

# 微生物防腐剂—细菌素的研究与应用

(吉林大学生命科学学院, 长春 130021) 田晓乐 孟庆繁 周杰 逯家辉 滕利荣\*

**摘要:** 细菌素是一类具有抑菌活性的蛋白质, 可以抑制许多革兰氏阳性菌。本文概述了细菌的分类、抑菌机理以及在食品工业中的应用。

**关键词:** 细菌素, 抑菌机理, 食品工业

**Abstract:** Bacteriocins are antibacterial produced by bacteria that can kill or inhibit the growth of some bacteria. Bacteriocins actively inhibit a wide range of gram-positive bacteria. The article gives an overview of the classification, mode of action and their applications of bacteriocins in food industry.

**Key words:** bacteriocins; mode of action; food industry

中图分类号: TS202.3 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2004)01-0120-04

1946年, Gratia 对大肠杆菌 V 菌株抑制  $\Phi$  菌株现象进行研究时发现了类似于噬菌体, 但不能自主复制的物质, 称为大肠菌素。由于许多细菌能够产生类似的物质, Jacob 将这些物质称为细菌素。后来人们利用微生物发酵法得到许多细菌素, 如乳酸链球菌素(乳链菌肽, Nisin)、枯草杆菌素等, 并且发现其有抑菌作用。目前, 国内外对细菌素的研究较深入, 已经发现几十种细菌素。

细菌素是由某些细菌在代谢过程中通过核糖体合成产生的一类具有抑菌生物活性的蛋白质或多肽, 其抑菌范围不局限于同源菌, 产生菌对其细菌素有自身免疫力<sup>[1]</sup>。其中有些作为发酵菌种的细菌素对动物无毒副作用, 无抗原性。其抑菌范围广, 可以杀死或抑制食物中一些腐烂菌和病原菌, 并有一定的热稳定性, 延长了食品的保质期, 同时不破坏食品的风味和组织状态。

## 1 细菌素的分类

细菌素以生产菌而命名, 如大肠杆菌产生的细菌素称大肠菌素, 乳酸菌产生的称为乳酸链球菌素

(乳链菌肽, Nisin), 绿脓杆菌产生的称绿脓菌素。

细菌素根据化学结构、稳定性和分子量大小可分为四类(表 1)<sup>[2]</sup>: 第一类定义为羊毛硫抗生素(Lantibiotics), 是一类小分子的修饰肽, 含 19~50 个以上的氨基酸分子, 分子活性部位有羊毛硫氨酸(Lanthionine)、 $\beta$ -甲基羊毛硫氨酸( $\beta$ -methyllanthionine)、脱氢酪氨酸(Dehydrobutyrine)和脱氢丙氨酸(Dehydroalanine)等非编码氨基酸。Lantibiotics 又可细分为两个亚类: Ia 类是由在靶目标膜上形成孔道的阳离子和疏水基团组成的肽, 它与结构稳定的 Ib 类相比, 结构的伸展性更好; Ib 类是球状的肽类, 它不带电荷或带负电荷<sup>[3]</sup>。第二类是小分子的热稳定肽(SHSP), 分子量小于 10KDa, 具有疏水性和膜活性, 其结构特征为: N 末端信号肽序列长度为 18~21 个氨基酸, 前导肽链由一个蛋氨酸开始, 并常随一个赖氨酸; 有活性的细菌素其 N-末端+1 的位置上通常是赖氨酸或精氨酸; 可以分为三个亚类: IIa 类 N-末端氨基酸序列为: Tyr-Gly-Asn-Gly-Val, 并由两个半胱氨酸所构成的 S-S 桥, 对利斯特氏杆菌有活性; IIb 类孔道复合物由两个具有不同氨基酸序列的肽类寡聚体形成; IIc 类能被硫醇激活、活性基团要求有还原性半胱氨酸残基。第三类是热敏感的大分子蛋白(LHLP), 分子量一般大于 10KDa, 通常在 100℃或更低温度 30s 内即失活, 它们的抑菌谱较窄。第四类是复合型的大分子复合物, 除蛋白质外还含有碳水化合物或类脂基团, 目前这类细菌素还未被纯化。第二、三、四类细菌素由于不含羊毛硫氨酸, 所以通常又被称为非羊毛硫抗生素(non-lantibiotic bacteriocin), 其中第一、二类细菌素由于抑菌的高活性和专一性而作为食品防腐保鲜研究的较多, 目前研究最深、应用最广的是第一类的乳链菌肽(Nisin)。

