

乳链菌肽及其应用研究综述*

A RESEARCH SUMMARY OF NISIN AND ITS APPLICATION

姜英辉¹ 李光友²(¹ 青岛海洋大学海洋生命学院 266003)(² 国家海洋局海洋生物活性物质重点实验室 青岛 266061)

乳链菌肽(nisin)是由特定的乳酸菌所产生的一种多肽类抗菌物质。它对食物传播的病原菌和腐败微生物有强的抑制作用,因此主要作为防腐剂用于各类食品的保存上。作为一种天然的抗菌物质,近几年来,人们开始探求乳链菌肽在其他方面的应用。本文综述了乳链菌肽的基本性质和其应用方面的研究进展,以期乳链菌肽在海洋食品、海洋药品等方面的应用研究提供参考。

1 乳链菌肽的结构及性质

Gross 等于 1971 年阐明了乳链菌肽分子的完整结构。乳链菌肽是由 34 个氨基酸组成的多肽,具有氨基和羧基末端基团,5 个二硫键形成分子内的 5 个环。分子量为 3 510 Da。乳链菌肽属于羊毛硫抗生素(lantibiotics),其活性部位含有大量的稀有氨基酸,包括羊毛硫氨酸(lanthionine)、 β -甲基羊毛硫氨酸(β -methyllanthionine)、脱氢丙氨酸(dehydroalanine)和 dehydrobutyrine 等一些非编码的氨基酸。一些证据表明,乳链菌肽的活性形式以二聚体和四聚体的形式存在,使其分子量分别为 7 000 和 14 000 Da。

乳链菌肽以两种天然形式存在,nisin A 和 nisin Z。nisin Z 是 nisin A 的变体,nisin Z 分子在其第 27 位上以精氨酸取代了 nisin A 上的组氨酸。nisin Z 比 nisin A 的扩散能力增强,抗菌活性提高。

乳链菌肽可溶于水,其溶解性依赖于溶液的 pH,在酸性条件下更易溶解。乳链菌肽在酸性条件下具有很高的稳定性。Wei 等人将乳链菌肽的 0.5% TFA(pH 2.2) 溶液于冰箱中放置几个月,没有检测到化学或生物学活性改变。乳链菌肽在高的 pH 条件下不稳定,易失活。因为碱性条件下的一些亲核物质如羟基离子、脱质子胺、脱质子的羟基基团等,易与乳链菌肽的羟基基团反应。羟基基团与这些亲核物质的反应可能是分子内的或分子间的,后者可引起交联反应。

乳链菌肽的结构基因是位于染色体上的一个接合转移的转座子上,基因是可动的。1989 年 Kaletta 等人,从乳链球菌 6F3 质粒中克隆到编码乳链菌肽的结构基因,分子量约为 70 kDa。乳链菌肽基因是一个多顺反子操纵子,长度约为 8.5 kb,5' 端有一个核糖体结合位

点,没有典型的启动子。3' 端有一个串联的中止密码子和不依赖于 ρ 因子的转录中止子。乳链菌肽的独特结构来自翻译后修饰,前体在核糖体上加工合成后,在细胞膜上前体多肽通过酶修饰半胱氨酸,苏氨酸和丝氨酸,形成具有 34 个氨基酸,并含有大量稀有氨基酸的五环结构多肽。

2 乳链菌肽的抗菌性及其作用方式

2.1 乳链菌肽的抑菌谱

许多文献表明,乳链菌肽对多种革兰氏阳性细菌,尤其是芽孢菌,具有明显的抗菌活性。在革兰氏阳性菌中,乳链菌肽可抑制 *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Streptococcus* 和 *Lactobacillus* 属中的某些种^[2],对于形成芽孢的梭菌属和芽孢杆菌属而言,芽孢比营养体对乳链菌肽更为敏感。

早期的文献报道认为,乳链菌肽仅对革兰氏阳性菌有抑制作用,而对革兰氏阴性菌、霉菌、酵母菌无抑制作用。最近的研究结果表明,乳链菌肽对某些革兰氏阴性菌也有较强的抑制作用,例如乳链菌肽与 EDTA 共同作用可抑制沙门氏菌和其他革兰氏阴性菌。当大肠杆菌受到渗透压休克处理后,改变了外膜结构,显示出对乳链菌肽的敏感性。

