

# 4株酸奶噬菌体的分离及其生物学特性

徐成勇<sup>1</sup>, 吴昊<sup>1</sup>, 顾晓琳<sup>1</sup>, 何楚莹<sup>1</sup>, 诸葛健<sup>2</sup>, 郭本恒<sup>1</sup>

(1.光明乳业股份有限公司技术研究中心, 上海 200072;

2.江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

**摘 要:** 从上海市光明乳业股份有限公司车间发酵罐中分离出4株酸奶噬菌体, 电镜下均呈蝌蚪形。1号噬菌体的裂解量为549, 潜伏期小于15min; pH4~6、Ca<sup>2+</sup>浓度为0.04%时对其生长有利, 60℃条件下处理30min时完全失活。2号噬菌体的裂解量为681, 潜伏期小于15min; pH4~8、Ca<sup>2+</sup>浓度为0.04%时对其生长有利, 50℃条件下处理40min时和60℃条件下处理20min时完全失活。3号噬菌体的裂解量为424, 潜伏期小于15min; pH8~10、Ca<sup>2+</sup>浓度为0.06%时对其生长有利, 60℃条件下处理10min时完全失活。4号噬菌体的裂解量为506, 潜伏期小于15min; pH7~8、Ca<sup>2+</sup>浓度为0.04%时对其生长有利, 60℃条件下处理40min时完全失活。

**关键词:** 酸奶; 噬菌体; 嗜热链球菌; 保加利亚乳杆菌; 分离; 生物学特性

## Isolation and Characterization of 4 Bacteriophages Strains in Yoghurt

XU Cheng-yong<sup>1</sup>, WU Hao<sup>1</sup>, GU Xiao-lin<sup>1</sup>, HE Chu-ying<sup>1</sup>, ZHU Ge-Jian<sup>2</sup>, GUO Ben-heng<sup>1</sup>

(1.Technical Center of Shanghai Bright Dairy and Food Co. Ltd, Shanghai 200072, China;

2.Key Laboratory of Industrial Biotechnology under Ministry of Education, School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

收稿日期: 2004-09-14

作者简介: 徐成勇(1968-), 男, 博士后, 主要从事食品生物技术学研究。

### 3 结 论

通过实验, 可以得出以下几点结论。

3.1 稀淀粉体系的回生导致溶液出现白浊、沉淀等现象, 用粘度测定法可以准确、简便地表征其变化。

3.2 酶法测定和DSC无法表征稀淀粉溶液的回生, 这可能是因为: 回生仅产生少量的新晶型, 导致样品的“结晶熔融”和抗酶解力的增加均十分有限。

3.3 纯糯米粉体系中, 海藻糖的回生抑制效果可通过粘度法测出。

3.4 在淀粉体系和含有白砂糖的复合体系中, 海藻糖有回生抑制作用。

3.5 -20℃保存有利于延缓淀粉的老化, 无海藻糖时频繁的冻/融会加速回生。在添加海藻糖后, 频繁的冻/融过程能强化其回生抑制作用。

### 参考文献:

[1] 姚远, 丁霄霖, 吴加根. 淀粉回生研究进展(I)回生机理、

回生测定方法及淀粉种类对回生的影响[J]. 中国粮油学报, 1999, 14(2): 24-30.

[2] 涂国云. 海藻糖的性质、生产及应用[J]. 山西食品工业, 2003, (3): 33-35.

[3] Kawai H, Sakurai M, Kobayashi S, et al. Hydration of oligosaccharides: anomalous hydration ability of trehalose [J]. Cryobiology, 1992, 29: 599.

[4] 姚远, 丁霄霖, 吴加根. 淀粉回生研究进展(II)脂类、糖类与淀粉酶对回生的影响[J]. 中国粮油学报, 1999, 14(3): 9-14.

[5] A Abd Karim, M H Norziah, C C Seow. Methods for the study of starch retrogradation[J]. Food Chemistry, 2000, 71: 9-36.

[6] Jeong-Ok Kim, Wan-Soo Kim, Mal-Shick Shin, et al. A comparative study on retrogradation of rice starch gels by DSC, X-ray and  $\alpha$ -amylase methods[J]. Starch, 1997, (49): 71-75.

[7] 周素梅. 合成高聚物理论在淀粉质食品老化中的应用[J]. 西部粮油科技, 1999, 24(5): 30-33.

