

# 鱼精蛋白抑菌机理及在食品防腐中的应用\*

李文茹<sup>1 2</sup> 谢小保<sup>1 2 \* \*</sup> 欧阳友生<sup>1 2</sup> 陈仪本<sup>1 2</sup>

(广东省微生物研究所 广州 510070)(广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)

**摘要** 鱼精蛋白是一类天然的阳离子抗菌肽,具有广谱抑菌活性。鱼精蛋白主要是通过破坏细菌的细胞壁、细胞膜及改变细胞的渗透性等途径抑制甚至杀死细菌细胞。在鱼精蛋白抑制细菌的同时,细菌也产生多种机制对抗鱼精蛋白。温度、pH、阳离子和 EDTA 等多种理化因子影响鱼精蛋白对细菌的抑制效果。由于鱼精蛋白在抑菌防腐方面的众多优势,目前已成为非常有发展前景的食品防腐剂。

**关键词** 鱼精蛋白, 抑菌机理, 食品防腐

中图分类号:Q512.8 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)04-0795-04

## Mechanism of Antimicrobial Activity and Application in Food Preservation of Protamine\*

LI Wen-Ru<sup>1 2</sup> XIE Xiao-Bao<sup>1 2 \* \*</sup> OUYANG You-Sheng<sup>1 2</sup> CHEN Yi-Ben<sup>1 2</sup>

(Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou, 510070)

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou, 510070)

**Abstract** Protamines are a group of native polycationic antimicrobial peptides, which have a broad range of antimicrobial activity. Protamines inhibit or kill bacteria by destroying their cell wall, cell membrane and changing permeability of cytoplasm membrane. While protamine inhibit or kill bacteria, bacteria are induced a variety of mechanisms to resist it. Several physical and chemical factors, such as temperature, pH, cations and EDTA, can affect protamine's inhibitory potency to bacteria. Because protamines have many advantages in antimicrobial activity, they have been developed a kind of promising food preservative presently.

**Key words** Protamine, Mechanism of antimicrobial activity, Food preservative

鱼精蛋白(protamine)是一类天然的阳离子抗菌肽,主要存在于鱼类、鸟类和哺乳动物的成熟精巢组织中,与 DNA 紧密结合在一起,以核精蛋白的形式存在。分子量在 5 kD 左右,由大约 31 个氨基酸组成,其中精氨酸的含量很高,达 66% 左右,等电点在 pH11 ~ 13<sup>[1]</sup>。

鱼精蛋白很早就被人们发现并开展了很多相关研究,但其抑菌作用曾一度未能引起重视。20 世纪 30 年代初,ibid 发现鱼精蛋白能够抑制牛痘病毒(vaccinia virus)的生长,McClellan 发现鱼精蛋白能够抑制伤寒埃氏杆菌(*Eberthella typhosa*)的生长;1942 年,Reiner 等发现鱼精蛋白能够部分抑制马媾疫锥虫(*Trypanosoma equiperdum*)的呼吸;Miller 等发现鱼

精蛋白能够抑制多种好氧菌和厌氧菌的呼吸和代谢,从而影响其生长繁殖<sup>[2]</sup>。鱼精蛋白的抑菌作用才引起人们的关注。至今,科研工作者已发现鱼精蛋白具有广谱抑菌活性,包括革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、酵母菌和霉菌<sup>[3~5]</sup>,使得鱼精蛋白有望发展成为具有很大大商业应用价值的天然绿色食品防腐剂。本文对鱼精蛋白的抑菌机理及其在食品防腐中的应用情况做一综述。

## 1 鱼精蛋白的抑菌机理

### 1.1 鱼精蛋白破坏细胞壁

Antohi 和 Popescu<sup>[4]</sup>曾提出设想,鱼精蛋白的抑菌活性是因其与细菌细胞壁的相互作用引起的,后

\* 广东省科技计划项目(No.2005B1040100) 广东省科技计划项目(No.2003C104022)

