

文章编号 :1009-038X(2004)04-0041-05

管碟法测定 Nisin 效价

伊守亮 , 肖 林 , 顾正华 , 章克昌
(江南大学 生物工程学院 江苏 无锡 214036)

摘 要 :对管碟法测定 Nisin 效价的条件进行了研究 ,考察了几个参数的影响 ,得出了 Nisin 测定的最佳条件 :90 mm 培养皿中培养基加量为 15 mL ,Na₂HPO₄ · 12H₂O 质量浓度 1 g/dL ,菌悬液浓度 10⁹ CFU/mL ,琼脂质量浓度 1 g/dL ,培养基 pH 值 7.0 ,牛津杯中样品加液量 100 μL. 在此条件下 ,Nisin 效价在 5 ~ 100 IU/mL ,其对数值与抑菌圈直径有较好的线性关系.
关键词 :管碟法 ;乳链菌肽 效价测定
中图分类号 :Q 331 文献标识码 :A

Determination of Nisin Activity by Oxford Plate Assay System

YI Shou-liang , XIAO Lin , GU Zheng-hua , ZHANG Ke-chang
(School of Biotechnology , Southern Yangtze University , Wuxi 214036 , China)

Abstract : The conditions of detecting Nisin activities by oxford plate assay system were studied in this paper. A couple of effecting factors were investigated. The optimal detecting conditions were as follows : monolayer medium loading quantity of 15 mL , *Micrococcus luteus* suspension concentration of 10⁹ CFU/mL , the loading quantity in Oxford Plate of 100 μL , 1 g/dL agar concentration , 1 g/dL Na₂HPO₄ · 12H₂O concentration , and the medium pH of 7.0. Under these conditions , a better linear relation was obtained when the Nisin concentration ranging from 5 IU/mL to 100 IU/mL.
Key words : oxford plate assay system ; Nisin ; determination of activity

乳链菌肽(Nisin)是由乳酸乳球菌乳酸亚种产生的一种多肽类细菌素 ,它可以抑制革兰氏阳性菌的生长. Nisin 是目前研究最多、应用较广的由乳酸菌产生的惟一用于商业化生产的细菌素 ,已被世界上 60 多个国家和地区广泛应用于乳制品、罐头食品、高蛋白食品的防腐保鲜 ,是一种高效无毒的天然食品防腐剂^[1 2]. 到目前为止 ,对 Nisin 的检测方法已有许多报道 ,概括起来 ,可分为液体检测法和固体检测法. 液体检测法有生长延迟期法、比浊法、试管稀释法等 ,这些方法虽能快速得到结果 ,但由

于其操作烦琐 ,条件不易控制 ,结果不够稳定 ,现在已很少使用. 目前 Nisin 活性的检测方法主要是固体检测法 ,亦称琼脂扩散法. 扩散法按扩散形式不同 ,可分为直线扩散法、点滴法、滤纸片法、杯碟法和管碟法等 ,国内外测定 Nisin 效价多采用杯碟法或打孔法^[3 ~ 7] ,而管碟法是抗生素效价测定的国际通用方法 ,也是各国药典规定的方法^[8 9] ,但该法本身仍存在一定的局限性 ,如影响因素较多 ,试验结果重现性较差等. 为此 ,作者以管碟法为基础 ,对影响 Nisin 效价测定的各种主要因素进行了分析 ,最

终得出了 Nisin 测定的最佳条件.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 指示菌 藤黄微球菌 (*M. luteus* ATCC 10240), 由中国药品生物制品检定所提供.

1.1.2 效价测定培养基 组分 (g/dL): 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 1.5, 吐温 20 与水 (体积比 1: 1) 的混合物 2.0. pH 6.8, 115 °C 灭菌 20 min.

1.1.3 指示菌悬液 取溶壁微球菌原菌接种于葡萄糖肉汤琼脂斜面上, 30 °C 培养 24 h, 用无菌生理盐水洗下菌苔并稀释成浓度为 $10^7 \sim 10^8$ CFU/mL 的菌悬液.

