



引用格式:李迎秋,郝曼,崔凯宇,等.大豆球蛋白碱性肽对黑曲霉和青霉的抑制效果研究[J].轻工学报,2016,31(3):33-38.

中图分类号:TS202.3 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2016.3.005

文章编号:2096-1553(2016)03-0033-06

大豆球蛋白碱性肽对黑曲霉和青霉的抑制效果研究

Research of the inhibitory effect of GBP against *Penicillium sp.* and *Aspergillus*

李迎秋,郝曼,崔凯宇,孙秀秀

LI Ying-qiu,HAO Man,CUI Kai-yu,SUN Xiu-xiu

齐鲁工业大学 食品科学与工程学院,山东 济南 250353

College of Food Science and Engineering, Qilu University of Technology, Jinan 250353, China

关键词:

大豆球蛋白碱性肽;青霉;黑曲霉;抑菌效果

Key words:

GBP; *Aspergillus*; *Penicillium sp.*; bacteriostasis effect

摘要:以大豆球蛋白碱性肽(GBP)为研究对象,考察了GBP对黑曲霉和青霉的抑制效果.实验结果表明,GBP对两种霉菌均具有显著的抑菌作用,且随着GBP质量浓度的增大,抑菌效果愈加明显;GBP能够抑制孢子的萌发和菌丝的生长,且随着其质量浓度增大,抑制作用增强;电导率测定结果表明GBP能够增大霉菌细胞膜的通透性.因此,GBP可以作为一种天然防腐剂应用于食品保解.

收稿日期:2015-11-02

基金项目:国家自然科学基金项目(31371839);山东省高等学校科技计划项目(J13LE02);山东省重点研发计划项目(2015GSF120006)

作者简介:李迎秋(1972—),女,山东省菏泽市人,齐鲁工业大学教授,博士,主要研究方向为食品生物技术、粮油加工及食品安全评价.

Abstract: The antifungal activity of GBP against *Penicillium sp.* and *Aspergillus* was evaluated. The results showed that GBP had strong antifungal activity against the two tested fungi. The antifungal activities increased with the increase of GBP concentration. Moreover, GBP could directly inhibit the mycelial growth and spore germination. The inhibitory effect of GBP against *Penicillium sp.* and *Aspergillus* increased with increasing concentration of GBP. The obvious increase in electric conductivity of hyphae suspension indicated that GBP could increase the membrane permeability of *Penicillium sp.* and *Aspergillus*. Therefore, GBP could serve as a natural preservative used in food preservation.

0 引言

大豆球蛋白碱性肽(GBP)是从大豆球蛋白中分离提取的一种碱性多肽,属于阳离子肽,其分子量将近 20 KDa,通过 1 个二硫键与大豆球蛋白酸性肽链接^[1-3]. GBP 具有很好的热稳定性、安全性和抗菌性. 已有研究表明,质量浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 GBP 对李斯特菌、肠炎沙门氏菌、芽孢杆菌等致病微生物有显著的抑制作用^[4]. 霉菌是引起食物腐败变质的主要菌种之一,在食品中添加防腐剂来抑制霉菌生长是食品保鲜的重要途径. 而我国目前允许使用的防腐剂大多是化学防腐剂,对人体健康可能产生不良影响,所以研制天然的防腐剂用于食品保鲜具有重要意义. 本文拟研究 GBP 对霉菌的抑菌效果,以判别其能否作为一种天然的防腐剂应用于食品保鲜,延长食品的货架期.

1 材料与amp;方法

1.1 材料与仪器

主要材料:GBP,实验室制得;察氏培养基:硝酸钠,氯化钾,磷酸二氢钾,硫酸镁,硫酸铁,蔗糖,均为分析纯,购于天津市科密欧化学试剂有限公司;琼脂(生化试剂),购于蓝宇科技试剂公司;黑曲霉、青霉,从米饭中分离、培养得到.

