

乳链菌肽——从实验室走进百姓生活

钟瑾

(中国科学院微生物研究所 北京 100101)

摘要：乳链菌肽(Nisin)是乳酸菌产生的一种含特殊氨基酸的羊毛硫细菌素，因其高抑菌活性及安全性，可用作天然食品防腐剂。20 世纪 80 年代末，中国科学院微生物研究所率先在国内开展了对乳链菌肽的研究和开发工作。从菌种选育、发酵及后提取工艺优化、到技术转移转化，经过几代科学家的不断创新与自主研发，产学研成功结合，乳链菌肽最终从实验室走向了工业化生产，走向了市场，走进了寻常百姓家，为“微生物，高科技，大产业”做了很好的诠释。

关键词：乳链菌肽，乳酸菌，羊毛硫细菌素，食品防腐剂

Nisin, from laboratory into people's daily life

ZHONG Jin

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Nisin is a lantibiotic with unusual amino acids produced by lactic acid bacteria. It has been used as a natural bio-preservative for food because of its high antimicrobial activity and safety. Since the late of the 1980s, nisin was first studied and developed in the Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences in our country. With the innovations and endeavor of several generations of scientists, nisin Z producing strain with high production was obtained, and the fermentation and extraction technologies were improved. Through technology transformation, nisin product was successfully manufactured by Zhejiang Silver-elephant Bioengineering Limited Corporation. Combining the scientific research, product developing and marketing, nisin is walking out from the laboratory to the market and into people's home, which is one of the best notes of “Tiny bugs, high technology, big business”.

Keywords: Nisin, Lactic acid bacteria, Lantibiotics, Food preservatives

食品安全问题一直是国内外关注的热点。我国食品防腐剂绝大部分为化学合成物，某些化学防腐剂如亚硝酸盐等有潜在的致癌作用，研究开发天然、无毒的新型食品防腐剂是保障人民健康的迫切需要。乳链菌肽又称乳酸链球菌素(Nisin)，是以乳

酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)为代表的乳酸菌产生的一类含特殊氨基酸的羊毛硫细菌素(图 1A, B)。它对许多革兰氏阳性菌，尤其是对引起食品腐败的嗜热脂肪芽孢杆菌、肉毒梭菌、金黄色葡萄球菌、李斯特氏菌等具有强烈的抑制作用^[1]，且经食用后

基金项目：中国科学院知识创新重要方向项目(No. KSCX2-EW-G-14)

