

抗菌素 natamycin 对酵母菌生长的影响

梁建芬 李勇

(中国农业大学 食品科学与营养工程学院,北京 100083)

摘要 考察了 natamycin 对酵母菌生长繁殖的影响,确定了其最低抑菌浓度及最佳添加时间。结果表明: natamycin 对酵母的生长繁殖有明显的抑制作用,其最小抑菌浓度为 $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;其抑菌效果与其浓度成正相关,与加入 natamycin 时酵母菌的初始活菌数成负相关;在酵母菌生长延迟期加入 natamycin 抑菌效果明显好于稳定期加入。

关键词 natamycin; 酵母菌; 抑菌效果; 最小抑菌浓度

中图分类号 TS 202.3

文章编号 1007-4333(2004)01-0096-04

文献标识码 A

Effect of natamycin on growth of yeast

Liang Jianfen, Li Yong

(College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract Effect of different concentrations of natamycin on yeast growth was studied. In order to investigate the inhibitory effect of natamycin, the different amounts of natamycin were added in malt broth at the different growth periods of yeast. The result showed that natamycin had significant effect on yeast growth, and its minimum inhibitory concentration was $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; the capabilities of natamycin to inactivate the yeast was in direct proportion to the concentration, but it was in inverse proportion to the quantity of alive yeast; the inhibition was more effective when the natamycin was added at the lag phase than at the stationary phase.

Key words natamycin; yeast; inhibition; minimum inhibitory concentration

Natamycin (纳它霉素) 也称游链霉素 (pimaricin), 其商品名称为霉克 (Natamaxin TM)^[1]。natamycin 是一种重要的多烯类抗菌素, 可以由纳塔链霉 (*Streptomyces natalensis*) 和恰塔努加链霉 (*S. chatanoogensis*) 等链霉菌发酵生成。该抗菌素是一种很强的抗真菌试剂, 能有效抑制酵母菌和霉菌的生长, 阻止丝状真菌中黄曲霉毒素的形成^[2]。1996 年我国食品添加剂委员会对 natamycin 进行了评价, 并建议批准使用。该产品现已列入食品添加剂使用标准^[1]。

Natamycin 的抑菌机理在于它能与细胞膜上的甾醇化合物, 尤其是麦角甾醇反应, 由此增强了细胞膜对 K^+ 和其他分子的通透性, 最终导致细胞死亡; 但也有些学者认为 natamycin 之所以改变了细胞膜的通透性, 是由于 natamycin 与细胞膜上的甾醇形

成一种复杂的复合物, 减弱了细胞膜的坚韧性, 使其容易破裂, 从而导致细胞死亡^[3]。

Natamycin 在国外已广泛应用于医药和食品行业。医药主要用于人体及动物体表面的局部治疗; 食品行业主要用于奶酪、香肠的表面处理, 防止真菌生长^[3], 也用于酸奶等发酵奶制品的保藏和抑制发酵过程的杂菌污染。Stack 的研究表明, 培养基中含有 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 natamycin 就可以完全阻止真菌的生长^[4]。Gourama 研究了 natamycin 对橄榄浆中赭曲霉的生长及产青霉素的影响, natamycin 与橄榄浆的质量比分别为 85, 175 和 $350 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 时, 赭曲霉的生长及其产生分生孢子的能力随着该质量比的增大而下降, 该质量比为 $350 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 时, 赭曲霉产生青霉素的能力降低 96%^[5]。Vinderola 的研究结果表明, natamycin 对乳酸发酵剂和细菌型生物制剂的生长

收稿日期: 2003-06-23

作者简介: 梁建芬, 副教授, 主要从事果蔬加工与食品营养的研究。

没有影响^[6]。

在我国 natamycin 的生产刚刚起步,有关研究报告较少,而且由于目前对其抑菌机理及对不同微生物的抑菌浓度还不完全清楚,物理、化学因素对其活性的影响也没有详细的报道,使 natamycin 的广泛应用受到限制。

