

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2023.12.009

王虹霁, 赵展展, 李梦圆, 等. 植物源抗真菌肽原材料的筛选及桂皮抗菌肽提取工艺的优化 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2023, 45(12): 76-84.

植物源抗真菌肽原材料的筛选及桂皮抗菌肽提取工艺的优化

王虹霁¹, 赵展展¹, 李梦圆¹, 张超文¹,
王敬仪¹, 韩玉竹^{1,2}

1. 西南大学 动物科学技术学院, 重庆 荣昌 402460; 2. 西南大学 医学院免疫学中心, 重庆 荣昌 402460

摘要: 为寻找抑制霉菌的植物源抗真菌肽(AMPs)的原材料, 选择了 53 种具有潜在抑菌特性的植物材料, 以黄曲霉和黑曲霉为指示菌, 用硫酸铵沉淀法提取抗菌肽, 对其抑菌活性进行评定; 进一步选取桂皮为原材料, 从浸提液种类、料液比、浸提时间和硫酸铵饱和度 4 个方面进行抗菌肽提取工艺的优化. 结果表明: 75.47% 的供试样材料含有抗菌肽, 籽实及根茎类含抗菌肽的比例为 86.11%, 明显高于花叶类(50%). 抑菌圈直径达到 15 mm 以上的包括大蒜、丁香、桂皮、辣椒籽、桑叶、白芨、木香等 12 种材料. 对桂皮提取工艺进行优化, 得出在浸提液为 PBS, 料液比为 1:5.11 g/mL, 浸提时间为 39.29 h, 硫酸铵饱和度为 81.74% 的条件下抑菌效果最好, 抑菌圈直径可达到 33.74 mm ($p < 0.05$). 研究结果显示: 抗菌肽广泛存在于植物组织中; 植物本身可利用的部位中, 籽实及根茎是抗菌肽分布的主要部位; 提取工艺优化后, 桂皮抗菌肽抑菌效果提高了 21.41%.

关键词: 植物源抗真菌肽; 生物防霉; 桂皮; AMPs 提取优化

中图分类号: Q946.8

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2023)12-0076-09

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Screening of Plant-Derived Antifungal Peptides and Optimization of Extraction Process of Antifungal Peptides from Cinnamon

WANG Hongji¹, ZHAO Zhanzhan¹, LI Mengyuan¹,
ZHANG Chaowen¹, WANG Jingyi¹, HAN Yuzhu^{1,2}

1. College of Animal Science and Technology, Rongchang Chongqing 402460, China;

2. Immunology Research Center, Medical Research Institute, Southwest University, Rongchang Chongqing 402460, China

收稿日期: 2022-02-26

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31901929); 重庆市自然科学基金面上项目(cstc2021jcyj-msxmX1021); 中央高校基本业务费专项资金重点项目(XDJK2020B015).

作者简介: 王虹霁, 硕士研究生, 主要从事抗菌活性物质研究.

通信作者: 韩玉竹, 博士, 副教授.

Abstract: To find the raw materials of plant-derived antifungal peptides for inhibiting mold, 53 plant materials with potential antifungal peptides were selected for their antifungal activities against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* determined by inhibition zone diameter. The antifungal peptides were extracted with ammonium sulfate precipitation method. Cinnamon was further selected as the raw material to optimize the extraction process of antifungal peptides from four aspects: the type of extraction solution, the ratio of solid to liquid, the extraction time and the saturation of ammonium sulfate. The results showed that 75.47% of the selected 53 samples contained antifungal peptides. The proportion of seeds and rhizomes containing antifungal peptides was 86.11%, which was significantly higher than that of flowers and leaves (50%). There were 12 materials with an antifungal zone diameter more than 15 mm, including garlic, clove, cinnamon, pepper seeds, mulberry leaves, *Bletilla striata* and *Aucklandiae radix*. The extraction process of cinnamon was optimized. The results showed that the antifungal activity was the best when the extraction solution was PBS, the solid-liquid ratio was 1 : 5.11 g/mL, the extraction time was 39.29 h and the saturation of ammonium sulfate was 80.74%, with an antifungal zone diameter of 33.74 mm ($p < 0.05$). Antifungal peptides widely exist in plant tissues. Among the available parts of plants, seeds and rhizomes were the main parts of the distribution of antifungal peptides. After optimizing the extraction process, the antifungal activity of cinnamon antifungal peptide was increased by 21.41%.

Key words: plant-derived antifungal peptides; biological mildew preventive; cinnamon; AMPs extraction optimization

粮食作物的霉菌污染以及由其引发的腐败变质, 为粮食的储存、生产和销售带来了极大的困扰^[1]. 据美国农业部估计, 世界上 25% 的粮食作物在生长或贮藏期间会受到霉菌污染, 造成巨额的经济损失^[2]; 且霉变的粮食含有多种毒素, 对畜禽的养殖产生了巨大危害^[3-4]. 目前市场上用于防霉的制剂主要为化学药剂, 常用的有丙酸及丙酸盐类、甲酸、乙酸及乙酸盐类等^[5]. 近年来, 化学制剂在饲料加工及后续生产链中引发的安全问题日益受到食品加工等行业的关注, 特别是药物在畜产品中的残留和药物对人体的危害等问题, 由此引发了人们对更安全、更健康的食品防霉剂应用的思考^[6].

