

文章编号:1000 - 0615(2001)02 - 0171 - 05

鱼精蛋白的抑菌机理

钟立人, 吕民主, 张合文, 陈荷凤

(杭州商学院食品、生物和环境工程系, 浙江 杭州 310035)

摘要:鱼精蛋白对细菌呼吸系统能产生微弱的抑制作用,但这并不是其抑菌活性的主要途径;鱼精蛋白主要是以分子中多聚精氨酸或多聚精氨酸与其它少数几个氨基酸以某一种结构或形式和细菌细胞壁结合,破坏细胞壁的形成,从而达到其抑菌效果。

关键词:鱼精蛋白;多聚精氨酸序列;抑菌机理

中图分类号:Q512+.8 **文献标识码:**A

Antimicrobial mechanism of protamine

ZHONG Li-ren, LV Min-zhu, ZHANG He-wen, CHEN He-feng

(College of Food Science, Biotechnology and Environmental Engineering, Hangzhou University of Commerce, Hangzhou 310035, China)

Abstract: Protamine may have a weak inhibitive action on the respiratory system of bacterium which is not the main function to inhibit the bacterium activity. The inhibitive activity of protamine on bacteria might be mainly due to polyarginine in protamine molecule or the combination of polyarginine and some amino acids with the cell wall of bacterium in certain form or structure to destruct the formation of cell wall.

Key words: protamine; polyarginine sequence; antimicrobial mechanism

鱼精蛋白是一种存在于鱼类、哺乳类等动物成熟精巢组织中的碱性蛋白质,分子量较小(约 4 000 - 10 000 道尔顿),其中三分之二以上的氨基酸组成是精氨酸。自从 1931 年 McClean 报道了鱼精蛋白具有抑菌活性以来^[1,2],国内外学者特别是日本学者对此作了大量的研究,鱼精蛋白作为一种天然食品防腐剂,已成功地应用于食品工业^[3,4]。总结这些研究发现,鱼精蛋白抑菌活性主要有以下几个特点:1. 鱼精蛋白对革兰氏阳性菌的抑菌效果明显,对革兰氏阴性菌的抑菌效果则较差;2. 鱼精蛋白在中性和碱性介质中有良好的抗菌活性;3. 热稳定性好,在一定温度范围内(常温 ~ 121 °C)加热对鱼精蛋白的抑菌活性无显著影响;4. Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 等高价金属离子对鱼精蛋白的抑菌活性有一定的影响,但一价金属离子及食品营养成分对其抗菌活性影响较小。但迄今为止,关于鱼精蛋白的抑菌机理的研究鲜见报道,而对于一种食品防腐剂而言,具有一个明确的抑菌机制对其应用的正确性是极其重要的。

1 实验材料和方法

1.1 实验材料和仪器

鲑鱼鱼精蛋白硫酸盐(sigma 试剂):市售。

收稿日期:2000-11-29

基金项目:浙江省科委资助项目(971101049)

第一作者:钟立人(1944-),男,浙江宁波人,教授,主要从事食品化学、添加剂的开发与研究。Tel:0571-8847724

实验菌种:大肠杆菌 (*Escherichia Coli*), 弱毒炭疽芽孢杆菌 (*B. Anthracis*)。

培养基:营养琼脂培养基供细菌固体培养用,营养肉汤培养基供细菌液体培养用。

主要仪器: YXQG01.280 型手提式高压蒸汽灭菌锅、S.C.303 型电热恒温培养箱、101-2 型干燥箱、电子天平 FA2004 型、YJ-875A 医用净化工作台、Olympus 显微镜、溶氧测定仪。

1.2 实验方法

1.2.1 鲑鱼鱼精蛋白对微生物的呼吸代谢的抑制作用的研究

大肠杆菌休止细胞的制备:(1)用固体或液体培养收获比较年青的细胞,制成菌细胞悬浊液。(2)将菌细胞悬浊液,以 $4000r \cdot \min^{-1}$ 离心 10min,在离心管中倾去上清液,保留沉淀细胞。(3)用适量的生理盐水洗涤细胞,作成均匀而分散的菌细胞悬浮液。(4)重复离心沉淀,洗涤 2~3 次。(5)最后用适量的生理盐水把细胞做成浓度约为 $1g \cdot (100mL)^{-1}$ 的悬浮液,即得休止细胞。