1.1.4 Nisin 标准溶液 准确称取 500 mg Nisin 标准品 (10^6 IU/g, 美国 Sigma 公司产品), 溶于 50 mL 无菌的 0.02 mol/L 的盐酸稀溶液中, 配成 10^4 IU/mL 的 Nisin 标准液备用. 使用时, 以无菌的 0.02 mol/L 盐酸为稀释液, 制备所需各种效价的 Nisin 标准液.

1.1.5 实验器材 牛津杯内径 (6.0 ± 0.1) mm, 外径 (7.8 ± 0.1) mm, 高 (10.0 ± 0.1) mm, 抗生素效价检测专用培养皿 (内径 90 mm, 高 16 ~ 17 mm), 游标卡尺 (量程 0 ~ 125 mm, 精度 0.02 mm).

1.2 实验方法

1.2.1 检测平板的制备

1) 单层平板 检测培养基融化并冷却至 50 °C 左右, 加入 2% 的检测菌悬液, 混匀, 用吸管准确量取 20 mL 该培养基, 加入内径一致并预先水平放置的培养皿内, 制成 3 ~ 4 mm 厚, 凝固后备用.

2) 双层平板 将检测培养基融化并冷却至 55 °C 左右, 倒入无菌平皿中约 20 mm, 在碟底内均匀摊布, 放置在水平台上凝固, 即为底层平板; 另取检测培养基适量, 融化后冷却至 48 ~ 50 °C, 加入制好的菌悬液并迅速摇匀, 在每个双碟中分别加入 5 mL 培养基, 使其在底层上均匀摊布, 作为菌层, 置水平台上冷却后待用.

1.2.2 标准曲线的绘制 参照文献 [8, 9].

1.2.3 测定结果的处理和评价 以抑菌圈直径的校正值为横坐标, Nisin 效价的对数为纵坐标, 绘制标准曲线. 标准曲线的斜率表示测量的偏差 (估计值与真实值的接近程度), 其值越小, 表示 Nisin 效价的增加幅度一定时, 抑菌圈直径的差异越大, 意味着检测时准确度较高. 标准曲线的 x 轴截距则反映出在最低可测效价下, 各种情况的抑菌圈直径

的大小, 即测定的灵敏度^[4].

2 结果与讨论

2.1 标准曲线范围的选择

准确称取 Nisin 标准品 500 mg, 0.02 mol/L HCl 溶解后于 50 mL 容量瓶定容, 即成 10^4 IU/mL 的母液; 然后再用 0.02 mol/L HCl 依次稀释成 1 000, 500, 250, 100, 50, 25, 10, 5, 2.5, 1.0 IU/mL 的标准溶液, 结果见图 1.

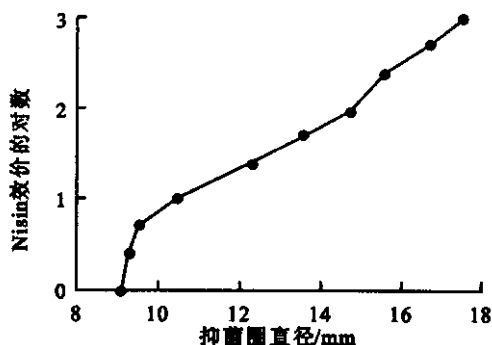


图 1 标准曲线范围的选择

Fig. 1 Choice of the scope of standard curve

根据所测数据, Nisin 效价在 5 ~ 100 IU/mL 时, 抑菌圈直径变化幅度为 5.16 mm, 在 100 ~ 1 000 IU/mL 时, 抑菌圈直径变化幅度为 2.85 mm, 结合图 1, Nisin 效价在 5 ~ 100 IU/mL 时, 其对数值与抑菌圈直径有较好的线性关系, 因此标准曲线范围可选为 5 ~ 100 IU/mL.

2.2 单双层平板的比较

2.2.1 单层平板的比较 取 4 套平板, 均铺成单层平板, 每套平板中单个培养基的加量分别为 10, 15, 20, 25 mL, 所得数据见图 2.

