

响应面法优化黄粉虫抗菌肽酶解工艺

孙长江, 张建新*, 汪璇, 宋真真

(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: 确定黄粉虫抗菌肽的最佳酶解工艺。方法: 以黄粉虫为原料, 碱提酸沉法提取黄粉虫蛋白质, 再利用筛选出的蛋白酶进行水解, 并用琼脂平板扩散法(打孔法)表征制得抗菌肽的抑菌活性。在单因素试验的基础上, 应用Box-Behnken中心组合试验设计和响应面(RSM)分析法, 探讨酶解温度、pH值、酶解时间、加酶量及底物质量浓度对酶解产物抑菌活性的影响。结果: 碱性蛋白酶最适合水解黄粉虫蛋白制备抗菌肽, 其最佳工艺条件为: 底物质量浓度810g/100mL、酶解时间4.4h、加酶量440U/g pro、酶解温度54℃、pH9.5; 酶解物抑菌圈大小理论预测值为15.17mm, 实际测量值为15.04mm。结论: 碱性蛋白酶水解黄粉虫蛋白能够得到抑菌活性较强的酶解物, 优化的工艺条件与理论预测拟合程度较高。

关键词: 黄粉虫; 抗菌肽; 酶解; 响应面

Optimization of Enzymatic Preparation of Antibacterial Peptides by Response Surface Methodology

SUN Chang-jiang, ZHANG Jian-xin*, WANG Xuan, SONG Zhen-zhen

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

Abstract: Objective: To determine the optimal conditions for enzymatic preparation of *Tenebrio molitor* antibacterial peptides. Methods: Antibacterial peptides were prepared by hydrolyzing the protein extracted from *Tenebrio molitor* by alkaline extraction and acid precipitation. The antibacterial activity of the peptides was evaluated by agar diffusion method. One-factor-at-a-time method and response surface analysis based on Box-Behnken design were used to explore the effects of hydrolysis temperature, pH, hydrolysis time, enzyme dosage and substrate concentration on antibacterial activity of *Tenebrio molitor* antibacterial peptides. Results: Alkaline protease was the most efficient protease for the preparation of *Tenebrio molitor* antibacterial peptides, and the optimum hydrolysis conditions were found to be hydrolysis at 54 °C and pH 9.5 for 4.4 h with an enzyme dosage of 440 U/g pro and a substrate concentration of 810 g/100 mL. The predicted maximum inhibition circle diameter was 15.17 mm, close to the actual value of 15.04 mm. Conclusion: Peptides with high antibacterial activity can be prepared by hydrolyzing *Tenebrio molitor* protein with alkaline protease, and the optimized process conditions allow accurate theoretical prediction.

Key words: *Tenebrio molitor*; antibacterial peptide; enzymatic hydrolysis; response surface methodology

中图分类号: TS201.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)07-0234-06

黄粉虫(*Tenebrio molitor*, Linnaeus)又称大黄粉虫、黄粉甲, 俗称“面包虫”。隶属于昆虫纲(Insecta)、鞘翅目(Coleoptera)、拟步甲科(Tenebrionidae)、粉甲属(*Tenebrionini*)^[1]。黄粉虫蛋白质含量达50%以上, 且氨基酸种类齐全, 组成合理^[2]。作为我国第三大昆虫产业和大宗食品蛋白质来源^[3], 对黄粉虫的加工利用进行系统研究, 有着重要的意义。抗菌肽是生物体产生的具有生物活性的小分子多肽, 其独特的氨基酸组成与结构可以破坏细菌的细胞膜结构并导致细胞死亡^[4-5]。近年来抗菌肽作为一种新型抗生素替代物引起了学者们的强烈兴趣, 国内外对其作用机理、分离纯化已经进行了大量的研究^[6-10]。抗菌

肽的低产量、高成本为制约其将来大规模应用的瓶颈, 酶法则具有简便快速、易于实现工业化生产等优点, 酶解蛋白质生产抗菌肽是大批量制备抗菌肽最有前途的方法^[11-13]。因此本实验以黄粉虫为原料, 研究黄粉虫蛋白的酶解条件, 为抗菌肽制备提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黄粉虫, 50~60日龄幼虫, 由陕西秦虫黄粉虫科技发展有限公司提供。