样品悬浮液中溶氧量的测定:在反应杯中加入 pH 7.2 浓度为 $0.1mol \cdot L^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液 1.5mL, 0.5mL 菌体悬浮液 [$1g \cdot (100mL)^{-1}$] 和 0.2mL 葡萄糖溶液 (1%), 露空搅拌 5min 后开始测定,抑制剂用微型注射器注入反应杯中,由于菌体悬浮液中溶氧量的变化可以求出菌体的呼吸速率。根据防腐剂加入前后菌体的呼吸速率,用下式求出抑制剂对菌体呼吸的抑制率:

$$I_R (\%) = \frac{R_o - R_i}{R_o} \times 100$$

其中 I_R 为抑制剂对菌体呼吸的抑制率 (%), R_o 、 R_i 分别为防腐剂加入前后菌体的呼吸速率。根据典型抑制剂加入前后菌体的呼吸速率,用下式求出典型抑制剂对防腐剂的叠加率:

$$R_R (\%) = \frac{R_i - R_i'}{R_i} \times 100$$

其中 R_R 为典型抑制剂对防腐剂的叠加率 (%), R_i 为加入防腐剂后菌体的呼吸速率 [$\mu mol \cdot O_2 \cdot (g \cdot \min)^{-1}$], R_i' 为加入典型抑制剂后菌体的呼吸速率。

使用的抑制微生物呼吸代谢途径的典型抑制剂是磷酸钠,碘乙酸和丙二酸,它们分别抑制微生物呼吸代谢途径的 HMP 途径、EMP 途径磷酸甘油醛脱氢酶和 TCA 循环中琥珀酸脱氢酶。

从计算得出的鲑鱼鱼精蛋白与三种典型抑制剂的叠加率,便可推断其作用部位。叠加率越大,典型呼吸抑制剂与防腐剂间增效作用越强,说明防腐剂与典型呼吸抑制剂抑制不同代谢途径的可能性越大。相反,则说明防腐剂与典型呼吸抑制剂抑制相同的呼吸代谢途径。

1.2.2 鱼精蛋白抑制细菌细胞壁生长实验

炭疽杆菌菌悬液的配制:用无菌接种环挑取经 16h~18h 培养的炭疽杆菌菌种于装有 10mL 无菌生理盐水的试管内混合均匀,经 McFarland 比浊管比浊,配制成浓度约为 3×10^8 个 $\cdot mL^{-1}$ 的菌悬液。

取 7 管装有灭菌营养肉汤培养基的试管,分别编号,然后接种炭疽杆菌菌悬液和添加一定量的鱼精蛋白。具体操作如下(单位:mL):

管号	1	2	3	4	5	6	7
营养肉汤培养基	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7
菌悬液 (3×10^8 个 $\cdot mL^{-1}$)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
鱼精蛋白溶液 ($5\ 000 \times 10^{-6}$)	0	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

然后 37℃ 恒温培养 2h 后,依 2,3,4,5,6,7,1 的顺序每隔半小时取出一管,取出后,立刻离心收集菌体,制成涂片,在显微镜下观察炭疽杆菌的形态及变化规律,并在 Olympus 显微镜下拍摄其图象(图版 - 2~6)。

1.2.3 L-精氨酸抑菌性能研究

L-精氨酸的梯度浓度溶液配制:配制成 $10\ 000 \times 10^{-6}$ 、 $8\ 000 \times 10^{-6}$ 、 $5\ 000 \times 10^{-6}$ 、 $2\ 500 \times 10^{-6}$ 、 $1\ 250 \times 10^{-6}$ 的梯度浓度溶液。

大肠杆菌菌悬液的配制:用无菌接种环挑取经 24h 培养的大肠杆菌菌种于装有无菌生理盐水的试管内混合均匀,用 McFarland 比浊管配制成浓度约为 (3.0×10^6) 个 mL^{-1} 的菌悬液。

实验操作方法:实验组:菌液 0.5mL + L-Arg 1.0mL + 液体培养基 3.5mL

对照组:菌液 0.5mL + 鱼精蛋白 1.0mL + 液体培养基 3.5mL

空白:菌液 0.5mL + 生理盐水 1.0mL + 液体培养基 3.5mL

37 恒温培养 24h,观察细菌生长情况。结果见表 1。

2 结果与讨论

2.1 鲑鱼鱼精蛋白对微生物的呼吸代谢的抑制作用的研究

纵观国内外学者对各种抑菌剂抑菌作用的研究报告,可以看出各抑菌剂的作用途径主要有两个:1. 作用于细胞壁和细胞膜系统;2. 作用于细菌细胞内的酶系或结构。陈亚非、宁正祥和王海洪^[5-7]等对食品防腐剂的抗菌机理及构效关系进行了探讨,他们在研究中发现食品生产中使用的防腐剂主要是通过渗透作用进入菌体细胞内,抑制微生物的呼吸作用,导致能量物质 ATP 和还原辅酶 亏缺,所有的合成代谢受阻,活性动态膜结构不能维持,代谢方向趋于水解,最后产生细胞自溶,不同防腐剂的抗菌力的差异则可能与作用的呼吸途径及抑菌强度有关。

