

马尚玄, 郭刚军, 黄克昌, 等. 不同分子量澳洲坚果多肽氨基酸组成与抑菌活性 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(7): 83–88. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020060376

MA Shangxuan, GUO Gangjun, HUANG Kechang, et al. Amino Acid Compositions and Antibacterial Activities of Different Molecular Weight Macadamia Nut Polypeptides [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(7): 83–88. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020060376

· 研究与探讨 ·

不同分子量澳洲坚果多肽氨基酸组成与抑菌活性

马尚玄¹, 郭刚军^{1*}, 黄克昌¹, 胡小静², 付稼榕¹, 徐 荣¹, 李志燕², 邹建云¹

(1. 云南省热带作物科学研究所, 云南景洪 666100;

2. 文山学院化学与工程学院, 云南文山 663000)

摘 要: 以液压压榨澳洲坚果粕为原料, 采用碱性蛋白酶水解制备多肽 (MNP-0), 通过分级透析将其分离为 8 种不同分子量的澳洲坚果多肽 (MNP-1、MNP-2、MNP-3、MNP-4、MNP-5、MNP-6、MNP-7、MNP-8) 组分, 测定其多肽含量、氨基酸组成与抑菌活性。结果表明: 不同分子量澳洲坚果多肽呈现不同的质量占比, 氨基酸组成也有所差异。其中, 澳洲坚果多肽 MNP-8 占比最高, 为 25.09%, 其所含有的与抗菌作用有关的丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、脯氨酸及总疏水性氨基酸占比最高, 分别为 3.38%、2.42%、4.67%、4.39% 与 26.92%。多肽 MNP-6 占比也较高, 为 18.52%, 与多肽 MNP-4 无显著性差异 ($P>0.05$), 其所含有的与抗菌作用有关的赖氨酸占比最高, 为 6.03%。不同分子量澳洲坚果多肽抑菌效果也不尽相同, 其对金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌、大肠埃希氏菌、铜绿假单胞菌抑菌活性较好, 对白色念珠菌与黑曲霉相对较差。其中, 澳洲坚果多肽 MNP-8 对金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌、大肠埃希氏菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌抑菌活性最好, 在 4 mg/mL 浓度下, 其抑菌圈直径分别为 15.92、14.67、13.70、16.98、12.47 mm, 最低抑菌浓度 (MIC) 分别为 4.0、5.0、4.5、3.5、18.0 mg/mL。不同分子量澳洲坚果多肽的抑菌活性与其分子量及氨基酸组成密切相关。

关键词: 澳洲坚果, 多肽, 氨基酸组成, 抑菌活性

中图分类号: TS229

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)07-0083-06

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020060376

Amino Acid Compositions and Antibacterial Activities of Different Molecular Weight Macadamia Nut Polypeptides

MA Shangxuan¹, GUO Gangjun^{1*}, HUANG Kechang¹, HU Xiaojing², FU Jiarong¹, XU Rong¹,

LI Zhiyan², ZOU Jianyun¹

(1. Yunnan Institute of Tropical Crops, Jinghong 666100, China;

2. School of Chemistry and Engineering, Wenshan University, Wenshan 663000, China)

Abstract: Macadamia nut polypeptides was prepared by the alkali protease hydrolysis. Eight constituents (MNP-1, MNP-2, MNP-3, MNP-4, MNP-5, MNP-6, MNP-7, MNP-8) were obtained by dialysis technology, its peptides contents, amino acid compositions and antibacterial activities were analyzed. Results showed that the quality proportions and amino acid compositions of different molecular weight Macadamia nut polypeptides were different. Macadamia nut polypeptide MNP-8 had the highest proportions, which was 25.09%, its alanine, valine, leucine, proline and total hydrophobic amino acids related to antimicrobial activity had the highest proportion, which were 3.38%, 2.42%, 4.67%, 4.39% and 26.92%, respectively. The polypeptide MNP-6 had the higher proportions, which was 18.52%, and was no significant difference with the polypeptide MNP-4 ($P>0.05$), its lysine related to antimicrobial activity had the highest proportion, which was 6.03%.

收稿日期: 2020-07-02

基金项目: 云南省热带作物科学研究所青年成长基金 (QNCZ2020-5); 云南省热带作物科技创新体系建设专项 (RF2020-14, RF2019-11, RF2018-10)。

作者简介: 马尚玄 (1994-), 女, 本科, 研究实习生, 研究方向: 食品贮藏与加工, E-mail: 1325730010@qq.com。

* 通信作者: 郭刚军 (1980-), 男, 硕士, 副研究员, 研究方向: 食品加工和植物中天然产物提取分离与功能, E-mail: guogangjun2001@126.com。

The antibacterial activities of different molecular weight Macadamia nut polypeptides were also different, which had the better antibacterial activities on the *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, and the worse antibacterial activities on the *Candida albicans* and *Aspergillus niger*. Macadamia nut polypeptide MNP-8 had the best antibacterial activities on the *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*, its diameter of bacteriostatic zones were 15.92, 14.67, 13.70, 16.98, respectively, and 12.47 mm at a concentration of 4 mg/mL, and the MIC were 4.0, 5.0, 4.5, 3.5 and 18.0 mg/mL, respectively. The antibacterial activities of different molecular weight Macadamia nut polypeptides were closely related to their molecular weight and amino acid compositions. This study provided the references for the development and utilization of the antibacterial activities of Macadamia nut polypeptides.