主要仪器:立式压力蒸汽灭菌器,上海博讯实业有限公司医疗设备厂产;AL204 型电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司产;SW-CJ-2F 型双人双面净化工作台,苏州净

化设备有限公司产;DHZ-C 型大容量恒温振荡器,上海福玛实验设备有限公司产;TopPette 移液枪,大龙兴创实验仪器(北京)有限公司产;DDS-307 电导率仪,上海精密科学仪器有限公司产;牛津杯(内径 $\phi 6\text{ mm} \times 8\text{ mm} \times 10\text{ mm}$),购于蓝宇科技试剂公司;打饼器,购于蓝宇科技试剂公司;CX41RF 光学显微镜,血球计数板 $74\text{ mm} \times 35\text{ mm} \times 5\text{ mm}$,上海市求精生化试剂仪器有限公司产.

1.2 实验方法

1.2.1 孢子悬浮液的制备 取已培养好的斜面菌种 1 支,加入 5 mL 无菌水,轻轻将琼脂表面的孢子刮下,将该孢子悬浮液置于已灭菌的 50 mL 三角瓶内,瓶中预先放置数粒无菌玻璃球,充分振摇后用灭菌的脱脂棉(灭菌的 4 层纱布或擦镜纸)进行过滤,并用无菌水冲洗滤渣 2—3 次,最终得到质量浓度为 1×10^5 孢子/mL 的孢子悬浮液.

1.2.2 抑菌圈实验 采用牛津杯法^[5]评价 GBP 对黑曲霉和青霉的抑制效果,用无菌镊子向培养皿中加入约 20 mL 察氏培养基,冷却后,取 100 μL 质量浓度为 1×10^5 孢子/mL 的孢子悬浮液于培养皿表面,用涂布器均匀涂布,用无菌镊子将无菌牛津杯放在涂完菌液的培养基表面,每个培养皿放置 3 个牛津杯,呈正三角形,向其中 2 个牛津杯中注入 150 mL 相同质量浓度的 GBP 溶液作为实验组,另一个牛津杯中加入 150 mL 无菌蒸馏水作为对照,不同培养皿实验组中的牛津杯被注入的 GBP 溶液浓度分别为 0.4 mg/mL, 0.8 mg/mL, 1.2 mg/mL,

1.6 mg/mL, 2.0 mg/mL, 2.4 mg/mL, 将培养皿置于恒温培养箱中, 28 °C 培养 3 d. 观察、测量抑菌圈直径大小.

1.2.3 孢子萌发率的测定^[6] 制备黑曲霉孢子悬浮液, 备用. 取 6 个 50 mL 三角瓶, 倒入一定量的察氏液体培养基, 然后向其中 5 个三角瓶中加入 GBP, 使 GBP 最终质量浓度分别为 0.2 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.8 mg/mL, 1.6 mg/mL 和 3.2 mg/mL, 作为实验组, 另一个不加 GBP 的三角瓶作为对照组. 向每个三角瓶中分别接入黑曲霉孢子悬浮液, 使其浓度为 1×10^5 孢子/mL, 然后在恒温 (28 °C) 摇床中振动培养 20 h, 每个质量浓度做 3 个平行, 以孢子抽出芽管、长出菌丝作为孢子萌发的标志, 用血球计数板在显微镜下观察孢子萌发的情况, 计算孢子的萌发率. 青霉孢子萌发率的测定方法与上述方法相同.