*通讯作者：Tel: 86-10-64807401; 信箱: zhongj@im.ac.cn

收稿日期：2013-11-26；接受日期：2014-01-14；优先数字出版日期(www.cnki.net)：2014-01-15

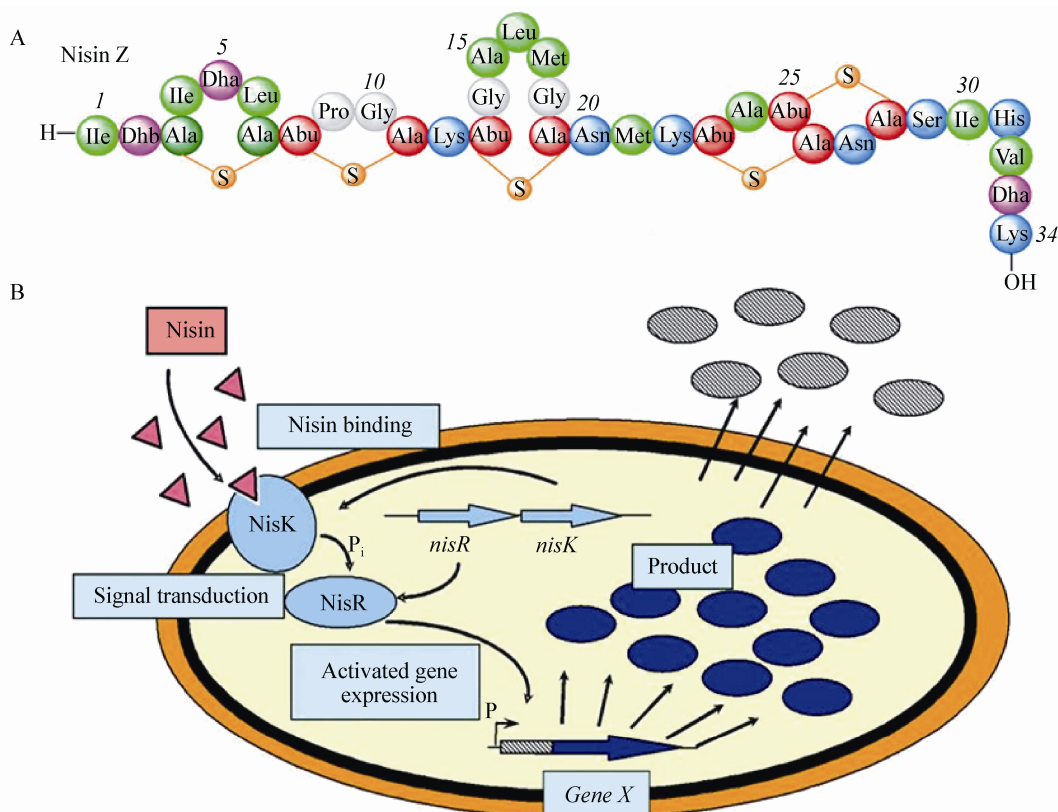


图1 Nisin 分子结构及其生物合成(B 引自文献[24])

Figure 1 Structure of nisin Z (A) and its biosynthesis process (B, [24])

可被消化道中的酶降解,不会改变人体肠道内的正常菌群及引起常用抗生素易出现的抗药性问题,毒理实验表明其对人体安全无毒。同时,乳链菌肽还可降低食品加工过程中的能源消耗,显著改善食品的营养、外观、风味和质地。1969年,联合国粮农组织和世界卫生组织食品添加剂联合专家委员会确认乳链菌肽为高效、安全的天然食品防腐剂。正是这个产生自乳酸菌的小肽,不仅见证了我国食品添加剂行业结束单纯依靠化学合成防腐剂的的历史,更是见证了中国科学院微生物研究所(简称微生物所)自主研发的科研成果一步步从实验室走进寻常百姓家的发展历程。

乳链菌肽的研究和开发始于微生物所科学家们对科学及市场的敏锐把握。1987年底,在微生物所的年终总结大会上,时任中国科学院百泰生物技术公司总经理的毛桂震先生提到市场上一种天

然食品防腐剂只有国外一家公司能够生产,是一个事关食品安全和人体健康、很有前途的产品,这就是乳链菌肽(Nisin)。微生物所的科研人员以科学的敏锐性,很快意识到它是符合社会需求和行业发展方向的、有市场生命力的产品。当时已年近七旬的老一辈科学家、老所长薛禹谷先生高瞻远瞩,迅即组织并实施了对乳链菌肽的立项和课题申请等工作(图2)。在她的亲力亲为和大力支持下,当时的微生物遗传室(七室)的还连栋等研究人员在国内率先开展了对乳酸菌所产生的乳链菌肽的基础研究及应用开发等工作(图3)。随着研究工作的逐步展开和深入,1990年,乳酸菌分子遗传学研究组也随之应运而生,课题组长为还连栋研究员。

乳链菌肽的研究和开发工作伴随着课题组的成长和发展。从1989年起,在国家自然科学基金和中科院“八五”重点项目的资助下,还连栋等研究



图2 选育乳链菌肽高产菌株(薛禹谷先生, 1989年)
Figure 2 Screening of strain with high production of nisin (Prof. Xue Yugu, 1989)



图3 乳链菌肽产品生产成功(还连栋研究员, 1999年)
Figure 3 Nisin Z product (Prof. Huan Liandong, 1999)

人员启动了对乳链菌肽的研究。首先在产生菌的筛选工作中,经研究探索,建立了直接筛选乳链菌肽产生菌的新方法^[2],从新鲜牛奶样品中筛选到产生乳链菌肽的乳酸乳球菌。在此基础上,选择多种理化诱变因子和多次诱变育种,选育得到乳链菌肽高产菌株^[3]。为深入了解产生菌,构建了乳链菌肽高产菌株的基因文库,从中筛选到完整的乳链菌肽生物合成基因簇,克隆了编码乳链菌肽的前体结构基因并获得表达^[4-5]。对克隆片段的DNA测序表明,我国工业化生产的高产菌株产生的是乳链菌肽Z,是国内外均未见报道的新品种^[6-7]。随后,在发酵及提取工艺的研究中,为了降低乳链菌肽的生产成本,也为使之适合中国国情,还连栋等研究人员采用廉价的植物蛋白胨和酵母粉作为发酵培养基并探索出了与其相适应的发酵条件和后提取工艺路

