

温度、pH 及盐对植物乳杆菌素 L-1 作用 单核细胞增生李斯特氏菌的影响

周 伟, 李平兰*, 周 康, 吕燕妮

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘 要: 本试验分析了透析除盐后的植物乳杆菌素 L-1 的效价和作用方式, 测定了在食品加工过程中常涉及到的温度、pH 和盐等生化条件对其作用单核细胞增生李斯特氏菌的影响, 并初步探索了 pH 和盐对植物乳杆菌素 L-1 吸附作用的影响。结果表明: 透析除盐后的植物乳杆菌素 L-1 的效价可达 1280AU/ml, 作用方式为杀菌; 低温下 144h 内可以控制住初始菌数, 高温下可以短时间内迅速降低初始活菌数; 在 pH7.0 下, 该细菌素的抑菌效果最好; 无论是 TSBYE 培养基中还是磷酸缓冲液中, 试验所采用的四种盐对植物乳杆菌素 L-1 的杀菌作用都有一定的拮抗作用, 各盐之间和同种盐内不同浓度间差异不显著; 对吸附作用的初步研究发现 pH 对植物乳杆菌素的吸附作用有一定影响, 而盐对其影响不显著。

关键词: 植物乳杆菌素; 单核细胞增生李斯特氏菌; 温度; pH; 盐

Effect of Temperature, pH and Salts on Plantaricin L-1 to *Listeria monocytogenes*

ZHOU Wei, LI Ping-lan*, ZHOU Kang, LÜ Yan-ni

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: Plantaricin L-1, an anti-*listeria* bacteriocin, obtained by precipitation with 80% ammonium sulphate is 1280AU/ml. The mode of action is bactericidal. Influence of temperature, pH and salts on inhibitory activity of plantaricin L-1 showed: that the inhibitory activity can last 144h at lower temperature, and the CFU/ml can be decreased at higher temperatures. pH7.0 was optimal, a significant reduction in activity was observed at acidic pH values; Salts in TSBYE broth and phosphate buffer (5mmol/L, pH7.0) tested can reduce the activity of plantaricin L-1, the difference between various salts was not significant, as well as the difference between three density of the same salt. Adsorption of plantaricin L-1 was influenced by the pH in some degree, however, salts didn't change the adsorption of plantaricin L-1.

Key words: plantaricin; *L.monocytogenes*; temperature; pH; salts

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)02-0121-05

植物乳杆菌广泛用于青贮饲料、腊肠制品、干酪及蔬菜制品的发酵, 是目前公认的安全菌。本实验室从我国云南宣威火腿中分离得到一株产细菌素的植物乳杆菌, 排除干扰因素后确定其抑菌物质为蛋白类物质-细菌素^[1], 命名为植物乳杆菌素 L-1。经硫酸铵沉淀、透析除盐后得到粗提物, 对其进行理化分析发现, 该细菌素对热比较稳定, 在 80℃ 热处理 15min 后活性丝毫没有损失, 121℃ 处理 15min 的情况下也只是部分失活; 对酸也相对稳定, 在 pH2~8 的范围内活性基本没有损失, pH 大于 9 的情况下, 活性逐渐降低; 可被胃蛋白

酶、胰蛋白酶、蛋白酶 K、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶完全失活。该细菌素不仅可以抑制乳杆菌属、链球菌属、片球菌属的多株菌株, 还可抑制金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、部分芽孢杆菌及单核细胞增生李斯特氏菌。其中单核细胞增生李斯特氏菌是水、畜禽肉类食品中危害最为严重的病原菌, 可引起人畜共患病如败血症、脑膜炎等, 且死亡率极高, 可达 30%~70%^[2]。以上的研究结果说明植物乳杆菌素 L-1 是一种具有良好的热、酸稳定性的蛋白类活性物质, 具有较高的安全性及作为食品防腐剂的良好应用前景。此外, 该菌株作

收稿日期: 2005-10-20

* 通讯作者

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目(6052015)

