

乳酸菌细菌素研究进展

李平兰 张 麓

江汉湖

(中国农业大学食品学院微生物组 北京 100094)

(南京农业大学食品学院微生物组 南京 210095)

关键词 乳酸菌, 细菌素, 特性

分类号 Q939.92

乳酸菌是一类能从可发酵性碳水化合物产生大量乳酸的革兰氏阳性细菌的通称。它们在人、动物体内及人类环境中是一类重要的微生物。一些定居在嘴、鼻粘膜中; 一些定居在消化道、肠道(双歧菌、肠球菌和一些乳杆菌)和阴道粘膜中(一些特殊的乳杆菌)。在这些生境小区里, 它们中大多数不仅不致病, 相反有益, 可以抑制一些腐败菌和病原菌, 从而维持体内这些小生境尤其是肠道内正常的微生态平衡^[1]。同时, 乳酸菌也是一类重要的工业微生物, 广泛应用于轻工业、医药工业、食品工业、发酵工业和饲料工业上。通常在食品和发酵工业中应用的乳酸菌主要包括乳球菌(*Lactococcus*), 片球菌(*Pediococcus*), 明串珠菌(*Leuconostoc*), 乳杆菌(*Lactobacillus*), 双歧杆菌(*Bifidobacterium*), 肠球菌(*Enterococcus*), 链球菌(*Streptococcus*)以及新近认识到的肉食杆菌(*Carnobacterium*)等属。并且已经从谷类、绿色植物、乳制品、肉制品、发酵蔬菜以及动物的粘膜表面分离到了这些微生物^[1]。作为发酵剂它们在乳酸发酵过程中可以产生各种化合物如有机酸、双乙酰、过氧化氢和细菌素等^[1]。而这些化合物不仅对食品的风味和组织状态有好的效果, 还可以抑制食品中的腐败菌和病原菌, 从而防止腐败, 延长食品的保藏期。

细菌素是细菌代谢过程中合成并分泌到环境中的一类对同种的或亲缘关系较近的种有抑制作用的杀菌蛋白或多肽物质^[2]。当然, 随着研究的进展, 已发现了一些对食品腐败微生物和病原微生物具有广谱抑菌活性的细菌素^[1,3]。因而, 目前普遍认为, 由发酵剂产生的细菌素对于改善和提高各种发酵食品的质量和安全性具有重要的意义。

国外对乳酸菌细菌素的研究比较早, 报道的文献

资料很多^[4-9]。而国内则起步较晚, 除了 nisin 的研究外^[10-14], 很少见到有关其它乳酸菌细菌素的报道。到目前为止已描述了 40 余种乳酸菌细菌素, 它们是一群复杂的拮抗物, 其分子量、生化特性、敏感范围及作用方式具有较大差异^[15]。尽管人们早已认识到它们在食品发酵、食品保藏和肠道生态中具有重要的作用, 但一直未能引起高度的重视。除了 nisin 研究最广泛, 并唯一被允许作为防腐剂在食品中使用外^[16], 其它则多限于一般特性的描述, 对其遗传特性等的研究还不很深入。近年来随着分子生物学和生物技术的发展, 有关细菌素尤其是乳酸菌细菌素的研究引起了广泛的关注。目前开发乳酸菌细菌素作为新型的天然食品防腐剂和饲料添加剂已成为研究的热点。

1 乳酸菌细菌素的特性

1.1 乳球菌属细菌素 乳球菌广泛使用在乳品工业上作为发酵剂。乳酸乳球菌和它的亚种可以产生细菌素双球菌素(diplococcin)、乳球菌素(lactococcin)、lactostrepcin、乳链球菌素(lacticin)和乳链菌肽(nisin)^[2,17]。通常报道乳球菌细菌素生化遗传特性的资料比其它乳酸菌的要多。其中最突出并得到实际应用的是由各种 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 产生的细菌素 nisin。

nisin 是一种仅有 34 个氨基酸残基的短肽分子, 分子量大约为 3,500Da, 其结构与枯草菌素(subtilin)、表皮素(epidermin)相似。由于在这些细菌素的分子活性部位均含有羊毛硫氨酸(lanthionine)等稀有氨基酸, 故统称为羊毛硫抗生素(lantibiotics)^[18]。nisin 有若干种类, 其中 nisin A 和 nisin Z 研究较多。通常 nisin A 的

