

植物提取物对冰核活性细菌表达冰核活性蛋白的影响*

宋丽萍 陈庆森 籍瑞芳

(天津商学院生物工程系,天津 300134)

摘要 植物提取物对于冰核活性细菌表达冰核活性蛋白具有明显的促进作用。通过添加适量的芥菜籽热水提取物培养冰核活性细菌(*Xanthomonas ampelina* TS206),细菌的冰核活性比原来提高了37.5%,菌体的生物量提高了36.2%。芥菜籽抽提物作为一种效应物分子激活启动子,在冰核蛋白基因的表达中起到了重要作用,从而显著地提高了细菌高水平表达冰核活性蛋白的能力。

关键词 植物提取物,冰核活性蛋白,冰核活性细菌

冰核活性细菌(ice nucleation activity bacteria,简称INA细菌)是在较高的温度下促使水结冰的一类细菌^[1]。根据这一特点,可将其应用于食品的冷冻浓缩^[2]。细菌冰核活性的高低主要与细菌表达冰核活性蛋白的多少有关^[3]。1994年^[4],日本学者Watanabe等人报道,在培养基中加入植物提取物可以促进冰核活性细菌表达冰核活性蛋白。1991年^[5],日本的厚生省已经批准将*Xanthomonas campestris* INXC-1经高压灭菌后应用在食品生产领域。本实验所用的菌种(*x. ampelina*)与其同属。此外,该菌种还具有呈冰核活性强,不易变异等优点。

1 材料与方 法

1.1 实验菌种

Xanthomonas ampelina TS206 冰核活性细菌(本实验室从天津地区蔬菜表面分离)。该菌种的特性见参考文献[6]。

1.2 主要仪器和药品

J2-21型低温冷冻离心机(Beckman公司);HYG-III型回转式恒温调速摇瓶柜;Hc21006低温恒温器;JY92-II超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所);核酸蛋白质检测仪(上海沪西

分析仪器厂);BT01-100恒流泵(兰格恒流泵有限公司);Sephacrose 4B(100~100000ku)购自Pharmacia公司;芥菜籽(光头芥,购于天津市蔬菜种子公司)。

1.3 芥菜籽抽提物的制备

称取一定量的芥菜籽,碾碎后用乙醚脱脂,残渣(称取1g)用70℃的热水(10 mL)抽提10 min(剧烈振荡),将抽提液在5000 r/min下离心20 min后取上清液,将上清液冷冻干燥制成粉末。

1.4 培养基

斜面培养基:见参考文献[7]。

液态种子培养基:见参考文献[2]。

发酵培养基:见文献[2]。

1.5 芥菜籽抽提物作为添加物的发酵培养方 法

在发酵培养基中分别加入0、140、280、420、560 mg/L的芥菜籽抽热水抽提物。其他的培养方法见参考文献[7]。

1.6 分析指标与测定方法

1.6.1 冰核活性的测定方法^[8]

测定温度为-3℃,时间为0.5 min,分析指标是冻滴率(%)。

冻滴率 = 冻结液滴数 × 100/30。

第一作者:硕士研究生。

*天津市自然科学基金资助项目(No. 023803311)

收稿时间 2003-08-11

1.6.2 菌体生物量的测定方法

用菌体干重法测定细菌发酵生物量^[7]。

1.7 冰核活性蛋白的分离纯化方法

将获得发酵液用缓冲液洗涤后悬浮,用超声波破碎菌体细胞,离心除去细胞碎片,低温下透析浓缩上清液,离心取沉淀,用少量缓冲液悬浮沉淀,利用凝胶(Sephacrose 4B)过滤方法分离纯化,收集含冰核蛋白质吸收峰的洗脱液。

2 实验结果

2.1 芥菜籽抽提物的制备结果

称取芥菜籽 125 g,按 1.3 节的方法处理后得到产品 13 g,芥菜籽热水抽提物的提取率仅为 10.4%^[4]。

2.2 芥菜籽抽提物对冰核活性菌的影响

按照 1.5 节的培养法,对 *Xanthomonas ampelina* TS206 进行发酵培养,结果见图 1 和图 2。

物量和冰核活性均有明显的促进作用。当菜籽抽提物的加入量为 10 mg/70 mL 时对生物量的促进作用最明显,菌体质量可达 5.12 g/L(干物质)比空白增加了 36.2%。冻滴率为 83.3% (0.5 min 内测得)比空白增加了 37.5%。

2.3 芥菜籽抽提物对细胞形态特征的影响

对菜籽抽提物具有促进 *Xanthomonas ampelina* TS206 的高水平的表达冰核活性蛋白质的现象,进行了发酵培养物的细胞形态的显微观察,试验结果见图 3 和图 4。