线^[8],进行了实验室放大试验,并终于在实验室中获得了小试样品。在此基础上,与浙江天台银象生物化工厂(浙江银象生物工程有限公司前身)合作进行了乳链菌肽的中间放大试验,经过近两年的努力,中试获得成功,于1994年3月通过中试鉴定并于1995年初全部采用国产设备和材料建成了我国第一条年产20 t乳链菌肽的生产线。1996年始,“特种保鲜剂——乳链菌肽”项目又被列入国家“九五”科技攻关计划,在此期间对乳链菌肽的中试结果进行了工业化规模生产试验并取得成功。该项目于2000年10月和12月分别通过中国科学院主持的专家鉴定和国家科技部组织的专家验收。同时,还主持制定了我国乳链菌肽产品质量标准,使乳链菌肽广泛应用于乳制品、肉制品、饮料和罐头食品中,并成功大幅出口国外市场。此后,在国家“十五”科技攻关项目“乳链菌肽发酵新工艺的研究”和国家高技术产业化示范工程项目“微生物法乳链菌肽产业化高技术示范工程”支持下,通过进一步对产生菌的诱变育种及对发酵和后提取工艺的优化改进,乳链菌肽产生菌的产量获得极大提高,生产成本大幅下降。而随着市场需求的不断扩大,产品产量也大幅提升,最终于2005年在浙江天台建成了世界最大、年产150 t乳链菌肽的现代化生产新厂。乳链菌肽Z产品大幅占领了国内外市场并得到广泛应用,创造了良好的经济效益和社会效益。还连栋研究员主持的“乳链菌肽的研究和开发”项目也因此获得2005年度国家科学技术进步二等奖。

乳链菌肽研究与开发的成功得益于一个团结拼搏的研究集体,是课题组几代人前赴后继、共同努力的结果。先后参加本项目研究工作的有二十多人,包括博士和硕士研究生在内,都奉献了他们的聪明才智和辛勤劳动。尤其是老一辈科学家薛禹谷先生,虽年近七旬,还亲自工作在第一线,对乳链菌肽的立项和课题申请做出了杰出的贡献。还有陈秀珠副研究员,正是她兢兢业业、任劳任怨的辛勤劳动,在“十五”攻关期间,历经千辛万苦,牺牲休

息时间,带领银象公司技术人员使乳链菌肽发酵效价从每毫升 3 000 多单位提高到 8 000 单位以上,达到了国内外领先水平,使乳链菌肽研究与开发工作登上了一个个新台阶。科研和开发工作还为研究生的成长提供了条件,而他们也在乳链菌肽研究与开发工作中迅速成长起来,为项目成功奉献聪明才智。比如硕士生才迎对乳链菌肽产生菌定向筛选方法的建立做出了贡献^[2];胡海菁克隆了乳链菌肽完整的生物合成基因簇,并在乳酸乳球菌中表达了乳链菌肽前体基因^[4-5];刘宗旨构建了乳酸菌启动子探测载体并克隆得到乳酸菌启动子^[9];杨巍研究了乳链菌肽前体结构基因启动子的结构与功能^[10];博士生袁静对乳链菌肽铰链区分子结构与功能进行了系统研究,获得了扩大抑菌谱、能抑制革兰氏阴性菌的突变体^[11]。乳链菌肽相关研究工作在国内外发表研究论文 30 余篇,申请并获授权国家发明专利 5 项,培养博士研究生和硕士研究生十余名。

乳链菌肽的研究和开发离不开对自主创新的坚持。乳链菌肽之所以能从实验室走向规模化生产、走向市场、走向世界,是源于研究人员对自主创新之路的坚持。他们摒弃了传统的微生物菌种筛选方法,发明并建立了一步法直接筛选乳链菌肽产生菌的新方法^[2]。在此基础上选择多种理化诱变因子和进行多次诱变育种获得乳链菌肽 Z 高产突变株,并以廉价植物性原料作培养基,采用自主独创的后提取工艺路线^[3,8],经过多年探索和科技攻关,取得自主知识产权,最终实现了乳链菌肽 Z 的工业化生产。虽然在国外已有类似的乳链菌肽商品(乳链菌肽 A)出售,但其用牛奶作培养基生产,成本昂贵,而在 20 世纪 90 年代初牛奶在我国仅是婴儿、孕妇和病人凭证供应的“奢侈品”,用牛奶作培养基显然不适合我国国情,也不利于降低生产成本。科研人员以蛋白胨、酵母粉等廉价植物性原料代替牛奶作培养基的自主创新使乳链菌肽的生产发生革命性的变革,不仅使生产成本大幅降低从而远低于国际同类产品,而且使产品的技术经济指标处于国内外领先水平。乳链菌肽产品通过了美国