1997-07-29收稿

结构基因位于染色体的转座子上, 大约为 70kb, 其中在 10kb 的片断上分布着 *nisin A*、*B*、*T*、*C*、*Z*、*P* 和 *K* 基因^[19]。*nisin A* 是一个长度大约为 8.5kb 的多顺反操纵子, 5' 端有一个与核糖体结合的位点, 没有典型的启动子。它可能是与 *nisin* 共同转录的, 3' 端有一个串联的终止密码子和不依赖于 ρ 因子的转录终止子, 多顺反子的 mRNA 含有 RNA 的加工信息, 加工后产生一个 267kb 的 mRNA 转录产物^[19]。

nisin 的结构基因已经进行了克隆和排序, 34 个氨基酸残基的肽包含了脱氢丙氨酸、羊毛硫氨酸和 β -羊毛硫氨酸三个稀有氨基酸^[16, 20]。*nisin A* 的结构基因是由包含 57 个氨基酸残基的短肽合成的, 其中 34 个氨基酸残基 C-端部分表现活性 *nisin*, 剩余的 23 个残基 N-端部分在细胞表面被酶分裂除去^[17]。而这种前肽是在核糖体上合成后经翻译而形成的, 尤其是通过翻译后在细胞膜上修饰, 加工而后以胱氨酸、丝氨酸和苏氨酸残基形成中间-羊毛硫氨酸和 3-甲基-羊毛硫氨酸桥, 最后形成 *nisin*^[17]。

nisin 是热稳定的 (100℃, 10min), 在酸性条件下对链霉蛋白酶、胰蛋白酶及胃蛋白酶不敏感, 但容易被胰凝乳蛋白酶失活^[21]。*nisin* 的作用范围相对较窄, 它仅对大多数革兰氏阳性菌起作用, 包括乳球菌、微球菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生利斯特氏菌及丁酸梭菌等有作用, 且对芽孢杆菌、梭状芽孢杆菌等孢子的萌发有抑制作用, 但对真菌和革兰氏阴性菌没有作用^[2, 15, 17]。新近报道, *nisin* 与螯合剂 EDTA 二钠连接可以抑制一些革兰氏阴性菌如沙门氏菌 (*Salmonella* sp.)、致贺氏菌 (*Shigella*) 和大肠杆菌 (*E. coli*) 等细菌的生长^[19, 22~23]。

nisin 的抑菌作用像一个阳离子表面活性剂。*nisin* 对革兰氏阳性菌的营养细胞和孢子均有作用, 且对芽孢的作用比对营养细胞的作用更大。*nisin* 对营养细胞的作用主要是在细胞膜上, 它可以抑制细菌细胞壁中肽聚糖等的生物合成, 使细胞膜和磷脂化物的合成受阻, 从而导致细胞内物质外泄, 甚至引起细胞裂解^[17]。近年来不少学者认为 *nisin* 的抑菌机制是因为 *nisin* 是一个疏水的带正电荷的小肽, 能与细胞膜结合形成管道结构, 使小分子和离子通过管道流失, 造成细胞膜渗漏, 膜内外能差消失所致^[20, 24~25]。

国内对 *nisin* 的研究已取得了突破性进展, 中国

科学院微生物研究所选育到一株 *nisin* 的高产突变株, 确定了适合我国国情的发酵培养基和培养条件, 并与浙江省天台制药厂合作取得了中试的成功, 这将为我国现代化食品工业的发展带来巨大的经济效益和社会效益。

