

# 天然肽类防腐剂研究进展

郭新竹 宁正祥

(华南理工大学食品与生物工程学院, 广州, 510640)

**摘 要** 综述了天然肽类食品防腐剂的研究进展, 主要论述了 4 种研究最多的肽类防腐剂: 溶菌酶、昆虫抗菌肽、乳酸链球菌素和鱼精蛋白的结构、抗菌机理等方面的研究成果, 简要介绍了解决天然防腐剂抗菌谱窄、抗菌效果差、生产成本高等问题而采取的一些措施。

**关键词** 肽类防腐剂 溶菌酶 昆虫抗菌肽 乳酸链球菌素 鱼精蛋白 抗菌机理

在食品工业中防腐剂是最重要的添加剂之一, 目前我国大量使用的还是苯甲酸及其盐、山梨酸及其盐、对羟基苯甲酸酯类等化学合成防腐剂。但随着生活水平的不断提高和对健康的日益关注, 人们对防腐剂之类的食品添加剂在安全性能上提出了更高的要求, 由于化学合成防腐剂或多或少对人体产生一定毒害作用, 研究者开始把目光投向天然防腐剂的开发。在天然防腐剂中, 有一大类肽类防腐剂, 由于其安全无毒害, 甚至有的对人体有保健作用而受到人们的广泛关注。本文将就研究最多的几种肽类防腐剂的来源、结构、抗菌性能等作一综述, 以期能使读者对天然肽类防腐剂有更深入的了解, 用以指导实践应用。

## 1 溶菌酶(lysozyme)

溶菌酶是一种专门作用于微生物细胞壁的水解酶, 最初是由 Fleming 1922 年在人的唾液、眼泪中发现的, 之后随着研究的不断深入, 在蛋清、哺乳动物乳汁、植物和微生物中都发现有溶菌酶的存在。作为一种存在于人体正常体液及组织中的非特异性免疫因素, 溶菌酶对人体完全无毒、无副作用, 且具有多种药理作用, 它具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤的功效。所以是一种安全的天然防腐剂。

溶菌酶是一种比较稳定的碱性蛋白质, 在酸性条件下最稳定。在 pH3 时能耐 100℃

加热 40 min, 在中性和碱性条件下耐热性较差, 如在 pH7、100℃处理 10 min 即失活。鸡蛋清溶菌酶是溶菌酶类的典型代表, 也是了解最清楚的溶菌酶之一。它由 129 个氨基酸残基组成, 具有 4 个 S—S 键, 分子相对质量为 14000, 最适 pH 为 6~7, 最适温度为 50℃<sup>[1]</sup>。按作用的微生物不同可将溶菌酶分为 3 大类: 细菌细胞壁溶解酶、酵母细胞壁溶解酶和霉菌细胞壁溶解酶。

从 60 年代起, 人们发现微生物也产生溶菌酶, 目前发现的微生物溶菌酶大体有以下 5 种。(1) 内 N-乙酰己糖胺酶, 此酶同鸡蛋清溶菌酶, 可破坏细菌细胞壁肽聚糖中的  $\beta$ -1,4 糖苷键。(2) 酰胺酶, 能切断细菌细胞壁肽聚糖中 NAM 与肽“尾”之间的 N-乙酰胞壁酸-L-丙氨酸键。(3) 内肽酶, 使肽“尾”及肽“桥”内的肽键断裂。(4)  $\beta$ -1,3 和  $\beta$ -1,6 葡聚糖和甘露聚糖酶, 此酶分解酵母细胞的细胞壁。(5) 壳多糖酶, 分解霉菌细胞壁。

因为革兰氏阳性菌细胞壁几乎全部由肽聚糖组成, 而革兰氏阴性菌只有内壁层为肽聚糖, 因此溶菌酶主要对革兰氏阳性菌起作用而对革兰氏阴性菌作用不大。

## 2 昆虫抗菌肽(cecropin)

昆虫是世界上最大的生物种群, 除海洋外, 其它的生态环境都有昆虫的分布, 这表明昆虫具有极强的适应能力和防御能力。人们

对昆虫的体液免疫及生化性质进行了深入研究后,发现经细菌、菌疫苗、某些化学物质及超声波诱导处理,昆虫体内能产生一些杀死细菌的物质,称之为抗菌肽。到目前为止,在昆虫中已发现了大量的抗细菌肽、抗真菌肽以及既抗细菌又抗真菌的抗菌肽。在食品防腐剂领域研究最多的是 cecropin,最初是从墨西哥佩蛾的免疫淋巴中发现的,后来在其它昆虫甚至在猪肠中都发现了 cecropin 的类似物。

抗菌肽的一个典型结构特征是在一个长的疏水片段后面连有一个强碱性的 N-端区域。cecropin 由 37 个氨基酸残基组成, N 端呈碱性,带正电荷,亲水; C 端酰胺化,中性或微酸性,不带电或少量负电荷,疏水。5~12 位和 25~37 位构成 2 个螺旋区域。许多来自于不同物种的抗菌肽,其一级结构有不少相似之处,如肽的 N 端半分子富含亲水的氨基酸残基,特别是碱性氨基酸 Lys 和 Arg, C 端则含较多的疏水氨基酸残基。

一般认为抗菌肽的抗菌机理是在微生物细胞膜上形成通道,引起细胞质溢流。Christense 等通过脂质体膜经抗菌肽处理后的电势和电流的变化,判断出抗菌肽在膜上形成了孔道,进一步的研究发现通道的开启和关闭都依赖于膜的电势,只有当膜的电势高于 110 mV 时,孔道才能形成或处于开启状态<sup>[2]</sup>。通过电镜能直接观察到抗菌肽在细胞膜上造成的孔道,为电势依赖通道的形成提供了直接依据<sup>[3]</sup>。对其它抗菌肽如防卫肽、爪蟾抗菌肽的抗菌机制的研究表明,通道的形成在抗菌活性中有重要作用<sup>[4]</sup>。