Key words: Macadamia nut; polypeptides; amino acid composition; antibacterial activity

澳洲坚果(*Macadamia* spp.), 又名昆士兰栗、夏威夷果、巴布果、澳洲胡桃等, 其可食部分为果仁, 既可生吃、又可烤制; 烤制后酥脆细腻, 味美可口, 风味极佳, 经济价值高, 在国际市场上极受青睐, 被誉为“坚果之王”^[1-2]。其脂肪含量高达 65%~80%, 蛋白质含量 8%~20%, 还含有相当量的碳水化合物、多酚、黄酮、甾醇、生育酚、角鲨烯等营养与功能成分^[3-4]。近年来, 我国澳洲坚果产业发展迅猛, 据农业农村部农垦局统计, 2018 年全国澳洲坚果种植面积 451.81 万亩。随着《云南省澳洲坚果产业规划(2013-2020)》的实施, 我国澳洲坚果带壳果产量有望达到 100 万吨/年, 澳洲坚果油将成为重要的产品形式^[5]。而榨油后的副产物澳洲坚果粕含有较高含量的蛋白质, 通过酶法及相关分离技术制备多肽是提高其利用率的有效途径之一^[6]。

微生物滋生或污染是影响食品保质期的主要因素, 工业上, 通常使用含有化学成分的防腐剂来抑制微生物的生长, 延缓产品的腐败^[7]。随着人类健康与安全意识的增强, 天然抑菌防腐物质成为世界各国研究的热点^[8]。抗菌多肽由于其天然的抗菌性能和较弱的细菌耐药性, 可替代化学防腐剂或抗生素等防腐抗菌药物, 如 Nisin 一样作为天然防腐剂应用于食品保鲜领域^[9]。本文利用液压压榨后的澳洲坚果粕蛋白质含量高(30% 左右)、未变性等特点, 制备并寻找一种或多种多肽作为天然食品保鲜剂^[10]。国内外研究发现, 功能多肽的制备可通过对蛋白质适当酶解获得^[11-12], 相对于化学法, 其具有反应条件温和、时间短、产品营养与保健价值高等优点^[13]。多肽的生物活性是由其氨基酸的构成决定的, 具体而言是氨基酸的种类、数量及排列顺序。在多肽制备时, 酶的种类和反应条件决定着其相对分子质量大小和氨基酸序列^[14]。目前, 利用蛋白酶水解法制备澳洲坚果多肽已有文献报道^[6, 15], 但有关其不同分子量多肽的分布、成分构成与生物活性的研究尚不多见。本研究利用碱性蛋白酶水解制备澳洲坚果多肽, 分级透析分离不同分子量的多肽, 研究其氨基酸组成与抑菌活性, 以期对澳洲坚果的深度利用和开发新型天然食品防腐剂提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

液压压榨澳洲坚果粕 西双版纳云垦澳洲坚果科技开发有限公司; 碱性蛋白酶(10 万 U/g) 广西南宁东恒华道生物科技有限公司; 金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌、大肠埃希氏菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌、黑曲霉 上海鲁微科技有限公司; 透析袋 美国联合碳化 Viskase 公司; 营养琼脂、牛肉膏、蛋白胨、酵母膏、三氯乙酸、盐酸、氢氧化钠、无水硫酸铜、酒石酸钾钠、氯化钠等试剂 均为分析纯。

RV10 型旋转蒸发仪 德国 IKA 集团; DZKW-4 型电子恒温水浴锅 上海科析试验仪器厂; 722 型可见分光光度计 上海精风仪器有限公司; TD5A-WS 型离心机湖南湘仪 离心机仪器有限公司; YXQ-LS-50A 型立式压力蒸汽灭菌器 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; 生化培养箱 上海一恒科学仪器有限公司; 150T 型多功能粉碎机 上海比朗仪器有限公司; AL 型电子天平 梅特勒-托利多仪器上海有限公司; 牛津杯 广州市昕迪实验器材有限公司; L-8800 型氨基酸自动分析 日本日立公司。

1.2 实验方法

1.2.1 澳洲坚果多肽的制备 本研究澳洲坚果多肽的制备工艺及酶解条件参考文献 [6], 具体如下: 液压压榨澳洲坚果粕经温度 50 ℃ 烘干, 粉碎, 过 60 目筛, 加入适量的蒸馏水搅拌调浆, 冷却至酶作用的适合温度, 加入适量的碱性蛋白酶, 调 pH 至恒定, 进行一定时间恒温酶水解, 反应结束后, 采用沸水灭酶 10 min, 冷却至室温, 用离心机于转速 4000 r/min 条件下离心 10 min, 取其上清液, 调 pH 为 4.6(蛋白质等电点), 静置 30 min 后再于转速 4000 r/min 条件下离心 10 min, 取其上清液, 真空浓缩, 冷冻干燥, 得澳洲坚果多肽(MNP-0)。酶解条件为: 酶解温度 60 ℃, 酶解时间 3.5 h, 底物浓度 110 g/L, 酶解 pH8.0, 加酶量 2400 U/g(占坚果粕质量)。

