

低温对不同相对分子质量花椒籽蛋白酶解物的抑菌活性影响

董小华, 申光辉, 王佳, 马丽, 黎杉珊, 张志清*

(四川农业大学 食品学院, 四川 雅安 625014)

摘要: 为了解低温对花椒籽蛋白不同相对分子质量段酶解物的抑菌活性的影响, 采用不同冷冻温度、反复冻融等方式处理花椒籽蛋白酶解物, 分析其对抑菌率、溶解性、蛋白质电泳条带以及巯基质量摩尔浓度的影响。结果表明, 冷冻温度对酶解物的溶解性、活性巯基质量摩尔浓度、总巯基质量摩尔浓度以及抑菌率均有一定的影响, 其中-15℃冷冻处理后的酶解物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌率最高, 为78.24%和72.46%。反复冻融不影响酶解物的抑菌率和溶解性, 但是随着冻融次数的增加, 活性巯基和总巯基质量摩尔浓度会降低。不同预冻温度下不同相对分子质量段的酶解物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌率影响不相同: 对大肠杆菌的抑菌率最高的分别为<3 000(-15℃和-70℃)、3 000~10 000(-20℃和-50℃)的酶解物, 对金黄色葡萄球菌抑菌率最高的均为相对分子质量<3 000的酶解物, >10 000的酶解物对金黄色葡萄球菌没有抑菌作用。上述研究表明, 低温对不同相对分子质量的花椒籽蛋白酶解物抑菌活性有一定的影响。

关键词: 花椒籽; 蛋白酶解物; 冻融温度; 相对分子质量; 抑菌活性

中图分类号: TS 201.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2018)06-0639-07

Effect of Low Temperature on Antibacterial Activity of Different Molecular Weight of Hydrolysate from *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. Seed

DONG Xiaohua, SHEN Guanghui, WANG Jia, MA Li, LI Shanshan, ZHANG Zhiqing*

(College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Yanan 625014, China)

Abstract: In order to acquire the influence on antibacterial activity of different molecular weight of hydrolysate from Chinese prickly ash seed, this study analysed the effect on bacteriostatic rate, solubility, protein electrophoretic band and sulphhydryl content of hydrolysate after the treatment of different freezing temperature and multigelation. The results indicated that freezing temperature had a certain influence on bacteriostatic rate, solubility, and sulphhydryl content and the treatment of -15℃ freezing proved the highest bacteriostatic rate of *E.coli* 78.24% and *S.aureus* 72.46%.

收稿日期: 2015-11-09

基金项目: 四川省科技厅应用基础项目(2016JY0118); 国家林业局林业行业标准项目(2015LY184)。

* 通信作者: 张志清(1976—), 男, 四川宜宾人, 农学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事粮食油脂及植物蛋白工程方面的研究。

E-mail: zqzhang721@163.com

引用本文: 董小华, 申光辉, 王佳, 等. 低温对不同相对分子质量花椒籽蛋白酶解物的抑菌活性影响[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(06): 639-645.

Multigelation had no influence on bacteriostatic rate and solubility, but total and active sulfhydryl content dropped with times of freezing-thawing increased. The bacteriostatic rates of different molecular weight of hydrolysate were different between *E.coli* and *S.aureus*; the highest rate of *E.coli* is those below 3 000 (−15 °C and −70 °C) and 3 000~10 000 (−20 °C and −50 °C) respectively. And the highest rate of *S.aureus* is that below 3 000 to four freezing temperatures and that above 10 000 didn't work. This study shows that low temperature has a certain influence on antibacterial activity of different molecular weight of hydrolysate.

Keywords: *Zanthoxylum bungeanum* Maxim seed, protein hydrolysate, freezing temperature, molecular weight, antibacterial activity

天然抑菌物质是传统杀菌剂和抗生素的替代物研究领域的重要内容,对细菌、真菌、病毒、寄生虫、肿瘤细胞等有抑制作用,抗菌肽是其中一大类,它还可以有效抑制对抗生素产生耐药性的细菌^[1]。由于天然物质来源广泛、成分复杂,要获得抗菌肽单体还较困难^[2],国内研究仍集中在抗菌肽的提取纯化、抑菌活性和机理研究等方面。而从天然植物、动物、微生物中,通过化学法、酶解法以及基因工程技术得到的抗菌肽,多为混合物发挥协同抑菌作用。对于抗菌肽来说,这类物质具有各种各样的结构构象特征,一方面它们有共性,如在中性 pH 一般为阳离子状态,在与病原体膜作用时呈两亲特性^[3];另一方面,抗菌肽的同分异构体之间的抗菌性能有所差异^[4]。前处理因素(如实验原料的储藏、离心、缓冲液、干燥等)^[5]、分离纯化过程中抗菌肽某种氨基酸的变化或者三、四级结构的破坏都会影响到后续所得活性肽的得率、稳定性、活性以及实验操作的可重复性,但目前还没研究这些因素对其的影响,而在菌体保藏、食品品质以及蛋白质评价等方面的研究表明,储藏条件、冷冻条件以及其他处理对蛋白质、食品的性质等都有不同程度的影响。

