

细菌素的研究与应用进展

田露 吴咪 缙敬轩 龚国利

(陕西科技大学食品与生物工程学院, 西安 710021)

摘要: 随着食品安全问题日益受到国际社会的重视, 以食品腐败/致病菌为靶点的细菌素应用受到了广泛关注。细菌素作为安全的天然防腐剂, 可通过成孔、抑制细胞壁/核酸/蛋白质合成等不同的作用方式有效地抵抗食源性病原体。然而, 抗细菌素突变菌株的出现和传播正阻碍着食品安全, 越来越多的人开始注意食源性病原体对细菌素的耐药性现象, 这将有助于人们对细菌素耐药性问题的深入研究。综述了细菌素的分类、合成和抑菌机理及生产方法, 介绍了细菌对细菌素产生抗性的机制以及减轻细菌素耐药性的方法, 进一步阐明了细菌素在食品保鲜中作为天然防腐剂的潜在应用。

关键词: 细菌素; 分类; 抑菌机理; 耐药性; 食品防腐

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2020-0863

Research and Application Progress of Bacteriocin

TIAN Lu WU Mi GOU Jing-xuan GONG Guo-li

(College of Food and Bioengineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021)

Abstract: As food safety issues are increasingly valued by the international community, the application of bacteriocins that target food spoilage/pathogenic bacteria has received great attention. As a safe natural preservative, bacteriocin can effectively resist food-borne pathogens through different modes of action, like pore formation and inhibition of cell-wall/nucleic acid/protein synthesis. However, emergence and spread of mutant strains resistant to bacteriocins is hampering food safety. More and more people have begun to know the phenomenon of food pathogens resistances to bacteriocins, and this is conducive for people to have the deep study of bacteriocin drug-resistance. This article reviews the classification, synthesis, antibacterial mechanism, and production methods of bacteriocins, introduces the mechanism of bacterial resistance to bacteriocin and the methods of reducing bacteriocin resistance to drug, and further clarifies the potential application of bacteriocin as a natural preservative in food preservation.

Key words: bacteriocins; classification; antibacterial mechanism; drug resistance; food preservation

食源性病原体是影响食品质量的重要因素, 威胁着人类的身体健康, 甚至造成致命的影响^[1]。例如, 单核细胞增生李斯特菌、肠球菌、链球菌、葡萄球菌、芽孢杆菌和大肠杆菌等病原体进入人体组织后, 会引起呼吸道感染、全身感染和肠道感染及癌症等疾病。因此, 在食品中添加化学防腐剂或天然防腐剂是必不可少的。

天然防腐剂, 主要是由微生物分泌的次生代谢

产物或体内存在的具有抗菌作用的物质。在微生物中, 乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)可产生一系列活性抗菌物质(有机酸、过氧化氢或细菌素)^[2], 其中细菌素因高抑菌、低毒性等特点而具有较强的生物保存潜力。

细菌素是由核糖体合成的具有20-60个氨基酸长度的分泌抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs), 具有疏水性, 能抑制革兰氏阴性和革兰氏阳性食品

收稿日期: 2020-07-13

基金项目: 陕西省科技厅重点研发计划项目(2020NY-108, 2019NY-194), 陕西省教育厅服务地方科学研究计划项目(18JC004), 陕西省教育厅专项科研计划项目(19JK01434), 陕西科技大学科研启动基金(2018BJ-17)

作者简介: 田露, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 微生物代谢产物分离及鉴定; E-mail: tianlu@sust.edu.cn

通讯作者: 龚国利, 男, 博士, 教授, 研究方向: 微生物发酵; E-mail: guoligong@sust.edu.cn

致病菌，因此提供了新的策略与病原菌作战^[3]。其中，LAB产生的乳酸链球菌(Nisin)已被食品药品监督管理局授予“一般认为安全”(generally recognized as safe, GRAS)的安全性指标^[4]。Nisin被发现能抑制奶酪和其他食物中肉毒杆菌孢子的萌发。乳酸杆菌产生的Pediocin PA-1，具有延长多种即食产品货架期的潜力，特别是抑制单核细胞增生李斯特菌的生长^[5]。

细菌素对其产生菌也有毒性，但通过一系列免疫蛋白，它们可以进行自我保护^[6]。编码细菌素、免疫蛋白和其他辅助蛋白的基因排列成操纵子，这些操纵子存在于基因组、质粒或其他可移动的基因元件中。一般来说，这些操纵子是可诱导的，需要分泌和细胞外积累的肽诱导^[7]。

微生物对细菌素的敏感性是由于细菌素与细菌细胞表面和细胞膜的相互作用所致。细胞膜通透性和孔隙形成是细菌素攻击靶细菌的主要机制^[8]。然而，一些食物致病菌对Nisin和Pediocin等细菌素产生耐药性的报道表明，耐药性的增加可能会损害细菌素在生物保存中的潜在作用^[9]。因此，为解决细菌素耐药性问题，需进一步了解细菌素的功能及其降解机理。

由于细菌细胞膜表面电荷和膜流动性是细菌素在抑菌过程中所利用的两个特性，对这些特性的操纵会使细菌素无效，从而导致细菌素耐药性^[8]。然而，许多研究表明，不同细菌素组合使用或与其他抗菌化合物组合使用可克服细菌素的耐药性。由于细菌素是由核糖体合成的抗菌肽，因此通过生物工程技术改造特定的氨基酸残基能够使其更有效地抵抗食品腐败菌^[9]。本文综述了细菌素的分类、合成和抑菌机理以及生产方法，介绍了细菌对细菌素产生抗性的机制以及减轻细菌素耐药性的方法，进一步阐明了细菌素在食品保鲜中作为天然防腐剂的潜在应用。