1.2.2 不同分子量澳洲坚果多肽的分离 配制 40 mg/mL 的澳洲坚果多肽(MNP-0)溶液, 然后采用截留分子量 20000、10000、5000、3000、2000、1000、500 与 300 Da 的透析袋逐级分离, 得到 MNP-1

(10000 Da<Mr<20000 Da)、MNP-2(5000 Da<Mr<10000 Da)、MNP-3(3000 Da<Mr<5000 Da)、MNP-4(2000 Da<Mr<3000 Da)、MNP-5(1000 Da<Mr<2000 Da)、MNP-6(500 Da<Mr<1000 Da)、MNP-7(300 Da<Mr<500 Da)、MNP-8(Mr<300 Da) 8 种澳洲坚果多肽组分,并以 MNP-0 为对照,测定其多肽含量,真空浓缩,冷冻干燥。

1.2.3 多肽与氨基酸组成的测定 多肽含量测定:双缩脲法^[16],以标准酪蛋白为标样,采用最小二乘法做线性回归,得酪蛋白标准液质量浓度 $C(\text{mg/mL})$ 与吸光度 A 关系曲线的回归方程: $C=0.0288A+0.0003$,决定系数 $R^2=0.9999$ 。然后取澳洲坚果多肽液 1 mL,加入 4 mL 双缩脲试剂,混匀,室温下放置 30 min,在 540 nm 处测定吸光度,对照标准曲线,换算得出样品中的多肽含量;计算多肽质量占比,参照文献^[6]中公式计算。

氨基酸组成测定:按照 GB/T 5009.124-2003《食品中氨基酸的测定》测定,并参考文献^[17],利用氨基酸分析仪测定澳洲坚果多肽组分的氨基酸组成。

1.2.4 不同分子量澳洲坚果多肽抑菌活性测定

1.2.4.1 菌悬液的制备 细菌菌悬液的制备:将供试细菌接种到牛肉膏蛋白胨固体培养基上,于温度 $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ 的培养箱中培养 24~48 h 活化。取活化好的菌种在无菌条件下,分别挑取一环放入 10 mL 的无菌水中,混匀,采用光电比浊法测定 $\text{OD}_{560\text{ nm}}$,配制活菌数 $1.45\times 10^8\text{ CFU/mL}$ 的细菌菌悬液,备用。

真菌菌悬液的制备:将供试白色念珠菌接种到 YPD 培养基上、黑曲霉接种到马铃薯葡萄糖培养上,于温度 $(26\pm 1)^\circ\text{C}$ 的培养箱中培养 48~72 h 活化,分别挑取一环真菌孢子或菌丝,放入 10 mL 的无菌水中,混匀,备用^[18]。

1.2.4.2 牛津杯法测定 将菌悬液均匀涂布在含有培养基的平板上,每个平板分 3 次涂布,每次涂 1/3,均匀涂布后,取 3 个已灭菌的牛津杯,均匀等距的放置于平板上,呈正三角形排列,分别取 0.2 mL 4 mg/mL 的多肽液样品加入牛津杯中,在 $(4\pm 1)^\circ\text{C}$ 温度下扩散处理 4 h,细菌在温度 37°C 培养 24 h,真菌在温度 27°C 培养 48 h,观察菌落生长情况,采用交叉法测量抑菌圈直径^[19-20]。

1.2.4.3 最低抑菌浓度(MIC)的测定 分别取 1 mL 不同分子量多肽液放入平板中,加入 1 mL 无菌水,混匀,然后再取 1 mL 放入下一个平板,加入 1 mL 无菌水混匀,依次重复上述操作,直到稀释到最小值。然后分别倒入培养基,轻微振荡,使多肽液与培养基充分混匀,待冷却后,分别取 0.2 mL 悬菌液涂布,然后放入培养箱中培养,确定出无菌生长的浓度,然后在此浓度上以 0.5 mg/mL 或 1.0 mg/mL 浓度梯度递减,倒入培养基培养,重复上述操作,确定不同分子量澳洲坚果多肽的最低抑菌浓度^[21-22]。

1.3 统计分析

数据采用 SAS 9.2 软件处理,应用 Duncan's 法进行显著性分析,以 $P<0.05$ 为显著性差异。用 Origin 8.5 软件进行数据图像处理。

2 结果与分析

2.1 不同分子量澳洲坚果多肽的质量分布

由图 1 可知,不同分子量澳洲坚果多肽具有不同的质量占比,其中,多肽 MNP-8 的质量占比最高,为 25.09%,与其他分子量的多肽存在显著性差异($P<0.05$),其次是多肽 MNP-4 与 MNP-6,其占比分别为 19.11% 与 18.52%,两者之间无显著性差异($P>0.05$)。多肽质量占比最低的是多肽 MNP-1 与 MNP-2,分别为 5.60% 与 5.20%,两者之间无显著性差异($P>0.05$)。研究发现^[23-24],多肽的分子量大小是影响蛋白肽生物活性的关键因素,分子量越小抗菌活性越高。由此推断,澳洲坚果多肽 MNP-8 分子量最低,质量占比最高,其可能具有较好的抑菌活性。

