

温度对琼脂扩散法测定

Nisin 效价的影响

张国只, 陈林海*, 王利敏, 陈洪卫, 秦广雍

(郑州大学离子束生物工程省重点实验室, 河南郑州 450052)

摘要: 4℃预扩散和培养温度是影响琼脂扩散法测定 Nisin 效价的两个重要因素。4℃预扩散可明显改进 Nisin 在琼脂中的扩散效果, 提高效价测定的精确度。30℃培养时, Nisin 效价测定的精确度和灵敏度最高。

关键词: 琼脂扩散法, 乳链菌肽, 预扩散

Abstract: 4℃ pre-diffusion and incubation temperature are two main factors influencing the agar diffusion bioassay of Nisin. 4℃ pre-diffusion can facilitate the diffusion of Nisin in agar, and the accuracy of measurement can be improved significantly. The highest accuracy and sensitivity of agar diffusion bioassay of Nisin can be obtained at the temperature of 30℃.

Key words: agar diffusion bioassay; Nisin; pre-diffusion

中图分类号: TS207.4 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2006)11-0177-03

乳链菌肽(Nisin)亦称为乳酸链球菌素,是由乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)产生的一种 34 个氨基酸的多肽抗菌物质。目前,测定 Nisin 效价的方法有琼脂扩散法^[1]、浊度检测法^[2]、ATP 生物荧光法^[3]、酶联免疫吸附法^[4]、流式细胞术法^[5]等方法,然而,基于简单、方便、经济的原因,琼脂扩散法仍然是目前较为常用的检测方法。根据扩散的形式不同,琼脂扩散法可分为直线扩散法、点滴法、滤纸片法、管碟法和打孔法,而打孔法和管碟法是测定 Nisin 效价较为常用的方法^[1,6-9]。在应用琼脂扩散法测定 Nisin 效价时,测定结果受较多因素影响^[6-9]。培养温度是 Nisin 效价测定中的一个重要影响因素,伊守亮^[7]在 25、30、37℃条件下

用管碟法测定 Nisin 效价标准曲线,发现 30℃培养条件下的标准曲线最佳,得到了较高的精确度和灵敏度。本实验以打孔法在不同温度下测定 Nisin 效价的标准曲线,试以优化打孔法测定 Nisin 效价的最佳温度培养条件,同时研究了 4℃预扩散对打孔法测定 Nisin 效价的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

指示菌 藤黄微球菌 *Micrococcus luteus* AS1.2156; Nisin 标准品 Sigma 公司; 效价检测培养基^[10] 胰蛋白胨 0.8%, 酵母膏 0.5%, 葡萄糖 0.5%, NaCl 0.5%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.2%, 琼脂 0.75%, pH6.8, $0.7 \times 10^5 \text{Pa}$, 灭菌 20min; 牛肉膏蛋白胨培养基 牛肉膏 0.3%, 蛋白胨 1.0%, NaCl 0.5%, pH 7.0, $1.1 \times 10^5 \text{Pa}$, 灭菌 20min。

ProtoCOL SR 自动菌落计数仪/抑菌圈测量仪 英国 Synoptics Ltd。

1.2 实验方法

1.2.1 Nisin 标准液的配制 准确称取 10mg Nisin 标准品 (10^6IU/g), 溶于 10mL 0.02mol/L 无菌 HCl 溶液中, 配成 10^3IU/mL 的 Nisin 标准液, 室温放置 1h, 4℃冰箱保存备用(不超过 7d), 需要时用 0.02mol/L 无菌 HCl 溶液稀释成 100、50、25、10、5IU/mL 五种效价的标准液。

1.2.2 指示菌菌悬液的制备 250mL 三角瓶装牛肉膏蛋白胨无菌液体培养基 30mL, 斜面接种指示菌两环, 230r/min, 37℃ 摇瓶 24h, OD_{600} 约为 1.552, 约 $1.76 \times 10^7 \text{cfu/mL}$ 。

