

细菌素作为生物防腐剂的研究现状

许 杨 孙红斌 谢俊杰

(江西-中德联合研究院 南昌 330047)

化学防腐剂潜在的安全隐患愈来愈不容忽视,寻找一种新的代用品以减少化学防腐剂所造成的潜在危害已为各国科研工作者所瞩目。自从1969年英国食品防腐剂委员会和世界卫生组织联合食品添加剂专家委员会确认nisin为食品防腐剂以来,nisin作为第一个应用于食品中的细菌素,以其生产基因稳定,抑菌范围较广的特性已陆续被许多国家接受。

细菌素是某些细菌在代谢过程中通过核糖体合成机制产生的一类具有抑菌活性的多肽或前体多肽,抑菌范围不局限于同源的细菌,产生菌对其细菌素有自身免疫性^[1]。

能够产生细菌素的菌株很多,但并非所有的细菌素或其生产菌种皆可应用于食品中,作为发酵菌种的乳酸菌产生的细菌素以其对动物无毒性,无抗原性,可杀死一些食品腐败菌,对热稳定,且易被人体消化道的一些蛋白酶所破坏,不会在体内蓄积引起不良反应等特性而被认为具有广阔前景,国内外学者对其分类、命名、抑菌范围、作用方式及稳定性等方面做了许多研究。

1 乳酸菌产生的细菌素的分类及命名

1.1 分类

根据化学结构^[2],可将乳酸菌的细菌素大致分为四类:①Lantibiotics。具有羊毛硫氨酸(lanthionine)或 β -甲基羊毛硫氨酸(β -methyllanthionine)基团。②肽类细菌素。是一类分子量小于10Ku,疏水的具有膜活性的

肽。这类细菌素又可分为三个亚类^[3,4]:(a)N-末端氨基酸序列为: - Thr - Gly - Asn - Gly - Val - Xaa - Cys,具有抗李斯特杆菌活性。(b)孔道复合物由两个不同的肽的寡聚体形成。(c)能被硫醇激活,活性基团要求有还原性半胱氨酸残基。③蛋白类细菌素。分子量大于10Ku,对热不稳定。④复合型细菌素。除蛋白质外还含有碳水化合物或类脂基团。第二、三、四类因不含lanthionine基团,又被称为非lantibiotic细菌素(non-lantibiotic bacteriocin)。

1.2 命名^[1]

细菌素的命名方式目前尚无共同标准,有以菌种的属名来命名的,也有以种名为依据的,同一菌种不同株产生的细菌素则于名称后以该菌株的数字名称或以字母表示。

由于缺少统一的命名规则,使细菌素的名称看起来杂乱无章,如: *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc gelicium* 和 *Leuconostoc carnosum* 产生的细菌素分别为 mesentericin Y105, leucocin AUAL-187, leuconocin Lcml; 从 *Carnobacterium piscicola* 不同株产生的细菌素分别被命名为 carnobacteriocin, carnocin, piscicotin 及 piscicocin。此外, pediocin PA-1 和 pediocin AcH 的化学结构相同; lactococcin A 及 diplococcin 是同一个肽; curvacin A 及

1997-04-14收稿

sakacin A 是同一个肽。为了改变这种混乱的情况,有学者建议新的细菌素在命名之前应先做氨基酸序列分析及相应结构基因的核酸序列分析,具有相同氨基酸序列的细菌素应按第一个发表的给以同一名称^[4]。

2 细菌素的抑菌范围^[1,2]

革兰氏阳性菌产生的细菌素可抑制其他的革兰氏阳性菌,lanibiotic 型的 nisin 可抑制许多革兰氏阳性菌,非 lanibiotic 型细菌素的抑菌范围则有所不同,如 pediocin ACh 对革兰氏阳性菌的抑菌范围较广,而 lactococcin A 的抑菌范围却很窄。有些细菌素不仅能够抑制与其产生菌关系密切的菌株,还能抑制一些食品腐败菌。作为菌母的乳酸菌产生的细菌素在食品发酵生产中能抑制其它杂菌,因此乳酸菌的细菌素是生物防腐剂的一个研究重点。(乳酸菌细菌素的抑菌范围见表 1)。

3 细菌素作用机制的研究^[3,1]

