



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108728508 B

(45) 授权公告日 2020.11.24

(21) 申请号 201810616068.0

CN 105002251 A, 2015.10.28

(22) 申请日 2018.06.14

WO 9827805 A1, 1998.07.02

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108728508 A

矫春娜等.醇提法制备榛仁浓缩蛋白的工艺.《大连工业大学学报》.2012,第31卷(第6期),第409-411页.

(43) 申请公布日 2018.11.02

杜丽清等.澳洲坚果蛋白肽制备工艺及抗氧化活性研究.《热带农业工程》.2016,第40卷(第Z1期),第1-6页.

(73) 专利权人 云南省热带作物科学研究所
地址 666100 云南省西双版纳傣族自治州
景洪市宣慰大道99号

李燕等.抗菌肽的制备和抗菌机制研究进展.《生物医学工程学杂志》.2015,第32卷(第2期),第465-466页.

(72) 发明人 郭刚军 邹建云 马尚玄 付稼榕
黄克昌 徐荣

郭刚军等.液压榨澳洲坚果粕酶解制备多肽工艺优化.《食品科学》.2016,第37卷(第17期),第173-178页.

(74) 专利代理机构 成都帝鹏知识产权代理事务
所(普通合伙) 51265
代理人 黎照西

John P.Marcus等.A family of antimicrobial peptides is produced by processing of a 7S globulin protein in Macadamia integrifolia kernels.《The Plant Journal》.1999,第19卷(第6期),第699-710页.

(51) Int. Cl.
C12P 21/06 (2006.01)
C07K 1/34 (2006.01)

审查员 王静

(56) 对比文件
CN 107814829 A, 2018.03.20
CN 103719531 A, 2014.04.16

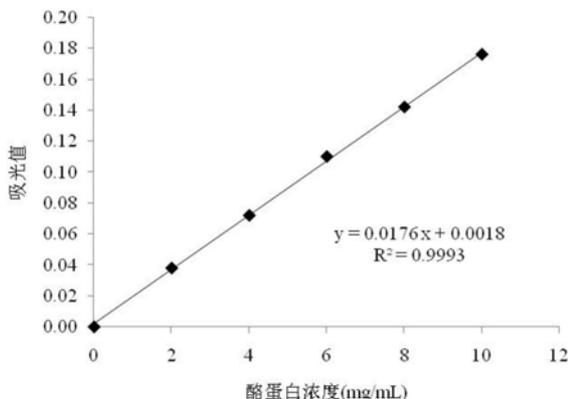
权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

一种具有抗菌活性澳洲坚果多肽的制备方法

(57) 摘要

本发明提供了一种制备具有抗菌活性澳洲坚果多肽的方法,属于植物多肽制备领域。本发明提供的方法,是以澳洲坚果粕为原料,通过加入特定的复合酶进行酶解,从而实现水解蛋白获得具有特定结构的多肽,再通过对多肽进行分子量截留而获得。采用本发明方法获得的澳洲坚果多肽表现出对多种菌种均具有较强的抑菌活性。



1. 一种具有抗菌活性澳洲坚果多肽的制备方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:
(1) 取澳洲坚果果仁,经烘干后进行冷榨脱脂,得到澳洲坚果粕,经乙醇充分浸提后,向浸提液中加入复合酶进行酶解,调节酶解的pH值为7.5~8.0,酶解温度为45~50℃,酶解反应的时间为1.5~2.0h;所述复合酶的组成按质量比计为:中性蛋白酶:碱性蛋白酶:木瓜蛋白酶=2:1:1,复合酶用量为澳洲坚果粕质量的1~1.5%;酶解完毕后进行灭酶处理,得到澳洲坚果酶解多肽液;(2) 将步骤(1)所得酶解多肽液冷却至室温,离心后取上清液,调pH值至4.6,静置30min后再次离心,收集上清液;(3) 将步骤(2)收集的上清液装入透析袋中进行透析,透析两次后截留分子量为100~300Da的透析液,经冷冻干燥后,即得澳洲坚果抗菌活性多肽。

