

# ε-聚赖氨酸抑菌性能研究

李诚, 石磊

(四川农业大学食品学院, 四川 雅安, 625000)

**摘要** 分别采用分光光度法、菌体量法以及孔扩散法研究了ε-聚赖氨酸对细菌和真菌的抑菌活性及ε-聚赖氨酸浓度、pH值和温度对其抑菌活性的影响。结果表明,ε-聚赖氨酸对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、黄曲霉、枯草芽孢杆菌、酿酒酵母、保加利亚乳杆菌等6种供试微生物均有一定的抑制作用,对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、保加利亚乳杆菌抑制效果较好,对黄曲霉较差;对各种菌的最小抑菌浓度(MIC)为大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、保加利亚乳杆菌12.5 mg/L;枯草芽孢杆菌25 mg/L;酿酒酵母800 mg/L;黄曲霉1 600 mg/L。ε-聚赖氨酸的抑菌活性随其浓度的增加而增强,热稳定性非常好,能耐100℃的高温,在pH5~8抑菌活性最强,与甘氨酸、Nisin都有协同增效的作用。

**关键词** ε-聚赖氨酸, 抑菌, 最低抑菌浓度

ε-聚赖氨酸(ε-polylysine, 简写ε-PL)是由微生物白色链霉菌发酵合成的一种由赖氨酸单体通过ε-酰胺键形成的多肽<sup>[1]</sup>,可直接吸附到细胞膜上,最终导致细胞死亡<sup>[2]</sup>,或者抑制细菌的呼吸作用,同时作用于细胞膜和蛋白合成系统,与核糖体结合抑制蛋白和酶的合成,从而达到杀菌目的<sup>[3,4]</sup>。ε-PL能在人体内分解为赖氨酸,不但没有任何毒副作用,而且可以作为一种赖氨酸的来源。因此,ε-PL属于天然抑菌剂。

作为新型的天然防腐剂,ε-PL已于2003年10月被FDA批准为安全食品保鲜剂。迄今为止,ε-PL的微生物发酵在日本已实现工业化,年产千吨。ε-PL的抑菌作用在国外已有一些相关报道,Shoji Shim等报道,ε-PL对真菌、病毒、革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都有明显的抑制作用,具有抑菌谱广、水溶性好、安全性高等特点<sup>[5,6]</sup>。Ezaki等报道,ε-PL能延长沙拉和肉制品的保质期<sup>[7]</sup>。而国内这方面的研究还比较少<sup>[8]</sup>。

本实验研究ε-PL对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、酿酒酵母、黄曲霉和保加利亚乳杆菌等6种常见的食品污染微生物的抑制作用,确定其最小抑菌浓度,从而为ε-PL作为食品抑菌防腐剂应用提供实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 供试菌种

第一作者:博士研究生,副教授。

收稿日期:2008-07-23,改回日期:2008-09-09

细菌:大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、保加利亚乳杆菌;霉菌:黄曲霉;酵母菌:酿酒酵母。

6种供试菌种均为四川农业大学食品科学系微生物实验室保藏菌种。

#### 1.1.2 培养基

细菌采用牛肉膏蛋白胨培养基,酵母菌和霉菌采用马铃薯培养基<sup>[9,10]</sup>。

#### 1.1.3 试剂

ε-聚赖氨酸(Sigma公司);乳酸链球菌素(Nisin,浙江银象生物制品有限公司);磷酸氢二钠(AR,成都科龙化工试剂厂);柠檬酸(AR,成都科龙化工试剂厂);甘氨酸(AR,上海生化技术公司产品);氢氧化钠(AR,成都科龙化工试剂厂)。

#### 1.1.4 主要仪器、设备

低温离心机(Thermo公司);S W-CJ-2FD 净化工作台(苏州净化设备有限公司);微孔滤膜过滤器(上海兴亚净化材料厂);直径25 mm、孔径0.22 μm的微孔滤膜(上海兴亚净化材料厂);HS80 恒温摇床(中国科学院武汉科学仪器厂);直径为8 mm的牛津杯(不锈钢制),游标卡尺等。