从表 1 知道,鱼精蛋白对大肠杆菌的呼吸代谢也产生了影响,但作用微弱,呼吸抑制率仅为 6.7%,远小于实验中的三种典型呼吸抑制剂的作用。鱼精蛋白与丙二酸、碘乙酸、磷酸钠的叠加率分别为 53.3%、52.6% 和 54.0%,三个数值较大,且极其接近。这说明鱼精蛋白可能与三种呼吸抑制剂的呼吸抑制途径均不相同,即它可能并不是由于抑制糖酵解、三羧酸循环及磷酸戊糖途径引起的。另外,鱼精蛋白具有较强的抑菌活性,这和表 1 中的鱼精蛋白低下的呼吸抑制率也是不相符的。

鱼精蛋白的分子量均在 1 万左右,较长的肽链一般是难以进入细菌细胞内的,更不用说抑制呼吸系统了。这一点与山梨酸钾等小分子量食品防腐剂是明显不同的。

综上所述,我们可以做出推断:鱼精蛋白虽然对细菌呼吸代谢产生微弱影响,但这并不是其抑菌的主要途径,它的作用部位可能是细菌细胞体外的某一结构或成分。

2.2 鱼精蛋白抑制细菌细胞壁生长实验

细菌细胞壁为细菌细胞最外一层坚韧并富有弹性的外被,主要成分为肽聚糖,它赋予细菌细胞以强度和形状,主要起着保护细胞形状的作用。细胞壁一旦被破坏,细菌形态也将随之发生变化。杆状细菌的形态一般为杆状,它们在细胞壁被破坏之后,会逐渐变成圆球状,对渗透压特别敏感,最后破裂而死亡^[8]。炭疽杆菌是革兰氏阳性菌,两端平截,单个存在时呈“砖块状”。在液体培养基中易形成长链,菌体相连处有清晰的空隙,故排列似“竹节状”。(图版 - 1)

在加入鱼精蛋白的炭疽杆菌培养液中,我们发现随着培养时间的延长炭疽杆菌的正常形态逐渐发生变异,具体的变异过程如下:

2 号管(培养 2h):细菌形态基本正常。

3 号管(培养 2.5h):细菌形态发生轻微的变化。有些炭疽杆菌开始变短,或成椭圆形(图版 - 2)。

4 号管(培养 3h):炭疽杆菌大多数变成圆球状,形似“串珠状”排列(图版 - 3)。

5 号管(培养 3.5h):炭疽杆菌的圆球形开始呈现不规则变化,链状开始断裂(图版 - 4)。

6 号管(培养 4h):大部分细菌呈极不规则形状(图版 - 5)。

7 号管(培养 4.5h):大部分炭疽杆菌菌体破裂,光学显微镜下仅能看到细胞破裂后的碎片

表 1 鱼精蛋白对大肠杆菌呼吸代谢的抑制率
Tab.1 Inhibition degree of protamine toward the respiratory system of Escherichia Coli

	抑制率(%)	叠加率(%)
鱼精蛋白	6.7	
丙二酸	31.8	53.3
碘乙酸	31.0	52.6
磷酸钠	32.1	54.0

(图版 - 6)。

1 号管(培养 5h):细菌形态完全正常。

炭疽杆菌经鱼精蛋白短时间的作用后,由平截的杆状逐渐转变成圆球状,这说明炭疽杆菌的细胞壁合成被鱼精蛋白所破坏或抑制,而成为细胞壁缺陷细菌。从图版 - 6 中可以看到,鱼精蛋白作用后的炭疽杆菌培养到 4.5h 大部分菌体均已破裂,也从而证明这些圆球状的菌体为原生质体,而不是球形体或细菌 L - 型。因为在这三种类型的细胞壁缺陷细菌中,原生质体对环境条件很敏感,而且特别脆弱,渗透压、振荡、离心以至通气等因素都易引起原生质体破裂;球形体对外界环境具一定抗性,并能在普通培养基上生长;细菌 L - 型细胞是呈多形态的^[8]。