2. 根据权利要求1所述的具有抗菌活性澳洲坚果多肽的制备方法,其特征在于,步骤(1)中所述乙醇浸提的步骤为:将澳洲坚果粕粉碎,过60目筛,然后向其中加入体积分数60%的乙醇溶液,充分混匀后置于恒温水浴中浸提1h,然后加热煮沸至无乙醇味。

3. 根据权利要求2所述的具有抗菌活性澳洲坚果多肽的制备方法,其特征在于,所述恒温水浴的温度为55~60℃,待煮沸除去乙醇后,冷却至酶解所需温度。

4. 根据权利要求2所述的具有抗菌活性澳洲坚果多肽的制备方法,其特征在于,所述澳洲坚果粕与乙醇溶液的料液比为1:5g/mL。

5. 根据权利要求1所述的具有抗菌活性澳洲坚果多肽的制备方法,其特征在于,所述冷榨脱脂的操作为:将澳洲坚果果仁在20~25℃、压力45~55MPa下压榨50~60min。

6. 根据权利要求1所述的具有抗菌活性澳洲坚果多肽的制备方法,其特征在于,所述灭酶处理的条件为:加热酶解液至85℃以上灭酶5~10min。

7. 根据权利要求1所述的具有抗菌活性澳洲坚果多肽的制备方法,其特征在于,步骤(2)中所述两次离心的条件均为:于4000r/min离心10min。

8. 根据权利要求1所述的具有抗菌活性澳洲坚果多肽的制备方法,其特征在于,所述透析时,将第一次透析后的袋外液体通过旋转蒸发仪富集,温度为54℃,真空泵压力为90bar,转速为140r/min。

9. 根据权利要求1所述的具有抗菌活性澳洲坚果多肽的制备方法,其特征在于,所述透析袋使用前经过煮沸处理10min。

一种具有抗菌活性澳洲坚果多肽的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于植物多肽制备技术领域,具体涉及一种具有抗菌活性澳洲坚果多肽的制备方法。

背景技术

[0002] 澳洲坚果 (*Macadamia* spp.),又名昆士兰栗、夏威夷果、巴布果、澳洲胡桃等,是山龙眼科 (Proteaceae) 澳洲坚果属 (*Macadamia* F.Muell) 多年生常绿果树,原产于澳大利亚昆士兰东南部和新西兰威尔士东北部 (南纬25~29°) 的亚热带森林,是世界著名的坚果。澳洲坚果从20世纪70年代开始引入中国,云南自1981年开始引种,1996年开始生产性规模种植,至2017年底全省种植面积已达260多万亩。澳洲坚果可食部分为果仁,含油量高、营养丰富、可生吃,烤制后酥脆可口,质地细腻,带有奶油清香,风味极佳,经济价值高,在国际市场上深受青睐,被誉为“坚果之王”。随着《云南省澳洲坚果产业规划(2013—2020)》的实施,我国澳洲坚果壳果产量有望达到100万t/年,澳洲坚果油将成为重要的产品形式。澳洲坚果油为单一不饱和脂肪酸,其中油酸和棕榈油酸占81.8%,油质清亮透明,是高级的天然色拉油。经榨油后的副产物澳洲坚果粕中含有较高含量的蛋白质、谷氨酸、精氨酸、天冬氨酸、亮氨酸与赖氨酸,通过酶法制备多肽是提高澳洲坚果粕蛋白利用率的有效途径之一。