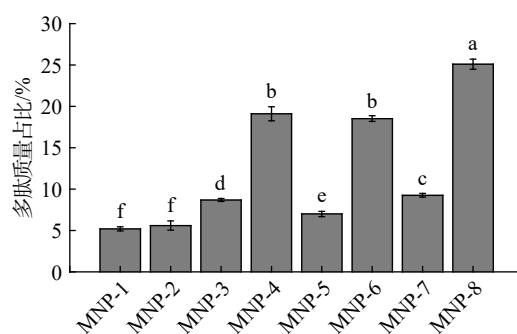


图 1 不同分子量澳洲坚果多肽质量占比

Fig.1 Quality proportions of Macadamia nut polypeptides different with different molecular weight

注:字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

2.2 不同分子量澳洲坚果多肽的氨基酸组成

具有抗菌作用的肽类一级结构比较相似,N 端富含赖氨酸和精氨酸等阳离子型氨基酸,C 端富含丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸等非极性氨基酸,中间部分则富含脯氨酸^[25],在 β 折叠型结构类与伸展性螺旋结构类中的抗菌肽均富含脯氨酸^[26]。由表 1 可知,澳洲坚果多肽 MNP-8 中含有与抗菌作用有关的丙氨酸、缬氨酸与亮氨酸占比显著高于其它多肽($P<0.05$),分别为 3.38%、2.42% 与 4.67%。多肽 MNP-8 与 MNP-3 的澳洲坚果多肽中所含有的脯氨酸占比最高,两者无显著性差异($P>0.05$),与多肽 MNP-0 及其他分子量多肽存在显著性差异($P<0.05$),多肽 MNP-8 的脯氨酸占比为 4.39%。澳洲坚果多肽 MNP-8 含有的赖氨酸占比相对较高,仅低于多肽 MNP-6,与多肽 MNP-0 无显著性差异($P>0.05$),为 5.51%。氨基酸的疏水性可直接影响抗菌肽对菌体细胞膜的透化作用,且肽的脂质体渗透性和杀菌活性随着疏水性的增加而增加^[27],总疏水性氨基酸占比越高,多肽的抑菌活性越强。澳洲坚果多肽 MNP-8 的

表 1 不同分子量澳洲坚果多肽的氨基酸组成(%)

Table 1 Amino acid composition of Macadamia nut polypeptides with different molecular weight (%)

氨基酸	MNP-0	MNP-1	MNP-2	MNP-3	MNP-4	MNP-5	MNP-6	MNP-7	MNP-8
天门冬氨酸	10.50±0.02 ^e	7.72±0.02 ^h	7.26±0.10 ⁱ	10.09±0.00 ^g	11.10±0.06 ^c	11.53±0.10 ^b	10.22±0.07 ^f	10.66±0.04 ^d	11.76±0.02 ^a
苏氨酸	2.82±0.00 ^d	2.57±0.04 ^e	2.69±0.07 ^e	2.82±0.11 ^d	3.23±0.06 ^c	3.50±0.08 ^b	1.18±0.04 ^f	3.86±0.10 ^a	3.60±0.06 ^b
丝氨酸	3.68±0.12 ^h	6.25±0.03 ^a	5.65±0.07 ^b	3.99±0.06 ^g	4.24±0.12 ^f	5.20±0.10 ^d	3.54±0.08 ^b	4.80±0.06 ^e	4.98±0.04 ^e
谷氨酸	29.99±0.05 ^g	32.35±0.03 ^c	36.56±0.08 ^a	36.38±0.12 ^a	35.72±0.06 ^b	32.09±0.01 ^d	30.93±0.09 ^e	30.44±0.02 ^f	26.02±0.08 ^h
甘氨酸	5.01±0.05 ^e	3.68±0.04 ^g	5.11±0.06 ^e	4.93±0.00 ^f	5.65±0.02 ^d	6.10±0.00 ^a	5.90±0.04 ^b	5.62±0.02 ^d	5.79±0.06 ^e
丙氨酸	2.08±0.00 ^c	2.94±0.02 ^b	1.88±0.00 ^e	1.64±0.00 ^f	1.11±0.01 ^g	1.69±0.05 ^f	2.10±0.08 ^e	1.99±0.03 ^d	3.38±0.04 ^a
胱氨酸	1.60±0.06 ^c	3.68±0.07 ^a	2.96±0.00 ^b	2.35±0.12 ^c	2.42±0.08 ^c	1.69±0.06 ^e	1.97±0.00 ^d	1.64±0.00 ^e	0.68±0.02 ^f
缬氨酸	1.93±0.02 ^d	0.74±0.04 ⁱ	1.08±0.02 ^h	1.17±0.01 ^g	1.61±0.03 ^f	1.81±0.02 ^e	2.10±0.07 ^e	2.34±0.00 ^b	2.42±0.00 ^a
蛋氨酸	1.08±0.00 ^e	2.21±0.04 ^a	1.34±0.03 ^d	1.41±0.00 ^c	0.40±0.01 ^g	0.34±0.00 ^h	0.52±0.01 ^f	0.35±0.01 ^h	1.69±0.00 ^b
异亮氨酸	2.62±0.02 ^b	1.10±0.00 ^h	1.34±0.05 ^g	1.64±0.06 ^e	1.51±0.02 ^f	1.92±0.01 ^d	2.36±0.04 ^e	2.34±0.02 ^e	3.07±0.00 ^a
亮氨酸	3.71±0.04 ^d	1.10±0.08 ⁱ	1.88±0.09 ^h	2.35±0.02 ^g	2.72±0.00 ^f	3.28±0.04 ^e	3.80±0.02 ^e	4.10±0.00 ^b	4.67±0.05 ^a
酪氨酸	5.41±0.04 ^d	4.04±0.06 ^g	4.84±0.02 ^e	4.23±0.00 ^f	5.45±0.08 ^d	5.76±0.01 ^c	5.77±0.09 ^e	6.32±0.00 ^a	5.96±0.02 ^b
苯丙氨酸	2.31±0.02 ^{cd}	0.74±0.00 ^h	1.34±0.04 ^f	1.17±0.02 ^g	1.92±0.04 ^e	2.37±0.05 ^c	2.23±0.06 ^d	2.81±0.03 ^b	3.04±0.01 ^a
组氨酸	2.02±0.07 ^h	4.41±0.03 ^a	3.23±0.04 ^d	3.76±0.03 ^b	2.52±0.03 ^g	2.94±0.00 ^f	3.41±0.02 ^e	3.04±0.00 ^e	1.97±0.02 ⁱ
赖氨酸	5.52±0.07 ^b	3.68±0.05 ^e	3.49±0.12 ^f	4.23±0.08 ^d	4.94±0.10 ^c	4.97±0.08 ^c	6.03±0.06 ^a	5.50±0.02 ^b	5.51±0.01 ^b
精氨酸	15.44±0.02 ^b	18.75±0.11 ^a	15.05±0.06 ^c	13.38±0.06 ^e	11.71±0.05 ^f	11.86±0.12 ^f	14.55±0.04 ^d	11.12±0.08 ^g	11.08±0.00 ^g
脯氨酸	4.29±0.00 ^b	3.31±0.03 ^f	4.03±0.02 ^e	4.46±0.05 ^a	3.94±0.02 ^d	2.82±0.06 ^h	3.41±0.03 ^e	3.04±0.08 ^g	4.39±0.04 ^a
总疏水性氨基酸	22.35±0.02 ^c	13.97±0.04 ⁱ	16.40±0.05 ^h	16.67±0.03 ^g	18.26±0.02 ^f	19.66±0.04 ^e	21.76±0.06 ^d	22.95±0.04 ^b	26.92±0.03 ^a