2.2 乳链菌肽的抑菌作用方式

对乳链菌肽抑菌作用方式的研究表明,细胞膜是其作用位点。乳链菌肽是一个疏水的带正电核的小肽,能在细胞膜上形成通道,引起重要的胞内物质的渗漏,例如 ATP(三磷酸腺苷)从胞内的渗漏,小分子或离子的流失而引起膜内外能差的消失,从而导致抑制依靠质子动力协助和依赖于磷酸烯醇丙酮酸-磷酸转移酶系统的葡萄糖的转运作用^[3],严重的甚至导致细胞的裂解。更进一步的研究结果表明,乳链菌肽分子中的脱氢丙氨酸与细胞膜上的 sulphydryl group 结合,从而引

* 国家海洋局海洋生物活性物质重点实验室基金 98 - 03 号。

第一作者:姜英辉,出生于 1972 年,博士,工程师。邮编:266500,青岛出入境检验检疫局,E-mail:Yinghui@yeah.net

收稿日期:2000 - 08 - 18;修回日期:2000 - 11 - 12

研究综述

起细胞的裂解。

Lin 等人^[4]通过分子模型分析了乳链菌肽与质膜之间的相互作用以及磷脂的影响。结果表明,乳链菌肽吸附在质膜,其N末端比C末端更深入的插入脂肪层中,表明N末端和C末端具有不同的疏水特性。因此,N末端部分用于插入脂双层中,C末端部分可能参与与膜表面的最初的相互作用。乳链菌肽与不同的中性和负电性的磷脂模型的研究结果表明,乳链菌肽扰乱了膜中脂肪,尤其是磷脂酰甘油的正常排列。乳链菌肽使磷脂酰层变圆,诱导了分子团的形成。这可能是孔道形成的最初步骤。因此,磷脂酰甘油对乳链菌肽的插入和通道的形成有直接的作用。

Jastimi 等人^[5]研究了乳链菌肽对卵磷脂膜(PC)模型的作用方式。乳链菌肽可显著地改善二软脂酰-sn-甘油酰-3-卵磷脂的多层分散形态,而不会引起脂肪晶相的显著改变。乳链菌肽能显著地干扰PC膜的渗透性和膜结构,这些干扰受到脂双层膜中的脂肪酸的种类的调节。

乳链菌肽对芽孢的作用是杀孢而非抑孢,对处于静息状态的芽孢无致死作用,但当芽孢萌发时会因对乳链菌肽敏感而被杀死,这是因为乳链菌肽主要是抑制芽孢萌发过程。

乳链菌肽的抑菌效果可延伸到G⁻(革兰氏阴性菌)。G⁻的脂多糖外膜起着细胞屏障的作用,能够阻挡一些分子,如抗生素、去污剂和染料到达细胞膜。因此,G⁻通常对乳链菌肽不敏感。外膜中的Mg²⁺起着稳定脂多糖的作用,当G⁻外膜被改变,例如外膜脂多糖的缺失或经乙二胺四乙酸(EDTA)等活性剂的处理。EDTA与G⁻的细胞外膜脂多糖的Mg²⁺螯合,导致脂多糖的缺失,增加细胞膜的通透性,从而提供乳链菌肽分子接近细胞膜上的作用位点,引起G⁻的死亡。Na₃PO₄也可以提高G⁻对乳链菌肽的敏感性^[6]。

3 乳链菌肽的测定方法

乳链菌肽的生物活性测定,人们设计了不同方法,主要包括:试管稀释技术(Tube dilution technique),浊度测定法(Turbidity assay),琼脂扩散法(Agar diffusion),ATP生物荧光法(ATP bioluminescence),酶免疫法(Enzyme immunoassay)和基质辅助激光解吸/离子化质谱法等(MALDI-TOF MS)^[7]。