[0003] 多肽是指分子结构介于氨基酸和蛋白质之间的一类化合物,由多种氨基酸按照一定的排列顺序通过肽键结合而成,它是由多个分子 α -氨基酸的 $-NH_2$ 与 $-COOH$ 互相缩合失水后形成10~50个肽键($-CONH-$)的长链化合物。多肽除了具有易被人体消化吸收的特性外,还有多种对人体有益的生理功能,如抗氧化性、降血压、降低胆固醇含量、促进钙吸收等。多肽的制备可由酶解法水解蛋白质获得,相对于化学法,酶解法水解蛋白质具有反应条件温和、反应时间短、产品营养价值高等优点。多肽性能的决定因素是由构成多肽的氨基酸来决定的,具体而言是由氨基酸的种类、氨基酸的数量以及氨基酸的排列顺序来决定的。在多肽制备时,酶的种类决定着氨基酸的种类,酶的用量和酶的组分比例决定着多肽中各种氨基酸数目的比例和多肽的氨基酸排列顺序,从而决定着多肽的不同性能。目前,利用蛋白酶水解法提取澳洲坚果蛋白制备多肽已有文献报道。

[0004] 但是,尚未发现有制备澳洲坚果抗菌肽的相关报道,研究澳洲坚果抗菌肽对不同菌种的抗菌活性有着重要意义。

发明内容

[0005] 本发明的目的就是为了解决上述技术问题,从而提供一种具有抗菌活性澳洲坚果多肽的制备方法,以期解决在澳洲坚果抗菌肽的制备上尚处于空白的报道。

[0006] 为了实现上述目的,本发明采用的技术方案为:一种具有抗菌活性澳洲坚果多肽的制备方法,包括如下步骤:

[0007] (1) 取澳洲坚果果仁,经烘干后进行冷榨脱脂,得到澳洲坚果粕,经乙醇充分浸提后,向浸提液中加入复合酶进行酶解,调节酶解的pH值为7.5~8.0,酶解温度为45~50℃,

酶解反应的时间为1.5~2.0h;所述复合酶的组成按质量比计为:中性蛋白酶:碱性蛋白酶:木瓜蛋白酶=2:1:1,复合酶用量为澳洲坚果粕质量的1~1.5%;酶解完毕后进行灭酶处理,得到澳洲坚果酶解多肽液;

[0008] (2) 将步骤(1)所得酶解多肽液冷却至室温,离心后取上清液,调pH值至4.6,静置30min后再次离心,收集上清液;

[0009] (3) 将步骤(2)收集的上清液装入透析袋中进行透析,透析两次后截留分子量为2000~3500Da的透析液,即得澳洲坚果抗菌活性多肽。

[0010] 本发明以澳洲坚果粕为原料,通过加入特定的复合酶进行酶解,实现了水解蛋白获得具有特定结构的多肽,再通过对多肽进行分子量截留而获得。在该酶解工艺下,获得的多肽中氨基酸种类和数量的结合,以及该多肽的分子量范围,使得该多肽结构具备了显著的抑菌活性。如本发明实施例所示,按照上述方法制备得到的澳洲坚果多肽具有良好的抑菌效果,对多个菌种均表现出较强的抑制作用,是一种效果显著的抗菌肽产品。

[0011] 进一步的是,步骤(3)中所述截留的分子量为100~300Da。在该分子量范围的多肽产品的抑菌效果最显著。

[0012] 进一步的是,步骤(1)中所述乙醇浸提的步骤为:将澳洲坚果粕粉碎,过60目筛,然后向其中加入体积分数60%的乙醇溶液,充分混匀后置于恒温水浴中浸提1h,然后加热煮沸至无乙醇味。