## 2 细菌素与抗生素的区别

细菌素可以安全有效地控制食品中病原菌的生

收稿日期: 2003-09-04 \* 通讯联系人

作者简介: 田晓乐(1976-), 女, 硕士, 研究方向: 微生物与生化药学。

表 1 细菌素的分类

类	特征	代表物
I	I a	分子量小于 5KDa 的小肽, 含羊毛硫氨酸和 β-甲基羊毛硫氨酸
	I b	不带电荷或负电荷的球状肽
II	II a	抗 <i>Listeria</i> N-末端有共同序列
	II b	由两个具有不同氨基酸序列的肽类寡聚体形成
	II c	能被硫醇激活、活性基团要求有还原性半胱氨酸残基
III	热敏感的大分子	<i>Helveticins</i> JV-1829, <i>Lactacins</i> A、B
IV	复合型大分子	

长, 两者的区别主要基于它们合成、作用方式、抗菌谱及毒理、抗药性机制之间的不同(表 2)<sup>[4]</sup>。1981 年 Hurst 指出<sup>[5]</sup>, 既然细菌素不用于医学, 可以将其称为“生物学食品防腐剂”。

表 2 细菌素与抗生素的区别

性质	细菌素	抗生素
合成	核糖体	二级代谢物
活性	窄谱	广谱
宿主细胞免疫	是	否
靶细胞机制	适应性影响细胞	基因转移
耐药性	细胞膜组分	根据作用方式决定不同位点
相互作用介质	对接分子	特异目标
作用方式	大多数形成孔道, 少量是细胞壁合成	细胞膜或细胞内目标
毒性副作用	未知	有
应用	食品	临床

细菌素通常是通过核糖体来合成, 是真正的蛋白质类物质; 而抗生素是通过酶促反应将初级代谢物转变为结构性的二级代谢物, 诸如短杆菌肽 S 等, 通过酶促反应把氨基酸转变为结构复杂的化合物。细菌素与抗生素的根本差别是: 大部分细菌素只对近缘关系的细菌有损害作用, 而且无毒、无副作用、无残留、无抗药性, 同时也不污染环境。因此, 细菌素的使

用, 可以部分减少甚至取代抗生素的使用。Hancock 等人<sup>[6]</sup>指出, 有些肽类抗菌剂是通过多载体硫模板机制合成的, 此处肽合成酶组装氨基酸形成抗生素分子。细菌素是结构基因编码, 可以通过基因操纵很容易地发现活性位点与结构功能之间的关系。而且细菌素可通过分子技术构建高活性或可变特异性的类似物, 而抗生素必须是化学合成的, 其基因操纵的复杂性是由于涉及的基因数量增加所造成的<sup>[4]</sup>。

### 3 细菌素的抑菌范围

细菌素通常由革兰氏阳性菌产生并可以抑制其它的革兰氏阳性菌, 如乳球菌、葡萄杆菌、利斯特氏杆菌等, 对大多数的革兰氏阴性菌、真菌等没有抑制作用。对于第一类细菌素可以抑制许多革兰氏阳性菌, 如 Nisin 抑制葡萄球菌属、链球菌属、小球菌属和乳杆菌属的某些菌种, 抑制大部分梭菌属和芽孢杆菌属的孢子; 嗜酸乳杆菌和发酵乳杆菌产生的细菌素对乳杆菌、片球菌、明串球菌、乳球菌和嗜热链球菌有抑制作用。但有研究发现<sup>[7]</sup>, Nisin 与螯合剂(如 EDTA) 连接后, 改变了靶细胞壁的渗透性, 可以抑制一些革兰氏阴性菌, 如 *E.coli* 和 *Salmonella sp.*; 或将 Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 与 Nisin 结合使用, 可以提高革兰氏阴性菌对 Nisin 的敏感性。而部分非羊毛硫抗生素其抑菌范围

