

文章编号:1673-1689(2007)03-0001-05

高压脉冲电场对乳铁蛋白抑菌性能的影响

陈梅仙¹, 胡晓宇¹, 卢蓉蓉^{1,2}, 杨瑞金^{1,2}

(1. 江南大学食品学院, 江苏无锡, 214122; 2. 江南大学食品科学与安全教育部重点实验室, 江苏无锡, 214122)

摘要: 研究了高压脉冲电场(PEF)对乳铁蛋白(LF)的抑菌性能的影响。结果表明, LF 质量浓度、电场强度、脉冲频率、脉冲数的增加, 有利于 LF 抑菌能力的增强, 而温度的升高会使之减弱。电场强度为 35 kV/cm 时, LF 的抑菌能力达到最大值。LF 的质量浓度越高, 对电场强度的变化越敏感。当脉冲个数达到 744 时, LF 的相对抑菌能力提高了 34%。处理温度为 15~55 °C 时, PEF 处理的 LF 的相对抑菌性能增长了 5% 左右。当温度升高至 65 °C 时, LF 的相对抑菌能力下降显著, 降低了约 22%。

关键词: 高压脉冲电场; 乳铁蛋白; 抑菌性能; 大肠杆菌

中图分类号: TS 201.3

文献标识码: A

Effects of Pulsed Electric Fields on Antibacterial Activity of Lactoferrin

CHEN Mei-xian¹, HU Xiao-yu¹, LU Rong-rong^{1,2}, YANG Rui-jin^{1,2}

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key laboratory of Food Science and Safety; Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Effects of Pulsed Electric Fields (PEF) on antibacterial activity of lactoferrin (LF) were investigated in this paper. The results indicated that antibacterial activity increased with the increase of concentration of LF, electric field strength, pulse frequency and pulse amount, while decreased with the increase of treatment temperature. The highest antibacterial activity was attained at 35 kV/cm, and it became more sensitive to the change of electric field strength with the increase of concentration of LF. The antibacterial activity increased by 34% at 744 pulse amount. Compared with that of the control, the antibacterial activity of LF increased by 5% at 15 °C~55 °C, whereas it decreased significantly by 22% at 65 °C.

Key words: pulsed electric fields; lactoferrin; antibacterial activity; *Escherichia coli*

高压脉冲电场(Pulsed Electric Fields, 简称 PEF)作为一种新型的冷杀菌技术,是将食品置于带有两个电极的处理室,用高压电脉冲作用于处理室中的食品,从而杀灭微生物和钝化酶活性,使食品

得以长期贮藏^[1-2],是处于研究阶段的一种新型非热力杀菌技术,已引起一些发达国家研究人员的广泛关注^[2]。PEF 技术具有安全无害、传递均匀、处理时间短、能耗低、对产品的色、香、味和营养成分

收稿日期:2006-07-08.

基金项目:国家自然科学基金项目(20436020).

作者简介:陈梅仙(1982-),女,浙江衢州人,食品科学硕士研究生. Email:meixianchen1982@yahoo.com.cn

通讯作者:卢蓉蓉(1970-),女,江苏盐城人,副教授,工学博士,硕士,主要从事乳品科学研究. Email:lurr@sytu.edu.cn

没有破坏,能保持产品的新鲜度^[3]等特点。因此,PEF技术已经成为近20年来最有前途实现工业应用的非热灭菌技术。目前,国内外PEF技术的应用研究主要集中在微生物的杀灭效果^[4-8]、液态食品品质影响^[1]和酶钝化效果^[9]上。

乳铁蛋白(Lactoferrin,简称LF)富含在牛初乳中,是一种相对分子质量约为80 000的铁结合性糖蛋白^[10],其主体呈无柄银杏叶并列状结构。LF具有广谱抗菌活性^[11-12]和多种生物学功能^[13-17]。

作者从PEF对LF的生物活性作用出发,研究了PEF对LF抑菌性能的影响,从而探讨PEF对生物活性蛋白质功能性质的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

乳铁蛋白,荷兰DMV公司产品,乳铁蛋白占蛋白质的质量分数90%以上。大肠杆菌(*Escherichia coli*)由江南大学食品生物技术学科组提供。牛肉浸膏、蛋白胨、琼脂购自国药集团化学试剂有限公司。实验所用的其它试剂均为分析纯。