1 细菌素的分类

细菌素最初被分为I、II、III和IV四类。其中I类细菌素包含19-50个氨基酸，如羊毛硫氨酸、N-甲基羊毛硫氨酸、脱氢酪氨酸和脱氢丙氨酸等非编码氨基酸^[10]。I类细菌素可进一步划分为Ia

类(Lantibiotics)、Ib类(Labyrinthopeptins)和Ic类(Sanctibiotics)。

II类细菌素是一类具有热稳定性、未经修饰的小肽，可进一步划分为IIa类(类片球菌素)、IIb类(两肽未修饰的细菌素)、IIc类(环状细菌素)和IId类(未修饰的、线性的和非类片菌素)^[11]。其中较为典型的Bactofencin A是一种具有某些特殊功能的新型IId细菌素，它与某些真核生物的阳离子抗菌肽相似，具有高度阳离子化的特征^[12]。此外，Bactofencin A的另一个独特之处在于，它与特异性免疫蛋白不同，它表现出dltB同源物介导的免疫功能，可降低细胞壁的负电荷，从而阻碍细菌素与细胞之间的相互作用^[12]。

III类细菌素是一类分子量大且热不稳定的细菌素。如大肠杆菌产生的大肠杆菌素，弯曲乳杆菌、益生乳酸菌和粪肠球菌产生的Helveticin M、Helveticin J和Enterolysin A^[13]。其中Helveticin M可破坏革兰氏阳性菌的细胞壁和革兰氏阴性菌的外膜，因此对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有效。

IV类细菌素由碳水化合物或脂质成分的大复合物组成，已被终止并被命名为由溶菌素S和Nisin 27组成的溶菌素^[14]。因此，细菌素主要分为以上3类。具体分类及属性，见表1。

2 细菌素的合成及其抑菌机理

产生活性细菌素的基因通常在操纵子簇中，存在于基因组、质粒或其他可移动的遗传元件中。这些操纵子的表达是可诱导的，需要自诱导肽的诱导^[23]。细菌素的表达通常受两组分系统调控，但在某些情况下受三组分系统调控。Nisin是通过激活两组分调控系统而充当其表达的自诱导剂。但是，某些细菌素例外，它们具有自己独特的调节与表达方式。例如，LsbB细菌素，位于*lsbB*基因下游的转录终止子，通过将RNA稳定性提高3倍来调节其表达，从而使表达增加30倍^[23]。有研究表明，细菌素Brevicin 174A的产生和自我抗性受两种转录调节蛋白的控制，它们在其中充当积极的自我调节作用^[7]。

细菌素是作为前体肽合成的，但前体肽不具备生物活性，需经过加工、翻译修饰和转运后才能形成成熟的细菌素^[24]。用于修饰和输出的基因位于细

表 1 细菌素的分类及属性

Table 1 Classification and properties of bacteriocins

Class	细菌素的特征 Characteristics of bacteriocins	举例 Examples	参考文献 Reference
I	Ia 羊毛硫细菌素 (<5 kD 含有羊毛硫氨酸和 β - 甲基羊毛硫氨酸的肽) Lantibiotics (< 5 kD peptides containing lanthionine and β - methylanthionine)	Nisin	[5]
	Ib 含有 labyrinthin 和 labionin 的碳环羊毛硫细菌素 Carbacyclic lantibiotics containing labyrinthin and labionin	Labyrinthopeptin A1	[15]
	Ic Sactibiotics (发夹结构和硫键) Sactibiotics (hairpin structure and disulfide bond)	Thuricin CD	[16]
II	IIa 主要由 <i>Pediococcus</i> 、 <i>Lactobacillus</i> 、 <i>Leuconostoc</i> 和 <i>Enterococcus</i> 菌株产生, 热稳定性小分子多肽, 具有抗单核细胞增生李斯特菌活性 Small heat-stable peptides with anti <i>Listeria monocytogenes</i> activity, mainly produced by strains of <i>Pediococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> and <i>Enterococcus</i>	Acidocin A, bavaricin A and pediocin PA-1	[17-18]
	IIb 两肽细菌素, 其活性取决于两种肽的互补作用 The activity of dipeptide bacteriocin depends on the complementary action of the two peptides	Lactococcin G, lactacin F and plantaricin J/K	[19-20]
	IIc N 和 C 末端共价连接的环状细菌素 N-terminal and C-terminal covalently linked circular bacteriocins	Acidocin B, gassericin A and uberolysin	[21-22]
	IId 未修饰的, 线性的, 非类片菌素 Unmodified, linear, non pediocin-like bacteriocins	Lacticin Z, carnobacteriocin A and enterocin Q	[12, 23]
III	大而 (> 30 kD) 热不稳定细菌素, 主要由乳杆菌产生 Large molecules (> 30 kD) sensitive to heat, mainly produced by <i>Lactobacillus</i>	Lactacin B, helveticin J and enterolysin A	[13]

