

防腐型乳化剂葡聚赖氨酸的研究

谢建飞, 杨玉红, 陈红漫*, 阚国仕
(沈阳农业大学生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 利用白色链霉菌(*Streptomyces albus*)发酵、分离纯化得到聚赖氨酸(PL), 其与葡聚糖(Dextran)在 Maillard 反应中通过共价结合生成一种防腐型乳化剂——葡聚赖氨酸(DPL)。通过测定 420nm 波长下吸光度和 SDS 聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)分析, 检测聚赖氨酸与葡聚糖的共价结合过程。乳化活性和最小抑菌浓度(MIC)测定结果表明, DPL 不但具有比传统乳化剂优良的乳化能力, 而且还保留了聚赖氨酸大部分的抑菌活性, 并且其乳化活性在 pH 值为 7 时最高, 在 NaCl 浓度为 1.75mol/L 时依然没有下降。

关键词: 葡聚赖氨酸; 乳化能力; 抑菌活性

Antibacterial Activity and Emulsifying Activity of Polylysine and Dextran Conjugate by Maillard Reaction

XIE Jian-fei, YANG Yu-hong, CHEN Hong-man*, KAN Guo-shi
(College of Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: A Maillard reaction was carried out between 1 g of polylysine (PL) produced through fermentation of *Streptomyces albus* and 9 g of dextran with 40 kD molecular weight. The covalent attachment of PL to dextran was confirmed by SDS-PAGE and the absorbance measurement of Maillard reaction system at 420 nm wavelength was conducted to determine the conjugation progress between the above two materials. Subsequently, the antibacterial activity and emulsifying activity of PL-dextran conjugate were investigated. The results indicated that the PL-dextran conjugate not only had higher emulsifying activity than that of 0.9% dextran or 0.1% PL, but retained the antibacterial activity of PL. Its emulsifying activity reached the maximum at pH 7.0, and did not decrease in the presence of 1.75 mol/L of NaCl.

Key words: PL-dextran; emulsifying activity; antibacterial activity

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)11-0131-03

随着生活质量的提高, 绿色、无公害食品越来越受到人们的重视, 人们对于天然食品添加剂的需求也随之增加。食品乳化剂是食品行业主要的添加剂, 目前市场上主要有 Tween 和 Span 系列等。

聚赖氨酸(PL)是一种天然食品防腐剂^[1-3], 对人体没有副作用, 而且 PL 在体内降解成为赖氨酸可以被人体吸收。在日本, PL 已广泛应用于食品的保鲜^[4-5]。

聚赖氨酸和葡聚糖经过复杂的 Maillard 反应生成一种新物质, 被命名为“葡聚赖氨酸(DPL)”, DPL 不但具有优良的乳化能力, 还保留了 PL 大部分的抑菌活性。日本学者早在 1999 年就发现了这种具有防腐功能的乳化剂^[6], 国内在这方面的研究还不是很多。本实验对 DPL 进行了研究, 旨在为 DPL 的开发与应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

聚赖氨酸由本实验室保藏菌种 *Streptomyces albus* 经发酵、分离纯化后制得; 葡聚糖(40000D) 国药集团化学试剂有限公司; 大豆油 市售。

N,N'-亚甲基双丙烯酰胺 Fluka 公司; 丙烯酰胺 上海源聚生物科技有限公司; 考马斯亮蓝 挺进基准化学试剂有限公司。

DYY-6B 型稳压稳流定时电泳仪、DYCZ-24BN 型垂直板电泳槽 北京六一仪器厂; UV-2000 紫外可见分光光度计 上海兰科仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 DPL 的制备和检测

称取葡聚糖 9g, 聚赖氨酸 1g, 加入到 100ml 蒸馏水中, 搅拌均匀, 10ml 等体积分装, 密封, 于 80、90、100℃ 分别加热 0~120min, 冷冻干燥, 研磨成粉。将上述 DPL 粉末配制成 1%(W/V)水溶液, 蒸馏水做空

收稿日期: 2008-10-23

作者简介: 谢建飞(1983-), 男, 硕士研究生, 研究方向为酶化学与酶工程。E-mail: jf-xie@126.com

* 通讯作者: 陈红漫(1969-), 女, 副教授, 研究方向为酶化学与酶工程。E-mail: hongmanc@hotmail.com

白, 于 420nm 波长处测定其吸光度, 并进行 15% SDS-PAGE 分析, 以检测反应进程。为了清晰区分电泳条带中的聚赖氨酸和葡聚糖, 凝胶板分别用考马斯亮蓝 R-250 和高碘酸-希夫试剂(PAS)染色^[6]。