注: 同行不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

总疏水性氨基酸占比最高, 与多肽 MNP-0 及其他分子量多肽存在显著性差异($P<0.05$), 为 26.92%, 其次为多肽 MNP-7, 占比为 22.95%, 与其他分子量多肽存在显著性差异($P<0.05$), 多肽 MNP-1 占比最低, 仅为 13.97%。由此推断, 澳洲坚果多肽 MNP-8 的丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸与脯氨酸及总疏水性氨基酸占比最高, 其可能具有较高的抑菌活性。

2.3 不同分子量澳洲坚果多肽的抑菌活性

由表 2 可知, 澳洲坚果多肽 MNP-0 与不同分子量多肽对受试的细菌和真菌呈现出不同的抑菌活性, 其中, 多肽 MNP-8 对金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌、大肠埃希氏菌、铜绿假单胞菌与白色念珠菌抑菌活性最好, 抑菌圈直径分别为 15.92、14.67、13.70、16.98 与 12.47 mm, 与多肽 MNP-0 及其他分子量多肽存在显著性差异($P<0.05$); 其与多肽 MNP-1 对黑曲霉的抑菌活性最好, 抑菌圈直径分别为

8.60 与 7.83 mm, 两者之间无显著性差异($P>0.05$)。其次, 多肽 MNP-0 对金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌、大肠埃希氏菌与白色念珠菌抑菌活性较好, 抑菌圈直径分别为 11.83、11.25、9.92 与 8.29 mm, 优于除多肽 MNP-8 以外的样品; 其与多肽 MNP-3 对铜绿假单胞菌的抑菌活性较好, 抑菌圈直径分别为 11.58 与 10.31 mm, 两者之间无显著性差异($P>0.05$), 优于除多肽 MNP-8 以外的样品; 多肽 MNP-2 与 MNP-5 对黑曲霉抑菌活性较好, 抑菌圈直径分别为 6.45 与 6.32 mm, 两者之间无显著性差异($P>0.05$), 优于除多肽 MNP-8 以外的样品。其他分子量多肽样品抑菌效果相对较差, 多肽 MNP-4 与 MNP-7 对金黄色葡萄球菌, 多肽 MNP-1 对鼠伤寒沙门氏菌, 多肽 MNP-2 对大肠埃希氏菌, 多肽 MNP-5 对铜绿假单胞菌, 多肽 MNP-3、MNP-4 与 MNP-7 对黑曲霉均无抑菌效果。由上述分析可知, 不同分子量澳洲

表 2 不同分子量澳洲坚果多肽的抑菌活性

Table 2 Antibacterial activities of Macadamia nut polypeptides with different molecular weight