菌素生物合成基因附近。细菌素的类型不同, 修饰可能会有所不同。像 ABC 转运蛋白和 Sec 依赖性蛋白这样的转运蛋白用于细菌素的分泌^[25]。

不同种类的细菌素对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌有不同的作用机制。由于大多数细菌素是阳离子型的, 因此细菌素分子与细菌表面阴离子成分之间的相互作用在细菌素产生活性的初始阶段起着至关重要的作用。细菌素采取构型, 以使带正电的基团与带负电的细菌表面发生静电相互作用, 而疏水性表面朝向膜排列并穿过脂质双分子层, 刺入脂质双分子层后, 肽段自缔合或聚合形成复合物^[26]。细菌素诱导靶细菌细胞膜通透性, 可能是通过形成离子选择性孔而引起的。这些孔会导致钾、镁、磷离子、氨基酸和 ATP 等小分子的流出, 从而引起膜电位的扰动, pH 梯度和质子泵的功能受到抑制。细胞中低水平的 ATP 和离子缺乏会导致 DNA、RNA、蛋白质和多糖合成受到抑制, 最终导致细菌细胞死亡^[27]。

细菌素需磷酸转移酶系统对接分子 (如脂质 II 或甘露糖渗透酶) 与膜相互作用。也存在某些细菌素可能不需要靶受体进行对接。Garvicin ML, 来源于乳球菌 DCC43 的环状细菌素, 利用麦芽糖 ABC

转运蛋白和渗透酶作为受体^[28]。对接分子可增强羊毛硫细菌素孔的传导性和稳定性, 但目标膜中的受体可能决定 II 类细菌素的特异性^[8]。I 类细菌素是带有羊毛硫氨酸残基的羊毛硫细菌素, 形成分子内硫醚环^[29]。II 类细菌素很小, 具有窄谱的抑菌活性。羊毛硫细菌素在“楔形”模型中形成孔, 而 II 类细菌素通过“桶壁”孔或“地毯”机制增加膜通透性^[8]。

3 细菌素的生产方法

研究表明, 细菌素主要是通过菌株的发酵生产。由于微生物发酵法产生的细菌素产量低且纯化繁琐。因此开发了固相肽化学合成法 (solid phase peptide chemical synthesis, SPPS) 和异源表达法生产细菌素。

3.1 发酵法

在含有乳清粉 (5% W/W) 和酵母提取物 (0.2% W/W) 的培养基中, 用乳酸乳球菌 ATCC 发酵生产 Nisin。将种子培养物 (2.5% W/W) 接种到发酵液中, 一旦乳酸浓度达到 25 g/L, 停止发酵并将温度升高至 50℃, 以停止细菌的生物活性。所获得的 Nisin 浓度为 3 000 IU/mL, 蒸发发酵液以得到浓缩的 Nisin^[30]。

细菌素的产量取决于发酵培养基的组成，发酵培养基约占生产成本的30%。多种低分子复杂介质使蛋白质纯化变得更加繁琐，从而增加了生产成本^[31]。对反应动力学，发酵过程建模以及用便宜培养基代替昂贵培养基的研究将是促进细菌素生产和应用的重中之重。

3.2 化学合成法

由于微生物发酵法产生的细菌素产量低，纯化繁琐，因此开发了SPPS生产细菌素。用于合成肽的试剂和构建基元的价格降低，以及催化天然蛋白翻译和修饰的化学进步，使化学合成法成为生物医学应用中的一种替代方法。

细菌素AS-48是由70个氨基酸组成的环状肽。首先合成线性肽，并通过Asn/Asp(Asx)特异性连接酶将其环化。合成后的环状细菌素在0.24–1.27 μmol/L浓度范围内对大肠杆菌，金黄色葡萄球菌，粪肠球菌和单核细胞增生李斯特菌均有活性^[32]。以HMPB-ChemMatrix树脂为原料，采用Fmoc/tBu合成Pediocin PA-1。Pediocin PA-1的总产率为11%，对单核细胞增生李斯特菌的MIC值为6.8 μmol/L。Pediocin PA-1也显示出对产气荚膜梭菌的显著抗菌活性^[33]。化学合成是获得纯细菌素以避免微生物发酵后繁琐纯化细菌素的良好起点。但低产量仍是一个瓶颈，需要进一步优化工艺以提高产量。

3.3 异源表达法

随着基因工程技术的广泛应用，许多学者发现通过异源分泌表达产生细菌素可克服发酵法与合成法的部分缺点。通常用于产生细菌素的表达宿主为细菌和酵母细胞。

从中国大港油田中分离出热反硝化地芽孢杆菌NG80-2。该分离物可表达广谱地杆菌素I和II。在大肠杆菌BL21(DE3)细胞中扩增并异源表达地杆菌素I和II的编码序列。与地杆菌素II相比，地杆菌素I对许多耐药病原微生物具有活性。地杆菌素I与Nisin相似，它通过与脂质II分子结合以剂量依赖的方式抑制肽聚糖的合成^[34]。因此开发异源表达系统以提高细菌素产量，且有助于扩大其在食品和制药行业中的应用^[35]。

4 细菌对细菌素产生耐药性的机制

所有生物都有适应环境变化的内在趋势。目标细菌持续暴露在细菌素当中会产生抵抗细菌素的成分，从而导致细菌素耐药性。由于反复使用细菌素，致使某些细菌对细菌素的耐药性日趋严重。目标细菌产生耐药性的机制不同，革兰氏阳性细菌的细胞壁由相对较厚的多层肽聚糖组成，溶葡萄球菌素可裂解葡萄球菌类细胞壁肽扩张层中的聚甘氨酸交联键^[36]。目标细菌也可通过中和细胞壁的净负电荷来逃逸细菌素。细菌对细菌素产生耐药性的机制各不相同，以下总结了细菌对细菌素产生耐药性的常见机制。