**Abstract :** 4 bacteriophage strains of yogurt were isolated from a fermentation tank in the plant of Bright Dairy & Food Co., Ltd. By electron microscopy observation, they appeared like tadpole. The burst size of No. 1 bacteriophage was 549, and its latent period was less than 15min. The environment of both pH4~6 and 0.04%  $\text{Ca}^{2+}$  contributed to their growth. But they were deactivated at 60℃ for 30min. The burst size of No. 2 bacteriophage is 681, and its latent period was less than 15min. The environment of both pH4~8 and 0.04%  $\text{Ca}^{2+}$  contributed to their growth. But they were deactivated at 50℃ for 40min or 60℃ for 20min. The burst size of No. 3 bacteriophage was 424, and its latent period was less than 15min. The environment of both pH8~10 and 0.06%  $\text{Ca}^{2+}$  contributed to their growth. But they were deactivated at 60℃ for 10min. The burst size of No. 4 bacteriophage was 506, and its latent period was less than 15min. The environment of both pH7~8 and 0.04%  $\text{Ca}^{2+}$  contributed to their growth. But they were completely deactivated at 60℃ for 40min.

**Key words :** yogurt; bacteriophage; *Streptococcus thermophilus*; *Lactobacillus bulgaricus*; isolation; biological characteristics

中图分类号: Q939.48

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)10-0098-06

在酸奶的生产过程中, 由于发酵原料鲜牛奶是进行巴氏杀菌的, 而且车间的空气和四周环境中存在噬菌体, 造成酸奶发酵过程中噬菌体的经常性污染, 导致发酵时间延长甚至倒罐。由于噬菌体有着很快的繁殖速度和极大的繁殖量, 很多灭菌措施的防治效果都不彻底, 噬菌体污染一直是困扰着酸奶发酵的一大世界性难题<sup>[1]</sup>。关于酸奶噬菌体的研究有助于选育抗噬菌体菌株, 轮换生产菌种。但是, 关于酸奶噬菌体的研究报道较少。

作者从上海市光明乳业股份有限公司的酸奶车间中分离出了4株能感染酸奶乳酸菌的噬菌体, 并对其生物学特性进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*, 缩写为St), 保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*, 缩写为Lb) 由法国 Rhodia 公司提供。

### 1.2 培养基和噬菌体保藏液

嗜热链球菌培养基 德国 Merck 公司的 M17-Agar; 保加利亚乳杆菌培养基 德国 Merck 公司的 MRS-Agar; 噬菌体生长培养基 见参考文献[2]; 噬菌体保藏液 德国 Merck 公司的 M17-Bouillon 和 MRS-Bouillon。

### 1.3 噬菌体的分离、原液制备及纯化

取可疑酸奶样品, 经过 4 000r/min 离心 30min 后, 取上清液, 目的在于离心去掉乳固体、一部分真菌和细菌菌体。利用细菌过滤器(0.45 μm), 过滤上清液到一无菌试管中, 目的在于过滤去掉真菌和细菌菌体, 使得试管中为纯噬菌体悬浮液, 且其浓度得到提高。

8ml 左右的 M17(或 MRS)-Agar 无菌培养基融化并降温至 50℃ 后倒平板作为底层平板。试管中含有 4ml 的

0.8% 琼脂的 M17(或 MRS)-Agar 无菌培养基融化并水浴保温, 无菌条件下加入 0.5ml 的处于对数生长期的 St(或 Lb) 菌悬液、0.5ml 的各个稀释度的噬菌体悬浮液, 振荡混匀后, 立即倒在底层平板上铺平待凝。平皿倒置于厌氧培养箱中进行 37℃ 恒温培养 18~22h, 观察。

以对数生长期的 St(或 Lb) 为指示菌, 以双层琼脂平板法测定各个上清液, 形成的噬菌斑按其形态和大小的不同, 分别连续 5 代单斑穿刺纯化培养。当噬菌斑形态和大小基本稳定时, 可认为噬菌斑已被纯化。

噬菌体原液用固体法制备<sup>[3]</sup>。

用甘油梯度法纯化噬菌体: 加 7ml 噬菌体原液在预制好的 5%~40% 的甘油梯度上, 日立 RPS40T 转头 35000r/min 离心 1h(4℃)。去掉甘油, 沉淀重悬于 0.1ml 的 PDB 中, 透析后保存。

### 1.4 电子显微镜观察

采用附有碳膜的铜网悬滴噬菌体液, 静止片刻, 然后用 pH6.8 的 4%PTA 负染 3min, 铜网在滤纸上自然干燥后, 在日立 H-600 透射电子显微镜下观察。