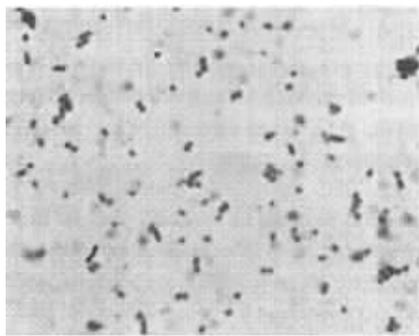


图 3 培养基中未添加菜籽抽提物 (×1000)

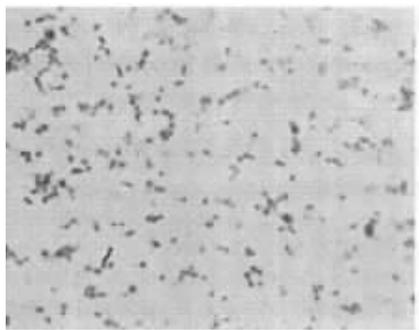


图 4 培养基中添加菜籽抽提物 (×1000)

通过在显微镜下观察冰核细菌的细胞形态,从图 3 和图 4 的比较可知,在发酵培养基中加入菜籽抽提物后,菌体细胞的形态发生了明显的变化,胞外分泌物增多,细胞粘连的现象增强。而且在培养基中添加了菜籽抽提物后培养出的细菌的冰核活性远远高于培养基中未添加芥菜籽抽提物培养出的细菌的冰核活性,所以形成 I 型冰核活性蛋白的可能性明显增加。因此可以推测出发酵中的培养物的菌体细胞形态跟冰核活性蛋白的过量表达有关。

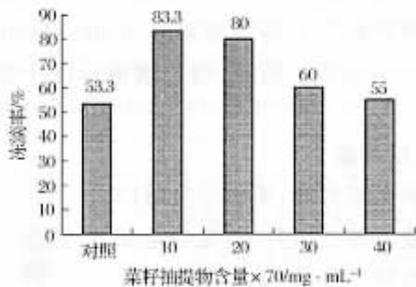


图 1 芥菜籽抽提物对 *Xanthomonas ampelina* TS206 冰核活性的影响

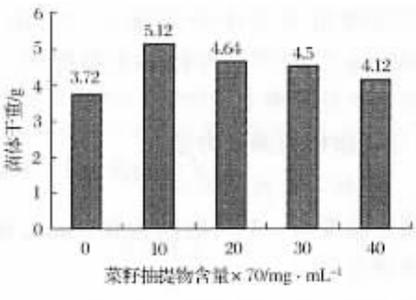


图 2 菜籽抽提物对 *Xanthomonas ampelina* TS206 生物量的影响

由图 1 和 2 可知,在培养基中添加芥菜籽抽提物对 *Xanthomonas ampelina* TS206 的生

2.4 Sepharose 4B 凝胶层析柱分离纯化冰核活性蛋白

将按 1.7 节方法制备的待分离纯化的含冰核活性蛋白质的发酵悬液,作 Sepharose 4B 凝胶层析柱分离纯化,实验结果见图 5 和图 6。

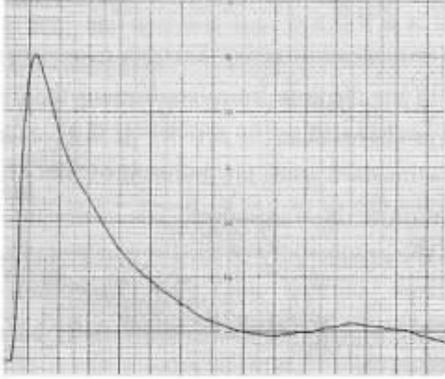


图 5 未加菜籽抽提物蛋白的凝胶层析图谱

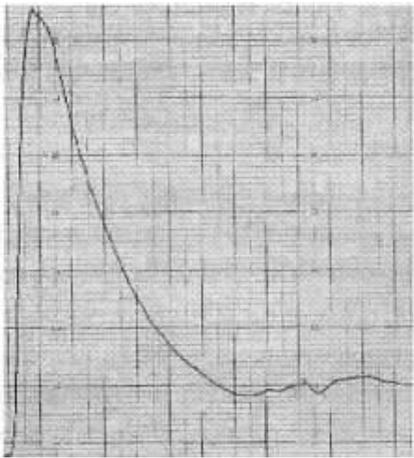


图 6 添加菜籽抽提物蛋白的凝胶层析图谱

图 5 和 6 所出现的峰的形状相同,但加入芥菜籽抽提物的蛋白溶液在层析时的吸收峰的最大值和峰的积分面积比没有添加芥菜籽抽提物有了明显的提高,这说明加入芥菜籽抽提物后细菌分泌的冰核活性蛋白的量有显著地增