[0013] 进一步的是,步骤(1)中所述恒温水浴的温度为55~60℃,待煮沸除去乙醇后,冷却至酶解所需温度。

[0014] 进一步的是,所述澳洲坚果粕与乙醇溶液的料液比为1:5g/mL。

[0015] 进一步的是,所述冷榨脱脂的操作为:将澳洲坚果果仁在20~25℃、压力45~55MPa下压榨50~60min。

[0016] 进一步的是,所述灭酶处理的条件为:加热酶解液至85℃以上灭酶5~10min。

[0017] 进一步的是,步骤(2)中所述两次离心的条件均为:于4000r/min离心10min。

[0018] 进一步的是,所述透析时,将第一次透析后的袋外液体通过旋转蒸发仪富集,温度为54℃,真空泵压力为90bar,转速为140r/min。

[0019] 进一步的,所述透析袋使用前经过煮沸处理10min。

[0020] 本发明的有益效果如下:提供了一种澳洲坚果抗菌活性多肽的制备方法,采用本发明的方法获得的澳洲坚果多肽表现出对多种菌种均具有较强的抑菌活性,其抗菌效果显著。

附图说明

[0021] 图1为实施例中采用双缩脲法测定多肽含量得到的标准曲线图。

具体实施方式

[0022] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例对本发明进行具体描述,有必要指出的是,以下实施例仅仅用于对本发明进行解释和说明,并不用于限定本发明。本领域技术人员根据上述发明内容所做出的一些非本质的改进和调整,仍属于本发明的保护范围。

[0023] 实施例1

[0024] 一种澳洲坚果抗菌肽,其制备方法按照如下步骤:

[0025] (1)取澳洲坚果果仁1kg,经烘干后于20℃、压力45MPa下压榨50min进行冷榨脱脂,得到澳洲坚果粕,粉碎,过60目筛,向其中加入体积分数60%的乙醇溶液5L,充分混匀后置于55℃的恒温水浴中浸提1h,然后加热煮沸至无乙醇味,再降温冷却至45℃,向浸提液中加入复合酶进行酶解,调节酶解的pH值为7.5,维持酶解温度为45℃,酶解反应的时间为1.5h;复合酶的组成按质量比计为:中性蛋白酶:碱性蛋白酶:木瓜蛋白酶=2:1:1,复合酶的总用量为澳洲坚果粕质量的1%,其中中性蛋白酶的用量为3000U/g,底物浓度为80g/L;酶解完毕后加热酶解液至85℃以上灭酶10min,得到澳洲坚果酶解多肽液;

[0026] (2)将步骤(1)所得酶解多肽液冷却至室温,于4000r/min离心10min,离心后取上清液,调pH值至4.6,静置30min后于相同条件下再次离心,收集上清液,得到多肽液;

[0027] (3)将步骤(2)收集的多肽液装入相应分子量的透析袋中进行透析,透析袋使用前经过煮沸处理10min,将第一次透析后的袋外液体通过旋转蒸发仪富集,温度为54℃,真空泵压力为90bar,转速为140r/min,然后按照所需分子量进行再次透析,透析两次后截留分子量为1000~800Da的透析液,经再次旋转蒸发后冷冻干燥,即得澳洲坚果抗菌肽。

[0028] 实施例2

[0029] 一种澳洲坚果抗菌肽,其制备方法按照如下步骤:

[0030] (1)取澳洲坚果果仁100g,经烘干后于25℃、压力55MPa下压榨60min,进行冷榨脱脂,得到澳洲坚果粕,粉碎,过60目筛,向其中加入体积分数60%的乙醇溶液500mL,充分混匀后置于60℃的恒温水浴中浸提1h,然后加热煮沸至无乙醇味,再降温冷却至50℃,向溶液中加入复合酶进行酶解,调节酶解的pH值为8.0,维持酶解温度为50℃,酶解反应的时间为2.0h;复合酶的组成按质量比计为:中性蛋白酶:碱性蛋白酶:木瓜蛋白酶=2:1:1,复合酶的用量为澳洲坚果粕质量的1.5%,其中中性蛋白酶的用量为3000U/g、底物浓度为80g/L;酶解完毕后加热酶解液至85℃以上灭酶5min,得到澳洲坚果酶解多肽液;

[0031] (2)将步骤(1)所得酶解多肽液冷却至室温,于4000r/min离心10min,离心后取上清液,调pH值至4.6,静置30min后于相同条件下再次离心,收集上清液,得到多肽液;