琼脂扩散法是测定乳链菌肽活性的常规方法,采用*Micrococcus luteus*为检测菌。由于此方法无法检测低浓度的乳链菌肽,而且样品的pH过低同样会形成抑菌圈。Wolf 等人1996年对此方法进行了改进,进一步提高了检测结果的灵敏性、准确性和精确性。改进

的结果表明,*M. luteus*是所测菌中对乳链菌肽最敏感的指示菌。采用0.75%琼脂浓度提高了分析的灵敏性,检测培养基中加1%Na₂HPO₄,可以防止由于样品溶液pH过低造成假抑菌圈。Wolf的改良方法与标准方法相比,使准确性提高了57%,精确度提高了12%。

4 乳链菌肽分离纯化的制备方法

Cheeseman 和 Berridge 对乳链菌肽的纯化方法包括正丙醇抽提和丙酮沉淀,此方法中丙酮往往不能使乳链菌肽沉淀完全,因而回收率较低。Bailey 和 Hurst 主要采用CM-纤维素层析,此法也因吸附容量限制而造成较大损失。

由于乳链菌肽是一种带正电荷的疏水小肽,因此,纯化方案包括离子交换,疏水作用和/或反相色谱等步骤。Rodriguez 等人1995年报道了乳链菌肽的纯化方法。含有乳链菌肽的发酵液经离心除菌,采用(NH₄)₂SO₄沉淀蛋白,用pH 5.8的20 mmol/L磷酸钠缓冲液溶解后,先后经过SP-Sepharose 阳离子交换柱层析,Octyl-Sepharose CL-4B柱层析,最后经PepRPC HR 5/5 C₂/C₁₈层析柱的反相层析,得到了单一的纯品。纯化的乳链菌肽比活力提高近9×10⁶倍,回收率为最初的23.711%。该纯化步骤简单、快速、重复性好。在反相层析和疏水作用层析中观察到乳链菌肽的活性大大增加,Tichaczek 等人认为这种表观活性的增加,可能是由于在纯化过程中的疏水相互作用或抑制物质的去除,引起活性增加,也可能是纯化前乳链菌肽与其他的蛋白质组分形成活性较弱的聚集体。陈秀珠等人1996年对由乳酸乳球菌AL2产生的乳链菌肽进行了提纯。将发酵液用NaCl饱和,经正丙醇提取和CM-Sepharose C-25柱层析,得到聚丙烯酰胺凝胶电泳纯的乳链菌肽组分,比活力提高1.63倍,活力回收为41.7%。

5 乳链菌肽的应用

目前,乳链菌肽作为食品防腐剂,已广泛地应用于奶制品、肉制品、蔬菜以及饮料等方面。

5.1 乳链菌肽的安全性

乳链菌肽是某些乳酸菌的天然产物,在乳制品中就含有产乳链菌肽的菌株,因此人们在开始食用乳制品时就无意识地摄入了乳链菌肽,迄今为止未发现对人类的有害。同时,乳链菌肽与一些重要的抗生素,如青霉素、链霉素、红霉素等都无交叉抗性,也不会引起细菌对这些抗生素产生抗性。

1969年,联合国食品和农业组织以及世界卫生组织

研究综述

织(FAO/WHO)专家委员会对乳链菌肽作为食品添加剂的毒理学数据进行分析,推荐其可作为食品防腐剂而使用。1988年,美国食品与药品管理局(FDA)认为乳链菌肽是奶制品的安全的防腐剂。因此,乳链菌肽是一种安全的,且是唯一被允许使用的天然食品防腐剂。

5.2 在乳制品方面的应用

乳链菌肽最先应用于乳酪的防腐过程。乳酪中的梭菌孢子,在乳酪加工过程中能经受85~105℃的处理温度,在以后的存放过程中芽孢的萌发导致产气,产生异味和液化,引起腐败。此外,*Clostridium botulinum*在乳酪中可形成毒素。有证据表明,在乳酪中添加的乳链菌肽的浓度在500~10 000 IU/g,能够有效地抑制乳酪中*C. botulinum*类型A和B的生长以及毒素的形成。Davies等人^[8]研究了乳链菌肽对食物病原菌*Listeria*的抑制作用。在不添加乳链菌肽的条件下,乳酪仅能保存1~2周,在乳酪中添加2.5 mg/L的乳链菌肽就能够有效地抑制*Listeria*的繁殖达8周以上,从而延长了乳酪的保存期。