表 3 部分细菌素的抑菌范围

细菌素	抑菌活性	细菌素	抑菌活性
<i>Acidocin A</i>	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Lactic acid bacteria</i>	<i>Lactacin F</i>	<i>Lactobacillus species</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Acidocin B</i>	<i>L.monocytogenes</i> , <i>Clostridium sporogenes</i> , <i>Brochothrix thermosphacta</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Leucocin VAL187</i> <i>Leuconocin S</i>	<i>L.monocytogenes</i> , <i>L.monocytogenes</i> , <i>Cl.botulinum</i> , <i>St.aureus</i>
<i>Bavaricin A</i>	<i>Lac.delbrueckii sp.bulgarius</i>	<i>Mesenterocin 5</i>	<i>L.monocytogenes</i>
<i>Bavarici MN</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Mesenterocin 52</i>	<i>L.monocytogenes</i>
<i>Carnobacteriocins A、B</i>	<i>L.monocytogenes</i>	<i>Pediocin A</i>	<i>L.monocytogenes</i> , <i>St.aureus</i> , <i>Cl.perfringens</i> , <i>Cl.botulinum</i>
<i>Carnocin 44</i>	<i>L.monocytogenes</i>	<i>Pediocin Ach</i>	<i>B.cereus</i> , <i>L.monocytogenes</i> , <i>St.aureus</i> , <i>Cl.perfringens</i>
<i>Curvacin A</i>	<i>L.monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pediocin PC</i>	<i>L.monocytogenes</i> , <i>Cl.perfringens</i>
<i>Curvacin B</i>	<i>L.monocytogenes</i> , <i>St.aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i>	<i>Sakacin A</i>	<i>L.monocytogenes</i>
	<i>L.monocytogenes</i> , <i>St.aureus</i> , <i>Clostridial strains</i>	<i>Sakacin M</i>	<i>L.monocytogenes</i>
<i>Diacetin B</i>		<i>Sakacin P</i>	<i>L.monocytogenes</i>

却很窄,如 Lactococcin A。表 3 列出了部分细菌素的抑菌范围<sup>[8]</sup>。

#### 4 细菌素的作用机制

由于细菌素并不是对每种菌都有抑制作用,研究进行了其对特殊菌株的亲合力实验,发现菌株的磷酸组成和 pH 影响最低抑菌浓度 (MIC)<sup>[9]</sup>。研究显示,通道的形成与靶细胞膜表面的“耦合分子基团”有关,耦合分子基团使得细菌素与靶细胞的相互作用更易于进行,从而提高细菌素的抑菌有效性。这一机制已成功地阐述了 Nisin 和 Mersacidin 的作用机制。二者都是使用脂质体 II、肽聚糖前体作为对接分子与靶细胞作用。相应的 Mersacidin 是抑制肽聚糖前体的合成,而 Nisin 主要是抑制细胞壁中肽聚糖的合成,从而使细胞壁和磷脂的合成受阻,使细胞质溢出。现在认为,一些细胞壁的生物合成是 Nisin 作用的靶点<sup>[10]</sup>。其他的细菌素也是与靶细胞膜上的特殊位点相互作用,这些位点可能是蛋白质。这种作用可以提高细菌素的有效性。

#### 5 细菌素的应用

细菌素由于无毒、无副作用、无残留、无抗药性,并可以抑制或杀死一些食物腐败菌,具有一定的热稳定性,易被人体消化道的部分蛋白酶降解,因此不会在体内积蓄引起不良反应,也不会影响抗生素的活性,在食品中易扩散,使用较方便,同时也不污染环境,因而受到食品工业的青睐。作为乳酸菌的产物,Nisin 的使用已有了很长的一段历史。1988 年美国 FDA 指出,对 Nisin 安全性的认可是基于一些公开和未公开的数据,并指出对其敏感性、次慢性和慢性毒性研究、致敏以及交叉抗性研究均表明每人每天 2.9mg Nisin 的摄入量 (ADI) 是安全的。我国于 1994 年批准使用的益生菌有 6 种:芽孢杆菌、乳酸杆菌、粪链球菌、酵母菌、黑曲菌、米曲菌。