\*\* 通讯作者 Tel/Fax 020-87688142 E-mail: xxiaobao@tom.com

收稿日期:2006-11-24,修回日期:2007-01-15

被日本科研人员证明<sup>[4]</sup>。现在普遍认为,鱼精蛋白的抑菌活性是由于其分子中存在着大量精氨酸,精氨酸中带正电荷的胍基能与细胞壁肽聚糖的负电荷产生静电作用。盐度对鱼精蛋白抑菌活性的影响证明了这一点,添加氯化钠能够覆盖细胞壁,钠离子被负电荷的细胞壁吸引,氯离子被鱼精蛋白吸引,使细胞壁和鱼精蛋白之间的静电相互作用降低<sup>[4]</sup>。免疫电镜观察经鱼精蛋白处理的单核细胞增生李斯特氏菌和腐败希瓦氏菌,发现细胞壁造成了大的损坏,细胞质发生了浓缩<sup>[6]</sup>。

革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的细胞壁结构不同,革兰氏阳性菌的细胞壁主要由肽聚糖和磷壁酸组成,而革兰氏阴性菌的细胞壁主要由脂多糖组成。早期的文献认为鱼精蛋白对革兰氏阳性菌抑制效果明显,对革兰氏阴性菌抑制效果不明显<sup>[1,5]</sup>。近年的研究工作表明,鱼精蛋白革兰氏反应之说不妥当的,在某些情况下,一些对鱼精蛋白最敏感的细菌正是革兰氏阴性菌,如百日咳博得特氏菌(*Bordetella pertussis*)<sup>[7]</sup>、大肠杆菌(*Escherichia coli*)<sup>[7,8]</sup>、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)<sup>[7]</sup>、栖瘤胃普雷沃氏菌(*Prevotella ruminicola*)<sup>[7]</sup>、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)<sup>[9]</sup>和腐败希瓦氏菌<sup>[5]</sup>等。因此可以说,鱼精蛋白的抑菌作用与其革兰氏特征并非绝对相关。

## 1.2 鱼精蛋白溶解细胞膜

鱼精蛋白与细菌细胞膜的相互作用也与其抑菌活性密切相关。普遍认为鱼精蛋白可以使细胞质膜形成通道或较大的孔洞,引起细胞内必要化合物的渗漏。鱼精蛋白通过破坏细胞膜的结构,破坏与能量代谢相关的电子传递系统和物质转运系统,摧毁细菌跨膜的物质运动,使整个细胞处于代谢瘫痪状态。原子能显微镜揭示,鱼精蛋白使细胞表面变得光滑,在细胞被膜上形成孔洞,且能引起腐败希瓦氏菌的溶解。用半致死浓度的鱼精蛋白处理细胞,发现细胞的呼吸率降低,可能是由于细胞被膜的渗漏或势能的损失所致。免疫电镜观察到细胞被膜的融合,而未发现胞质的融合<sup>[6]</sup>。总之,鱼精蛋白破坏了敏感细胞外膜的结构,造成胞质的浓缩,引起呼吸抑制<sup>[6]</sup>。

## 1.3 鱼精蛋白引起细胞渗漏

鱼精蛋白能够改变细胞的渗透性,这也是其抑菌机制之一。早期曾经推测,分子电荷在鱼精蛋白

抑菌作用中是一个重要因素<sup>[4]</sup>。然而,在鱼精蛋白表面电荷与其作用微生物之间的关系却鲜有报道。直到2005年,potter在研究鱼精蛋白与细菌间静电相互作用时指出,适度还原鱼精蛋白中的正电荷,其最小抑菌浓度甚至减小。但当被修饰的精氨酸残基数多于4个时,会导致抑菌功效的损失<sup>[1]</sup>。由此,可证明 Uyttendaele 和 Debevere<sup>[4]</sup>关于鱼精蛋白作用机制的推测,在正电荷的鱼精蛋白与负电荷的细胞壁肽聚糖和细胞膜磷脂间存在着静电吸引作用。鱼精蛋白与细胞壁或细胞膜间的相互作用扰乱了细胞的渗透性。

鱼精蛋白能够改变大肠杆菌细胞膜的渗透性,并从细胞膜中释放脂多糖,而不改变外膜的磷脂酶活性<sup>[10]</sup>。而且,鱼精蛋白能够导致细胞内ATP水平降低,细胞外ATP水平增高,显然造成了胞内的ATP渗漏。鱼精蛋白诱导的ATP渗漏依赖于pH和鱼精蛋白的浓度,在高pH时有最大的影响<sup>[19]</sup>。细胞膜的渗漏不是在加入鱼精蛋白后立即发生的,会有一段延滞时间。延滞时间在低鱼精蛋白浓度、低pH或二价阳离子存在时都会延长<sup>[10]</sup>。

