

Nsin 效价测定方法研究进展

陈洪卫, 陈林海* (郑州大学河南省离子束生物工程重点实验室, 河南郑州 450052)

摘要 综述 Nsin 效价测定方法及各种方法的特点的研究进展。

关键词 乳链菌肽; 效价; 测定

中图分类号 Q939.92 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)07-02624-02

Research Progress on the Determination Method of Nsin Titer

CHEN Hong wei et al (Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering of Henan Province, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052)

Abstract The determination methods of Nsin titer and the characteristics of each method were summarized.

Key words Nsin; Titer; Determination

乳链菌肽(Nsin)亦称为乳酸链球菌素,是由乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)或乳酸链球菌(*Streptococcus lactis*)产生的一种由34个氨基酸组成的多肽类抗菌物质^[1],目前作为天然食品防腐剂已经在欧盟(EU)、美国、中国、巴西等50多个国家和地区得到广泛应用^[2]。它对大多数革兰氏阳性菌如金黄色葡萄球菌、肉毒梭菌、李斯特氏菌、芽孢杆菌等多种腐败菌和食物致病菌有强烈的抑制和杀灭作用。作为天然的多肽类食品添加剂,它可以在人体内被消化酶所消化^[3],不会对人体健康造成影响,是一种安全高效的天然食品防腐剂。

Nsin 定量分析最初的方法为1934年Cox G A.等建立的甲基蓝还原法^[4]。琼脂扩散法是最早被广泛采用的 Nsin 效价测定方法。琼脂扩散法操作简单、成本很低,但耗时较长、灵敏度较低。研究者在不断对其条件进行优化的同时,也在不断开发新的测定方法。其中包括96孔聚乙烯板生物测定法、分光光度法、MIT法、免疫法、生物荧光法和生物发光法等。这些方法在测定速度和灵敏度等方面均较琼脂扩散法有不同程度的改善。笔者对各种方法的特点和研究进展进行综述。

1 基于抑菌作用的测定方法

1.1 琼脂扩散法

1.1.1 管碟法。管碟法又称牛津杯法,是被各国药典所广泛采用的抗生素生物鉴定方法,也是 Nsin 效价测定中应用最早、最广泛的生物测定方法。目前 Nsin 的效价测定中所使用的琼脂扩散法是由 Traner 等于1964年建立起来的^[5],对 Nsin 敏感的指示菌在含有 Nsin 的培养基上会形成透明的抑菌圈,抑菌圈的大小与样品的效价成正比,通过测量抑菌圈的直径来计算样品的效价。这种方法操作简单并且测定成本较低。

1.1.2 打孔法。首先制作含指示菌的平板,4 预处理以便于打孔,用打孔器在平板上打出所需的孔数,用镊子小心挖去孔中的琼脂块,向孔中加入一定量的样品溶液,4 过夜预扩散,培养适当时间后测量抑菌圈直径,然后根据标准曲线方程计算样品的效价。

1.1.3 影响因素。指示菌。不同的菌种对 Nsin 的敏感性

不同,因此以不同的菌种作指示菌对 Nsin 效价测定的灵敏度有较大影响。T. Pongtharangkul 等对 *Brochetrix thermophilus*、*Lactobacillus sakei*、*Micrococcus luteus* 3 株菌进行了研究,结果表明,以 *L. sakei* 做指示菌进行效价测定,测定结果的灵敏度和准确度较其他2株菌高^[6]。琼脂浓度。张国只等研究了琼脂浓度对 Nsin 的扩散程度的影响,结果显示,琼脂浓度对 Nsin 的灵敏度影响不大,但是对测定的准确度有较大的影响,在琼脂浓度0.75%时,具有较高的精确度^[7]。表面活性剂。许多研究发现表面活性剂对 Nsin 的扩散有促进作用。张国只等的研究发现,在培养基中添加浓度为0.5%的 Tween 20 能显著增加抑菌圈的清晰度,提高结果的准确性。预扩散。T. Pongtharangkul 等研究发现,样品在检验平板上经过4 预扩散24 h 后, Nsin 效价测定的灵敏度有明显的提高。同时发现4 预处理对指示菌的生长没有影响,这为测定工作提供了较大的方便。

