

碘乙酰胺改性溶菌酶抑菌效果研究

金 茜, 智秀娟, 姜怀玺, 仝其根*

(北京农学院 农产品有害微生物及农残安全检测与控制北京市重点实验室/食品质量与安全北京实验室, 北京 102206)

摘要: 在单因素实验的基础上,应用正交分析,优化碘乙酰胺改性溶菌酶的条件,并测定此改性条件下溶菌酶对革兰氏阴性菌的抑菌活性。结果表明,0.06 mol/L 碘乙酰胺与 5 mg/mL 溶菌酶改性时,对大肠杆菌和沙门氏菌的抑菌效果最好,在 45 ℃,反应时间 30 min,pH=5 的条件下改性后的溶菌酶,其对大肠杆菌的抑菌圈直径为 25.7 mm,是改性前抑菌圈的 2.7 倍。在 55 ℃,反应时间 70 min,pH=6 的条件下改性后的溶菌酶对大肠杆菌的抑菌圈直径为 24.1 mm,是改性前抑菌圈的 2.6 倍。这充分说明蛋清溶菌酶经过碘乙酰胺改性后,可以用于对革兰氏阴性菌(大肠杆菌 K12、沙门氏菌)抑菌,而且效果良好。

关键词: 蛋清溶菌酶;碘乙酰胺;大肠杆菌;沙门氏菌;抑菌

中图分类号:TS 201.3 文献标志码:A 文章编号:1673—1689(2014)07—0750—05

Study on the Antimicrobial Effect of Iodoacetamide Modified Lysozyme

JIN Qian, ZHI Xiujuan, JIANG Huaixi, TONG Qigen*

(Beijing Key Laboratory of Agricultural Product Detection and Control of Spoilage Organisms and Pesticide Residue / Beijing Laboratory of Food Quality and Safety, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract: In order to improve the antibacterial effect of lysozyme on *Escherichia coli* and other gram negative bacteria, according to the single-factor experiments and orthogonal methodology was employed to optimize the Iodoacetamide modified lysozyme. The results show that 0.06 mol/L iodine acetamide and 5 mg/mL lysozyme bacteriostatic effect is best. The biggest inhibition zone diameter to the *Escherichia coli* is 25.7 mm when the reaction temperature is 45 ℃, reaction time is 30 min, and pH is 5. The antibacterial circle diameter is 2.7 times of the original. The biggest inhibition zone diameter to the *salmonella* is 24.1 mm when the reaction temperature is 55 ℃, reaction time is 70 min, and pH is 6. The antibacterial circle diameter is 2.6 times of the original. This was considered that egg white lysozyme after iodoacetamide modified, can be used for Gram-negative bacteria (*E.coli* K12, *salmonella*) inhibition, and the effect is good.

Keywords: hen egg white lysozyme, iodoacetamide, *Escherichia coli*, *Salmonella*, bacteriostatic

收稿日期: 2013-12-25

基金项目: 北京市科技成果转化和产业化项目(PZM2013-014207-000054)。

* 通信作者: 仝其根(1962—),男,山东寿张人,教授,主要从事农产品加工研究。E-mail:meiblyaoa@163.com

溶菌酶可以水解黏多糖,是一种碱性酶^[1]。它作为一种小分子蛋白质,具有对组织无刺激无毒性等优点,在《关于批准溶菌酶等物质为食品添加剂及部分食品添加剂和营养强化剂扩大使用范围、用量的公告(2010年第23号)》中,溶菌酶已经可以在干酪和发酵酒中作为防腐剂使用^[2]溶菌酶主要通过破坏细胞壁中的N-乙酰胞壁酸和N-乙酰氨基葡萄糖间的 β -1,4糖苷键,使细胞壁不溶性黏多糖分解成可溶性糖,导致细胞壁破裂、内容物逸出而溶解细菌^[3]。由于革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌的细胞壁中肽聚糖含量不同,而使得溶菌酶对革兰氏阴性菌的破坏远远不如革兰氏阳性菌效果好。