1.2 片球菌属细菌素 片球菌常用于许多蔬菜、奶酪、肉和腊肠产品的发酵。片球菌素是片球菌属中的乳酸片球菌 (*P. acidilactici*)、啤酒片球菌 (*P. cerevisiae*) 和戊糖片球菌 (*P. pentosaceus*) 三种菌产生^[17]。已报道的有片球菌素 AcH、PA-1、A (pediocin AcH, pediocin PA-1, pediocin A) 及由 *P. cerevisiae* FBB63 和 *P. acidilactici* PC 产生的两种未命名的细菌素^[2, 15, 17]。片球菌细菌素的分子量较小, 均为几千道尔顿, 热稳定。其中片球菌素 AcH 研究较详细。它是由 *Pediococcus acidilactici* H 产生, 分子量为 2,700Da, 热稳定, 121℃, 15min 仍保持活性, 对胰蛋白酶、无花果蛋白酶、木瓜蛋白酶、蛋白酶 K 和胰凝乳蛋白酶敏感, 适合在 TEG 液体培养基中产生, 抑菌谱较广, 可抑制乳杆菌、明串珠菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生利斯特氏菌、产气荚膜梭菌、恶臭假单胞菌, 其作用机制是抑制 ATP 的合成, 损坏运输系统, 最终导致细胞死亡。通常片球菌素表现出一个抗广谱革兰氏阳性菌的活性, 如可以抗单核细胞增生利斯特氏菌、金黄色葡萄球菌和梭菌等^[26]。

1.3 明串珠菌属细菌素 明串珠菌是从食品原材料、乳制品和葡萄酒发酵中发现的乳酸菌。很早人们就认识和了解到这种有机体具有抗菌活性, 然而在多数情况下, 此类抑菌物不是细菌素, 而是乙酸和双乙酰^[2]。已报告的明串珠菌细菌素有 mesenterocin 5、leucocin A、leuconocin S 和 carnocin, 但只是一般特性的描述, 缺乏完整的生化遗传特性^[2, 15, 17, 27]。其中 leucocin A 表现出一个抗广谱革兰氏阳性菌的活性。它是由 *L. gelidum* UAL187 产生的细菌素, 分子量为 3,900Da, 热稳定性为 60℃, 30min, 对淀粉酶、胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶敏感, 在 MRS 液体培养基中对数前期产生, 可抑制明串珠菌、乳杆菌、片球菌、单核细胞增生利斯特氏菌、粪肠球菌等。

1.4 肉食杆菌属细菌素 肉食杆菌属是 1987 年命名的属, 包括有非耐酸的异型乳杆菌。它们是从家禽、鱼和真空包装肉中分离到的^[28]。关于肉食杆菌的鉴定和分类相对讲比较晚, 但也有研究报告了这个属产生的

细菌素^[28~29]。已知的细菌素有 *carnobacteriocin* A₁, A₂, A₃, *camocin* U149, *carnobacteriocin* B₁, B₂ 及由 *C. pisci-cola* LK5 产生的一种未命名的细菌素, 但都缺乏详细的资料报道^[2, 15, 17]。

1.5 乳杆菌属细菌素 乳杆菌的拮抗作用除了细菌素外, 常常由酸、乳过氧化物酶、双乙酰、过氧化氢等末端产物引起^[28~29]。因而在测定细菌素这种杀菌蛋白前, 必须从样品制剂中除去上述抑制化合物, 以消除干扰。已经从自然发酵的乳制品、非乳制品、发酵剂、动植物和人类中分离到的乳杆菌中筛选出了产细菌素的许多乳杆菌菌株。目前已知的乳杆菌细菌素有 *plantaricin* A, *plantaricin* B, *plantaricin* C, *plantaricin* S, T, *plantaricin* BN, *sakacin* A, *sakacin* M, *sakacin* P, *lactocin* S, *curvacin* A, *brevicin*, *helveticin* J, *helveticin* V-1829, *lactocin* 27, *cascicin* 80, *bavaracin* MN, *fermentacin*, *lactacin* F, *lactacin* B 等近 20 种^[2, 15, 17]。它们的分子量、生化特性、敏感范围及作用方式差异较大。如 *lactacin* F 的分子量仅为 2,500Da, *cascicin* 80 则高达 4,200Da; *helveticin* V-1829 仅耐温和热 (45℃, 120min), *brevicin* 则非常耐热, 120℃, 60min 仍保留活性; *plantaricin* B 和 *bavaracin* MN 适合在固体培养基中产生, 而 *lactocin* 27 在液、固培养基中均可产生, 其它细菌素则适合在液体培养基中产生; *cascicin* 80 的产生需用丝裂霉素 C 对其产生菌给予诱导, *helveticin* V-1829 只有在厌氧的条件下才能产生, 而 *lactocin* S 则需在无吐温 80 的液体培养基中才能产生; *cascicin* 80、*plantaricin* BN 和 *bavaracin* MN 的抑菌谱很窄, 仅抑制与产生菌同种的其它菌种, 而其它乳杆菌细菌素抑菌谱较广, 可抑制一个广谱的革兰氏阳性菌。