[0032] (3)将步骤(2)收集的多肽液装入相应分子量的透析袋中进行透析,透析袋使用前经过煮沸处理10min,将第一次透析后的袋外液体通过旋转蒸发仪富集,旋蒸温度为54℃,真空泵压力为90bar,旋蒸仪转速为140r/min,然后按照所需分子量进行再次透析,透析两次后截留分子量为800~500Da的透析液,经再次旋转蒸发后冷冻干燥,即得澳洲坚果抗菌肽。

[0033] 实施例3

[0034] 一种澳洲坚果抗菌肽,其制备方法按照如下步骤:

[0035] (1)取澳洲坚果果仁200g,经烘干后于21℃、压力47MPa下压榨55min,进行冷榨脱脂,得到澳洲坚果粕,粉碎,过60目筛,向其中加入体积分数60%的乙醇溶液1L,充分混匀后置于55℃的恒温水浴中浸提1h,然后加热煮沸至无乙醇味,再降温冷却至46℃,向溶液中加入复合酶进行酶解,调节酶解的pH值为7.6,维持酶解温度为46℃,酶解反应的时间为1.8h;所述复合酶的组成按质量比计为:中性蛋白酶:碱性蛋白酶:木瓜蛋白酶=2:1:1,复合酶的用量为澳洲坚果粕质量的1.2%,其中中性蛋白酶的用量为3000U/g、底物浓度为80g/L;酶

解完毕后加热酶解液至85℃以上灭酶8min,得到澳洲坚果酶解多肽液;

[0036] (2) 将步骤(1)所得酶解多肽液冷却至室温,于4000r/min离心10min,离心后取上清液,调pH值至4.6,静置30min后于相同条件下再次离心,收集上清液,得到多肽液;

[0037] (3) 将步骤(2)收集的多肽液装入相应分子量的透析袋中进行透析,透析袋使用前经过煮沸处理10min,将第一次透析后的袋外液体通过旋转蒸发仪富集,温度为54℃,真空泵压力为90bar,转速为140r/min,然后按照所需分子量进行再次透析,透析两次后截留分子量为500~300Da的透析液,经再次旋转蒸发后冷冻干燥,即得澳洲坚果抗菌肽。

[0038] 实施例4

[0039] 一种澳洲坚果抗菌肽,其制备方法按照如下步骤:

[0040] (1) 取澳洲坚果果仁600g,经烘干后于24℃、压力52MPa下压榨58min,进行冷榨脱脂,得到澳洲坚果粕,粉碎,过60目筛,向其中加入体积分数60%的乙醇溶液3L,充分混匀后置于60℃的恒温水浴中浸提1h,然后加热煮沸至无乙醇味,再降温冷却至48℃,向溶液中加入复合酶进行酶解,调节酶解的pH值为7.8,维持酶解温度为48℃,酶解反应的时间为1.9h;复合酶的组成按质量比计为:中性蛋白酶:碱性蛋白酶:木瓜蛋白酶=2:1:1,复合酶的用量为澳洲坚果粕质量的1.2%,其中中性蛋白酶的用量为3000U/g、底物浓度为80g/L;酶解完毕后加热酶解液至85℃以上灭酶7min,得到澳洲坚果酶解多肽液;

[0041] (2) 将步骤(1)所得酶解多肽液冷却至室温,于4000r/min离心10min,离心后取上清液,调pH值至4.6,静置30min后于相同条件下再次离心,收集上清液,得到多肽液;

[0042] (3) 将步骤(2)收集的多肽液装入相应分子量的透析袋中进行透析,透析袋使用前经过煮沸处理10min,将第一次透析后的袋外液体通过旋转蒸发仪富集,温度为54℃,真空泵压力为90bar,转速为140r/min,然后按照所需分子量进行再次透析,透析两次后截留分子量为300~100Da的透析液,经再次旋转蒸发后冷冻干燥,即得澳洲坚果抗菌肽。