目前,为了提高溶菌酶对大肠杆菌等阴性细菌的抑菌效果,国内外已经做了一些相关研究,可以通过热处理、利用还原剂还原溶菌酶的二硫键、添加其他化学物质与溶菌酶协同作用等改变酶的构象^[4]。最常见的是利用小分子对溶菌酶进行修饰,溶菌酶分子表面有8个半胱氨酸残基($\text{HS-CH}_2\text{-}$),可以与外来的化合物发生化学反应,用含氨基小分子修饰是不错的选择。碘乙酰胺是一种化学活性很强的试剂,易与巯基进行反应将溶菌酶进行修饰,并可以保证溶菌酶分子的还原状态,常用于有机合成和化学修饰中,也用于蛋白组学中半胱氨酸和组氨酸的烷基化试剂。

碘乙酰胺与巯基的反应过程为: $\text{R-SH} + \text{ICH}_2\text{CONH}_2 \rightarrow \text{R-S-CH}_2\text{CONH}_2 + \text{HI}$ ^[5],因此,通过选取碘乙酰胺在内的3种小分子化合物与溶菌酶分子进行有机合成,以革兰氏阴性的典型代表菌大肠杆菌和沙门氏菌为测验菌进行抑菌试验,选取出抑菌效果明显的试剂并采用正交试验对改性溶菌酶进行优化。

1 材料与方法

1.1 菌种与试剂

大肠杆菌 K12:中国工业微生物菌种保藏中心产品;沙门氏菌:北京农学院食品科学与工程学院提供;蛋清溶菌酶:生工生物工程(上海)股份有限公司产品;碘乙酰胺:阿拉丁试剂上海公司产品;琼脂、蛋白胨、牛肉膏:北京奥博星生物技术有限公司产品。

1.2 仪器与设备

牛津杯内径(6.0 ± 0.1)mm,外径(7.8 ± 0.1)mm,

高(10 ± 0.1)mm;DHP-500 电热恒温培养箱:天津中环电炉有限公司产品;DSHZ-300 型水浴恒温振荡器:江苏太仓试验设备厂产品;HWS12 型电热恒温水浴锅:上海一恒科技有限公司产品;HD-920 超净工作台:北京东联哈尔仪器制造有限公司产品。

1.3 方法

1.3.1 溶菌酶改性前后抑菌效果测定 采用倍比稀释法^[6]测定改性前溶菌酶对革兰氏阴性菌的抑菌效果。取经过高压灭菌的试管9支于超净台,依次编上号码,在各管中分别加入2 mL 营养肉汤液体培养基。然后向1号管加入质量浓度为10 mg/mL的溶菌酶样品液2 mL,于漩涡震荡仪充分混匀后,吸出2 mL加入2号试管中混匀,依照此法倍比稀释至第7管,第7管混匀后吸出2 mL混合液弃去。再分别向1-8管加入已活化的需要测试的菌液100 μL 。第8管中不加酶液加菌液,作为阳性对照,第9管中加入2 mL浓度为10 mg/mL的溶菌酶样品液,混匀后弃去2 mL,不加菌液作为生长对照。将9支试管置于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡培养箱中培养12 h后取出,用生理盐水将各试管进行梯度稀释,选取 10^4 cfu/mL的菌液用倾倒法进行平板菌落计数,观察结果。

采用牛津杯法^[7],通过测量菌落数与抑菌圈直径大小分别研究溶菌酶改性前后对大肠杆菌及沙门氏菌的抑菌效果。在无菌条件下,将已灭菌的营养琼脂培养基加热到完全融化,以每皿15 mL(下层)倒入培养皿中,待其凝固。之后,将融化的培养基冷却到50 $^{\circ}\text{C}$ 左右混入适宜浓度的菌液200 μL ,将混有菌的培养基5 mL加到已凝固的培养基上(上层)。待凝固后在培养基表面垂直放上牛津杯,再在每个牛津杯中加入0.2 mL已除菌的样品液,将平皿置37 $^{\circ}\text{C}$ 培养18 h,观察结果,测量抑菌圈大小。