样品	抑菌圈直径(mm)					
	金黄色葡萄球菌	鼠伤寒沙门氏菌	大肠埃希氏菌	铜绿假单胞菌	白色念珠菌	黑曲霉
MNP-0	11.83±0.61 ^b	11.25±0.57 ^b	9.92±0.96 ^b	11.58±1.02 ^b	8.29±0.18 ^b	1.99±0.29 ^d
MNP-1	7.53±1.19 ^d	0.00±0.00 ^f	6.08±0.06 ^c	7.73±0.28 ^c	5.75±0.12 ^e	7.83±1.09 ^a
MNP-2	6.67±0.38 ^d	3.58±0.19 ^b	0.00±0.00 ^e	9.67±0.61 ^c	6.58±0.18 ^d	6.45±0.31 ^b
MNP-3	10.08±0.79 ^c	8.25±0.48 ^c	5.63±0.19 ^c	10.31±0.40 ^{bc}	5.78±0.05 ^e	0.00±0.00 ^e
MNP-4	0.00±0.00 ^e	7.42±0.19 ^d	5.92±0.51 ^c	8.48±0.12 ^d	7.18±0.14 ^e	0.00±0.00 ^e
MNP-5	8.83±1.00 ^{cd}	7.08±0.60 ^b	6.00±0.24 ^c	0.00±0.00 ^f	3.15±0.41 ^f	6.32±0.23 ^b
MNP-6	7.00±0.50 ^d	6.17±0.15 ^e	3.83±0.33 ^d	8.03±0.00 ^e	6.37±0.28 ^d	4.70±0.22 ^c
MNP-7	0.00±0.00 ^e	7.92±0.51 ^{cd}	6.03±0.88 ^c	8.37±1.03 ^{cd}	7.20±0.33 ^c	0.00±0.00 ^e
MNP-8	15.92±0.51 ^a	14.67±0.15 ^a	13.70±0.44 ^a	16.98±0.68 ^a	12.47±0.46 ^a	8.60±0.22 ^a

注: 同列字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

坚果多肽具有不同的抑菌活性,这可能与它们拥有不同分子量、抗菌氨基酸组成及结构特征等密切相关,其可以破坏微生物细胞膜的通透性,瓦解细胞壁,抑制蛋白质合成,引起其能量代谢系统紊乱,从而发挥抑菌作用^[28]。宋惠平等^[29]将条斑紫菜水溶性蛋白胃蛋白酶水解物分成 Mr<5 kDa、5 kDa<Mr<10 kDa、10 kDa<Mr<50 kDa、50k Da<Mr<100 kDa 和 Mr>100 kDa 5 种不同分子量多肽组分,研究发现分子量最小的 Mr<5 kDa 多肽组分对金黄色葡萄球菌抑菌活性最强;蒋雨晴等^[30]利用胃蛋白酶水解卵白蛋白制备多肽,采用超滤技术将其分为 Mr>10 kDa、3 kDa<Mr<10 kDa、Mr<3 kDa 3 种不同分子量的多肽,实验结果表明,分子量最小的 Mr<3 kDa 多肽组分对大肠杆菌和沙门氏菌具有最好的抑菌作用,这和本研究结果一致。综合来看,相同浓度澳洲坚果多肽 MNP-8 对各受试菌抑菌圈直径最大,抑菌效果最好;多肽 MNP-0 的抑菌效果次之。因此,本文进一步对其最低抑菌浓度(MIC)进行了研究。

2.4 澳洲坚果多肽最低抑菌浓度 (MIC)

2.4.1 多肽 MNP-8 最低抑菌浓度(MIC) 由表 3、表 4 可知,澳洲坚果多肽 MNP-8 对不同类型的微生物均有不同程度的抑制作用,受试细菌中受抑制作用最为明显的是铜绿假单胞菌,其 MIC 为 3.5 mg/mL,其次是金黄色葡萄球菌, MIC 为 4.0 mg/mL,相对较差的是大肠埃希氏菌和鼠伤寒沙门氏菌, MIC 分别为 4.5 和 5 mg/mL。多肽 MNP-8 对受试真菌白色念珠菌与黑曲霉抑菌效果相对较差,其对白色念珠菌的 MIC 为 18.0 mg/mL;而在 0~28 mg/mL 多肽浓度范围内,均有黑曲霉菌生长,达不到最低抑菌浓度。研究证实天然抗菌活性多肽具有活性强、广谱杀菌、易被人体消化水解且无毒副作用的优点,对食品中的多种微生物都有很强的杀灭作用,是一类新型的生物防腐剂^[31-32]。在食品加工中添加抗菌活性多肽可减少化学防腐剂的使用量,减轻热处理程度,且能保证食品

表 3 澳洲坚果多肽 MNP-8 对细菌的 MIC

Table 3 MIC of bacterias of Macadamia nut polypeptide MNP-8

样品	细菌菌株	质量浓度(mg/mL)							
		6.0	5.5	5.0	4.5	4.0	3.5	3.0	0.15
澳洲坚果多肽MNP-8	金黄色葡萄球菌	-	-	-	-	-	+	+	+
	鼠伤寒沙门氏菌	-	-	-	+	+	+	+	+
	大肠埃希氏菌	-	-	-	-	+	+	+	+
	铜绿假单胞菌	-	-	-	-	-	-	+	+