笔者参考国外学者对 natamycin 在奶酪中抑制霉菌生长及其在酸奶发酵中的应用研究结果,研究了 natamycin 对酵母菌生长繁殖的影响。

1 材料与设备

1) 实验材料。菌种为 *Saccharomyces cerevisiae*; natamycin 由北京东方瑞德生物技术公司提供, natamycin 和乳糖各为 50% (质量分数); 液体麦芽汁购于北京市五星啤酒厂; 琼脂粉、美蓝染液等。

2) 主要仪器与设备。显微镜 XSZ-G, 上海光学仪器厂生产; 杀菌釜 SAN YO AUTOCLAVE MLS-3020, SAN YO Electric Co. Ltd; 水浴振荡器 H2S-H, 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司生产; 生化培养箱 PSH-525, 重庆实验设备厂生产。

2 实验方法

1) Natamycin 无菌溶液的配制。将 0.15 g 固体粉末状 natamycin 加入 150 mL 无菌水中, 用滤菌器 (0.2 μm) 过滤制成 500 μg · mL⁻¹ 的 natamycin 溶液。

2) 酵母菌的计数。总菌数的检测采用血球计数法^[7], 用血球计数板在显微镜下直接计数; 活菌数

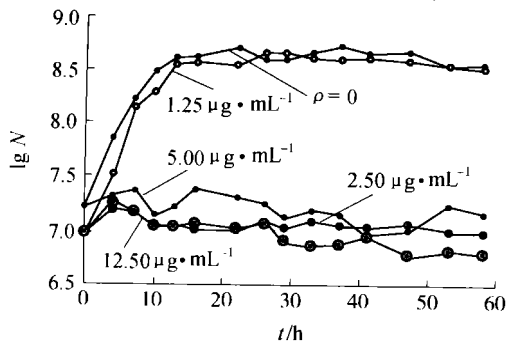
的检测, 使用美蓝染液染色后再用血球计数法检测。

3) 实验步骤。a. 酵母菌活化: 将酵母菌用麦芽汁 (121 °C, 15 min 灭菌) 在 30 °C 摇床培养 48 h 活化, 得到酵母菌悬液。b. 酵母菌生长延迟期加入 natamycin: 将活化好的酵母菌悬液接入麦芽汁的同时加入一定浓度的 natamycin 进行培养。c. 酵母菌生长稳定期加入 natamycin: 将活化好的酵母菌悬液接种到装有麦芽汁的三角瓶中, 30 °C 水浴摇床培养 12 ~ 18 h, 酵母菌生长进入稳定期后, 将酵母菌悬液分装, 同时加入 natamycin 进行培养。

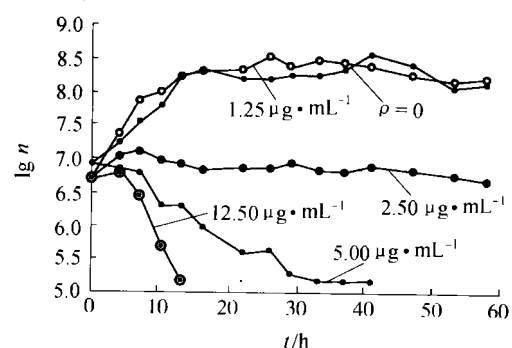
3 实验结果与分析

3.1 延迟期加入 natamycin 对酵母菌生长的影响

1) 酵母菌总数的变化。由图 1(a) 可以看出, natamycin 对酵母菌生长的影响与其添加量有较大的关系。在未添加 natamycin 的麦芽汁中, 酵母菌生长繁殖正常, 且有规律。natamycin 添加量为 1.25 μg · mL⁻¹ 时, 对酵母菌的生长繁殖影响不大, 酵母菌的生长规律同未加 natamycin 的非常接近; 添加量分别为 2.50, 5.00, 12.50 μg · mL⁻¹ 时, 酵母菌的细胞总数基本维持在接种时的水平, 仅在一个较小的范围内波动, 略有下降趋势。由此可见, natamycin 添加量为 1.25 μg · mL⁻¹ 时不能抑制酵母菌的生长繁殖, 高于 2.50 μg · mL⁻¹ 时酵母菌的生长受到抑制。这一结果在 Gourama 所得到的 natamycin 的最低抑菌浓度范围 (1 ~ 15 μg · mL⁻¹) 之内^[5]。