作者简介: 周伟(1979-), 女, 硕士研究生, 研究方向为乳酸菌细菌素。

为发酵香肠发酵剂在河南双汇集团进行实验室规模试制,结果表明香肠产酸迅速,风味优良,且在发酵过程中可明显降低肠杆菌科的数量,具有较好的作为发酵剂使用的前景。

然而天然食品防腐剂的抑菌效果受多种环境因素的影响,如食品的加工工艺、包装、贮藏方式等,因此研究各种环境因素对天然食品防腐剂抑菌效果的影响,对其正确合理的实际应用具有一定的指导意义。本试验主要研究温度、pH及盐等食品中常见的生化环境对该细菌素作用单核细胞增生李斯特氏菌的影响,从而为该细菌素在食品防腐保鲜中,如何进行科学合理的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

试验菌:产细菌素植物乳杆菌 L-1(分离自宣威火腿,专利保藏菌株)。

指示菌:单核细胞增生李斯特氏菌 *Listeria monocytogenes* 54002(购于中国药品生物制品鉴定所)。

1.1.2 培养基

优化 MRS 液体培养基,TSBYE、TSBYA 培养基。

1.1.3 药品与试剂

(NH₄)₂SO₄, NaCl, KCl, MgSO₄, CaCl₂, 均为分析纯。5mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.0), 1.0mol/L NaOH, 1.0mol/L HCl。

1.1.4 仪器与设备

细菌过滤器,透析袋(7000kDa), 85-2 磁力搅拌器,飞鸽牌 TGL-16C 高速低温离心机,低温冰箱, DNP 型电热恒温培养箱。

1.2 方法

1.2.1 植物乳杆菌素 L-1 粗提液的制备

将植物乳杆菌 L-1 发酵液经 6000r/min, 4℃低温离心 15min, 取上清弃菌体沉淀。将硫酸铵粉末缓缓加入, 边加边搅拌, 使最终饱和度为 70%, 可看到有片状沉淀浮现, 置于 4℃冰箱中静置沉淀过夜。12000r/min, 4℃低温离心 15min, 将沉淀复溶于原体积 1/10 的磷酸缓冲液(pH7.0)中, 装于 7000kD 的透析袋中对去离子水透析脱盐, 用 BaCl₂ 跟踪检测去离子水中的 SO₄²⁻, 没有白色沉淀出现则透析完毕。透析后的液体用 PEG20000 浓缩至透析前体积(效价 1280AU/ml), 存放于 4℃冰箱中待用。

1.2.2 植物乳杆菌素 L-1 作用方式的确定

将培养至对数生长期中期的李斯特氏菌接种于含有 64AU/ml 透析后植物乳杆菌素粗提液(640AU/ml)的新鲜

TSBYE 培养基中, 初始菌数控制在 10⁷CFU/ml, 对照为不加细菌素^[3]。37℃下培养, 每隔 3h 取 1ml 样品, 采用平板计数法测其活菌数, 各取三个稀释度, 每个稀释度三个重复。

1.2.3 温度对植物乳杆菌素 L-1 作用的影响

选择 7、15、30、37℃四个温度^[4]。植物乳杆菌素 L-1 的添加量为终浓度 64AU/ml, 对照不加细菌素。测定方法同 1.2.2。

1.2.4 pH 对植物乳杆菌素 L-1 作用的影响

TSBYE 培养基用 1mol/L HCl 或 1mol/L NaOH 调成 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 六种 pH 值^[4]。接种量及细菌素添加量同 1.2.3, 分别在接种后 0h 及 15℃下培养 24h 后, 各取 1ml 样品测其活菌数, 测定方法同 1.2.2。