注: +: 表示有菌生长; -: 表示无菌生长; 表4~表6同。

表 4 澳洲坚果多肽 MNP-8 对真菌 MIC

Table 4 MIC of fungus of Macadamia nut polypeptide MNP-8

样品	真菌菌株	质量浓度(mg/mL)								
		28.0	24.0	22.0	21.0	20.0	19.0	18.0	17.0	16.0
澳洲坚果多肽MNP-8	白色念珠菌	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	黑曲霉	+	+	+	+	+	+	+	+	+

的营养与风味,延长货架期,在果汁、蔬菜、水果、食用菌、牛奶、冷鲜肉中保鲜效果良好,具有替代化学防腐剂的潜能,拥有广阔的应用前景^[33]。

2.4.2 多肽 MNP-0 最低抑菌浓度(MIC) 由表 5、表 6 可知,澳洲坚果多肽 MNP-0 对细菌金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌、大肠埃希氏菌与铜绿假单胞菌等细菌的抑菌效果相对较好,其 MIC 分别为 20.0、22.0、19.0、18.0 mg/mL。其对真菌白色念珠菌与黑曲霉的抑菌活性较差,对白色念珠菌的 MIC 为 28.0 mg/mL,而在 0~33 mg/mL 浓度范围内,均有黑曲霉菌生长,达不到最低抑菌浓度。澳洲坚果多肽 MNP-0 对除黑曲霉外的各种细菌和真菌的抑菌效果低于多肽 MNP-8。

表 5 澳洲坚果多肽 MNP-0 对细菌的 MIC

Table 5 MIC of bacterias of Macadamia nut polypeptide MNP-0

样品	细菌菌株	质量浓度(mg/mL)							
		24.0	23.0	22.0	21.0	20.0	19.0	18.0	17.0
碱性蛋白酶水解多肽	金黄色葡萄球菌	-	-	-	-	-	+	+	+
	鼠伤寒沙门氏菌	-	-	-	+	+	+	+	+
	大肠埃希氏菌	-	-	-	-	-	-	+	+
	铜绿假单胞菌	-	-	-	-	-	-	-	+

表 6 澳洲坚果多肽 MNP-0 对真菌的 MIC

Table 6 MIC of fungus of Macadamia nut polypeptide MNP-0

样品	真菌菌株	质量浓度(mg/mL)								
		33.0	32.0	31.0	30.0	29.0	28.0	27.0	26.0	25.0
碱性蛋白酶水解多肽	白色念珠菌	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	黑曲霉	+	+	+	+	+	+	+	+	+

3 结论

利用分级透析将碱性蛋白酶水解制备澳洲坚果多肽分离为 8 种不同分子量的多肽组分,其呈现不同的质量占比,氨基酸组成与抑菌活性也有所不同。其中,澳洲坚果多肽 MNP-8 质量占比最高,其所含有的与抗菌作用有关的丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、脯氨酸及总疏水性氨基酸占比也最高;不同分子量澳洲坚果多肽抑菌效果也不尽相同,其对金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌、大肠埃希氏菌、铜绿假单胞菌抑菌活性较好,对白色念珠菌与黑曲霉相对较差。其中,澳洲坚果多肽 MNP-8 对细菌类的金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌、大肠埃希氏菌、铜绿假单胞菌与真菌类的白色念珠菌、黑曲霉抑菌效果最好,其对受试细菌的抑菌活性优于真菌。实验结果表明,澳洲坚果多肽 MNP-8 具有较好的抑菌活性,下一步可对其肽段进行分离纯化,评价生物活性,测定氨基酸序列,为澳洲坚果功能肽的开发与应用提供一定的理论依据。

参考文献

[1] Navarro S L B, Rodrigues C E C. Macadamia oil extraction methods and uses for the defatted mealbyproduct[J]. Trends in Food Science & Technology, 2016, 54: 148-158.