1.2.4 菌丝生长抑制率的测定 将程婵娟^[7]的方法做一些合理改变以测定 GBP 对黑曲霉和青霉菌丝的抑制生长率. 取两种霉菌的孢子悬浮液 100 μ L 涂布于直径为 9 cm 的察氏培养基平板上, 并将其放置于霉菌培养箱中, 28 °C 条件下培养 3 d, 备用. 将察氏培养基和 GBP 溶液均匀混合, 使混合液中 GBP 的最终质量浓度为 0.0 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.8 mg/mL, 1.2 mg/mL, 1.6 mg/mL, 2.0 mg/mL 和 2.4 mg/mL, 趁热倒入直径为 9 cm 的培养基平板中, 冷却. 用灭菌打孔器在培养 3 d 的霉菌察氏培养基上沿平板边缘大孔得到直径为 1 cm 的菌栓, 将菌栓放置在已冷却的混合培养基中央, 菌丝面朝下, 然后放入霉菌培养箱, 28 °C 条件下培养 7 d, 观察菌丝覆盖的面积, 测量直径, 菌丝生长抑制率/% 用下式计算:

菌丝生长抑制率 = (对照组菌丝直径 -

实验组菌落直径) / 对照组菌落直径 $\times 100\%$

1.2.5 电导率测定 参照 S. Paul^[8] 描述的方

法测定 GBP 作用于黑曲霉、青霉后电导率的变化, 以评价 GBP 对黑曲霉、青霉细胞膜通透性的影响. 将 100 μ L 霉菌孢子悬浮液 (1×10^5 孢子/mL) 于 20 mL 液体察氏培养基中, 28 °C 下培养 48 h, 将其菌液在 4 000 r/min 条件下离心 10 min, 并用无菌蒸馏水洗涤两次; 菌丝体再次悬浮在 20 mL 无菌蒸馏水. 将不同质量浓度 (0.0 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.8 mg/mL, 1.6 mg/mL, 3.2 mg/mL) 的 GBP 溶液分别加入上述菌悬液, 用无菌水代替 GBP 作为对照组. 用电导率仪分别测定黑曲霉混合菌液在 0 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min 的电导率值.

2 结果与讨论

2.1 GBP 对霉菌的抑制效果

采用牛津杯方法, 通过有无抑菌圈和抑菌圈直径大小来评价 GBP 的抑菌效果, 抑菌圈直径越大, 其抑菌效果越显著. 图 1 和图 2 分别为 GBP 处理黑曲霉、青霉的抑制效果图. 从图 1 和图 2 中可以看出, 黑曲霉和青霉培养基中对照组牛津杯周围都长满了霉菌, 没有出现抑菌圈, 而 1.2 mg/mL GBP 的牛津杯周围出现抑菌圈, 且抑菌圈较明显. 表 1 为 GBP 对黑曲霉、青霉抑菌圈直径. 从表 1 可知, 随着 GBP 质量浓度从 0.0 mg/mL 增加到 2.4 mg/mL, 黑曲霉中牛津杯抑菌圈直径从 0 mm 增大到约 20 mm, 青霉中牛津杯抑菌圈直径从 0 mm 增大到约 22 mm. 与其他质量浓度相比, 经 2.4 mg/mL GBP 处理的抑菌圈直径最大, 说明 2.4 mg/mL GBP 对黑曲霉和青霉的抑菌效果最好. 由此得出结论: GBP 对黑曲霉和青霉均有较明显的抑制作用; GBP 质量浓度越大, 其抑菌效果越明显.

2.2 GBP 对霉菌孢子萌发的影响

图 3 和图 4 分别为不同质量浓度 GBP 对黑曲霉和青霉孢子萌发的影响. 由图 3 和图 4



图1 GBP处理黑曲霉的抑制效果图

Fig.1 Photo of antifungal activity of *Penicillium sp.* treated with GBP

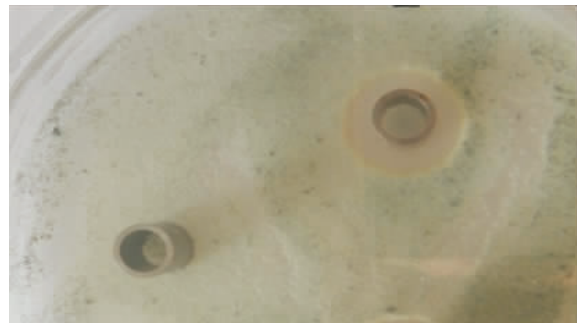


图2 GBP处理青霉的抑制效果图

Fig.2 Photo of antifungal activity of *Aspergillus* treated with GBP

表1 牛津杯法测定不同质量浓度GBP对黑曲霉和青霉抑菌圈直径

Table 1 The diameters of the inhibition zones with the different concentrations GBP against *Penicillium sp.* and *Aspergillus*