1.2.5 几种盐离子对植物乳杆菌素 L-1 作用的影响

NaCl、KCl 在磷酸缓冲液(5mmol/L, pH7.0)和 TSBYE 培养基中的浓度为 50、100、200mmol/L, 而 MgCl₂、CaCl₂ 在磷酸缓冲液(5mmol/L, pH7.0)和 TSBYE 培养基中的浓度为 10、25、100mmol/L。接种量及细菌素添加量同 1.2.3, 对照 I 为不加盐离子和细菌素的 TSBYE 液体培养物, 对照 II 为不加盐离子添加细菌素的 TSBYE 液体培养物, 对照 III 为不加盐离子和细菌素的磷酸缓冲液培养物, 对照 IV 为不加盐离子添加细菌素的 TSBYE 液体培养物^[5]。上述样品放在 15℃下培养 24h, 各取 1ml 样品测其活菌数, 测定方法同 1.2.2。

1.2.6 pH 和盐对植物乳杆菌素 L-1 吸附的影响

TSBYE 培养基用 1mol/L NaOH 或 1mol/L HCl 调 pH 至 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5。将培养至对数生长期中期的李斯特氏菌离心收集菌体, 用 5mmol/L(pH7.0)的磷酸缓冲液洗两次, 然后用相同体积的 TSBYE 培养基重悬浮。15℃下培育 15min, 离心收集上清液进行效价分析。对照 I 为不含细菌素和细胞的 pH7.0 的培养基; 对照 II 为添加细菌素不含细胞的 pH7.0 的培养基。

含盐的培养基和缓冲液同 1.2.5, 方法同上。对照 I 为不含细菌素和细胞的培养液; 对照 II 为不含细胞含细菌素的培养液。

吸附率(%)=[1-(样品上清 AU-对照 I AU)/对照 II AU]×100%^[6]

1.2.7 统计分析

采用 SPSS8.0 统计分析软件进行单因素方差分析, 对 F 检验显著者, 进一步采用邓肯氏“新复极差检验法”(LSR)进行多重比较。

2 结果与讨论

2.1 植物乳杆菌素 L-1 粗提物的制备

经硫酸铵沉淀, 离心收集沉淀并透析后所得细菌素

粗提液的效价为 1280AU/ml(图 1), 接下来的试验即采用此细菌素粗提液。

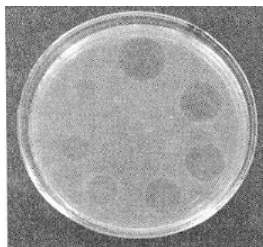


图1 透析后的植物乳杆菌素效价
Fig.1 Activity assay

2.2 作用方式的确定

在 64AU/ml 植物乳杆菌素 L-1 存在的情况下(图 2), 单核细胞增生李斯特氏菌活菌数在前 3 h 内就降到 10^2 CFU/ml 左右, 第 6h 开始回升, 而未加细菌素的对照则一直呈上升趋势, 12h 接近稳定。说明植物乳杆菌素 L-1 的添加在很短时间内杀死了部分指示菌, 可以初步判断在 64AU/ml 浓度的情况下, 该细菌素的作用方式为杀菌。但类似的研究也指出细菌素的作用方式取决于细菌素浓度、指示菌浓度、指示菌的生理状态和其他作用条件^[7], 所以在食品加工中要考虑到细菌素的剂量问题。

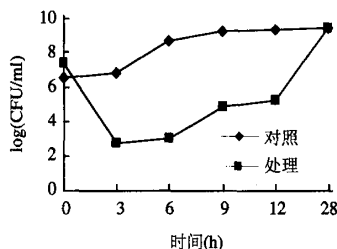


图2 植物乳杆菌素 L-1 作用方式的确定

Fig.2 The mode of action of plantaricin L-1 on *L. monocytogenes*

2.3 温度对植物乳杆菌素 L-1 作用的影响

有关温度影响的研究较多, 范围也较广^[8]。本实验选用食品加工储藏中常用的四种温度, 实验结果见图 3。

由图 3 可知, 在 7℃ 下, 对照中的指示菌呈上升的生长趋势, 而添加植物乳杆菌素 L-1 的处理则指示菌被明显抑制, 保持在初始菌数且这种抑制作用持续到 144h。15℃ 下, 在前 12h 中表现出明显的抑制作用, 随后指示菌即呈现较快的增长。而在 30℃、37℃ 下, 在前 6h 内活菌数一度降到 10^2 CFU/ml 左右, 随后开始上升。研究表明, 低温下使用植物乳杆菌素 L-1 可较长时间的将单核细胞增生李斯特氏菌控制在初始菌数水平, 而高温下使用该细菌素可以在很短的时间内降低活菌数, 如果结合其他杀菌技术则可达不同的防腐要求。