肉汤蛋白胨培养液^[18]:牛肉浸膏3g,蛋白胨10g,NaCl5g,水1L,pH7.2~7.4。

营养琼脂培养基^[18]:琼脂18g,肉汤蛋白胨培养液1L,pH7.2~7.4。

1.2 主要仪器设备

DRP-9082型电热恒温培养箱:上海森信实验仪器有限公司制造;VIS-722型可见分光光度计:上海精密科学仪器有限公司制造;VD-650桌上型洁净工作台:无锡超净净化空调设备有限公司制造;101-1-BS电热恒温鼓风干燥箱:上海跃进医疗器械厂制造;迴转式恒温调速摇瓶柜:上海欣蕊自动化设备有限公司制造;OSU-4L高压脉冲设备:俄亥俄州立大学制造;电压范围0~40kV;连续处理室,流速范围0~54mL/min;脉冲频率100~1000Hz;循环式冷却水浴锅温度范围15~65℃,双极脉冲;波形为方波。

1.3 实验方法

1.3.1 微生物活化、接种与平板计数 参照文献^[18-19]。

1.3.2 抑菌性能的测定 参照文献^[20]做适当调整。将经PEF处理后的LF溶液进行无菌微滤,再用无菌水分别稀释至2 500、1 000、500、100 μg/mL,各取2 mL与等体积大肠杆菌菌悬液(菌悬液浓度为10⁶ cfu/mL左右)混合,37℃下恒温培养4~5 h,测定培养后的混合物的T₆₀₀,以液体培养基

为测定参比。T₆₀₀高,说明抑菌效果好。

以未经过PEF处理的LF为对照样,按公式(1)计算LF的相对抑菌能力。

$$\text{LF的相对抑菌能力}/\% = \frac{\text{经PEF处理的LF测得的} T_{600}}{\text{未经PEF处理的LF测得的} T_{600}} \times 100 \quad (1)$$

1.3.3 PEF处理 采用实验室规模连续处理设备(OSU-4L,美国俄亥俄州立大学制造),主要由高压脉冲器、处理室、液体食品泵、冷却装置、带有计算机数据处理控制系统5部分组成。装置示意图见图1(图1中T₁、T₂、T₃及T₄由热电偶测量,其数值可在触摸控制屏直接读出)所示。仪器在使用前后,其管路需用4g/dL NaOH和1:10稀释的市售84消毒液和无菌水清洗至无菌,备用。

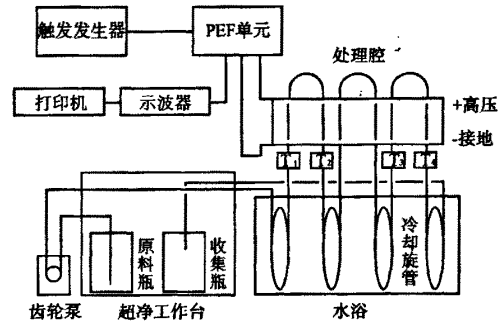


图1 实验室规模连续处理设备 OSU-4 L 示意图

Fig.1 Schematic diagram of a pulsed electric field-equipment

图2为示波器输出的双极矩形脉冲波形图,LF水溶液的脉冲波形基本为矩形,峰顶为锯齿形。其中1为电压波形,2为电流波形,PEF单元输出的电压电流的实际数值可由示波器图读出。

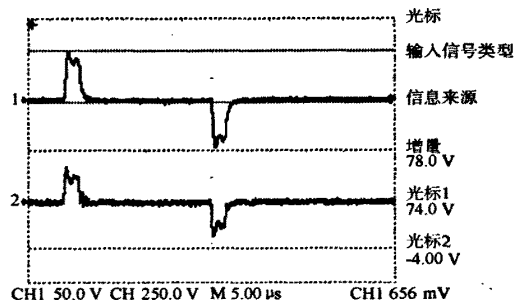


图2 双极矩形脉冲波形图

Fig.2 Bipolar square wave pulse pair

接受PEF处理的LF溶液质量浓度为5 000 μg/mL,样品经过恒流泵进入处理室,在处理室接受脉冲电场的处理,处理过的样品立即冷却,并进行抑菌性能的测定。

1.3.4 PEF处理参数的计算方法 电场强度E和

总处理时间 t 计算方法如下:

$$E = U/d \quad (2)$$

$$t = N_p \times N_c \times W_p \quad (3)$$

$$N_p = T_r \times f \quad (4)$$

$$T_r = V/F \quad (5)$$

其中: U 为电压,kV; d 为电极间距,0.29 cm; N_p 为单个处理腔内接收的脉冲数; N_c 为处理腔个数,6; W_p 为脉冲宽度,2 μ s; T_r 为停留时间,s; f 为脉冲频率,Hz; V 为单个腔体积,0.012 mL; F 为物流速,mL/s。

1.3.5 PEF 操作参数的选择 对于食品中常见菌,原始菌落数、电场强度、脉冲数、温度、脉冲频率、介质电导率等都会影响 PEF 的灭菌效果。本实验中 PEF 处理系统采用 6 个处理腔,双极正负脉冲,通过改变电场强度、脉冲数、温度、脉冲频率等操作参数,测定其对 LF 抑菌性能的影响。

称取一定量的 LF,用无菌水溶解,配制成 5 mg/mL 的 LF 溶液,测定溶液电导率为 1 436 μ S/cm。控制脉冲宽度为 2 μ s,介质流速 $F=54$ mL/min,脉冲频率 $f=200$ Hz,温度 $T=15$ $^{\circ}$ C 时,调整电场强度分别 15,20,25,30,35,40 kV/cm;

控制脉冲宽度为 2 μ s,电场强度 $E=30$ kV/cm,流速为 32.4 mL/min, $f=200$ Hz,温度 $T=15$ $^{\circ}$ C 时,调整脉冲数分别为:69,343,477,744 个;

控制脉冲宽度为 2 μ s,介质流速 $F=54$ mL/min, $f=200$ Hz,温度 $T=15$ $^{\circ}$ C 时,调整电场强度 E 分别为:20,40 kV/cm,脉冲频率分别为:200,1 000 Hz;

控制脉冲宽度为 2 μ s,电场强度 $E=30$ kV/cm,介质流速 $F=12.6$ mL/min, $f=200$ Hz 时,调整 PEF 处理温度分别为 15,25,35,45,55,65 $^{\circ}$ C。

每个样品均作 3 个平行测试,分别测定 T_{600} ,取平均值作相关曲线,并在图中以误差线表示标准偏差。

2 结果与讨论

2.1 电场强度对乳铁蛋白抑菌性能的影响

测定经过 PEF 不同电场强度处理后的 LF 对其的抑制能力,并作出 LF 的相对抑菌能力与电场强度的关系曲线,见图 3。

由图 3 可知,LF 对大肠杆菌的抑制能力随着电场强度的增加小幅提高,说明电场强度的增强对 LF 的抑菌能力是有利的。而当电场强度大于 35 kV/cm 时,LF 的相对抑菌能力没有明显的改变。在电场强度从 0 增加到 40 kV/cm 的过程中,质量

浓度为 5 000 μ g/mL 的 LF 溶液的相对抑菌能力可提高 8%,而质量浓度为 100 μ g/mL 的 LF 溶液仅能提高 4.5%左右,说明 LF 的质量浓度越高,对电场强度的变化越敏感。

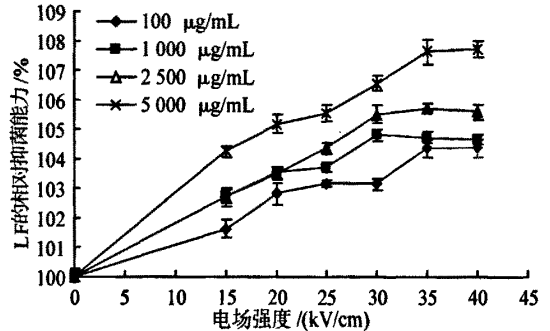


图3 电场强度对 LF 溶液抑菌性能的影响

Fig.3 Effect of electrical field strength on antibacterial activity of LF

当固定脉冲数时,细胞的杀灭率随电场强度的增加而增加。因为细胞膜两侧的感应电势与电场强度成正比,更高的电场强度能杀灭更多的细菌,这与本实验的结果是一致的。相同的电场强度下,LF 质量浓度越高,抑菌能力越强。