## 1.2 方法

### 1.2.1 菌种的活化

将各供试菌种分别接种于新配制的液体培养基中,细菌37℃培养24h,霉菌、酵母菌28℃培养48h,然后分别取0.2 mL倾注培养于平板培养基,再挑取单个生长好的菌落接种于液体培养基中培养。

### 1.2.2 菌(孢子)悬液的制备

吸取 0.2 mL 菌(孢子)悬液于已灭菌的各自适宜的平板培养基中,再向平板中倒入溶化后冷却至 45℃左右的培养基,细菌 37℃培养 24h,酵母菌、霉菌 28℃培养 48h,平板计数。根据得到的菌(孢子)悬液的浓度进行稀释,吸取 1.0 mL 菌原液加入 9.0 mL 无菌生理盐水中,得到稀释 10 倍的菌悬液,依次进行梯度稀释,直到得到  $10^6 \sim 10^7$  个/L 的菌(孢子)悬液。

### 1.2.3 最小抑菌浓度(MIC)的测定

通过不同浓度配比的  $\epsilon$ -PL 的单因素实验,进而确定各供试菌种的最小抑菌浓度。

含不同浓度抑菌剂培养基制备:将  $\epsilon$ -PL 母液分别定量加入到融化的培养基,使之彻底溶解,制成含 3.125 mg/L、6.25 mg/L、12.5 mg/L、25 mg/L、50 mg/L、100 mg/L、200 mg/L、400 mg/L、800 mg/L、1600 mg/L 不同浓度抑菌剂的平板。抑菌液用无菌蒸馏水配制,且用灭菌的微孔过滤器过滤后备用,下同。

接种培养:将 1.2.2 中的各细菌、酵母菌菌悬液以及霉菌孢子悬液分别取 0.2 mL 倾注到含有不同  $\epsilon$ -PL 浓度的平板上,涂布均匀,细菌 37℃培养 24 h,酵母菌和霉菌 28℃培养 48 h,然后观察各平板菌落的生长情况并计算 MIC 值。平行操作 3 次,取平均值。

### 1.2.4 抑菌效力的测定

分光光度法:分别取 1.2.2 中稀释好的细菌、酵母菌菌悬液 10 mL。以最低抑菌浓度为依据,菌液添加相应浓度的  $\epsilon$ -PL 150  $\mu$ l,并以不加  $\epsilon$ -PL 的培养基作为对照。细菌 37℃、酵母菌 28℃摇床培养,每隔 8 h 测定 1 次吸光度值  $A_{560}$ ,连续测定 6 次。平行操作 3 次,取平均值。

菌体重量法:方法同上。28℃摇床培养,每隔 12h 各取 1 瓶培养液,3000r/min 离心 10 min,再用蒸馏水洗涤 3 次,105℃烘干至恒重,称量并计算菌体干重,连续测定 8 次。平行操作 3 次,取平均值。

### 1.2.5 不同温度对 $\epsilon$ -聚赖氨酸抑菌活性的影响

分别移取 400 mg/L  $\epsilon$ -PL 150  $\mu$ L 于 5 个 EP 管中,分别在 25℃、45℃、55℃、75℃、100℃水浴中浸泡加热 30 min,冷却后备用。采用孔扩散法测定不同温度处理后的抑菌液的抑菌圈的直径,平行操作 3 次,取平均值。

### 1.2.6 不同 pH 值对 $\epsilon$ -聚赖氨酸抑菌活性的影响

用 0.1 mol/L, pH 为 3.0~8.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液和 pH 9~10 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液配制 pH 值为 3、4、5、6、7、8 和 9,共 7 个梯度,浓度为 400 mg/L 的  $\epsilon$ -PL 的溶液。分别移取不同 pH 的  $\epsilon$ -PL 溶液 150  $\mu$ L,采用孔扩散法测定不同 pH 的  $\epsilon$ -PL 溶液的抑菌圈直径,平行操作 3 次,取平均值。