4.1 细菌素对接分子膜受体的变化

细菌素系于脂质II、甘露糖磷酸转移酶系统、十一异戊二烯焦磷酸磷酸酶、麦芽糖ABC转运体和锌离子依赖性金属内肽酶上。甘露糖特异性磷酸转移酶系统(Man PTS)基因在耐细菌素的单核细胞增生李斯特菌中表达较低，表明受体密度低影响细菌素的结合^[36]。Garvicin ML需要麦芽糖ABC转运体复合物作为受体，缺乏这种复合物会导致肠球菌科的耐药性。

4.2 细胞壁磷壁酸的D-丙氨酸化

由于磷壁酸组成的变化，获得耐药性的细菌细胞壁负电荷降低。磷壁酸是一种富含磷酸根的阴离子聚合物，它由聚甘油磷酸酯组成，该磷酸甘油酯通过糖脂锚定蛋白与膜相连^[37]，或聚核糖醇磷酸可形成磷壁酸核心，也可存在于其他多元醇中，如甘露醇、赤藓糖醇和阿拉伯糖醇中。磷壁酸的核糖醇磷酸骨架可被D-丙氨酸取代以形成D-丙氨酸酯键。通常，磷壁酸给细胞壁带来负电荷，但当它D-丙氨酸化后，给细胞壁带来正电荷，从而导致阴离子聚合物的中和。金黄色葡萄球菌对达托霉素的耐药性是由磷壁酸的D-丙氨酸化引起的。在革兰氏阳性细菌中，由dlt操纵子编码的4种蛋白质是合成磷壁酸D-丙氨酸酯所必需的。鼠李糖乳杆菌的研究表明了这4种蛋白质(DltA-D)的作用^[38]。DltA充当D-丙氨酸-D-丙氨酸载体蛋白连接酶(Dcl)，该酶通过ATP水解激活D-丙氨酸，并将其转移至由dltC

编码的 D- 丙氨酸载体蛋白 (Dep) 的磷酸泛素辅助因子上。疏水性 DltB 是一种膜蛋白, 它是 D- 丙氨酸与磷壁酸结合和活化 D- 丙氨酸跨细胞质膜转移所必需的。DltD 负责将 D- 丙氨酸从膜载体 DltB 转移到磷壁酸^[38]。已发现金黄色葡萄球菌中 *dlt* 操纵子的失活赋予了病原菌对细菌素的敏感性。此外, 粪便大肠杆菌和肺炎链球菌中 *dltA* 的缺失导致磷壁酸中缺乏 D- 丙氨酸, 使该菌株对细菌素更加敏感^[39]。与野生型相比, 在粪便大肠杆菌的耐片球菌素的突变体中观察到 D- 丙氨酸的变化: 磷的比率增加, 中和细胞壁表面电荷, 从而增加了片球菌素扩散至增生间隙的通透性屏障^[40]。

4.3 细胞膜磷脂的 L- 赖氨酸酰化

由于磷壁酸通过 D- 丙氨酸化成为一种毒力剂, 一些细菌用 L- 赖氨酸修饰阴离子磷脂, 产生碱性赖氨酸酰磷脂酰甘油, 它赋予细胞质膜正电荷, 可以保护细菌免受细菌素的侵害, 包括达托霉素^[41]。在高抗性单核细胞增生李斯特菌, 金黄色葡萄球菌, 粪肠球菌等菌株中, 已观察到膜磷脂的赖氨酸含量增加。由 *mprF* 基因编码的 MprF 蛋白是磷脂赖氨酸酰化所必需的。事实上, MprF 可用赖氨酸或丙氨酸修饰细菌磷脂酰甘油, 以改变膜电荷^[42]。

磷脂酰甘油的极性头被 Ala-tRNA (Ala) 依赖性的丙氨酰 - 磷脂酰甘油合酶或 Lys-tRNA (Lys) 依赖性的赖氨酰 - 磷脂酰甘油合酶酰化, 有利于易感细菌暴露在细菌素当中时得以生存^[43]。这种含氨基酸的膜脂是应激状态的标志, 并适应不断变化的环境条件^[44]。

4.4 细胞膜脂肪酸组成的变化

耐细菌素病原体中饱和脂肪酸和支链脂肪酸的比例增加, 可表现为更高的膜刚性, 更少的流动性, 防止细菌素渗透进入病原体细胞^[45]。有趣的是, 病原体采取相同的策略来逃避氨基青霉素、氯霉素、红霉素和四环素等抗生素。毕竟细菌素是抗生素的一个子集。芽孢杆菌和假单胞菌产生的 AMPs 被用作抗生素^[46], 而 LAB 产生的 AMPs 被用作食品防腐剂。多黏菌素、达托霉素和表面活性物质等是具有抗生素用途的环脂肽^[47]。

4.5 细菌素之间的交叉耐药性

由于细菌素的联合使用, 尤其是具有不同作用机理的细菌素组合使用, 可能会减少或阻止细菌素耐药性的发展, 因此对于确定“对两种细菌素中的一种产生耐药性之后是否会发生交叉耐药性”至关重要^[48]。Crandall 等^[49]报道单核细胞增生李斯特菌对 Nisin 的耐药性赋予了对 pediocin PA-1 的交叉耐药性。在另一项研究中, 单核细胞增生李斯特菌显示出对 Nisin、pediocin PA-1 和 leuconocin S 的耐药性。Gravesen 等^[48]发现, Nisin 和 IIa 类细菌素 (pediocin PA-1 和 leucocin A) 之间有一定程度的交叉耐药性。他们还观察到 IIa 类细菌素 (pediocin PA-1、leucocin A 和 carnobacteriocin B2) 之间完全交叉耐药。