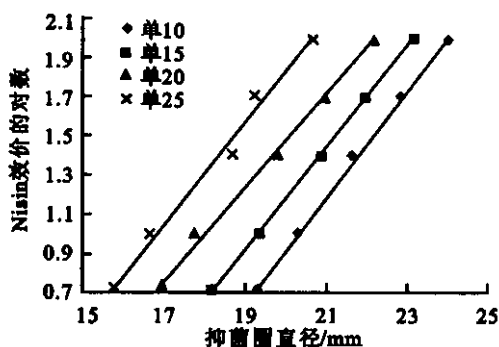


图 2 单层平板的比较

Fig. 2 Comparison of monolayers

从图 2 可以看出, 随着培养皿中检测培养基加量的增加, 检测的灵敏度逐渐降低, 但其斜率变化不大, 加量为 15 mL 时准确度较高.

2.2.2 双层平板的比较 变换各种不同的底层和

菌层培养基的配比 ,依次制成双层 20 + 5 ,15 + 5 ,15 + 10 ,10 + 10 mL(“ + ”号前后两个数字分别代表底层和菌层培养基的加量)平板各一套 ,30 ℃ 培养 24 h 后测量各抑菌圈直径 ,所得标准曲线见图 3.

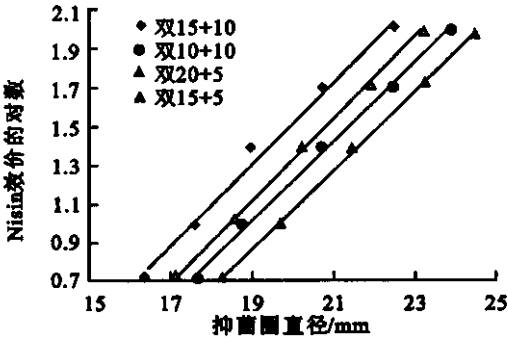


图 3 双层平板的比较
Fig. 3 Comparison of double-layers

从图 3 中可以看出 ,各曲线斜率比较接近 ,即对检测的准确度影响不大 ,但对同一菌层而言 ,较小的底层培养基加量其灵敏度较高 ,这可能是由于提高了指示菌的敏感性的缘故.

结合图 2 3 ,采用单层加量为 15 mL 或者双层 15 + 5 mL 培养基都可以得到较好的结果 ,但考虑到操作的方便性 ,采用单层加 15 mL 培养基.

2.3 培养温度的影响

采用 3 种不同的培养温度(25 ,30 ,37 ℃) ,培养 24 h 后 ,在 30 ℃ 和 37 ℃ 培养的平板均出现较清晰的抑菌圈 ,而在 25 ℃ 培养的平板培养至 48 h 时 ,抑菌圈边缘仍比较模糊 ,30 ℃ 和 37 ℃ 的标准曲线见图 4.

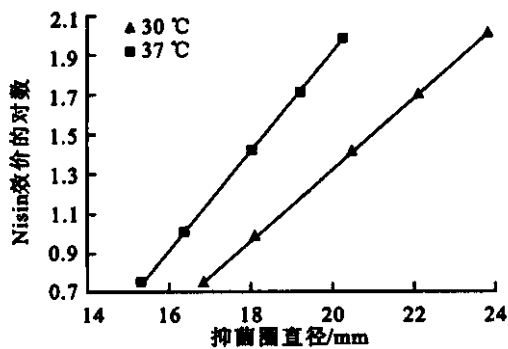


图 4 温度的影响
Fig. 4 Effect of culture tempreture

由图 4 可以看出 ,30 ℃ 培养的斜率较小 ,x 轴截距较大 ,所以选择 30 ℃ 作为检测的培养温度比较合适.

2.4 检测培养基 pH 值的影响

用 1 mol/L 的 HCl 和 NaOH 分别将检测培养基 pH 值调至 5.0 ,5.5 ,6.0 ,6.5 ,7.0 ,7.5 ,8.0 ,每种 pH 值均用 1 套检测平板 ,30 ℃ 培养 24 h 后 ,发现

pH 值为 6.5 ,7.0 ,7.5 时均出现了较为清晰的抑菌圈 ,pH 值 8.0 的平板培养至 36 h 也出现了清晰的抑菌圈 ,而 pH 值为 5.0 ,5.5 ,6.0 的 3 套平板培养至 48 h 仍未观察到清晰的可测量的抑菌圈 .pH 值为 6.5 ,7.0 ,7.5 ,8.0 的标准曲线见图 5.