LF 因其晶体呈红色又称“红蛋白”,铁离子结合在两叶的切入部分(Fe 离子间隔 2.8~4.3 nm)^[10]。LF 的抑菌作用是由于 LF 与铁结合,造成了缺铁的营养环境,进而阻碍了微生物的生长发育。电场强度的增加,使 LF 分子结构发生变化,两叶部分扩张程度变大,更有利于铁离子的切入,结合铁离子的能力变强,抑菌性也得到提高。当电场强度达到 35 kV/cm 后,LF 分子的两叶结构可能不会再有明显改变,不能再与更多的铁离子结合,抑菌性能也就不会再有提高。今后若能进行 LF 结构上的分析,将能更清楚地解释以上实验现象及结果。

2.2 脉冲数对乳铁蛋白抑菌性能的影响

测定经过 PEF 不同脉冲数处理后 LF 对大肠杆菌的抑菌效果,并作出 LF 的相对抑菌能力与脉冲数的关系曲线,见图 4。

由公式(3)可以看出,在恒定的脉宽下,脉冲数与处理时间成正比,脉冲数越大,样品接受脉冲处理的时间就越多,抑菌能力有一定的提高,脉冲数的增加对 LF 抑菌性能的提高是有利的。图 4 表明,对于质量浓度为 1 000 μ g/mL 的 LF 溶液,即使在脉冲个数较低(69 个)时,抑菌能力也提高了 3.5%。随着脉冲数的增加,LF 溶液的抑菌能力逐渐增强。当脉冲个数达到 744 时,LF 的相对抑菌

能力提高了34%。

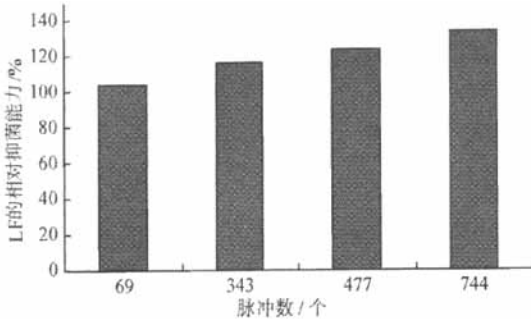


图4 脉冲数对LF溶液抑菌性能的影响

Fig. 4 Effect of pulse amount on antibacterial activity of LF

2.3 脉冲频率对乳铁蛋白抑菌性能的影响

测定经过PEF不同脉冲频率处理后的LF对大肠杆菌的抑制能力,分别测定电场强度为20,40 kV/cm时,LF的相对抑菌能力与脉冲频率的关系曲线,结果见图5,6所示。

图5及图6表明,经不同频率PEF处理的LF溶液的抑菌能力均有所提高。当电场强度为20 kV/cm时,LF溶液的抑菌能力随着频率的升高而增强,即频率的增加对LF的抑菌性能的增强是有利的;当电场强度达到40 kV/cm时,LF溶液的抑菌能力并不是一直随着频率的升高而增强,频率为200 Hz时的抑菌效果高于频率为1000 Hz处理后的LF。

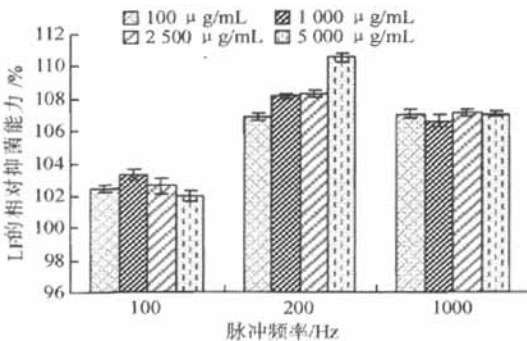


图5 电场强度为20 kV/cm时,脉冲频率对不同质量浓度LF溶液抑菌性能的影响

Fig. 5 Effect of pulse frequency on antibacterial activity of LF at 20 kV/cm

对于100 $\mu\text{g/mL}$ 的LF溶液,频率为200 Hz时,LF的相对抑菌能力可提高6%左右,从200 Hz增加到1000 Hz,LF的抑菌能力没有明显提高。对于质量浓度大于1000 $\mu\text{g/mL}$ 的LF溶液,当电场强度较高时,在频率小于200 Hz的范围内,频率的增加对LF抑菌能力的提高是有利的。LF质量

