3±1.7 b	11.3±0.7 e	—	13.0±0.2 de	14.0±0.5 d	—	49.3±1.7 a

表 5 牛乳酪蛋白酶解物凝胶过滤色谱 A、B 洗脱峰组分对大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的 MIC 和 MBC						
Table 5 MIC and MBC of fractions A and fractions B by gel eluted chromatography against <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> and <i>Staphylococcus aureus</i> mg/mL						
菌株 Strains	A 峰 Fractions A		B 峰 Fractions B		体积分数 75%乙醇洗脱组分 75% volume fraction of ethanol fractions	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	0.121	0.484	0.168	0.671	2.600	5.210
沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	0.242	0.967	0.336	1.342	2.930	10.42
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	0.121	0.484	0.084	0.336	2.600	5.210

从表 5 可以看出, A 峰对大肠杆菌和沙门氏菌的 *MIC*、*MBC* 均较 B 峰小, 表明 A 峰对大肠杆菌和沙门氏菌的抑制作用较 B 峰强, 其抗菌活性(*MIC* 和 *MBC*)均达体积分数 75% 乙醇洗脱组分的 11 倍以上; B 峰对金黄色葡萄球菌的 *MIC*、*MBC* 均较 A 峰小, 表明 B 峰对金黄色葡萄球菌的抑制作用较 A 峰强, 其抗菌活性(*MIC* 和 *MBC*)分别是体积分数 75% 乙醇洗脱组分的 31 和 15 倍。表 4 和表 5 均说明, 体积分数 75% 乙醇洗脱组分经凝胶过滤色谱分离纯化后, 其抑菌活性进一步增强。

2.5 抗菌肽乳基料的制备

单独收集牛乳酪蛋白酶解物体积分数 75% 乙醇洗脱液的凝胶色谱 A 峰和 B 峰组分, 经冷冻干燥成功制备出 2 种抗菌肽乳基料。抗菌肽乳基料颜色类似乳清粉, 可以研成粉状, 但其吸湿性较强, 应该尽快密闭包装。由于冷冻干燥法制备抗菌肽乳基料的成本较高, 因此, 在工业化生产中宜选择喷雾干燥法。

3 结论与讨论

采用木瓜蛋白酶水解牛乳酪蛋白, 酶解物经大孔吸附树脂和凝胶过滤色谱分离、纯化后, 其分离组分的抑菌活性逐步增强, 其中 A 峰和 B 峰组分经冷冻干燥后, 于实验室成功制备了 2 种抗菌肽乳基料。

多肽分子中疏水性氨基酸残基所占的比例是影响多肽活性的因素之一, 而乙醇对大孔吸附树脂进行洗脱实质上是一种由疏水性质决定的置换过程, 而疏水性氨基酸含量高的组分需要较高体积分数的乙醇来解吸^[25-27]。本试验体积分数 75% 乙醇洗脱组分的抑菌作用较强, 这与文献^[25-27]的报道相一致。

本试验采用木瓜蛋白酶代替以往采用胃肠道蛋白酶(胃蛋白酶、胰蛋白酶、凝乳酶等)水解牛乳酪蛋白, 制备的酶解物经大孔吸附树脂和凝胶过滤色谱分离纯化后, 分离组分的抑菌活性显著提高, 制备的抗菌肽乳基料除可以作为抑菌配料外, 还可以提高制品的营养价值, 而且因为酪蛋白经过蛋白酶的降解, 其过敏性可能显著降低^[28-29], 但抗菌肽乳基料的实际应用还有待进一步研究。

胡志和等^[20]利用胰蛋白酶水解酪蛋白(底物质量浓度 6%)制备的抗菌肽, 对大肠杆菌进行抑菌试验, 发现其最大抑菌圈直径为 21.0 mm, 较本试验中木瓜蛋白酶酶解物对大肠杆菌的抑菌圈直径大, 原因可能是酶解底物纯度不同(前者酪蛋白是化学