本研究所采用的实验原料为花椒籽蛋白酶解物,为了最大限度地保持生物活性和稳定性,制备时采用真空冷冻干燥,而在整个过程中仍存在多种因素可能会引起蛋白质变性^[6],如预冷冻的方式和温度。冷冻可能使蛋白质变性,目前对鱼类以及豆类蛋白质的冷冻变性的探究比较多,邓敏^[7]、胡亚芹^[8]、董开成^[9]等分别研究了不同冻结、预冻方式对草鱼、带鱼、小黄鱼的影响,通过相应指标的测定,表明不同的冻结方式对鱼蛋白质的变性程度不一样。王玲等^[10]研究发现大豆分离蛋白(SPI)随着冷冻

温度降低和冷冻时间延长,其游离巯基、二硫键含量及表面疏水性逐渐减少,冷冻过程中 SPI 大部分的分子内二硫键转化为分子间二硫键。

课题组前期从花椒 (*Zanthoxylum bungeanum* Maxim) 籽(椒目)中制备得到了具有一定抗菌活性的抗菌肽^[11],但是实验发现其存在抗菌活性不稳定、酶解产物相对分子质量不确定等问题。作者在上述研究基础上,将大肠杆菌和金黄色葡萄球菌作为受试菌种,旨在探究酶解物制备过程中低温冷冻以及不同分子段对其自身性质及两种试验菌的抑菌活性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂、仪器

花椒籽:产地四川金阳;大肠杆菌(ATCC25922)、金黄色葡萄球菌(ATCC25923):由四川农业大学食品学院微生物实验室提供。

酵母膏、胰蛋白酶:北京奥博星生物技术有限公司;琼脂粉、氯化钠:成都市科龙化工试剂厂;胃蛋白酶 1:3 000(比活力 1:3 000~1:3 500):如吉生物科技;凝胶制备试剂盒:武汉博士德生物工程有限公司;5,5-二巯基-2,2-二硝基苯甲酸:上海瑞永生物科技有限公司;考马斯亮蓝 G250:国药集团化学试剂有限公司;牛血清蛋白:北京索莱宝有限公司。

CP225D 型电子天平:德国赛多利斯股份公司;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;UV-3100 型紫外-可见分光光度计:上海美谱达仪器有限公司;SCIENTZ-12N 真空冷冻干燥机:宁波新芝生物科技股份有限公司;BCD-224 西门子冰箱:博西华家用电器有限公司;Gel Doc XR

型凝胶成像仪;Bio-Rad 公司;超滤离心管(截留相对分子质量 3 000、10 000):Millipore。

1.2 方法

1.2.1 花椒籽粗酶解物制备 花椒籽粗酶解物(以下简称粗酶解物)的制备参照姜太玲等的方法^[12]。本研究中由 400 g 花椒籽所提粗酶解物液(50 mL)为一组进行预冻。

1.2.2 低温和分子量对酶解物抑菌活性、巯基含量的影响

1)冷冻温度对酶解产物抑菌活性的影响:分别将等量粗酶解物液分别置于温度为 $(-70\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 、 $(-50\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 、 $(-20\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 、 $(-15\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 下冷冻 12 h,取出迅速置于真空冷冻干燥机内进行干燥(温度维持在 55°C 左右)至样品无结晶冰后取出,分别置于相应温度下保存备用。测定酶解物的抑菌率、巯基含量等指标,分析酶解物相对分子质量分布情况。

2)冻融次数对酶解产物抑菌活性的影响:将粗酶解液分别冻融 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 次,在 -20°C 下冷冻 6 h,在常温下融化至酶解液达到常温即进行下一次冷冻。样品经真空冷冻干燥后备用。

3)不同相对分子质量的酶解产物抑菌活性分析:分别取不同温度冷冻下的粗酶解物进行超滤分离,得到相对分子质量分别为 $<3\ 000$ 、 $3\ 000\sim 10\ 000$ 、 $>10\ 000$ 的酶解物,真空冷冻干燥后备用。