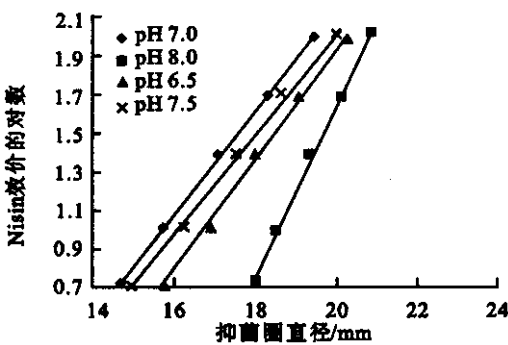


图 5 检测培养基 pH 值的影响
Fig. 5 Effect of medium pH

从图 5 可以看出 ,pH 值为 6.5 ,7.0 和 7.5 的 3 条曲线较为接近 ,都能得到比较满意的结果 ,但 pH 值 7.0 的斜率最小 ,准确度最高 ,是最佳选择 .而 pH 值 8.0 的曲线虽然 x 轴截距较大 ,但斜率也最大 ,准确度最低 ,需培养 36 h 才可以测量.

2.5 牛津杯加液量的比较

对于一般的抗生素测定来说 ,大多数情况下都需要把牛津杯加满 ,但作者在实际测定中发现 ,若加满牛津杯 ,培养 24 h 后牛津杯内仍有将近一半的残留溶液 .鉴于此 ,作者考虑了牛津杯加液量(分别为 200 ,100 ,50 μ L)的影响 ,所得标准曲线见图 6.

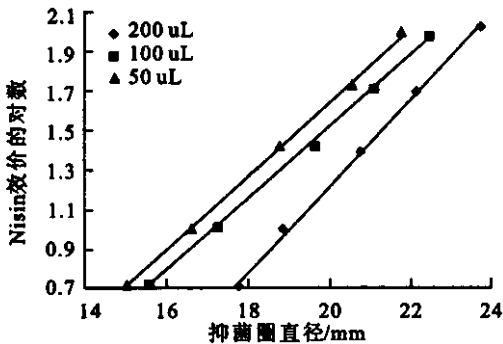


图 6 牛津杯加液量的影响
Fig. 6 Effect of loading quantity in Oxford Plate

由图 6 可见 ,牛津杯加液量越大 ,所形成的抑菌圈直径就越大 ,这可能是由于加入的 Nisin 量多时 ,其在培养基中的扩散速度快 ,产生的抑菌圈就大 ,因此 ,牛津杯加液量和抑菌圈大小成正比 .但从斜率来看 ,100 μ L 和 50 μ L 都比 200 μ L 小 ,也就是准确度都比 200 μ L 要高 ,而加液量为 100 μ L 灵敏

度较高,因此,牛津杯加液量为 100 μL 比较合适.

2.6 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度的影响

在实验中发现 0.02 mol/L HCl 在检测培养基上产生了较明显的抑菌圈,为了消除这种影响,根据 Wolf 等人的研究结果,作者采用改变检测培养基中 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 的质量浓度的方法.

制备 6 套检测平板,每种含有一套不同质量浓度的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (质量浓度分别为 0,0.2,0.5,1,2 g/dL),30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后,发现不加 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 的平板抑菌圈很大,也很模糊,不易测量,而 1 g/dL 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 显示了较好的缓冲效果,并基本消除了稀盐酸的影响.

从图 7 可以看出,1 g/dL 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 的标准曲线虽然准确度比 0.2 g/dL $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 的稍低,而且灵敏度也略低,但因为其有效地消除了稀盐酸所造成的假抑菌圈,作者仍选择 1 g/dL $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 作为检测培养基的缓冲体系.