- [2] 施彬, 聂艳丽, 贺熙勇. 澳洲坚果丰产栽培管理技术[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2016: 2.
- [3] Wall M M. Functional lipid characteristics, oxidative stability, and antioxidant activity of macadamia nut (*Macadamia integrifolia*) cultivars[J]. *Food Chemistry*, 2014, 121: 1103–1108.
- [4] Buthelezi N M D, Magwaza L S, Tesfay S Z. Postharvest pre-storage processing improves antioxidants, nutritional and sensory quality of macadamia nuts[J]. *Scientia Horticulturae*, 2019, 251: 197–208.
- [5] 贺熙勇, 陶亮, 柳靓, 等. 我国澳洲坚果产业概况及发展趋势[J]. *热带农业科技*, 2015, 38(3): 12–16.
- [6] 郭刚军, 邹建云, 胡小静, 等. 液压压榨澳洲坚果粕酶解制备多肽工艺优化[J]. *食品科学*, 2016, 37(17): 173–178.
- [7] 吴少辉, 叶伟娟, 黄雪莲, 等. 南五味子抑菌物质的优化提取及抑菌活性研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2012, 31(7): 719–726.
- [8] 胡永金, 韩小溪, 薛桥丽, 等. 普洱茶不同提取物体外抑菌活性研究[J]. *现代食品科技*, 2013, 29(8): 1770–1773, 1765.
- [9] 顾晨涛, 黄酒, 王雪燕, 等. 鲫鱼鱼鳞抗菌多肽的制备纯化及其抑菌活性[J]. *食品科学*, 2019, 40(22): 193–198.
- [10] 郭刚军, 胡小静, 马尚玄, 等. 液压压榨澳洲坚果粕蛋白质提取工艺优化及其组成分析与功能性质[J]. *食品科学*, 2017, 38(18): 266–271.
- [11] Gill I, Lopez-fandino R, Jorba X, et al. Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, 18: 162–183.
- [12] Yamamoto N, Ejiri M, Mizuno S. Biogenic peptides and their potential use[J]. *Curr Pharm Design*, 2003, 9(16): 1345–1355.
- [13] Agyei D, Danquah M K. Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides[J]. *Biotechnology Advances*, 2011, 29(3): 272–277.
- [14] 刘恩岐, 贺菊萍, 陈振家, 等. 黑豆蛋白质酶水解物体外抗氧化活性的研究[J]. *中国粮油学报*, 2009, 24(11): 38–41.
- [15] 帅希祥, 杜丽清, 张明, 等. 超声辅助酶解制备澳洲坚果蛋白肽及其抗氧化活性的研究[J]. *热带作物学报*, 2017, 38(11): 2076–2081.
- [16] 肖怀秋, 李玉珍, 林亲录, 等. 响应面优化冷榨花生粕酶法制备多肽工艺的研究[J]. *中国粮油学报*, 2013, 28(9): 50–55.
- [17] 郭刚军, 胡小静, 徐荣, 等. 干燥方式对辣木叶营养、功能成分及氨基酸组成的影响[J]. *食品科学*, 2018, 39(11): 39–45.
- [18] 赵玲, 曹荣, 刘洪, 等. 南极磷虾酶解多肽的抑菌活性[J]. *渔业科学进展*, 2011, 32(4): 112–116.
- [19] Li J E, Fan S T, Qiu Z H, et al. Total flavonoids content, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from *Mosla chinensis* Maxim. cv. Jiangxiangru[J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2019, 64: 1022–1027.
- [20] 吴海霞, 吴彩娥, 范龔健, 等. 银杏种仁蛋白分离纯化及其抑菌活性[J]. *食品科学*, 2014, 35(13): 108–113.
- [21] Soulaïmani B, Nafis A, Kasrati A, et al. Chemical composition, antimicrobial activity and synergistic potential of essential oil from endemic *Lavandula maroccana* (Mill.) [J]. *South African Journal of Botany*, 2019, 125: 202–206.
- [22] Fernandes M R V, Dias A L T, Carvalho R R, et al. Antioxidant and antimicrobial activities of *Psidium guajava* L. spraydried extracts[J]. *Industrial Crops and Products*, 2014, 60: 39–44.
- [23] Chang O K, Ha G E, Han G S, et al. Novel antioxidant peptide derived from the ultrafiltrate of ovomucin hydrolysate[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(30): 7294–7300.
- [24] Jrad Z, Hatmi H E, Adt I, et al. Effect of digestive enzymes on antimicrobial, radical scavenging and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of camel colostrum and milk proteins[J]. *Dairy Science and Technology*, 2014, 94(3): 205–224.
- [25] 宋茹, 汪东风, 谢超, 等. 黄鲫胃蛋白酶酶解液体外抗氧化、抑菌作用研究[J]. *食品科学*, 2010, 31(11): 127–131.
- [26] 王瑞雪, 方舒, 伊丽, 等. 驼乳和牛乳乳清蛋白抑菌肽的分离纯化及抑菌活性的比较[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(18): 107–113.
- [27] 徐欣瑶, 董娜, 李欣然, 等. 不同疏水性氨基酸对 α -螺旋抗菌肽生物学活性的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2019, 50(4): 791–801.
- [28] 刘蕾. 坛紫菜 (*Prophyra haitanensis*) 中抑菌活性多肽的分离、初步纯化及其作用机理研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2011: 54–55.
- [29] 宋惠平, 于佳, 李钊, 等. 条斑紫菜蛋白酶解多肽的抑菌活性[J]. *渔业科学进展*, 2015, 36(2): 140–145.
- [30] 蒋雨晴, 迟玉杰. 卵白蛋白源抗菌肽的分离纯化与结构鉴定[J]. *食品与机械*, 2019, 35(7): 1–6, 86.
- [31] 王宏亮, 李昂, 那杰. 抗菌肽在果蔬保鲜中的应用[J]. *江苏农业科学*, 2014, 42(3): 238–240.
- [32] Marcus J P, Green J L, Goulter K C, et al. A family of antimicrobial peptides is produced by processing of a 7S globulin protein in *Macadamia integrifolia* kernels[J]. *The Plant Journal*, 1999, 19(6): 699–710.
- [33] 金红, 叶锐, 徐晶, 等. 抗菌肽对食品腐败菌抑制效果的研究进展[J]. *农产品加工*, 2018(3): 59–63.