1.2.2 DPL 乳化活性的测定

量取 1% DPL 溶液 10ml, 加入 1.4g 大豆油, 剧烈振荡 10min, 静置 30min。吸取下层溶液 0.1ml, 溶于 0.05% (W/V) SDS 溶液, 定容至 10ml, 蒸馏水做空白, 于 500nm 波长下测定其吸光度。以 0.1% PL、0.9% 葡聚糖、Span80、Tween80 做对照, 比较乳化活性。

1.2.3 DPL 抑菌活性的测定

采用最小抑菌浓度法^[7]测定 DPL 的抑菌活性。

配制不同 DPL 浓度梯度的 LB 液体培养基, 分别向其中接种供试菌, 使菌体浓度达到 10^5 CFU/ml, 37℃, 160r/min 培养 24h, 以培养 0h 的培养液做空白, 于 590nm 波长处测定其吸光度^[8]与空白相同则说明菌体被完全抑制, 其中最小的 DPL 浓度即为 DPL 最小抑菌浓度(MIC), 并用同样的方法测定 PL 的 MIC, 作为对照。

1.2.4 DPL 的 pH 值和离子强度稳定性

pH 值 3~10 和 NaCl 浓度 0~1.75mol/L 条件下分别测定 DPL 的乳化活性。以 Tween80 和 Span80 做对照, 比较 DPL 与 Tween80、Span80 的稳定性。

2 结果与分析

2.1 Maillard 反应和 SDS-PAGE 检测

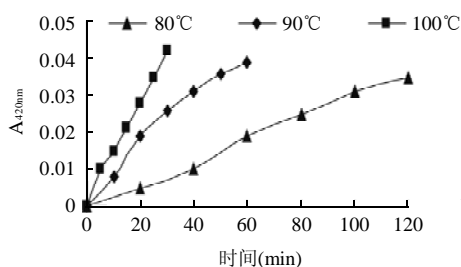
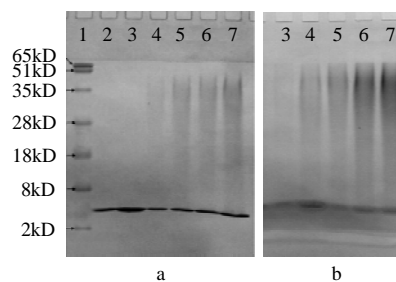


图1 不同温度下 Maillard 反应进程
Fig.1 Progress curves of Maillard reaction at different temperatures

由图 1 可知, 聚赖氨酸和葡聚糖在加热条件下发生 Maillard 反应。随着反应的进行, 溶液逐渐从透明变为棕色, A_{420nm} 逐渐上升, 100℃下, Maillard 反应迅速进行, 快于在 80℃和 90℃下的反应速率。

由图 2 可知, 随着反应的进行, 被亮蓝染成蓝色的聚赖氨酸逐渐拖尾, 被 PAS 染成紫红色的葡聚糖也逐渐显现, 而且两者颜色都逐渐加深, 这与文献^[6]中的报道基本一致。 A_{420nm} 检测和电泳分析表明, 在加热条件下, 聚赖氨酸与葡聚糖发生 Maillard 反应, 生成新物质——葡聚赖氨酸。



1. Maker; 2. PL; 3. 100℃ 0min; 4. 100℃ 10min; 5. 100℃ 20min; 6. 100℃ 30min; 7. 100℃ 40min.

图2 考马斯亮蓝 R-250 染色 (a) 和高碘酸-希夫碱染色 (b)

Fig.2 Staining results with Coomassie brilliant blue R-250 (a) and periodic acid-Schiff (b) for SDS-PAGE analysis of Maillard reaction progress at 100℃

2.2 DPL 的乳化活性

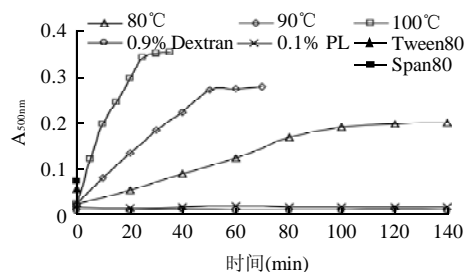


图3 不同温度下制备的 DPL 的乳化活性

Fig.3 Emulsifying activity of PL-dextran conjugates during reaction at different temperatures

