

溶菌酶酶解物的抗菌活性研究

朱伶俐,朱明捷,杨严俊*

(江南大学食品学院,江苏无锡 214122)

摘要:目的:考察溶菌酶酶解物的抑菌能力,为扩展溶菌酶的应用提供理论依据。方法:采用胃蛋白酶对溶菌酶进行酶解,得到溶菌酶酶解物(Lysozyme hydrolysate, LH);采用二倍稀释法检测LH对几种常见食品腐败菌的抑菌能力;以金黄色葡萄球菌为受试菌种,通过抑菌圈实验探讨LH的抑菌活性,并与溶菌酶和乳酸链球菌素作比较。结果:LH对几种常见阳性菌都有很强的抑制作用,其中对金黄色葡萄球菌的抑制作用最强;未经热处理时,LH的抑菌活性略低于溶菌酶,而高于乳酸链球菌素;经热处理后,LH的抑菌活性高于溶菌酶和乳酸链球菌素。溶菌酶酶解物有望被开发成一种天然的食品防腐剂。

关键词:溶菌酶,溶菌酶酶解,耐热性,抗菌活性

Study on the antibacterial activity of lysozyme hydrolysate

ZHU Ling-li, ZHU Ming-jie, YANG Yan-jun*

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Objective: Provide the theoretical foundation for broadening the application of lysozyme in food industry through researching on the bacteriostatic ability of Lysozyme hydrolysate. Methods: Lysozyme hydrolysate (LH) was obtained by using pepsin. The antibacterial activity of LH was tested by antibacterial circle experiment; meanwhile, lysozyme and nisin were also tested. The minimum bactericide concentration of LH against common food bacteria was determined with the two-fold dilution method. Results: LH showed great inhibition effect on positive bacteria, especially staphylococcus aureus. Without heat treatment, the bacteriostatic ability of LH on staphylococcus aureus was weaker than lysozyme, but much stronger than nisin. After heat treatment, LH was more antibacterial than lysozyme and nisin. LH was promising to be a natural food preservative.

Key words: lysozyme; lysozyme hydrolysate; heat resistance; the antibacterial activity

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)13-0074-04

食品防腐剂按来源分为化学防腐剂和天然防腐剂两大类^[1]。化学防腐剂主要包括苯甲酸、山梨酸、硝酸盐等,化学防腐剂存在致癌性、致畸性及食物中毒等安全隐患。而天然防腐剂具有抗菌性强、安全无毒、水溶性好、热稳定性好、作用范围广等化学防腐剂无法比拟的优点,因此开发天然防腐剂已成为食品科学研究的热点之一。天然防腐剂,通常是从动物、植物和微生物的代谢产物中提取,如乳酸链球菌素、溶菌酶等。乳酸链球菌素是一种多肽类物质,已被广泛用于肉制品、乳制品、罐头、饮料等的多类食品防腐^[2]。鸡蛋溶菌酶是一种天然抗菌蛋白,2011年1月被列入中国食品防腐剂行列,但允许添加溶菌酶的食品只有奶酪和发酵酒。由于鸡蛋溶菌酶相对分子量14300,作为一种蛋白具有免疫原性,可以引起过敏^[3];溶菌酶不能耐受高温高压,且在非酸性条件下的耐热性大大降低^[4],这两点严重限制了溶菌酶的应用。本文所研究的溶菌酶酶解物,能扩展溶菌酶在食品中的应用。同样作为多肽物质,在乳酸链球菌素的应用领域,溶菌酶酶解物也有其用武之地。国外有研究者用胃

蛋白酶对溶菌酶进行酶解,得到溶菌酶酶解物,其溶壁活性只有溶菌酶的十分之一,但能强烈抑制芽孢菌的生长及芽孢的萌发,其抑菌活性强于乳酸链球菌素,有潜力开发成为一种新型食品防腐剂^[5]。食品中腐败菌具有多样性,且大部分食品需进行加热灭菌,因此,有必要研究溶菌酶酶解物的耐热性和对不同菌种的抑菌能力,为其在食品防腐中的应用提供更全面的理论依据。本研究采用胃蛋白酶酶解溶菌酶,得到溶菌酶酶解物(Lysozyme hydrolysate, LH),重点考察了LH的抑菌能力和耐热性,并与溶菌酶和乳酸链球菌素做比较。此外,还考察了LH对常见食品腐败菌的抑制能力。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