1.2.3 效价测定、结果处理及评价 冷却已灭菌的效价检测培养基至 45℃左右, 再加入 2%指示菌菌悬液, 摇匀, 用 20mL 移液管准确吸取 20mL 该培养基,

收稿日期: 2006-03-06 *通讯联系人

作者简介: 张国只(1978-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 微生物育种及发酵。

基金项目: 极端微生物及其功能利用的基础研究(973 计划)(2004CB719604)。

加入直径一致、水平放置的培养皿内,待凝固后用一直径 7mm 的中空打孔器在每个平板上打出五个孔洞,依次等量加入 100、50、25、10、5IU/mL 的 Nisin 标准溶液,并几乎充满孔洞,盖上皿盖,静止放置 0.5h,然后小心移至培养箱内培养 24h,用 ProtoCOL SR 测量仪测量抑菌圈直径。

用 ProtoCOL SR 测量仪测量抑菌圈直径后,以 Nisin 标准液对数值为横坐标,抑菌圈直径为纵坐标,绘制得出标准曲线^[1]。标准曲线斜率大小可反映出单位 Nisin 标准液浓度抑菌圈直径变化的幅度,即测定的精确性,斜率越大扩散性越好,反之越差;标准曲线与 y 轴截距则反映出在最低 Nisin 效价时,各种情况的抑菌圈直径的大小,即测定的灵敏度^[9]。

2 结果与分析

2.1 培养温度对效价测定的影响

采用 25、30、35、37℃ 4 种不同的培养温度,培养 24h 后,30、35、37℃ 均显示出比较清晰的抑菌圈,而 25℃ 指示菌长势较慢,培养至 48h 时,抑菌圈边缘仍比较模糊。30、35、37℃ 的标准曲线见图 1。30、35、37℃ 标准曲线斜率分别为 5.9、5.6、5.8mm·mL·IU⁻¹,30℃ 斜率最大,即精确度最高。由图 1 可看出,30℃ 标准曲线的截距最大,即灵敏度最高。同时,在实验过程中观察到培养温度越高,Nisin 标准液蒸发越快,不利于 Nisin 标准液的扩散。因此,30℃ 为打孔法 Nisin 效价测定的最佳培养温度。

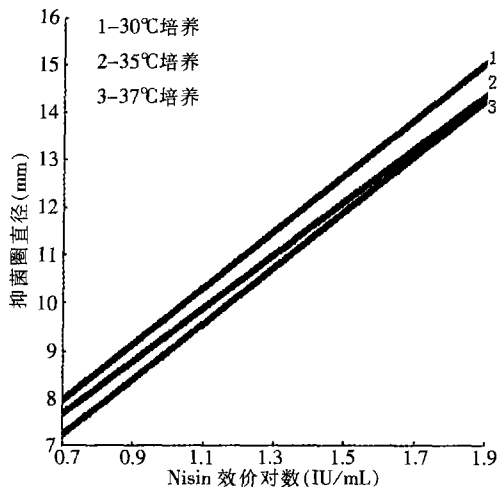


图 1 培养温度的影响

2.2 4℃预扩散对效价测定的影响

Nisin 效价测定的培养方法按以下方案进行:方案 1:加有 Nisin 标准液培养皿 4℃ 预扩散 24h,然后再放置于 30℃ 培养箱培养 18h;方案 2:加有 Nisin 标准液培养皿直接置于 30℃ 培养箱培养 24h;方案 3:未加有 Nisin 标准液培养皿先 4℃ 预扩散 24h,然后加入 Nisin 标准液,置于 30℃ 培养箱培养 18h。

在三种方案的培养条件下均得到了较为清晰的抑菌圈,标准曲线绘制如图 2。方案 1、2、3 所得标准

曲线斜率分别为 8.2、4.5、4.8mm·mL·IU⁻¹,方案 1 所得标准曲线的斜率最大,明显高于其它两个方案的斜率,说明 4℃ 预扩散可明显提高 Nisin 效价测定的精确度,促进 Nisin 在琼脂中的扩散。但同时也可以看出,经过 4℃ 预扩散后,Nisin 标准曲线截距有所减小,灵敏度有所降低。