### 1.2.7 $\epsilon$ -PL、Nisin 和甘氨酸及其复配抑菌功效比较

打孔扩散法:用灭菌的琼脂对平板进行封底,牛津杯(直径为 8mm)置于凝固的琼脂上,等距离放 5 个。再将各菌(孢子)悬液与相应的培养基按 1:10 混合均匀,倾注到平板上。待凝固后,取出牛津杯,分别将  $\epsilon$ -PL、Nisin 和甘氨酸及其复配的抑菌剂加于孔内。抑菌剂的配方见表 1。

表 1 抑菌剂的配方

组别	抑菌剂的配方
A 组	200 mg/L $\epsilon$ -PL
B 组	40 mg/L Nisin
C 组	20 mg/L 甘氨酸
D 组	200mg/L $\epsilon$ -PL+20 mg/L 甘氨酸
E 组	200mg/L $\epsilon$ -PL+20mg/L 甘氨酸+40 mg/L Nisin

细菌在 37℃下培养 24 h;酵母菌、霉菌在 28℃培养下 48h。测定抑菌圈直径大小,确定抑菌效果。每个试验平行 3 次,取平均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 $\epsilon$ -聚赖氨酸的最小抑菌浓度(MIC)

$\epsilon$ -聚赖氨酸对 6 种供试微生物菌的 MIC 试验结果见表 2 和图 1。

表 2 不同浓度  $\epsilon$ -聚赖氨酸最低抑菌浓度试验结果

供试菌种	$\epsilon$ -PL 的浓度/mg · L <sup>-1</sup>									
	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	400	800	1600
大肠杆菌	++	+-	-	-	-	-	-	-	-	-
金黄色葡萄球菌	++	+-	-	-	-	-	-	-	-	-
枯草芽孢杆菌	+++	++	+-	-	-	-	-	-	-	-
保加利亚乳杆菌	++	+-	-	-	-	-	-	-	-	-
黄曲霉	++++	+++	+++	++	++	++	++	+-	+-	-
酿酒酵母	+++	+++	+++	++	++	++	++	+-	-	-

注:“-”表示菌体不生长,“+-”表示有菌体略有生长,“++”“+++”“++++”分别表示菌体生长情况。

由表 2 可知, $\epsilon$ -PL 对 6 种供试菌种的生长均有

显著的抑制作用,并且随着  $\epsilon$ -PL 浓度的增加,抑制功

效明显增强。 $\epsilon$ -PL 抑菌谱广,对革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌都有强烈的抑制作用,对霉菌和酵母的抑制作用相对较弱。 $\epsilon$ -PL 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、

保加利亚乳杆菌的最小抑菌浓度为 12.5mg/L, 枯草芽孢杆菌的 MIC 为 25 mg/L, 酿酒酵母的 MIC 为 800 mg/L, 黄曲霉的 MIC 为 1 600 mg/L。

12.5 mg/L  $\epsilon$ -PL                      6.25 mg/L  $\epsilon$ -PL                      3.125 mg/L  $\epsilon$ -PL

图 1 不同浓度  $\epsilon$ -PL 对大肠杆菌的抑制效果

### 2.2 $\epsilon$ -聚赖氨酸的抑菌效力

采用分光光度计法和菌体干重法对聚赖氨酸的抑菌性进行研究,比较  $\epsilon$ -PL 对 6 种常见微生物的抑制效果,结果如图 2~图 7 所示。

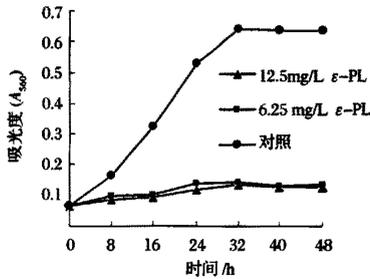


图 2  $\epsilon$ -PL 对大肠杆菌的抑制作用

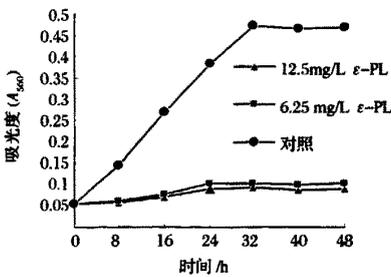


图 3  $\epsilon$ -PL 对金黄色葡萄球菌的抑制作用

从图 2~图 5 可以看出, $\epsilon$ -PL 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和保加利亚乳杆菌均有明显的抑制作用。被抑制的菌既有革兰氏阳性菌又有革兰氏阴性菌,既有球菌又有杆菌。