霉菌	GBP质量浓度/(mg·mL ⁻¹)						
	0.0	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0	2.4
黑曲霉	0	8 ± 0.3	10 ± 0.1	13 ± 0.5	16 ± 0.1	18 ± 0.4	20 ± 0.2
青霉	0	9 ± 0.2	12 ± 0.1	15 ± 0.3	18 ± 0.3	19 ± 0.1	22 ± 0.3

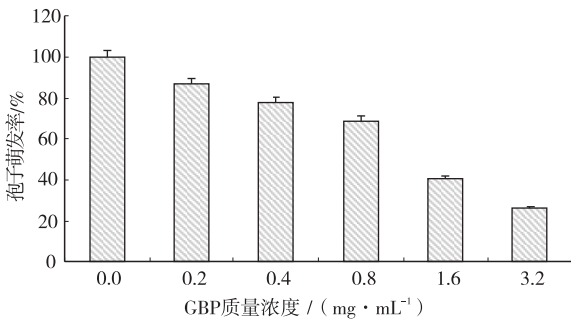


图3 不同质量浓度的GBP对黑曲霉孢子萌发的影响

Fig.3 Effects of the different concentrations of GBP on spore germination of *Penicillium sp.*

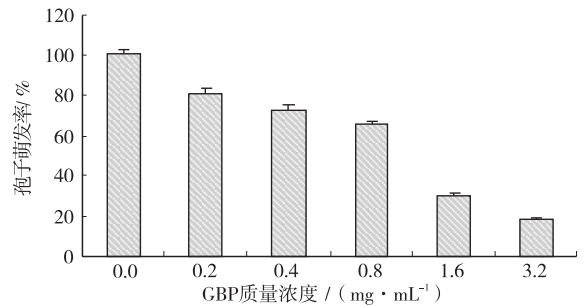


图4 不同质量浓度的GBP对青霉孢子萌发的影响

Fig.4 Effects of the different concentrations of GBP on spore germination of *Aspergillus*

可以看出,对照组中所有孢子都产生萌发,萌发率为100%,而实验组中孢子萌发率与对照组相比明显下降,且随着GBP质量浓度的增加,黑曲霉和青霉孢子萌发率均逐渐降低.当GBP质量浓度为3.2 mg/mL时,黑曲霉的孢子萌发率低于30%,青霉的孢子萌发率低于20%.上述结果表明:GBP能抑制黑曲霉和青霉孢子的

萌发;随着GBP质量浓度的增大,其对黑曲霉和青霉孢子的萌发抑制效果愈加显著.

2.3 GBP对菌丝生长的影响

经不同质量浓度GBP处理的黑曲霉和青霉菌丝抑菌率的变化见图5,菌落直径大小见表2.从图5和表2中可知,GBP对黑曲霉和青霉菌均具有明显的抑制作用,在较低质量浓度(0.4 mg/mL)条件下,黑曲霉的菌落直径约为

表2 不同质量浓度 GBP 处理黑曲霉和青霉的菌落直径

Table 2 The colony diameters of *Penicillium sp.* and *Aspergillus* treated with the different concentrations GBP

霉菌	GBP 质量浓度/(mg · mL ⁻¹)						
	0.0	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0	2.4
黑曲霉	3.0 ± 0.2	2.5 ± 0.3	2.3 ± 0.1	2.1 ± 0.5	1.8 ± 0.1	1.6 ± 0.4	1.3 ± 0.2
青霉	3.0 ± 0.1	2.0 ± 0.2	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.3	1.4 ± 0.3	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.3