1.1.4 应用特点。琼脂扩散法测定 Nsin 效价的结果受主观因素影响较大,但随着 CCD 技术在抑菌圈测定上的应用,操作过程大大简化,因主观因素造成的误差也大为减小。琼脂扩散法操作简单、成本较低,经过多年的改进与提高,在准确度和灵敏度方面也已经得到了很大的改善和提高;但是指示菌的选择、测定中的误差等各种影响因素对测定效果的影响是很难避免的,同时,琼脂扩散法的灵敏性和准确性有限,加上测定周期较长,所以,近年来涌现出一些灵敏度较高,或测定周期相对较短的鉴定和测定方法。

1.2 96孔聚乙烯板生物测定法 该方法是对传统浊度方法的改进,传统的浊度测量法,是一种半定量的测定方法,通过找到最低抑制浓度(MC)或半致死浓度(ID₅₀),然后以此浓度作为基准,通过稀释倍数来估算原溶液中 Nsin 的效价。浊度法简单易行,所以应用广泛。但因这种方法浓度不连续,且测定结果受主观因素影响较大,所以易产生较大误差。随着96孔聚乙烯板的使用,浊度法更加快捷方便。Carl Turcotte 等对96孔聚乙烯板生物测定法进行了系统的改进^[8],通过梯度稀释,由两种标准溶液2、1.5 μg/ml 得到16个标准样,其浓度在3~500 ng/ml,然后接种100 μl 乳酸片球菌指示菌悬液(1×10⁸ CFU/ml)。30 培养3~4 h 后在波长650 nm 下测定样品的 OD 值,最终在20~130 ng/ml 的范围内获得了较好的回归方程。用已知效价的样品对该方法进行验证,结果表明,这种测定方法的精确度和准确度都较琼脂扩散法有

基金项目 极端微生物及其功能利用的基础研究(973计划)“耐辐射菌等极端微生物DNA修复机制”(2004CB719604)。

作者简介 陈洪卫(1982-),男,山东滨州人,硕士研究生,研究方向:应用微生物学。* 通讯作者。

收稿日期 2007-11-15

较大提高。最为重要的是将测定时间从琼脂扩散法的20 h 以上缩短到了3~4 h。

1.3 分光光度法 为解决琼脂扩散法测定 Nsin 效价时间长的问題,吴兆亮等引进了分光光度法,通过 Nsin 浓度与指示菌吸光度间的函数关系测量 Nsin 的效价^[9]。首先,确定标准曲线 $A = a \ln Y + b$;并经检测培养基对指示菌活化,制备菌悬液,然后将菌悬液在检测培养液中培养,在600 nm 的波长下以空白检测培养基为参比,测定培养后的检测培养液吸光值 A,然后根据吸光值与溶液中 Nsin 效价的标准曲线关系,计算出样品效价。试验证明指示菌藤黄微球菌指数期的中后期作为接种期,接种量10%,加入待检样品后在33、150 r/min 摇培5 h,在600 nm 波长下测定吸光度值,可获得比较理想的结果。经验证,该方法的重复性良好,同时,对同一批样品多次检测所得结果相对误差均小于5%,符合工业检测的要求。分光光度法测定效价所用时间从琼脂扩散法的20 h 以上缩短到了5 h。

1.4 四甲基偶氮唑盐比色法 (MTT) MTT 是一种 唑盐,化学名3-(4,5-二甲基2-噻吩-2,5-二苯基溴化四唑),水溶液为黄橙色。在细胞内线粒体琥珀酸脱氢酶作用下 MTT,形成蓝色的甲臜(Formazan)颗粒沉积于细胞内或细胞周围,经溶解成为蓝色溶液,在特定波长下测定溶液的 OD 值。根据 OD 值的大小计算反应体系中细胞增殖程度。王芳等^[10]利用 MTT 法,在指示菌与样品共培养4 h 后加入 MTT,再培养2 h,离心出甲臜(Formazan)颗粒,用 DMSO 溶解后,在波长510 nm 下测定其 OD 值,以此来计算指示菌的数量,从而达到测量 Nsin 效价的目的。这种方法最低检测浓度在3.125 ng/ml。测定时间从琼脂扩散法的20 h 以上减少到了6 h 左右。