2.3 L - 精氨酸抑菌性能研究

鱼精蛋白是一种小分子量的蛋白质,等电点在 10~12 之间,呈强碱性。通过分析迄今发现的各类鱼精蛋白的氨基酸序列,在组成鱼精蛋白的 30 多个氨基酸中,精氨酸一般占三分之二以上,其余为极少数的其他几种氨基酸,这构成了鱼精蛋白的一个最为鲜明的特点。这种情况在碱性蛋白质的氨基酸组成中是罕见的,鱼精蛋白良好的抑制细菌细胞壁合成的抑菌活性也可能与此有关。表 2 中的结果显示,鱼精蛋白在 500×10^{-6} 浓度条件下即可完全抑制大肠杆菌的生长,而 L - 精氨酸在 1000×10^{-6} 仍然达不到抑菌效果。这说明鱼精蛋白的精氨酸含量虽然很高,但其抑菌活性并不是由单个的 L - 精氨酸在起作用。

Yoshiko 研究了 12 种鱼类的鱼精蛋白的氨基酸序列,发现这些鱼精蛋白的氨基酸序列有许多相似性:1. N - 末端均是精氨酸或者是丙氨酸;2. 各种鱼精蛋白分子肽链中都含有 4 个较长的和 2 个短的精氨酸簇,并分别被特征性的残基 Ser 或 Thr, Pro - Ile, Gly - Gly 或 Val - Val 分隔开^[9]。他列举了各类鱼的鱼精蛋白的氨基酸序列,其中鲑鱼鱼精蛋白的氨基酸序列如下:

Pro - Arg - Arg - Arg - Arg - Ser - Ser - Ser - Arg - Pro - Val - Arg - Arg - Arg - Arg - Arg - Pro - Arg - Val - Ser - Arg - Arg - Arg - Arg - Arg - Arg - Gly - Gly - Arg - Arg - Arg - Arg

从这个氨基酸序列中我们可以看出 Yoshiko 所指出的两个特征,同时也看到 Arg 在鲑鱼鱼精蛋白的氨基酸组成中占有极大比重,另外仅出现 Ser, Pro, Gly 等少数几个氨基酸。所以,在实验证明单个精氨酸没有抑菌活性的情况下,我们认为是多聚精氨酸或多聚精氨酸与其它少数几个氨基酸以某一种结构或形式和细菌细胞壁结合,破坏细胞壁的合成,达到其抑菌效果。当然,这也仅为一种富有推测性的结论,还有待于进一步研究考证。