植物中含有许多具有活性的抗菌物质, 包括为我们所熟知的黄酮类、有机酸类、生物碱类、甾体皂苷类等, 不同的抗菌物质对细菌、真菌具有不同的抗菌效果和作用机制^[7]. 目前对植物源抗菌物的研究主要集中在药用植物中, 对具体化学物质功能的研究主要集中在医药方面, 但应用还存在诸多限制^[8]. 作为广泛存在于动植物体内的小肽类物质, 部分抗菌肽以稳定的特性展现出更好的杀菌效果^[9, 10]. 相对于传统的抗生素而言, 植物源抗菌肽(AMPs)具有广谱、高效的抗细菌、抗真菌活性, 且不易产生耐药性. 此外, 抗菌肽使用时绿色无污染, 可广泛用于食物保存^[11]、植物病害防治^[12-13]等方面, 具有广阔的应用前景. 桂皮指樟科植物的皮, 含有多种抗炎症、抗肿瘤、抗血栓以及抗菌的活性成分, 比如桂皮醛、香豆素和异硫氰酸酯等^[14]. 目前对于桂皮中挥发性物质的关注较多, 而桂皮中抗菌肽的研究还未有报道. 硫酸铵沉淀法可破坏蛋白质表面的疏水结构, 使蛋白质沉淀且不会破坏其活性, 该方法可从植物浸提液中有效提取抗菌肽, 因此, 此技术的优化对桂皮抗菌肽的提取得率和活性具有重要意义.

目前国内外关于植物源抗菌肽的研究主要集中在中药材方面^[15-16], 其分布及抑菌效果差异分析研究较少. 本文将探究 AMPs 在 53 种价廉易得、有潜在抑菌特性的植物材料中的分布情况, 以粮食和油料作物中常见腐败菌黑曲霉和黄曲霉为指示菌, 根据抗菌肽的抑菌圈大小, 对不同植物中提取的抗菌肽的抗菌效果和含量进行分析, 筛选出抑菌效果较好的植物源. 在前期实验的基础上, 对具有抗菌肽开发潜力的桂皮的抗菌肽提取工艺进行优化, 以期为进一步在食品安全中的应用提供数据借鉴. 研究植物源抗菌肽的分布和提取工艺, 可以扩大粮食作物生物防霉剂、饲料安全添加剂的来源, 同时为 AMPs 的研究提供一定的实验方法及理论参考.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

硫酸铵, 重庆北碚化学试剂厂; PBS, PDA 培养基, 上海博微生物科技有限公司; 黄曲霉和黑曲霉, 西南大学牧草微生物实验室。

经查阅资料, 梳理出了 21 个科共 53 种价廉易得、耐储存、可能会含有植物源抗菌肽的原材料(表 1)。除了部分材料直接从西南大学牧草基地获得, 其余植物材料均购于京东商城。

表 1 植物材料

| 编号 | 样品名称 | 产地 | 科 | 利用部位 | 编号 | 样品名称 | 产地 | 科 | 利用部位 |
|----|-------|----------|-----|------|----|------|----------|------|------|
| 1 | 八角 | 重庆 | 八角科 | 果实 | 28 | 菊花 | 重庆 | 菊科 | 花序 |
| 2 | 薤白 | 重庆 | 百合科 | 鳞茎 | 29 | 木香 | 重庆 | 菊科 | 根 |
| 3 | 大蒜 | 重庆 | 百合科 | 鳞茎 | 30 | 艾叶 | 重庆 | 菊科 | 叶 |
| 4 | 洋葱 | 重庆 | 百合科 | 鳞茎 | 31 | 苦苣菜 | 西南大学牧草基地 | 菊科 | 叶 |
| 5 | 黄芩 | 重庆 | 唇形科 | 根 | 32 | 山奈 | 重庆 | 姜科 | 根茎 |
| 6 | 黄芪 | 重庆 | 豆科 | 根 | 33 | 生姜 | 重庆 | 姜科 | 根茎 |
| 7 | 甘草 | 重庆 | 豆科 | 根茎 | 34 | 白芨 | 重庆 | 兰科 | 块茎 |
| 8 | 绿豆 | 重庆 | 豆科 | 籽实 | 35 | 荞麦 | 重庆 | 蓼科 | 籽实 |
| 9 | 黑豆 | 重庆 | 豆科 | 籽实 | 36 | 连翘 | 重庆 | 木樨科 | 果实 |
| 10 | 豆粕 | 重庆 | 豆科 | 籽实 | 37 | 土豆 | 重庆 | 茄科 | 块茎 |
| 11 | 红豆 | 重庆 | 豆科 | 籽实 | 38 | 辣椒籽 | 重庆 | 茄科 | 籽实 |
| 12 | 黄豆 | 重庆 | 豆科 | 籽实 | 39 | 金银花 | 重庆 | 忍冬科 | 花蕾 |
| 13 | 拉巴豆 | 西南大学牧草基地 | 豆科 | 籽实 | 40 | 板蓝根 | 重庆 | 十字花科 | 根 |
| 14 | 拉巴豆 | 西南大学牧草基地 | 豆科 | 叶 | 41 | 白萝卜 | 重庆 | 十字花科 | 籽实 |
| 15 | 紫花苜蓿 | 西南大学牧草基地 | 豆科 | 叶 | 42 | 柴胡 | 重庆 | 伞形科 | 根 |
| 16 | 麦麸 | 重庆 | 禾本科 | 种皮 | 43 | 白芷 | 重庆 | 伞形科 | 根 |
| 17 | 糯高粱 | 重庆 | 禾本科 | 籽实 | 44 | 孜然 | 重庆 | 伞形科 | 果实 |
| 18 | 小黄米 | 重庆 | 禾本科 | 籽实 | 45 | 小茴香 | 重庆 | 伞形科 | 果实 |
| 19 | 薏仁 | 重庆 | 禾本科 | 籽实 | 46 | 商陆 | 重庆 | 商陆科 | 根 |
| 20 | 皇竹草 | 西南大学牧草基地 | 禾本科 | 叶 | 47 | 桑叶 | 西南大学牧草基地 | 桑科 | 叶 |
| 21 | 玉米 | 重庆 | 禾本科 | 籽实 | 48 | 鱼腥草 | 重庆 | 三白草科 | 叶 |
| 22 | 青贮玉米 | 西南大学牧草基地 | 禾本科 | 叶 | 49 | 丁香 | 重庆 | 桃金娘科 | 花蕾 |
| 23 | 墨西哥玉米 | 西南大学牧草基地 | 禾本科 | 籽实 | 50 | 苎麻 | 西南大学牧草基地 | 荨麻科 | 叶 |
| 24 | 饲用甜高粱 | 西南大学牧草基地 | 禾本科 | 籽实 | 51 | 花椒 | 重庆 | 芸香科 | 果皮 |
| 25 | 麦迪黑麦草 | 西南大学牧草基地 | 禾本科 | 籽实 | 52 | 香叶 | 广西 | 樟科 | 叶 |
| 26 | 麦迪黑麦草 | 西南大学牧草基地 | 禾本科 | 叶 | 53 | 桂皮 | 广西 | 樟科 | 树皮 |
| 27 | 牧童鸭茅 | 西南大学牧草基地 | 禾本科 | 籽实 | | | | | |