### 1.5 噬菌体原液的保藏

保存噬菌体的条件为噬菌体原液 4℃, 液态体系为乳清和 M17(或 MRS)液体培养基。

噬菌体存活率的测定: 将待测噬菌体液用无菌移液管进行对倍稀释, 双层平板法记数噬菌斑; 每 7d 测 1 次。

### 1.6 一级生长曲线

方法和步骤见参考文献[1]。

### 1.7 pH 稳定性测定

处理介质为 M17(或 MRS)-Bouillon, 用 NaOH 和 HCl 调节液体培养基的 pH 值, 以 pH 计测 pH 值。将不同 pH 值的 M17(或 MRS)-Bouillon 培养液 9ml 加入试管内, 置于温度为 25℃ 的水浴中, 待温度平衡后加入噬菌体液

1ml, 经过2h处理后, 以同样pH值的M17(或MRS)-Bouillon培养液进行适当稀释, 按双层平板法记数噬菌斑。

### 1.8 热失活测定

将噬菌体液1ml移入9ml的液体培养基中, 在恒定温度(温度设定范围为40~90℃, 10℃为一个梯度)的水浴锅内水浴一定的时间(时间分别控制为10、20、30和40min), 取出样品立即放入冰水中降温, 以M17(或MRS)-Bouillon培养液进行适当稀释, 按双层平板法记数噬菌斑。

### 1.9 $\text{Ca}^{2+}$ 对噬菌体吸附能力的影响

半固体培养基中添加 $\text{CaCl}_2$ , 使 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度分别为0%、0.02%、0.04%、0.06%和0.08%, 以M17(或MRS)-Bouillon培养液进行适当稀释, 按双层平板法记数噬菌斑。

## 2 结果与分析

### 2.1 噬菌体的电镜形态

室温22℃, 相对湿度为60%, 以JY/T 001-1996为检测依据, 在日立H-600透射电子显微镜下观察, 这4株噬菌体的形态和大小见图1~4和表1。

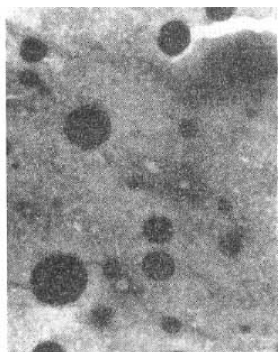


图1 1号噬菌体形态(60000×)  
Fig.1 Shape of No. 1 bacteriophage (60000×)

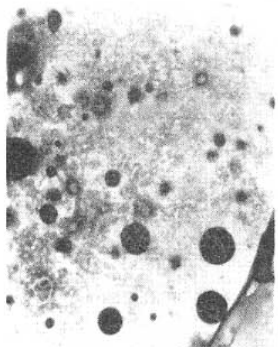


图2 2号噬菌体形态(40000×)  
Fig.2 Shape of No. 2 bacteriophage (40000×)

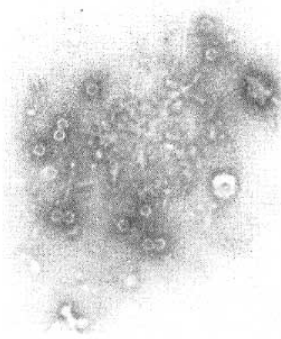


图3 3号噬菌体形态(50000×)  
Fig.3 Shape of No. 3 bacteriophage (50000×)



图4 4号噬菌体形态(50000×)  
Fig.4 Shape of No. 4 bacteriophage (50000×)

表1 4种噬菌体形态结构  
Table 1 Shapes of 4 bacteriophages

样品 编号	头部形状	头部		尾部	
		平均直径 (nm)	平均面积 (nm <sup>2</sup> )	平均长度 (nm)	平均直径 (nm)
1	六角形	95.1	8184.8	403.4	18.3
2	六角形	85.4	8064.2	549.4	23.3
3	六角形	95.5	9792.3	450.5	19.8
4	六角形	119.3	12586.1	520.5	23.6

### 2.2 噬菌体原液的保藏

关于组织、细胞和真菌、细菌、放线菌以及一般病毒的保存条件的研究报道表明, 不管保存这些生物活细胞的保存液是什么, 保存条件都是需要低温保存。4℃保存、低温冻干后4℃保存、-20℃保存、-80℃保存和液氮保存法都是低温保存, 只要哪种方法最简便而有效, 就可以采取。

