

国产 Nisin 部分特性的研究

江芸 南京师范大学金陵女子学院 南京 210097

周光宏 高峰 徐幸莲 南京农业大学 南京 210095

摘要 研究温度、pH、蛋白酶、保存条件对国产 Nisin 抑菌活性的影响,以及抑菌谱等。结果表明温度、pH 会显著影响 Nisin 活性,在酸性条件下,Nisin 对温度较稳定,随 pH 值的增加,温度越高,Nisin 活性下降越显著。温度越低越有利于保存,干制品比溶液易保存。国产 Nisin 对胃蛋白酶不敏感,但对胰蛋白酶敏感。国产 Nisin 对革兰氏阳性细菌有抑制作用,而对革兰氏阴性细菌、霉菌和酵母没有作用。

关键词 国产 Nisin 特性

Abstract Experiments were conducted to study the effects of temperature, pH, protease and storage condition on the activity of native nisin through the inhibitory spectrum. The results indicated that nisin activity was affected significantly by temperature and pH. Under acidic condition nisin was stable to temperature. But as pH increased, the higher the temperature, the more the losses of nisin activity. The lower temperature was of advantage to nisin storage. Storage life of dry nisin was better than its solution. It was observed that native nisin was sensitive to trypsin, but insensitive to pepsin. The results of inhibitory spectrum experiments revealed that native nisin was inhibitive against Gram-positive bacterium, but not inhibitive on Gram-negative bacterium, yeast or mold.

Key words Native nisin Characteristics

Nisin 是乳酸乳球菌产生的一种细菌素^[1,2],作为天然的食品防腐剂已被 50 多个国家和地区批准使用。国外研究已有 50 多年的历史,我国始于 1989 年,起步晚,研究资料较少,对国产 Nisin 的报道更少,国产 Nisin 的推广应用也尚未得到普及。

本试验对国产 Nisin 的理化、微生物学特性进行研究,为进一步推广提供一些理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 Nisin 浙江天台制药厂生产,效价 1×10^6 IU/g

1.1.2 试验菌种:藤黄微球菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、沙门氏菌、大肠杆菌、干酪乳杆菌、植物乳杆菌、黑曲霉、酿酒酵母等。

1.1.3 试验用培养基及培养条件

1.1.3.1 金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、沙门氏菌、大肠杆菌等采用营养琼脂培养基^[3], 37℃ 恒温培养 18 ~ 24h。

1.1.3.2 藤黄微球菌,即 Nisin 效价测定用培养基(g/L)^[4,5]:胰蛋白胨 8,酵母膏 5,葡萄糖 5,NaCl 5,Na₂HPO₄ · 12H₂O 2,琼脂 15,pH6.8 ± 0.55 × 10⁻⁴ Pa 灭

菌 30min。30℃ 培养 24h。

1.1.3.3 干酪乳杆菌、植物乳杆菌采用 Rogosa SL 琼脂培养基^[3],37℃ 恒温培养 2 ~ 3d

1.1.3.4 黑曲霉、酿酒酵母采用沙氏葡萄糖琼脂培养基^[3],28℃ 恒温培养 2 ~ 3d。

1.2 实验内容及方法

1.2.1 Nisin 效价与抑菌作用的关系

1.2.1.1 Nisin 溶液的配制

准确称取 30mg Nisin,用 0.2mol/L HCl 溶解,定容至 100ml,配成 300mg/kg 溶液备用。用 0.02mol/L HCl 稀释至所需浓度,0.22μm 滤膜过滤消毒。

1.2.1.2 Nisin 效价测定平板制备

配制 Nisin 效价测定培养基,高压蒸汽消毒灭菌后,冷却至 55 ~ 60℃,无菌操作倾注于干热灭菌的培养皿内,每皿约 15 ~ 20ml,即培养皿内培养基的厚度约为 2 ~ 2.5mm。

1.2.1.3 藤黄微球菌菌悬液的制备

以藤黄微球菌作为敏感指示菌^[6],接至斜面,30℃ 培养 48h 后置冰箱备用。吸取 1ml 灭菌生理盐水至斜面试管,洗下菌苔于装有玻璃珠及灭菌生理盐水的锥形瓶中,振荡 10min 左右,制成均匀的菌悬浮液。采用比浊法^[7],调整菌悬浮液的浓度,使其含菌量为