1.2 仪器和设备

漩涡振荡器, IKA 广州仪科实验室技术有限公司; 定时恒温磁力搅拌器, 上海沪西分析仪器厂; THZ-C 型空气恒温振荡器, 江苏太仓市实验设备厂; LRH 生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 牛津杯, 北京先驱威峰技术开发公司; 冷冻干燥机, 松源华兴有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 抗菌肽的提取

将所选材料在 65 °C 下烘干至恒质量后, 用自动粉碎机粉碎后过 20 目筛, 并用储物袋保存。采用硫

酸铵沉淀法提取植物源抗菌肽^[17-18], 使用 PBS 缓冲液(pH 值为 7.6, 0.02 mol/L) 200 mL 进行浸提. 加 50 g 磨碎的样品, 4 ℃ 中浸泡 12 h, 搅拌均匀浆, 纱布过滤后, 在 4 ℃, 2 000 r/min 离心 20 min. 上清液中缓慢添加硫酸铵, 使其饱和度达到 80%, 磁力搅拌 30 min 后于 4 ℃ 静置 4 h, 之后在 4 ℃, 10 000 r/min 离心 20 min, 沉淀即为抗菌肽粗提物. 将沉淀冷冻干燥后, 放入干燥器备用. 使用时, 向每种粗提物中加 25 mL 无菌水, 混匀制成抗菌肽溶液, 经 10 KDa 超滤管超滤后, 供抑菌实验检测用.

1.3.2 优化提取工艺

按照筛选实验选择优化材料和指示菌, 分别从浸提液种类、料液比、浸提时间和硫酸铵饱和度等方面进行优化. 采用单因素实验法, 每个处理均设 6 个重复.

1.3.2.1 浸提液种类对抗菌粗提物的影响

浸提时分别使用 Tris-HCl 缓冲液(pH 值为 7.6, 0.02 mol/L), PBS 缓冲液(pH 值为 7.6, 0.02 mol/L)、EDTA 缓冲液(10 mmol/L Na₂HPO₄, 15 mmol/L NaH₂PO₄, 100 mmol/L KCl, 1.5% EDTA), 丙酮以及无菌水. 3 种盐溶液浸提性质较为温和, 丙酮具有良好溶剂效果且挥发性较强.

1.3.2.2 料液比对抗菌粗提物的影响

基于前一实验条件, 设置料液比分别为 1:3, 1:5, 1:7, 1:9.

1.3.2.3 浸提时间对抗菌粗提物的影响

基于前一实验条件, 设置浸提时长分别为 4 h, 8 h, 12 h, 16 h, 24 h, 36 h, 48 h.

1.3.2.4 硫酸铵饱和度对抗菌粗提物的影响

基于前一实验条件, 设置硫酸铵饱和度分别为 50%, 60%, 70%, 80%, 90%.

1.3.2.5 响应面优化

经过单因素实验数据对比, 选取料液比、浸提时间、硫酸铵饱和度为自变量, 抑菌圈直径为响应值, 采用 Box-Behnken 设计方法, 设计 3 因素 3 水平的 Box-Behnken 中心组合实验(表 2), 并对实验结果进行验证.

表 2 响应面实验因素水平

| | 因素 | 水平 | | |
|---|-----------------------------|-----|-----|-----|
| | | -1 | 0 | 1 |
| A | 料液比/(g · mL ⁻¹) | 1:3 | 1:5 | 1:7 |
| B | 浸提时间/h | 24 | 36 | 48 |
| C | 硫酸铵饱和度/% | 70 | 80 | 90 |

1.3.3 分析方法

筛选实验和优化实验均采用牛津杯双层琼脂平板扩散抑菌圈法测定提取物的抑菌效果, 用游标卡尺测量抑菌圈直径. 筛选实验以黄曲霉和黑曲霉为指示菌, 优化实验以黄曲霉为指示菌. 将保存的纯种霉菌活化, 28 ℃ 培养 7 d, 加入灭菌水后刮取孢子, 配制浓度为 1 × 10⁶ 个/mL 的孢子悬浮液. 吸取 10 mL 孢子悬浮液至装有冷却到 45 ℃ 的 200 mL PDA 培养基的无菌瓶中, 充分混匀孢子液和培养基, 然后倒 20 mL 至培养皿(直径为 90 mm)中, 制成含菌平板. 在灭菌的牛津杯里加入 100 μL 抗菌粗提物水解液, 做好标记, 密封好后在 4 ℃ 的冰箱中浸润 12 h, 以促使抗菌物有效浸入培养基内, 而后转置 28 ℃ 恒温培养, 48 h 后用游标卡尺测量抑菌圈直径, 设空白加无菌水为对照, 每个处理重复测 6 次, 结果取平均值.