5 克服细菌素耐药性的方法

细菌素可通过不同的机制产生耐药性, 即使是在同一菌种的不同菌株之间也是如此。此外, 属于不同类别的细菌素可能有相似的耐药机制。但细菌素耐药性的发展不会妨碍细菌素的预期用途, 因为有一些策略可用于预防或克服这种耐药性。

单凭细菌素可能不足以破坏食物中的病原微生物。过量的细菌素可能导致非特异性杀菌作用, 并且可能对消费者造成危害。因此, 考虑将细菌素与其他抗菌剂结合以增加其抑菌作用。在这方面, 植物精油已显示出希望^[50]。百里香、小茴香、香菜、薄荷、鼠尾草、熏衣草、牛至和肉桂精油已被用作食品防腐剂。牛至精油 (0.6%) 和 Nisin (500 IU/g) 组合可抑制肉末肠炎沙门氏菌^[51]。百里香精油 (0.6%) 与 Nisin (500-1 000 IU/g) 组合可抑制单核细胞增生李斯特菌的生长^[52]。用 Nisin (0.3 ppm) 修饰的百里香素可抑制香肠中的伤寒沙门氏菌^[53]。除精油外, 辐照也可以提高细菌素的功效。封装的 Nisin 与牛至和肉桂精油组合可增强单核细胞增生李斯特菌对 γ 射线的敏感性^[54]。

除了将细菌素与其他抗菌化合物组合之外, 将两种具有不同作用机理的细菌素组合也可提高对细菌靶标的效力。细菌素的组合使最小抑菌浓度显著降低, 从而降低抑菌剂量。许多研究表明, 将两种

细菌素一起使用具有很多优势,如 Nisin 和 Pediocin AcH 或 Leucocin F10 的组合。当同时或按顺序添加 Nisin 和 Nisin 13 时,可更有效地对抗单核细胞增生李斯特菌^[55]。研究表明,细菌素 AS-48 和 Nisin 已被共同用于对抗金黄色葡萄球菌,并发现与单独使用一种细菌素相比,该组合在抑菌方面更加有效。由于对特定细菌素的抗性可能会扩展到其他细菌素,尤其是同一亚类的细菌素^[56]。因此,在组合使用不同的细菌素之前,应研究交叉耐药性发展的初步测试,使耐药性的出现最小化。

另一种方法是合理设计细菌素以提高抑菌活性。与抗生素不同,细菌素可以在某些氨基酸处突变,以使其更有效地对抗靶标。像 Nisin A 已通过单个 Met21-Val 取代被修饰为 Nisin V,与 Nisin A 相比,其抗单核细胞增生李斯特菌的功效增强^[57]。已经对 Nisin 进行了一些诱变研究,以提高其对革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌的功效。用乳链菌肽 Durancin GL 进行定点诱变的丙氨酸扫描突变分析表明,几个氨基酸残基对其抗菌活性具有重要意义,而突变后的残基会提高抗菌活性^[58]。Lacticin 3147 还可以在选定的氨基酸残基处突变,以增强其抗菌活性。研究表明,Bactofencin A 已在几个氨基酸残基处突变,以了解哪些氨基酸残基对其抗金黄色葡萄球菌活性是必不可少的,哪些氨基酸残基突变以进一步增强其抑菌活性^[59]。考虑到所有方法,生物工程技术将始终是增强细菌素抗菌活性最有希望的方法。

6 细菌素在食品领域的应用

如今,消费者要求提供安全、健康、美味、保质期长且加工少的食品。LAB 是食品级微生物,已被广泛用于食品保存中,其中许多具有 GRAS 安全性指标。因此,LAB 产生的细菌素和其他代谢物通常也被认为是具有一定特性的安全化合物(如稳定性、抗菌活性、毒性低、无风味变化)^[60]。到目前为止,只有 Nisin 和 Pediocin PA-1 被商业化为食品添加剂。但其他细菌素也为其在食品领域用作生物防腐剂提供了广阔的前景,如肠球蛋白 AS-48^[61]。

细菌素在食品中的应用方式一般有两种,一种是以纯化或半纯化细菌素制剂形式添加,如 Nisin 是

50 多个国家唯一获许可用作生物防腐剂的细菌素。然而,由于多种因素,如吸附到食物成分,酶降解,不良的溶解性或食物基质中分布不均,细菌素在食物系统中的有效性通常很低。通过将产生活细菌素的细菌应用于食品中可克服使用纯化细菌素的局限性^[62]。将乳酸菌添加到乳制品(酸奶和奶酪)中将确保在整个成熟和储存过程中连续产生细菌素,并可作为发酵中的辅助培养物使用。

另一种是以细菌产生的浓缩发酵液的形式添加。例如,ALTA 2431™ (Quest) 是一种来自 Pediocin PA 的发酵产物^[63]。产生细菌素的菌株也可直接接种到食品中作为发酵剂、辅料或保护性培养物。实际上,LAB 及其细菌素已在传统食品生产中用作发酵剂。但是在数千种细菌素中,只有少数用于食品保存,因为其他的是有毒的。中草药中的细菌素和真菌毒素与肝毒性有关。同时细菌素是一组抗菌剂,能够引起与抗生素相同的危害^[64]。因此,应避免在食品等重要物品中滥用细菌素。在积极发现新的细菌素的同时,应积极探索其工程化、与其他杀菌剂相结合,同时也应探索其他食品保鲜方式,并降低细菌素的毒性,为其作为生物防腐剂奠定基础。