在4℃条件下, 以乳清悬液作为存储体系, 测定噬菌体的存活率, 经过5个月的连续观察, 见图5。

由图5可见, 噬菌体在开始的44d内, 存活率下降速度很快, 第44d时几乎已经降为原来的1/3。但是,

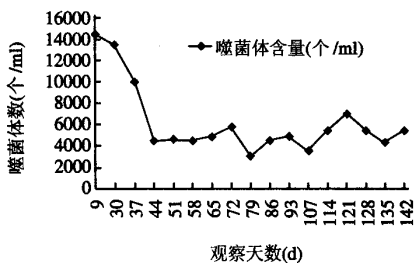


图5 噬菌体存活曲线  
Fig.5 Survival curve of bacteriophage

第44d后,存活率下降速度趋于缓和,虽然实验数据有点上下波动,但基本保持在一个水平上。可见,在4℃条件下,用乳清悬浮液保存噬菌体,即使是保存到第142d,效价也能保持到原来的1/3。

2.3 一级生长曲线

在一定条件下,噬菌体的潜伏期和裂解量是相对衡定的,各种噬菌体在其相应的寄主细胞上表现本身的特征。由图6可见,1号噬菌体自135min至180min均趋于稳定,其裂解量为549。2号噬菌体裂解量为681,3号噬菌体裂解量为424,4号噬菌体裂解量为506。4种噬菌体的潜伏期都小于15min。

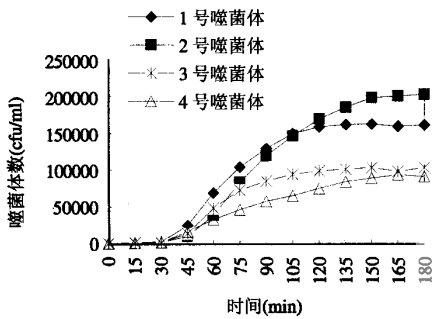


图6 噬菌体的一级生长曲线  
Fig.6 Primary growth curve of bacteriophage

2.4 对pH值稳定性的测定

酸碱度(pH值)是一个容易控制的理化因子,明了环境pH与噬菌体存活之间的关系,就可以在CIP清洗时调整清洗液的pH值来达到杀灭噬菌体的目的,并预防或治理溶源性生产菌株的自身裂解问题。

由图7可见,1号噬菌体在pH4~6的范围内都比较稳定,而pH4以下和pH6以上则活力下降很快,直至失活;2号噬菌体在pH4~8的范围内都比较稳定,而pH4以下和pH8以上则活力下降很快,直至失活;3号噬菌体的抗碱性能力较强一些,在pH8~10的范围内比较稳定,而pH8以下则活力下降很快,直至失活;4号噬菌体在pH7~8的范围内都比较稳定,而pH7以下

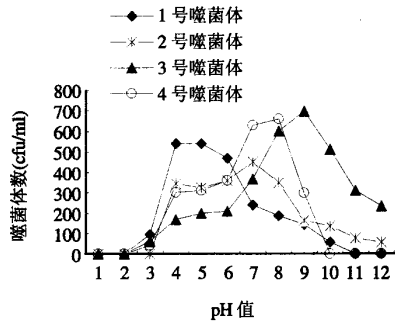


图7 4种噬菌体的pH值稳定曲线(T: 25℃)  
Fig.7 The pH curve of 4 bacteriophages (T: 25℃)

和pH8以上则活力下降很快,直至失活。这反映出4株噬菌体对pH值变化的敏感度不同。

2.5 对热的稳定性

对4种噬菌体进行热灭活性实验,结果见表2、表3、表4和表5。

由表2、表3、表4和表5可见,4种噬菌体对热比较敏感。

同一时间进行不同温度条件处理,4种噬菌体的存活率都要下降很大。可见,温度是影响噬菌体存活的重要因素。

相同温度条件下处理不同的时间:在40℃的水浴中处理,噬菌斑虽然有所减少,但不是很明显;而经过

表2 1号噬菌体热灭活性(噬菌斑:个/皿)  
Table 2 Heat inactivation of No. 1 bacteriophage  
(Plaque: cfu/dish)

温度(℃)	时间(min)			
	10	20	30	40
40	238	215	209	196
50	103	77	40	5
60	10	1	0	0
70	0	0	0	0
80	0	0	0	0
90	0	0	0	0
对照	248			

表3 2号噬菌体热灭活性(噬菌斑:个/皿)  
Table 3 Heat inactivation of No. 2 bacteriophage  
(Plaque: cfu/dish)

温度(℃)	时间(min)			
	10	20	30	40
40	174	142	163	160
50	34	30	7	0
60	2	0	0	0
70	0	0	0	0
80	0	0	0	0
90	0	0	0	0
对照	181			