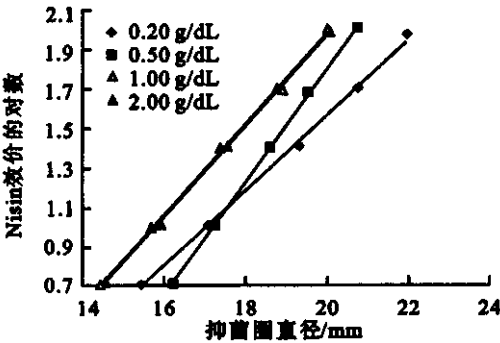


图 7 磷酸氢二钠质量浓度的影响

Fig.7 Effect of $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ concentrations

2.7 吐温 20 质量浓度的影响

制备 4 套不同吐温质量浓度(0,0.25,0.5,1.0 g/dL)的检测平板,所得标准曲线见图 8.

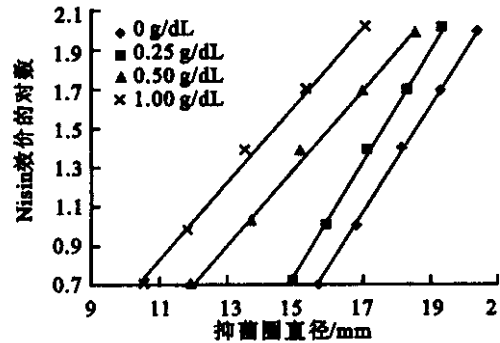


图 8 吐温 20 质量浓度的影响

Fig.8 Effect of Tween 20 concentrations

从图 8 可以看出,吐温 20 质量浓度为 0.5

g/dL 和 1 g/dL 时,准确度均比不加吐温时高,但灵敏度却比不加吐温时有所降低,这说明添加吐温 20 可使测量的准确度有所提高,但对促进琼脂扩散并没有太大的影响,反而会使测量的灵敏度降低.另外,在预实验中发现继续增加吐温 20 的质量浓度对测量的准确度并没有太大的影响.

2.8 菌悬液浓度的影响

管碟法测定 Nisin 效价时,控制检测平板中菌悬液的浓度非常重要,过浓则抑菌作用不明显,过低则菌体生长稀疏,抑菌圈不明显或者不规则,难以准确测量.

取藤黄微球菌斜面一支,用适量无菌生理盐水洗下全部菌苔,充分振荡后作为原液,并依次稀释到 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 直至 10^{-8} 倍,然后利用平板菌落计数法^[10]计数,同时以无菌生理盐水作为空白,在 500 nm 波长下测定 OD 值(见表 1).分别取原液和 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} 倍稀释液,作为菌悬液加入到测定培养基中,培养 24 h 后发现 10^{-3} 倍稀释液平板上抑菌圈非常模糊,边缘不清晰,难以测量.原液及 10^{-1} , 10^{-2} 倍稀释液的标准曲线见图 9.

表 1 检测菌悬液浓度的比较

Tab.1 Comparison of the suspension concentrations of *M. luteus*

稀释倍数	菌液浓度/(CFU/mL)	OD ₅₀₀
原液	1.44×10^{10}	> 1.5
10^{-1}	1.44×10^9	0.468
10^{-2}	1.44×10^8	0.042
10^{-3}	1.44×10^7	0.006
10^{-4}	1.44×10^6	0

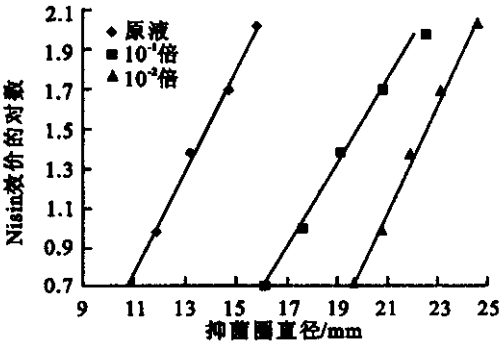


图 9 菌悬液浓度的影响

Fig.9 Effect of the suspension concentrations

从图 9 可以看出,原液、 10^{-1} 、 10^{-2} 倍稀释液三者的准确度比较接近,灵敏度依次增加, 10^{-1} 倍稀释度的菌悬液准确度最高,虽然其灵敏度稍低于 10^{-2} 倍稀释度,但其产生的抑菌圈非常清晰,最容易观察和测量.