对于牛奶和牛奶制作的甜点,是不可能进行完全的灭菌,否则会破坏其口味、结构和营养等。采用巴氏消毒的奶制品在保存期上受到限制,但添加乳链菌肽后可以显著地延长产品的货架期。Wandling等人^[9]在脱脂牛奶热处理之前加入2 000 IU/ml的乳链菌肽,与对照组相比能显著地降低芽孢杆菌的拾-存活时间。乳链菌肽不仅提高了芽孢菌对热的灵敏性,而且能继续阻止未被杀死的芽孢的萌发。此外,乳链菌肽可以有效地抑制*Listeria monocytogene*在经巴氏消毒的液体蛋制品中的生长^[10]。

5.3 肉制品方面的应用

为了减少肉类食品中硝酸盐的使用量,将乳链菌肽作为防腐剂应用到肉制品中。Hague等人^[11]采用乳链菌肽和微波共同处理真空包装的熟牛肉,能够减少*Clostridium sporogenes*的繁殖。Cutter等人1996年将乳链菌肽固定在褐藻酸钙凝胶上,用于处理牛肉的瘦肉和肥肉组织,比直接用乳链菌肽处理牛肉能更有效地抑制*Brochothrix thermosphacta*在牛肉表面生长。

Scannell等人^[12]测定了用有机酸和乳链菌肽代替二氧化硫处理鲜肉香肠,以降低香肠中微生物的含量。实验结果表明,将柠檬酸钠和乳链菌肽配合使用,能有效地降低香肠中细菌含量,同时也对香肠中的病原菌如*Staphylococcus aureus*和*Salmonella* sp.有明显的抑制作用。Zhang等人^[13]用乳链菌肽、乳链菌肽与EDTA共同处理新鲜牛肉,采用真空包装,4℃储存30d,与对照相比,可以降低*L. monocytogene*达2.01和0.99 log CRU/cm²,降低*Escherichia coli* O157:H7505B为

1.02和0.81 log CFU/cm²。

5.4 在蔬菜和水果方面的应用

*L. monocytogene*广泛地存在于植物材料上。现代生活中,快餐食品和超市中新鲜蔬菜的半成品,已成为方便人们生活的事物。蔬菜加工处理过程中产生的营养物质能够支持食物病原菌的生长,包括李斯特菌。已有报道,一些食物传染疾病的爆发与蔬菜加工有关,这导致寻找处理蔬菜加工过程中食品传染病菌的有效方法。Cai等人^[2]尝试从豆芽中分离产乳链菌肽的乳酸菌,并用这些分离物来改进新鲜加工蔬菜的安全性,从而抑制或减少食物病原菌李斯特菌的繁殖。Fang等人^[14]将真空包装的样品用5×10³ IU/g乳链菌肽和3%山梨酸钾联合处理,能有效地抑制*S. aureus* C10和*Bacillus cereus* B7的生长繁殖,从而延长了蔬菜食品的货架期。此外,乳链菌肽能够有效地增加生物控制剂*Candida oleophila*的抑制效果,防治苹果收获后*Botrytis cinerea*和*Penicillium expansum*引起的腐烂^[15]。

5.5 饮料方面的应用

乳链菌肽能有效抑制啤酒和葡萄酒中的乳酸菌引起的腐败。一些研究表明,乳链菌肽对引起腐败的乳酸菌有很强的抑制作用,而对酿酒用的酵母菌却无任何作用。因此,可在发酵液中直接加入乳链菌肽,控制杂菌如乳杆菌及片球菌的生长。*Pectinatus frisingensis*是G⁻的厌氧菌,能够引起啤酒的腐败。Chihib等人^[16]在发酵液中添加一定量的乳链菌肽,可以延长*P. frisingensis*的生长延滞期,降低生长速率。将乳链菌肽和温和的热处理共同使用,可抑制*P. frisingensis*在啤酒中的生长繁殖,延长啤酒的储存时间。

