

乳酸链球菌素对不同细菌的抗菌性

张菲菲, 沈静雯

国家轻工业食品质量监督检测南京站, 江苏南京

摘要:乳酸链球菌素(Nisin)对不同菌种的具有不同的抗菌性。实验结果表明, 乳酸链球菌素对革兰氏阳性菌具有显著作用, 其作用机制可能包括破坏细胞膜和干扰细胞代谢等。然而, 一般认为乳酸链球菌素对革兰氏阴性菌无作用, 但却意外发现对志贺氏菌有抑制效果。该研究为深入理解乳酸链球菌素的作用机制以及其在食品工业等领域的应用提供了重要参考。

关键词:乳酸链球菌素(Nisin); 志贺氏菌; 抗菌性

The Antibacterial Activity of Lactostreptococcin against Different Bacteria

Feifei Zhang, Jingwen Shen

Nanjing Station of National Light Industry for Food Quality Supervision and Inspection, Nanjing, Jiangsu

Abstract: Nisin shows different antibacterial properties against different bacterial strains. The experimental results indicate that nisin has a significant effect on Gram-positive bacteria, and its mechanism of action may include disrupting cell membranes and interfering with cell metabolism, etc. However, it is generally believed that nisin has no effect on Gram-negative bacteria, but unexpectedly, it was found to have an inhibitory effect on Shigella. This study provides an important reference for in-depth understanding of the mechanism of action of nisin and its application in the food industry and other fields.

Keywords: Nisin; Shigella; Antibacterial properties

1 前言

乳酸链球菌素(Nisin)是一种广泛运用于食品工业的生物防腐剂和抗菌剂,它是从乳酸链球菌或乳酸乳球菌发酵产物中提制的一种多肽抗菌类物质。而多肽是氨基酸连结而成的化合物,由肽键相连,具有一定的生理作用,安全性高。由于生物防腐剂的这一特性,人们在加工食品时,逐渐以天然生物防腐剂来替代化学防腐剂。然而Nisin的抗菌性具有特异性,不同菌种其抗菌效果有明显的差异,本文就其抗菌特异性做浅显的研究。

现阶段乳酸链球菌素Nisin的抑菌活性测定方法主要有琼脂扩散法、临界稀释法、ELISA测定、ATP

生物荧光法、毛细管电泳、电导测定以及辐射法等[1]。虽然琼脂扩散法操作复杂且受到很多因素影响,但仍然是抑菌活性测定的主流方法,它测量结果相对准确,直观,无需借助实验仪器。所以依据GB1886.231-2023,我们选用琼脂扩散法,进行乳酸链球菌素抑菌性评价。观察结果,用游标卡尺测量抑菌圈的直径,直径的大小代表添加样液抑菌强度的大小。

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

2.1.1 菌株

蜡样芽孢杆菌:购自广东省微生物菌种保藏中

心,编号为ATCC 1179;

枯草芽孢杆菌:购自广东省微生物菌种保藏中心,编号为ATCC 6633;

单增李斯特菌:购自广东省微生物菌种保藏中心,编号为ATCC 19115;

金黄色葡萄球菌:购自广东省微生物菌种保藏中心,编号为ATCC 6538;

藤黄微球菌:购自中国医学细菌菌种保藏管理中心,编号为CMCC 28001;

志贺氏菌:购自中国医学细菌菌种保藏管理中心,编号为CMCC 51572;

大肠杆菌:购自广东省微生物菌种保藏中心,编号为ATCC 25922;

沙门氏菌:购自广东省微生物菌种保藏中心,编号为ATCC 14028;

阴沟肠杆菌:购自广东省微生物菌种保藏中心,编号为ATCC13047;

阪崎肠杆菌:购自中国微生物菌种保藏中心,编号为CICC 21560。

2.1.2 培养基与试剂

乳酸链球菌素标准品:

营养肉汤、营养琼脂、S1培养基、志贺氏菌增菌液、LB培养基等,北京陆桥生物技术有限公司

0.02mol/L盐酸,安徽康帕化工有限公司

2.1.3 仪器与设备

BCD-195KA医用冷藏箱 青岛海尔股份有限公司; DW-HW50超低温冰箱 中科美菱低温科技股份有限公司; SPX-800智能型生化培养箱 宁波江南仪器厂; SPX-80智能型生化培养箱 宁波江南仪器厂; BSC-1500 II A2-X生物安全柜 济南鑫贝西生物技术有限公司; YA28X6T/B立式灭菌锅 宁波永安医疗器械制造有限公司; LDZM-40KCS- II 型立式压力蒸汽灭菌锅 上海申安医疗器械厂。