10^7 个/ml。吸取 0.1ml 于上述平板上,涂布均匀。

1.2.1.4 Nisin 抑菌效果的测定

采用琼脂扩散法^[7],直径 6.35mm 圆滤纸片经灭菌烘干后,分别置不同浓度 Nisin 溶液中,浸泡 10min,对照用 0.02mol/L HCl 溶液浸泡。用无菌镊子取出滤纸片,沥去多余溶液,无菌操作放入测试平板上。倒置 30℃ 培养 24h,观察有无抑菌作用。根据浓度与抑菌圈大小的关系,确定实验用 Nisin 抑菌浓度。

1.2.2 Nisin 对外界环境的敏感性

1.2.2.1 Nisin 对温度的敏感性

配制 Nisin 一定浓度溶液,滤膜过滤消毒,在不同温度(45、65、80、100、115、121℃)下保持 20min,以未加热 Nisin 原液作对照,一起进行抑菌试验。

1.2.2.2 Nisin 对 pH 的敏感性

配制 Nisin 一定浓度溶液,用 1mol/L NaOH 和 1mol/L HCl 调至不同的 pH 值(2.0~7.0),滤膜过滤消毒,而后进行抑菌效果试验。

1.2.2.3 不同 pH 及不同温度对 Nisin 抑菌作用的影响

配制 Nisin 一定浓度溶液,调不同的 pH 值,滤膜过滤消毒,分别在不同温度下处理 20min,而后进行抑菌效果试验。

1.2.2.4 Nisin 保存试验

配制 Nisin 一定浓度溶液,滤膜过滤于灭菌试管中,分别置 4、20、30℃ 温度下保存,另取适量 Nisin 干制品同时保存,每周分别测其抑菌活性。

1.2.2.5 Nisin 对蛋白酶的敏感性

配制 Nisin 一定浓度溶液,然后加一定量的胃蛋白酶、胰蛋白酶,滤膜过滤于无菌小三解瓶中,37℃ 水浴中孵育 1h,而后进行抑菌活性试验。

1.2.3 Nisin 抑菌谱试验

根据 1.2.1 方法,将收集的 G⁺细菌、G⁻细菌、霉菌及酵母等制成均匀的菌悬浮液,细菌用比浊法计数,霉菌、酵母用血球计数板计数^[8],分别制成检测平板,而后进行 Nisin 对它们的抑菌试验。

1.2.4 统计分析

采用 SPSS8.0 统计分析软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA),对 F-检验显著者,进一步采用邓肯氏(Duncan)新复极差检验法(LSR)进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 Nisin 效价与抑菌作用的关系

用 0.02mol/L HCl 配制一系列浓度的 Nisin 溶液,同时设 0.02mol/L HCl 作对照,结果见表 1 和图 1。

表 1 不同溶液 Nisin 抑菌作用

Nisin 浓度(mg/kg)	2.5	5	10	25	50	75	100	200	300	0.02 mol/L HCl
抑菌圈直径(cm)	0.82	0.89	1.09	1.22	1.33	1.43	1.52	1.58	1.77	-*

注:-*表示无抑菌圈。

由表 1 看出,0.02mol/L HCl 对指示菌藤黄微球菌无抑制作用,说明 Nisin 对该指示菌的抑制作用完全是由 Nisin 本身发挥的。随着浓度增加,抑菌作用逐渐增强;不同浓度的单因素方差分析, $P < 0.01$,说明浓度对 Nisin 抑菌作用有极显著性影响。由图 1 可知,在浓度 100mg/kg 以后,曲线较平坦,对 2.5~100mg/kg 浓度对数与相应抑菌圈直径进行相关分析,得相关系数 $r = 0.994$,说明在 2.5~100mg/kg 范围内,Nisin 活性与其抑菌圈直径线性关系明显,可以通过测定抑菌圈直径大小来反映 Nisin 活性,故确定 100mg/kg 作为下列实验用浓度。