浓度为5000 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,低频率时抑菌性能可提高7.5%~10%左右,当频率从200 Hz增加到1000 Hz时,抑菌能力又会有所下降。因此,在选择PEF处理参数时不宜同时选择高电场强度及高脉冲频率。

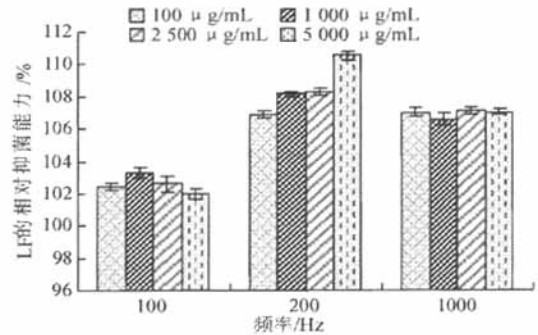


图6 电场强度为40 kV/cm时,脉冲频率对不同质量浓度LF溶液抑菌性能的影响

Fig. 6 Effect of pulse frequency on antibacterial activity of LF at 40 kV/cm

2.4 处理温度对乳铁蛋白抑菌性能的影响

温度是PEF处理的重要参数,LF的结构及功能性质与温度紧密相关。测定经过不同PEF温度处理后的LF对大肠杆菌的抑制能力,并作出LF的相对抑菌能力与温度的关系曲线,结果见图7。

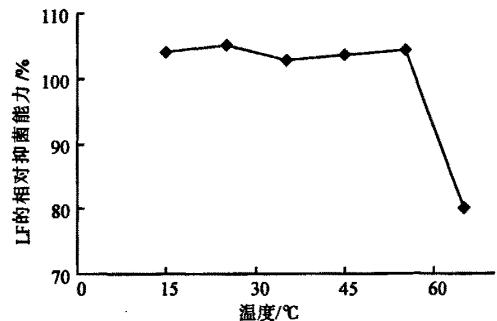


图7 温度对LF溶液抑菌性能的影响

Fig. 7 Effect of temperature on antibacterial activity of LF

图7表明,经PEF处理的LF的相对抑菌性能增长了5%左右,在15~55 $^{\circ}\text{C}$,LF溶液的抑菌性能有所波动。但当温度从55 $^{\circ}\text{C}$ 升至65 $^{\circ}\text{C}$ 时,LF的相对抑菌能力下降显著,降低了22%左右。

将PEF作用于菌悬液时,温度的升高,除引起热损害效应外,还降低了击穿细胞膜的跨膜电位,因此可提高灭菌率。但是对于LF溶液,过高的处理温度对其抑菌性能却是不利的。尤其是当介质温度为65 $^{\circ}\text{C}$ 时,样品实际温度超过55 $^{\circ}\text{C}$,已接近样品的变性温度。

3 结 论

1) 通过高压脉冲电场 PEF 处理 LF, 发现 PEF 对 LF 的抑菌性能有一定的影响。LF 的铁结合能力受到电场强度、脉冲数、脉冲频率、处理温度等因素的影响。

2) 电场强度、脉冲数、脉冲频率、温度的适当增加对其抑菌性能有正面的影响, 过高的温度会减弱其抑菌性能。

3) PEF 处理会对生物活性蛋白的功能性质产生正面或负面的影响。选择适宜的操作参数, 可以提高其功能性质。

参考文献(References):