[0043] 对比例1

[0044] 按照实施例1的方法制备澳洲坚果多肽,其中复合酶仅添加中性蛋白酶和碱性蛋白酶,中性蛋白酶的用量为3200U/g、底物浓度为100g/L,其余条件不变。

[0045] 对比例2

[0046] 按照实施例2的方法制备澳洲坚果多肽,其中澳洲坚果果仁经烘干后进行高温脱脂处理,温度为60℃、压力30MPa下压榨80min,复合酶为中性蛋白酶和碱性蛋白酶,中性蛋白酶的用量为3000U/g、底物浓度为80g/L,其余条件不变。

[0047] 对比例3

[0048] 按照实施例3的方法制备澳洲坚果多肽,其中透析后截留的分子量为1200~1500Da。

[0049] 对比例4

[0050] 按照实施例4的方法制备澳洲坚果多肽,其中透析后截留的分子量为1500~3000Da。

[0051] 实验例1

[0052] 抗菌肽制备过程中多肽含量的测定:

[0053] (一) 标准曲线的绘制:

[0054] 双缩脲试剂配置:称取1.5g无水硫酸铜和6g酒石酸钾钠(四水),加500mL的蒸馏水

溶解,在搅拌下加入300mL质量分数10%的NaOH,定容至1L。

[0055] 在容量瓶中分别加入0、0.2、0.4、0.6、0.8、1mL的10mg/mL的标准酪蛋白溶液,用蒸馏水补足1mL,然后各加4mL的双缩脲试剂,充分摇匀在室温下反应30min,在540nm的波长下测定其吸光度,每个样品重复测三次,取其平均值。以横坐标为酪蛋白浓度(mg/mL),纵坐标为吸光值绘制标准曲线,得到标准曲线方程为: $y=0.0176x+0.0018$, $R^2=0.9993$,如图1所示。

[0056] (二)多肽的透析:

[0057] 第一次透析时,取40mL多肽液装入20cm的透析袋中,溶液约为透析袋长度的三分之一,将透析袋系紧,放入量筒中进行透析,透析袋要完全淹没在蒸馏水中。每个分子段的多肽液透析时间为两天,每隔3小时换一次蒸馏水,共重复透析六次。检测透析是否完成时,将透析袋外液体经过蒸发浓缩后,取1mL双缩脲试剂加入溶液中,观察颜色变化,若有明显改变则表明透析未完成,若颜色基本无变化则表明透析完成。

[0058] 将袋外液体经旋蒸富集起来,旋蒸温度为54℃,真空泵压力为90bar,旋蒸仪转速为140r/min。然后继续第二次透析截留不同分子段的多肽,将每个分子段的多肽旋蒸到相同体积,每个分子段分别浓缩至20mL,测量其多肽含量。

[0059] (三)多肽含量的测定:

[0060] 将多肽液与等体积的10%的三氯乙酸混合,静置30min,在4000r/min下离心20min,除去不溶性蛋白和长肽链,取上清液1mL,加4mL双缩脲试剂,混匀,放置30min,在540nm处测定吸光值,对照标准曲线换算上清液中的多肽含量,计算公式如下:

[0061] 多肽含量 = (X值*总样液体积) / 1000

[0062] 实验例2

[0063] 抗菌肽抑菌活性试验:

[0064] (一)培养基的配制

[0065] 1、牛肉膏蛋白胨培养基(细菌培养基)的配置:称取0.3g牛肉膏,0.5gNaCl,1g蛋白胨,1.5g琼脂于烧杯中,然后加入100ml蒸馏水,加热煮沸1min,加热时要用玻璃棒不断搅拌,用2mol/L的氢氧化钠调PH值至7.0左右,倒入三角瓶中进行灭菌,条件为121℃、20min。