蛋清溶菌酶 大连绿雪蛋品发展有限公司;胃蛋白酶、营养肉汤、营养琼脂、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸 国药集团化学试剂有限公司;金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、单核增生李斯特菌、嗜热脂肪链球菌、溶壁微球菌 江南大学食品生物技术组。

AKTA层析仪 瑞典GE Healthcare公司;数控超级恒温槽 宁波天恒仪器厂;冷冻离心机 上海力申

收稿日期:2011-11-18 * 通讯联系人

作者简介:朱伶俐(1986-),女,硕士研究生,研究方向:食品生物技术。

科学仪器有限公司;SPX型智能生化培养箱 南京盈鑫实验仪器有限公司;手提式不锈钢蒸汽消毒器 上海三申医疗器械有限公司;UV-1100紫外可见分光光度计 上海美谱达仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 LH的制备 将质量浓度为5mg/mL的溶菌酶溶液加入反应容器中。恒温水浴,达到酶解温度38℃后,保温5min左右,用1.0mol/L的HCl调pH至2.0,加入胃蛋白酶,使最终加酶量[E]/[S](酶与底物质量比)为1:50。反应过程中不断搅拌,并维持pH恒定不变,酶解4h后将pH升到7.0,反应到终点。10000r/min条件下冷冻离心20min,上清液冷冻干后备用。

1.2.2 LH对几种常见食品腐败菌的抗菌活性测定 采用二倍稀释法^[8],考察LH对几种常见食品腐败菌的抗菌活性。操作步骤:在无菌条件下,用二倍稀释法配制浓度梯度320、160、80、40、20、10μg/mL等。分别吸取200μL各浓度的LH样品液于离心管中,加入200μL菌液(浓度为10⁶~10⁷cfu/mL),混合均匀,在37℃恒温培养箱中静置2h。用灭菌生理盐水将菌液与LH的混合液稀释1000倍,取100μL注入培养皿中,倒入冷却至40~45℃的营养琼脂培养基(乳酸菌用MRS培养基培养),立即混合均匀,待其凝固后,37℃培养24h。

1.2.3 检测LH的相对分子质量分布 用凝胶层析检测LH的相对分子质量分布。

凝胶柱: Superdex Peptide 10/300 GL; 检测波长: 215nm; 洗脱液: 50mmol/L, pH7.2磷酸盐缓冲液; 流量 0.5mL/min。

对比抑肽酶(分子量6521)、维生素B₁₂(分子量1355)、胞嘧啶核苷(分子量246)这三个标样的保留体积,考察LH的相对分子质量分布区间。

1.2.4 溶菌酶及LH的酶活性测定 参考文献[6],以溶壁微球菌作为底物,采用分光光度法测定酶活力。

1.2.5 抑菌圈的测定 将溶菌酶、LH、乳酸链球菌素,分别用50mmol/L, pH3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0的磷酸盐缓冲液配制浓度250μg/mL。参考文献[7],在无菌条件下,将准备好的菌液(以金黄色葡萄球菌为受试菌种,浓度为10⁶~10⁷cfu/mL)移取500μL至培养皿中,然后将冷却至40~45℃的固体培养基倒入其中,待其凝固。将牛津杯放置在培养基平面,加满样品液,37℃培养24h。测定培养皿内各抑菌圈直径大小,抑菌圈直径越大,说明该样品的抑菌能力越强。

1.2.6 LH在不同pH下的热稳定性 将样品分别用50mmol/L, pH3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0的磷酸盐缓冲液配制浓度1mg/mL,90℃水浴30min,冷却后按1.2.5方法测抑菌圈直径,分别以相应缓冲液作空白对照。

将样品分别用50mmol/L pH3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0的磷酸盐缓冲液配制浓度5mg/mL,115℃高温高压处理20min,冷却后按1.2.5方法测抑菌圈直径,分别以相应缓冲液作空白对照。