1.3.2 碘乙酰胺对溶菌酶的改性 准确称取0.5 g溶菌酶于100 mL容量瓶中,加入无菌水配成浓度为5 mg/mL的溶液;分别称取0.37,0.74,1.11,1.48 g碘乙酰胺于100 mL容量瓶中,用无菌水配成0.02,0.04,0.06,0.08 mol/L的碘乙酰胺溶液,取5 mL上述溶液分别加入标记好的试管中,在各个试管中按1:1加入5 mg/mL溶菌酶溶液,之后将上述不同浓度的混合溶液在55 $^{\circ}\text{C}$ 保温30 min后对大肠杆菌及沙门氏菌进行抑菌实验,选出碘乙酰胺与溶菌酶反应的最适浓度,再在此基础上对反应温度、溶液pH、反应时间进行单因素试验与正交实验,优

化碘乙酰胺与溶菌酶的反应参数。

2 结果与分析

2.1 溶菌酶对大肠杆菌及沙门氏菌抑菌作用

用 1.3.1 的方法对大肠杆菌及沙门氏菌进行实验,对两种菌分别经过 37 ℃,12 h 恒温振荡培养后的试管进行观察,可以看到 1~7 号试管均比 9 号试管浑浊,表明 1~7 号加了不同浓度溶菌酶的试管中的试验菌都有不同程度的生长。再对各试管中的培养物进行平板计数,各样品菌落数如表 1 所示。

表 1 不同质量浓度溶菌酶对大肠杆菌及沙门氏菌抑菌结果表
Table 1 Different concentrations of lysozyme inhibition on *Escherichia coli* and *salmonella*

编号	溶菌酶质量浓度/(mg/mL)	大肠杆菌菌落总数/(cfu/mL)	沙门氏菌菌落总数/(cfu/mL)
1	10	1.3×10^{10}	1.07×10^9
2	5	7.6×10^{10}	2.08×10^{10}
3	2.5	3.3×10^{10}	2.18×10^{10}
4	1.25	6.4×10^{10}	2.92×10^{10}
5	0.625	5.7×10^{10}	2.79×10^{10}
6	0.313	2.7×10^{10}	4.23×10^{10}
7	0.156	6.5×10^{11}	7.97×10^{10}
8	0	5.7×10^{11}	1.02×10^{11}

由表 1 可见,溶菌酶最大质量浓度为 10 mg/mL 时对沙门氏菌的抑菌效果好于对大肠杆菌的抑菌效果,但总体与不添加溶菌酶的阳性对照组的菌落总数相差不大,即溶菌酶对大肠杆菌及沙门氏菌的

抑菌效果不明显。再选取上述质量浓度为 10、5、2.5、1.25 mg/mL 的溶菌酶进行抑菌圈大小的测定,重复实验 4 次,结果见表 2。

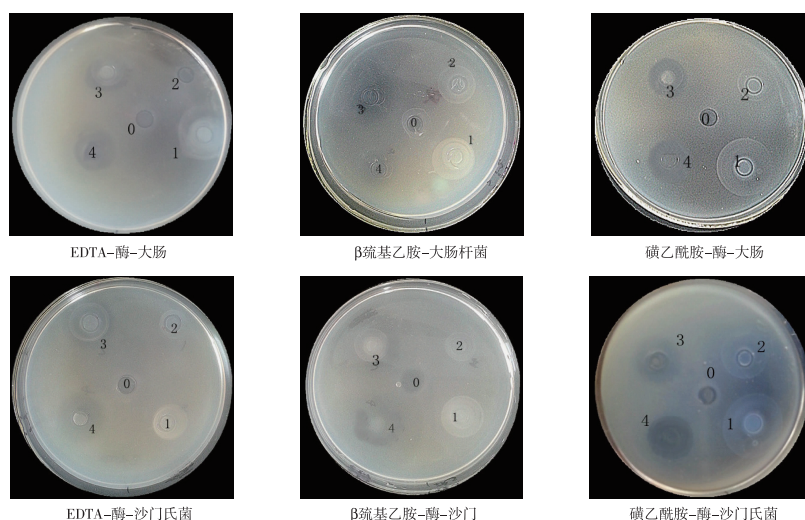
表 2 表明溶菌酶抑菌活性高低与质量浓度大小成正比,且两种菌各质量浓度间抑菌圈直径相差不大,即对大肠杆菌和沙门氏菌抑菌效果不是很好。