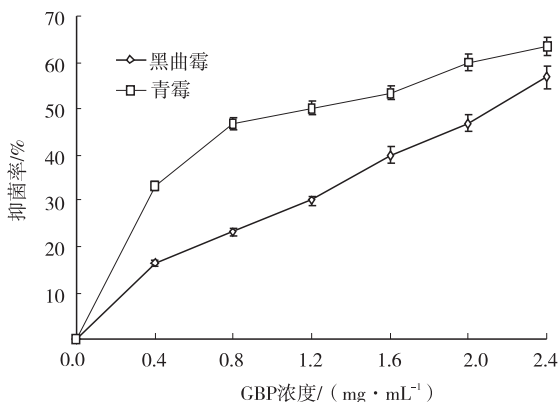


图5 不同质量浓度 GBP 的菌丝生长抑制率

Fig. 5 Effects of the different concentrations of GBP on the mycelial growth of *Penicillium sp.* and *Aspergillus*

2.5 cm, 低于对照组 (3.0 cm), 其抑菌率为 16.7%; 青霉的菌落直径约为 2.0 cm, 也低于对照组, 其抑菌率为 33.3%。随着 GBP 质量浓度的增大, 抑菌率增大。当 GBP 质量浓度为 2.4 mg/mL 时, 黑曲霉菌落直径约为 1.3 cm, 青霉菌落直径约为 1.1 cm, 此时黑曲霉抑菌率升高到 56.7%, 青霉抑菌率升高到 63.3%。上述研究结果表明: GBP 对黑曲霉和青霉有明显的抑菌作用; GBP 质量浓度越大, 其抑菌效果越明显。

2.4 GBP 对霉菌电导率的影响

2.4.1 GBP 对黑曲霉电导率的影响

通过测定黑曲霉、青霉的电导率变化, 研究不同质量浓度 GBP 对霉菌细胞膜通透性的影响。添加不同质量浓度 GBP 后黑曲霉的电导率变化如图 6 所示。由图 6 可以看出, 随着时间的增加, 对照组电导率变化较小; 而经 GBP 处理的黑曲霉的

电导率随着处理时间的增加逐渐增大。在同一时间条件下, 黑曲霉的电导率随着 GBP 质量浓度的增大而增大, 其中用 1.6 mg/mL, 3.2 mg/mL GBP 处理的黑曲霉的电导率变化较明显。因此, GBP 对黑曲霉细胞膜通透性有影响, 随着其质量浓度的增大, 对黑曲霉细胞膜通透性的影响也增大; 同一质量浓度下, 在一定时间范围内, 随着时间的增加, GBP 对黑曲霉细胞膜通透性的影响增大。

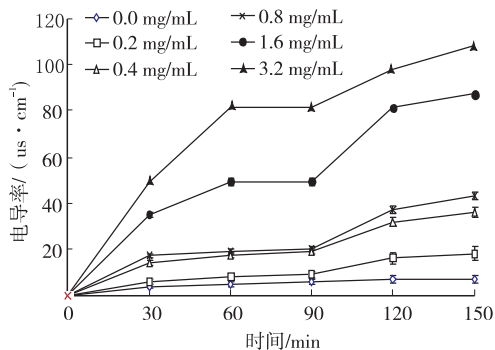


图6 不同质量浓度 GBP 对黑曲霉电导率的影响

Fig. 6 Effects of the different concentrations of GBP on the electric conductivity of *Penicillium sp.*

2.4.2 GBP 对青霉电导率的影响

添加不同质量浓度 GBP 后青霉的电导率变化如图 7 所示。由图 7 可以看出, 随着时间的增加, 对照组中青霉的电导率变化较小, 而经 GBP 处理的青霉的电导率随着时间的延长而增大。在同一时间条件下, 青霉的电导率随着 GBP 质量浓度的增大而增大, 其中用 1.6 mg/mL, 3.2 mg/mL GBP 处理的青霉的电导率增加较显著。前 30 min 经 GBP 处理的青霉的电导率增加较快, 120 min

之后趋于平稳. 因此, GBP 对青霉细胞膜的通透性有影响, 随着其质量浓度增大, 影响效果增强; 同一质量浓度下, 在一定时间范围内, 随着时间的增加, GBP 对青霉细胞膜的通透性的影响增大.