纯, 本试验为酪蛋白粗品)所致。其次, 胡志和等^[20]的琼脂孔直径较本试验大 2 mm, 抑菌圈试验时加入酶解物的量较本试验多 10 μL 。翟青新等^[21]采用胰蛋白酶水解酪蛋白 2 h, 其酶解物对金黄色葡萄球菌有抑制作用, 而本研究经过多次试验均未发现这一现象, 具体原因有待进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Chandan R C, Kilara A. Dairy ingredients for food processing [M]. Ames: Blackwell Publishing Ltd, 2011: 2-10.
- [2] Chandan R C. Dairy-based ingredients [M]. Louis: American Association of Cereal Chemists, 1997: 3-16.
- [3] 汲全柱, 任静柏. 抗菌肽的研究进展 [J]. 现代畜牧兽医, 2010(4): 64-66.
Ji Q Z, Ren J B. Research progress of antimicrobial peptides [J]. Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2010(4): 64-66. (in Chinese)
- [4] 李 勇. 生物活性肽研究现况和进展 [J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(1): 3-9.
Li Y. Current progress and advances of study on bioactive peptides [J]. Food and Fermentation Industries, 2007, 33(1): 3-9. (in Chinese)
- [5] 郭 鸽, 任大喜, 张英华, 等. 发酵生产低致敏乳源蛋白基料的研究 [J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(10): 81-84.
Guo G, Ren D X, Zhang Y H, et al. Study on hypoallergenic protein ingredients from milk source by fermentation [J]. Food and Fermentation Industries, 2007, 33(10): 81-84. (in Chinese)
- [6] 任大喜, 霍贵成. 酶水解生产类母乳蛋白基料的研究 [J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(10): 186-190.
Ren D X, Huo G C. Research of humanized production milk protein material for infant formula by enzymatic hydrolysis [J]. Food and Fermentation Industries, 2010, 36(10): 186-190. (in Chinese)
- [7] 刘成果. 中国奶业年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2010: 163-164.
Liu C G. China dairy yearbook [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2010: 163-164. (in Chinese)
- [8] He Z M, Qi W, He M X. A novel exponential kinetic model for casein tryptic hydrolysis to prepare active peptides [J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2002, 10(5): 562-566.
- [9] 李志成, 蒋爱民, 岳田利, 等. 山羊乳酪蛋白酶解工艺及抗氧化性研究 [J]. 食品科学, 2009, 30(21): 252-257.
Li Z C, Jiang A M, Yue T L, et al. Investigations of enzymolysis technology and antioxidant activity of goats milk casein [J]. Food Science, 2009, 30(21): 252-257. (in Chinese)
- [10] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.
- [11] 卢蓉蓉, 王新保, 任 举. 大孔吸附树脂对乳铁蛋白抗菌肽脱盐作用的研究 [J]. 食品工业科技, 2008, 29(6): 91-94.