表4 3号噬菌体热灭活性(噬菌斑: 个/皿)  
Table 4 Heat inactivation of No. 3 bacteriophage  
(Plaque: cfu/dish)

温度(℃)	时间(min)			
	10	20	30	40
40	212	189	175	144
50	61	31	9	1
60	0	0	0	0
70	0	0	0	0
80	0	0	0	0
90	0	0	0	0
对照	204			

表5 4号噬菌体热灭活性(噬菌斑: 个/皿)  
Table 5 Heat inactivation of No. 4 bacteriophage  
(Plaque: cfu/dish)

温度(℃)	时间(min)			
	10	20	30	40
40	182	179	174	162
50	72	58	17	7
60	46	11	3	0
70	0	0	0	0
80	0	0	0	0
90	0	0	0	0
对照	189			

50℃水浴处理后, 随着时间的延长, 噬菌体大幅度死亡。

对于不同噬菌体, 他们的灭活时间稍有不同。1号噬菌体在60℃条件下处理30 min完全失活; 2号噬菌体在50℃条件下处理40min和在60℃条件下处理20min完全失活; 3号噬菌体在60℃条件下处理10min完全失活; 4号噬菌体在60℃条件下处理40min完全失活。

## 2.6 $\text{Ca}^{2+}$ 对噬菌体吸附能力的影响

阳离子的作用可能将噬菌体和细胞表面之间的电荷所产生的静电斥力予以中和, 从而促进吸附。根据噬菌体的特点, 设法控制发酵过程中 $\text{Ca}^{2+}$ 的浓度, 借以研究 $\text{Ca}^{2+}$ 对噬菌体侵染乳酸菌的抑制或侵染作用。

1号噬菌体, 在 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度为0.02%时, 吸附力小, 产生的噬菌斑数量小; 浓度为0.02%~0.08%时, 噬菌斑的大小形态基本相等, 肉眼无法区别; 浓度为0.04%~0.08%时计数稳定, 噬菌斑数量基本相等。可见,  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度为0.04%时已达到促进噬菌体吸附的作用。

2号噬菌体, 在 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度为0.02%时, 吸附力小, 产生的噬菌斑不仅数量小, 而且形态细小; 浓度为0.04%时, 噬菌斑最大; 随着浓度的增加, 噬菌斑逐渐缩小, 而中间部分越来越清晰; 浓度为0.04%~0.08%时, 噬菌斑计数基本稳定。可见,  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度为0.04%时已达到促进噬菌体吸附的作用。

3号噬菌体, 在 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度 $\leq 0.04\%$ 时, 噬菌体吸附能力小; 浓度为0.06%~0.08%时, 基本计数稳定; 随

着浓度的增加, 噬菌斑逐渐变大, 周围的溶菌圈变大, 而中间的空斑缩小。可见,  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度为0.06%时已达到促进噬菌体吸附的作用。

4号噬菌体, 在 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度为0.02%时, 噬菌斑数目少, 且呈针眼状, 十分细小; 浓度达到0.04%以上时, 噬菌斑数趋于稳定, 噬菌体吸附能力基本相同; 浓度为0.04%~0.08%时噬菌斑大小相等, 但随着浓度的增加噬菌斑逐渐模糊。可见,  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度为0.04%时已达到促进噬菌体吸附的作用。

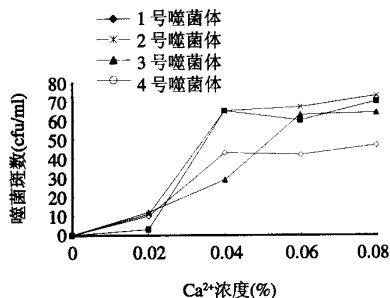


图8  $\text{Ca}^{2+}$  浓度对噬菌体吸附能力的影响

Fig.8 Effect of concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  on adsorbability of bacteriophage

## 3 结论

3.1 从上海市光明乳业股份有限公司车间发酵罐中分离出4株酸奶噬菌体。

3.2 1号噬菌体头部呈六角形, 平均直径为95.1nm, 头部剖面平均面积为8184.8nm<sup>2</sup>, 尾部的平均直径为18.3nm, 平均长度为403.4nm。其裂解量为549, 潜伏期小于15min。在pH4~6的范围内比较稳定, 60℃条件下处理30min时完全失活,  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度为0.04%时对其有促进吸附的作用。