收稿日期: 2012-03-02

作者简介: 孙长江(1988—), 男, 硕士研究生, 主要从事食品营养与安全研究。E-mail: sunchangjiang000@126.com

*通信作者: 张建新(1959—), 男, 教授, 硕士, 主要从事食品营养安全与标准化研究。E-mail: zhangjx59@foxmail.com

大肠杆菌25922由西北农林科技大学食品与工程学院食品微生物实验室保存;胰蛋白酶、碱性蛋白、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、胃蛋白酶 上海佳和生物科技有限公司;LB培养基 天津百浩生物科技有限公司;谷胱甘肽(99%) 上海时代生物科技有限公司;三氯乙酸、氢氧化钠、盐酸、浓硫酸、硫酸钾、硫酸铜均为分析纯。

1.2 仪器与设备

UV-2550型紫外分光光度计 日本岛津公司;SCB-1520超净工作台 北京东联哈尔仪器制造有限公司;HH-4恒温水浴锅 上海乔跃电子科技有限公司;HWS-150恒温恒湿细菌培养箱 上海森信实验仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 黄粉虫蛋白的提取

黄粉虫→禁食24h→冷冻致死→50℃烘干→研磨粉碎→索氏脱脂→粉碎→过70目筛→碱提酸沉法提蛋白→冷冻干燥→4℃冰箱保存

1.3.2 酶解

取一定量的蛋白粉于100mL烧杯中,加入适量蒸馏水,将pH值调至最适,置于恒温水浴锅中保温,不断加入2mol/L NaOH维持pH值的稳定,加酶进行酶解,不同蛋白酶的酶解最适条件如表1所示。酶解结束后,以2mol/L NaOH或HCl将pH值调回中性,升温至90℃并保持10min灭酶。将酶解液3500r/min离心20min,取上清液进行酸溶肽的测定和抑菌实验。

表1 不同蛋白酶的水解条件

Table 1 Factors and levels used in response surface analysis

蛋白酶种类	加酶量/(U/g pro)	pH	酶解时间/h	酶解温度/℃	底物质量浓度/(g/100mL)
胰蛋白酶	300	8.0	4	40	10
碱性蛋白酶	300	8.5	4	50	10
木瓜蛋白酶	300	6.5	4	50	10
中性蛋白酶	300	7.5	4	50	10
胃蛋白酶	300	3.0	4	40	10

1.3.3 酸溶肽测定

取5mL酶解液,加5mL 15g/100mL的三氯乙酸(TCA)溶液,混匀后静置10min,3500r/min离心10min,上清液稀释至多肽质量浓度为1~10mg/mL,取稀释液3mL加入2mL双缩脲试剂,混匀后静置20min。参比液以3mL蒸馏水和2mL双缩脲组成。在540nm波长处测定吸光度,查标准曲线即可得酸溶肽含量(mg/mL)^[14-16]。

1.3.4 抑菌活性测定

采用打孔法^[17-20],将20mL无菌LB培养基(琼脂质量分数1.12%)倒入培养皿,确保每次倒入培养基的量相等;待琼脂凝固后,用无菌的微量移液器吸取200μL菌悬液(1×10^7 CFU/mL)至培养基表面,迅速用刮刀涂布均匀。

用灭过菌的打孔器在涂布菌液的平皿上十字对称打4

个孔,打孔器直径为10mm;以蒸馏水为空白对照,青霉素为阳性对照,碱性蛋白酶为阴性对照,均加样80μL,每板3个平行,整个操作都在超净工作台中进行。加样完毕后,将平皿转移至4℃冰箱,放置2h,使样品充分扩散。将平皿转移至37℃恒温恒湿培养箱,倒扣培养18h。

1.4 工艺优化试验设计

在单因素试验结果的基础上,对酶解时间、酶解温度和加酶量3个影响酶解物抑菌活性的主要因素进行优化试验。采用三因素三水平的中心组合(Box-Behnken)试验优化酶解工艺。试验设计与统计分析软件为Design-Expert 7.0 Trial。试验因素水平设计见表2。