(a) 酵母菌总数 N 的变化



(b) 酵母菌活菌数 n 的变化

图 1 酵母菌生长延迟期加入 natamycin 对酵母菌生长的影响

Fig. 1 Effect on the growth of yeast added natamycin at lag phase

2) 酵母菌活菌数的变化。由图 1(b) 可以看出, 未加 natamycin 的麦芽汁中酵母菌活细胞的对数期为接种后的 0 ~ 16 h, 16 ~ 55 h 是稳定期, 55 h 后逐渐进入衰亡期。natamycin 添加量为 1.25 μg · mL⁻¹

时, 麦芽汁中酵母菌活细胞数的变化趋势和未加 natamycin 的相差不多; 添加量为 2.50 μg · mL⁻¹ 时, 麦芽汁中酵母菌活细胞总数几乎没有增加, 基本维持在接种时的水平, 随着时间的推移活细胞总数略

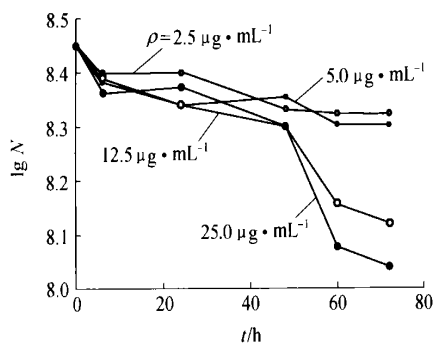
呈下降趋势;添加量分别为 5.00 和 $12.50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,麦芽汁中活细胞总数均有明显的下降趋势,且添加量为 $12.50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的培养基中,活细胞的下降趋势明显快于 $5.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的。natamycin 添加量为 $1.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时不能抑制酵母菌活细胞的生长繁殖,添加量分别为 $2.50, 5.00$ 和 $12.50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时均能抑制酵母菌活细胞的生长繁殖;但是 natamycin 添加量为 $2.50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时不能很快杀死酵母菌活细胞,添加量为 $5.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,40 h 左右酵母菌活细胞数降低一个数量级(从 $10^6 \text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 降到 $10^5 \text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$);添加量为 $12.50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,16 h 左右酵母菌活细胞数降低一个数量级(从 $10^6 \text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 降到 $10^5 \text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$)。在高于有效抑菌浓度的前提下,natamycin 质量浓度越高,酵母菌细胞致死所需的时间越短。这与 Gourama^[5] 的结论类似。

3.2 稳定期加入 natamycin 对酵母菌生长的影响

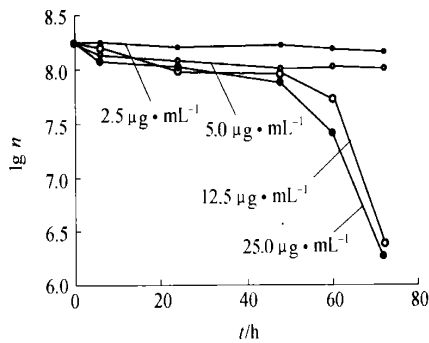
1) 酵母菌总数的变化。由图 2(a)可以看出,natamycin 添加量分别为 $2.5, 5.0, 12.5$ 和 $25.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的麦芽汁中,酵母菌总数均未呈增加趋势。natamycin 添加量为 2.5 和 $5.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,总菌数波动一直比较平稳;添加量为 12.5 和 $25.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,培养 45 h 后,总菌数下降趋势明显。培养

72 h 后,natamycin 添加量分别为 2.5 和 $5.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的麦芽汁,酵母总菌数减少 $20\% \sim 30\%$;添加量为 12.5 和 $25.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的减少 $50\% \sim 60\%$ 。