3.3 2号噬菌体头部呈六角形, 平均直径为85.4nm, 头部剖面平均面积为8046.2nm<sup>2</sup>, 尾部的平均直径为23.3nm, 平均长度为549.4nm。其裂解量为681, 潜伏期小于15min。在pH4~8的范围内比较稳定, 50℃条件下处理40min时和60℃条件下处理20min时完全失活,  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度为0.04%时对其有促进吸附的作用。

3.4 3号噬菌体头部呈六角形, 平均直径为95.5nm, 头部剖面平均面积为7972.3nm<sup>2</sup>, 尾部的平均直径为19.8nm, 平均长度为450.5nm。其裂解量为424, 潜伏期小于15min。在pH8~10的范围内比较稳定, 60℃条件下处理10min时完全失活,  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度为0.06%时对其有促进吸附的作用。

3.5 4号噬菌体头部呈六角形, 平均直径为119.3nm, 头部剖面平均面积为12586.1nm<sup>2</sup>, 尾部的平均直径为23.6nm, 平均长度为520.5nm。其裂解量为506, 潜伏

# 干燥温度对谷朊粉膜性能的影响

李梦琴, 张 剑, 张平安, 李 超

(河南农业大学食品科学技术学院, 河南 郑州 450002)

**摘 要:** 干燥温度是影响谷朊粉可食性膜性能的一个重要因素。本文探讨了可食性谷朊粉膜制备过程中, 采用真空干燥在不同的温度下进行时对膜透光率、水溶性、拉伸强度、断裂伸长率、水蒸气透过系数等性能的影响。试验结果表明: 在 60℃ 条件下干燥, 膜的综合性能最好。

**关键词:** 谷朊粉可食性膜; 干燥温度; 性能

## The Influences of Drying Temperature on the Properties of Wheat Gluten Film

LI Meng-qin, ZHANG Jian, ZHANG Ping-an, LI Chao

(College of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** Drying temperature was one of the most important factors that affect the properties of edible wheat gluten film. The influences of different drying temperature in the preparation of samples on the properties of wheat gluten film, such as: light transmitting rate, water solubility, tensile strength, elongation rate, water vapor permeability, etc, were discussed in this paper. when the drying temperature was 60℃, the experimental results showed that the film had the best properties.

**Key words:** edible wheat gluten film; drying temperature; properties

中图分类号: TS206.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)10-0103-04

小麦谷朊粉主要由麦胶蛋白和麦谷蛋白组成, 其中麦胶蛋白占 40%~50%, 麦谷蛋白占 30%~40%, 此外还含有少量的淀粉、脂肪和矿物质。作为优质的植物蛋白资源, 小麦谷朊粉本身具有很高的营养价值, 用它制备的膜具有良好的可食性。

由于麦胶蛋白具有延伸性, 麦谷蛋白具有弹性, 能与水形成网络结构, 从而具有优良的粘弹性、延伸性、吸水性、乳化性、成膜性等独特的物理特性。天然蛋白质靠分子中的氢键、离子相互作用、偶极相互作用、二硫键等来维持其稳定的结构。通过加热或酸、

碱、盐等处理会破坏这些相互作用, 使蛋白质亚基解离、分子变性, 分子内部的疏水基团、巯基暴露出来, 蛋白质分子通过疏水键、二硫键的结合, 形成立体网络结构, 在适当成膜条件下便可得到具有一定阻隔性和机械强度的膜。

大量的文献表明<sup>[1~4]</sup>, 干燥温度是影响谷朊粉可食性膜性能的一个重要因素, 本文在制备谷朊粉可食性膜的过程中, 固定干燥温度以外影响膜性能的其他条件, 探讨了在真空条件下不同干燥温度对膜性能的影响, 从而确定了制备膜的最佳干燥温度。

收稿日期: 2004-06-02

基金项目: 河南省科技攻关项目(20025500003)

作者简介: 李梦琴(1965-), 女, 副教授, 长期从事粮油深加工的教学和科研工作。

期小于 15min。在 pH7~8 的范围内比较稳定, 60℃ 条件下处理 40min 时完全失活,  $Ca^{2+}$  浓度为 0.04% 时对其有促进吸附的作用。

### 参考文献:

[1] Djordjevic G M, Klaenhammer T R. Gens and gene expres-

sion in *Lactococcus bacteriophages*[J]. *International Dairy Journal*, 1997, (7): 489-508.

[2] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002.

[3] 中国科学院微生物研究所噬菌体组. 噬菌体及其防治[M]. 北京: 科学出版社, 1973.