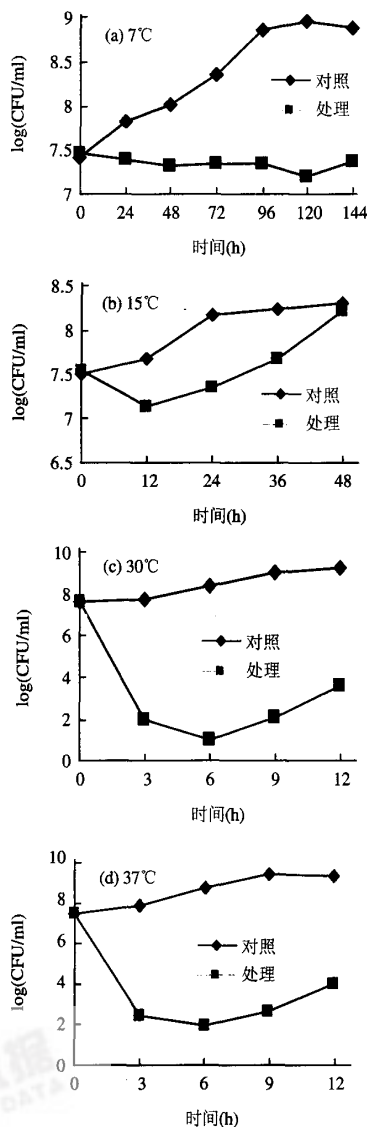


图3 温度对植物乳杆菌素 L-1 作用单增李斯特菌的影响

Fig.3 Effect of plantaricin L-1 on *L. monocytogenes* at various temperature

2.4 pH 对植物乳杆菌素 L-1 作用的影响

本实验选用的 pH 范围见图 4, 由图 4 可以看出, 在起始活菌数差异不显著的情况下, 经 15℃ 作用 24h 后, 其活菌数随着 pH 的升高而降低, pH7.0 时达到最低, 随后有所上升。方差分析 $p < 0.01$, 表明 pH 对植物乳杆菌素 L-1 的抑菌作用有显著影响, pH7.0 的条件下其抑菌效果最好。Sophie^[9]等认为低 pH 下细菌素的结构也许发生改变, 造成活性降低, 从而表现出抑菌效果不佳。另外较低的 pH 有可能影响植物乳杆菌素 L-1 对指示菌的吸附作用, 从而不能充分发挥抑菌作用。

