

聚赖氨酸对产气荚膜梭菌的 抑菌研究

孙涪陵¹, 周晓宏^{1*}, 罗爱芹¹, 杨新芳¹, 胡冰², 陶庆²

(1.北京理工大学生命科学与技术学院, 北京 100081; 2.北京中融百鸣科技公司, 北京 102600)

摘要:产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)是真空包装熟肉制品中最常见的一种厌氧污染菌。研究表明 ϵ -聚赖氨酸对其具有很强的抑制作用, 在最适抑菌 pH 下(pH6.5), ϵ -聚赖氨酸对产气荚膜梭菌的最小抑菌浓度(MIC)为 0.025%; 高价金属阳离子对 ϵ -聚赖氨酸的抑菌活性有明显的抑制作用, 而 EDTA 则可以络合高价金属离子, 增强其抑菌作用。将 0.01% 的 EDTA 和 0.01% 的 ϵ -聚赖氨酸复合使用时可完全抑制产气荚膜梭菌的生长繁殖。

关键词: ϵ -聚赖氨酸, 产气荚膜梭菌, 抑菌

Abstract: *Clostridium perfringens* is a common spoilage bacteria species causing spoilage of vacuum packaged cooked meat products. ϵ -Polylysine has strong inhibition to the growth of *Cl. perfringens*, and its MIC is 0.025% at the optimum pH of 6.5. High valence metal ions have obvious negative effect on the inhibition while EDTA can chelate high valence metal ions and increase the inhibition. A combination of only 0.01% EDTA and 0.01% ϵ -polylysine can completely inhibit the growth of *Cl. Perfringens*.

Key words: ϵ -polylysine; *Cl. Perfringens*; inhibition

中图分类号: TS207.4 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2006)09-0109-03

ϵ -聚赖氨酸(ϵ -Polylysine, ϵ -PL)为一种由单一赖氨酸的 α -羧基和 ϵ -氨基通过酰胺键连接成的聚氨基酰胺^[1]。由于它是一种阳离子聚合多肽, 能结合到带有负电荷的细菌表面, 阻止细菌细胞内外的物质运输, 从而抑制细菌的生长, 所以具有很广的抗菌谱^[2]。当用于食品防腐时, 它具有水溶性好, 安全性高, 热稳定性强等特点^[3]。作为新型的天然防腐剂, ϵ -PL 已于 2003 年 10 月被 FDA 批准为安全的食品防腐剂。产气荚膜梭菌(*Cl. perfringens*)为厌氧性革兰氏阳性粗大芽孢杆菌, 由于产气荚膜梭菌产生芽孢, 具有较强的耐

性, 在热加工过程中仍能存活, 所以是真空包装食品腐败的主要污染菌之一。其产生的 H_2S 不但引起包装胀袋, 而且使食品散发出难闻的恶臭味。目前国内还鲜有产气荚膜梭菌抑菌研究的报道。本文在研究 ϵ -PL 抑制产气荚膜梭菌的基础上, 同时研究了因素 pH、金属离子以及与 EDTA 复合等对 ϵ -PL 抑菌活性的影响, 以期在食品防腐中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

产气荚膜梭菌(*Cl. perfringens*) 为本实验室从胀袋火腿肠中分离、鉴定和保存的菌种; ϵ -聚赖氨酸(50%) 北京东方瑞德公司提供; EDTA、盐酸、氢氧化钠、三氯化铁、氯化钠、氯化钾、氯化镁、氯化钙均为分析纯; RCM 培养基^[4] 强化梭状芽孢杆菌培养基。

厌氧培养盒(GENbox) 法国生物梅里埃(bioMérieux)公司生产; DJ-CJ-2F 超净工作台 哈尔滨东联电子技术开发有限公司; UV-2000 紫外-可见分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司; HPS-280 生化培养箱 哈尔滨东明医疗仪器厂; pHs-3C 型精密 pH 计 上海雷磁仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 ϵ -PL 的 MIC 确定 将保存的受试菌, 接种于 RCM 培养液, 37℃ 培养 18h, 用 RCM 培养液稀释至菌液浓度为 10^7 个/mL, 备用。配制一系列浓度的 ϵ -PL 溶液, 取 1mL 与 1mL 受试菌悬液于已灭菌的含有 8mL 的 RCM 培养液的试管内, 使 ϵ -PL 的最终浓度为 0%、0.005%、0.010%、0.015%、0.020%、0.025%、0.030%、0.035%、0.040%。以 1mL 的 RCM 培养液代替 1mL 的菌悬液作为空白对照管, 每一浓度的 ϵ -PL 溶液做两个平行。试管于 37℃ 厌氧培养 24h 后,