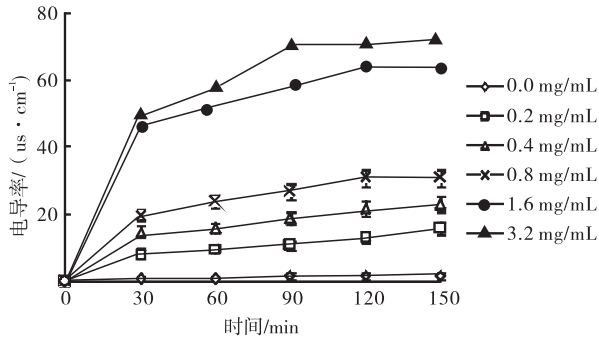


图7 不同质量浓度 GBP 对青霉电导率的影响

Fig.7 Effects of the different concentrations of GBP on the electric conductivity of *Aspergillus*

上述结果表明, 用不同质量浓度的 GBP 处理黑曲霉、青霉, 其电导率变化趋势相似: 随着时间延长, 霉菌电导率增大; GBP 质量浓度越大, 霉菌电导率变化越明显. 由此可见 GBP 能增大霉菌细胞膜的通透性.

3 结论

本文研究了 GBP 对黑曲霉和青霉的抑制效果. 牛津杯实验结果表明, GBP 对两种霉菌均具有显著的抑菌作用, 且随着 GBP 质量浓度的增大, 抑菌效果愈加明显. 菌丝生长抑制率和孢子萌发率的测定结果表明, GBP 能够抑制孢子的萌发和菌丝的生长, 且随着其质量浓度增大, 抑制作用增强. 电导率测定结果表明, GBP 能够增大霉菌细胞膜的通透性. 因此, GBP 的上述抑菌效果证明, 它可以作为一种天然防腐剂应用于食品保鲜.

参考文献:

- [1] DAMODARAN S, KINSELLA J E. Effect of conglycinin on the thermal aggregation of glycinin[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 1982, 30(5): 812.
- [2] DELWICHE S R, PORDESIMO L O, PANTHEE D R, et al. Assessing glycinin (11S) and β -conglycinin (7S) fractions of soybean storage protein by near-infrared spectroscopy[J]. Journal of the american oil chemists society, 2007, 84: 1107.
- [3] HU S D, LIU H, QIAO S Y, et al. Development of immunoaffinity chromatographic method for isolating glycinin (11S) from soybean proteins [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2013, 61(18): 4406.
- [4] SITOHY M Z, MAHGOUB S A, OSMAN A O. In vitro and in situ antimicrobial action and mechanism of glycinin and its basic subunit [J]. International journal of food microbiology, 2012, 154: 19.
- [5] 张宽朝, 魏练平, 沈浩, 等. 肉桂醛、柠檬醛抑制黑曲霉生长的比较研究[J]. 中国微生态学杂志, 2011, 23(2): 141.
- [6] 罗曼, 蒋立科, 吴子健. 柠檬醛对黄曲霉质膜损伤机制的初步研究[J]. 微生物学报, 2001, 41(6): 723.
- [7] 程婵娟, 韦伟, 胡尚勤. 柠檬醛对绳状青霉抑制作用研究[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(3): 85.
- [8] PAUL S, DUBEY R C, MAHESWARI D K, et al. *Trachyspermum ammi* (L.) fruit essential oil influencing on membrane permeability and surface characteristics in inhibiting food-borne pathogens[J]. Food control, 2011, 22(5): 725.