2 结果与讨论

2.1 LH对几种食品腐败菌的抑制作用

采用二倍稀释法配制不同浓度梯度的样品溶

液,LH对几种常见食品腐败菌的抑菌效果如表1所示。

表1 LH对不同菌种的抑菌情况

Table 1 The antimicrobial activity of LH against various strains of bacteria

菌种样品	样品浓度(μg/mL)									
	320	160	80	40	20	10	5	2.5	1.25	空白
大肠杆菌	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
沙门氏菌	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
嗜热脂肪链球菌	-	+-	++	++	++	++	++	++	++	++
金黄色葡萄球菌	-	-	-	-	-	-	-	+-	+	++
枯草芽孢杆菌	-	-	-	+-	+	++	++	++	++	++
李斯特菌	-	+-	+	++	++	++	++	++	++	++
乳酸菌	-	-	+-	+	++	++	++	++	++	++

注:-, 无菌生长;+-, 少量的菌落;+, 菌落面积超过培养皿1/3面积, 不超过培养皿1/2面积; ++, 菌落面积超过培养皿1/2面积。

表1的实验结果说明,LH对于革兰氏阴性菌(大肠杆菌和沙门氏菌)基本没有抑菌作用;而对革兰氏阳性菌有不同程度的抑菌作用。单增李氏菌在4℃的环境中仍可生长繁殖,是冷藏食品威胁人类健康的主要病原菌之一,本实验结果表明,添加LH可以有效地抑制李斯特菌的生长。乳酸菌并不都是益生菌,其中某些乳酸菌也是果汁及饮料中最常见的腐败菌^[11]。LH对乳酸菌具有抑制能力,可用于饮料的防腐。

当LH浓度达320μg/mL时能抑制枯草芽孢杆菌的芽孢萌发(数据未给出)。有研究表明:溶菌酶酶解物的浓度达100μg/mL时能完全抑制枯草芽孢杆菌的芽孢萌发^[9]。导致这种差异的可能原因是:本实验的酶解物中对芽孢具有抑制作用的活性肽的含量低于文献中活性肽的含量。

2.2 LH的相对分子质量分布

抑肽酶(分子量6521)、维生素B₁₂(分子量1355)、胞嘧啶核苷(分子量246)的保留体积分别为11.5、

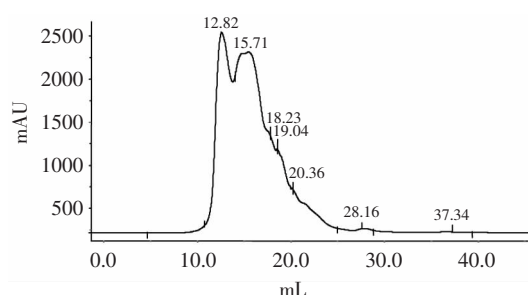


图1 LH的凝胶层析图

Fig.1 Gel chromatography figure of LH

表2 LH的各峰参数

Table 2 Parameters of each peak

各峰的保留体积 (mL)	峰强 (mAU)	峰面积 (mAU·mL)	峰面积所占比例 (%)
12.82	2249.222	3978.8861	30.06
15.71	2011.291	5966.8465	45.08
18.23	1372.436	1156.4528	8.74
19.04	1206.532	1267.2415	9.56
20.36	439.077	856.9746	6.47
28.16	12.139	9.6400	0.09

16.2、19.7mL(图未给出)。对比这三个标样的保留体积,由图1可见,LH的相对分子质量范围在200~6000。根据表2可知,相对分子量在1000~6000的组分的峰面积占总面积的93.53%。根据文献报道,抗菌肽一般由10~50个氨基酸组成^[9],相对分子质量多为1000~6000,本实验与前人研究具有一致性。

过敏是指由免疫机制诱导的高敏反应,大多数蛋白质能与IgE和IgG抗体发生反应而引起过敏。溶菌酶能与IgE抗体强烈的结合在一起,是蛋清中主要过敏源之一^[3]。抗原相对分子量一般都在10000以上^[10],本实验采用胃蛋白酶酶解溶菌酶,使之降解为分子量小于6000的多肽,从而减弱其免疫原性。