2 基于免疫学的测定方法

从20世纪70年代起,以免疫学为基础的特异性检测方法以其高效、高灵敏的特点被广泛应用。随着对细菌素研究的深入,研究者在利用免疫学方法进行 Nsin 的鉴定方面做了大量研究。在应用免疫法检测 Nsin 的发展历程中,抗体的制备经历了由多克隆抗体到单克隆抗体的发展过程。Bouksim 等^[11]采用 Nsin Z 多克隆抗体(pAb)的 ELISA 法, Falahee 等^[12]采用羊多克隆抗体的夹心式(Sandwich)酶联免疫吸附分析法测定 Nsin A 的方法, Suarez 等^[13]采用老鼠血清和腹水多克隆抗体和源于稳定融合细胞的单克隆抗体(mAb)的竞争型直接 ELISA(CD ELISA)测定 Nsin A 的方法。各种免疫学方法都表现出了较高的灵敏度。但是应用免疫法所测定的结果与实际情况之间存在着一定的偏差,因为所用的抗体与 Nsin 的相关组分会发生交叉反应,影响测定的结果。Daoudi 等研究了 Nsin Z 的单克隆抗体与 Nsin Z 的活性形式、非活性形式的反应性^[14]。结果显示在应用免疫学方法检测 Nsin 含量的时候,降解失活的组分也被计算在内。免疫学方法的精确度较高,但操作繁琐,且成本较高,所以目前其应用并不广泛。

3 基于 Nsin 基因自诱导特性的测定方法

Nsin 的生物合成具有自诱导特性。即亚抑制浓度的 Nsin 可以作为诱导剂促进 Nsin 的生物合成,同时也可以使 Nsin 的免疫基因启动,增强菌体对 Nsin 的免疫功能。根据

这种特性,Wahlström 等提出了 Nsin 的生物荧光测定法,设计出了质粒 pLEB535,其中包含有以 Nsin 的一个免疫基因启动子 PrsF 做启动子的荧光素酶基因 luxHb,质粒被转移进不产 Nsin 的菌株 *L. lactis* MG1614 中^[15]。以其为指示菌,将待检样品加入其中,培养3 h 后,加入荧光素酶底物,检测荧光强度,以此来计算 Nsin 的活性。这种方法的最低检测浓度低至0.0125 ng/ml,在牛奶中其最低检测浓度可以达到0.075 ng/ml,具有相当高的灵敏度。Reunanen 等随后对这种方法进行了改进,设计了质粒 pLEB599,其中以 GFP 基因作为指示基因,使得测定中无需再加入底物,同时使得可测定时期也大大延长^[16],但这种方法没有 Wahlström 所使用的荧光素酶方法敏感性高。Nra Imøren 等将荧光素酶操纵子 luxABCDE 置于 Nsin A 的控制下,转入到质粒 pNZ8048 中,然后把构建的质粒转入到 *Lactococcus lactis* 菌株 NZ9800、NZ9000 中,得到两株指示菌,在环境中存在 Nsin 的情况下会自动发光,通过对活细菌所发出光的测定就可以确定 Nsin 的量^[17]。在整个测定过程中无需加入荧光素酶底物,且整个测定过程只需要3 h,并且整个测定过程也相对简化,其灵敏度在 Nsin 溶液中可以达到0.1 pg/ml,在牛奶中,可以达到3 pg/ml,这是目前所有报道的测定方法中灵敏度最高的。

4 其他方法

除以上所介绍的各种测定方法之外,研究者也开发现了很多其他测定 Nsin 效价的方法,比如流式细胞仪测定(Fcm)法^[18]、ATP 生物荧光^[19]、毛细管区带电泳法^[20]等,不同的测定方法涉及到不同的方法和技术,但基本上都是以 Nsin 的抑菌作用为基础的,只是对指示菌的检测方法所使用技术各有不同。有些方法需要使用到一些特定的仪器和设备,所以并没有得到广泛的应用。

5 结语

目前为止,琼脂扩散法仍然是 Nsin 效价测定中使用最为广泛的方法。琼脂扩散法成本较低、操作简单,在样品吸光度较高的时候,依旧是不可替代的测定方法,但其步骤较为繁琐,耗时较长,并且灵敏度较低。在各种新开发的测定方法中,分光光度法虽然灵敏度较低,但可以快速的测量样品效价,主要应用于工业快速检测。96孔聚乙烯板生物测定法、MIT 法、生物荧光法和生物发光法都具有较高的灵敏度,测定时间也大大缩短,但不能用于光密度较大的样品,要在工业上投入使用,仍有待进一步的研究。免疫学方法的灵敏度高,但是因为抗体的交叉反应,其测量的准确度存在着一定的偏差,所以如果能够制备高特异性的抗体将会对免疫法测定技术的提高起到很大的推动。

参考文献

- [1] 还连栋,陈秀珠.天然食品防腐剂乳链菌肽的性质及其应用[J].天然产物研究与开发,1995,7(1):56-60.
- [2] 张国只,陈林海,王雁萍,等.乳链菌肽应用新进展[J].中国农学通报,2006,22(5):102-105.
- [3] 谢逢春,杨博.乳链菌肽的作用位点[J].生命的化学,2000,20(4):173-175.
- [4] 吴琼.乳链菌肽效价测定方法的研究[J].食品科学,1999(6):56-59.
- [5] TRAMER J, FOWLER G G. Estimation of risin in foods[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1964,15:522-528.
- [6] PONGHARANGKUL T, DEMIRCI A. Evaluation of agar diffusion bioassay for risin quantification[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2004,65:268-272.

