

理化因素对鱿鱼鱼精蛋白抑菌性的影响

钟立人 毋瑾超 王南舟

(杭州商学院食品科学与工程系, 310035)

摘 要 选用鱿鱼精巢组织为原原料,经水解、抽提、沉淀等一系列方法得到鱿鱼鱼精蛋白样品。后经葡聚糖凝胶对其进行过滤层析,可得纯度较高的鱿鱼鱼精蛋白。最后对照讨论了各种理化因素如温度、盐离子浓度、酸度、有机成份等对鱿鱼鱼精蛋白抑菌性的影响,同时测定了其在不同影响因素下的最低抑菌浓度。

关键词 鱿鱼,鱼精蛋白,最低抑菌浓度,抗菌性

中图分类号 S985.9

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。由于其生化组成的特点,鱼精蛋白不仅具有促使细胞发育繁殖的作用,而且一旦被分离出来,它能有效抑制多种食品腐败菌的生长、繁殖[Miller 1942]。同时,鱼精蛋白还有降血压、助呼吸、促消化、抗菌消毒、抑制肿瘤的生长等多种作用[Sharifa等 1993]。本研究以鱿鱼作为原材料,采用不同于国内外报导的方法[Uyttendaele和Debevere 1994,张文重 1992,高桂庭 1995],提取得到鱿鱼鱼精蛋白样品。并以葡聚糖凝胶过滤层析进行纯化,然后对照讨论了各种理化因素如温度、盐离子浓度、酸度、有机成份等对鱿鱼鱼精蛋白抑菌性的影响,同时测定了在不同影响因素下的最低抑菌浓度(MIC)。

1 材料和方法

1.1 实验材料和主要仪器

1.1.1 原材料和主要仪器

鱿鱼精巢(取自成熟鱿鱼,性期IV,中外合资舟山兴业有限公司鱿鱼加工厂提供);组织捣碎机(DS-1,上海标本模型厂);高速冷冻离心机(GL-21,湖南仪器仪表总厂离心机厂);721型分光光度计(上海第三分析仪器厂);透析袋(上海生物化学试剂公司);核酸蛋白检测仪(MP-92,中科院上海生化研究所);自动部分收集器(BS-100A,上海沪西分析仪器厂);层析柱1.8cm×16cm, YXQG01.280型手提式高压蒸汽灭菌锅(上海医用仪器厂);SC.303型电热恒温培养箱(浙江省嘉兴县新睦电热仪器厂);HY31-04型电热恒温水浴锅(绍兴沙桥医疗器械厂)。

1.1.2 试验菌种、培养基和缓冲液

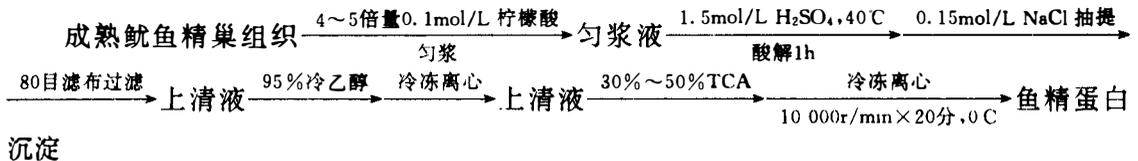
大肠杆菌、枯草杆菌、绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、蜡样芽胞杆菌、青霉、曲霉、毛

霉、啤酒酵母、异常汉逊酵母。以上菌种分别由杭州商学院食品科学与工程系微生物教研室,浙江大学食品科技系微生物教研室,浙江省卫生防疫站提供。

培养细菌用营养肉汤培养基;培养霉菌用蔡氏培养基;培养真菌用马铃薯葡萄糖培养基(PDA)[甄宏大和俞平 1986]。

乙酸-乙酸钠缓冲液 0.2mol/L pH4.0, 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液 0.2mol/L pH 6.0~8.0, 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液 0.1mol/L pH 9.0。