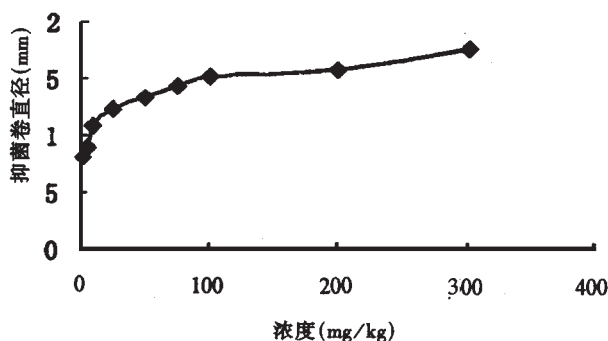


图 1 不同浓度 Nisin 抑菌作用

2.2 Nisin 对外界环境的敏感性

2.2.1 对温度的敏感性

用 0.02mol/L HCl 配制 100mg/kg Nisin 溶液(pH=2±)于不同温度下保持 20min 后进行抑菌试验,同时设未经加热的 Nisin 原液作对照,结果见图 2。

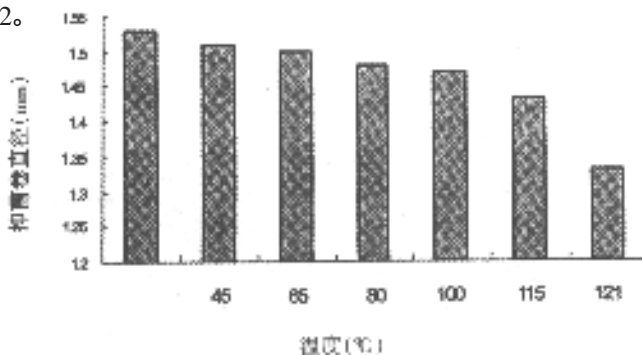


图 2 温度对 Nisin 抑菌效果的影响

由图！可知，随着温度的升高，抑菌圈直径逐渐减小，对上述结果进行不同温度的单因素方差分析，* +""#，表明温度对（，-，. 的活性影响极显著。采用 /01 检验各不同温度间差异显著性，结果见表！。

表 2 不同温度处理后 Nisin 抑菌效果差异显著性比较

处理温度(3 J	原液)2	42	B''	#'''	#2	#!#	
抑菌圈直径(D7)	#' 2>	#' 2#	#' 2''	#')B	#')?	#')>	#' >>	
显著水平	22	<	C	C	D	D	F	E
显著水平	#K	L	LM	M9	9N	N	O	P

注：有相同字母者表示差异不显著(*A "" "2)

由表！看出，原液与)23 处理组之间存在一定显著性差异("" "# +* +"" "2)，而与 423 及以上各温度间均存在极显著性差异；不同温度差异程度不同。从上表还可看出，（，-，. 经 ##23 和 #!#3 高温后仍有活性，说明（，-，. 在酸性条件下具有一定的热稳定性。 !!! 对 56 的敏感性

用 "" "17%8 / 69& 配制 #"" "7: 8;: （，-，. 溶液，用 #7%8 / (<=6 和 #7%8 / 69& 调至不同的 56 值(!""、>'""、)'""、2'""、4'""、?'"")，滤膜过滤消毒，再进行抑菌试验，结果见图 >。

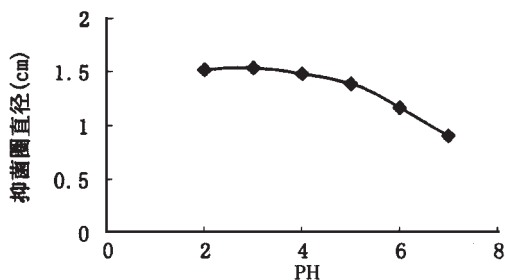


图 3 不同 pH 值对 Nisin 抑菌效果的影响

由图 > 可知，56 值不同，（，-，. 抑菌效果发生改变，不同 56 值的单因素方差分析，结果 * +"" "#，表明 56 值对（，-，. 的活性有极显著影响。采用 /01 检验各 56 值间差异显著性，除了 56! 与 56> 之间无显著差异外，其它各组均存在极显著差异，表明在 56 值偏酸性时（，-，. 抑菌活性强，56 值偏中性抑菌效果显著下降，但在 56? 时仍有一定活性。