由此看来,鱼精蛋白是通过其分子表面的高正电荷与细菌表面的负电荷的静电作用,破坏细胞膜,导致胞内成分的渗漏(如K<sup>+</sup>、ATP和细胞内的酶),从而使细菌代谢活性降低甚至死亡<sup>[8,10,11]</sup>。

诚然,鱼精蛋白抑菌机制很有可能不是单一因子的作用,而是几个机制联合发挥作用,如同时作用于细胞壁、细胞膜,并引起细胞渗透性的改变。除此之外,鱼精蛋白还有其它的作用部位,如有研究人员发现鱼精蛋白在半致死浓度时对基因转录的抑制<sup>[6]</sup>。另外,它可以不经引起细胞溶解或改变细胞渗透性而发挥抑菌作用,如使细胞丧失积累亮氨酸的能力,因而不能进行蛋白质合成,破坏能量转导和营养摄取功能;降低ATP的浓度,并抑制氨基酸的运输,表明损害了细胞产生质子动势的能力<sup>[9]</sup>。

## 2 细菌对鱼精蛋白的抗性机制

在鱼精蛋白作用于细菌的同时,细菌也产生多种机制对抗鱼精蛋白。其中细菌对鱼精蛋白的降解可能是其中一种重要的防御机制。鱼精蛋白的精氨酸含量很高,使其对胰蛋白酶等非常敏感。大

肠杆菌具有一种降解鱼精蛋白的酶类<sup>[7,42]</sup>,但它仍然对鱼精蛋白敏感并能被其杀死。因此酶促降解鱼精蛋白的能力可能与其它因子一起发挥作用,使一些细菌对鱼精蛋白产生抗性。如 EDTA 可能通过螯合细菌蛋白酶所需要的二价阳离子辅基来使其失活,从而对鱼精蛋白有协同作用<sup>[31]</sup>。

当鱼精蛋白处理剂量较低时,大肠杆菌会缓慢恢复生长<sup>[8]</sup>。这可能是由于鱼精蛋白被细菌的蛋白酶所降解,因为当大肠杆菌菌株缺失胞外的蛋白酶 DegP、OmpT 和蛋白酶 III 时,敏感性会增加 5 倍<sup>[8]</sup>。为了研究大肠杆菌分泌到胞外的蛋白酶对其抗鱼精蛋白的影响,选取敲除蛋白酶基因 *degP*, *ptr* 和 *ompT* 的实验菌株作为研究对象,发现仅仅 *ompT* 缺陷菌株敏感,且这一效应能通过转进带有 *ompT* 的质粒而消除。无论在低  $Mg^{2+}$  条件还是高  $Mg^{2+}$  条件下,*ompT*<sup>+</sup> 菌株都能在几分钟内从培养基中清除鱼精蛋白。对照组中,在  $Mg^{2+}$  条件下,鱼精蛋白在 *ompT*<sup>-</sup> 菌株的培养基中保持存在至少 1h。这表明,在这 3 种蛋白质中负责降解鱼精蛋白的是 OmpT,它分泌到细胞膜外,主要作用就是保护细胞不受培养基中的抗菌阳离子肽的侵害。将鱼精蛋白加到 *ompT*<sup>+</sup> 菌株 KS272 的菌悬液中,发现其被迅速的从培养基中清除掉,75s 时,鱼精蛋白的 HPLC 峰谱已经很小,450s 后从培养基中完全消失,同时出现几个新的产物,证明是鱼精蛋白的降解产物<sup>[12]</sup>。

最近,Nogales 等<sup>[13]</sup>利用 Tn5 转座子构建了苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)突变体,得到 21 个对鱼精蛋白敏感性增加的突变株。对其中 9 个突变株的突变基因进行研究,发现有 3 个基因参与细胞壁肽聚糖和  $\beta(1,2)$  葡聚糖的生物合成,另 3 个基因参与氮素的代谢,1 个基因与膜运输中的 ATP 结合框(ATP binding cassette)家族的基因相似。表明这 9 个基因都与苜蓿中华根瘤菌对抗鱼精蛋白的机制有关。