Yoo等人在日本瓶装的Sikhae(一种大米饮料)添加乳链菌肽,用于解决高温灭菌引起的饮料营养物质的破坏和口感差的问题。在添加乳链菌肽后,灭菌过程从121℃,25 min下降至110℃,15 min,从而大大减少了营养物质的破坏,提高了Sikhae的质量,同时也降低了成本。

5.6 水产养殖上的应用

对鱼类肠道中的微生物的调查结果表明,链球菌、明串珠菌、乳芽孢杆菌等属于健康鱼肠道中的正常存在的微生物。消化道中的乳酸菌的种群数量受到各种营养和环境因子的影响。已有报道表明,从鱼类肠道中分离的乳酸菌能够起着生物原的作用。这些乳酸菌能够在鱼肠道中繁殖共生,起到抵抗革兰氏阳性鱼类病原的作用,如果采用这些无害的产细菌素的菌株喂养鱼类,可以减少抗生素的用量。孟凡伦等人^[1]采用含有多种乳酸菌的益生生素制剂应用于对虾养殖

研究综述

中,对对虾的主要致病菌——弧菌具有较强的抑制作用,可以避免使用抗生素带来的药物残留及细菌抗药性等问题。Sato 等人将乳链菌肽用于传染性鱼病的控制,并申请了专利。鱼类致病菌 *Streptococcus equinus* 在含有乳链菌肽 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的人工海水中 24 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 h 后,仅存活 4%;在未加乳链菌肽的对照组为 95%。因此在 40 L 海水中加入 1 g 乳链菌肽就能有效地抑制 *S. equinus* 对黄尾鱼的感染。

5.7 食品包装材料上的应用

目前在食品保藏方面,逐渐将乳链菌肽添加到食品包装膜和可食用膜中,从而减少抗菌剂或防腐剂的用量。Ming 等人^[17]将乳链菌肽制成粉剂后,再制成食品包装膜。在加工过程中能保持乳链菌肽的抗菌活性,并在被包装的食品表面也能保持这一活性。Padgett 等人^[18]将乳链菌肽添加到可生物降解的包装膜中,能够有效地抑制 *Lactobacillus plantarum* 的生长。在膜中同时加入乳链菌肽、EDTA 和裂解酶,可以增加对 *E. coli* 的抑制效果。因此,将乳链菌肽用于食品保鲜膜是一种有效地途径来减少食物病原菌对肉类、蔬菜、海产品等食品的污染。

5.8 医药方面的应用

乳链菌肽作为天然的抗菌物质,近几年,人们开始探索将其用于医药方面。Kaneko 等人^[19]申请在抗艾滋病(HIV)病毒的药品中添加乳链菌肽的专利。Kojima 等人认为,乳链菌肽作为抗 HIV 的活性成分,可以用来治疗艾滋病。乳链菌肽对 $\mu\text{F}-4$ 细胞的抗病毒活性为 FC_{50} 0.07 $\mu\text{g}/\text{ml}$,其细胞毒性为 CC_{50} 1.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。Montville 等人^[20]研究了乳链菌肽对结核菌 *Mycobacterium smegmatis* 的作用。乳链菌肽有可能作为抗结核试剂,用于结核病的治疗,但仍需作进一步的研究。此外,乳链菌肽还可以添加到化妆品中,例如牙膏、护肤用品等。

6 结语

综上所述,乳链菌肽是具有 34 氨基酸的小肽,结构独特。其应用广泛,不仅可以作为传统上的食品添加剂,应用于食品的保鲜防腐上,同时亦可作为益生菌应用于水产养殖,以及应用于新药的研究与开发。

加强对乳链菌肽生物合成的遗传调控的研究,了解其结构与功能的关系。采用蛋白质工程等手段,对乳链菌肽进行定向的改造与加工,可赋予其新的特征与功能,使其具有广泛的应用前景。