3.1 Lanibiotic 型

尽管此型的 nisin 已广泛应用于食品防腐,但对其作用机制仍不甚明确。由于 nisin 带正电荷,且经它处理后的细菌细胞紫外吸收物质有泄漏现象,最初认为它是一种表面活性剂;因为 nisin 中的脱水丙氨酸和脱水丁氨酸可能与细菌细胞中酶的巯基发生作用,进而又有人认为 nisin 的作用机制与这两个脱水氨基酸有关^[1]。还有人认为细菌素的作用机制主要是消耗细菌细胞的质子驱动力 (PMF, Proton motive force)^[8,9,10]。目前认为 nisin 等 lanibiotic 型细菌素的靶器官是细菌的细胞膜,在一定的膜电位的存在下,吸附于感受菌的细胞膜上。侵入膜内形成通透孔道(因此有人认为 lanibiotic 型细菌素属于孔道形成蛋白),可允许分子量为 0.5kDa 的亲水溶液通过,导致 K⁺ 从胞浆中流出,细胞膜去极化及 ATP 泄漏^[3],细胞外水分子流入,细胞自溶而死亡^[1]。因其作用需膜电位的存在,故又称为能量依赖型细菌素。

3.2 非 Lanibiotic 型

此型细菌素也是在细胞膜上形成一个亲水孔道,但这个亲水孔道是经膜上特定的受体蛋白介导的,与膜电位无关^[1,3]。该类细菌素又被称为非能量依赖型细菌素。与 Lanibiotic 型相比,此型细菌素的作用主要是破坏膜功能的稳定性(如能量转导),而不是破坏膜结构的完整性。

表1 细菌素及其抑菌范围

细菌素	抑菌活性	参考文献
Acidocin A	<i>Listeria monocytogenes</i> , lactic acid bacteria	[6]
Acidocin B	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Clostridium sporogenes</i> , <i>Brochothrix thermosphacta</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lac. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i>	[7]
Bavaricin A	<i>Listeria monocytogenes</i> .	[2]
Bavaricin MN	<i>L. monocytogenes</i> .	[2]
Carnobacteriocins A and B	<i>L. monocytogenes</i>	[2]
Carnocin 44	<i>L. monocytogenes</i> .	[2]
Curvacin A	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> .	[2]
Curvacin B	<i>L. monocytogenes</i> , <i>St. aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i>	[2]
Diacetin B	<i>L. monocytogenes</i> , <i>St. aureus</i> , <i>Clostridial strains</i>	[4]
Lactacin F	<i>Lactobacillus species</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	[5]
Leucocin VAL 187	<i>L. monocytogenes</i> ,	[2]
Leuconocin S	<i>Cl. botulinum</i> , <i>St. aureus</i> <i>L. monocytogenes</i>	[2]
Mesenterocin 5	<i>L. monocytogenes</i>	[2]
Mesenterocin 52	<i>L. monocytogenes</i>	[2]
Mesenterocin Y105	<i>L. monocytogenes</i>	[2]
Pediocin A	<i>L. monocytogenes</i> , <i>St. aureus</i> <i>Cl. perfringens</i> <i>Cl. botulinum</i>	[2]
Pediocin ACH	<i>Cl. perfringens</i> , <i>B. cereus</i> <i>L. monocytogenes</i> , <i>St. aureus</i>	[2]
PediocinPC	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Cl. perfringens</i>	[2]
Plantaricin SA6	<i>Mesophilic lactobacilli</i>	[7]
Sakacin A	<i>L. monocytogenes</i>	[2]
Sakacin M	<i>L. monocytogenes</i>	[2]
Sakacin P	<i>L. monocytogenes</i>	[2]

细菌素的作用受许多因素制约。如 pH 值、细菌浓度、磷脂成份、蛋白酶、温度、食品性状等。在 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Gd^{3+} 等二价或三价阳离子存在时, nisinZ 的作用显著减弱。因为这些阳离子与磷脂头部基团的负电荷反应, 一方面竞争性地抑制了细菌素的正电荷与细胞膜的静电作用, 另一方面中和了磷脂头部基团的负电荷, 使类脂体聚合从而细胞膜更加坚固^[3]。