近来,细菌素也被掺入包装膜中以控制食源性致病菌,从而确保细菌素逐渐释放到食品中并避免与食物成分相互作用而使细菌素失活^[65]。此外,一些研究表明,与高压、有机酸、酚类化合物和脉冲电场等物理化学方法结合使用时,细菌素对革兰氏阴性菌的抗菌活性显著增强。

7 展望

细菌素在食品加工、保存和食品安全中具有广阔的应用前景。随着分子生物技术的进步,基因工程技术的成熟,可通过基因工程和蛋白质工程以生产新型细菌素,从而提高细菌素的应用潜力。但是选择新型细菌素作为生物防腐剂之前需深入了解细菌素产生的分子机制、免疫机制和作用方式,并进行综合研究从而评估其安全性。虽然一些细菌素如 Nisin 在特定的食品体系中得到了商业化的应用,但由于细菌素的局限性以及各种食品基质的其他影响因素,限制了细菌素的广泛应用。细菌素的这些局限性可通过设计细菌素,使其热稳定和 pH 稳定、

改善扩散率来克服。此外,生产和纯化成本也阻碍了细菌素的广泛应用。这些问题可通过细菌素在营养需求量最小的细菌宿主中异源表达来克服。这将在很大程度上直接降低生产成本。然而,像抗生素耐药性一样,细菌素耐药性也可能是灾难性的,因此在日常生活中探索使用细菌素时应格外小心。此外,还需要毒理学数据以确定 GRAS 的安全性指标和细菌素应用于食品中的法律批准。

细菌素可与其他保鲜方法结合使用,以减少微生物引起的食品腐败。已经证明,使用化学防腐剂、物理处理(热)或新型温和的非热物理方法(脉冲电场、高静水压、真空或改良的大气包装)可有效地提高许多细菌素的活性。使用合适的组合不仅在经济上具有吸引力,而且可以提高食品的安全性、感官和营养质量。随着将细菌素和产生细菌素的菌株掺入食品基质和包装材料中的新技术出现,预计未来在食品保鲜行业中对细菌素的需求将会增加。因此,细菌素作为天然食品防腐剂显然可以替代常规的苛刻的物理和化学防腐剂。

参考文献

- [1] Eijlander RT, Abee T, Kuipers OP, et al. Bacterial spores in food : how phenotypic variability complicates prediction of spore properties and bacterial behavior [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2011, 22 (2): 180-186.
- [2] Todorov SD, Leblanc JG, Franco BDGM, et al. Evaluation of the probiotic potential and effect of encapsulation on survival for *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 28 (3): 973-984.
- [3] Walsh CJ, Guinane CM, Hill C, et al. *In silico* identification of bacteriocin gene clusters in the gastrointestinal tract, based on the Human Microbiome Project's reference genome database [J]. *BMC Microbiology*, 2015, 15 (1): 183.
- [4] 匡珍, 李学英, 徐春霞, 等. 乳酸菌细菌素研究进展及其在水产养殖和加工中的应用 [J]. *食品工业科技*, 2019, 40 (4): 292-298.
- Kuang Z, Li XY, Xu CX, et al. Research progress of bacteriocins from lactic acid bacteria and its application in aqua culture and processing [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40 (4): 292-298.
- [5] Szabo EA, Cahill ME. Nisin and ALTA (TM) 2341 inhibit the growth of *Listeria monocytogenes* on smoked salmon packaged under vacuum or 100% CO₂ [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 1999, 28 (5): 373-377.
- [6] Oppegard C, Rogne P, Emanuelsen L, et al. The two-peptide class II bacteriocins : structure, production, and mode of action [J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2007, 13 (4): 210-219.
- [7] Noda M, Miyauchi R, Danshiitsoodol N, et al. Expression of genes involved in bacteriocin production and self-resistance in *Lactobacillus brevis* 174A is mediated by two regulatory proteins [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84 (7): 2707-2717.
- [8] Moll GN, Konings WN, Driessen AJM, et al. Bacteriocins : mechanism of membrane insertion and pore formation [J]. *Molecular Microbiology*, 1999, 76 (1-4): 185-198.
- [9] Okuda K, Zendo T, Sugimoto S, et al. Effects of bacteriocins on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, 57 (11): 5572-5579.
- [10] Parada JL, Caron CR, Medeiros ABP, et al. Bacteriocins from lactic acid bacteria : purification, properties and use as biopreservatives [J]. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2007, 50 (3): 521-542.
- [11] Drider D, Fimland G, Hechard Y, et al. The continuing story of class IIa bacteriocins [J]. *Microbiology and Molecular Biology*, 2006, 70 (2): 564-582.
- [12] O'Shea EF, O'Connor PM, O'Sullivan O, et al. Bactofencin A, a new type of cationic bacteriocin with unusual immunity [J]. *mBio*, 2013, 4 (6): 498-513.
- [13] Sun Z, Wang X, Zhang X, et al. Class III bacteriocin helveticin-M causes sublethal damage on target cells through impairment of cell wall and membrane [J]. *Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2018, 45 (3): 227-231.
- [14] Gulluce M, Karadayi M, Baris O, et al. Bacteriocins : promising antimicrobials. *Microbial pathogens and strategies for combating them [M]//A. Mendes-Vilas (Ed.)*, Science, Technology and Education, FORMATEX, Madrid, Spain, 2013 : 1016-1027.
- [15] Ferir G, Petrova MI, Andrei G, et al. The lantibiotic peptide