1.2.3 分析指标测定

1)花椒籽粗酶解物抑菌率的测定:参照 GB 15979-2002 一次性使用卫生用品卫生标准和 QB/T 2738-2012 日化产品抗菌抑菌效果的评价方法^[13-14],采用平板计数法测定抑菌活性和抑菌率(%)。具体参考姜太玲等^[11]的方法。

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

2)花椒籽粗酶解物 SDS-PAGE 分析:利用 SDS-PAGE 比较不同冷冻温度处理得到的粗酶解物的相对分子质量分布情况。

3)花椒籽粗酶解物巯基质量摩尔浓度测定:参考 Tang^[15]和陈茜茜^[16]的方法进行测定酶解物的巯基质量摩尔浓度。巯基质量摩尔浓度公式如下:

$$-\text{SH 质量摩尔浓度}(\mu\text{mol/g}) = 73.53 \times A_{412} \times D/C$$

其中, D 为稀释系数(溶液总体积/样品体积); C 为蛋白质质量浓度(mg/mL); $73.53=1/13\ 600$ (由摩尔消光系数 $13\ 600\ \text{L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ 计算而得)。

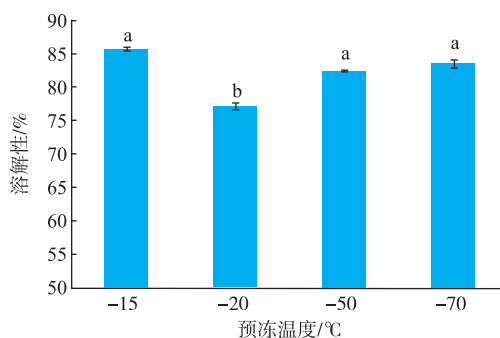
4)花椒籽粗酶解物的溶解性分析:参考张立娟的方法,并做一定的修改^[17]。溶解性公式如下:

$$\text{NSI}(\%) = \frac{\text{上清液中蛋白质质量分数}}{\text{样品中总蛋白质质量分数}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 低温处理对花椒籽酶解物抑菌活性的影响

2.1.1 不同冷冻温度处理对酶解物溶解性的影响 溶解度是蛋白质最重要的功能特性之一,溶解度的高低往往决定了蛋白质其他功能特性的强弱^[18]。由图 1 可知, -15°C 处理产物的溶解性最好,为 85.71%;其次是 -70°C 和 -50°C 处理产物,分别为 83.43%和 82.31%,但三者之间差异不显著; -20°C 处理产物的溶解性最低,为 77.22%,显著低于其他三组($p<0.05$)。说明低温处理对酶解物的溶解性无显著影响。



不同小写字母表示差异显著($p<0.05$),相同字母表示差异不显著($p>0.05$)。

图 1 不同冷冻温度处理后酶解物的溶解性

Fig. 1 Solubility of hydrolysate after different freezing temperature treatment

2.1.2 不同冷冻温度处理对酶解物蛋白质条带比较分析 由图 2 可以看出,不同冷冻温度处理酶解物的 SDS-PAGE 条带基本一样,主要有 4 条较明显的条带,相对分子质量分布近似,说明冷冻温度没有引起酶解物分子间变性。

2.1.3 不同冷冻温度处理对酶解物巯基质量摩尔浓度的影响 由表 1 可以看出, -15°C 冷冻处理的酶解物巯基质量摩尔浓度最高,显著高于其他组($p<0.05$);其次为 -20°C 和 -50°C 组,它们之间差异不显著($p>0.05$); -70°C 组最低,显著低于其它三组($p<0.05$)。与 -15°C 相比, -20°C 组总巯基和活性巯基分别下降 5.14、4.57 $\mu\text{mol/g}$, -50°C 分别下降 5.0、

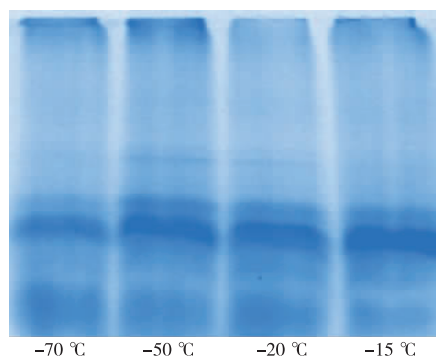


图2 不同冷冻温度处理后粗酶解物的电泳图

Fig. 2 Electrophoretogram of hydrolysate after different freezing temperature treatment