FDA 注册,取得国外产品未能取得的清真和犹太认证,1998 年与企业主持制定了我国乳链菌肽产品质量的行业标准(QB 2394-98)。自主创新的成果还迫使国外同类产品在中国的售价一跌再跌,进而大幅退出了国内市场。

乳链菌肽的研究和开发不断完善了以企业为主体、市场为导向、产学研相结合的技术创新体系,使得乳链菌肽从实验室最终得以走入寻常百姓家。研究人员在取得乳链菌肽小试成功的基础上,立即走出所门,与企业——浙江银象生物工程有限公司合作进行了中试及工业化生产等试验。双方相互信任,优势互补,精诚合作,共同攻关,携手自主创新。企业为了乳链菌肽的产业化也克服了诸多难以想象的困难,例如,投产之初,由于产品比较超前,人们对其还很陌生,乳链菌肽的市场一时难以打开,加之国家实行宏观调控,资金链断裂,企业陷入困境。为使企业得以运转,项目得以维持,公司顶住了破产压力,而与此同时,研究所对企业给予了极大的信任与支持,拒绝了国内外许多公司要求出让知识产权的请求,坚持与企业共度难关,最终使乳链菌肽走向了国内外市场。“银象”牌乳酸链球菌素(即乳链菌肽 Z)产品的生产规模与市场占有率均位居全球第一,打破了国际大公司垄断全球生产、销售 50 年的局面,在世界食品添加剂市场树立了中国的民族品牌。几年间,企业也由原先濒临破产的小型制药厂成长为中国食品添加剂和食品配料行业百强企业、全国轻工业质量效益型先进企业等。为使乳链菌肽更好地适应市场需求和实现深层次开发,研究所一方面邀请了中国食品发酵研究院、中国农业大学、南京农业大学、上海梅林食品有限公司等单位的专家参加乳链菌肽应用试验的研究行列,使乳链菌肽在低温肉制品、奶制品和罐头食品中的应用获得了突破,加快了其在国内推广应用的步伐,也使河南双汇、南京雨润、杭州娃哈哈、北京三元、蒙牛、伊利、汇源、华邦等国内众多知名食品企业成为乳链菌肽的固定客户;另一方面,还和生产企业成立了联合实验室,进一步扩大

了合作范围,对产品进行优化、改造和调整。如试验扩大产品的应用范围、进一步提高产品的稳定性、提高产品的纯度以满足不同层次用户需求、拓展其在医药领域的应用等,以利其长远可持续发展。产学研的紧密结合,不断推动了乳链菌肽研究和开发的深入,乳链菌肽也得以在食品防腐领域广泛应用,为食品安全做出了贡献。2005 年乳链菌肽的研究与开发还获得了中国食品工业科技进步奖特等奖。

乳链菌肽的研究与开发仍在继续和深入。在前期工作基础上,课题组又深入开展了乳链菌肽发挥抑菌活性的分子机理及作用机制研究^[12-13]、抗性机制研究^[14-16]、乳链菌肽生物合成规律尤其是自诱导的分子机制研究^[17]、从组学层面解析乳链菌肽的高产机制等的研究;同时,基于其生物合成规律,还从微生物资源或基因组资源中发掘获得了新的有潜力的羊毛硫细菌素^[18-23],为进一步深入、拓展乳链菌肽这一类羊毛硫细菌素活性物质在食品、医药等领域的应用奠定了基础。

来自乳酸菌的乳链菌肽,见证了老一辈科学家的敬业与付出,见证了科研团队的团结奋斗与努力,见证了院企合作的艰辛与成功,也见证了自主科研成果从实验室走进寻常百姓家的发展历程,为“微生物,高科技,大产业”做了很好的注脚。