1.6 其它乳酸菌细菌素 除了上述五个属的乳酸菌可产生细菌素外, 在其它乳酸菌属如链球菌、肠球菌等属中也有个别产细菌素菌株的报道。如有研究报道嗜热链球菌代谢产生的物质具有抗烟曲霉、寄生曲霉和根霉等真核生物的能力; Casaus 等报道 *Enterococcus faecium* T136 菌株可同时产生肠菌素 A、B (*enterocin* A、B)^[30], Torri 等报道从牛乳中分离到的粪肠球菌和屎肠球菌能产生广泛的拮抗物, 可抑制单核细胞增生利斯特氏菌、酪丁酸梭菌等病原菌和一些污染菌, 然而缺乏详细的特性报道。

2 乳酸菌细菌素的应用

已经证明乳酸菌细菌素是一种杀菌蛋白或多肽, 可以抑制一个广谱的革兰氏阳性菌, 尤其是抑制一些腐败菌和病原菌且与螯合剂结合可以将其活性谱拓宽到革兰氏阴性菌^[19], 因而为食品加工和食品保藏提供了一个新方法。如 *nisin* 作为一种安全、无毒、天然的食品防腐剂和抗菌添加剂已被 50 多个国家和地区广泛应用在乳制品、罐头食品上^[18]。当然在食品中添加细菌素之前, 需要考虑几个因素。首先, 食品的结构和成分要估测, 因为特定的成分可以影响细菌素的活性, 如研究发现细菌素可以和脂肪粘结, 从而影响其活性。其次, 温度、pH 值和外原酶 (如蛋白酶) 的存在也应考虑, 因为它们也是影响食品中细菌素活性的关键因素, 如由于某些细菌素是在一个窄的 pH 值范围内有活性, 故它们应该使用在类似 pH 值的食品中, 这样才能保证最大的活性。又如绝大多数乳酸菌细菌素是低分子量、热稳定的蛋白, 因而适合使用在加工食品中。值得注意的是在所有上述乳酸菌细菌素中, 仅有 *nisin* 被认为是安全的且允许作为食品防腐剂使用。因此, 其它细菌素在允许作为食品添加剂使用之前, 还需要做类似于 *nisin* 那样的广泛的毒理学研究。当然除了广谱性、稳定性和无毒性等外, 细菌素还应该是有利的、廉价的且加入后不影响食品的感觉器官。

细菌素也可以作为发酵剂发酵的副产物存在于成熟奶酪、酸奶、腊肠、泡菜等食品中。许多研究已经证明, 具有产细菌素能力的发酵剂在发酵过程中可以防止和控制不良菌丛引起的污染。因此一般认为添加产细菌素的乳酸菌到食品中比直接添加细菌素更可取^[31]。

细菌素的另一个应用的例子是可以被利用去进行结构基因的克隆和免疫因子的测定上。已有几个克隆了细菌素基因到不产细菌素的乳酸菌中的研究报道^[32]。这不仅可以使不产细菌素的菌株获得产细菌素的能力, 而且为人工合成大量的细菌素提供了可能。