从图 6 可见,添加 12.5mg/L  $\epsilon$ -PL 对酿酒酵母几乎没有抑菌作用;但添加 400mg/L 和 800mg/L  $\epsilon$ -PL 对酿酒酵母有明显的抑菌作用,这与在 MIC 测定中发现酿酒酵母的 MIC 为 800 mg/L 相吻合。

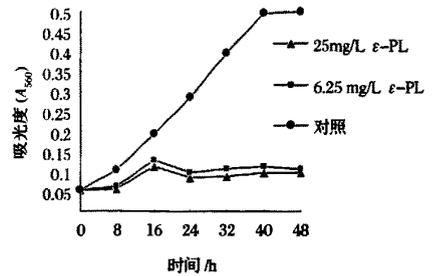


图 4  $\epsilon$ -PL 对枯草芽孢杆菌的抑制作用

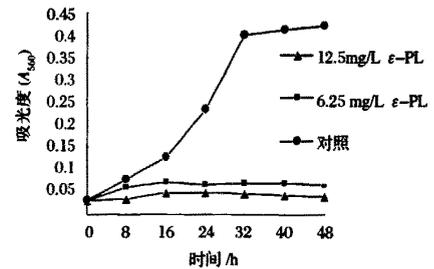


图 5  $\epsilon$ -PL 对保加利亚乳杆菌的抑制作用

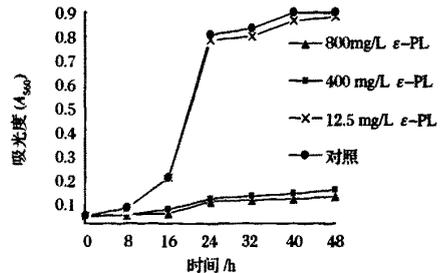


图 6  $\epsilon$ -PL 对酿酒酵母的抑制作用

图 7 看出,添加 12.5mg/L  $\epsilon$ -PL 对黄曲霉几乎没有抑菌作用,添加 1600mg/L  $\epsilon$ -PL 能有效地抑制黄曲霉生长繁殖。可见  $\epsilon$ -PL 对黄曲霉抑制比较弱。

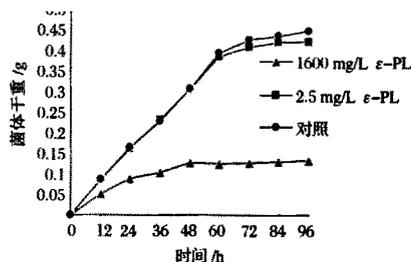


图7 ε-PL对黄曲霉的抑制作用

### 2.3 热处理对ε-聚赖氨酸抗菌效力的影响

热处理对ε-PL抗菌效力影响的实验结果见表3。从表3可以看出,ε-PL水溶液分别经25℃、45℃、55℃、75℃、100℃加热30 min后,各供试菌的抑菌圈直径变化不大,在25~100℃,经过高温处理与未经过高温处理的ε-PL对微生物的抑制作用无明显差异,即说明在25~100℃,ε-PL不分解,不失活。

表3 ε-聚赖氨酸热处理对抗菌效力的影响

处理温度	抑菌圈直径/mm				
	25℃	45℃	55℃	75℃	100℃
大肠杆菌	14.04	14.01	13.99	13.97	13.97
金黄色葡萄球菌	12.36	12.37	12.34	12.30	12.28
枯草芽孢杆菌	8.89	8.85	8.82	8.75	8.70
保加利亚乳菌	11.32	11.29	11.28	11.25	11.23
酿酒酵母	9.25	9.23	9.23	9.22	9.21
黄曲霉	0	0	0	0	0