- labyrinthopeptin A1 demonstrates broad anti-HIV and anti-HSV activity with potential for microbicidal applications [J] . PLoS One, 2013, 8 (5) : e64010.
- [16] Mathur H, O'Connor PM, Cotter PD, et al. Heterologous expression of thuricin CD immunity genes in *Listeria monocytogenes* [J] . Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58 (6) : 3421-3428.
- [17] Trinetta V, Morleo A, Sessa F, et al. Purified sakac in A shows a dual mechanism of action against *Listeria* spp : proton motive force dissipation and cell wall breakdown [J] . FEMS Microbiol Letters, 2012, 334 (2) : 143-149.
- [18] Chen H, Tian F, Li S, et al. Cloning and heterologous expression of a bacteriocin sakacin P from *Lactobacillus sakei* in *Escherichia coli* [J] . Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 94 (4) : 1061-1068.
- [19] Oppegard C, Rogne P, Kristiansen PE, et al. Structure analysis of the two-peptide bacteriocin lactococcin G by introducing D-amino acid residues [J] . Microbiology, 2010, 156 (6) : 1883-1889.
- [20] Ekblad B, Kyriakou PK, Oppegard C, et al. Structure-function analysis of the two-peptide bacteriocin plantaricin EF [J] . Biochemistry, 2010, 55 (36) : 5106-5116.
- [21] Pandey N, Malik RK, Kaushik JK, et al. A circular bacteriocin produced by lactic acid bacteria *Lactobacillus gasseri* [J] . World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013, 29 (11) : 1977-1987.
- [22] Grande Burgos MJ, Galvez A, Pulido RP, et al. The cyclic antibacterial peptide enterocin AS-48 : isolation, mode of action, and possible food applications [J] . International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15 (12) : 22706-22727.
- [23] Uzelac G, Miljkovic M, Lozo J, et al. Expression of bacteriocin LsbB is dependent on a transcription terminator [J] . Microbiological Research, 2015, 179 : 45-53.
- [24] Zheng S, Sonomoto K. Diversified transporters and pathways for bacteriocin secretion in gram-positive bacteria [J] . Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102 (10) : 4243-4253.
- [25] Chatterjee M, Raichaudhuri A. Bacteriocin in harmony with ABC transporter exhibits antimicrobial activity [J] . EC Microbiol, 2017, 8 (1) : 3-10.
- [26] Shah Nawaz M, Soto C. Microcin amyloid fibrils A are reservoir of toxic oligomeric species [J] . Biological Chemistry, 2012, 287(15) : 11665-11676.
- [27] Christensen DP, Hutkins RW. Collapse of the proton motive force in *Listeria monocytogenes* caused by a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* [J] . Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58 (10) : 3312-3315.
- [28] Gabrielsen C, Brede DA, Hernandez PE, et al. The maltose ABC transporter in *Lactococcus lactis* facilitates high-level sensitivity to the circular bacteriocin garvicin ML [J] . Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2012, 56 (6) : 2908-2915.
- [29] Bierbaum G, Sahl HG. Lantibiotics—unusually modified bacteriocin-like peptides from gram-positive bacteria [J] . Zentralblatt Fur Bakteriologie, 1993, 278 (1) : 1-22.
- [30] Ozel B, Simsek O, Akcelik M, et al. Innovative approaches to nisin production [J] . Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102 (15) : 6299-6307.
- [31] Garsa AK, Kumariya R, Sood SK, et al. Bacteriocin production and different strategies for their recovery and purification [J] . Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2014, 6 (1) : 47-58.
- [32] Hemu X, Qiu Y, Nguyen GK, et al. Total synthesis of circular bacteriocins by butylase 1 [J] . Journal of the American Chemical Society, 2016, 138 (22) : 6968-6971.
- [33] Bedard F, Hammami R, Zirah S, et al. Synthesis, antimicrobial activity and conformational analysis of the class IIa bacteriocin pediocin PA-1 and analogs thereof [J] . Scientific Reports, 2018, 8 (1) : 9029.
- [34] Garg N, Tang W, Goto Y, et al. Lantibiotics from *Geobacillus thermodenitrificans* [J] . Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012, 109 (14) : 5241-5246.
- [35] Beaulieu L, Groleau D, Miguez CB, et al. Production of pediocin PA-1 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* reveals unexpected inhibition of its biological activity due to the presence of collagen-like material [J] . Protein Expression Purification, 2005, 43 (2) : 111-125.
- [36] Sabala I, Jonsson IM, Tarkowski IM, et al. Anti-staphylococcal activities of lysostaphin and LytM catalytic domain [J] . BMC Microbiol, 2012, 12 (1) : 97-107.
- [37] Bhavsar AP, Erdman LK, Schertzner JW, et al. Teichoic acid is an essential polymer in *Bacillus subtilis* that is functionally distinct from teichuronic acid [J] . Bacteriol, 2004, 186 (23) : 7865-7873.
- [38] Debabov DV, Kiriukhin MY, Neuhaus FC, et al. Biosynthesis of