2) 酵母菌活菌数的变化。由图 2(b)可以看出,natamycin 添加量分别为 2.5 和 $5.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,麦芽汁中酵母活菌数是一条比较平稳的直线;添加量分别为 12.5 和 $25.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,45 h 前酵母菌活菌数为比较平稳的直线,超过 45 h 后活细胞数开始明显下降,到 72 h 时,活细胞的减少量达到 99% 。在酵母菌生长的稳定期,菌悬液中活菌数较高(约达到 $10^8 \text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$),而且在此期间,酵母耐受不良环境变化的能力也比较强,因此 natamycin 不会迅速杀死酵母菌;但是由于达到有效抑菌浓度($2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)的 natamycin 的作用,酵母菌的活菌数不会增加。随着时间的推移(培养 45 h 后),酵母对高浓度的 natamycin 的耐受力开始逐渐降低,活菌数开始减少。由此可见,在酵母活菌数较高且酵母菌处于生长稳定期的情况下,natamycin 要杀死酵母菌不仅需要更高的浓度,也需要更长的时间。Boer 的研究表明,霉菌对 natamycin 不会产生明显的抗药性^[8],从本研究结果来看,处于稳定期的酵母对 natamycin 有一定的耐受力,但长期使用是否会产生耐药性有待于今后进一步研究。



(a) 酵母菌总数 N 的变化



(b) 酵母菌活菌数 n 的变化

图 2 酵母菌生长稳定期加入 natamycin 对酵母菌生长的影响

Fig. 2 Effect on the growth of yeast added natamycin at stationary phase

4 结论

1) Natamycin 抑制酵母菌生长繁殖的最小有效质量浓度为 $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。在酵母菌初始活菌数相同的条件下,natamycin 的抑菌效果与其质量浓度成正比,即 natamycin 质量浓度越高,杀菌所需时间越短,效果也越明显。natamycin 的杀菌效果同酵母菌所处生长阶段有很大关系,在其生长延迟期加入

natamycin 杀菌效果明显好于稳定期加入。

2) Natamycin 只抑制活细胞的生长繁殖或者杀死活细胞,使其数目减少,从而使麦芽汁中酵母菌总数和活细胞数减少,但并不会使死细胞溶解。

研究中发现,麦芽汁培养基中 natamycin 的存在不仅使酵母菌的生长规律发生了变化,其形态和大小也发生了明显的变化,这些变化有待于今后的进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 汤凤霞, 乔长晟, 宋卫东. natamycin 及其在食品中应用的研究[J]. 食品科技, 2000, (6): 43 ~ 44
- [2] Bas fíco J C, deBas fíco M Z, Chiericatti C, et al. Characterization and control of thread mould in cheese[J]. Letters in Applied Microbiology, 2001, (32): 419 ~ 423
- [3] Committee for veterinary medicinal products natamycin. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines Evaluation Unit [S]. E-meia / mrl/ 342/ 98-final, 1998
- [4] Stack J A, Harrison M, Perrett L L. Evaluation of a selective medium for *Brucella* isolation using natamycin [J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 92: 724 ~ 728
- [5] Gourama H, Bullerman L B. Effects of potassium sorbate and natamycin on growth and penicillic acid production by *Aspergillus ochraceus* [J]. Journal of Food Protection, 1998, 51 (2): 139 ~ 144
- [6] Vinderrola C G, Costa G A, Regenhardt S, et al. Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria [J]. International Dairy Journal, 2002 (12): 579 ~ 589
- [7] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册 [M]. 北京: 轻工业出版社, 1994. 62 ~ 63, 220 ~ 222
- [8] Boer E de, Stolk-horsthuis M. Sensitivity to natamycin (pimaricin) of fungi isolated in cheese warehouses [J]. Journal of Food Protection, 1977, 40 (8): 533 ~ 536

科研简讯

绒山羊绒毛生长机理及营养调控技术研究通过鉴定

2003 年 12 月, 我校贾志海教授主持完成的“绒山羊绒毛生长机理及舍饲半舍饲营养调控技术研究”顺利通过农业部组织的专家鉴定。该项成果系统研究了绒山羊绒毛生长规律、生长机理、营养代谢及调控技术, 为我国绒山羊科学化饲养提供了理论依据和技术保障。该成果达到国际先进水平, 绒山羊营养调控技术达到国际领先水平。

研究成果已在内蒙古、河北、陕西等地的 600 万只绒山羊中推广应用, 大大加快了绒山羊舍饲半舍饲进程, 取得了巨大的经济效益和社会效益, 绒山羊饲养区的草场退化得到了遏制, 生态环境得到了恢复和改善。

(科技处供稿)