!!' > 不同温度、不同 56 时的抑菌效果

表 3 不同保存条件对 Nisin 抑菌效果的影响

组别	保存温度(3)	物理性状	保存时间(周)					
			#	!	>)	2	4
I)	干制品	#' 2! <	#' 2! <	#' 2! <	#' 2! <	#' 2# <	#' 2# <
II	!"	干制品	#')B ^C	#')4 ^C	#')! ^C	#' >? ^C	#' ># ^D	#' !? ^C
III	>"	干制品	#')4 ^D	#') ^D	#' >2 ^D	#' !B ^D	#' !> ^F	#' !?B ^D
IV)	溶液	#' 2# <	#')H ^F	#')? ^F	#')> ^F	#' >B ^C	#' >) ^F
V	!"	溶液	#')B ^C	#') ^E	#' >B ^E	#' >" ^E	#' !! ^F	#' ># ^E
VI	>"	溶液	#')2	#')B	#')#	#')#	#')#	#')#

注：# 表中值为抑菌圈直径，单位 D7，G) ！同一列中有相同上角标小写字母差异不显著(*A "" "2)

用 "" "17%8 / 69& 配制 #"" "7: 8;: （，-，. 溶液，用 #7%8 / (<=6 和 #7%8 / 69& 调至 56 值(!""@?'"")，滤膜过滤消毒，于不同温度下保持 ! "7. 后进行抑菌试验，结果见图)。

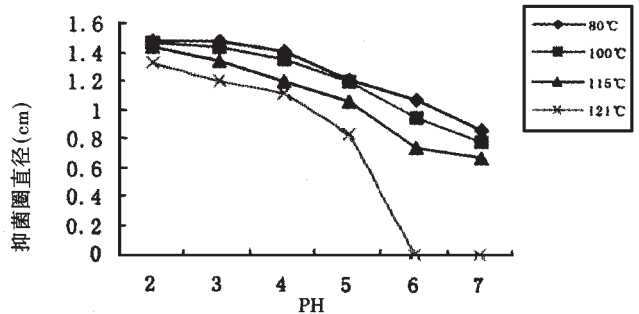


图 4 不同温度不同 pH 时 Nisin 的抑菌效果

由图) 可知，同一温度下，56 值越高，（，-，. 抑菌圈直径越小，而同一 56 下，温度越高，抑菌圈直径也越小。在 564 和 56? 时，经 #!#3 高温后，活性丧失。不同温度的单因素方差分析和不同 56 值的单因素方差分析，均为 * +"" "#，表明不同温度、56 值均对（，-，. 的活性有极显著影响。

!!') 保存试验

配制 #"" "7: 8;: （，-，. 溶液，滤膜过滤消毒于灭菌试管中，分别置)、!""、>"3 保存，另取适量（，-，. 干制品同时保存，每周分别测其抑菌活性，结果见图 2。

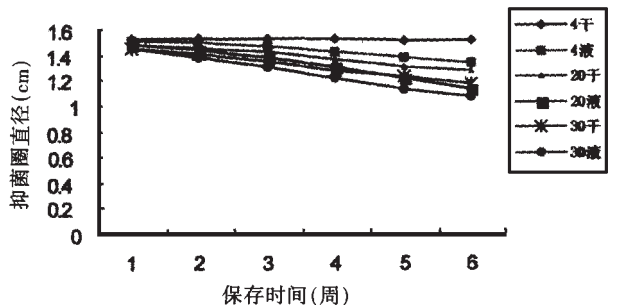


图 5 不同保存条件对 Nisin 抑菌效果的影响

由图 2 可知，随着保存时间的延长，（，-，. 活性均逐渐下降，不同保存时间的单因素方差分析，干制品)3 保存 *A "" "2，说明时间无显著影响；其它各组均为 * +"" "#，说明时间对其活性影响极显著。

对不同时间进行不同保存方式的单因素方差分析,结果均为 $P < 0.01$,说明保存温度及物理性状(干制品、溶液)影响极显著见表 3。

2.2.5 对蛋白酶的敏感性

配制 100mg/ml Nisin 溶液,分别加入胃蛋白酶和胰蛋白酶 0.25mg/ml、0.5mg/ml 和 1.00mg/ml,滤膜过滤消毒于无菌小三角瓶中,同时设 100mg/kg Nisin 溶液作对照,于 37℃ 水浴中孵育 1h,而后进行抑菌活性试验(图 6)。