2.2 实验方法

2.2.1 目标菌的培养

将所有实验用的目标菌株接种至相应的增菌液中,除蜡样芽孢杆菌和藤黄微球菌30℃,其它均36℃,培养18-24h。放入4℃冰箱保存。

2.2.2 菌株悬浮液的制备

从冰箱中取出所有增菌液,取10mL,3000-5000 r/

min离心5 min,弃去上清液,收集沉淀,加入适量生理盐水,制成 10^8 CFU/mL浓度的细胞悬浮液备用。

2.2.3 平板的配置

配置S1培养基,冷却至50℃左右,按1:100菌悬液和培养基的比例加入适量的细胞悬浮液,使培养基中检测菌的最终浓度为 1.0×10^6 CFU/mL,摇匀倒平板,凝固后,用直径为5mm打孔器在平板上打出所需要的孔数,小心挖出孔内琼脂,放置4℃冰箱过夜。

2.2.4 乳酸链球菌素Nisin工作液的配置

Nisin溶解于0.02 mol/L的HCl溶液,再用盐酸溶液稀释至600 IU/mL的浓度。

2.2.5 滴加乳酸链球菌素Nisin工作液

取出4℃冰箱过夜的平板,用移液器吸取50 μ L浓度为600IU/mL的Nisin工作液,滴加到平板小孔中,静置。

2.2.6 恒温培养

待孔内Nisin工作液渗透完全后,放入36℃培养箱培养16-24h,测量抑菌圈直径。

3 结果与分析

3.1 乳酸链球菌素Nisin对革兰氏阳性菌的抑菌效果

3.1.1 蜡样芽孢杆菌

蜡样芽孢杆菌是芽孢杆菌属的一种革兰氏阳性菌,兼性需氧,广泛分布于土壤、灰尘和污水中,也是食品中常见的污染菌和条件致病菌 [2-4]。毛汝婧[5]通过将Nisin与其他抑菌剂复配达到延长鲜湿面贮藏期的目的。王舒媛、王子元等人通过研究乳酸链球菌素(Nisin)、肉桂醛和表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate,EGCG)等3种抑菌剂作为配料添加至青稞鲜湿面中,发现此3种抑菌剂对蜡样芽孢杆菌均有抑制效果(如图1)[6]。

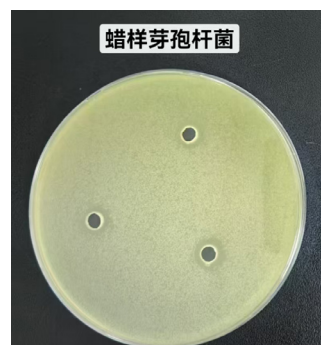


图1

在本次实验中,也发现乳酸链球菌素(Nisin)对蜡样芽孢杆菌有抑制作用,但是抑菌圈界限不明显。

3.1.2 枯草芽孢杆菌

枯草芽孢杆菌是一种好氧或兼性厌氧的细菌,能够形成耐热、抗干旱的芽孢,具有极强的抗逆性,可以存活数年甚至数百万年。因为芽孢难以灭活,所以时常会出现食物腐败或中毒事件。而乳酸链球菌素对枯草芽孢杆菌具有一定的抑菌作用。在尚彬玲、申瑾等人的论文中,清晰地阐述了高压热杀菌技术(HPTS)与 Nisin 有协同杀菌的作用,杀菌效果优于单独的HPTS处理,影响芽孢的生理代谢,最终导致枯草芽孢杆菌的死亡(如图2)[7]。

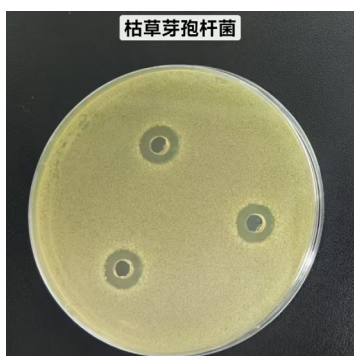


图2

通过实验发现,乳酸链球菌素对枯草芽孢杆菌抑菌明显,具有很好的抑菌作用。

3.1.3 单增李斯特菌

单增李斯特菌是革兰氏阳性短杆菌,是一种人类致病的病原菌,广泛存在与自然环境中,在各种食品以及食品加工设备中也常出现。易被污染的食品主要有生乳、奶酪、肉及肉制品、鸡蛋、蔬菜沙拉、水产品等。研究表明乳酸链球菌素对单增李斯特菌均有抑制作用。张鑫,李迎秋等人,有做过关于乳酸链球菌素对单增李斯特菌抑菌性的研究,并得出结论证明乳酸链球菌素能够抑制其生长[8]。