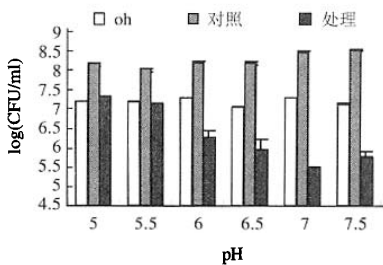


图4 pH对植物乳杆菌素L-1作用的影响

Fig.4 Effect of plantaricin L-1 on *L.monocytogenes* at various pH

2.5 几种盐离子对植物乳杆菌素L-1作用的影响

图5所示为植物乳杆菌素L-1分别在TSBYE培养基(图5a)和磷酸缓冲液(图5b)中结合几种盐对单核细胞增生李斯特氏菌作用的影响。

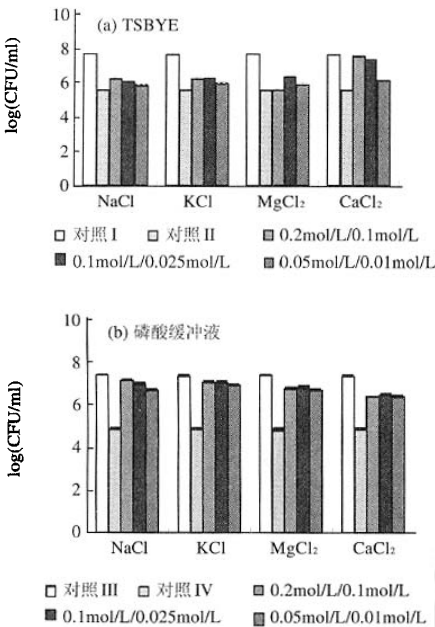


图5 几种盐对植物乳杆菌素L-1作用的影响

Fig.5 Combined effect of salts and plantaricin L-1 on *L. monocytogenes* cell viability

可以看出在培养基中, 几种盐对植物乳杆菌素L-1具有一定的拮抗作用, 即在四种盐存在的情况下, 植物乳杆菌素L-1对单核细胞增生李斯特氏菌的抑制作用有所下降, 而同种盐不同浓度间的差异不显著。在磷酸缓冲液中, 几种盐对植物乳杆菌素的拮抗作用较培养基中明显, 同种盐内不同浓度间的差异不显著。这可能由两方面的原因造成: 一是盐离子改变了单核细胞增生李斯特氏菌细胞膜受体的极性, 消除膜内外电位差等, 从而对植物乳杆菌素吸附在作用菌上有阻遏作用; 二是

盐通过改变细菌素的空间构象或键的连接而导致细菌素部分活性的丧失。

2.6 pH和盐对植物乳杆菌素L-1吸附单核细胞增生李斯特氏菌的影响

不同pH和盐对植物乳杆菌素L-1吸附单核细胞增生李斯特氏菌的影响见表1和表2。

表1 pH对植物乳杆菌素L-1吸附单核细胞增生李斯特氏菌的影响
Table 1 Effect of pH on adsorption of plantaricin L-1 to *L. monocytogenes*

pH	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5
吸附率(%)	0	0	50	50	50	50

由表1可以看出, 在pH5.0和pH5.5下, 植物乳杆菌素L-1不能吸附在指示菌上, pH6.0至pH7.5下则有50%吸附在指示菌上。造成这种现象的原因可能是: 一方面, 低pH影响该细菌素的吸附作用; 另一方面, 较高的pH下植物乳杆菌素L-1的活性有所损失。结合前面pH对该细菌素作用单增李斯特菌的影响结果, 低pH下指示菌生长比高pH下的生长要旺盛, 在一定程度上证实了吸附的假设。

表2 盐对植物乳杆菌素L-1吸附单核细胞增生李斯特氏菌的影响
Table 2 Effect of salts on adsorption of plantaricin L-1 to *L. monocytogenes*

盐	浓度(mmol/L)	吸附率(%)	
		TSBYE培养基	磷酸缓冲液
对照II	0	0	0
NaCl	50	0	0
	100	0	0
	200	0	50
	250	0	50
KCl	50	0	0
	100	0	0
	200	0	100
MgCl ₂	10	0	0
	25	0	0
	100	0	50
CaCl ₂	10	0	0
	25	0	50
	100	0	0

观察表2所示盐对植物乳杆菌素L-1吸附作用的影响, 发现在几种盐缓冲液中, 仅在较高浓度下该细菌素有部分吸附在指示菌上, 低浓度下没有吸附作用发生。在相应处理的培养基中全部没有吸附作用发生, 说明盐对植物乳杆菌素L-1的吸附作用几乎没有影响。从另一个角度讲, 这也许由于高浓度的盐对植物乳杆菌素L-1造成了一定的失活而引起部分吸附的假象。结合2.4、2.5有关指示菌活菌数的测定结果, 发现pH和盐对植物乳杆菌素L-1吸附作用的影响与pH和盐对植物乳杆菌素L-1作用单核细胞增生李斯特氏菌的影响之间没有相关性, 这和Atrih的报道一致^[5]。