2 结果与分析

2.1 植物源抗菌肽(AMPs)原材料的筛选

本实验对 21 个科共 53 种材料进行 AMPs 的提取, 并对其抑菌效果进行比较, 结果表明, 在 53 种实验材料中共有 40 种表现出抑菌活性, 占比为 75.47%(表 3). 不同植物之间, 籽实、根、根茎、鳞茎及块茎含抗菌肽的比例为 86.11%, 明显高于含抗菌肽比例为 50% 的花蕾、花序、叶片及茎叶. 相同植物不同部位之间, 如拉巴豆、黑麦草、玉米的籽实都表现出抑菌效果, 而茎叶无抑菌效果.

表 3 53 种植物源抗菌肽的抑菌圈大小

| 编号 | 样品名称 | 抑黑曲霉直径/ 抑黄曲霉直径/ | | 编号 | 样品名称 | 抑黑曲霉直径/ 抑黄曲霉直径/ | |
|----|---------|-----------------|------------|----|------|-----------------|------------|
| | | mm | mm | | | mm | mm |
| 1 | 八角 | 9.42±0.72 | 8.21±0.81 | 28 | 菊花 | 0 | 0 |
| 2 | 薤白 | 10.44±1.14 | 7.98±0.65 | 29 | 木香 | 17.86±1.22 | 19.92±1.42 |
| 3 | 大蒜 | 41.96±2.14 | 41.16±2.01 | 30 | 艾叶 | 10.51±1.64 | 9.25±0.92 |
| 4 | 洋葱 | 12.52±1.58 | 15.98±1.32 | 31 | 苦苣菜 | 0 | 0 |
| 5 | 黄芩 | 21.50±0.87 | 22.64±1.09 | 32 | 山奈 | 10.82±1.81 | 16.15±1.55 |
| 6 | 黄芪 | 16.10±1.66 | 14.28±1.24 | 33 | 生姜 | 13.68±1.43 | 12.52±0.93 |
| 7 | 甘草 | 18.50±1.15 | 16.82±1.43 | 34 | 白芨 | 25.17±0.44 | 15.82±0.97 |
| 8 | 绿豆 | 0 | 0 | 35 | 荞麦 | 0 | 0 |
| 9 | 黑豆 | 15.44±1.38 | 13.46±1.53 | 36 | 连翘 | 9.94±0.72 | 8.04±0.82 |
| 10 | 豆粕 | 13.32±0.97 | 24.19±0.74 | 37 | 土豆 | 0 | 0 |
| 11 | 红豆 | 0 | 0 | 38 | 辣椒籽 | 27.25±1.51 | 26.19±1.43 |
| 12 | 黄豆 | 14.14±0.56 | 15.32±0.97 | 39 | 金银花 | 22.16±1.87 | 12.38±1.18 |
| 13 | 拉巴豆籽实 | 9.52±0.82 | 8.46±0.74 | 40 | 板蓝根 | 9.34±0.82 | 8.94±1.26 |
| 14 | 拉巴豆茎叶 | 0 | 0 | 41 | 白萝卜 | 21.42±1.22 | 20.94±1.91 |
| 15 | 紫花苜蓿 | 0 | 0 | 42 | 柴胡 | 11.30±1.03 | 9.83±1.12 |
| 16 | 麦麸 | 23.24±1.02 | 14.06±0.85 | 43 | 白芷 | 11.32±0.97 | 11.84±0.76 |
| 17 | 糯高粱 | 21.42±0.91 | 15.94±0.75 | 44 | 孜然 | 9.93±0.89 | 9.24±0.78 |
| 18 | 小黄米 | 0 | 0 | 45 | 小茴香 | 10.08±1.12 | 8.28±0.82 |
| 19 | 薏仁 | 10.31±1.02 | 12.12±1.14 | 46 | 商陆 | 10.38±1.78 | 14.00±1.31 |
| 20 | 皇竹草 | 25.09±1.71 | 14.70±1.32 | 47 | 桑叶 | 23.64±1.71 | 21.90±1.55 |
| 21 | 玉米 | 26.98±1.10 | 14.42±1.05 | 48 | 鱼腥草 | 13.33±0.98 | 9.42±0.86 |
| 22 | 青贮玉米 | 0 | 0 | 49 | 丁香 | 29.52±2.01 | 30.16±1.94 |
| 23 | 墨西哥玉米 | 19.20±0.83 | 15.64±0.77 | 50 | 苎麻 | 0 | 0 |
| 24 | 饲用甜高粱 | 18.13±1.36 | 14.87±1.42 | 51 | 花椒 | 0 | 0 |
| 25 | 麦迪黑麦草籽实 | 22.87±1.91 | 14.72±1.01 | 52 | 香叶 | 13.28±1.65 | 8.86±0.91 |
| 26 | 麦迪黑麦草茎叶 | 0 | 0 | 53 | 桂皮 | 29.08±1.84 | 27.79±1.73 |
| 27 | 牧童鸭茅 | 17.12±0.98 | 14.48±1.22 | | | | |

注：“0”表示没有抑菌效果。

在 40 种有抗菌效果的材料中，同时抑制黄曲霉和黑曲霉的抑菌圈直径达到 15 mm 以上的材料共有 12 种，其中大蒜(3)、辣椒籽(38)、丁香(49)和桂皮(53)的抑菌效果尤为突出，抑制黄曲霉和黑曲霉的直径均在 25 mm 以上，大蒜对两种菌的抑菌圈直径均达到了 41 mm，其次为丁香、桂皮、辣椒籽。只对黑曲霉的抑菌圈达到 15 mm 及其以上的材料共有 9 种，只对黄曲霉的抑菌圈达到 15 mm 及其以上的材料共有 4 种。