地PYF 因子的酵母超前絮凝活性没有发生变化。

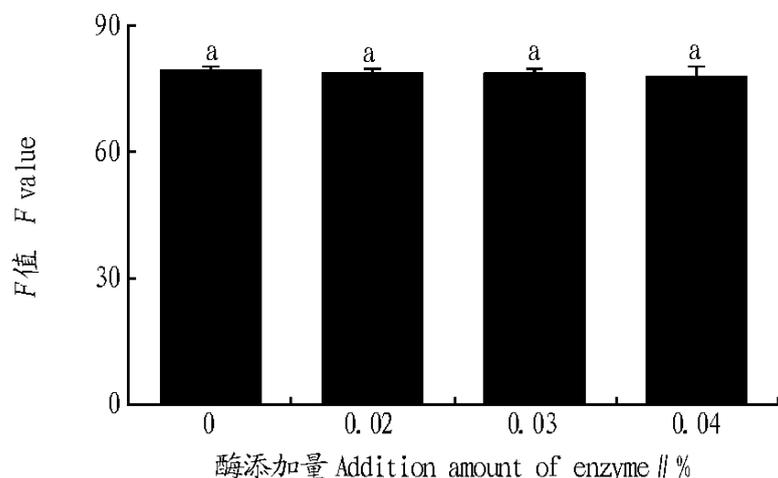


图1 不同添加量的A 型复合酶对PYF 因子水解的影响

Fig.1 Effects of different addition amount of compound enzyme A on hydrolysis ability of PYF factor

2.2 B 型复合酶对PYF 因子水解程度的影响 在该酶制剂推荐较适宜的添加量范围内进行PYF 因子水解试验。由图2 可知,B 型复合酶同A 型复合酶均不能因其存在而导致PYF 因子发生水解反应。酶添加量从0.005 % 升高到

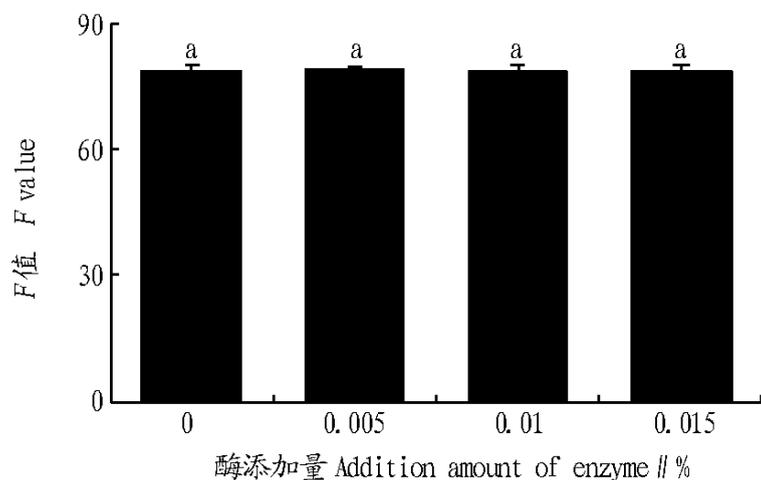


图2 不同添加量的B 型复合酶对PYF 因子水解的影响

Fig.2 Effects of different addition amount of compound enzyme B on hydrolysis ability of PYF factor

0.015 %, 溶液中PYF 因子絮凝活力平均值达 78.52 ± 0.30 , 与对照组PYF 因子絮凝活力值无显著性差异($P > 0.05$), 说明该复合酶不能水解麦芽中诱导酵母超前絮凝的PYF 因子。