- [1] Barsotti L, Merle P, Cheftel J C. Food processing by pulsed electric fields [J]. *Biological Aspects, Rew Food Rew Int*, 1999, 15(2):181-213.
- [2] Zhang Q H, Qiu X, Sharms S K. Recent development in pulsed electric field processing [J]. *New Technologies Yearbook*, 1997, (2) 31-42.
- [3] Quass D W. Pulsed electric field processing in the food industry [M]. CA: Electric Power Research Institute, 1997.
- [4] Jayaram S, Castle G S P, Margaritidis A. Effects of high electric field pulses on *Lactobacillus brevis* at elevated temperatures [A]. IEEE Industry Applications Society Annual Meeting [C]. 1991, (1): 674-681.
- [5] Pothakamury U R, Vega-Mercado H, Zhang Q, Barbosa-Canovas G V, et al. Effect of growth stage and temperature on inactivation of *E. coli* by pulsed electric fields [J]. *Journal of Food Protection*, 1996(59):1167-1171.
- [6] 吴岗, 郑成, 宁正祥. 高压脉冲电场灭菌机理 [J]. *食品科学*, 1998(4):7-9.
WU Gang, ZHENG Chen, NING Zheng-xiang. sterilization mechanism of pulsed electric fields [J]. *Food Science*, 1998 (4):7-9.
- [7] 祖国仁, 孔繁东, 刘阳, 等. 高压方波脉冲电场对微生物的致死作用 [J]. *高电压技术*, 2004, 30(8): 47-49.
ZU Guo-ren, KONG Fan-dong, LIU Yang, et al. Inactivation of microorganism by pulsed electric fields [J]. *High Voltage Engineering*, 2004, 30(8):47-49.
- [8] 孙静, 孔繁东, 祖国仁, 等. 高压脉冲电场对酵母菌和大肠杆菌存活率的影响 [J]. *食品科学*, 2004, 25(2): 87-90.
SUN Jing, KONG Fan-dong, ZU Guo-ren, et al. The effects of high power pulsed electric field on the survive ability of *S. cerevisiae* and *E. coli* [J]. *Food Science*, 2004, 25(2): 87-90.
- [9] 史梓男, 廖小军, 钟葵, 等. 脉冲电场中西瓜汁杀菌钝酶效果分析 [J]. *高电压技术*, 2002, 28(B12):52-53.
SHI Zi-nan, LIAO Xiao-jun, ZHONG Kui, et al. Effect of pulsed electric fields on the sterilization and enzyme inactivation of water melon juice [J]. *High Voltage Engineering*, 2002, 28(B12):52-53.
- [10] Foley A A, Bates G W. The purification of lactoferrin from human whey by batch extraction [J]. *Analytical biochemistry*, 1987, 162(1):296-300.
- [11] Kawasaki Y, Tazume S, Shimizu K. Inhibitory effects of bovine lactoferrin on the adherence of enterotoxigenic *Escherichia coli* to host cells [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64(2):348-354.
- [12] David A D, Paul A G, Joanne M M. Form of lactoferrin: their antibacterial effect on enterotoxigenic *Escherichia coli* [J]. *J Dairy Science*, 1993(76):2597-2606.
- [13] Abdallah F B, Chahine J E. Transferrins; iron release from lactoferrin [J]. *J Molecular Biology*, 2000(303): 255-266.
- [14] Tu Y Y, Chen C C, Chang J H. Characterization of lactoferrin (LF) from colostrum whey using anti-LF antibody immunoaffinity chromatography [J]. *J Food Science*, 2002, 67(3): 996-1001.
- [15] Lindmark M H, Akesson B. Antioxidative factors in milk [J]. *British J Nutrition*, 2000(84): 103-110.
- [16] Medina I, Tombo I, Satue Gracia M T. Effects of natural phenolic compounds on the antioxidant activity of lactoferrin in liposomes and oil-in-water emulsions [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(8): 2392-2399.
- [17] Belzen N. The role of lactoferrin in cancer prevention [J]. *Sciences des Aliments*, 2002, 22(4): 461-468.
- [18] 周德庆. 微生物学教程 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1993:208.
- [19] 冯敏杰, 周惠明, 钱海峰. 鹅血中转铁蛋白质的分离纯化及其性质 [J]. *食品与生物技术*, 2004, 23(1): 94-98.
FENG Min-jie, ZHOU Hui-ming, QIAN Hai-feng. Extaction and characterization of transferrin from goose serum [J]. *J Food Science and biotechnology*, 2004, 23(1): 94-98.
- [20] 卢蓉蓉. 乳铁蛋白的分离纯化及其生物活性功能 [D]. 无锡: 江南大学, 2003.

(责任编辑:李春丽)