参 考 文 献

- [1] 陈秀珠,张玉华,还连栋. 两种乳链菌肽天然变异体抑菌活性的研究[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(7): 1-3.
- [2] 还连栋,陈秀珠,才迎,等. 乳链菌肽产生菌的定向筛选及发酵产物的鉴定[J]. 微生物学报, 1997, 37(4): 292-300.
- [3] 陈秀珠,何松,龙力红,等. 乳酸乳球菌 AL2产生的乳链菌肽的提纯和性质[J]. 微生物学报, 1996, 36(4): 296-275.
- [4] 陈秀珠,胡海菁,贾士芳,等. 乳酸乳球菌 AL2基因文库的构建及乳链菌肽生物合成基因簇的筛选[J]. 微生物学报, 2000, 40(5): 465-469.
- [5] 陈秀珠,胡海菁,杨巍,等. 乳链菌肽前体基因(*nisZ*)在乳酸乳球菌中的克隆和表达[J]. 遗传学报, 2001, 28(3): 285-290.
- [6] 还连栋,陶勇,何松,等. 乳链菌肽高产菌株的选育及其基因定位[J]. 微生物学报, 1995, 35(5): 364-367.
- [7] 还连栋,陶勇,田宇清,等. 利用 PCR 技术克隆乳链菌肽前体基因[J]. 生物工程学报, 1995, 11(4): 389-391.

- [8] 陈秀珠,何松,龙力红,等. 乳链菌肽高产菌株 AL2的发酵条件研究[J]. 微生物学通报, 1995, 22(4): 215-218.
- [9] 陈秀珠,刘宗旨,还连栋. 乳酸菌启动子——信号肽探测载体 pZLB 的构建及应用[J]. 微生物学报, 2001, 41(1): 101-104.
- [10] 杨巍,陈秀珠,袁静,等. *nisZ* 启动子的定点突变研究[A]//首届中国青年学者微生物遗传学学术研讨会论文集摘要集[C]. 2002.
- [11] Yuan J, Zhang ZZ, Chen XZ, et al. Site-directed mutagenesis of the hinge region of nisin Z and properties of nisin Z mutants[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 64(6): 806-815.
- [12] 路遥,蒋立科,陈美玲,等. 通过定点突变提高乳链菌肽对热及 pH 的稳定性[J]. 微生物学报, 2010, 50(11): 1481-1487.
- [13] 胡红梅,蒋立科,林宇恒,等. 乳链菌肽自身免疫基因 *nisI* 的表达对乳链菌肽产量的影响[J]. 微生物学报, 2010, 50(10): 1341-1346.
- [14] 初晓东,林宇恒,孙志增,等. 乳链菌肽(nisin)抗性机制的研究进展[J]. 微生物学报, 2010, 50(9): 1129-1134.
- [15] 刘家乐,孙志增,刘一苇,等. 大肠杆菌重组乳链菌肽抗性蛋白(NSR)的表达纯化及其功能分析[J]. 微生物学通报, 2009, 36(10): 1519-1525.
- [16] Sun ZZ, Zhong J, Liang XB, et al. Novel mechanism for nisin resistance via proteolytic degradation of nisin by the nisin resistance protein NSR[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, 53(5): 1964-1973.
- [17] Liang XB, Sun ZZ, Zhong J, et al. Adverse effect of nisin resistance protein on nisin-induced expression system in *Lactococcus lactis*[J]. Microbiological Research, 2010, 165(6): 458-465.
- [18] Xiao HJ, Chen XZ, Chen ML, et al. Bovicin HJ50, a novel lantibiotic produced by *Streptococcus bovis* HJ50[J]. Microbiology, 2004, 150(Pt 1): 103-108.
- [19] Liu G, Zhong J, Ni JQ, et al. Characteristics of the bovicin HJ50 gene cluster in *Streptococcus bovis* HJ50[J]. Microbiology, 2009, 155(Pt 2): 584-593.
- [20] Lin YH, Teng KL, Huan LD, et al. Dissection of the bridging pattern of bovicin HJ50, a lantibiotic containing a characteristic disulfide bridge[J]. Microbiological Research, 2011, 166: 146-154.
- [21] Ni JQ, Teng KL, Liu G, et al. Autoregulation of lantibiotic bovicin HJ50 biosynthesis by the BovK-BovR two-component signal transduction system in *Streptococcus bovis* HJ50[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(2): 407-415.
- [22] Gao Y, Lu Y, Teng KL, et al. Complete genome sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CV56, a probiotic strain isolated from the vaginas of healthy women[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(11): 2886-2887.
- [23] Wang J, Gao Y, Teng KL, et al. Restoration of a bioactive lantibiotic suicin from a remnant *lan* locus of pathogenic *Streptococcus suis* serotype 2[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(3): 1062-1071.
- [24] Mierau I, Kleerebezem M. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 68(6): 705-717.