3 讨论

啤酒复合酶制剂主要由-葡聚糖酶、木聚糖酶、戊聚糖酶、纤维素酶、中性蛋白酶、淀粉酶等组成, 能促进-葡聚糖、木聚糖、戊聚糖和纤维素、半纤维素及淀粉等大分子的水解, 但对麦芽中PYF 因子不具有水解作用。因此, 可以推断PYF 因子不同于这些大分子, 是一种具有特殊结构、不能被麦芽自身酶系和一般复合酶制剂水解的多糖或糖蛋白大分子。从另一个角度来看, 由于PYF 因子在复合酶的作用下不能被降解为小分子聚合物, 因此有必要利用生物大分子研究的最新技术和现代分离手段实现对异常麦芽中PYF 因子的分离纯化及其结构表征, 并在此基础上开发出水解PYF 因子的新型酶制剂, 以避免麦芽PYF 因子引起的酵母超前絮凝异常发酵, 最终为啤酒酿造行业提供有力的技术支持。

参考文献

- [1] NIEROP S NE, CLARKE A C, AXCELL B C. Enzymatic generation of factor from malt responsible for premature yeast flocculation[J]. *Yeast*, 1993, 12:207 - 213.
- [2] AXCELL B C, VAN NIEROP S, VUNDA W. Malt induced premature yeast flocculation[J]. *Tech Q Master Brew Assoc Am*, 2000, 37:501 - 504.
- [3] HERRERA V E, AXCELL B C. Induction of premature yeast flocculation by a polysaccharide fraction isolated from malt husk[J]. *J INST BREW*, 1991, 97 (5):359 - 366.
- [4] NAKAMURA T, CHIBA K, ASAHARA Y, et al. Prediction of barley which causes premature yeast flocculation[J]. *Proc Congr Eur Brew Conv*, 1997, 26:53 - 60.
- [5] KOZUMI H, OGAWA T. Rapid and sensitive method to measure premature yeast flocculation activity in malt[J]. *J Am Soc Brew Chem*, 2005, 63(4):147 - 150.
- [6] JHEK M, SASAKI K, KAGAMI N, et al. Application of a newly developed method for estimating the premature yeast flocculation potential of malt samples [J]. *J Am Soc Brew Chem*, 2006, 64(2):79 - 85.
- [7] 张国只, 陈林海, 杨天佑, 等. 琼脂扩散法测定乳链菌肽效价的优化[J]. *食品科学*, 2007, 28(3):175 - 178.
- [8] TURCOTTE C, LACROIX C, KHEADR E, et al. A rapid turbidimetric microplate bioassay for accurate quantification of lactic acid bacteria bacteriocins [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 90:283 - 293.
- [9] 吴兆亮, 贾永生, 谭相伟, 等. 分光光度法快速测定乳链菌肽效价[J]. *分析化学研究简报*, 2006(34):227 - 230.
- [10] WANG F, CAOL, HUS. A rapid and accurate 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide colorimetric assay for quantification of bacteriocins with risin as an example[J]. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 2007, 8(8):549 - 554.
- [11] BOUKSAIMM, FISS T, MEGHROUS J, et al. Immunodetection of risin Z in milk and whey using enhanced chemiluminescence[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1998, 84:176 - 184.
- [12] FALAHEE MB, ADAMS MR, DALE J W, et al. An enzyme immunoassay for risin[J]. *J Food Sci and Technol*, 1990, 25:590 - 595.
- [13] SUAREZ A M, RODRY GUEZ J M, HERNANDEZPE, et al. Generation of polyclonal antibodies against risin: immunization strategies and immunoassay development[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(6):2117 - 2121.
- [14] DACUD L, TURCOTTE C, LACROIX C, et al. Production and characterization of anti-risin z monoclonal antibodies: suitability for distinguishing active from inactive forms through a competitive enzyme immunoassay[J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2001, 56:114 - 119.
- [15] WAHLSTR M G, SARIS P E J. A risin bioassay based on bidurinescence [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(8):3742 - 3745.
- [16] REUNANEN J, SARIS P E J. Microplate bioassay for risin in foods, based on risin-induced green fluorescent protein fluorescence [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(7):4214 - 4218.
- [17] IMMUNEN N, KARP M. Bidurinescence based bioassays for rapid detection of risin in food [J]. *Sensors and Bioelectronics*, 2006, 22:1982 - 1987.
- [18] BUDE B B, RASCH M. A comparative study on the use of flow cytometry and colony forming units for assessment of the antibacterial effect of bacteriocins [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 63:65 - 72.
- [19] WAITES M J, OGDEN K. The estimation of risin using AIP-bidurimetry [J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 1987, 93(1):30 - 32.
- [20] ROSSANO R, DELIORE A, DEIA A, et al. New procedure for the determination of risin in milk [J]. *Biotechnology Techniques*, 1998, 12(10):783 - 786.

(上接第2625 页)