4.17 $\mu\text{mol/g}$, -70 $^{\circ}\text{C}$ 分别下降 7.82、6.95 $\mu\text{mol/g}$ 。不同冷冻温度处理的酶解物的总巯基和活性巯基质量摩尔浓度均随着温度的降低呈下降趋势。郑子懿等^[19]研究发现,面条在冷冻过程中不同蛋白质组分质量分数发生变化,蛋白质分子巯基和二硫键发生了相互转化。而在冷冻过程形成的冰晶可能使得蛋白质结构疏松,蛋白质空间结构发生改变,可能会暴露出某些功能基团,结构改变会引起巯基位置的变化,同时蛋白质中的活性巯基易被氧化生成二硫键^[20]。本实验也说明低温对酶解物巯基质量摩尔浓度有影响,而不同冷冻温度处理的酶解物蛋白质条带一致,它们之间的相对分子质量没有区别,这说明减少的巯基可能被氧化形成分子内二硫键,对酶解物的结构产生影响,从而对微生物的抑制作用。

表1 不同冷冻温度处理后酶解物总巯基、活性巯基质量摩尔浓度

Table 1 Total and active sulfhydryl content of hydrolysate after different pre-freezing temperature treatment

温度/ $^{\circ}\text{C}$	总巯基质量摩尔浓度/ ($\mu\text{mol/g}$)	活性巯基质量摩尔浓度/ ($\mu\text{mol/g}$)
-15	48.75 $\pm$ 0.62 ^a	47.44 $\pm$ 0.093 ^a
-20	43.61 $\pm$ 0.58 ^b	42.87 $\pm$ 0.52 ^b
-50	43.75 $\pm$ 0.36 ^b	43.27 $\pm$ 0.11 ^b
-70	40.93 $\pm$ 1.37 ^c	40.49 $\pm$ 0.96 ^c

注:同行不同小写字母代表差异显著($p<0.05$),相同字母表示差异不显著($p>0.05$)。

2.1.4 不同冷冻温度处理对酶解物抑菌率的影响
由表2可以看出,不同温度处理的酶解物对 *E.coli* 的抑菌率大小顺序为:-15 $^{\circ}\text{C}$ >-50 $^{\circ}\text{C}$ >-20 $^{\circ}\text{C}$ >-70 $^{\circ}\text{C}$,且-15 $^{\circ}\text{C}$ 和-70 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻处理的酶解物的抑菌率分

别与其他三组差异显著($p<0.05$),-20 $^{\circ}\text{C}$ 和-50 $^{\circ}\text{C}$ 之间差异不显著。对 *S.aureus* 的抑菌率大小顺序为:-15 $^{\circ}\text{C}$ >-50 $^{\circ}\text{C}$ >-70 $^{\circ}\text{C}$ >-20 $^{\circ}\text{C}$,且-15 $^{\circ}\text{C}$ 、-50 $^{\circ}\text{C}$ 和-70 $^{\circ}\text{C}$ 之间差异不显著($p>0.05$),但-20 $^{\circ}\text{C}$ 显著低于其它三组($p<0.05$)。

根据 QB/T 2738-2012 日化产品抗菌抑菌效果的评价标准^[14]可知,抑菌率在 50%~90%时产品有抑菌作用,抑菌率 $\geq 90\%$ 时产品有较强抑菌作用。由此可知,不同冷冻温度处理的酶解物对两受试菌均具有抑菌作用。冷冻温度对抑菌率有所影响,随着温度的降低,对两受试菌的抑制率也随之降低。大量研究表明,抗菌肽对热稳定性好,一般在 100 $^{\circ}\text{C}$ 下处理 15 min 甚至 30 min 依然保持较高抑菌活性^[21],本研究说明,酶解物中的抗菌肽成分对低温也有一定的耐受性,但抗菌肽作为活性蛋白质,不同于某些植物抗冻蛋白^[22],而且不同来源和不同分离纯化方法得到的抗菌肽分子结构的复杂性对高温和低温的稳定性也有所不同。

根据 2.1.1 和 2.1.3 分析可知,不同温度冷冻的酶解物对大肠杆菌的抑菌作用可能与巯基质量摩尔浓度变化有关,因为植物防御素富含半胱氨酸,所以推测作用位点在于未被氧化的半胱氨酸。而对金黄色葡萄球菌的抑菌作用可能与其可溶性蛋白质质量分数有关,蛋白质溶解性越高,说明肽链所暴露的极性基团越多,发挥抑菌作用越强。另外,溶解的蛋白质在菌体表面成膜密集,对菌体作用也越强烈^[23]。