耐高温 α -淀粉酶的酶学性质研究

毕金峰¹, 董福奎²

(1. 中国农业科学院农产品加工研究所 农业部农业核技术与农产品加工重点实验室, 北京 100094;
2. 内蒙古呼和浩特市赛罕区蔬菜技术推广站, 内蒙古 呼和浩特 010020)

摘 要: 耐高温 α -淀粉酶是淀粉生产麦芽糖的关键酶。本文对两种耐高温 α -淀粉酶的酶学性质进行了对比研究。结果表明: 两种酶的耐高温能力差别较大, 酶活差别明显; 最适 pH 值均为 7.0, 耐酸性较差; 当 Ca^{2+} 浓度在 7~9 mmol/L 时, 酶活提高明显。

关键词: 耐高温 α -淀粉酶; 性质

Studies on Enzyme Properties of Heat-resisting α -amylase

BI Jin-feng¹, DONG Fu-kui²

(1. Institute of Agro-Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences,
Key Laboratory of Agricultural Nuclear Technology and Agro-Food Processing, MOA, Beijing 100094, China;
2. Vegetable Technology Popularize Station of Saihan District in Huhehaote City, Huhehaote 010020, China)

Abstract: Heat-resisting α -amylase is a critical enzyme for producing maltose. Enzyme properties of two species of heat-resisting α -amylases were studied. The results were as follows: the heat-resisting ability for two species of enzymes was different, and there was an evident difference in enzyme activity. The optimum pH was 7.0, and the acid-resisting ability was poor. The

收稿日期: 2005-01-21

作者简介: 毕金峰(1970-), 男, 副教授, 博士后, 主要从事食品化学与生物技术研究。

3 结 论

植物乳杆菌素 L-1 经硫酸铵沉淀, 透析除盐后效价达 1280 AU/ml, 作用方式为杀菌。在 7、15、30、37℃下, 添加植物乳杆菌素 L-1 对单增李斯特菌都有一定的抑制作用。7℃下该细菌素在 144h 内控制住初始菌数, 温度较高的情况下则可以在短时间内迅速降低活菌数。在选用的六种 pH 下, pH7.0 时植物乳杆菌素 L-1 的抑菌效果最好。不论在培养基中还是 pH7.0, 5mmol/L 的磷酸缓冲液中, 盐对该细菌素具有一定的拮抗作用, 各盐之间和同种盐不同浓度之间差异不显著。有关吸附作用的研究发现: 低 pH(5.0~5.5)下, 植物乳杆菌素 L-1 不能吸附在单核细胞增生李斯特氏菌上, 而 pH6.0~7.5 下有 50% 吸附在指示菌上。盐对该细菌素吸附单核细胞增生李斯特氏菌没有显著影响。

参考文献:

[1] 吕燕妮, 李平兰, 江志杰. 乳酸菌 31-1 菌株产细菌素的初步研究[J].

中国食品学报, 2003, 增刊: 130-133.

- [2] 郁庆福, 蔡宏道, 何晓青, 等. 现代卫生微生物学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995. 116-117.
- [3] Sophie M P, Emilia F, Richard J. Purification, Partial characterization and mode of action of enterococcal EFS2, an antilisterial bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecalis* isolation from a cheese[J]. International Journal of Food Microbiology, 1996, 30: 255-270.
- [4] Atrih A, Rekhif N, Moir A J G, et al. Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1993, 39: 1173-1179.
- [5] Atrih A, Rekhif N, Moir A J G, et al. Mode of action, purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti-Listeria bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 68: 93-104.
- [6] Rongguang Y, Monty C J, Bibek R. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria[J]. Applied and Environment Microbiology, 1992, 58: 3355-3359.
- [7] 还连栋, 贾士芳, 庄增辉, 等. 乳链菌肽(NISIN)的杀菌作用机制[J]. 中国食品添加剂, 1997, (4): 20-23.
- [8] S Todorov, B Onno, O Sorokine, et al. Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST 31 isolated from sourdough[J]. Int J Food Microbiol, 1999, 48: 167-177.