表2 响应面分析因素与水平表

Table 2 Hydrolysis conditions of 5 proteases

水平	A酶解时间/h	B加酶量/(U/g pro)	C酶解温度/℃
-1	3	300	50
0	4	500	55
1	5	700	60

2 结果与分析

2.1 酶的选择

底物质量浓度选择10g/100mL、加酶量300U/g pro,分别选用胰蛋白酶、碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、胃蛋白酶5种酶,在各自适宜条件下水解黄粉虫蛋白,酶解4h后,90℃灭酶10min,抑菌圈直径和酸溶肽含量见图1。

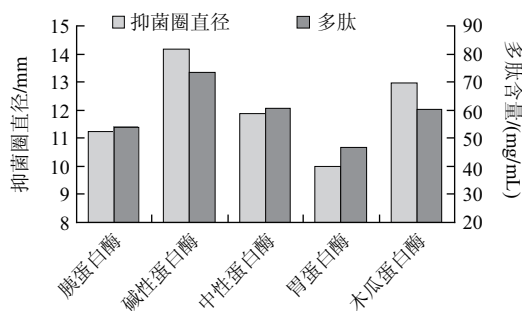


图1 酶的种类对抑菌活性的影响

Fig.1 Effect of enzyme type on antibacterial activity

由图1可知,碱性蛋白酶酶解产物的抑菌圈直径达到14.16mm,酸溶肽含量为73.38mg/mL;木瓜蛋白酶与中性蛋白酶效果一般,胰蛋白酶和胃蛋白酶效果最差,胃蛋白酶酶解产物没有表现出抑菌活性。原因可能与酶的特异性有关,抗菌肽大多是小分子肽^[3],胃蛋白酶和胰蛋白酶剪切肽键时均具有一定的氨基酸序列特异性,无法较彻底地水解黄粉虫蛋白;碱性蛋白酶则能作用于亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和丙氨酸参与形成的肽键,特异性不强,故能较彻底地水解黄粉虫蛋白,暴

露出具有抑菌活性的氨基酸序列^[17], 得到更多活性肽。因此, 本实验选取碱性蛋白酶制备抗菌肽。

2.2 黄粉虫蛋白碱性蛋白酶水解工艺单因素试验

2.2.1 酶解时间对黄抑菌活性的影响

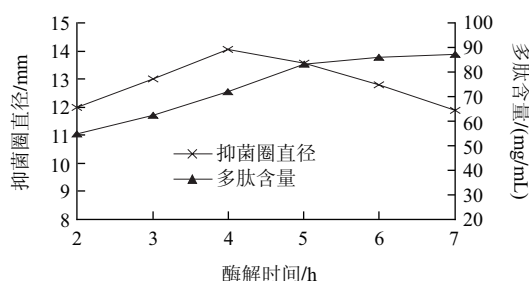


图2 酶解时间对抑菌活性的影响

Fig.2 Effect of hydrolysis time on antibacterial activity

取6份黄粉虫蛋白粉, 在底物质量浓度10g/100mL、加酶量300U/g pro、温度50℃、pH9.5的条件下, 分别酶解2、3、4、5、6、7h。由图2可知, 随着时间的延长, 酶解产物的抑菌活性呈现先增加后降低的趋势, 4h时酶解产物的抑菌活性达到最大, 而酸溶肽的含量则持续增加。原因可能是随着时间的增加, 水解程度不断加深, 4h之前, 抑菌活性随着酸溶肽的增加而增强; 4h以后, 水解继续进行, 将有抑菌活性的小分子肽水解成为无抑菌活性的更小的分子片段。因此, 优化试验酶解时间选为3~5h。

2.2.2 加酶量对抑菌活性的影响

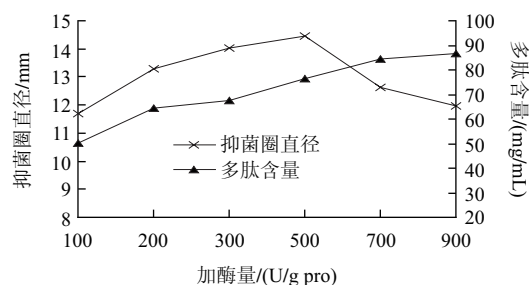


图3 加酶量对抑菌活性的影响

Fig.3 Effect of enzyme dosage on antibacterial activity

取6份黄粉虫蛋白粉, 加酶量分别为100、200、300、500、700、900U/g pro, 在底物质量浓度10g/100mL、温度50℃、pH值9.5的条件下, 酶解4h。由图3可知, 随着加酶量的增加, 酶解产物的抑菌活性呈现先增加后降低的趋势, 加酶量为500U/g pro时酶解产物的抑菌活性达到最大, 而酸溶肽的含量则持续增加。原因可能是加酶量较少, 水解不充分, 随着加酶量的增加, 水解产生更多抗菌肽, 抑菌活性随之增加, 加酶量达到一定值后, 过多的酶将有抑菌活性