结合抗菌肽研究现状，同时考虑实验效果、取材的方便性和价格等多种因素，最终选择桂皮为材料，对其抗菌肽的提取工艺进行优化。

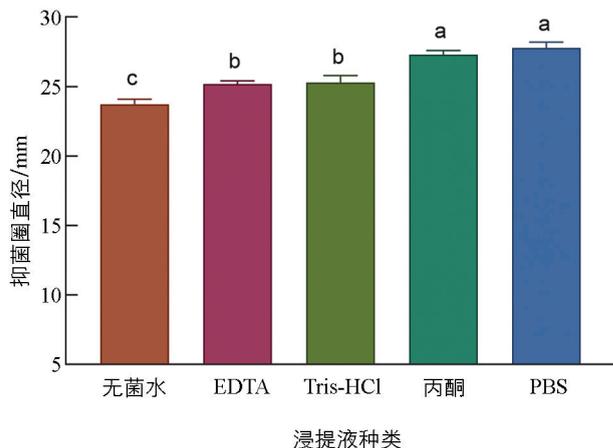
2.2 浸提液种类对抗菌肽提取效果的影响

浸提液不仅影响抗菌肽提取的数量和效率，而且关系到提取成本的高低，对实验研究和批次生产都起着重要的作用。由图 1 可知，5 种浸提液均能提出抗菌肽，但浸提液丙酮和 PBS 的浸提物抑菌效果显著高于其余 3 种浸提液($p < 0.05$)，PBS 浸提的抑菌圈最大，直径达到了 27.41 mm。无菌水的浸提物抑菌效果显著低于其余 4 种浸提液($p < 0.05$)，抑菌圈直径只有 23.41 mm，表明浸提液的种类对于浸提物抑菌效果的影响显著。虽然 PBS 和丙酮的浸提物抑菌效果之间差异无统计学意义($p > 0.05$)，但与丙酮相比，PBS

价格更低廉且无毒, 所以优化实验中选择 PBS 作为浸提液。

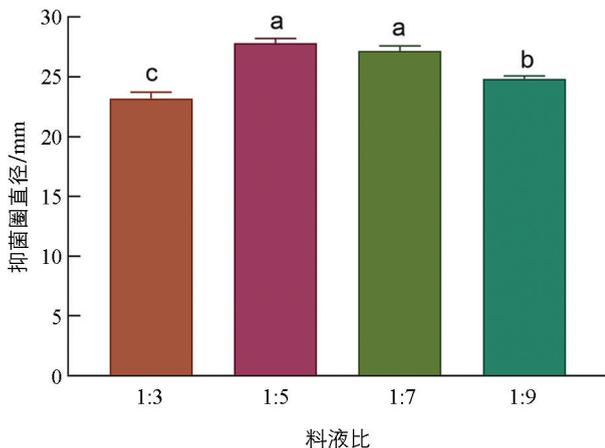
2.3 料液比对抗菌肽提取效果的影响

料液比会影响抗菌肽的提取效率和效果, 影响所获得的蛋白沉淀物的数量, 与整个实验的操作效率和复杂程度有关, 恰当的料液比可降低成本, 提高提取方法的可操作性。由图 2 可知, 料液比为 1:5 和 1:7 的抑菌效果显著高于其余两组 ($p < 0.05$), 料液比为 1:3 的抑菌效果最差, 料液比 1:5 之后抑菌效果发生回落。虽然料液比为 1:5 和 1:7 的抑菌效果之间差异无统计学意义 ($p > 0.05$), 但料液比为 1:5 的抑菌效果更好, 因此后续优化实验选用料液比为 1:5。



小写字母不同表示 $p < 0.05$, 差异有统计学意义。

图 1 不同浸提液对桂皮抗菌肽提取效果的影响



小写字母不同表示 $p < 0.05$, 差异有统计学意义。

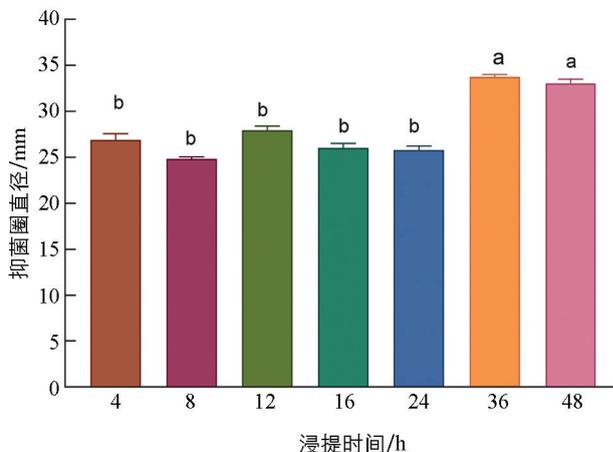
图 2 不同料液比对桂皮抗菌肽提取效果的影响

2.4 浸提时间对抗菌肽提取效果的影响

合适的浸提时间才能保证抗菌肽从原材料中充分释放。由图 3 可知, 浸提 36 h 和 48 h 的抑菌效果显著高于其余 5 个处理 ($p < 0.05$), 4 h, 8 h, 12 h, 16 h, 24 h 的抑菌效果间差异无统计学意义 ($p > 0.05$)。浸提 36 h 和浸提 48 h 二者的抑菌效果差异无统计学意义 ($p > 0.05$), 为了提高浸提效率, 在后续优化实验中浸提时间选用 36 h。