收稿日期: 2005-12-20 * 通讯联系人

作者简介: 孙涪陵(1983-)男, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术。

600nm 测定 OD_{600} 。其中最低浓度的 OD_{600} 为 0 的试管内 ϵ -PL 的浓度为 ϵ -PL 抑制 *Cl.perfringens* 的 MIC。

1.2.2 最佳抑菌 pH 优化 根据 1.2.1 的实验结果, 在小于 ϵ -PL 的 MIC 浓度下, 利用 1mol/L 的 HCl 和 NaOH 调节 pH 分别为 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0, 37°C 厌氧培养 24h 后, 测定 OD 值, 由此确定 ϵ -PL 对 *Cl.perfringens* 的最佳抑菌 pH, 并在此 pH 下重新确定 ϵ -PL 对 *Cl.perfringens* 的 MIC。

1.2.3 金属离子对 ϵ -PL 抑菌作用的影响 通过添加 NaCl、KCl、CaCl₂、MgCl₂、FeCl₃ 的盐溶液研究金属离子对 ϵ -PL 抑菌作用的影响。NaCl 和 KCl 在抑菌培养液中的浓度分别为 0、2、4、6、8、10mmol/L, MgCl₂ 和 CaCl₂ 的浓度分别为 0、1、2、3、4、5mmol/L, FeCl₃ 的浓度分别为 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5mmol/L。根据 1.2.2 的实验结果, 测定在最适 pH 下, 最小抑菌浓度时, 不同金属离子对 ϵ -PL 抑制 *Cl.perfringens* 生长的影响。其他方法同 1.2.1。

1.2.4 EDTA 对 ϵ -PL 抑菌作用的影响 根据 1.2.2 的实验结果, 在 ϵ -PL 抑制 *Cl.perfringens* 的最适 pH 下, 选取某一小于 MIC 的浓度, 并向该恒定浓度的体系中加入不同量的 EDTA 试剂, 使 EDTA 的最终浓度分别为 0%、0.002%、0.004%、0.006%、0.008%、0.01%, 由此确定 EDTA 对 ϵ -PL 抑制 *Cl.perfringens* 作用的影响。

2 结果与分析

2.1 自然 pH 下 ϵ -PL 对 *Cl.perfringens* 的 MIC 的确定

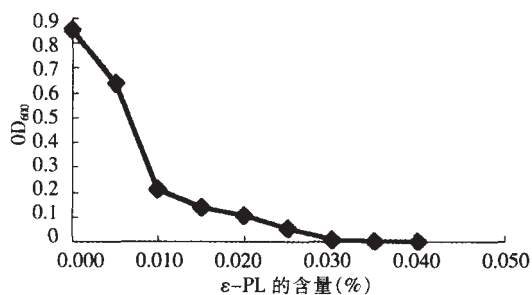


图1 自然 pH 下 ϵ -PL 对 *Cl.perfringens* 的抑制作用

由图 1 可以看出, 随着 ϵ -PL 浓度的增大 *Cl.perfringens* 培养液的 OD 值逐渐下降, 当 ϵ -PL 的含量为 0.030% 时, 培养液的 OD 值几乎为 0, 说明此时 *Cl.perfringens* 已停止生长, 故在自然 pH 下 ϵ -PL 对 *Cl.perfringens* 的 MIC 应为 0.030%。

2.2 pH 对 ϵ -PL 抑制 *Cl.perfringens* 的影响

将培养液中 ϵ -PL 的浓度固定为 0.015%, 按 1.2.2 调节 pH 2.0~9.0。如图 2 所示, 在 pH 2.0~8.0 间有两个低谷出现, 它们分别是在 pH 2.0~3.0 和 pH 6.0~7.0 间。当 pH 大于 3.0 时, 培养液的 OD 值又

