

鱿鱼鱼精蛋白的抑菌作用及在保鲜中的应用

李 燕, 汪之和, 王 麟, 宋倩禹
(上海水产大学食品学院, 上海 200090)

摘 要: 以鱿鱼精巢组织为原料, 从中分离提取鱼精蛋白。确定其对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度(MIC)后, 将其添加到新鲜的鱼糜制品中, 研究了pH值、无机成分、有机成分和其他化学物质对鱼精蛋白抑菌活性的影响。结果表明, 鱼精蛋白是一种有效的天然食品防腐剂。

关键词: 鱼精蛋白; 最低抑菌浓度; 抑菌作用

Study on Antibacterial Action of Squid Protamine and the Preservation of the Ground Flesh of Fish

LI Yan, WANG Zhi-he, WANG Lin, SONG Qian-yu
(College of Food Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: This paper used spermatozoa of adult squid as crude material, through a serial processes of extraction, crude product of protamine was yielded and measured the minimum inhibition concentration of squid protamine on *E. coli* and *S. aureus*. The ground flesh of fish was added with protamine. In this paper, pH value, inorganic, organic substances and other chemical components that affect antibacterial activity of protamine were studied. The results indicated that protamine was an effective natural food preservative.

收稿日期: 2004-08-19

作者简介: 李燕(1965-), 女, 副教授, 研究方向为海洋活性物质的提取与应用。

芦荟汁与25%糖液及与10%盐液的协同抑菌作用十分明显, 所有四种菌的菌落总数的增长均得到了有效抑制, 且芦荟汁浓度越高, 一些菌的菌落总数在24h之后会迅速降低, 如: 大肠杆菌和蜡样芽孢杆菌, 在70%和100%芦荟汁与糖液的协同作用下, 24h以后, 菌落总数迅速减少, 而枯草芽孢杆菌在100%芦荟汁与10%盐液的协同作用下, 24h以后的菌落总数也迅速减少, 说明了芦荟汁的不仅具有抑菌效果, 在与糖液或盐液协同作用时, 还表现出了一定程度的杀菌活性。

3 结 论

3.1 50%以上不同浓度的芦荟汁具有相似的抑菌活性, 且其抑菌效果具有一定的选择性, 即对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的抑菌效果显著地强于金黄色葡萄球菌和蜡样芽孢杆菌。

3.2 经沸水浴的处理后, 芦荟汁的抑菌性随处理时间的长短表现出不同的效果, 越短的处理时能获得更为理

想的抑菌效果。

3.3 芦荟汁与糖液、盐液的协同抑菌效果显著, 且芦荟汁浓度高时, 对某些菌而言, 其协同抑菌性表现为一定程度的杀菌效果。

参考文献:

- [1] 熊佑清, 姚利. 芦荟[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1999.
- [2] Levin H, Hazenfratz R, Friedman J, et al. Partial purification and some properties of an antibacterial compound from *Aloe vera*[J]. *Phytotherapy Research*, 1988, (2): 67-69.
- [3] 姚晓敏, 孙向军, 黄时. 芦荟及其抑菌作用研究[J]. *食品科技*, 2001, (4): 23-25.
- [4] Dopp W. Die tuberkulostatische Wirkung der Aloe und ihrer wichtigsten Inhaltsstoffe in vitro[J]. *Arzneimittel-Forschung*, 1953, (3): 627-630.
- [5] Heggors J P, Kucukcelibi A, Stabenau, C J, et al. Wound healing effects of Aloe gel and other topical antibacterial agents on rat skin[J]. *Phytotherapy Research*, 1995, (9): 455-457.

Key words: protamine; minimum inhibitory concentration (MIC); antibacterial action

中图分类号 Q512.8

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2004)10-0080-05

鱼精蛋白是存在于鱼类成熟精巢组织中的一类碱性蛋白, Miller等^[1]研究表明鱼精蛋白能有效抑制多种食品腐败菌的生长和繁殖, 对水产品、畜肉制品、蔬菜等食品有防腐效果, 因此可作为食品保鲜剂加以利用。随着生活水平的提高, 人们的保健意识不断增强, 对诸如防腐剂之类的食品添加剂, 在安全性上提出了更高的要求, 并且越发关注纯天然物质的开发利用。以鱼类精巢组织为原料分离得到的鱼精蛋白, 作为食品的天然防腐剂, 在日本等国已成功用于食品的贮藏保鲜^[2]。