对细菌素的毒理并不完全明了。目前申请专利的细菌素仅作为食品防腐剂,对其安全性已进行了检验,但还未能提供用于医学临床的数据。Bhumia 等

用细菌素 Pediocin AcH 分别对小鼠和兔进行皮下注射、静脉注射和腹腔注射,进行免疫研究发现,Pediocin AcH 没有产生任何不良反应和致死作用,而且易被胰蛋白酶和糜蛋白酶水解,说明细菌素对动物和人类是安全的。

部分细菌素已广泛用于肉类工业、奶制品工业、酿酒和粮食加工等。目前,在食品应用中研究得最透彻的细菌素是乳链菌素 Nisin,在美国已用于食品添加剂。硝酸盐被广泛应用在肉类食品中以防止梭菌 (*Clostridial*) 的生长,但从安全的角度考虑,硝酸盐的存在使食品很容易变质,产生对人体有害的物质,甚至会危及生命。使用 Nisin 或含低量硝酸盐的 Nisin 可以抑制梭菌 (*Clostridial*) 的生长,以减少硝酸盐。在西方,细菌素已用于奶制品中,可以抗 *Clostridial* 和 *Listeria*。例如,Nisin 可以控制奶酪中 *C.botulinum* 的孢子生长,并已成为巴氏灭菌精制奶、糊状食品最有效的防腐剂。添加 Nisin 可防止牛乳和乳制品的腐败,延长货架期。由于 Nisin 在偏酸性下较稳定,且易溶解,所以在酸性罐头食品中添加比较合适,同时还可降低罐头的灭菌强度,提高罐头的品质。Nisin 在酒精饮料中应用也比较广泛,由于 Nisin 对酵母菌没有抑制作用,所以对发酵没有任何影响,并可以很好地抑制革兰氏阳性菌,保证产品质量。目前 Nisin 在全世界范围内的各种食品中得到了应用(表 4)。现在许多研究证明,产生细菌素的发酵剂在发酵过程中可以防止或抑制不良菌的污染,因而将产细菌素的乳酸菌加入到食品中比直接加细菌素更好。但细菌素抗菌谱有一定的范围,为扩大其抑菌范围,可将几种细菌素或将其与其它来自于动植物(如抗菌肽)等的天然食品防腐剂配合使用,利用它们的协同作用,增强抑菌范围及强度,或与部分化学防腐剂络合使用,既可增加抑菌范围又可减少化学防腐剂的使用。

另外,对于不同国家使用细菌素还有其他的不同,例如丹麦用于食品添加剂的细菌素要求不产生

表 4 Nisin 在部分食品中的应用

国家	允许应用食品	最大含量(IU/g)
Argentina	Processed cheese	500
Australia	Processed cheese,cheese,canned tomatoes	No limit
Belgium	Cheese	100
Cyprus	Cheese,clotted cheese, canned vegetables	No limit
EU	E234,or labled as "natural preservative"	Varies according to product and member state
France	Processed cheese	No limit
Italy	Cheese	500
Mexico	Additive	500
Netherland	Factory cheese,Processed cheese,cheese powder	800
Peru	Additive	No limit
Russia	Dietetic, Processed cheese, canned vegetables	8000
UK	Cheese,canned food,clotted cream	No limit
US	Pasteurized, processed cheese,spreads	10000

毒质或抗生素；而在美国作为产生细菌素的引物时不需要特殊的考虑，而用纯化的细菌素用于食品保鲜时，需要 FDA 的认可。

利用细菌素进行结构基因的克隆，已将细菌素基因克隆到不产生细菌素的乳酸菌中，通过人工大量合成细菌素，提高细菌素的产量。尽管细菌素已有所应用，但对其很多性质了解的还不够深入，所以在使用细菌素作为食品防腐剂或添加剂时，需要考虑食品的结构和成分对细菌素的影响；还有温度、pH 变化等也会影响细菌素的活性，这是由于细菌素一般在 pH 变化范围不大时才有活性，如 Nisin 在 pH2 时的溶解度比 pH8 时大了 228 倍<sup>[11]</sup>。目前使用最广泛、研究最彻底的细菌素是 Nisin，所以其他细菌素要用于食品工业之前必须要进行广泛的毒理研究。

