

红茶菌抗菌蛋白产生方式的初步研究*

谢俊杰 余世望 许 杨 晏学明 张辉亮

(中德联合研究院 南昌 330047)

摘要: 从红茶菌液中分离得到膜醋酸菌与裂殖酵母。采用单菌培养与混合菌培养,探讨了各菌对红茶菌抗菌蛋白的产生所起的作用。初步推断,裂殖酵母先合成相关蛋白,该蛋白经膜醋酸菌产生的酶修饰后,抗菌活力显著提高。不同属酵母与膜醋酸菌共培养,结果表明裂殖酵母优于其它酵母。

关键词: 红茶菌,抗菌蛋白,产生方式

中图分类号: Q93.936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)06-0424-03

THE PRODUCTION OF ANTIBACTERIAL PROTEIN IN TEA FUNGUS

XIE Jun-Jie SHE Shi-Wang XU Yang YAN Xue-Ming ZHANG Hui-Liang

(Sino-German Joint Research Institute, Nanchang 330047)

Abstract: The *Acetobacter xylinum* and *Schizosacchomyces* sp. were isolated from tea fungus culture.

* 江西省教委科技发展基金项目

收稿日期:1999-11-15,修回日期:2000-01-30

Each strain's function on the production of antibacterial protein was explored by single-strain culture and double-strain culture under various condition. The preliminary conclusion is that the protein is synthesized by the yeast cells and its antibacterial activity is significantly improved through modification by bacteria enzymes. The results of co-cultures of several yeasts with the *Acetobacter xylinum* show that *Schizosaccharomyces* is superior to other yeasts.

Key words: Tea fungus, Antibacterial protein, Production

从传统发酵食品中分离并培养微生物,再从培养物中分离抗菌物质,这是筛选食品天然防腐剂一个行之有效的办法。因为发酵食品本身的安全性说明了菌种及代谢产物的安全性。国内外已开展了这方面的工作,但主要停留在对单一菌的研究上^[1,2]。

红茶菌(又称海宝)是一种传统活菌饮料,曾遍及几十个国家。红茶菌是酵母和细菌形成的共生菌;红茶菌能调整人体某些生理机能,增强体质且对人体无毒副作用^[3]。迄今为止,红茶菌的研究工作主要为红茶菌组成菌的分离鉴定及代谢产物(有机酸与乙醇)的测定^[4,5]。

本课题组对本院保藏的红茶菌进行了初步研究,发现它是由膜醋酸菌与裂殖酵母组成;红茶菌的抗菌作用来源于培养液中的有机酸及抗菌蛋白。本文旨在探讨组成红茶菌的细菌与酵母对产生抗菌蛋白所起的作用,以便更好地制备抗菌物。

1 材料与方法

1.1 菌种

红茶菌,金黄色微球菌,啤酒酵母,产朊假丝酵母,粘红酵母:本院保藏。

对红茶菌组成菌进行了分离,只得到一株细菌与一株酵母菌。细菌呈细杆状,革兰氏阴性,过氧化氢酶阳性,好氧,斜面上形成菌膜,液体培养产醋酸,初步鉴定为膜醋酸菌(以下称细菌 B);酵母菌呈扁椭圆状,有子囊孢子(多为 4 个),无芽殖,以裂殖为主要繁殖方式,兼性厌氧,初步鉴定为裂殖酵母(以下称酵母 Y)。

1.2 红茶菌培养

红茶 0.3%、蔗糖 5%:在沸水中加入红茶,5min 后去渣,加入蔗糖,制得糖茶水。冷后接入一小块红茶菌菌膜,30℃ 静置 5d。

1.3 单菌培养

每 100mL 糖茶水中分别接入 5 环细菌 B 或酵母 Y,30℃ 静置 5d。

1.4 混合菌培养

每 100mL 糖茶水中分别接入细菌 B 和酵母 Y 各 2.5 环,30℃ 静置 5d。

1.5 透析培养

采用 8~10kD 的透析膜,扎成小袋,袋内装 50mL 糖茶水,接入 2.5 环酵母 Y,置于三角瓶中;瓶内装 100mL 糖茶水,接入 5 环细菌 B,30℃ 静置 5d。

1.6 接力培养

将培养了 2.5d 的细菌 B 或酵母 Y 培养物,经过滤、离心除菌(无菌操作)后,再分别接入 5 环酵母 Y(细菌 B→酵母 Y)或细菌 B(酵母 Y→细菌 B),30℃ 静置 2.5d。

1.7 变温培养

混合菌培养时,前后段采用不同温度,即 30℃→37℃,2.5d,37℃→30℃,2.5d。

1.8 蛋白质提取

将培养液除菌后,减压浓缩,加入 2 倍冷丙酮,收集析出物,溶于蒸馏水中,得蛋白液。

1.9 蛋白浓度测定

采用 Folin-酚法^[6]。

1.10 抗菌作用测试

4mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基中加入 1mL 待测抗菌物(抗菌物预先澄清,调 pH5.0,巴氏灭菌处理)并以无菌水作对照。

各管加入 0.3mL 金黄色微球菌菌悬液($10^7 \sim 10^8$ 个/mL),混匀,37℃ 培养 20h,测 600nm 处 OD 值。

$$\text{抗菌率} = \frac{OD_{\text{对照}} - OD_{\text{样品}}}{OD_{\text{对照}}} \times 100\%, OD \text{ 为}$$