3 乳酸菌细菌素展望

综上所述, 乳酸菌细菌素有很多特点, 已经引起广大从事乳酸菌、食品添加剂、益生菌及开发新药等领域研究人员的极大兴趣, 出现了研究热潮。近年来新的乳酸菌细菌素不断出现, 报道乳酸菌细菌素的文献资料和专利数量也越来越多。目前的研究主要集中于新菌株和高产菌株的筛选以及对已知乳酸菌细菌素遗传因

子的鉴定及结构基因的克隆和排序上。我国是一个乳酸菌资源非常丰富的国家,但对乳酸菌细菌素的研究起步较晚,除 nisin 外,对其它乳酸菌细菌素还没有进行很好的基础研究和开发应用研究。因而大力进行乳酸菌细菌素的研究尤其是生化、遗传特性及基因调控方面的研究不仅具有重要的理论意义,而且具有广阔的应用前景。相信二十一世纪乳酸菌及乳酸菌细菌素将对人类健康发挥巨大的作用。

参 考 文 献

- [1] Lindgren S W, Dobrogosz W J. *FEMS Microbiol Rev*, 1990, 87:149~164.
- [2] Klaenhammer T R. *Biochimie*, 1988, 70:337~349.
- [3] Piard J C. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58:279~284.
- [4] Klaenhammer T R. *FEMS Microbiol Rev*, 1993, 12:39~86.
- [5] Abec T, Krockel L, Hill C. *Int J Food Microbiol*, 1995, 28:169~185.
- [6] Jack R W, Tagg J R, Ray B. *Microbiol Rev*, 1995, 59:170~200.
- [7] Nes I F, Diep D B, Havarstein L S *et al.* *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1996, 70:113~128.
- [8] Stiles M E. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1996, 70:331~345.
- [9] Helander I M. *Trends in Food Science & Technology*, 1997, 8:146~150.
- [10] 还连栋,陈秀珠. *微生物学通报*, 1993, 20(5):301~306.
- [11] 孔健,马桂荣,刘稳等. *微生物学报*, 1995, 35(6):450~454.
- [12] 陈秀珠,何松,龙力红等. *微生物学报*, 1996, 36(4):269~275.
- [13] 刘稳,马桂荣,朱文森等. *食品与发酵工业*, 1996, (3):37~40.
- [14] 陈秀珠,何松,龙力红等. *微生物学通报*, 1995, 22(4):215~218.
- [15] Jack R W, Tagg J R, Ray B. *Microbiol Rev*, 1995, 59:171~200.
- [16] Delves-Broughton J. *Food Technol*, 1990, 44:100~112.
- [17] Nettles C G, Barefoot S F. *J Food Prot*, 1993, 4:338~356.
- [18] Linda J. *Food Research International*, 1992, 25:57~66.
- [19] Stevens K A, Sheldon B W, Klapes N A *et al.* *J Food Prot*, 1992, 55:763~766.
- [20] Kordel M, Schuller F, Sahl H G. *FEBS Lett*, 1989, 44:99~102.
- [21] Liu W, Hansen J N. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56:2551~2558.
- [22] Cutter C N, Siragusa G R. *J Food Prot*, 1995, 58:977~983.
- [23] Mazzotta A S, Montville T J. *J Appl Bacteriol*, 1997, 82:32~38.
- [24] Bruno M E C, Kaiser A T J. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58:2255~2259.
- [25] Harris L J, Fleming H P, Klaenhammer T R. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58:1477~1483.
- [26] Bhunia A K, Johnson M C. *Lett Appl Microbiol*, 1992, 15:5~7.
- [27] Schillinger U, Becker B, Holzapfel W H. *Food Microbiol*, 1995, 12:31~37.
- [28] Ahn C, Stiles M E. *J Appl Bacteriol*, 1990, 69:302~310.
- [29] Ahn C, Stiles M E. *J Appl Bacteriol*, 1992, 73:217~228.
- [30] Casaus P, Nilsen T, Cintas L M *et al.* *Microbiol*, 1997, 143:2287~2294.
- [31] Hoover D G, Walsh P M, Kolacis K M *et al.* *J Food Prot*, 1988, 51:29~31.
- [32] Joerger M C, Klaenhammer T R. *J Bacteriol*, 1990, 171:1597~1601.