2.3 LH的抑菌能力和在不同pH下的热稳定性

2.3.1 未经过热处理的样品的抑菌活性 为了确定LH的抑菌作用是否受pH条件的影响,有必要测定不同pH下的抑菌活性。由表1可知,LH对金黄色葡萄球菌的抑菌作用最强,因此选择金黄色葡萄球菌为受试菌种。将未经过热处理的样品,分别用不同pH的缓冲液溶解,浓度为0.25mg/mL,进行抑菌圈实验,每个样品重复三次,抑菌圈直径大小求平均值。溶菌酶、乳酸链球菌素、LH对金黄色葡萄球菌的抑菌情况如图2所示。

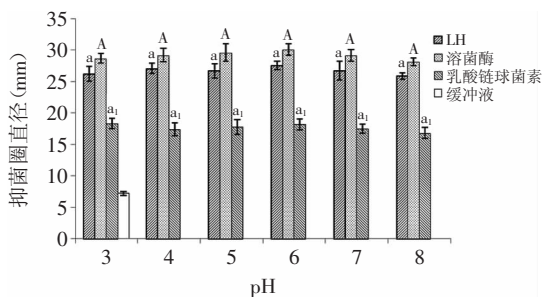


图2 未经热处理的样品的抑菌能力

Fig.2 The antibacterial ability of samples without heat treatment
注:同种样品,字母完全不同者表示存在显著差异 $p < 0.05$,图4、图5同。

通过图2可以看出,未经热处理时,LH、溶菌酶和乳酸链球菌素的抑菌作用受pH影响较小。溶菌酶和LH的抑菌活性均高于乳酸链球菌素。经测定,LH的酶活力为1332u/mg,只有溶菌酶的7.4%。但LH仍具有很强的抑菌活性,抑菌能力稍逊于溶菌酶。可见,LH的抑菌能力并不完全依赖于溶壁活力,而是其中的抗菌肽在发挥主要抑菌作用。

2.3.2 经过90℃、30min热处理的样品的抑菌活性 样品分别用不同pH的缓冲液溶解,浓度为1mg/mL,经90℃、30min热处理后进行抑菌圈实验,每个样品重复三次,抑菌圈直径大小求平均值。溶菌酶、乳酸链球菌素、LH对金黄色葡萄球菌的抑菌情况如图3和图4所示。

pH条件会影响抗菌肽的热稳定性,有必要研究样品在不同pH条件下经过热处理后的抑菌能力,可以为溶菌酶酶解物在不同pH的食品中的应用提供理论依据。由图3可见,经过90℃、30min热处理后,溶菌酶、乳酸链球菌素、LH三者的抑菌活性都随着pH的升高而降低,溶菌酶受pH的影响最大,当pH超过7后,其

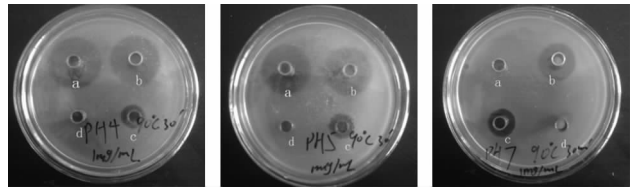


图3 90℃、30min热处理后的样品的抑菌圈

Fig.3 The inhibition zone of samples after heating at 90°C for 30min

注:(1)左起pH条件分别为:pH4、5、7;
(2)a:溶菌酶;b:LH;c:乳酸链球菌素;d:缓冲液

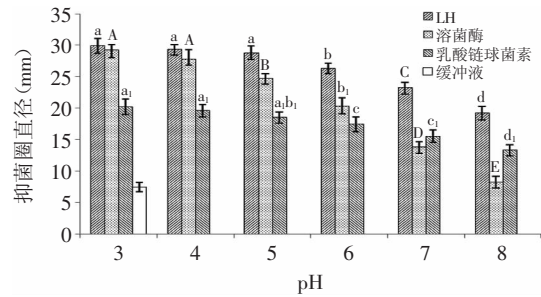


图4 在不同pH条件下经过90℃、30min热处理的样品的抑菌能力
Fig.4 The antimicrobial activity of samples heating at 90°C for 30min