1.2 鲑鱼鱼精蛋白的提取工艺



经以上提取方法得到的鱼精蛋白样品经葡聚糖凝胶柱层析加以纯化,取其第二峰,经聚丙烯酰胺等电聚焦电泳鉴定为纯净的鱼精蛋白。

1.3 种菌液的配制和接种

菌种经钓菌接种于斜面恒温扩大培养24h后,钓菌加于10mL灭菌生理盐水倍比稀释,配成 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 四个稀释度的种菌液。用无菌吸管吸取 10^{-4} 种菌液1mL加于无菌平皿中,于46℃加入各自培养基,冷却凝固,37℃恒温倒置24h培养,计算菌落总数。

鲑鱼鱼精蛋白浓度的配制:准确称量鲑鱼鱼精蛋白,并用无菌水配制成10g/L的浓度,然后倍比稀释成 10×10^{-3} , 5×10^{-3} , 2.5×10^{-3} , 1.25×10^{-3} , 0.75×10^{-3} 系列的浓度。

1.4 鲑鱼鱼精蛋白对各种腐败微生物最低抑菌浓度(MIC)的测定

根据食品微生物污染的特点,选若干代表性的食品污染菌、霉菌、酵母按1.3配制各种菌液,接种培养,观察不同浓度鱼精蛋白对其发育的抑制情况。鲑鱼鱼精蛋白液浓度为 10×10^{-3} , 5×10^{-3} , 2.5×10^{-3} , 1.25×10^{-3} , 0.75×10^{-3} 。

操作方法为以菌液0.5mL,鱼精蛋白液1.0mL,培养基8.5mL,分别加入培养皿,摇匀,制成平板。

对照组以菌液0.5mL,生理盐水1.0mL,培养基8.5mL分别加入培养皿,摇匀,制成平板,进行培养。细菌37℃,48h培养;霉菌30℃,4d培养;酵母30℃,24h培养。

对以上各组进行恒温培养,观测菌落生长情况,推测鲑鱼鱼精蛋白对各种微生物的MIC值[黄荣敏 1989]。

1.5 pH值对鲑鱼鱼精蛋白抑菌作用的影响

选择pH 5~10范围,观察pH对鲑鱼鱼精蛋白抑菌性的影响,以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌为试验菌,配制种菌液分别接种,用缓冲液调节不同pH值,测定鱼精蛋白在不同pH条件下对上述两种菌的MIC。

1.6 温度对鲑鱼鱼精蛋白抑菌作用的影响

温度设置:鲑鱼鱼精蛋白先通过不同温度加热半小时,温度为常温、40℃、60℃、80℃、

100℃、121℃。

试验菌：枯草杆菌和金黄色葡萄球菌，初始浓度为 $(1.0\sim 2.8\times 10^{-6})\text{cells/mL}$ 。

溶液配制及测定：在试管中分别加入0.5mL的 10^{-4} 稀释度种菌液和1mL鱼精蛋白，再加入8.5mL的营养肉汤24h培养，在610nm下测定其OD值，用OD值作为指标，若OD值变化较大，表示该温度对应的细菌生长情况变化越大[松田敏生 1993]。

1.7 无机成份对鱿鱼鱼精蛋白抑菌效果的影响

盐类：NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂，0.01、0.1、0.2、0.3、0.6mol/L。

试验菌：选用金黄色葡萄球菌，菌液初始浓度为 $1.0\sim 2.8\times 10^{-6}\text{cell/mL}$ 。

溶液配制及测定：配制鱿鱼鱼精蛋白溶液浓度为 2.5×10^{-4} 。在试管中分别加入0.5mL菌液和1mL鱼精蛋白液，再加入8.5mL含有各种盐的不同离子浓度的营养肉汤培养基，以肉汤中加入生理盐水为空白，24h培养后在610nm下测定其OD值，判断不同金属离子对鱼精蛋白抑菌性的影响。