的小分子肽水解成为无抑菌活性的更小的片段, 导致抑菌活性下降。综合考虑, 优化试验加酶量定为300~700U/g pro。

2.2.3 底物质量浓度对抑菌活性的影响

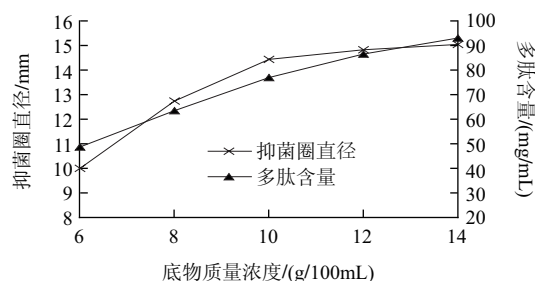


图4 底物质量浓度对抑菌活性的影响

Fig.4 Effect of substrate concentration on antibacterial activity

用蒸馏水分别配制底物质量浓度为6、8、10、12、14g/100mL的黄粉虫蛋白溶液, 在加酶量为500U/g pro、温度50℃、pH值9.5的条件下酶解4h。由图4可知, 底物质量浓度为6g/100mL时, 多肽含量仅为48.59mg/mL, 没有达到最低抑菌质量浓度, 酶解产物没有表现出抑菌活性。随着底物质量浓度的增加, 抑菌活性和多肽含量都迅速增加; 当底物质量浓度达到10g/100mL时, 再增加底物质量浓度, 抑菌活性的变化不大, 酸溶多肽的增加也变得缓慢, 水解程度有所降低, 原料利用率下降。综合考虑, 优化试验中底物质量浓度定为10g/100mL。

2.2.4 酶解温度对抑菌活性的影响

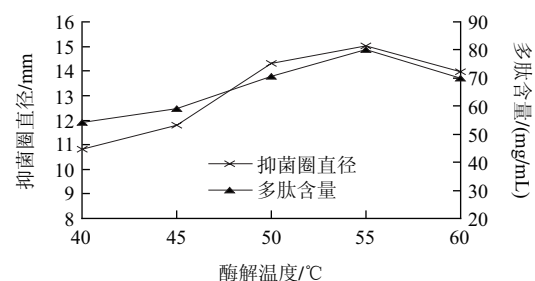


图5 温度对抑菌活性的影响

Fig.5 Effect of hydrolysis temperature on antibacterial activity

取5份黄粉虫蛋白粉, 配制成底物质量浓度10g/100mL的蛋白溶液, 加酶量500U/g pro, pH值调至9.5, 分别在40、45、50、55、60℃酶解4h。由图5可知, 随着酶解温度的增加, 酶解产物的抑菌活性和酸溶肽的含量都呈现先增加后下降的趋势; 温度为55℃时, 抑菌活性最大, 酸溶肽含量最多。原因可能为, 在低于酶的最适温度时, 温度的升高有利于酶活性的增加, 但温度过高, 酶的活性反而受到抑制, 不利于酶解反应进行。综合考虑, 优化试验酶解温度定为50~60℃。

2.2.5 pH值对抑菌活性的影响

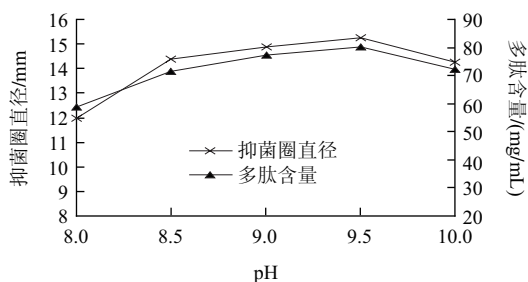


图6 pH值对抑菌活性的影响

Fig.6 Effect of pH on antibacterial activity

取5份黄粉虫蛋白粉, 配制成底物质量浓度10g/100mL的蛋白溶液, 加酶量500U/g pro, pH值分别调至8.0、8.5、9.0、9.5、10.0, 在55℃酶解4h。由图6可知, 随着pH值的升高, 酶解产物的抑菌活性和酸溶肽的含量都呈现先增加后下降的趋势; pH值达到9.5时, 抑菌活性最大, 酸溶肽最多, pH值在8.5~10.0之间, 碱性蛋白酶的活性变化不大。原因可能为, 当pH值低于酶的最适pH值时, 随着pH值的升高, 酶的活性逐渐增强, 但pH值过大, 酶的活性反而受到抑制, 不利于水解反应的进行。因此, 优化试验pH值定为9.5。