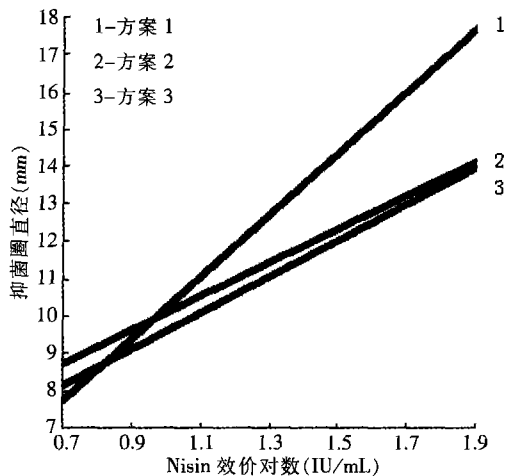


图 2 4℃预扩散的影响

3 结论

琼脂扩散法是测定 Nisin 效价较为常用的方法,具有简单、方便、经济等优点,但是该方法也受较多因素的影响,培养温度及 4℃ 预扩散是较为重要的影响因素。本实验以打孔法测定 Nisin 效价的培养温度为 30℃,在此温度下得到的标准曲线具有较高的精确度和灵敏度,这与伊守亮^[7]用管碟法测定所得出的结论相同。4℃ 预扩散可明显促进 Nisin 在琼脂中的扩散,所得标准曲线具有较高的精确度,但同时 4℃ 预扩散使得标准曲线的灵敏度略有降低。

参考文献:

- [1] Tramer J, Fowler GG. Estimation of Nisin in foods[J]. J Sci Food Agric, Vol15:522~528.
- [2] Berridge N J, Barrett J. A rapid method for the turbidimetric assay of antibiotics[J]. Journal of General Microbiolog, 1952(6): 14~20.
- [3] Waites M J, Ogden K. The estimation of Nisin using ATP-bioluminometry[J]. Int Journal of the Institute of Brewing, 1987. 93(1):30~32.
- [4] Falahee M B, Adams M R, Dale J W, et al. An enzyme immunoassay for Nisin[J]. J Food Sci Technol, 1990, 25:590~595.
- [5] Buddle B B, Rasch M. A comparative study on the use of flow cytometry and colony forming unites for assessment of the antibacterial effect of bacteriocins [J]. Int J Microbiol, 2001,63:65~72.

(下转第 181 页)

测定值,计算回收率、标准差(S)和变异系数(CV)(见表1)。结果表明,回收率在95.83%~125.83%之间,变异系数在1.35%~7.78%之间。

表1 回收率及精密度实验

期望值 (ng/mL)	测定值 (ng/mL)	回收率 (%)	S	CV (%)
1400	1398.89	99.92	0.034	2.14
1200	1255.00	104.58	0.073	4.99
1100	1080.00	98.18	0.032	2.27
1000	1051.67	105.17	0.070	5.15
800	776.67	95.83	0.036	2.95
600	598.33	99.72	0.015	1.35
500	501.67	100.33	0.081	7.78
200	251.6	125.83	0.065	7.32

取100份原料奶样品,用ELISA方法检测,将通过工作曲线计算所得测定值与Foss120乳成分分析仪所测数据作比较,准确率为92%。

2.4 抗血清的特异性

原料奶中除含有 κ -酪蛋白外,还含有乳清蛋白、 β -酪蛋白、 α_s -酪蛋白和乳铁蛋白,分别将这几种蛋白以200ng/mL的浓度包被,检测各蛋白与所制 κ -酪蛋白抗血清是否有交叉反应(见表2)。结果表明,所建立的ELISA方法能够有效地将 κ -酪蛋白与其他蛋白质区分开来,具有较强的特异性。