- lipoteichoic acid in *Lactobacillus rhamnosus* : role of DltD in D-alanylation [J] . *Bacteriol*, 2000, 182 (10) : 2855-2864.
- [39] Kovacs M, Halfmann A, Fedtke I, et al. A functional dlt operon, encoding proteins required for incorporation of D-alanine in teichoic acids in Gram-positive bacteria, confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Streptococcus pneumoniae* [J] . *Bacteriol*, 2006, 188 (16) : 5797-5805.
- [40] Kumariya R, Sood SK, Rajput YS, et al. Gradual pediocin PA-1 resistance in *Enterococcus faecalis* confers cross-protection to diverse pore-forming cationic antimicrobial peptides displaying changes in cell wall and mannose PTS expression [J] . *Annals of Microbiology*, 2015, 65 (2) : 721-732.
- [41] Khatib TO, Stevenson H, Yeaman MR, et al. Binding of daptomycin to anionic lipid vesicles is reduced in the presence of lysyl-phosphatidylglycerol [J] . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016, 60 (8) : 5051-5053.
- [42] Ernst CM, Kuhn S, Slavetinsky CJ, et al. The lipid-modifying multiple peptide resistance factor is an oligomer consisting of distinct interacting synthase and flippase subunits [J] . *mBio*, 2015, 6 (1) : e02340-14.
- [43] Hebecker S, Krausze J, Hasenkampf T, et al. Structures of two bacterial resistance factors mediating tRNA-dependent aminoacylation of phosphatidylglycerol with lysine or alanine [J] . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112 (34) : 10691-10696.
- [44] Geiger O, Gonzalez-Silva N, Lopez-Lara IM, et al. Amino acid-containing membrane lipids in bacteria [J] . *Progress in Lipid Research*, 2010, 49 (1) : 46-60.
- [45] Naghmouchi K, Kheadr E, Lacroix C, et al. Class I/Class IIa bacteriocin crossresistance phenomenon in *Listeria monocytogenes* [J] . *Food Microbiology*, 2007, 24 (7) : 718-727.
- [46] Raaijmakers JM, Bruijn ID, Nybroe O, et al. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas* : more than surfactants and antibiotics [J] . *FEMS Microbiology Reviews*, 2010, 34 (6) : 1037-1062.
- [47] Ines M, Dhouha G. Lipopeptide surfactants : Production, recovery and pore forming capacity [J] . *Peptides*, 2015, 71 : 100-112.
- [48] Gravesen A, Kallipolitis B, Holmstrøm K, et al. pbp2229-mediated nisin resistance mechanism in *Listeria monocytogenes* confers cross-protection to class IIa bacteriocins and affects virulence gene expression [J] . *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70 (3) : 1669-1679.
- [49] Crandall AD, Montville TJ. Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype [J] . *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64 : 231-237.
- [50] Patel S. Plant essential oils and allied volatile fractions as multifunctional additives in meat and fish-based food products : a review [J] . *Food Additives and Contaminants*, 2015, 32 (7) : 1049-1064.
- [51] Govaris A, Solomakos N, Pexara A, et al. The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella enteritidis* in minced sheep meat during refrigerated storage [J] . *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 137 (2-3) : 175-180.
- [52] Solomakos N, Govaris A, Koidis P, et al. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage [J] . *Food Microbiology*, 2008, 25 (1) : 120-127.
- [53] Rattanachaiyunsopon P, Phumkhachorn P. Synergistic antimicrobial effect of nisin and p-cymene on *Salmonella enterica* serovar *Typhi* *in vitro* and on ready-to-eat food [J] . *Agricultural Chemical Society of Japan*, 2010, 74 (3) : 520-524.
- [54] Huq T, Vu KD, Riedl B, et al. Synergistic effect of gamma (γ) - irradiation and microencapsulated antimicrobials against *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat (RTE) meat [J] . *Food Microbiology*, 2015, 46 : 507-514.
- [55] Bouttefroy A, Milliere JB. Nisin-curvaticin 13 combinations for avoiding the regrowth of bacteriocin resistant cells of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 [J] . *Food Microbiology*, 2000, 62 (1) : 65-75.
- [56] Topisirovic L, Kojic M, Fira D, et al. Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation [J] . *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 112 (3) : 230-235.
- [57] Field D, Daly K, O' Connor PM, et al. Efficacies of nisin A and nisin V semipurified preparations alone and in combination with plant essential oils for controlling *Listeria monocytogenes* [J] . *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81 (8) : 2762-2769.
- [58] Ju X, Chen X, Du L, et al. Alanine-scanning mutational analysis

- of durancin GL reveals residues important for its antimicrobial activity [J] . *Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63 (28) : 6402-6409.
- [59] Paula M, O' Connor, Eileen F, et al. The potency of the broad spectrum bacteriocin, bactofencin A, against staphylococci is highly dependent on primary structure, N-terminal charge and disulphide formation [J] . *Scientific Reports*, 2018, 8 (1) : 1-8.
- [60] Carr FJ, Chill D, Maida N. The lactic acid bacteria : a literature survey [J] . *Critical Reviews in Microbiology*, 2002, 28 (4) : 281-370.
- [61] Sanchez-Hidalgo M, Montalban-Lopez M, Manuel R, et al. AS-48 bacteriocin : close to perfection [J] . *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2011, 68 (17) : 28145-2857.
- [62] Johnson EM, Jung DY, Jin DY, et al. Bacteriocins as food preservatives : Challenges and emerging horizons [J] . *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2018, 58 (16) : 2743-2767.
- [63] Rodriguez JM, Juan M, Martinez MI, et al. Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria [J] . *Food Science and Nutrition*, 2002, 42 (2) : 91-121.
- [64] Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays [J] . *International Journal of Pharmaceutics*, 2005, 288 (2) : 369-376.
- [65] Grande MJ, Lopez RL, Abriouel H, et al. Treatment of vegetable sauces with enterocin AS-48 alone or in combination with phenolic compounds to inhibit proliferation of *Staphylococcus aureus* [J] . *Journal of Food Protection*, 2007, 70 (2) : 405-411.

(责任编辑 狄艳红)