表2 不同冷冻温度处理后酶解物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌抑菌率

Table 2 Bacteriostatic rate of hydrolysate to *E.coli* and *S.aureus* after different freezing temperature treatment

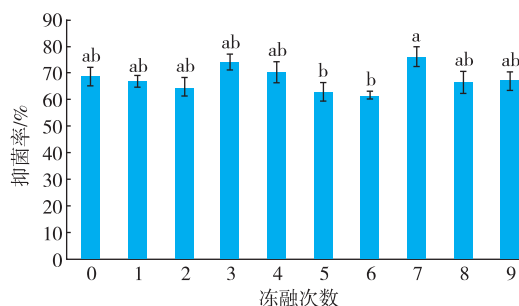
温度/ $^{\circ}\text{C}$	大肠杆菌抑菌率/%	金黄色葡萄球菌抑菌率/%
-15	78.24 $\pm$ 0.040 ^a	72.46 $\pm$ 0.040 ^a
-20	63.9 $\pm$ 0.068 ^b	53.62 $\pm$ 0.037 ^b
-50	67.22 $\pm$ 0.037 ^b	69.57 $\pm$ 0.041 ^a
-70	53.82 $\pm$ 0.044 ^c	66.67 $\pm$ 0.043 ^a

注:同列不同小写字母表示差异显著($p<0.05$),相同字母表示差异不显著($p>0.05$)。

2.2 反复冻融对花椒籽酶解物抑菌活性的影响

2.2.1 反复冻融处理对酶解物抑菌率的影响 由于蛋白质溶液多在-20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻以及结合实验室实际

情况,选择 -20°C 冷冻的酶解物作为反复冻融对大肠杆菌的抑菌作用影响的研究对象。由图3可以看出,不同冻融次数的酶解物对大肠杆菌的抑菌率均高于60%。经冻融的酶解物与未经冻融的差异并不显著($p>0.05$),说明反复冻融对酶解物的抑菌率无显著影响,这与郝刚的研究结果一致。有研究指出,抗菌肽对低温虽然有一定的耐受力,但随着冻融次数的增加,抑菌作用有所下降,可能是在低温条件下形成的细小冰晶对抗菌肽的结构有一定的破坏作用,因此,对样品不宜反复冻融^[24]。

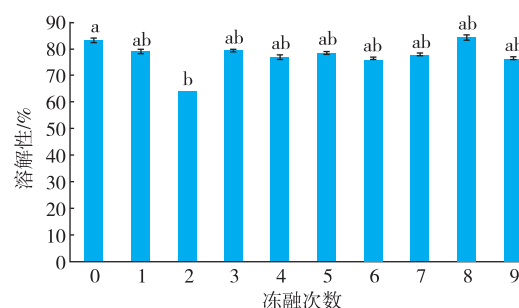


不同小写字母表示差异显著($p<0.05$),相同字母表示差异不显著($p>0.05$)。

图3 反复冻融处理的酶解物对大肠杆菌的抑菌率

Fig. 3 Bacteriostatic rate of hydrolysate to *E. coli* after multigelation treatment

2.2.2 反复冻融处理对酶解物溶解性的影响 由图4可知,冻融两次的酶解物溶解性显著低于未经冻融组($p<0.05$),而其它组与未经冻融组的差异不显著($p>0.05$),不同冻融次数的酶解物的溶解性之间差异不显著($p>0.05$)。说明冻融不影响花椒籽酶解物中可溶性蛋白质的质量分数,反复冻融并没有引起酶解物变性。



不同小写字母表示差异显著($p<0.05$),相同字母表示差异不显著($p>0.05$)。

图4 反复冻融处理的酶解物的溶解性

Fig. 4 Solubility of hydrolysate after multigelation treatment

2.2.3 反复冻融处理对酶解物巯基质量摩尔浓度的影响 由表3可知, -20°C 冷冻的酶解物的总巯基质量摩尔浓度和活性巯基质量摩尔浓度均比表2高,可能由于样品处理时间和操作的误差导致的。可以看出,冻融两次的酶解物巯基质量摩尔浓度显著低于其他处理,这可能与溶解性有关。随着冻融次数的增加,巯基质量摩尔浓度均呈降低趋势,减少的巯基可能在冻融过程中被氧化形成二硫键,但2.2.1和2.2.2结果表明,冻融并不影响其可溶性蛋白质质量分数和抑菌能力。孔保华^[25]等研究表明,随着冻融次数的增加,肌原纤维蛋白的ATP酶活性、巯基质量摩尔浓度、热稳定性明显逐渐降低,凝胶形成能力明显下降,说明酶解液在冷冻过程中仍不适宜反复冻融。