抑菌活性急剧下降。LH在酸性条件下,具有较强的耐热性。在各个pH条件下经90℃、30min热处理后,LH的抑菌活性均高于溶菌酶和乳酸链球菌素。

2.3.3 经过115℃、20min热处理的样品的抑菌活性 分别用不同pH的缓冲液溶解,浓度为5mg/mL,经115℃、20min热处理后进行抑菌圈实验,每个样品重复三次,抑菌圈直径大小求平均值。溶菌酶、乳酸链球菌素、LH对金黄色葡萄球菌的抑菌情况如图5和图6所示。



图5 115℃、20min热处理后的样品的抑菌圈

Fig.5 The inhibition zone of samples after autoclaving at 115°C for 20min

注:(1)左起pH条件分别为:pH3、5、7;
(2)a:溶菌酶;b:LH;c:乳酸链球菌素;d:缓冲液

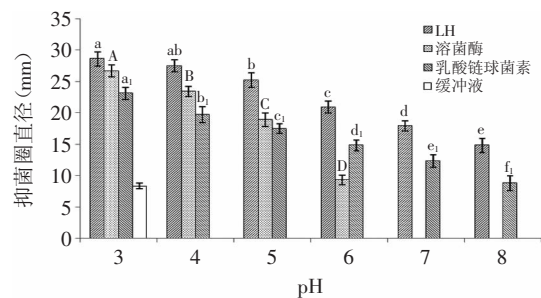


图6 在不同pH条件下经过115℃、20min热处理的样品的抑菌能力
Fig.6 The antimicrobial activity of samples autoclaving for 20 min at 121°C

许多食品需进行高压杀菌,因此,需研究LH在不同pH条件下经下高压高温处理后的抑菌能力。由图4可见,经过115℃、20min热处理,LH在酸性条件下仍保有很好的抑菌活性,随着pH的升高而有所降低。溶菌酶的抗菌活性受pH影响非常大,在pH超过7时完全失活。乳酸链球菌素的抑菌活性随着pH的升高也呈降低趋势。在各个pH条件下经115℃、20min热处理后,LH的抑菌活性均高于溶菌酶和乳酸链球菌素。

未经热处理时,LH对金黄色葡萄球菌的抑制能力略低于溶菌酶;而经热处理后,LH对金黄色葡萄球菌的抑制能力高于溶菌酶。导致这种现象的可能原因是:LH中含有耐热性较强的抗菌肽。由于抗菌肽在混合多肽中的含量较低,因此,未经热处理时,LH的抑菌活性低于溶菌酶。抗菌肽分子量小,大多数抗菌肽只有二级结构,这就决定了抗菌肽耐高温的能力较强,并且在较大的离子强度和较低或较高的pH下仍可保持较强的抑菌活性^[9],因此,经过热处理后,LH的抑制能力强于溶菌酶。乳酸链球菌素也是肽类物质,它耐高温的能力也强于溶菌酶。

3 结论

LH的相对分子量在6000以下。未经热处理时,LH具有较好的抑菌活性,抑菌能力稍逊于溶菌酶,而高于乳酸链球菌素;经过90℃、30min热处理后,LH在酸性条件下仍能保持较强的抑菌活性,随着pH的升高而有所降低,LH的抑菌活性高于溶菌酶和乳酸链球菌素;经过115℃、20min热处理条件后,溶菌酶受pH影响较大,在pH超过7时就完全失去了抗菌活性,而LH和乳酸链球菌素仍保持一定抑菌活性,LH的抑菌活性高于溶菌酶和乳酸链球菌素。LH对革兰氏阳性菌有不同程度的抑制作用。相信在经过更深入的