### 2.4 不同pH对ε-聚赖氨酸抗菌效力的影响

不同pH对ε-PL抗菌效力影响结果见表4。

由表4可知,在pH值5~8的时候,ε-PL对各除黄曲霉以外的供试菌种具有较好的抑菌效力,呈现出

清晰透亮的抑菌圈。其中,当pH为7时,ε-PL抑菌效力最好,随着酸性和碱性的增强,ε-PL的抑菌效力下降。

表4 不同pH对ε-PL抑菌效果的影响

pH值	抑菌圈直径/mm					
	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	保加利亚乳杆菌	黄曲霉	酿酒酵母
3	9.19	8.69	0	8.47	0	0
4	9.72	8.93	0	8.59	0	0
5	13.99	12.20	8.43	11.23	0	8.73
6	13.98	12.24	8.54	11.28	0	9.21
7	14.04	12.36	8.89	11.32	0	9.25
8	13.03	10.25	10.02	0	8.52	
9	8.73	8.50	8.23	8.36	0	0

### 2.5 抑菌功效比较试验

ε-PL、Nisin和甘氨酸及其复配的抑菌功效比较

实验的结果见表5。

表5 ε-PL、Nisin和甘氨酸及其复配抑菌功效比较

供试菌种	抑菌圈直径/mm				
	A组	B组	C组	D组	E组
大肠杆菌	14.04	0	0	14.32	14.31
金黄色葡萄球菌	12.36	14.01	0	13.83	14.47
枯草芽孢杆菌	8.89	10.43	9.26	10.72	11.96
保加利亚乳菌	11.32	11.40	0	11.80	12.74
黄曲霉	0	0	0	12.53	12.50
酿酒酵母	9.25	0	0	12.69	12.68

从表5可知,200 mg/L ε-PL与40 mg/L Nisin相比,Nisin抑制金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌生长繁殖的能力明显强于ε-PL;Nisin对大肠杆菌没有明显的抑制作用,而ε-PL对大肠杆菌具有较好的抑

菌效果;同时ε-PL能够对Nisin不能起到影响作用的酿酒酵母呈现出一定的抑菌性。

200 mg/L ε-PL与20 mg/L甘氨酸复配以后的抑菌效果比单一ε-PL的抑菌效果和单一的甘氨酸的

抑菌效果都要好。甘氨酸对细菌有一定的抑制作用,但不能抑制酵母和霉菌的繁殖。单独使用  $\epsilon$ -PL 对枯草芽孢杆菌和黄曲霉抑制不明显, $\epsilon$ -PL 与甘氨酸复配抑制枯草芽孢杆菌和黄曲霉生长繁殖的能力明显强于单一的  $\epsilon$ -PL。这说明  $\epsilon$ -PL 和甘氨酸比单独使用时抑菌范围更加广泛,并具有协同抗菌作用。

200 mg/L  $\epsilon$ -PL, 20 mg/L 甘氨酸, 40 mg/L Nisin 复配与 200mg/L  $\epsilon$ -PL, 20 mg/L 甘氨酸复配相比,对于革兰氏阳性菌抑菌效果得到增加,对于其它菌,两者总体抑菌效果差别不大。

### 3 结论

(1) $\epsilon$ -PL 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、黄曲霉、枯草芽孢杆菌、酿酒酵母、保加利亚乳杆菌等食品常见微生物均有一定的抑制作用, $\epsilon$ -PL 有着广谱的抑菌能力。

(2) $\epsilon$ -PL 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、保加利亚乳杆菌的最低抑菌浓度 MIC 为 12.5 mg/L,对枯草芽孢杆菌的 MIC 为 25 mg/L,对酿酒酵母的 MIC 为 800 mg/L,对黄曲霉的 MIC 为 1 600 mg/L。