2.3 碱性蛋白酶水解工艺优化

2.3.1 响应面优化试验结果

表3 Box-Behnken 设计方案及响应值结果
Table 3 Box-Behnken design and results

试验号	因素			抑菌圈直径/mm
	A酶解时间	B加酶量	C酶解温度	
1	-1	-1	0	13.00
2	1	-1	0	14.42
3	-1	1	0	12.70
4	1	1	0	13.52
5	-1	0	-1	13.40
6	1	0	-1	13.82
7	-1	0	1	11.60
8	1	0	1	13.80
9	0	-1	-1	14.20
10	0	1	-1	12.40
11	0	-1	1	12.83
12	0	1	1	13.20
13	0	0	0	14.68
14	0	0	0	15.30
15	0	0	0	14.82
16	0	0	0	15.22
17	0	0	0	14.90

在单因素的基础上, 底物质量浓度10g/100mL、pH9.5保持不变, 以酶解时间、加酶量、酶解温度为自变量, 酶解产物的抑菌圈直径(Y)作为响应值, 采用Box-Behnken组合设计, 设计三因素三水平5个中心点的响应面优化试验, 试验以随机次序进行。数据采用Design-Expert 7.0 Trial软件进行统计分析, 结果见表3, 对表3结果进行统计分析, 可建立如下二次回归方程(编码方程):

$$Y=14.98+0.61A-0.33B-0.30C-0.15AB+0.45AC+0.54BC-0.79A^2-0.79B^2-1.04C^2$$

表4 响应面二次模型方差分析

Table 4 Analysis of variance for the fitted quadratic regression model

方差来源	平方和	自由度	均方差	F值	P	显著性
模型	17.49	9	1.94	27.10	0.0001	**
A	2.95	1	2.95	41.8	0.0004	**
B	0.86	1	0.86	12.06	0.0104	*
C	0.71	1	0.71	9.96	0.0160	*
AB	0.090	1	0.090	1.26	0.2995	
AC	0.79	1	0.79	11.05	0.0127	*
BC	1.18	1	1.18	16.42	0.0049	**
A ²	2.62	1	2.62	36.49	0.0005	**
B ²	2.60	1	2.60	36.26	0.0005	**
C ²	4.56	1	4.56	63.61	<0.0001	**
残差	0.50	7	0.072			
失拟项	0.22	3	0.073	1.04	0.4654	
纯误差	0.28	4	0.070			
总离差	17.99	16				

注: *, 差异显著 ($P < 0.05$); **, 差异极显著 ($P < 0.01$)。

对建立的模型进行方差分析。由表4可知, 该模型显著性达到极显著水平 ($P < 0.01$), 失拟项不显著 ($P > 0.05$), 说明该模型有较好的拟合度。回归系数显著性检验显示, 一次项A, 二次项A²、B²、C², 交互项BC的影响均达到极显著水平; 一次项B、C, 交互项AC的影响达到显著水平。由P值可知, 在各试验范围内对抑菌圈直径影响的大小依次为: 酶解时间>加酶量>酶解温度。