[0066] 2、马铃薯培养基(黑曲霉培养基)的配置:马铃薯去皮,切成小块,称取20g,加100ml水煮烂至能被玻璃棒戳破即可,用八层纱布过滤,补足水分至100ml,加入2g营养琼脂,加入2g葡萄糖,搅拌均匀后,装入瓶中进行杀菌,121℃、20min。

[0067] 3、YPD培养基(白色念珠菌培养基)的配置:称取1g酵母膏,2g蛋白胨,2g琼脂粉于水90ml水中,加热溶解。称取2g葡萄糖溶解于10ml的水中,放入锥形瓶中杀菌,葡萄糖要经过杀菌后再混入培养基中。

[0068] 4、培养基的分装

[0069] 装入试管,培养基不超过试管高度的五分之一,装入三角瓶内不超过其容积的一半。

[0070] 5、平板倒置

[0071] 将已经灭菌的培养基倒入杀好菌的平板中(杀菌条件:121℃、20min),每个平板倒入大约12-15mL的培养基。没用完的培养基放在冰箱4℃保存。

[0072] (二)菌种的活化

[0073] 先将操作台的紫外灯打开照射灭菌30min,使用前用70%的乙醇擦拭操作台和双手。

[0074] 1、斜面培养

[0075] 取已经杀好菌的试管,将已经灭菌的培养基倒入试管中,冷却制作斜面,备用。将供试菌用接种环挑取到制备好的斜面上,划Z字型,挑取3-4环划到斜面上,每次用接种环前需要用酒精灯外焰灼烧至红,以防菌种的污染,然后冷却再挑取菌种,以防烫伤菌种,将接种好的斜面塞好塞子,放入培养箱中培养。细菌条件:36±1℃、24~48h,牛肉膏蛋白胨培养基;真菌培养条件:26±1℃,48-72h,黑曲霉:马铃薯葡萄糖培养基,白色念珠菌:YPD培养基。

[0076] 2、悬菌液的配置

[0077] 将活化好的菌种,用接种环挑取一环放入10mL的无菌水中,在手掌上震荡80多次,以使悬菌液均匀。悬菌液只能当天制备当天用。

[0078] (三) 抑菌圈直径

[0079] 将不同分子段的多肽稀释到相同浓度,备用。无菌水做对照。用牛津杯法测定抑菌活性:将制备好的悬菌液用棉签均匀涂布在制备好的平板上,每个平板分三次涂布,每次涂三分之一,棉签不可重复使用,均匀涂布后,取三个牛津杯,均匀等距的放置于平板上,呈正三角形排列,将制备好的多肽液用无菌移液管加入牛津杯中,每个牛津杯加0.2mL,于4±1℃做扩散处理,之后放入培养箱培养。用十字交叉法测量抑菌圈直径。每组重复三次。

[0080] (四) 最低抑菌浓度(MIC)的测定

[0081] 用二倍稀释法,确定抑菌浓度范围,确定好后,再缩小范围确定最小抑菌浓度。无菌水作对照。

[0082] 二倍稀释法:将高浓度的多肽液取1mL放入平板中,取1mL无菌水与其充分混匀,然后从这个平板中取1mL液体放入下一个平板,重复上述操作,直到稀释到最小值,取出1mL丢掉。

[0083] 将各个分子段的多肽液取1mL放入平板,再倒入培养基,充分混匀,再用悬菌液涂布,然后倒置培养。无菌生长的平板即为最低抑菌浓度(MIC)。

[0084] 多肽液浓度为4mg/mL下本发明获得的抗菌肽对各菌种的抑菌圈直径结果如表1-6所示,而对比例1-4中的多肽对各菌种的抑菌活性要显著降低。

[0085] 表1对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径(cm)

多肽类别	实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4	对比例 1	对比例 2	对比例 3	对比例 4
抑菌圈直径	1.88	1.99	2.81	4.10	1.07	0.79	0.81	0.52