(3) $\epsilon$ -PL、甘氨酸和 Nisin 复配与  $\epsilon$ -PL、甘氨酸复配相比,对金黄色葡萄球菌、保加利亚乳杆菌和枯草芽孢杆菌的抑菌效果得到增加,对于大肠杆菌、酿酒酵母和黄曲霉,两者总体抑菌效果差别不大。 $\epsilon$ -PL 和甘氨酸具有很强的协同抗菌作用,而  $\epsilon$ -PL、甘氨酸和 Nisin 复配协同抗菌作用进一步加强。

(4) $\epsilon$ -PL 热稳定性非常好,能耐 100℃ 高温,加热后其抑菌效果基本不受影响。因此,在食品生产加工

时, $\epsilon$ -PL 加入后,可与食品一同进行热处理,二次灭菌,从而达到延长食品保存期的目的。

(5) $\epsilon$ -PL 抗菌活性具有较宽的 pH 值范围,在中性、弱酸性、微碱性环境中有较强的抑菌性,而在过酸或者过碱的条件下抑菌效果不是很好。最适 pH 值为 5~8。

通过本实验对  $\epsilon$ -PL 抑菌特性的研究,可为  $\epsilon$ -PL 在食品防腐保鲜上的应用提供实验依据。

### 参 考 文 献

- 1 Shima S, Sakai H. Poly-L-lysine produced by *Streptomyces*, Part III [J]. Chemical studies. Agric Biol Chem, 1981, 45(11):2503~2508
- 2 Vaara M. Agents that increase the permeability of the outer membrane[J]. Microbiol Rev, 1992, 56:395~411
- 3 Mitsuaki Kito, Rika Takimoto, Toyokazu Yoshida, et al. Purification and characterization of an  $\epsilon$ -poly-L-lysine-degrading enzyme from an  $\epsilon$ -poly-L-lysine-producing strain of *Streptomyces albulus* [J]. Arch Microbiol, 2002, 178:325~330
- 4 Shima S, Matsuoka H, Iwamoto T, et al. Antimicrobial action of epsilon-poly-L-lysine [J]. J Antibiot, 1984, 37(11):1449~1455
- 5 Hiraki J. Basic and applied studies on  $\epsilon$ -polylysine [J]. J Antibact Antifungal Agents, 1995, 23:349~354
- 6 Shoji Shima. Antimicrobial action of  $\epsilon$ -poly-L-lysine [J]. Journal of antibiotics, 1984, 37:1449~1445
- 7 Ezaki Milsuo. Manufacture of salads and meat products using Preservatives [P]. Jpn, Kokai Tokyo koho. 04304840, 1993
- 8 尤新. 食品安全和食品防腐抗氧保鲜剂 [J]. 食品科技, 2006(1):1~4
- 9 牛天贵. 食品微生物学实验技术 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002. 171~172
- 10 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验 (第三版) [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000. 121

## Study on the Antimicrobial Activity of $\epsilon$ -Polylysine

Li Cheng, Shi Lei

(College of Food, Sichuan Agriculture University, Yaan 625000, China)

**ABSTRACT** The anti-microbial activity of  $\epsilon$ -Polylysine and its effect factors (including concentration, pH value, temperature) were studied by spectrophotometry, dry bacteria cell weight and aperture pervasion method. The results showed that  $\epsilon$ -Polylysine had a inhibition function on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus flavus*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus bulgaricus*, the antimicrobial action was especially notable to *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Lactobacillus bulgaricus*, and it was not very effective to *Aspergillus flavus*. The minimal inhibitory concentration (MIC) was 12.5mg/L for *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Lactobacillus bulgaricus*, 25 mg/L for *Bacillus subtilis*, 800mg/L for *Saccharomyces cerevisiae*, 1 600mg/L for *Aspergillus flavus*. And it was proved that the stronger the concentration of  $\epsilon$ -PL is, the stronger the anti-microbial activity is. It was also proved that  $\epsilon$ -Polylysine has very good thermal stability, being able to endure as high as 100℃ temperature and it can be effective from pH5~8. Besides, the addition of glycine or Nisin can improve antimicrobial activity of  $\epsilon$ -Polylysine.

**Key words**  $\epsilon$ -polylysine, bacteriostasis, minimal inhibitory concentration