应用研究后,溶菌酶解物有望被开发成为一种天然食品防腐剂。

参考文献

- [1] 张红艳,林凯,阎春娟. 国内外天然食品防腐剂的研究进展[J]. 粮食加工,2004(3):57-60.
- [2] 李科德,韩木兰,柏建玲. 乳酸链球菌素的研究和应用[J]. 微生物学通报,2002,29(4):102-104.
- [3] 佟平,高金燕,陈红兵. 鸡蛋清中主要过敏原的研究进展[J]. 食品科学,2007,28(8):565-568.
- [4] Laurents DV, Baldwin RL. Characterization of the unfolding pathway of hen egg white lysozyme[J]. Biochemistry,1997,36:1496-1504.
- [5] Adham MA, Higashiguchi S, Aboueleinin AM, et al. Antimicrobial peptides derived from hen egg lysozyme with inhibitory effect against Bacillus species[J]. Journal of Food Control,2007(18):173-178.
- [6] 李德海,迟玉杰. 溶菌酶活力的简易测定[J]. 中国乳品工业,2002,30(5):42-44.
- [7] 庞莉,陆建安,王森,等. 阿魏酸化学修饰溶菌酶及扩展抗菌谱的研究[J]. 食品工业科技,2009,30(11):184-187.
- [8] 蔡宏亚,何宁先,王泽平,等. 连续稀释法研究红腺忍冬体外抑菌作用[J]. 中华实用中西医杂志,2007,20(5):448-449.
- [9] 刘德辉,徐慧,黄毓茂. 抗菌肽的生物活性及在畜牧生产中的应用前景[J]. 广东畜牧兽医科技,2009,43(3):3-5.
- [10] 北京大学生命科学导论编写组. 现代生命科学导论[M]. 北京:高等教育出版社,2000:333.
- [11] 关怀. 控制果汁及果汁饮料中腐败菌的非加热法[J]. 国外医学卫生学分册,2002,29(3):182-185.

(上接第73页)

活性研究表明,扇贝边蛋白粉清除羟基自由基的能力较强,EC₅₀可达0.2981mg/mL,且具有较强的还原能力,所以可以初步推测其抗氧化机理主要是清除已产生的自由基,此外还与还原能力有关,但仍处于初步阶段,还需进一步进行体内活性实验研究。

参考文献

- [1] 王璐. 论扇贝的营养价值、生物活性及养殖[J]. 牡丹江大学学报,2007,11(3):92-94.
- [2] 苏秀榕,李太武,丁明进. 扇贝营养成分的研究[J]. 海洋科学,1997(2):10-11.
- [3] 黄翠丽,刘赛. 扇贝的生理活性物质和药用价值[J]. 中国海洋药物,2001(2):45-47.
- [4] 李国江. 海湾扇贝边裙的加工利用[J]. 中国农村科技,2001(2):39.
- [5] 张一江,曹文红,毕春波,等. 海湾扇贝酶解产物清除自由基活性的研究[J]. 食品与发酵工业,2008,34(4):60-63.
- [6] 孔繁东,杨喆,祖国仁,等. 扇贝裙边酶解液抗氧化性研究[J]. 食品科技,2007(6):164-167.

- [7] 中华人民共和国国家标准食品中蛋白质的测定方法. GB/T 14771-1993[S].
- [8] 赵新淮,冯志标. 蛋白质水解物水解度的测定[J]. 食品科学,1994(11):65-67.
- [9] 钱飞,陈焱,刘海英,等. 克氏原螯虾头酶解工艺的研究[J]. 食品工业科技,2009,30(6):271-274.
- [10] 栗桂娇,阎欲晓,申柯,等. 酶法制取罗非鱼水解动物蛋白的工艺研究[J]. 食品科学,2005,26(4):177-182.
- [11] 李建武,余瑞元,袁明秀,等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京:北京大学出版社,1994.
- [12] 李翠萍,于华华,陈晓琳,等. 白色霞水母蛋白抗氧化活性的初步研究[J]. 海洋科学,2008,32(7):65-70.
- [13] 肖军霞,黄国清,仇宏伟,等. 红树莓花色苷的提取及抗氧化活性研究[J]. 食品科学,2011,32(8):15-18.
- [14] Zhou Da Yong, Zhu Bei Wei, Lu Qiao, et al. In vitro antioxidant activity of enzymatic hydrolysates prepared from abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) viscera[J]. Food Bioprod Process, 2011.
- [15] 曾庆祝,许庆陵,林鲁萍. 扇贝边酶解物抗氧化作用研究[J]. 中国生化药物杂志,2005,26(2):86-89.