1% DPL 溶液与大豆油混合, 剧烈振荡, 形成乳油, 用 0.05% SDS 溶液稀释 100 倍, 于 500nm 波长下测定吸光度。由图 3 可知, DPL 的乳化活性随着 Maillard 反应的进行而提高, 在 100℃下反应 30min 后 DPL 的乳化活性达到最高, 在 80 与 90℃下则需要较长的时间才能达到较高的乳化活性。不同制备条件下 DPL 的乳化活性均明显高于 0.1% PL、0.9% 葡聚糖及传统乳化剂 Tween80 和 Span80 的乳化活性。

2.3 DPL 的抑菌活性

表1 DPL 的最小抑菌浓度

Table 1 Minimal inhibitory concentrations against 4 species of bacteria of PL and Maillard reaction products reaction products between PL and dextran at different reaction time 9 (100℃) of DPL

菌种	MIC(μ g/ml)					
	PL	DPL				
		0min	10min	20min	30min	40min
<i>Bacillus subtilis</i>	3	13	13	13	13	13
<i>Bacillus cereus</i>	50	65	65	65	65	65
<i>Escherichia coli</i>	50	60	65	65	65	65
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	25	25	30	30	30

采用最小抑菌浓度法测定 100℃下 Maillard 反应在不同时刻 DPL 的抑菌活性, 结果表明, 葡聚糖和聚赖氨酸按 9:1 混合后抑菌活性有所下降, 但随着 Maillard 反

应进行其抑菌活性几乎没有变化,可见DPL保留了PL大部分的抑菌活性,见表1。

2.4 离子强度与pH值稳定性

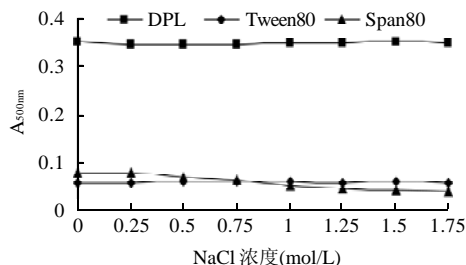


图4 离子强度对DPL乳化活性的影响

Fig.4 Emulsifying activity of PL-dextran conjugate at different ion strength

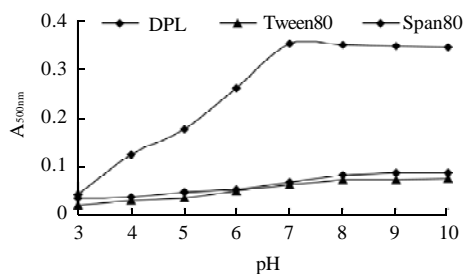


图5 pH值对DPL乳化活性的影响

Fig.5 Emulsifying activity of PL-dextran conjugate at different pH values

在pH值3~10和NaCl浓度0~1.75mol/L的条件下,分别测定DPL的乳化活性。图4表明,DPL具有良好

的离子强度稳定性,如图5所示,在pH值为7时DPL的乳化活性最高。

3 结论

葡聚糖和聚赖氨酸按9:1混合,在加热条件下发生Maillard反应,生成葡聚赖氨酸。葡聚赖氨酸不但具有比传统乳化剂更优良的乳化能力,而且还具有很好抑菌活性,其商业价值有待于进一步开发。

参考文献:

- [1] SHIMA S, SAKAI H. Poly-L-lysine produced by *Streptomyces*.II.taxonomy and fermentation studies[J]. Agric Biol Chem, 1981, 45: 2497-2502.
- [2] SHIMA S, SAKAI H. Poly-L-lysine produced by *Streptomyces*.III. chemical studies[J]. Agric Biol Chem, 1981, 45: 2503-2508.
- [3] KAWAI T, KUBOTA T, HIRAKI J, et al. Biosynthesis of epsilon poly-L-lysine in a cell-free system of *Streptomyces albulus*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 311: 635-640.
- [4] HIRAKI J. ϵ -Polylysine, its development and utilization[J]. Fine Chem, 2000, 29: 18-25.
- [5] SHIMA S, FUKUHARA Y, SAKAI H. Inactivation of bacteriophages by ϵ -poly-lysine produced by *Streptomyces*[J]. Agric Biol Chem, 1982, 46: 1917-1919.
- [6] HO Y T, ISHIZAKI S, TANAKA M. Improving emulsifying activity of ϵ -polylysine by conjugation with dextran through the maillard reaction [J]. Food Chemistry, 1999, 68: 449-455.
- [7] YOSHIDA T, NAGASAWA T. ϵ -poly-L-lysine: microbial production, biodegradation and application potential[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 62: 21-26.
- [8] SHIMA S, MATSUOKA H, IWAMOTO T, et al. Antimicrobial action of ϵ -poly-lysine[J]. Antibiot, 1984, 37: 1449-1455.