参考文献

- 1 孟凡伦、马桂荣、孔 健. 益生菌制剂在中国对虾养殖中的应用研究, 山东大学学报, 1998, 33: 101~104
- 2 Cai Y., Ng L. K., Farber J. M. Isolation and characterization of nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from bean-sprouts, *J. Appl. Microbiol.*, 1997, 83: 499~507
- 3 Waite B. L., Siragusa G. R., Hutkins R. W. Bacteriocin

- inhibition of two glucose transport systems in *Listeria monocytogenes*, *J. Appl. Microbiol.*, 1998, 84: 715~721
- 4 Lin L., Ducarme P., Breukink E. *et al.*. Computational study of nisin interaction with model membrane, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1999, 1420: 111~120
- 5 Jastimi R., Edwards K., Lafleur M. Characterization of permeability and morphological perturbations induced by nisin on phosphatidylcholine membrane, *Biophys. J.*, 1999, 77: 842~852
- 6 Carneiro M., Cassar C. A., Miles R. J. *et al.* Trisodium phosphate increases sensitivity of gram-negative bacteria to lysozyme and nisin, *J. Food Prot.*, 1998, 61: 839~843
- 7 Rose N. L., Sporns P., McMullen L. M. Detection of bacteriocins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 65: 2238~2242
- 8 Davies E. A., Bevis H. E., Broughton J. D. The use of the bacteriocin, nisin, as a preservatives in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*, *Lett. Appl. Microbiol.*, 1997, 24: 343~346
- 9 Wandling L. R., Sheldon B. W., Foegeding P. M. Nisin in milk sensitizes *Bacillus* spores to heat and prevents recovery of survivors, *J. Food Prot.*, 1999, 62: 492~498
- 10 Knight K. P., Bartlett F. M., McKellar R. C. *et al.* Nisin reduces the thermal resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A in liquid whole egg, *J. Food Prot.*, 1999, 62: 999~1003
- 11 Hague M. A., Kastner C. L., Fung D. Y. C. *et al.* Use of nisin and microwave treatment reduces *Clostridium sporogenes* outgrowth in precooked vacuum-packaged beef, *J. Food Prot.*, 1997, 60: 1072~1074
- 12 Scannell A. G. M., Hill C., Buckley D. J. *et al.* Determination of the influence of organic acids and nisin on shelf-life and microbiological safety aspects of fresh pork sausage, *J. Appl. Microbiol.*, 1997, 83: 407~412
- 13 Zhang S., Mustapha A. Reduction of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 numbers on vacuum-packaged fresh beef treated with nisin combined with EDTA, *J. Food Prot.*, 1999, 62: 1123~1127
- 14 Fang T. J., Chen C. Y. Inhibition of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* on a vegetarian food treated with nisin combined with either potassium or sodium benzoate, *J. Food Safe.*, 1997 17: 69~87
- 15 Neshawy S. M., Wilson C. L. Nisin enhancement of bio-control of postharvest diseases of apple with *Candida oleophila*, *Postharvest Biol. Technol.*, 1997, 10: 9~14
- 16 Chihib N., Monnerat L., Membre J. M. *et al.* Nisin, temperature and pH effect on growth and viability of *Pectinatus frisingensis*, a gram-negative, strictly anaerobic beer-spoilage bacterium, *J. Appl. Microbiol.*, 1999, 87: 438~446
- 17 Ming X., Weber G. H., Ayres J. W. *et al.* Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meat, *J. Food Sci.*, 1997, 62: 413~415
- 18 Padgett T., Han I. Y., Dawson P. L. Incorporation of food-grade antimicrobial compounds into biodegradable packing

研究综述

- films, *J. Food Prot.*, 1998, 61:1 330~1 335
- 19 Kaneko R., Miyawaki S., Fujii Y. *et al.*. Anti-HIV agents containing nisin, Jpn., Kokai, Tokkyo Koho Jp 09 77 681, 1997.
- 20 Montiville T. J., Chung H.J., Chikindas M.L. *et al.*. NisinA

depletes intracellular ATP and acts in bactericidal manner against *Mycobacterium smegmatis*, *Lett. Appl. Microbiol.*, 1999, 28:189~193
(本文编辑:张培新)