表 2 不同质量浓度溶菌酶对大肠杆菌及沙门氏菌抑菌结果表
Table 2 Different concentrations of lysozyme inhibition on *Escherichia coli* and *salmonella*

编号	溶菌酶质量浓度/(mg/mL)	大肠杆菌抑菌圈直径/mm	沙门氏菌抑菌圈直径/mm
1	10.0	10.7	9.3
2	5.00	9.4	9.1
3	2.50	8.2	8.7
4	1.25	7.9	8.3
5	0	7.8	7.9

2.2 改性后溶菌酶对大肠杆菌及沙门氏菌抑菌作用

选取了 EDTA- Na_2 、 β -巯基乙胺,碘乙酰胺 3 种含有氨基的化合物和溶菌酶反应,对大肠杆菌及沙门氏菌抑菌效果见图 1。碘乙酰胺与溶菌酶反应后抑菌效果明显好于溶菌酶单独对大肠杆菌及沙门氏菌作用,且抑菌效果优于 EDTA- Na_2 和 β -巯基乙胺与溶菌酶的作用。相同浓度试剂与不同浓度溶菌酶作用抑菌圈效果相差不大,因此,结合表 2,选取质量浓度为 5 mg/mL 的溶菌酶与不同试剂作用,在溶菌酶水解最适 55 ℃温度下加热 30 min^[8],结果见表 3。



注:0 为无菌水对照;1 为 5 mg/mL 溶菌酶;2 为 125 mg/mL 溶菌酶;3 为 0.5 mol/L 试剂+125 mg/mL 溶菌酶;4 为 0.5 mol/L 试剂+5 mg/mL 溶菌酶。

图 1 不同试剂与溶菌酶对大肠杆菌及沙门氏菌的抑制作用

Fig. 1 Effect of different reagents and lysozyme on *Escherichia coli* and *salmonella*

由表 3 可知,0.06 mol/L 碘乙酰胺与 5 mg/mL 溶菌酶反应后对两种细菌的抑菌效果最好,因此,选取这个浓度下的试剂进行正交优化试验。

表 3 不同浓度碘乙酰胺与 5 mg/mL 溶菌酶在 55 °C 保温 30 min 后对细菌抑菌效果

Table 3 Different concentrations of iodoacetamide and 5 mg/mL lysozyme effect on *Escherichia coli* and *salmonella* at 50 °C for 30 min

编号	浓度/ (mol/L)	大肠杆菌抑菌 圈直径/mm	沙门氏菌抑菌 圈直径/mm
1	0.02	19.4	19.0
2	0.04	21.3	19.7
3	0.06	23.7	22.4
4	0.08	22.1	21.7

2.3 正交试验结果

根据溶菌酶及碘乙酰胺的理化性质,并根据正交实验的特点,采用 $L_9(3^4)$ 正交设计分别研究反应温度、时间、pH 对大肠杆菌及沙门氏菌抑菌效果,设计表见表 4,确定碘乙酰胺和溶菌酶反应的最佳条件,对大肠杆菌抑菌效果分析见表 5,方差分析见表 6;对沙门氏菌抑菌效果分析见表 7,表 8。

由对大肠杆菌影响的正交表 5 中极差分析可知, $C>B>A>$ 空列,即对改性的溶菌酶作用因素由强到弱依次为 pH,时间,温度,最优组合为 $C_1B_1A_1$,对应的是试验设计的第一组中的因素。即 45 °C、反应时间 30 min、PH 为 5 的条件下抑菌效果最优。按最优组合 $C_1B_1A_1$ 的条件进行 3 次平行试验,测得抑菌圈均值为 25.7 mm。