### 3 影响鱼精蛋白抑菌效果的因素

#### 3.1 温度的影响

由于大部分关于鱼精蛋白的研究工作都是在最适生长温度(30℃~37℃)下进行的,因此温度对其抑菌作用的影响在很长一段时间并不被人们所认识。目前,研究表明细菌的不同属、不同种甚至

同一个种的不同菌株对鱼精蛋白的敏感性受温度的影响是不同的。1997 年,Johansen 等在研究中发现温度影响鱼精蛋白的抑菌活性。当培养温度从 5℃升到 25℃时,单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)对鱼精蛋白的抗性增加,而腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)对鱼精蛋白更加敏感<sup>[10]</sup>。Truelstrup Hansen 等<sup>[3]</sup>发现,温度对蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*),*Brochothrix thermosphacta* 和清酒乳杆菌(*Lactobacillus sake*)的敏感性没有影响。李斯特氏菌属(*Listeria*)中的两个种无害李斯特氏菌(*L. innocua*)和单核细胞增生李斯特氏菌,以及腐败希瓦氏菌 A2 菌株和摩氏摩根菌(*Morganella morganii*)随着温度降低抗性增强,而金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)在 10℃比 18℃更敏感。单核细胞增生李斯特氏菌 19115 菌株在低温抗性增强,而 O32 菌株在低温更敏感。

#### 3.2 pH 的影响

革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌<sup>[4]</sup>,甚至霉菌<sup>[5]</sup>对鱼精蛋白的敏感性均受 pH 影响。而且鱼精蛋白的抑菌作用受培养基的 pH 影响较大,在中性到碱性 pH 具有较低的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)<sup>[7,40]</sup>。

鱼精蛋白在高 pH 抑菌活性增强,可能是因为高 pH 致使细菌外膜负电基团增加,从而促进鱼精蛋白( $pI > 10$ )与细菌外膜的静电作用<sup>[10]</sup>。Truelstrup Hansen 和 Gilf<sup>[7]</sup>也认为 pH 影响鱼精蛋白对细菌表面的亲合性,从而影响其抑菌效率。鱼精蛋白在中性或碱性 pH 对细菌表面有最大的静电亲合性,因而具有更高的抑菌效率。

#### 3.3 阳离子和 EDTA 的影响

pH 和离子强度影响细胞被膜两性电荷的总电荷,鱼精蛋白在中性到碱性 pH 条件和低离子强度的条件下抑菌效果最好<sup>[4]</sup>。科研人员发现  $Ca^{2+}$  能够减弱鱼精蛋白的抑菌效果,认为高浓度的  $Ca^{2+}$  能够对细胞壁的肽聚糖层造成轻微的损坏<sup>[14]</sup>。鱼精蛋白能够抑制单核细胞增生李斯特氏菌,大肠杆菌和腐败希瓦氏菌的氧气消耗,添加  $Ca^{2+}$  和  $Mg^{2+}$  能够解除该抑制,再添加 EDTA 又可使该抑制恢复<sup>[10]</sup>。Truelstrup Hansen 等<sup>[3]</sup>也发现,在鱼精蛋白抑菌实验的培养基中加入 EDTA,对鱼精蛋白的抑菌作用有促进功能。

二价阳离子可以保护细胞质膜和肽聚糖上的

负电荷的磷脂,稳定细菌表层的整体结构<sup>[10]</sup>,因此能解除鱼精蛋白的抑菌作用<sup>[10]</sup>。而 EDTA 能够通过螯合  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  来摧毁细菌细胞被膜,因为  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  通常能够稳定革兰氏阴性菌的脂多糖层和革兰氏阳性菌的肽聚糖层。这样就使得阳离子抗菌肽类能够更容易的渗透进入细胞质膜<sup>[3]</sup>。EDTA 也能够释放内源性的磷脂酶来进一步降解细胞质膜<sup>[3]</sup>。

除了以上几个影响鱼精蛋白抑菌效果的主要因素外,还有其它一些因素,例如细胞膜的渗透性、蛋白水解酶类、竞争相同结合位点的化合物或者通过非特异结合能够除掉鱼精蛋白的化合物<sup>[10]</sup>,以及实验中培养细胞的数目、鱼精蛋白的浓度和培养基的内部参数等等。