加。

3 讨论

在培养基中加入芥菜籽抽提物不但可以促进冰核活性细菌表达冰核活性蛋白质,而且也可以提高细菌的生物量,该现象对大量制备冰核活性蛋白质具有重大意义。这种现象是因为芥菜籽抽提物在冰核蛋白基因表达中扮演了重要的角色,它可能作为一种效应物分子激活启动子,增强转录的起始。从而显著地增加了细菌分泌冰核活性蛋白的量,提高了细菌高水平表达冰核活性蛋白的能力。

参 考 文 献

- 1 Maki R L, Galyan E L, Chang-Chien M et al. Ice-nucleating induced by *Pseudomonas syringae* [J]. *Appl Microbiol*, 1974, 28: 456~459
- 2 宋丽萍,陈庆森,闫亚丽等. *Xanthomonas ampelina* 发酵培养基组成的优化[J]. *食品科学*, 2003, 24(7): 89~92
- 3 宋丽萍,陈庆森,刘健等. 冰核活性细菌发酵生产冰核活性蛋白产物的研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2003, 29(6): 92~95
- 4 Michiko Watanabe Jun Watanabe. Screening, Isolation and Identification of Food-originated Compounds Enhancing the Ice-nucleation Activity of *Xanthomonas campestris* [J]. *Biosci Biotech Biochem*, 1994, 58(1): 64~66
- 5 Watanabe M, Makino T, Kumeno K et al. High-pressure sterilization of ice nucleation-active bacterial cells [J]. *Agric Biol Chem*, 1991, 55: 291~292
- 6 王素英,陈庆森. 天津市蔬菜叶表冰核活性细菌的鉴定[J]. *食品科学*, 2000, 21(11): 54~56
- 7 刘健,陈庆森. *X. ampelina* TS206 发酵生产冰核活性蛋白的研究[J]. *生物技术*, 2000, 12(6): 33~34
- 8 Lindow S E. Plant Cold Hardiness and Freezing Stress [M]. Sakai A, Li PH. eds. New York: Academic Press, 1982. 395~416

Effect of Food-originated Compounds on the Ice-nucleation Active Bacteria

Song Liping Chen Qingsen Ji Ruifang

(Department of Biological Engineering, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300400)

ABSTRACT Food-originated compounds enhancing the ice-nucleation active bacteria to express the ice nucleation active protein. The mustard seeds are added in the medium for cell culture of the ice nucleation active bacteria *Xanthomonas ampelina* TS206. It is shown that the activity of the bacteria is increased 37.5% and the biomass is increased 36.2%. The mustard seeds are assumed to be a kind of effectors that can activate the promoter and enhance the initiation of the translation. The compound is an enhancer in the process of the gene express and it increases the productivity of the ice nucleation active protein.

Key words food-originated compounds, ice nucleation activity protein, ice nucleation activity bacteria

(上接第 41 页)

Antimicrobial Activity of Shaddock Peels Extract

Li Chunmei Du Jing Xie Bijun

(Department of Food Science, Huazhong Agriculture University, Wuhan, 430070)

ABSTRACT Shaddock peels extract (SPE) with the content of flavone of 10.9% was obtained using ethanol extraction and its antimicrobial activity against a series of bacterium and mold was studied. It is indicated that SPE can effectively inhibit the growth of bacteria. The minimal inhibition concentration (MIC) of SPE to different bacteria are as follows: *Escherichia coli* 2.5%; *Staphylococcus aureus* 2.5%, *salmonella* >2.5%. It is seen that pH value and temperature affect the antibacterial activity of the SPE. SPE was more effective under acid condition. The antibacterial activity didn't change remarkably when the sample was treated below 50°C but it will decrease when temperature is over 80°C. The extract can also inhibit the growth of mold, the inhibit rate of the SPE to *Aspergillus niger* V, *Tiegh*, *Penicillium* and *Aspergillus otyzae* were 60.5%, 59.5%, 34.3% respectively.

Key words shaddock peels extract, antimicrobial activity

信息窗

澳大利亚利用葡萄渣制作保健食品

香醇的葡萄酒不仅口感好,还有健体强身的作用。最近,澳大利亚科学家利用从加工葡萄酒剩下的残渣中提取的抗氧化剂制成有益健康的椒盐脆饼。

在澳大利亚南部的巴罗萨葡萄酒加工区,每年都会产生大约 1 万吨葡萄渣,研究者从葡萄渣里挑出葡萄籽,再将富含抗氧化剂的葡萄籽皮融化成液体,经过烘干就制成了黄色粉末状的抗氧化剂。将这种抗氧化剂添加到休闲食品中,可制成各种有益健康的小食品。