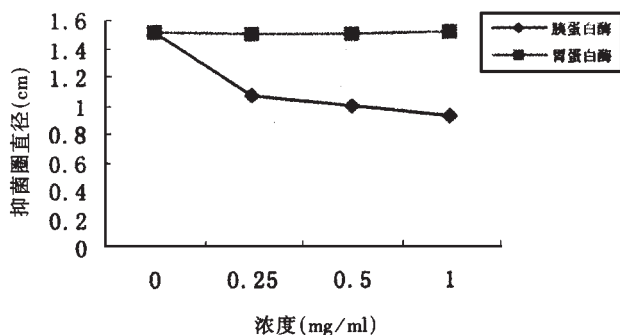


图 6 蛋白酶 Nisin 抑菌效果的影响

统计分析结果表明,胃蛋白酶对 Nisin 抑菌效果影响较小 ($P > 0.05$),胰蛋白酶影响较大 ($P < 0.01$),并随着剂量的增加而增大 ($P < 0.01$),说明 Nisin 对胃蛋白酶不敏感,而对胰蛋白酶敏感。

2.3 抑菌谱

将收集到的金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌等 G⁺ 细菌,沙门氏菌、大肠杆菌等 G⁻ 细菌,黑曲霉及酿酒酵母分别制检测平板,配制 200mg/kg Nisin 溶液,做抑菌试验,同时用 0.02mol/L HCl 作为对照,结果见表 4。

表 4 Nisin 抑菌谱试验

菌株	抑菌圈直径(cm)	菌株	抑菌圈直径(cm)
金黄色葡萄球菌	1.02	干酪乳杆菌	1.02
枯草芽孢杆菌	1.07	植物乳杆菌	1.23
蜡样芽孢杆菌	0.98	黑曲霉	-
沙门氏菌	-	酿酒酵母	-
大肠杆菌	-		

注: - 表示无抑菌圈。

2. 0.02mol/L HCl 对以上菌株均无抑菌圈,表中未列出。

由上表可知,国产 Nisin 可以抑制一些革兰氏阳性细菌,而对革兰氏阴性细菌和霉菌、酵母没有任何抑制,表明国产 Nisin 是一种仅对革兰氏阳性菌具有

抑菌活性的细菌素。

3 讨论

研究表明温度、pH 显著影响 Nisin 活性,这与国外研究结论一致^[9]。在酸性条件下,Nisin 对温度较稳定,随着 pH 值的增加,温度越高,Nisin 活性下降越显著,pH6 和 pH7 时,121℃ 20min 后活性完全丧失。提示在食品生产中,应注意 Nisin 的适用条件,在低温制品、pH 值较低的食品中使用, Nisin 不易受到破坏,活性较强,能更好的发挥保鲜效果。

实验还发现,保存温度对 Nisin 活性有显著影响,温度越低越有利于保存。另外,Nisin 的物理性状也有影响,干制品比溶液易保存,故保存时,应防潮,低温 ($\leq 4^\circ\text{C}$)。

国产 Nisin 对胃蛋白酶不敏感,但对胰蛋白酶敏感,说明食用后在消化道中会被消化分解,具有一定安全性。

抑菌谱试验表明,国产 Nisin 对革兰氏阳性细菌有抑制作用。试验可知,国产 Nisin 在一些实用特性方面与国外 Nisin 一致,表明国产 Nisin 已达到一定水平,这对推广国产 Nisin,替代进口产品有重要意义。

参考文献

- Hurst, A. Nisin and other inhibitory substances from lactic acid bacteria. In A. L. Branen & P. M. Davidson (ed.), *Antimicrobials in foods*. Marcel Dekker, Inc, New York, 1983, Pp, 327 ~ 351.
- Daeschel, M. A. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use preservatives. *Food Technol*, 1989, 43: 164.
- 李影林主编. 培养基手册. 吉林: 吉林科学技术出版社, 1991.
- 迟玉杰等. 管碟法测定乳链菌肽活性. *中国乳品工业*, 1997, 25(4): 33 ~ 34.
- 吴琼. 乳链菌肽效价测定方法的研究. *食品科学*, 1999, 6: 56 ~ 59.
- Tramer, J. G. G. Fowler. Estimation of nisin in food. *J. Sci. Fd Agric*, 1964, 15(8): 522 ~ 527.
- 冯仁丰. 实用医学检验学. 上海: 上海科学技术出版社, 1996, 768 ~ 772.
- 王绍树主编. 食品微生物实验. 天津: 天津大学出版社, 1996, 62 ~ 66.
- Hurst, A. Nisin. *Adv. In Appl. Microbiol*, 1981, 27: 85 ~ 123.