4 细菌素的稳定性

各类细菌素的稳定性不一。如 jensenin G 在 100℃ 时只能维持 15 分钟^[11], 而 diacetinB^[4] 和 pediocinPO₂^[12] 于 121℃ 作用 15 分钟后仍可保持活性, 但前者的活性具有较广的 pH 范围 (pH2~11), 后者却只有在低 pH 范围内才能起作用。nisin 在 4℃ 比在 20℃ 更稳定, 且在较低 pH 范围内具有活性, pH6.4 时, 23% 的 nisin 失活^[12]。

5 结论

细菌素(主要是 nisin)作为生物防腐剂已被 50 多个国家应用于乳品业、酿酒业、粮食和肉类加工业, 我国也已批准 nisin 作为食品防腐剂, 并对其做了较为深入的研究, 包括菌株的选育^[13], 发酵条件的探索^[14], 结构基因的 PCR 扩增, 基因定位及克隆株的构建^[15]等。nisin 已由浙江天台制药厂生产。除 nisin 外, 我国对其他细菌素如: 抑菌素 (antimicrobials)^[16], 地衣芽胞杆菌产生的抗菌物质等^[17]也进行了初步研究。

细菌素以其安全、高效、无毒而倍受推崇, 但也存在着一定的局限性。尤其是在抑菌范围方面, 乳酸菌产生的细菌素只能抑制一些革兰氏阳性菌, 对大多数革兰氏阴性菌及霉菌都无抑菌作用, 但也有报道用络合剂(如 EDTA 或柠檬酸)结合革兰氏阴性菌细胞壁脂多糖层的镁离子, 改变细胞壁的渗透屏障特性, 可使一些革兰氏阴性菌对 nisin 或 pediocinACh 敏感^[3]。还有人认为如将 nisin 与山梨酸(主要抑制霉菌, 酵母及需氧细菌)配合使用, 将弥补彼此在抗菌谱方面的不足, 发挥广泛的防腐作用。另外, 已有报道将 lactacinF 的操纵子引入 *Carnobacteriocin* 的产生菌 *Carnobacterium*

piscicola LV17k 中, 重组后的细菌素同时具有两种细菌素的抑菌活性^[5]。随着细菌素性质及作用机理的进一步研究, 基因重组技术的应用和发展^[1,15], 细菌素作为天然食品防腐剂的应用将更广泛。

参 考 文 献

- [1] Jack R W, Tagg J R, Ray B. *Microbiol Rev*, 1995, 59: 171~200.
- [2] Holzapfel W H, Geisen R, Schillinger U. *Int J Food Microbiol*, 1995, 24: 343~362.
- [3] Abee T, Krockel L, Hill C. *Int J Food Microbiol*, 1995, 28: 169~185.
- [4] Ali D, Lacroix C, Thauault D, *et al.* *Can J Microbiol*, 1995, 41(9): 832~841.
- [5] Allison G E, Worobo R W, Stiles M E, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(4): 1371~1377.
- [6] Kanatani K, Oshimura M, Sano K. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(3): 1061~1067.
- [7] Leer R J, van der Vossen J M, van Giezen M, *et al.* *Microbiol*, 1995, 141: 1629~1635.
- [8] Bruno M E, Kaiser A, Montville T J. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58(7): 2255~2259.
- [9] Christensen D P, Hutkins R W. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58(10): 3312~3315.
- [10] Montville T, Maria J Bruno E C. *Int J Food Microbiol*, 1994, 24: 53~74.
- [11] Grinstead D A, Barefoot S F. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58(1): 215~220.
- [12] Coventry M J, Muirhead K, Hickey M W. *Int J Food Microbiol*, 1995, 26(2): 133~145.
- [13] 彭沈军, 李 东, 孙 健. *中国食品添加剂*, 1995, 3: 6~9.
- [14] 陈秀森, 何 松, 龙力红. *微生物学通报*, 1995, 22(4): 215~218.
- [15] 还连栋. *微生物学通报*, 1996, 23(5): 299~306.
- [16] 刘 稳, 马桂荣, 孔健. *微生物学报*, 1995, 36(1): 53~57.
- [17] 梁 冰, 吴克力, 刘建华. *中国微生物学杂志*, 1995, 7(3): 62~63.