由表 6 可知,pH 和时间对抑菌效果有极显著影响($p<0.01$),温度对抑菌效果也有显著影响($p<0.05$),说明在碘乙酰胺与溶菌酶反应过程中,对温度、时间和 pH 的控制是较为关键的。

表 4 正交试验因素与水平设计

Table 4 Factors and levels of orthogonal design

水平	温度 A/°C	时间 B/min	pH C
1	45	30	5
2	55	50	6
3	65	70	7

表 5 $L_9(3^4)$ 正交试验结果与分析

Table 5 Results and analysis of $L_9(3^4)$ orthogonal experiment

试验号	温度 A/ °C	时间 B/ min	pH C	空列 D	抑菌圈直 径/mm
1	1	1	1	1	24.7
2	1	2	2	2	22.5
3	1	3	3	3	19.4
4	2	1	2	3	23.0
5	2	2	3	1	20.3
6	2	3	1	2	21.8
7	3	1	3	2	20.5
8	3	2	1	3	22.9
9	3	3	2	1	20.2
均值 1	22.200	22.733	23.133	21.733	
均值 2	21.700	21.900	21.900	21.600	
均值 3	21.200	20.467	20.067	21.767	
极差	1.000	2.266	3.066	0.167	
最优水平	A_1	B_1	C_1		

表 6 方差分析

Table 6 Analysis of variance

方差来源	离差平 方和	自由度	均方	F	显著性
A	1.5	2	0.75	25	*
B	7.88	2	3.94	131.33	**
C	14.28	2	7.14	238	**
D(误差)	0.06	2	0.03		

注: $F_{0.05}(2,2)=19.00$, $F_{0.01}(2,2)=99.00$

表 7 $L_9(3^4)$ 正交试验结果与分析

Table 7 Results and analysis of $L_9(3^4)$ orthogonal experiment

试验号	温度 A/ °C	时间 B/ min	pH C	空列 D	抑菌圈直 径/mm
1	1	1	1	1	18.9
2	1	2	2	2	22.9
3	1	3	3	3	21.1
4	2	1	2	3	23.9
5	2	2	3	1	21.3
6	2	3	1	2	22.4
7	3	1	3	2	19.7
8	3	2	1	3	19.6
9	3	3	2	1	23.4
均值 1	20.967	20.833	20.3	21.200	
均值 2	22.533	21.267	23.400	21.667	
均值 3	20.900	22.300	20.700	21.533	
极差	1.633	1.467	3.100	0.467	
最优水平	A_2	B_3	C_2		

表 8 方差分析

Table 8 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	显著性
A	5.127	2	2.563 5	17.78	
B	3.407	2	1.703 5	9.82	
C	17.060	2	8.53	9.16	*
D(误差)	0.347	2	0.173 5		

注: $F_{0.05}(2,2)=19.00$, $F_{0.01}(2,2)=99.00$

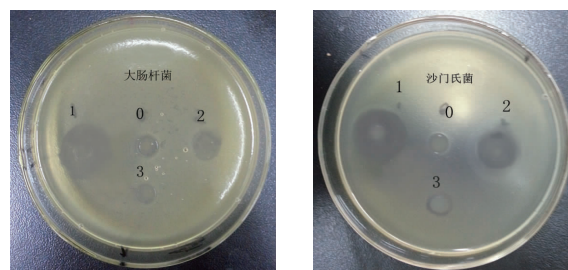
由对沙门氏菌影响的正交表极差分析可知, $C>A>B>$ 空列, 即对改性的溶菌酶作用因素由强到弱依次为 pH, 温度, 时间, 最优组合为 $C_2A_2B_3$ 。即 55 ℃、反应时间 70 min、PH 为 6 的条件下抑菌效果最优。按最优组合的条件进行 3 次平行试验, 测得抑菌圈均值为 24.1 mm, 说明改性后的溶菌酶对革兰氏阴性菌抑菌效果良好。