平行试验平均值。

2 结果与讨论

2.1 红茶菌各组成菌的分布

红茶菌培养至第 5d, 闻之有怡人的酸味, 菌膜悬浮于液面, 菌液清亮, 瓶底有少量沉淀物。镜检发现, 菌膜由细菌形成, 酵母夹杂其中或吸附在菌膜下部, 菌液中有少量酵母与细菌,

沉淀物中有大量酵母与极少量细菌; 美兰染色发现各处的酵母存活率接近。

2.2 单菌培养、混合菌培养、透析培养结果比较

培养结束后, 取各种培养液进行抗菌实验。为了消除有机酸浓度差异的影响, 抗菌物的 pH 均调至 5.0。结果如表 1 所示。

从表 1 可看出, 红茶菌菌膜是由细菌 B 形成的, 酵母 Y 对菌膜的颜色略有影响。酵母 Y

表1 单菌培养、混合菌培养、透析培养测定结果

	细菌B	酵母Y	混合菌	红茶菌	透析袋内液	透析袋外液
菌膜	无色透明	无	乳白色	乳白色	无	无色透明
pH	3.86	3.41	2.95	2.85	2.85	3.10
抗菌率	-5.6%	16.1%	59.5%	56.5%	55.9%	57.3%

注: 抗菌率负号表示促菌生长

培养物具有弱的抗菌作用; 当与细菌 B 共培养时, 抗菌作用显著提高。混合菌培养与红茶菌培养的生长情况及抗菌作用很接近, 证实红茶菌是由细菌 B 与酵母 Y 组成。

透析袋内、外液抗菌率相近, 表明抗菌物是一种小分子量物质。抗菌作用的提高是 2 菌代谢产物共同作用的结果, 与 2 菌是否直接接触无关。

2.3 蛋白提取液的抗菌作用

分别将细菌 B、酵母 Y、混合菌及红茶菌培养液中的蛋白组份提取出来, 调整至相同浓度,

并取细菌 B 与酵母 Y 的蛋白液各一半混合, 做抗菌实验。

测得抗菌率依次为 -15.5%、44.2%、84.6%、89.7%、18.9%。结果说明, 细菌 B 与酵母 Y 共培养抗菌作用的提高, 并非简单的代谢物加和作用, 而是由培养过程中代谢物的相互作用引起的。

2.4 接力培养与变温培养

为了进一步探讨 2 菌在抗菌蛋白产生中所起的作用, 设计了不同培养方法。测定结果见表 2。

表2 接力培养、变温培养测定结果

	酵母Y	混合菌	细菌B→酵母Y	酵母Y→细菌B	混合菌 30℃→37℃	混合菌 37℃→30℃
菌膜	无	乳白色	无色透明	无色透明	乳白色	乳白色
pH	3.44	3.07	3.62	3.18	2.94	3.80
抗菌率	21.1%	62.3%	32.7%	52.8%	70.9%	17.6%

2 种接力培养产物的抗菌率均低于混合菌培养, 但酵母 Y→细菌 B 的差距小得多。2 种变温培养产物的抗菌率有很大差别, 30℃→37℃变温培养高于 30℃恒温培养。30℃为酵母较适生长温度, 37℃为细菌较适生长温度。

据此, 对红茶菌抗菌蛋白的产生方式可作以下推断: 首先, 酵母产生出具有较弱抗菌作用的蛋白; 然后, 细菌产生某种酶, 这种酶对抗菌蛋白进行修饰, 使其活性大大提高。

2.5 不同属酵母与细菌 B 混合培养

不同属的酵母对抗菌蛋白的产生是否有影响? 选择了另外 3 种酵母与酵母 Y 进行比较,

结果如表 3 所示。

表3 不同属酵母与膜醋酸菌共培养结果

	粘红酵母	啤酒酵母	假丝酵母	酵母Y
菌膜	絮状	网状	胶状	胶状
pH	4.20	3.35	3.41	2.95
抗菌率	0.9%	39.8%	30.5%	45.8%

采用不同属酵母, 生长及抗菌作用都有较大的差别; 其中以酵母 Y 为优, 这也许是一种自然的选择。因此, 选择合适的酵母与膜醋酸菌共培养, 将是提高“红茶菌”抗菌蛋白抗菌活力的措施之一。

参 考 文 献

- [1] Ivanova I, Miteva V, Stefanova Ts *et al.*
International Journal of Food Microbiology, 1998, 42:
147~158.
- [2] 杜连祥, 郝利民, 路福平等. 食品与发酵工业, 1998,
24(1): 7~10.
- [3] 食品科技杂志社编. 红茶菌与健康长寿. 北京: 工商出

版社, 1981.

- [4] Hiroshi H, Satoshi M, Tomoaki W *et al.* Shokuhin
Eiseigaku Zasshi, 1978, 19(3): 273~281.
- [5] Blanc P J. Biotechnology Letters, 1996, 18(2): 139~
142.
- [6] 李建武, 肖能惠, 余瑞元等. 生物化学实验原理和方法.
北京: 北京大学出版社, 1994, 168~170.