鱼类的精巢组织俗称鱼白, 约占鱼体重的7%, 由于它有独特的臭味, 以往总是作为废弃物处理。鱼精蛋白是一种与DNA结合存在于鱼类成熟精巢中的碱性蛋白, 分子量约为6000~10000, 其氨基酸组成中含有比较多的精氨酸^[3]。因其生化组成上的特点, 鱼精蛋白的抗菌作用早在1931年就有了相关报道^[4], 并于1942年由Miller等人研究了鱼精蛋白的抗菌性^[1]。从二十世纪八十年代后期开始, 鱼精蛋白因其良好的天然性和抗菌性受到广泛关注, 并作为化学防腐剂的替代品出现在食品添加剂行列。

本文以鲑鱼精巢组织为原料, 分离提取其中的鱼精蛋白, 测定其最低抑菌浓度(MIC), 同时将提取的鲑鱼鱼精蛋白添加到新鲜的鱼糜制品中, 研究食品中其它成分或外界因素对其防腐性能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

鲑鱼精巢组织: 中国水产舟山海洋渔业公司制品厂提供

鱼糜制品: 福建东山水产供销公司加工厂提供。

供试菌种: 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*), 大肠杆菌(*Escherichia coli*)。

高速冷冻离心机(SORVALL RC-5C PLUS); 冻干机(CHRIST); 匀浆机(IKA-T18); 净化工作台(SW-CJ-1F); 电热恒温培养箱。

1.2 实验方法

1.2.1 鲑鱼鱼精蛋白的提取工艺

鲑鱼鱼精蛋白的提取主要参考吴燕燕等^[5]的方法, 并略加改进。精巢组织解冻后用生理盐水洗涤去除附着在其表面的结缔组织、血块等污物, 称量后剪成约5mm×5mm大小的碎块, 加入3倍体积的蒸馏水匀浆, 匀浆速率为10000r/min; 时间控制在2~5min。在均匀分散的白色糊状匀浆液中加入20%冰醋酸, 调pH4~5。

然后于冰箱中静置过夜, 离心分离, 倾出上清液。在沉淀物中加入3倍体积的5%硫酸溶液, 抽提2h, 离心分离, 收集上清液, 沉淀部分再用5%硫酸抽提并离心, 重复一次, 合并上清液, 于3倍体积的95%乙醇溶液中静置2h, 离心分离得膏状沉淀。将沉淀溶解在热水中, 并于60℃恒温水浴1h, 随后真空过滤。滤液用3倍体积的95%乙醇沉淀, 静置2h后离心分离, 沉淀物经冷冻干燥得鱼精蛋白粗品。

1.2.2 鲑鱼鱼精蛋白对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌最低抑菌浓度(MIC)的测定

1.2.2.1 菌悬液的配制和接种

将菌种接种于斜面恒温扩大培养24h。增菌培养后用灭菌的生理盐水倍比稀释, 配成 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 五个稀释度的菌悬液。

1.2.2.2 鲑鱼鱼精蛋白浓度的配制

准确称量鲑鱼鱼精蛋白, 用无菌水倍比稀释定容配制成 10000×10^{-6} 、 8000×10^{-6} 、 5000×10^{-6} 、 2500×10^{-6} 、 1250×10^{-6} 、 750×10^{-6} 系列的浓度。

1.2.2.3 实验操作

将大肠杆菌、金黄色葡萄球菌按1.2.2.1配制成菌悬液, 以 10^{-5} 稀释度的菌液进行操作。

试验组 菌液0.5ml + 鱼精蛋白1.0ml + 培养基8.5ml, 注入培养皿, 摇匀, 制成平板。

对照组 菌液0.5ml + 生理盐水1.0ml + 培养基8.5ml, 注入培养皿, 摇匀, 制成平板。

制成平板后, 于37℃培养48h, 观察菌落生长情况, 测定鲑鱼鱼精蛋白对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的MIC值。

1.2.3 鲑鱼鱼精蛋白抑菌作用的应用研究

1.2.3.1 鲑鱼鱼精蛋白的添加量与鱼糜保藏期的关系

试验组 (1)鱼糜 + 0.25%鱼精蛋白 (2)鱼糜 + 0.50%鱼精蛋白。

对照组: 鱼糜 + 等量无菌水。

将制备的样品置于5℃冰箱中保存。

1.2.3.2 pH值对鲑鱼鱼精蛋白抑菌性的影响

实验组: 鱼糜 + 0.25%鱼精蛋白 + 磷酸盐缓冲液(pH7.5);