通过本次实验发现,在被单增李斯特菌覆盖的平板上,乳酸链球菌素能够形成抑菌圈抑制其生长,但所形成的直径较小,且抑菌圈不明显,如图3所示。

3.1.4 金黄色葡萄球菌

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是革兰氏阳性菌的代表,它是人类的一种重要病原菌,可引起许多严重的感染。乳酸链球菌素对金黄色葡萄球菌具有很好的抑制性,正如郑小虎的研究[9],乳酸链球菌素对金黄色葡萄球菌的抑菌率均大于 90%,几

乎完全抑制了金黄色葡萄球菌的生长。

本实验发现,在被金黄色葡萄球菌覆盖的平板上,乳酸链球菌素能够形成较为清晰透明的溶解圈,如图4所示。

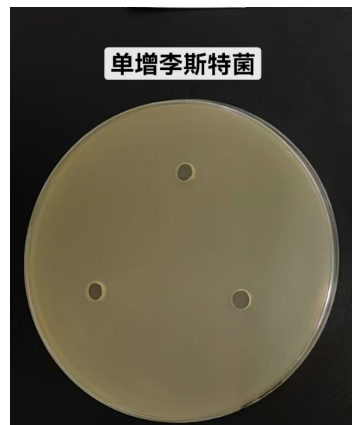


图3

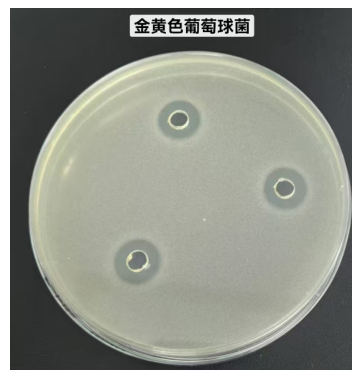


图4

3.1.5 藤黄微球菌

藤黄微球菌,革兰氏阳性,专性需氧,存在与土壤、灰尘、水和空气中,是一种条件致病菌。它对乳酸链球菌素较为敏感,且易于培养和操作,所以作为乳酸链球菌素的指示菌。通过GB1886.231-2023可知,藤黄微球菌的生长情况可以用来定量测定Nisin的效价。鉴于这种情况,我们可确认下Nisin对藤黄微球菌的抑制作用。

通过实验表明,相同效价下的Nisin,在藤黄微球菌培养基中形成的的抑菌圈最大且十分明显,其抑菌效果远大于其他革兰氏阳性菌,如图5所示。

3.2 乳酸链球菌素Nisin对革兰氏阴性菌的抑菌效果

一直以来,均有报道说乳酸链球菌素对革兰氏阴性菌几乎无抑制作用[10],可是却无文献做相关的实验证明,为了验证这一说法的正确性,本次实验将

研究乳酸链球菌素对革兰氏阴性菌有无抑制作用。

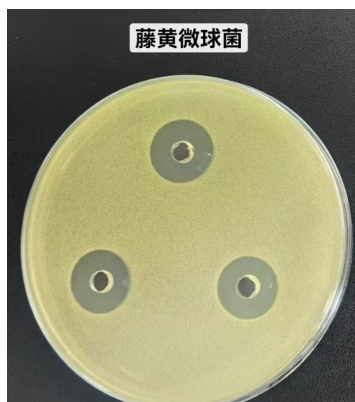


图5

选取5种不同的革兰氏阴性菌,分别是大肠杆菌、沙门氏菌、志贺氏菌、阴沟肠杆菌、阪崎肠杆菌等,效价浓度均为600 IU/mL。

如图6所示,除志贺氏菌,其他四种菌均无抑菌圈。这与廖涵[10]等人的陈述一致,然而志贺氏菌虽有溶解圈,但直径较小,且抑菌圈透明度较低。

虽然志贺氏菌属于革兰氏阴性菌,但它的其细胞壁可能在某些成分上存在一定的特殊性,使得其与其他常见的革兰氏阴性菌不完全相同,导致乳酸链球菌素能够突破革兰氏阴性菌细胞壁的屏障,接触到细胞膜发挥作用。

3.3 乳酸链球菌素Nisin对不同细菌的抑菌能力分析

乳酸链球菌素 Nisin 展现出对多种细菌不同程度的抑菌活性。在革兰氏阳性菌方面,藤黄微球菌对

其极为敏感,抑菌圈直径达16.63mm,呈现出+++的强抑菌能力;金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径为13.9mm,抑菌能力为++;枯草芽孢杆菌的抑菌圈直径为11.97mm,抑菌能力处于++水平;蜡样芽孢杆菌和单增李斯特菌的抑菌圈直径分别为8.14mm与8.57mm,抑菌能力均为+。而在革兰氏阴性菌中,情况有所不同,仅有志贺氏菌表现出一定敏感性,抑菌圈直径为9.22mm,抑菌能力为+,其余如大肠杆菌、沙门氏菌、阴沟肠杆菌、阪崎肠杆菌的抑菌圈直径均为0mm,无明显抑菌效果,抑菌能力为-。这些数据清晰地表明了乳酸链球菌素 Nisin 对不同细菌种类抑菌活性的差异,为进一步探究其抗菌机制及应用范围提供了有力依据,如表1所示。