1.8 有机成份对鱿鱼鱼精蛋白抑菌性的影响

有机成份及其浓度的配制：葡萄糖0.1mol/L，蛋白胨1.0%，肉汁0.5%。

试验菌种：金黄色葡萄球菌，初始浓度为 $1.0\sim 2.8\times 10^{-6}\text{cells/mL}$ 。

溶液配制及测定：方法同本文材料和方法的1.7。

2 结果分析

2.1 鱼精蛋白对各代表性食品污染菌、霉菌、酵母等抑菌试验结果

鱼精蛋白对各代表性食品污染菌，霉菌，酵母等抑菌试验的结果(表1)。由表1结果可知鱿鱼鱼精蛋白对革兰氏阳性菌作用较强，MIC均小于 5×10^{-4} ，对阴性菌作用较弱，这与国外在此方面的有关研究结果相同，据报道这是由于细菌细胞膜结构不同所致[Antohi 和 Pescu 1979]。

表1 鱿鱼鱼精蛋白对各代表性食品污染菌、霉菌、酵母等的最低抑菌浓度
Tab. 1 MIC of Squid protamine on food-spoiling bacteria, molds and yeasts

试验菌	浓度($\times 10^{-4}$)					空白
	10	5	2.5	1.25	0.75	
大肠杆菌	—	+	+	+	+	+
沙门氏菌	—	—	+	+	+	+
绿脓杆菌	—	—	+	+	+	+
枯草杆菌	—	—	+	+	+	+
蜡样芽胞杆菌	—	—	+	+	+	+
金黄色葡萄球菌	—	—	+	+	+	+
青霉	—	—	+	+	+	+
毛霉	—	—	+	+	+	+
曲霉	—	—	+	+	+	+
啤酒酵母	—	—	+	+	+	+
异常汉逊酵母	—	—	+	+	+	+

注：表中“—”表示无菌落出现，“+”表示已有菌落出现。以下同。

2.2 pH 对鱼精蛋白抑菌作用的影响

pH 对鱼精蛋白抑菌作用的影响结果(表2)。由表2可知,鱿鱼鱼精蛋白在 pH6.0 以上时具有明显的抑菌活性,因此鱼精蛋白适用于 pH6.0 至偏碱性食品的防腐保存,当 pH5.0 和 pH10.0 时空白组细菌不生长,是由于酸碱性原因所致。

2.3 温度对鱼精蛋白抑菌效果的影响

温度对鱼精蛋白抑菌效果的影响结果(图1)。由图1可知,在经过高温加热30分钟的鱿鱼鱼精蛋白其抑菌性虽有所下降,但即使在121℃条件下处理后与常温时相比,并无显著差异,因此鱿鱼鱼精蛋白在热加工食品中应用也不会损失其活性。

2.4 无机离子对鱿鱼鱼精蛋白抑菌性的影响

无机离子对鱿鱼鱼精蛋白抑菌性的影响结果(图2)。由图2可知,无机盐离子对鱿鱼鱼精蛋白抑菌性的影响趋势为随着各种盐离子浓度的增大,鱿鱼鱼精蛋白的抑菌性相应降低,在同等浓度条件下,二价金属离子比一价金属离子的影响更明显,因此在盐离子含量高的食品中特别是某些钙镁强化食品,在其中使用鱿鱼鱼精蛋白抑菌时,就必须特别注意。

表2 不同 pH 值,鱿鱼鱼精蛋白对金黄色葡萄球菌抑菌性结果

Tab.2 The antimicrobial activity of squid protamine on *Staphylococcus aureus* at different pH values

pH	浓度($\times 10^{-4}$)					空白
	10	5	2.5	1.25	0.75	
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	+	+	+	+
7	-	-	+	+	+	+
8	-	-	+	+	+	+
9	-	-	-	+	+	+
10	-	-	-	-	-	-

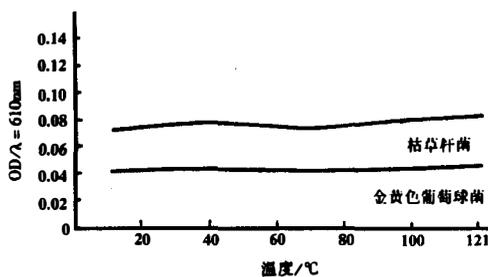


图1 不同温度处理对鱿鱼鱼精蛋白抑菌性影响

Fig.1 The antimicrobial activity of squid protamine on two kind of bacteria at different temperatures