对照组: 鱼糜 + 0.25%鱼精蛋白 + 等量无菌水。

将制备的样品置于5℃冰箱中保存。

1.2.3.3 无机成分对鲑鱼鱼精蛋白抑菌性的影响

试验组1: 鱼糜 + 0.50%鱼精蛋白 + 2.5%氯化钠。

对照组: 鱼糜 + 0.50% 鱼精蛋白 + 等量无菌水。
将制备的样品置于 5℃ 冰箱中保存。

1.2.3.4 有机成分对鲑鱼鱼精蛋白抑菌性的影响

试验组 2: 鱼糜 + 0.50% 鱼精蛋白 + 5.0% 可溶性淀粉。

对照组: 鱼糜 + 0.50% 鱼精蛋白 + 等量无菌水。
将制备的样品置于 5℃ 的冰箱中保存。

1.2.3.5 与其他物质复配对鱼精蛋白抑菌性的影响

试验组 3: 鱼糜 + 0.50% 鱼精蛋白 + 0.4% 甘氨酸 + 0.8% 醋酸钠。

对照组: 鱼糜 + 0.50% 鱼精蛋白 + 等量无菌水。
将制备的样品, 置于 5℃ 冰箱中保存。

定期对上述样品进行感官检测及 TVBN 和菌落总数的测定。

1.2.4 保存效果检测

1.2.4.1 感官检测 主要观察保存后鱼糜制品的表观变化, 如气味、颜色、霉变等。

1.2.4.2 挥发性盐基氮 TVBN 值 按 GB5009.44-1996 中蒸馏法测定。

1.2.4.3 细菌菌落总数的测定 按 GB4789.2-1984 方法测定。

2 结果与讨论

2.1 最低抑菌浓度的确定

提取的鲑鱼鱼精蛋白对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌结果如表 1 所示。金黄色葡萄球菌的 MIC 为 1600×10^{-6} , 大肠杆菌的 MIC 是 5000×10^{-6} 。金黄色葡萄球菌属革兰氏阳性菌, 大肠杆菌属革兰氏阴性菌。MIC 越低, 表示鱼精蛋白对该菌的抗菌力越强。由表 1 结果可知, 金黄色葡萄球菌比大肠杆菌对鱼精蛋白更敏感, 这与钟立人等^[6]的研究结果相同。鱼精蛋白的抑菌机理被认为是鱼精蛋白会和细胞壁上带负电的胞壁酸或是与细胞膜上带负电的磷脂产生静电作用, 这种作用的结果破坏了细胞壁或细胞膜的通透性, 从而抑制了细菌的生长^[2]。

2.2 鱼精蛋白的添加量与鱼糜保存期的关系

表 2 的测定结果说明, 鱼精蛋白可抑制环境中常见腐败菌的繁殖。综合 TVBN 和细菌菌落总数的测定结果可知, 未加鱼精蛋白的鱼糜制品在 5℃ 条件下保质期仅有 2~3d, 而在样品中加入鱼精蛋白后可使其保质期延长。在样品中加入 0.5% 的鱼精蛋白, 其保质期可延长到 6d, 鱼精蛋白加入量为 0.25% 的鱼糜制品中因浓度低故效果稍差。

2.3 pH 环境对鱼精蛋白抑菌活性的影响

实验结果见表 3。结果表明, 鱼精蛋白在碱性环境

表 1 鲑鱼鱼精蛋白对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度

Table 1 MIC of protamine on *E.coli* and *S.aures*

试验菌	鱼精蛋白浓度 ($\times 10^{-6}$)							
	5200	5000	4800	4600	4400	4200	4000	空白
大肠杆菌	-	-	+	+	+	+	+	+
	2000	1800	1600	1400	1200	1000	800	空白
金黄色葡萄球菌	-	-	-	+	+	+	+	+

注: 表中“-”表示培养基中无菌落生长; “+”表示培养基中有菌落生长。

表 2 鲑鱼鱼精蛋白的添加量与鱼糜保存期的关系

Table 2 Relationship between the added amount with protamine and storage time of ground flesh of fish

测定项目	0d	2d	4d	6d	7d
感官检测	空白	+	+++		
	0.25%	-	++	+++	
	0.5%	-	-	+	++
TVBN(mg/100g)	空白	20.19	47.59		
	0.25%	5.19	13.55	60.56	
	0.5%		7.79	22.21	36.63
细菌菌落总数 (个/g)	空白	8.7×10^4	2.8×10^7		
	0.25%	6.2×10^3	2.3×10^4	8.0×10^7	
	0.5%		8.7×10^3	2.2×10^5	1.4×10^6

注: 感官检测 “-”表示外观无变化; “+”表示有轻微腐败气味, 色泽暗淡; “++”表示有较强腐败气味, 色泽明显灰暗, 有霉点; “+++”表示有强烈腐败气味, 色泽微黄, 大量霉点。