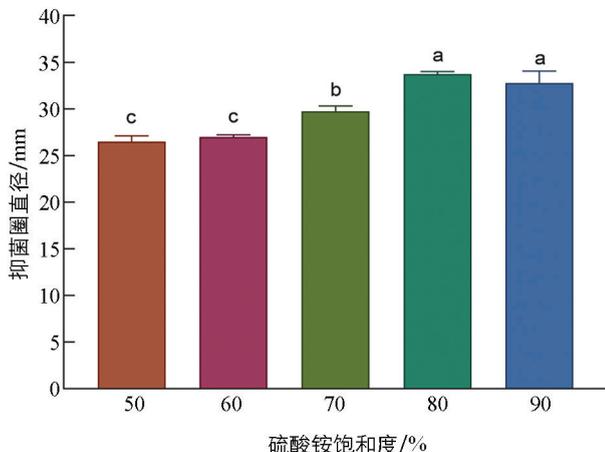
2.5 硫酸铵饱和度对抗菌肽提取效果的影响

由图 4 可知, 不同饱和度的硫酸铵对桂皮抗菌肽的抑菌效果影响明显。饱和度为 80% 和 90% 的抑菌效果显著高于其余 3 个处理 ($p < 0.05$), 饱和度为 50% 和 60% 之间差异无统计学意义 ($p > 0.05$), 效果低于其余 3 个处理。饱和度为 80% 和 90% 之间的抑菌效果差异无统计学意义, 但考虑成本和降低物耗以及环境污染, 认为 80% 的硫酸铵饱和度更适合于植物源抗菌肽的提取。



小写字母不同表示 $p < 0.05$, 差异有统计学意义。

图 3 不同浸提时间对桂皮抗菌肽提取效果的影响



小写字母不同表示 $p < 0.05$, 差异有统计学意义。

图 4 不同饱和度对桂皮抗菌肽提取效果的影响

2.6 桂皮抗菌肽提取响应面优化分析

2.6.1 响应面回归模型建立及结果分析

响应面实验设计和结果如表 4, 获得桂皮抗菌肽的抑菌圈直径(Y)对料液比(A)、浸提时间(B)、硫酸铵饱和度(C)的多元回归方程:

$$Y = 33.74 + 0.92A + 1.97B + 0.46C + 0.29AB + 0.23AC + 0.032BC - 2.41A^2 - 3.16B^2 - 1.43C^2$$

表 4 中心组合实验设计及结果

| 试验号 | 料液比(A)/(g · mL ⁻¹) | 浸提时间(B)/h | 硫酸铵饱和度(C)/% | 抑菌圈直径(Y)/mm |
|-----|------------------------------------|---------------|-----------------|-----------------|
| 1 | 1 : 3 | 24 | 80 | 25.94 |
| 2 | 1 : 7 | 24 | 80 | 26.65 |
| 3 | 1 : 3 | 48 | 80 | 29.11 |
| 4 | 1 : 7 | 48 | 80 | 30.97 |
| 5 | 1 : 3 | 36 | 70 | 28.64 |
| 6 | 1 : 7 | 36 | 70 | 30.57 |
| 7 | 1 : 3 | 36 | 90 | 28.77 |
| 8 | 1 : 7 | 36 | 90 | 31.61 |
| 9 | 1 : 5 | 24 | 70 | 26.49 |
| 10 | 1 : 5 | 48 | 70 | 30.55 |
| 11 | 1 : 5 | 24 | 90 | 27.68 |
| 12 | 1 : 5 | 48 | 90 | 31.87 |
| 13 | 1 : 5 | 36 | 80 | 33.54 |
| 14 | 1 : 5 | 36 | 80 | 34.16 |
| 15 | 1 : 5 | 36 | 80 | 33.83 |
| 16 | 1 : 5 | 36 | 80 | 33.27 |
| 17 | 1 : 5 | 36 | 80 | 33.92 |

通过 Design Expert 8.0.6.1 软件分析(图 5), 桂皮抗菌肽最佳提取条件为料液比 1 : 5.11 g/mL, 浸提时间 39.29 h, 硫酸铵饱和度 81.74%, 在此条件下抗菌肽的抑菌圈直径为 34.20 mm.

2.6.2 回归模型验证

根据响应面的最优条件进行验证, 重复 6 次, 桂皮抗菌肽的抑菌圈直径平均值为 33.74 mm, 与预测值拟合率为 98.65%, 优化模型可靠. 优化后抗菌肽活性比优化前(27.79 mm)提高了 21.41%, 表明此优化方案合理, 可提高桂皮抗菌肽的获得率.

3 讨论与结论

植物源抗菌肽被认为是一种有希望的、绿色安全的生物防霉剂, 在食品、医药、畜牧方面有巨大的发展潜能. 本研究选择的 53 种实验材料中, 含有抗菌肽的植物占被测总数的 75.47%, 而 Srinivasan 等^[19]研究了 50 种药用植物, 其中有抗菌活性的植物占 72%. 本研究优先选择了利用广泛、具有消炎作用的植物材料, 这些植物材料可能含有抑制霉菌的抗菌肽, 因此比例接近. 相同植物材料之间, 种子和茎叶的抗菌肽含量不同, 例如麦迪黑麦草、拉巴豆、玉米种子中均能提取出抗菌肽, 而茎叶粗提物则无抗菌活性, 因此推测抗菌肽主要分布在籽实及根茎部位, 53 种植物材料中籽实及根茎所含抗菌肽的比例高达 86.11%也可以证明此结论. 根据抑菌圈的大小, 筛选出大蒜、丁香、桂皮、辣椒籽对黑曲霉和黄曲霉抑菌效果最好. 此外黄芪、甘草、豆粕、麦麸、黑豆、木香、白芨、金银花、黄芩、洋葱、饲用甜高粱等多种植物提取的抗菌肽都有较好的抑制霉菌的作用. 目前除了辣椒籽、黑豆等少数材料^[17,20]研究过抗菌肽的抑菌活性, 其余材料的抑菌研究主要集中于黄酮类^[21]、有机酸^[22]、内生菌^[23]等方面, 鲜有关于其抗菌肽的相关研究. 另外, 本研究还首次发现糯高粱、皇竹草植物组织中含有抗菌物质——抗菌肽, 且对黄曲霉或黑曲霉有较好的抑菌效果.