表3 反复冻融处理的酶解物总巯基、活性巯基质量摩尔浓度
Table 3 Total and active sulfhydryl content of hydrolysate after multigelation treatment

冻融次数	总巯基质量摩尔浓度/ ($\mu\text{mol/g}$)	活性巯基质量摩尔浓度/ ($\mu\text{mol/g}$)
0	57.31±0.16 ^a	55.68±0.098 ^a
1	56.95±0.15 ^a	55.17±0.10 ^{ab}
2	48.17±0.048 ^s	46.57±0.16 ^b
3	56.53±0.102 ^b	55.24±0.103 ^{bc}
4	55.73±0.10 ^{bc}	54.57±0.20 ^c
5	55.13±0.052 ^c	53.61±0.20 ^d
6	54.55±0.31 ^d	53.99±0.050 ^d
7	52.2±0.15 ^c	50.43±0.053 ^c
8	50.58±0.15 ^f	49.82±0.16 ^f
9	50.10±0.051 ^f	48.60±0.11 ^{de}

注:同列不同小写字母表示差异显著($p<0.05$),相同字母表示差异不显著($p>0.05$)。

2.3 不同相对分子质量段的酶解物的抑菌率及蛋白质质量分数

由表4可知, -15°C 处理的酶解物对两受试菌的作用效果与2.1的结果相似。3种分子段的酶解物对*E. coli*和*S. aureus*的的抑菌率大小顺序均为: $<3\ 000$ 、 $3\ 000\sim 10\ 000$ 、 $>10\ 000$,其中 $>10\ 000$ 对*S. aureus*无抑菌作用; -20°C 处理的不同分子段的酶解物对*E. coli*的抑菌率大小顺序为: $3\ 000\sim 10\ 000$ 、 $<3\ 000$ 、 $>10\ 000$,其中 $>10\ 000$ 的酶解物无抑菌作用;对*S. aureus*的抑菌率大小顺序为: $<3\ 000$ 、 $3\ 000\sim 10\ 000$ 、 $>10\ 000$,其中 $>10\ 000$ 无抑菌作用; -50°C 处理的酶解物与 -20°C 的作用效果相似;

-70 ℃处理的酶解物对 *E.coli* 的抑菌率大小顺序为: <3 000、>10 000、3 000~10 000, 其中<3 000 的有较强抑菌作用, 3 000~10 000 和>10 000 的有抑菌作用; 对 *S.aureus* 的抑菌率大小顺序为: <3 000、3 000~10 000、>10 000。4 种冷冻温度处理的酶解物蛋白质质量分数均呈现同一种趋势: (>10 000)>(3 000~10 000)>(<3 000)。对比表 1 可知, 经超滤后的相对分子质量段酶解物抑菌率远高于同一温度下未经超滤的粗酶解物, 说明经过超滤膜截留分离后, 大分子杂蛋白质越来越少, 小肽以及其它小分子物质增多, 不同分子段能发挥抑菌作用的物质不同, 这也是不同相对分子质量段酶解物抑菌率不同的原因。张顺亮等^[26]研究也发现, >10 000 相对分子质量的牛骨胶原蛋白源抑菌肽组分没有抑菌能力, 这可能是因为多肽的相对分子质量较大, 具有独特的空间结构, 不易与细菌发生作用; <10 000 相对分子质量的组分具有较好的抑菌活性。

表 4 不同相对分子质量酶解物的抑菌率及蛋白质质量分数

Table 4 Bacteriostatic rate and protein content of hydrolysate with different molecular weight

冷冻温度/℃	相对分子质量/Da	大肠杆菌抑菌率/%	金黄色葡萄球菌抑菌率/%	蛋白质质量分数/(mg/mg)
-70	<3 000	90.21±2.34	98.56±0.79	0.007 6±0.000 11
	3 000~10 000	79.96±2.50	63.12±8.36	0.035±0.000 12
	>10 000	80.14±1.97	21.37±2.39	0.32±0.014
-50	<3 000	72.68±7.57	96.52±1.01	0.007 5±0.001 6
	3 000~10 000	85.92±4.73	84.85±7.26	0.027±0.003 5
	>10 000	18.03±0.067	21.91±2.12	0.27±0.031
-20	<3 000	73.59±8.20	99.18±0.5	0.004 1±0.000 86
	3 000~10 000	81.30±4.71	79.51±1.89	0.023±0.001 3
	>10 000	22.4±5.96	20.22±3.79	0.22±0.004 0
-15	<3 000	95±1.56	100	0.005±0.000 92
	3 000~10 000	86.35±5.25	94±2.16	0.032±0.002 2
	>10 000	78.99±1.28	10.64±3.21	0.36±0.007 5