表3 pH值对鱼精蛋白抑菌性的影响

Table 3 The effects of pH value on squid protamine's antibacterial activity

测定项目		0d	2d	4d	6d	7d
感官检测	对照组	—	—	++	+++	
	实验组		—	+	++	+++
TVBN (mg/100g)	对照组	5.19	13.55	31.72	60.56	
	实验组		12.40	21.19	43.84	62.58
细菌菌落总数 (个/g)	对照组		2.3×10^4	7.8×10^6	8.0×10^7	
	实验组	6.2×10^3	1.5×10^4	8.6×10^4	2.6×10^7	8.2×10^7

表4 食品中其它成分对鱼精蛋白抑菌性的影响

Table 4 The effects of different components on squid protamine's antibacterial activity

测定项目		0d	2d	4d
感官检测	对照组		—	+
	实验组 1	—	—	+
	实验组 2		—	+
	实验组 3		—	—
TVBN (mg/100g)	对照组		10.96	16.73
	实验组 1	5.77	12.98	19.61
	实验组 2		11.54	17.30
	实验组 3		8.36	14.13
细菌菌落总数 (个/g)	对照组		1.0×10^4	4.0×10^4
	实验组 1	7.6×10^3	1.5×10^4	6.9×10^4
	实验组 2		1.1×10^4	4.2×10^4
	实验组 3		8.9×10^3	1.7×10^4

附表：国标规定检测鱼肉新鲜度的标准

新鲜度	TVBN(mg/100g)	细菌菌落总数(个/g)
新鲜	≤ 15	$\leq 10^4$
次新鲜	≤ 25	$\leq 10^6$
腐败	>25	$>10^6$

中,更能发挥其抑菌性能。就这一点而言,鱼精蛋白作为食品防腐剂具有较大的优势。目前应用广泛的防腐剂如苯甲酸钠、山梨酸钾等属酸型防腐剂,在pH6以下时防腐效果较好,而要在中性乃至碱性食品中使用,则不能达到满意的抑菌效果。有时为了抑制微生物生长,常采用添加酸的办法来降低食品的pH值。然而这样做对食品的风味、保水性、弹性等天然品质会带来不良影响。鱼精蛋白的开发使用,可以拓宽防腐剂使用的pH范围,同时若与酸型防腐剂合用还能使两者的抑菌性产生协同作用^[7]。有些企业在加工鱼糜制品时,会添加适量的磷酸盐,不但提高了产品的弹性,而且使鱼糜呈微碱性,也提高了鱼精蛋白的抑菌效果。

2.4 食品中其它成分对鱼精蛋白抑菌性的影响

鱼精蛋白的抑菌作用除了与它的浓度、作用环境的

pH值有关外,添加到食品中的其它成分如无机盐、淀粉等对其可能产生的影响本文做了相应的研究。表4的测定结果表明,鱼精蛋白的抑菌活性由于无机盐的存在而下降。根据资料显示,同等浓度条件下,二价盐的影响要大于一价盐^[6]。这一结果提示,鱼精蛋白作为防腐剂在含盐量较高的食品如腌制食品和钙镁强化食品中使用,应考虑其抗菌活性下降的问题。

本文检测了有机成分淀粉对鱼精蛋白抑菌活性的影响。测定结果表明,淀粉对鱼精蛋白抑菌作用的影响较小,钟立人等^[6]的研究结果也表明蛋白质、脂肪对鱼精蛋白的抑菌效果影响也很小,这使鱼精蛋白在富含糖类和蛋白质类的食品中作为防腐剂使用成为可能。

表4的测定结果也表明,甘氨酸和醋酸钠以一定的比例与鱼精蛋白复合使用,具有增强抑菌效果的作用。甘氨酸和醋酸钠的安全性能都比较理想,复配使用能够节约鱼精蛋白的用量,所以复配使用具有良好的应用价值。

实验采用的是实验室制备的鱿鱼鱼精蛋白粗制品,未对粗品进行纯化等后续处理。若使用市售的鱼精蛋白纯品进行食品应用研究,其抑菌效果将会有所提高。

3 结 论

鱼精蛋白在中性和碱性介质中有良好的抑菌活性,可与酸性防腐剂协同作用,金属离子对其抑菌效果有负面影响,食品中的有机成分对其抑菌效果的影响不大,因此鱼精蛋白在食品工业中作为一种天然食品防腐剂具有极大地开发应用价值。

参考文献:

- [1] Miller B, Abrams R, Dorfman A, et al. Antibacterial properties of protamine and histone[J]. Science, 1942, 96: 428-430.
- [2] Uyttendaele M, Debevere J. Evaluation of the antimicrobial activity of protamine[J]. Food Microbiology, 1994, 11: 417-427.
- [3] 毋瑾超, 钟立人. 鱿鱼鱼精蛋白的提取研究[J]. 黑龙江商学院学报(自然科学版), 1998, 14(4): 20-26.