#### 4 鱼精蛋白的应用

从鱼类精巢中提取的鱼精蛋白硫酸盐已用于制药行业多年,如:用作胰岛素的载体和注射胰岛素的缓释剂已有五十多年的历史<sup>[15]</sup>。除此之外,鱼精蛋白对肝磷脂具有特异的亲合性,已用作肝磷脂的解毒剂<sup>[15]</sup>。

目前,食品行业倾向避免使用化学防腐剂,使得食品学家致力于寻找天然的防腐剂替代品。鱼精蛋白用作食品防腐剂有很多优点:①具有广谱抑菌活性,不仅能抑制革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌,还能抑制酵母菌和霉菌;②作为一种天然产物,具有很高的安全性,且无臭、无味;③是精氨酸丰富的蛋白质,具有很高的营养性;④能够耐热,经高压灭菌而不丧失抑菌活性<sup>[1]</sup>,使其可以与食品热处理并用,提高加工食品的保存性;⑤在比较宽的 pH 范围都有抑菌活性,中性到碱性 pH 范围内抑菌效果良好<sup>[4]</sup>;⑥食品中主要营养成分,如蛋白质、脂肪、糖类对鱼精蛋白抑菌活性影响较小<sup>[8]</sup>,这有利于其在食品中的应用。鱼精蛋白在抑菌方面的众多优势使其成为化学防腐剂的一个非常有前景的替代品,在日本已成功用作食品行业的防腐剂<sup>[15]</sup>。鱼精蛋白用作食品防腐剂也存在一些问题,如它在中性和碱性介质中有良好的抑菌活性,但在酸性介质中抑菌效果较差,影响其在酸性食品中的应用。

#### 5 鱼精蛋白的研究展望

随着生活水平的提高,人们对食品安全的要求也越来越高,因此用安全天然的防腐剂取代化学防腐剂势在必行。鱼精蛋白作为安全天然的防腐剂,将在食品行业中发挥越来越大的作用。对于鱼精蛋白的研究,未来应注重以下几点:①从更深的层次上进一步研究鱼精蛋白的抑菌机理,为其广泛应用奠定理论基础;②借助现代生物新技术,从分子水平上改造鱼精蛋白基因结构,提高其抑菌活性;③利用遗传工程技术,把具有高效抑菌活性的鱼精蛋白基因转入原核或真核表达系统中,大规模高产量的生产基因工程鱼精蛋白;④提高其提取与纯化技术,降低生产成本。

#### 参考文献

- [1] Potter R, Truelstrup Hansen L, Gill T A. *Inter J Food Microbiol*, 2005, **103**: 23 ~ 34.
- [2] Miller B F, Abrams R, Dorfman A, *et al.* *Science*, 1942, **96**: 428 ~ 430.
- [3] Truelstrup Hansen L, Austin J W, Gill T A. *Inter J Food Microbiol*, 2001, **66**: 149 ~ 161.
- [4] Uyttendaele M, Debevere J. *Food Microbiol*, 1994, **11**: 417 ~ 427.
- [5] Johansen C, Gill T, Gram L. *J Appl Bacteriol*, 1995, **78**: 297 ~ 303.
- [6] Johansen C, Verheul A, Gram L, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 1058 ~ 1064.
- [7] Truelstrup Hansen L, Gill T A. *J Appl Microbiol*, 2000, **88**: 1049 ~ 1055.
- [8] Stumpe S, Bakker E P. *Arch Microbiol*, 1997, **167**: 126 ~ 136.
- [9] Aspedon A, Groisman E A. *Microbiology*, 1996, **142**: 3389 ~ 3397.
- [10] Johansen C, Verheul A, Gram L, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 1155 ~ 1159.
- [11] Islam N M D, Oda H, Motohiro T. *Nippon Suisan Gakk*, 1987, **53**: 297 ~ 303.
- [12] Stumpe S, Schmid R, Stephens DL, *et al.* *Journal of Bacteriology*, 1998, **180**(15): 4002 ~ 4006.
- [13] Nogales J, Muñoz S, Olivares J *et al.* *FEMS Microbiol Lett*, 2006, **264**(2): 160 ~ 167.
- [14] Pink D A, Truelstrup Hansen L, Gill T A, *et al.* *Langmuir*, 2003, **19**: 8852 ~ 8858.
- [15] Gill T A, Singer D S, Thompson J W. *Process Biochem*, 2006, **41**: 1875 ~ 1882.