注: 同列不同小写字母表示差异显著 ($p<0.05$), 相同字母表示差异不显著 ($p>0.05$)。

研究表明, 蛋白质水解物的平均相对分子质量是决定其生物学性质最重要的因素之一, 蛋白肽组

分的理化性质、功能特性与其相对分子质量大小有关^[27]。邓成萍等^[28]研究发现, 随着大豆多肽段相对分子质量的降低, 其溶解性、抗氧化性和 ACE 抑制活性呈增加趋势。祝婧等研究也发现, 海鲈鱼胶原蛋白肽不同相对分子质量组分的理化特性存在显著差异, 其功能特性和相对分子质量分布有密切关系。花椒籽蛋白经酶解成不同相对分子质量的混合物, 肽链某些位点可能断开, 暴露某些基团或氨基酸, 使得不同相对分子质量段的酶解物对同种受试菌株的抑菌性能不同。冯小强等研究发现, 低相对分子质量的壳聚糖抑菌活性高于高相对分子质量的壳聚糖。壳聚糖相对分子质量越小, 越容易进入细胞壁的空隙结构内, 干扰细胞的新陈代谢而达到杀菌目的。另外, 我们发现不同冷冻温度下不同相对分子质量的粗酶解物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌作用规律并不一致。一方面, 可能因为不同冷冻温度产生交互影响; 另一方面, 抑菌物质对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的作用机理不一样。

3 结 语

随着冷冻温度的降低, 花椒籽粗蛋白酶解物的活性巯基和总巯基质量摩尔浓度降低, 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制率也降低, -15 ℃处理的酶解物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌率最高, 分别为 78.24% 和 72.46%。反复冻融并不影响抑菌率, 均在 60% 以上, 但是随着冻融次数的增加, 活性巯基和总巯基质量摩尔浓度会降低。-15 ℃和-70 ℃冷冻处理的酶解物对大肠杆菌的抑菌率最高的为相对分子质量小于 3 000 的酶解物, -20 ℃和-50 ℃的则为相对分子质量在 3 000~10 000 的酶解物; 4 种冷冻温度对金黄色葡萄球菌抑菌率最高的均为相对分子质量小于 3 000 的酶解物, 相对分子质量大于 10 000 的酶解物对金黄色葡萄球菌并没有抑菌作用。这为花椒籽蛋白酶解物在制备过程中冷冻条件的探讨提供一定的理论基础。

参考文献:

- [1] MOLLOY E M, FIELD D, COTTER P D, et al. Saturation mutagenesis of lysine 12 leads to the identification of derivatives of nisin a with enhanced antimicrobial activity[J]. *Plos One*, 2013, 8(3): 1-10.
- [2] PRINGSULAKA O, THONGNGAM N, SUWANNASAI N, et al. Patial characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products[J]. *Food Control*, 2012, 23(2): 547-551.
- [3] DEMPSEY CE, HAWRANI A, HOWE R A, et al. Amphipathic antimicrobial peptides-from biophysics to therapeutics[J].