2.3.2 响应面分析

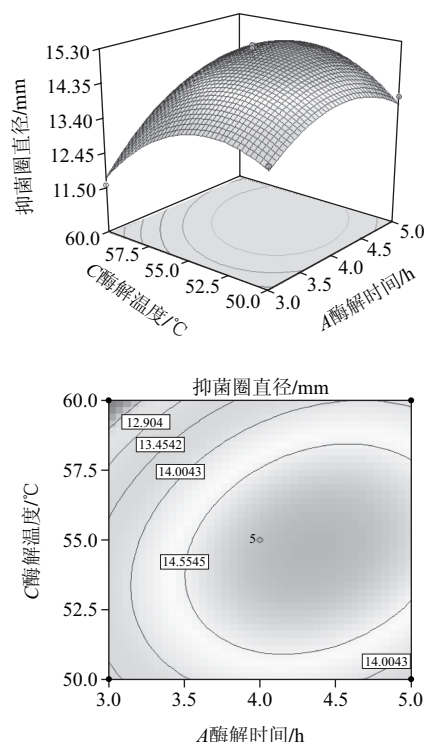


图7 酶解温度和酶解时间交互作用对抑菌活性的影响

Fig.7 Response surface and contour plots for the effect of hydrolysis temperature and hydrolysis time on antibacterial activity

等高线的形状反映交互效应的强弱大小,圆形表示两因素交互作用不显著,而椭圆形则表示两因素交互作用显著^[21]。本实验中,酶解时间与酶解温度(AC)、加酶量与酶解温度(BC)的交互作用对酶解物的抑菌圈直径影响显著。由图7可知,加酶量为500U/g pro时,酶解时间和酶解温度对抑菌圈直径的影响。当酶解时间一定时,随着酶解温度的升高抑菌圈直径先增加后减小,在酶解温度低于55℃时,抑菌圈直径逐渐增加;当酶解温度一定时,抑菌圈直径随着时间的增加先增加后略微减小,酶解时间大于4h时趋于缓和。

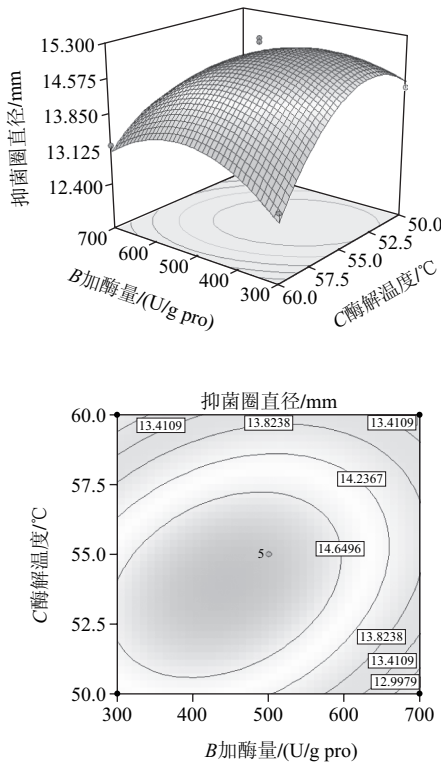


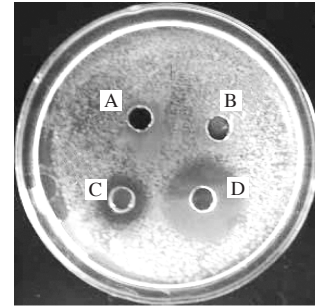
图8 加酶量和酶解温度交互作用对抑菌活性的影响

Fig.8 Response surface and contour plots for the effect of enzyme dosage and hydrolysis temperature on antibacterial activity

由图8可知,酶解时间为4h时,酶解温度和加酶量对抑菌圈直径的影响。加酶量一定时,随着温度的升高抑菌圈直径先增加后减小,酶解温度高于55℃,抑菌圈直径开始减小;当酶解温度一定时,抑菌圈直径随着加酶量的增加而增加,加酶量达到400U/g pro时,趋于缓和,加酶量大于500U/g pro时,抑菌圈直径随着加酶量的增加开始减小。

通过Design-Expert 7.0 Trial软件分析可知,碱性蛋白酶水解黄粉虫蛋白的最佳酶解工艺为底物质量浓度10g/100mL、酶解时间4.37h、加酶量441.27U/g pro、酶解温度54.30℃、pH9.5,在此优化条件下,酶解产物抑菌圈直径的理论值为15.17mm。结合实际条件,最终选择的

实验条件为:底物质量浓度10g/100mL、酶解时间4.4h、加酶量440U/g pro、酶解温度54℃、pH9.5,实际测得酶解产物的抑菌圈直径达到15.04mm,如图9所示,与理论值15.17mm相比,相对误差为0.857%,说明采用响应面法优化得到的酶解工艺参数准确可靠,本实验建立的模型在实际应用中是可行的。