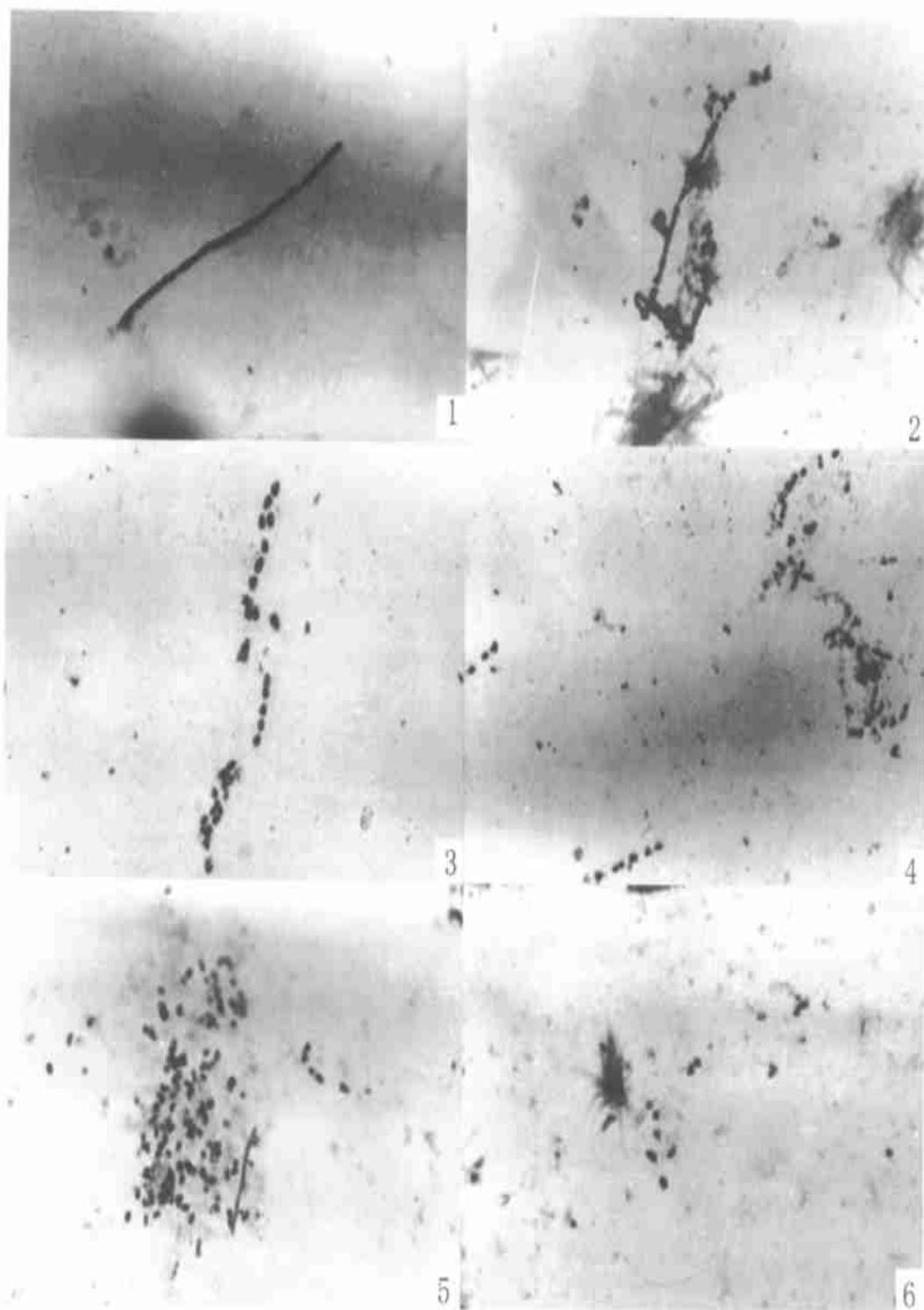
参考文献:

- [1] Vytendale M, Debevere J. Evaluation of the antimicrobial activity of protamine[J]. Food Microbiol, 1994, 11, 417 - 427.
- [2] Miller B, Abrams F. Antibacterial properties of protamine and histone[J]. Science, 1994, 96, 428 - 430.
- [3] Motohiro T. Protamine and emulsifiers as food preservatives. Jp. Kokai Tokkyo Koho, 2, 25, 96.
- [4] Akazawa, H, Yajima M. Food preservatives containing protamine mixture. Jp, Kokai Tkkyo Koho, 63, 17, 679.
- [5] 陈亚非, 宁正祥. - 溴代肉桂醛及烷烯基酯类对鲜草菇呼吸代谢的抑制[J]. 食品科学, 1994(9): 9 - 12.
- [6] 陈亚非, 宁正祥. - 溴代肉桂醛及烷烯基酯类对微生物的呼吸代谢的抑制[J]. 食品与发酵, 1994(3): 26 - 29.
- [7] 王海洪. 富马酸二甲酯对微生物生长和呼吸的抑制作用[J]. 食品与发酵工业, 1993(2): 1 - 6.
- [8] 复旦大学、武汉大学生物系微生物学教研室. 微生物学(第二版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1988. 25 - 27.
- [9] Yoshiko O. Primary structure of Scombriner protamine isolated from Spotted Mackerel[J]. J Biochem. 1993, 113, 658 - 664.

表 2 鱼精蛋白与 L - 精氨酸对大肠杆菌的生长抑制情况

Tab. 2 Growth inhibitory action of protamine and L-arginine toward Escherichia Col ($\times 10^{-6}$)					
L-arginine toward	Escherichia Col ($\times 10^{-6}$)				
浓度	1 000	800	500	250	125
鱼精蛋白	-	-	-	+	++
L - 精氨酸	+	++	++	++	++
空白	++	++	++	++	++

注:“-”表示无菌生长,“+”表示细菌轻微生长,“++”表示细菌生长良好。



1.炭疽杆菌正常形态； 2.培养2.5h时的炭疽杆菌形态； 3.培养3h的炭疽杆菌的形态； 4.培养3.5h的炭疽杆菌形态； 5.培养4h的炭疽杆菌的形态； 6.培养4.5h的炭疽杆菌的形态