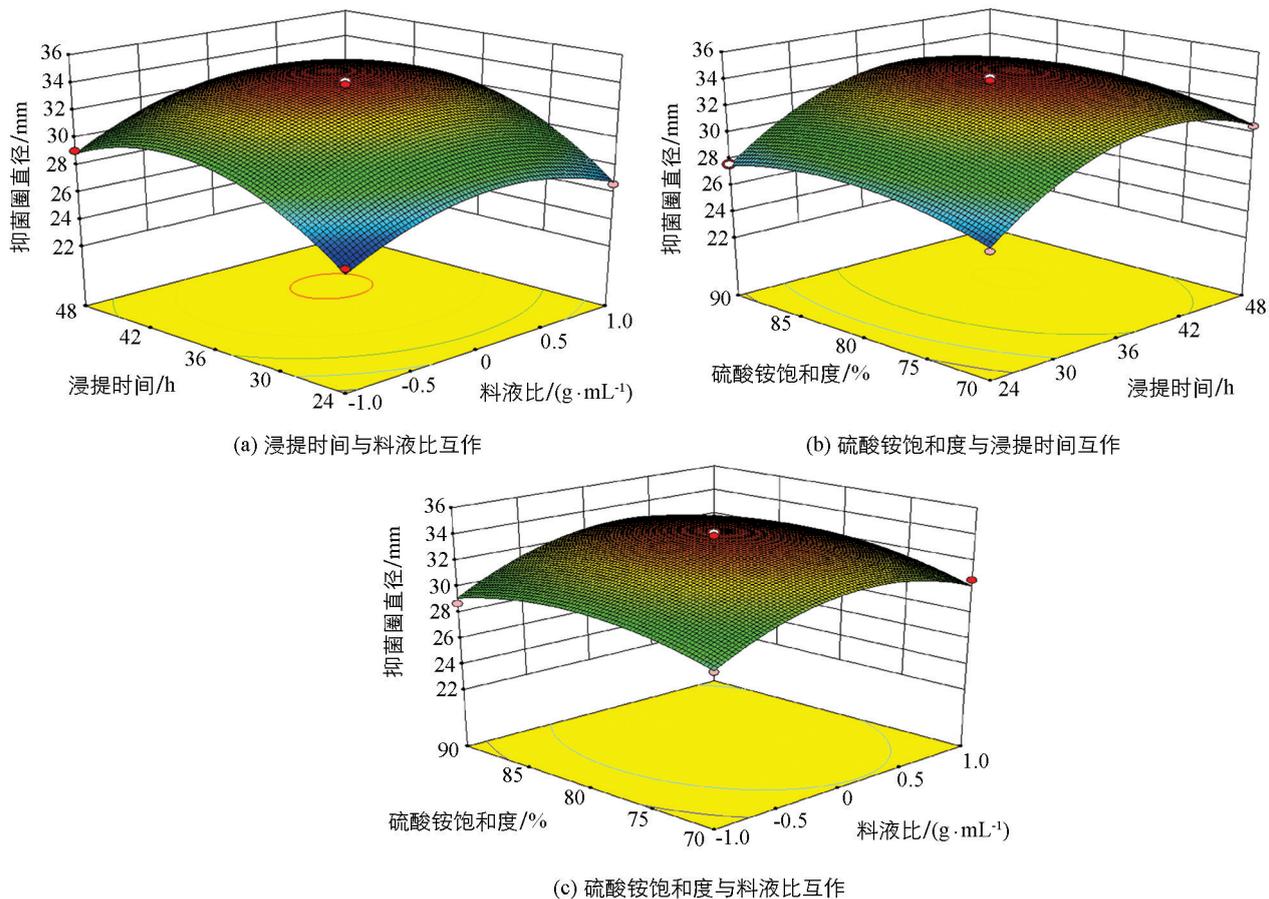


图 5 各因素互作对桂皮抗菌肽抑菌圈直径的影响

桂皮是天竺桂、阴香、细叶香桂或川桂等树皮的通称, 桂皮中的活性物质——桂皮醛和桂皮醇也对多种细菌、真菌有抑菌效果^[14,24], 但目前还没有关于桂皮抗菌肽的报道. 本实验提取抗菌肽时, 首先对桂皮进行了烘干处理, 在此过程中可去除桂皮中的桂皮醛和桂皮醇等挥发性抑菌物质. PBS 萃取和硫酸铵沉淀法是经典也是目前广泛采用的分离和提取抗菌肽的方法^[25-26], 经 10 KDa 超滤管超滤后, 可去掉具有抗菌效果的酶类等蛋白, 得到小分子量的抗菌肽. 采用此法得到的桂皮抗菌肽对黑曲霉和黄曲霉均具有较好的抑菌效果, 抑菌圈直径分别为 29.08 mm 和 27.79 mm, 经提取工艺优化后, 抑制黄曲霉的效果提升了 21.41%, 达到 33.74 mm, 结果可对下一步桂皮抗菌肽的结构解析、抑菌机理、开发应用提供数据参考.

综上, 植物源抗菌肽是一种绿色安全的生物资源, 广泛分布于植物籽实及根茎部位. 合理利用植物源抗真菌肽, 可减少粮食作物的霉菌污染. 对这些 AMPs 资源的挖掘, 可为扩大生物防霉剂和饲料添加剂来源提供思路.