A. 阴性对照; B. 空白对照; C. 黄粉虫蛋白酶解物; D. 阳性对照。

图9 验证实验结果

Fig.9 Validation of the optimized process conditions

3 结论

碱性蛋白酶为酶解黄粉虫蛋白制备抗菌肽的适宜用酶。碱性蛋白酶水解黄粉虫蛋白的最优工艺为:底物质量浓度10g/100mL、加酶量440U/g pro、酶解时间4.4h、酶解温度54℃、pH9.5。在此条件下获得的酶解产物抑菌圈直径最大,可达15.04mm。验证实验结果表明,该模型准确可靠,具有较好的预测能力。酶法制备抗菌肽与提取法相比,具有简单快速、易于工业化等优点,具有现实的意义。但本研究中只选取一种菌作为指示菌表征酶解产物的抑菌活性,代表性不强,这是本研究的不足;后续的工作应对酶解物进行进一步的分离、纯化并系统地研究抗菌肽的抑菌活性。

参考文献:

- [1] 李奕冉,姜玉新,李朝品.黄粉虫蛋白提取工艺的研究进展[J].安徽医药,2010,14(7):751-753.
- [2] 赵大军.黄粉虫的营养成分及食用价值[J].粮油食品科技,2000,8(2):41-42.
- [3] 吴福中,林华峰,刘志红,等.中国黄粉虫产品开发利用的现状及其对策[J].中国农学通报,2005,21(8):72-74.
- [4] 田彩平.抗菌肽的分布及抗肿瘤作用[J].甘肃医药,2011,30(12):722-724.
- [5] BROGDEN K. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria[J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3: 238-250.
- [6] ZASLOFF M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms[J]. Nature, 2002, 415: 389-395.
- [7] CHAN D I, PRENNER E J, VOGEL H J. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action[J].

- Biochimica et Biophysica Acta, 2006, 1758: 1184-1202.
- [8] 江龙法, 谢慧, 邬敏辰, 等. 阳离子抗菌肽的作用机理及构效[J]. 中国医药工业杂志, 2005, 36(4): 244-248.
- [9] 王小平, 徐冠军, 汪钟信. 大肠杆菌对黄粉虫不同虫态诱导动力学的研究[J]. 华中农业大学学报, 2000(3): 223-226.
- [10] XIE Xiansheng, DONG Jianzhen, LI Jing. Analysis of the antimicrobial activity of antimicrobial peptides extracted from immunized tenebrio molitor induced by different microbial treatments against 26 pathogens[J]. Agricultural Science & Technology, 2010, 11(9): 1-4; 9.
- [11] BOLSCHER J G M, DERKRAAN M I A, NAZMI K, et al. A one-enzyme strategy to release an antimicrobial peptide from the L Fampin-domain of bovine lactoferrin[J]. Peptides, 2006, 27: 1-9.
- [12] 王军, 庞广昌. 抗菌肽抗菌机理的研究现状及趋势[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 526-529.
- [13] 王新保, 卢蓉蓉, 任举, 等. 酶法制备乳铁蛋白抗菌肽的工艺[J]. 食品与发酵工业, 2008(2): 98-103.
- [14] 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): 169-170.
- [15] 毕葳, 邢延一, 李燕燕, 等. 应用双缩脲反应测定鳖甲中总肽含量的方法学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 63-65.
- [16] SAH H G, PAG U, BONNESS S, et al. Mammalian defenses: structures and mechanism of antibiotic activity[J]. J Leukoc Biol, 2005, 77: 1210-1215.
- [17] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1612.
- [18] 潘扬昌. 生物酶法制备黄粉虫抗菌肽的研究[D]. 南宁: 广西大学, 2010.
- [19] FLUXÀV S, MAILLARD N, PAGE M G P, et al. Bead diffusion assay for discovering antimicrobial cyclic peptides[J]. The Royal Society of Chemistry, 2011, 47(5): 1434-1436.
- [20] DAS R, DUTTA A, BHATTACHARJEE C. Preparation of sesame peptide and evaluation of antibacterial activity on typical pathogens[J]. Food Chemistry, 2012, 131: 1504-1509.
- [21] 刘进杰, 张玉香, 冯志彬, 等. 超声波提取莲花粉多糖工艺[J]. 食品科学, 2011, 32(18): 44-48.