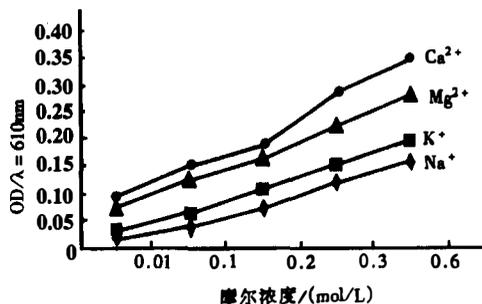


图2 不同浓度金属离子对鱿鱼鱼精蛋白抑菌性影响

Fig.2 The antimicrobial activity of squid protamine on *Staphylococcus aureus* at different metal ions concentrations

2.5 有机成份对鱿鱼鱼精蛋白抑菌性影响

有机成份对鱿鱼鱼精蛋白抑菌性影响结果(表3)。由表3可知,有机成份对鱿鱼鱼精蛋白抑菌性几乎无影响,但在脂肪含量较高的情况下,则抑菌力稍弱。

表3 有机成份对鱿鱼精蛋白抑菌性影响结果

Tab. 3 The effects of organic components on squid protamine's antimicrobial activity with *Staphylococcus aureus* as test bacteria

成份	葡萄糖(0.1mol/L)	蛋白胨(0.1%)	肉汁(0.5%)	空白
OD	0.015	0.017	0.020	0.015

3 结论

由上述试验可知,鱿鱼精蛋白对革兰氏阳性菌抑菌效果较好,而对阴性菌较差。鱿鱼精蛋白在偏碱性时抑菌效果好,并随 pH 值下降抑菌性减弱,且在一定温度范围,加热对鱿鱼精蛋白抑菌性无明显影响,无机离子对鱿鱼精蛋白抑菌性影响显著,且二价金属离子的影响大于一价金属离子。

参 考 文 献

- 张文重. 1992. 乌鱼精蛋白之萃取与利用. 养鱼世界(台刊), (2), 31~34
- 高桂庭. 1995. 鱼精蛋白的提取工艺与防腐特性. 水产科技情报, 22(3)119~120
- 黄荣敏(译). 1989. 鱼精蛋白的抗菌性与食品保存. 食品科学, 89(9). 87~93
- 甄宏大, 俞平(译). 1986. 细菌学分析手册. 北京: 轻工业出版社. 252~256
- 松田敏生. 1993. 天然抗菌成份鱼精蛋白. 食品工业(日), 33(9). 36~46
- Antohi S, Pescu P A. 1979. Protamine and polyarginine bacteriolysis similarities in its mechanism with chroinetim DNA Picnosis. Zeti Naturforsch, 34C, 1140~1150
- Miller B F. 1942. Antibacterial properties of protamine and histone. Science, 96, 428~430
- Sharifa K, Flushing N Y, John K, et al. 1993. Process for the preparation of a high purity protamine-DNA complex and process for use of same. United States. Patent Number, 5 187 260
- Uyttendaele M, Debevere J. 1994. Evaluation of the antimicrobial activity of protamine. Food Microbiology, 11, 417~427

EFFECT OF PHYSICAL AND CHEMICAL FACTORS ON ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SQUID PROTAMINE

ZHONG Li-Ren, WU Jin-Chao, WANG Nan-Zhou

(Department of Food Science and Engineering, Hangzhou Institute of Commerce, 310035)

ABSTRACT Based on abundant resources of squid as crude material, spermatozoa of adult squid were used selectively. After a serial processes of extraction, hydrolyzation and precipitation, crude product of protamine was yielded. The crude protamine was then purified by column chromatograph packed with Sephadex G-25. In this paper such physical and chemical factors as temperature, pH, salt concentration, organic substances, etc that affect antimicrobial activity of protamine were studied. Also, the minimum inhibition concentration of protamine was measured under various conditions.

KEYWORDS squid, protamine, minimum inhibition concentration, antimicrobial activity