由表 8 可知, pH 对沙门氏菌抑菌效果有显著影响 ($p<0.05$), 因此, 碘乙酰胺改性溶菌酶在对沙门氏菌的抑菌过程中 pH 的控制较为关键。

2.4 溶菌酶修饰前后抑菌圈比较

图 2 为溶菌酶与碘乙酰胺反应前后对大肠杆菌及沙门氏菌的抑菌效果图, 经过测量, 1 为在最优条件下的抑菌圈, 大肠杆菌及沙门氏菌抑菌圈分别可以达到 25.7 mm 和 24.1 mm, 2 为未改性溶菌酶

对大肠杆菌及沙门氏菌的抑菌效果, 抑菌圈直径分别为 9.4 mm 和 9.1 mm, 相差约 2.7 和 2.6 倍, 可见, 改性后的溶菌酶对大肠杆菌抑菌效果明显。



注: 0 为无菌水对照, 1 为改性后 0.06 mol/L 碘乙酰胺与 5 mg/mL 溶菌酶, 2 为改性前 5 mg/mL 溶菌酶, 3 为 0.06 mol/L 碘乙酰胺试剂

图 2 溶菌酶改性前后对大肠杆菌及沙门氏菌的抑制作用
Fig. 2 Lysozyme before and after the modification of the inhibitory effect of *Escherichia coli* and *salmonella*

3 结 语

通过对大肠杆菌的抑菌试验进行正交分析, 得出了碘乙酰胺与溶菌酶反应的最适条件为 45 ℃, 反应时间 30 min, pH=5; 通过对沙门氏菌的抑菌试验进行正交分析, 得出了碘乙酰胺与溶菌酶反应的最适条件为 55 ℃, 反应时间 70 min, pH=6, 对扩大溶菌酶的抑菌谱图奠定了基础。

参考文献:

- [1] 黄栋, 崔莉, 王强, 等. MTG 催化羊毛固定化溶菌酶及其抗菌整理研究[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(6): 812.
HUANG Dong, CUI Li, WANG Qiang, et al. Immobilization of lysozyme by MTG on the wool and antibacterial action[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2009, 28(6): 812. (in Chinese)
- [2] 国家卫生计生委食品安全标准与监测评估司公告 [EB/OL]. (2011-01-05)[2013-10-16] <http://www.moh.gov.cn/sps/s7891/201101/26b4692fcc004b0196884946be6b618e.shtml>.
- [3] Fujita I, Maeda A, Takashik. Studies on the anti-diarrheal activity of *Clostridium butyricum* Miyairi II 588 [J]. *Jpn Pharmacol Ther*, 1986, 14: 6073-6080.
- [4] 尹金凤, 史锋, 王小元. 蛋清溶菌酶与渗透剂对大肠杆菌的协同抑菌作用[J]. 食品科学, 2011, 32(11): 177.
YIN Jinfeng, SHI Feng, WANG Xiaoyuan, Synergistic antibacterial effect of lysozyme with cell permeabilizers on *Escherichia coli* [J]. *Journal of Food Science*, 2011, 32(11): 177. (in Chinese)
- [5] Blanchard H, Kodandapani L, Mittl P R, et al. The three-dimensional structure of caspase-8; an initiator enzyme in apoptosis[J]. *Structure*, 1999, 7(9): 1125.
- [6] 吴少辉, 叶伟娟, 黄雪莲, 等. 南五味子抑菌物质的优化提取及抑菌活性研究[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(7): 720-721.
WU Shaohui, YE Weijuan, HUANG Xuelian, et al. Optimum extraction of bioactivity substances and its activity against bacteria and fungous from *Kadsura longipedunculata* [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2012, 31 (7): 720-721. (in Chinese)
- [7] 马绪荣, 苏德模. 药品微生物学检验手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [8] 张立彦, 曾庆孝, 李作为. 溶菌酶降解壳聚糖条件的研究[J]. 功能高分子学报, 2004, 9(17): 92-393.
ZHANG Liyan, ZENG Qingxiao, LI Zuwei. Study on the reation conditions of lysozymic of hydrolysis of chitosan [J]. *Journal of Functional Polymers*, 2004, 9(17): 92-393. (in Chinese)