参考文献:

- [1] 韩业东, 李延山, 刘再胜, 等. 2020 年饲料和饲料原料中霉菌毒素监测分析报告 [J]. 新农业, 2021(13): 48-50.
- [2] USDA GRAIN. Fungal Diseases and Mycotoxin Reference [M]. Washington: DC-United States Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration, 2016.
- [3] 张勇, 王梦晨, 董浩, 等. 霉变饲料对肉鸡生长性能、抗氧化性能及组织形态的影响 [J]. 饲料研究, 2021, 44(12): 37-40.
- [4] YANG B L, Li L, GENG H R et al. Detoxification of Aflatoxin B₁ by H₂SO₃ during Maize Wet Processing, and Toxicity Assessment of the Transformation Product of Aflatoxin B₁ [J]. Food Control, 2022, 131: 108444.
- [5] 王孝忠, 赵明, 熊同舟, 等. 饲料防霉剂和脱霉剂研究进展 [J]. 饲料博览, 2020(10): 13-17.
- [6] SHWAIKI L N, LYNCH K M, ARENDT E K. Future of Antimicrobial Peptides Derived from Plants in Food Application-A Focus on Synthetic Peptides [J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 112(4): 312-324.

- [7] 蔺蓓蓓, 徐尤美, 吴三桥, 等. 秦岭植物源抗菌活性物质的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2018, 46(13): 15-19.
- [8] IBRAHIM N, KEBEDE A. *In vitro* Antibacterial Activities of Methanol and Aqueous Leave Extracts of Selected Medicinal Plants Against Human Pathogenic Bacteria [J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2020, 27(9): 2261-2268.
- [9] HAN Y Z, ZHAO J J, ZHANG B et al. Effect of a Novel Antifungal Peptide P852 on Cell Morphology and Membrane Permeability of *Fusarium oxysporum* [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2019, 1861(2): 532-539.
- [10] HUANG C Y, ARAUJO K, SÁNCHEZ J N, et al. A Stable Antimicrobial Peptide with Dual Functions of Treating and Preventing Citrus Huanglongbing [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2021, 118(6): e2019628118.
- [11] 吴海虹, 刘芳, 靳盼盼, 等. 3 种植物源抗菌剂对青虾虾仁贮藏货架期及腐败菌多样性的影响 [J]. 食品科学, 2019, 40(21): 188-195.
- [12] YANG L, GUAN D L, VALLS M, et al. Sustainable Natural Bioresources in Crop Protection: Antimicrobial Hydroxycoumarins Induce Membrane Depolarization-associated Changes in the Transcriptome of *Ralstonia solanacearum* [J]. Pest Management Science, 2021, 77(11): 5170-5185.
- [13] YANG L, WEI Z, LI S et al. Plant Secondary Metabolite, Daphnetin Reduces Extracellular Polysaccharides Production and Virulence Factors of *Ralstonia solanacearum* [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2021, 179: 104948.
- [14] 韦露玲, 谢凤凤, 黄飘玲, 等. HS-SPME-GC-MS 分析比较肉桂挥发性成分 [J]. 湖北农业科学, 2021, 60(21): 97-102.
- [15] CUNSOLO V, SCHICCHI R, CHIARAMONTE M, et al. Identification of New Antimicrobial Peptides from Mediterranean Medical Plant *Charybdis pancration* (Steinh.) Speta [J]. Antibiotics (Basel, Switzerland), 2020, 9(11): 747.
- [16] 李晓丹. 药用植物内生细菌 HDXY-02 抗真菌物质毒黄素的分离鉴定和合成调控机制 [D]. 南京: 南京师范大学, 2020.
- [17] 韩玉竹, 曾兵, 孟醒, 等. 辣椒籽抗菌肽对黄曲霉的抑制作用 [J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(6): 110-114.
- [18] DOS SANTOS L A, TAVEIRA G B, RIBEIRO S F F, et al. Purification and Characterization of Peptides from Capsicum Annuum Fruits which are α -Amylase Inhibitors and Exhibit High Antimicrobial Activity Against Fungi of Agonomic Importance [J]. Protein Expression and Purification, 2017, 132: 97-107.
- [19] SRINIVASAN D, NATHAN S, SURESH T, et al. Antimicrobial Activity of Certain Indian Medicinal Plants Used in Folkloric Medicine [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2001, 74(3): 217-220.
- [20] 邵彪, 汪少芸, 叶秀云, 等. 黑豆中抗真菌蛋白的纯化及活性鉴定 [J]. 福州大学学报(自然科学版), 2007, 35(6): 945-948.
- [21] 张亚芬, 管杨洋, 钟茂程, 等. 响应面法优化井栏边草总黄酮提取工艺及其提取物的生物活性 [J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2021, 46(8): 66-73.
- [22] PAZO M V, ASPROMONTE S G, ALONSO E et al. Extraction of Ferulic Acid and Feruloylated Arabinoxyl-Oligosaccharides from Wheat Bran Using Pressurized Hot Water [J]. Food Bioscience, 2021, 44: 101374.
- [23] 马敏芝. 黑麦草内生真菌生物学、生理学及其抑菌特性研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2009.
- [24] 南洋, 徐鹏, 高宁, 等. 肉桂的化学成分及抑菌作用探索 [J]. 中国调味品, 2016, 41(3): 158-160.
- [25] 欧婷, 金必堃, 高海英, 等. *Bacillus velezensis* SWUJ1 拮抗物质分离纯化及抑菌机理研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2022, 44(1): 75-87.
- [26] BARASHKOVA A S, ROGOZHIN E A. Isolation of Antimicrobial Peptides from Different Plant Sources: Does a General Extraction Method Exist [J]. Plant Methods, 2020, 16: 143.