[0087] 表2对鼠伤寒沙门氏菌的抑菌圈直径(cm)

	多肽类别	实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4	对比例 1	对比例 2	对比例 3	对比例 4
[0088]	抑菌圈直径	1.62	1.91	2.55	3.81	0.91	0.89	0.55	0.38

[0089] 表3对大肠埃希氏菌的抑菌圈直径 (cm)

	多肽类别	实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4	对比例 1	对比例 2	对比例 3	对比例 4
[0090]	抑菌圈直径	1.27	1.3	1.4	1.5	0.89	0.74	0.71	0.56

[0091] 表4对铜绿假单胞菌的抑菌圈直径 (cm)

	多肽类别	实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4	对比例 1	对比例 2	对比例 3	对比例 4
[0092]	抑菌圈直径	1.62	1.69	1.78	1.85	1.03	0.84	0.96	0.77

[0093] 表5对白色念珠菌的抑菌圈直径 (cm)

	多肽类别	实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4	对比例 1	对比例 2	对比例 3	对比例 4
[0094]	抑菌圈直径	1.20	1.25	1.32	1.55	0.71	0.65	0.57	0.72

[0095] 表6对黑曲霉的抑菌圈直径 (cm)

	多肽类别	实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4	对比例 1	对比例 2	对比例 3	对比例 4
[0096]	抑菌圈直径	0.82	0.92	0.91	0.98	0.63	0.78	0.64	0.19

[0097] 对上述六种菌的最小抑菌浓度测定结果如表7和表8所示:

[0098] 表7最小抑菌浓度

	浓度 (mg/ml)	0	0.15	3	3.5	4	4.5	5	5.5	6
	金黄色葡萄球菌	—	—	—	—	—	—	—	—	×
[0099]	鼠伤寒沙门氏菌	—	—	—	—	—	—	—	—	×
	大肠埃希氏菌	—	—	—	—	—	—	—	×	×
	铜绿假单胞菌	—	—	—	—	—	—	—	—	×

[0100] 注：“—”有菌落生长，“×”无菌落生长。

[0101] 表8最小抑菌浓度

	浓度 (mg/ml)	0	6	12	14	16	18	20	21	22	24	26
	白色念珠菌	—	—	—	—	—	—	—	—	×	×	×
[0103]	黑曲霉	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×

[0104] 注：“—”有菌落生长，“×”无菌落生长。

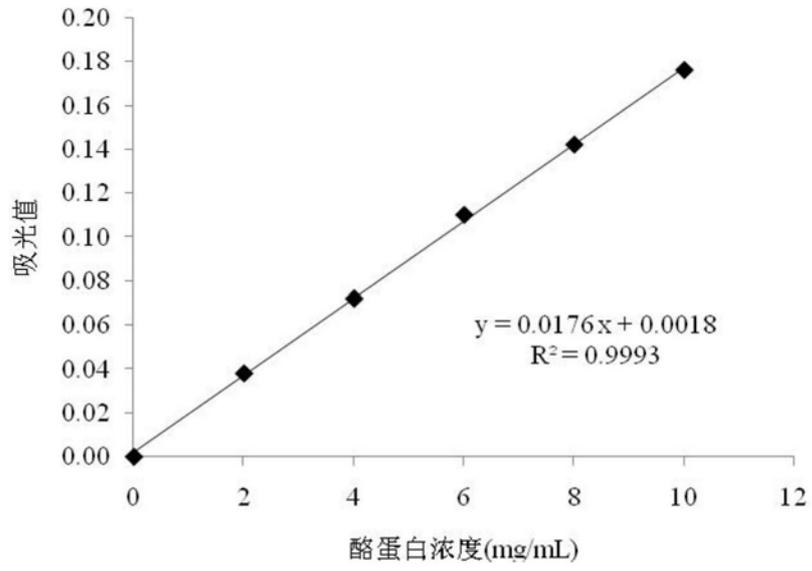


图1