随着生物技术和分子生物学的不断进步，细菌素的研究和应用已引起了研究者的高度重视，随之将会有更多的细菌素应用于食品工业及新药开发领域。相信随着细菌素研究的深入，不久的将来就可不用担心化学防腐剂对人类的危害。

(上接第 125 页)

更换模具给盖片压上产品商标或企业标识，使产品具有一定的防伪功能。热压工序和压花工序不可调换顺序，压花压力为 1.6MPa。

3.2.8 成型盖的卸料 易拉盖加工成型后，由机械手夹持至卸料工位，当机械手的活动指碰到卸料块时，机械手张开，同时装在卸料工位的喷嘴将成品盖喷落，成品盖沿着滑道下滑，由输送带送出。

#### 4 小结

马口铁-铝塑复合易拉盖是由铝塑复合膜和马口铁盖圈封合而成的一种新型的复合易拉盖，具有铝制易拉盖的密闭、遮光、防伪等特点，强度较好，同时成本更低，适用于粉状、粒状物品的罐装包装中。在开启易拉盖时，轻轻向上提起铝制拉环，使拉环产生力矩，启开粘合在马口铁盖圈上的铝箔，这

(上接第 132 页)

样容易得到罐中食品，而不必附加任何开罐器。其独特的外观造型及精美的图文有很好的装饰性，新颖、别致、美观，具有提高内装物品档次又增加市场宣传的效果。再加上该易拉盖密封性好，拉启方便，使得这种复合型易拉盖在罐盖行业备受青睐，为易拉罐新产品开发包装封口多提供了一项选择，也多了一份商机。

参考文献：

[1] 葛文光.低聚乳果糖的生理功能及加工特性[J].食品科学,

参考文献：

- [1] Klaenhammer, T R. FEMS Microbiol Rev[J],1993(12):39~85.
- [2] Nilsson, L. Chen, Y, Chikindas, M. Appl Environ Microbiol[J],2000,66:769~774.
- [3] Terebiznik M R, Jagus R J, et al. Food Prot[J], 2000,63: 741~746.
- [4] Jennifer Cleveland, Thomas J M, et al. International Journal of Microbiology[J], 2001,71:1~20.
- [5] Hurst, A, Adv.Appl Microbiol[J], 1981,27:85~123.
- [6] Hancock R E, Chapple D S. Antimicrob. Agents Chemother[J],1999,43:1317~1323.
- [7] Zhang, S, Mustapha, A. Food Prot[J],1999,62:1123~1127.
- [8] 许杨,孙红斌,谢俊杰.微生物学通报[J],1998,25(2):104~106.
- [9] Chen Y, Ludescher R D, Montville T J. Appl Environ Microbiol[J], 1997,63:4770~4777.
- [10] Breukink E, Wiedemann I, Van Kraaij C, et al. Science[J],1999,286:2361~2364.
- [11] Liu W, Hansen J N. Appl Environ Microbiol[J], 1990, 56:2551~2558.

参考文献：

- [1] 刘乘.复合易拉盖成型工艺及设备研究[J].包装与食品机械,2002(3).
- [2] 日本包装技术协会编,蔡少龄译.包装技术手册[M]. 机械工业出版社,1994.
- [3] 赵淮.包装机械选用手册[M]. 化学工业出版社,2001.
- [4] K Fujita, M Hirayama, H Hashimoto, et al. Purification and some Properties of  $\beta$ -Fructofuranosider from *Arthrobacter* sp.K-1[J].Agric Biol Chem,1990,54(4):931~919.
- [5] 王肇慈.粮油食品卫生检测[M].北京:中国轻工业出版社, 2001.117~135.
- [6] K Fujita, M Hirayama, H Hashimoto, et al. Transfructosylation Catalyzed by  $\beta$ -Fructofuranoside from *Arthrobacter* sp.K-1[J]. Agric Biol Chem,1990,54(10): 2653~2661.