荞麦 α - 淀粉酶抑制剂的初步研究

王转花¹, 张 政¹, Ivan Kreft²

(1. 山西大学生物技术研究所, 太原 030006; 2. 斯洛文尼亚卢布尔亚那大学, Slovenia)

摘 要: 收集了我国荞麦主要产地和部分国外的甜荞和苦荞样品, 研究荞麦粉中 α - 淀粉酶抑制剂的活性和热稳定性。结果显示, 苦荞粉中 α - 淀粉酶抑制剂平均活性 ($44.8 \pm 3.2 \text{ U/g}$) 高于甜荞粉 ($37.8 \pm 2.4 \text{ U/g}$), 品种内的 α - 淀粉酶抑制剂活性无明显的地区间差异。抑制剂具有高的热不稳定性, 在 100°C 处理 20min 即完全失活, 荞麦种子萌发过程中 α - 淀粉酶抑制剂活性逐渐丧失。研究表明, 荞麦食品中的 α - 淀粉酶抑制剂无内源性抗营养作用。

关键词: 荞麦粉; α - 淀粉酶抑制剂; 热稳定性; 抗营养作用

Inhibitory Activity of α -amylase Inhibitor from Buckwheat Flour

WANG Zhuan-hua¹, ZHANG Zheng¹, Kreft Ivan²

(1. Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, P.O. Box 2995, SI-1001, Slovenia)

Abstract: 26 samples of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) and tartary buckwheat (*Fagopyrum tartaricum*) collected from Chinese main producing areas and others countries were used to study the inhibitory activity and thermostability of α -amylase-inhibitor in buckwheat flour. The results showed that tartary buckwheat flour had an average higher inhibitory activity ($44.8 \pm 3.2 \text{ U/g}$) than common buckwheat flour ($37.8 \pm 2.4 \text{ U/g}$). No significant regional differences were detected among the same species in the level of inhibitory activity. It was also demonstrated that the inhibitor was unthermostable. When it was heated at 80°C , 90°C and 100°C for different time respectively, a fat lot or no inhibitory activity was displayed. During buckwheat seeds germination, the inhibitory activity was gradually lost. The study suggested that α -amylase-inhibitor in buckwheat flour might be not act as an antinutritional factor.

Key words: buckwheat; α -amylase-inhibitor; thermostability; germination

中图分类号 S517

文献标识码 B

文章编号 1002-6630(2004)10-0084-04

荞麦是营养丰富的粮食作物, 是我国和亚洲国家一些地区重要的食品来源。荞麦中的蛋白质有很高的生物学价值, 氨基酸组成平衡并含有赖氨酸和异亮氨酸等必需氨基酸^[1]。荞麦中含有芦丁等多种生物类黄酮, 对于防治某些心血管疾病, 糖尿病和提高肌体免疫力有一定

作用^[2]。近年来, 国内外对荞麦粉的理化性质, 荞麦保健品制作工艺的研究愈来愈重视^[3], 对其内源性抗营养因子如蛋白酶抑制剂^[4], 多酚类抑制剂^[5]等也进行了研究, 但有关荞麦粉 α - 淀粉酶抑制剂研究尚未见文献报道。我们对选自国内外的 26 种荞麦粉 α - 淀粉酶抑制剂活性及抗营养作用进行了研究, 为荞麦食品的开发利用提供科学依据。

收稿日期: 2004-07-15

基金项目: 山西省自然科学基金项目(20030063)

作者简介: 王转花(1956-), 女, 教授, 主要从事生物活性物质及其分子生物学研究。

1 材料与方法

[4] 杜荣茂, 付红霞, 应铁进. 鱼精蛋白——一种新型的食品防腐剂[J]. 中国食品添加剂, 2002, (5): 36-40.

[5] 吴燕燕, 李来好, 杨贤庆, 等. 核蛋白和鱼精蛋白提取工艺的研究[J]. 食品科学, 1999, (7): 30-33.

[6] 钟立人, 毋瑾超, 王南舟. 理化因素对鲑鱼鱼精蛋白抑菌性的影响[J]. 上海水产大学学报, 1999, 8(1): 63-67.

[7] 许志刚, 康志明. 山梨酸与鱼精蛋白的抗菌特性[J]. 肉类工业, 2002, (2): 42-44.