- Lu R R, Wang X B, Ren J. Study on desalination of lactoferrin antimicrobial peptides with macroporous adsorption resin [J]. Science and Technology of Food Industry, 2008, 29(6): 91-94. (in Chinese)
- [12] 钟 芳, 张晓梅, 麻建国. 大豆肽的大孔吸附树脂以及凝胶过滤色谱分离 [J]. 食品与机械, 2006, 22(4): 25-29.
Zhong F, Zhang X M, Ma J G. Isolation and identification of ACE inhibition peptides from soy hydrolytes fraction with macroporous adsorption resin and gel filtration [J]. Food and Machinery, 2006, 22(4): 25-29. (in Chinese)
- [13] 赵 利, 王 璋, 许时婴. 大孔吸附树脂对酪蛋白非磷肽的脱盐和色谱分离 [J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 22(4): 69-71.
Zhao L, Wang Z, Xu S Y. The application of macroporous adsorption resin in desalt and chromatographic separation of casein non-phosphate peptides [J]. Journal of Wuxi University of Light Industry, 2003, 22(4): 69-71. (in Chinese)
- [14] 胡仲秋, 李百玲, 李志成. 木瓜蛋白酶水解羊乳酪蛋白的工艺研究 [J]. 中国食品学报, 2009, 9(4): 82-87.
Hu Z Q, Li B L, Li Z C. Research on papain-catalysed hydrolytic technology of casein from goats milk [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2009, 9(4): 82-87. (in Chinese)
- [15] 孙 浩, 蔡兴旺. 碱性蛋白酶对酪蛋白水解的最适宜条件 [J]. 大连轻工业学院学报, 2003, 22(1): 25-27.
Sun H, Cai X W. Optimal condition for enzymically hydrolyzing casein by using alkaline protease [J]. Journal of Dalian Institute of Light Industry, 2003, 22(1): 25-27. (in Chinese)
- [16] 徐 微, 赵新淮. 酪蛋白水解物的中性蛋白酶修饰及其 ACE 抑制活性 [J]. 食品与工业发酵, 2010, 36(5): 17-22.
Xu W, Zhao X H. Modification of casein hydrolysates by neutrase and ACE inhibitory activity of the products [J]. Food and Fermentation Industries, 2010, 36(5): 17-22. (in Chinese)
- [17] 张虎刚, 张志翔, 万端极. 酪蛋白酶解制活性肽的工艺条件 [J]. 食品研究与开发, 2010, 31(11): 201-203.
Zhang H G, Zhang Z X, Wan D J. Casein solution process conditions of active peptide research [J]. Food Research and Development, 2010, 31(11): 201-203. (in Chinese)
- [18] 刘志东, 王荫榆, 曲映红, 等. 大孔吸附树脂对酪蛋白酶解物的吸附特性研究 [J]. 食品工业科技, 2008(6): 88-92.
Liu Z D, Wang Y Y, Qu Y H, et al. Study on adsorption of the hydrolysates of casein with macroporous adsorption resins [J]. Science and Technology of Food Industry, 2008(6): 88-92. (in Chinese)
- [19] 赵一明, 王 璋, 许时婴, 等. 大孔吸附树脂对酪蛋白非磷肽脱盐效果的研究 [J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(11): 22-25.
Zhao Y M, Wang Z, Xu S Y, et al. Study on the desalination of non-phosphopeptides casein with macroporous adsorption resin [J]. Food and Fermentation Industries, 2007, 33(11): 22-25. (in Chinese)
- [20] 胡志和, 庞广昌, 陈庆森, 等. 不同条件下水解酪蛋白所得到的抗菌肽抑菌效果比较 [J]. 食品科学, 2003, 24(2): 130-133.
Hu Z H, Pang G C, Chen Q S, et al. Comparison study on different hydrolysis conditions for better antibacterial effects of hydrolysates [J]. Food Science, 2003, 24(2): 130-133. (in Chinese)
- [21] 翟青新, 张源淑, 哈惠馨. 乳源抗菌肽的分离纯化及部分性质的研究 [J]. 药物生物技术, 2006, 13(6): 422-425.
Zhai Q X, Zhang Y S, Ha H X. Isolation of anti-bacterial peptide derived from milk and research of its partial character [J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2006, 13(6): 422-425. (in Chinese)
- [22] 刘倚帆, 徐 良, 朱海燕, 等. 抗菌肽与抗生素对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的体外协同抗菌效果研究 [J]. 动物营养学报, 2010, 22(5): 1457-1463.
Liu Y F, Xu L, Zhu H Y, et al. An *in vitro* study on combination of antimicrobial peptides and antibiotics against gram-negative and gram-positive bacteria [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2010, 22(5): 1457-1463. (in Chinese)
- [23] 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 G P, Song J M. Determination of content of peptides in protein hydrolysates [J]. Food Science, 2005, 26(7): 169-171. (in Chinese)
- [24] 顾仁勇, 张石峰, 刘莹莹, 等. 五种香辛料精油抑菌及抗氧化性能研究 [J]. 食品科学, 2008, 29(3): 106-108.
Gu R Y, Zhang S F, Liu Y Y, et al. Study on anti-oxidation and bacteriostasis of five spices essential oil [J]. Food Science, 2008, 29(3): 106-108. (in Chinese)
- [25] Cheung H S, Wang F L, Ondetti M A, et al. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1980, 255: 401-407.
- [26] Wu J, Ding X. Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides [J]. Food Research International, 2002, 35(4): 367-375.
- [27] 王昌涛, 韩 扬, 董银卯, 等. 采用大孔树脂纯化燕麦酶解产物的研究 [J]. 食品科技, 2007(12): 208-211.
Wang C T, Han Y, Dong Y M, et al. Application of macroporous adsorption resin in purification of oat hydrolysates [J]. Food Science and Technology, 2007(12): 208-211. (in Chinese)
- [28] Ena J M, Van Berestein E C H. Whey protein antigenicity reduction by fungal proteinases and a pepsin/pancreatic combination [J]. Journal of Food Science, 1995, 60(1): 104-116.
- [29] Van Hoeyveld E M, Escalona-Monge M, De Swert L F A, et al. Allergenic and antigenic activity of peptide fragments in a whey hydrolysate formula [J]. Clinical and Experimental Allergy, 1998, 28: 1131-1137.