表2 抗血清的特异性实验

相关蛋白	OD _{492nm}	结果
乳清蛋白	0.01	-
乳铁蛋白	0.01	-
β -酪蛋白	0.02	-
α_s -酪蛋白	0.03	-
κ -酪蛋白	0.99	+

3 结论

常规的检测酪蛋白的方法是先将酪蛋白在等电点沉淀,用凯氏定氮法测定,此法的缺点是:耗时,测定过程繁琐;测定的是含氮化合物(其中包括一些非蛋白氮),其结果只能称为粗蛋白,而非真蛋白^[2]。而层析法和电泳法所需仪器设备昂贵,而且操作时需要专门的技术人员,不适合中小型奶站^[6]。现在有一些大型的乳品企业采用Foss120乳成分分析仪来控制原料奶质量,该仪器检测快速,平均2min

即可出结果,而且可以同时检测多项指标,如蛋白质含量、乳脂率、冰点、酸度等。但是这种仪器一台就需三十多万,这是中小企业无力承担的,而且需要专门人员检测和维护。

本实验建立了检测原料乳中 κ -酪蛋白的酶联免疫吸附法(ELISA),该方法具有专一、灵敏、准确的特点,不需要特殊的仪器设备,操作也较为简便,而且能够同时对几十个甚至上百个样品进行检测。检测的线性范围是25~1400ng/mL,相关系数为0.9831,回收率在95.83%~125.83%之间,不仅适合于中小企业,也适合于原料乳的现场快速检测。

参考文献:

- [1] 张建忠,等. 酪蛋白和酪蛋白制品的开发[J]. 中国乳品工业,1998,26(6):31~32.
- [2] 李震,陈永福.牛乳 β -酪蛋白检测的ELISA方法[J]. 山东农业大学学报,1999,30(4):451~452.
- [3] 周先婉,胡晓倩. 生物化学仪器分析与实验技术[M]. 北京:化学工业出版社,2003.
- [4] 吴雄文,梁志辉. 实用免疫学实验技术[M]. 湖北:湖北科学技术出版社,2002.
- [5] 丁伟,黄素珍,李绪英. 牛奶掺假快速检验方法的研究[J]. 山西农业大学学报,1994,14(1):4~7.
- [6] 卢蓉蓉,孙震,许时英,等. 乳铁蛋白的免疫化学分析法—酶联免疫吸附测定法[J]. 食品科学,2002,23(4):102~104.
- [7] MCHAELEA VÍTKOVÁ, PAVEL RAUCH, LADISLAV FUKAL. Optimization of indirect competitive ELISA of α - β -, and κ -caseins for the thermal and proteolytic treatment of milk and milk products[J]. Czech J Food Sci,2002,20(2):53~62.
- [8] KARASOVÁ,RAUCHP,FUKAL. Construction of competitive enzyme immunoassay for determination of α -lactalbumin and β -lactoglobulins of cow's milk [J]. Czech J Food Sci,1999,17:5~14.
- [9] ROLLAND M P, BESANCON P. Polyclonal antibodies with predetermined specify against bovine α_s -casein: application to the detection of bovine milk in ovine milk and cheese[J]. J Dairy Res,1993,60:413~420.
- [9] Wolf CE, Gibbon WR. Improved method for quantification of the bacteriocin Nisin[J]. J of Appl Bacterio,1996,80:453~457.
- [10] 陈秀珠,何松,龙力红,等. 乳链菌肽高产菌株AL2的发酵条件研究[J]. 微生物学通报,1995,22(4):215~218.

(上接第178页)

- [6] 吴琼. 乳链菌肽效价测定方法的研究[J]. 食品科学,1999(6):56~59.
- [7] 伊守亮,肖林,顾正华,等. 管碟法测定Nisin效价[J]. 无锡轻工大学学报,2004,23(4):41~45.
- [8] Mocquot G, Lefebvre E. A simple procedure to detect Nisin in cheese[J]. J Appl Bacteriol, 1956,19:322~323.