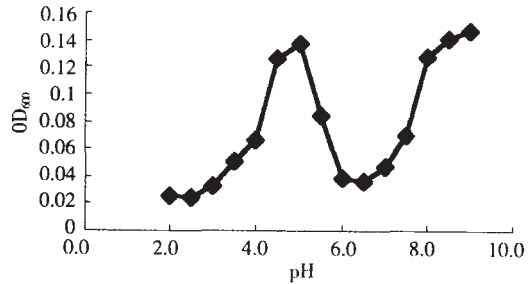


图2 0.015%的 ϵ -PL 在不同 pH 下对 *Cl.perfringens* 的抑制作用

逐渐上升, 这说明第一个低谷点的出现主要是酸的作用; 当培养液的 pH 大于 7.5 时, ϵ -PL 对 *Cl.perfringens* 的抑制作用明显下降, 这可能是 pH 大于 ϵ -PL 的 pK_a ($pK_a=7.6$)^[5] 时, ϵ -PL 的 α -NH₃⁺ 就会解离, 由此使 ϵ -PL 失去了多聚阳离子特性, 故抑菌效果逐渐下降。由此确定 ϵ -PL 对 *Cl.perfringens* 的最佳抑菌 pH 应在 pH 6.0~7.0 间。在 pH 3.0~6.0 时, 抑菌作用降低, 这一现象尚无法解释。当将培养液的 pH 调为最适抑菌 pH 6.5 时, 由图 3 可以看出, ϵ -PL 对 *Cl.perfringens* 的 MIC 应为 0.025%。

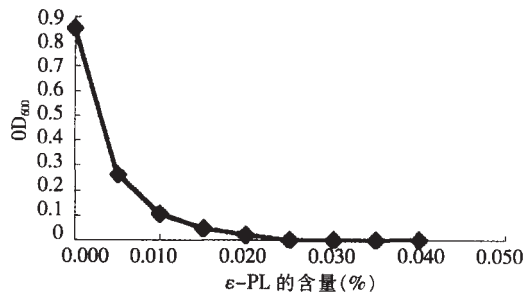


图3 最适 pH 条件下 ϵ -PL 对 *Cl.perfringens* 的抑制作用

2.3 金属离子对 ϵ -PL 抑制 *Cl.perfringens* 的影响

由图 4、图 5 以及图 6 可以看出, 随着金属阳离子化合价的升高, 其对 ϵ -PL 抑制 *Cl.perfringens* 的影响依次增强。NaCl、KCl 在 10mmol/L 时, 抑菌培养液的 OD 值为 0.015~0.017 之间; CaCl₂ 和 MgCl₂ 在 5 mmol/L 时, 抑菌培养液的 OD 值就已经达到 0.60~0.65; 而 FeCl₃ 仅在 0.2mmol/L 时, 抑菌培养液的 OD 值就达到 0.60 左右。对同一种金属离子, 随着金属离子浓度的增大, 它对 ϵ -PL 的抑菌活性的抑制作用也逐渐增强。这可能是由于金属离子结合在带负电荷的细菌细胞的表面, 占据了部分 ϵ -PL 的吸附位点, 降低了 ϵ -PL 的抑菌作用。

2.4 EDTA 对 ϵ -PL 抑制 *Cl.perfringens* 生长的影响

由图 7 可以看出, 当 ϵ -PL 的浓度固定为 0.01% 时, EDTA 对 ϵ -PL 抑制 *Cl.perfringens* 有明显的促进作用, 并且随着 EDTA 含量的增大, 其促进作用显著增强。当 EDTA 的含量为 0.01% 时, 培养液的 OD 值

(下转第 123 页)

- [10] 陈来同,等.41种生物化学产品生产技术[M].金盾出版社,1994.
- [11] 杨严俊,王荣民.猪血中脱色球蛋白的制备及其功能性研究[J].无锡轻工大学学报,1997,16(2).
- [12] 北大生物系生化教研室编.生物化学实验指导[M].高等教育出版社,1979.
- [13] 钟耀广.猪血球中卟啉铁的提取方法及血红素修饰技术的研究(博士学位论文)[D].北京:中国农业大学,2002.
- [14] Jeng-Huh Yang, Chin-Wen Lin. Functional properties of porcine blood globin decolorized by different methods [J].

- International Journal of Food Science & Technology,1998,33(4):419.
- [15] Functional properties of globin protein obtained from bovine blood by decolorisation of the red cell fraction. Concepción Gómez-Juárez 1, Rutilo Castellanos 1, Teresa Ponce-Noyola 1*, Víctor Calderón-Salinas 2, Juan D Figueroa.
- [16] 于美娟,马美湖.复合酶水解猪血液工艺条件的研究[J].食品科技,2005(3):96~98.
- [17] 朱明华编.仪器分析[M].高等教育出版社,1983.