4 结论

通过本次研究可以明确,乳酸链球菌素在细菌抑制方面表现出显著的选择性。它可能通过破坏细菌的细胞膜、干扰细胞代谢等途径,从而有效地抑制了革兰氏阳性菌的生长和繁殖,体现出了明显的抑菌作用。这一特性使得乳酸链球菌素在涉及革兰氏阳性菌易致腐败或致病的食品及相关领域具有重要的应用价值,是保障食品质量和安全一种天然有效的手段。

同时,对于一般的革兰氏阴性菌,乳酸链球菌素确实如以前文献描述的一般,未表现出明显的抑菌效果。然而,志贺氏菌却表现出了例外。虽然抑菌圈不

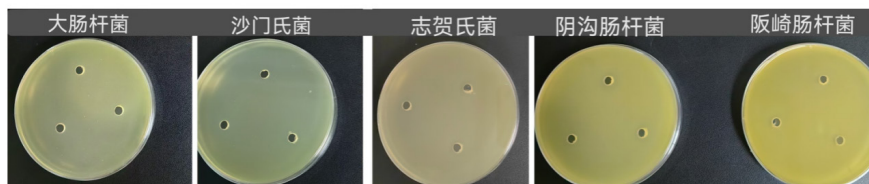


图6

表1:乳酸链球菌素Nisin对不同细菌的抑菌圈直径大小比较

菌种	革兰氏阳性菌					革兰氏阴性菌				
	蜡样	枯草	单增	金葡	藤黄	大肠	沙门	志贺	阴沟	阪崎
抑菌圈直径(mm)	8.14	11.97	8.57	13.9	16.63	0	0	9.22	0	0
抑菌能力	+	++	+	++	+++	-	-	+	-	-
备注: 抑菌能力: <6mm, 为-; 6-10mm, 为+; 10-15mm, 为++; >15mm, 为+++										

太明显,但是还是呈现出少量的抑菌效果,如果进一步优化相关条件,如pH、温度以及其他复配制剂的使用,是否使抑菌效果更加明显。

综上所述,乳酸链球菌素对不同菌种的作用具有明显的差异性。我们应当进一步深入探究志贺氏菌与乳酸链球菌素相互作用的具体机制。同时,对于乳酸链球菌素在食品中的应用,应不断优化其使用条件和方法,以充分发挥其抑菌优势,为食品工业及相关领域的发展提供更加有力的支持。

参考文献

- [1] 孙思睿, 万峰, 贺菁等. 乳酸菌细菌素的抑菌活性测定及效价表示方法[J]. 食品工业科技, 2018, 39(16) :340-345.
- [2] 曹飞扬, 王娉, 江连洲等. 蜡样芽孢杆菌分型方法研究进展[J]. 食品科学, 2017, 38(17): 286-290.
- [3] 张伟伟, 鲁绯, 张金兰等. 食品中蜡样芽孢杆菌的研究进展[J]. 中国酿造, 2010(5): 1-3.
- [4] 周文化, 郑仕宏, 唐冰. 生鲜湿面菌相分析及腐败菌分离[J]. 粮食与油脂, 2010(4): 45-47.
- [5] 毛汝婧. 鲜湿即食面品质改良及保鲜研究[D]: [学士学位论文]. 兰州: 甘肃农业大学, 2016: 47.
- [6] 王舒媛, 王子元, 张敏. 不同抑菌剂对青稞鲜湿面中蜡样芽孢杆菌的抑制作用[J]. 食品科学, 2020, 41(13): 206-211.
- [7] 尚彬玲, 申瑾, 陈翔, 陈乐, 章中. HPTS结合Nisin对枯草杆菌芽孢的杀灭机理[J]. 食品与生物技术学报, 2022, 41(3): 29-36.
- [8] 张鑫, 李迎秋. 两种天然防腐剂对单增李斯特菌抑菌性的研究[J]. 中国调味品, 2021, 46(2): 37-39.
- [9] 郑小虎. 乳酸链球菌素对金黄色葡萄球菌生长的影响[J]. 临床研究. 2017, 4(8): 14.
- [10] 廖涵. 乳酸链球菌素(Nisin)与超高压结合对E. coli的协同杀菌效应[J]. 食品工业科技, 2019, 40(20): 82-87.