- Protein Pept Lett**,2010,17(11):1334-1344.
- [4] Cristina Coccia, Andrea C. Rinaldi, Vincenzo Luca, et al. Membrane interaction and antibacterial properties of two mildly cationic peptide diastereomers, bombinins H2 and H4, isolated from Bombina skin[J]. **Eur Biophys J**,2011,40:577-588.
 - [5] MIAO Jianyin, KE Chang, GUO Haoxian, et al. Extraction, isolation and antibacterial mechanism of antibacterial peptides[J]. **Modern Food Science and Technology**,2014,30(1):233-240. (in Chinese)
 - [6] HUANG Jing, CHEN Hongbing. Influencing factors on protein frozen dehydration [J]. **Science and Technology of Food Industry**,2001,22(4):79-81. (in Chinese)
 - [7] DENG Min, ZHU Zhiwei. Effect of different freezing way on the quality characteristics of grass carp cubes[J]. **Modern Food Science and Technology**,2013,29(1):55-58,76. (in Chinese)
 - [8] HU Yaqin, HU Qinglan, YANG Shuibing, et al. Effects of different freezing methods on the quality of *Trichiurus haumela*[J]. **Modern Food Science and Technology**,2014,30(2):23-30. (in Chinese)
 - [9] DONG Kaicheng, YANG Shuibing, YU Haixia, et al. Effect of different pre-freeze conditions on the quality of *Larimichthys polyactis*[J]. **Modern Food Science and Technology**,2015,31(2):225-231. (in Chinese)
 - [10] WANG Ling, ZHU Xiuqing, LI Jiadong, et al. Effect of cryopreservation on surface hydrophobicity and disulfide bonds of soybean protein isolate liquid dispersion[J]. **Food Science**,2014,35(7):28-32. (in Chinese)
 - [11] JIANG Tailing, WU Hongyang, SHEN Guanghui, et al. Antibacterial activity and stability of antimicrobial peptides from Chinese prickly ash (*Zanthoxylum bungeanum* Maxim.) seed protein[J]. **Modern Food Science and Technology**,2015,31(8):129-135. (in Chinese)
 - [12] JIANG Tailing, WU Hongyang, 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. (in Chinese)
 - [13] 全国表面活性剂和洗涤用品标准化技术委员会. QB/T 2738-2012 日化产品抗菌抑菌效果的评价方法[S]. 北京:中国轻工业出版社,2012.
 - [14] 中华人民共和国卫生部. GB 15979-2002 一次性使用卫生用品卫生标准[S]. 北京:中国轻工业出版社,2002.
 - [15] TANG C H, CHEN L, MA C Y. Thermal aggregation, amino acid composition and in vitro digestibility of vicilin-rich protein isolates from three *Phaseolus legumes*: a comparative study[J]. **Food Chemistry**,2009,113:957-963.
 - [16] CHEN Qianqian, HUANG Ming, ZOU Yufeng, et al. Influence of irradiation and freeze-thawing cycles on myofibrillar protein oxidation and eating quality of beef[J]. **Food Science**,2014,35(19):1-5. (in Chinese)
 - [17] ZHANG Lijuan. Functional properties of porcine blood peptides[J]. **Meat Research**,2010(3):31-35. (in Chinese)
 - [18] LI Kaifang, JIANG Jiang, LIU Yuanfa. Influences of drying methods on function and structure of pH-modified pea protein isolate [J]. **China Oils and Fats**,2014,39(3):74-79. (in Chinese)
 - [19] ZHENG Ziyi, LU Qiyu, ZHANG Shaobing. Research on change of protein and disulfide bond in noodles during frozen storage[J]. **Cereal & Feed Industry**,2013(7):34-37. (in Chinese)
 - [20] 陈俊. 蛋白质结构预测中若干问题的研究[D]. 上海:上海交通大学,2013.
 - [21] 郝刚. Buforin II 抗菌肽的分子设计及对 DNA 作用抑菌机理研究[D]. 无锡:江南大学,2009.
 - [22] XU Huaneng, MA Shufeng, ZHANG Lianfu. Research progress in separation and purification methods of antifreeze proteins from plants[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2013,32(4):347-352. (in Chinese)
 - [23] FENG Xiaoqiang, YANG Sheng, LI Xiaofang, et al. Study on antibacterial activity of chitosan with different molecular weights to five common bacterium and mechanism[J]. **Natural Product Research and Development**,2008,20:335-338. (in Chinese)
 - [24] 周世成. 小麦蛋白抗菌肽的制备及其特性研究[D]. 郑州:河南工业大学,2011.
 - [25] KONG Baohua, XIA Xiufang, XIONG Youling. The structure and functional property changes in myofibrillar protein as influenced by different freeze-thaw cycles[J]. **Food Science**,2009,30(21):1-7. (in Chinese)
 - [26] ZHANG Shunliang, PAN Xiaoqian, CHENG Xiaoyu, et al. Isolation, purification and compositional analysis of antibacterial peptides from bovine bone collagen[J]. **Meat Research**,2013,27(11):33-36. (in Chinese)
 - [27] QIAN Z J, JE J Y, KIM S K. Antihypertensive effect of angiotensin I converting enzyme-inhibitory peptide from hydrolysates of bigeye tuna dark muscle, *Thunnus obesus*[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2007,55:8398-8403
 - [28] DENG Chengping, XUE Wentong, SUN Xiaolin, et al. Functional properties of different molecular weight segments of soybean protein[J]. **Food Science**,2006,27(5):109-112. (in Chinese)