(上接第 110 页)

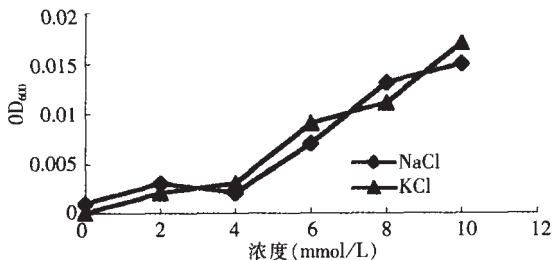


图4 NaCl和KCl对 ϵ -PL抑制 $Cl.perfringens$ 生长的影响

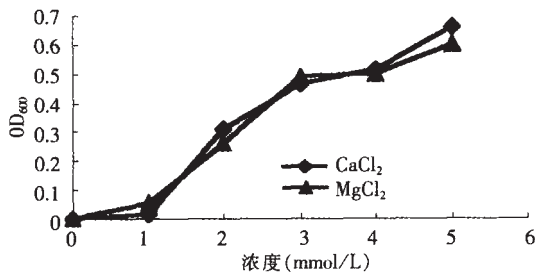


图5 CaCl₂和MgCl₂对 ϵ -PL抑制 $Cl.perfringens$ 生长的影响

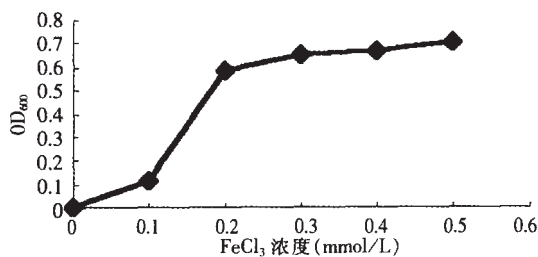


图6 FeCl₃对 ϵ -PL抑制 $Cl.perfringens$ 生长的影响

几乎为0,说明0.01% ϵ -PL和0.01%的EDTA能完全抑制 $Cl.perfringens$ 的生长繁殖。EDTA作为一种金属离子整合剂,它不但降低金属离子与 ϵ -PL对细菌细胞表面的竞争性吸附,而且还会使细菌因代谢过程缺乏微量元素而死亡。

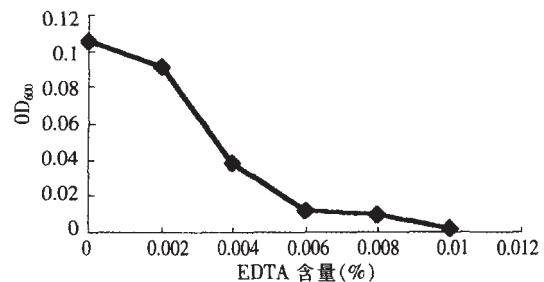


图7 EDTA对 ϵ -PL抑制 $Cl.perfringens$ 的作用效果

3 结论

ϵ -PL对真空包装熟肉制品污染菌 $Cl.perfringens$ 具有很强的抑菌作用。在自然pH下,其MIC为0.030%;其最适抑菌pH为pH6.5,在此条件下,其MIC为0.025%。高价金属阳离子能明显降低 ϵ -PL抑制 $Cl.perfringens$ 的作用,而EDTA则可以络合金属离子,加强 ϵ -PL的抑菌作用。0.01% ϵ -PL和0.01%的EDTA能完全抑制 $Cl.perfringens$ 的生长繁殖。

参考文献:

- [1] S Shims, H Sakai. Poly-L-lysine produced by streptomycetes. Part III. Chemical Studies [J]. Agric Biol chem, 1981, 45(11): 2503~2508.
- [2] J Hiraki. ϵ -Polylysine, its development and utilization [J]. Fine chem, 2000, 29(1): 18~25.
- [3] J Hiraki. Basic and applied studies on ϵ -polylysine [J]. J Antibact Antifungal Agents, 1995, 23: 349~354.
- [4] R M Kalinowsky, R B Tompkin. Psychrotrophic clostridia causing spoilage in cooked meat and poultry products [J]. Food Prot, 1999, 62(7): 766~772.
- [5] Shima Shoji, Sakai Heiichi. Polylysine produced by streptomycetes [J]. Agric Biol Chem, 1977, 41(9): 1807~1809.