2.9 琼脂质量浓度的比较

制备 4 套不同琼脂质量浓度(1.00 ,1.25 ,1.50 ,1.75 g/dL)的检测平板 ,所得标准曲线见图 10.

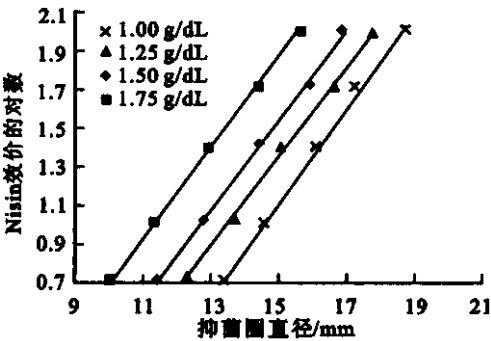


图 10 琼脂质量浓度的比较

Fig. 10 Comparison of agar concentrations

从图 10 可以看出 ,不同的琼脂质量浓度的直线斜率相近 ,这表明琼脂质量浓度对检测的准确度没有大的影响.但是 ,各个直线的 x 轴截距却有很大不同 ,1.0 g/dL 的琼脂质量浓度灵敏度最大 ,这可能是因为随着琼脂质量浓度的增加 ,培养基内的

间隙减少 ,相对来说 Nisin 的扩散要慢些 ,致使最终形成的抑菌圈较小.另外 ,在预备实验中发现 ,过高的琼脂质量浓度(2 g/dL 以上)冷却至 50 ℃ 以下倒平板时 ,很快就会凝固 ,不利于制备菌层 ;而琼脂质量浓度太低时(低于 1 g/dL) ,培养基不容易凝固 ,而且牛津杯由于重力的作用易陷于培养基内 ,增加了 Nisin 扩散的困难 ,产生的抑菌圈亦不太规则.

3 结 论

管碟法测定抗生素效价是国内外通用的方法 ,也是生物测定中最准确、最方便的方法 ,但该方法本身仍存在一定的局限性 ,如影响因素较多等.作者以管碟法为基础 ,对影响 Nisin 效价测定的各种主要因素进行了分析 ,并最终得出了 Nisin 测定的最佳条件 :采用单层培养基加量 15 mL ,检测培养基中 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度为 1 g/dL ,菌悬液浓度 10^9 CFU/mL ,不加吐温 20 ,琼脂质量浓度 1 g/dL ,培养基 pH 7.0 ,牛津杯加液量 100 μL ,30 ℃ 培养 24 h.

参考文献 :

[1] 李明春 ,田睿. 乳球菌肽(Nisin)的研究进展[J]. 食品科学 ,1999 ,20(12) :10 - 12.
[2] 姜英辉 ,李光友. 乳链菌肽及其应用研究综述[J]. 海洋科学 ,2002 ,26(4) :32 - 36.
[3] Tramer J ,Fowler G G. Estimation of Nisin in food[J]. J Sci Food Agr ,1964 ,15 :522 - 528.
[4] Wolf C E ,Gibbons W R. Improved method for quantification of the bacteriocin nisin[J]. J of Appl Bacterio ,1996 ,80 :453 - 457.
[5] 吴琼. 乳链菌肽效价测定方法的研究[J]. 食品科学 ,1999 ,20(6) :56 - 59.
[6] 何宁 ,王昌禄. 杯碟法检测乳酸菌素活性优化条件的研究[J]. 天津轻工业学院学报 ,1999 (2) :17 - 20.
[7] 朱文森 ,刘稳 ,马桂荣. 一种乳链菌肽测定方法及其 FORTRAN 运算程序[J]. 食品与发酵工业 ,1997 ,23(3) :36 - 38.
[8] 钱存柔 ,黄仪秀. 微生物学实验教程[M]. 北京 :北京大学出版社 ,2000.
[9] 马绪荣 ,苏德模. 药品微生物学检验手册[M]. 北京 :科学出版社 ,2001.
[10] 无锡轻工大学. 微生物学(第二版) [M]. 北京 :中国轻工业出版社 ,2000.

(责任编辑 :李春丽)