关于通道形成的具体过程有不同的几种假说, Christensen 等认为通道的形成可分为 3 个步骤: (1) 抗菌肽分子通过静电作用被吸附到膜的表面; (2) 抗菌肽分子中的疏水尾巴插入细胞膜; (3) 抗菌肽分子的两性分子  $\alpha$  螺旋插入膜中, 多个抗菌肽分子共同作用形成离子通道。而 Fink 等认为当抗菌肽作用于细胞膜时, N 端的两亲螺旋结合在膜表面, 只

有 C 末端的疏水螺旋插入膜中, 进而形成离子通道。Clague 等认为抗菌肽通过作用于膜蛋白, 引起蛋白质的凝聚失活, 细胞膜变性而形成离子通道<sup>[2]</sup>。

### 3 乳酸链球菌素(nisin)

早在 1928 年, 美国 Roger 等人发现乳酸链球菌的代谢产物能抑制保加利亚乳杆菌, 在其后的 20 多年中, 许多科学家对其结构、功能进行了深入的研究。1989 年联合国粮食及农业组织/世界卫生组织(FAO/WHO)、食品添加剂联合专家委员会给予 nisin 作为食品防腐剂的国际承认后, 迄今为止, 已有英、美、法等 50 多个国家和地区批准 nisin 作为食品防腐剂, 我国也在 1990 年批准使用。中科院微生物所、中国食品发酵工业研究所和浙江省天台制药厂银象分厂联合研制开发的产品也已投产。

nisin 是乳制品所含有的天然产物, 若干年来, 它随着食品被人们摄入, 并没发现毒性问题。现在已对 nisin 的安全性问题进行了系统的研究: 大鼠经口服  $LD_{50}$  约为 7000 mg/kg 体重, ADI 为 0~0.875 mg/kg 体重。研究表明, nisin 对蛋白水解酶(如胰蛋白酶等)特别敏感, 因此食用后在消化道中即可很快被蛋白水解酶水解成氨基酸。人在摄入含 nisin 的液体 10 min 后, 在唾液中就检测不到 nisin 活性, 故不会改变肠道正常菌群, 是一种安全的防腐剂。

随着研究的深入, 人们已经发现 nisin 的 6 种类型, 分别为 A、B、C、D、E 和 Z, 其中对 nisin A、nsin Z 2 种类型的研究最活跃。图 1 为 nisin A 的一级结构<sup>[5]</sup>, 它是由 34 个氨基酸组成的多肽, N 末端为异亮氨酸, C 末端为赖氨酸, 含 2 种特殊氨基酸 Dha 和 Dhb, 有 5 个硫醚键形成的分子内环, 其中一个称羊毛硫氨酸, 其它 4 个是  $\beta$ -甲基羊毛硫氨酸。相对分子质量为 3510, 活性分子常为二聚体和四聚体。nisin Z 和 nisin A 仅在 27 位氨基酸残基有差别, A 为 His, 而 Z 为 Asp。两者的

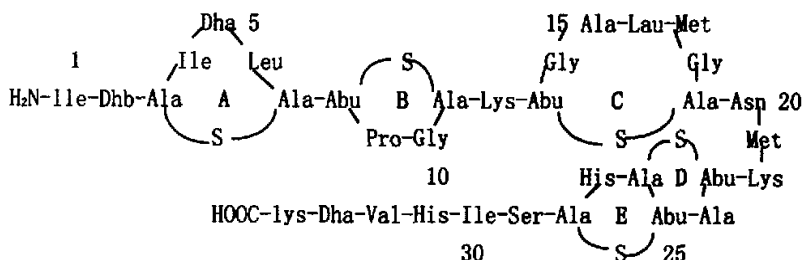


图1 nisin A 的一级结构

Ala-S-Ala 代表羊毛硫氨酸, Abu-S-Ala 代表  $\beta$ -甲基羊毛硫氨酸,

Dha 为脱氢丙氨酸, Dhb 为脱氢丁氨酸

抗菌特性几乎无差别。

许多研究表明, nisin 的作用位点主要是细胞膜<sup>[6~8]</sup>, Palmeri 等人对 nisin 存在下双层脂膜电流和电势测量后, 结果证实了 nisin 形成膜通道的能力<sup>[6]</sup>。细胞质内小分子和离子通过管道流失, 更严重则导致细胞溶解而达到杀菌防腐的目的。

Chan 等在研究 nisin 的构效关系时发现 Dha5 残基失去后会导致 nisin 活性的显著下降, Rollema 等认为这主要是由于 Dha5 作为两亲分子疏水部分及 nisin 第一个环的完整对其功能是必要的<sup>[7,8]</sup>。那么 nisin 的作用机制也很可能是插入细胞膜中后, 在 A 环的作用下形成有一定孔径的膜通道, 而导致细胞质的溢流, 引起细胞的死亡。

#### 4 鱼精蛋白(protamine)

鱼精蛋白是一种在鱼类精核中发现的聚阳离子肽, 有广谱抑菌活性, 能抑制枯草杆菌、巨大芽孢杆菌、地衣形芽孢杆菌等的生长<sup>[9]</sup>, 分子富含 Pro 和 Arg。

许多带正电荷小肽和 ceropin 和 nisin 等的杀菌机制是在细胞膜上形成电势依赖通道, 然后导致细胞内新陈代谢物质的溢流而使细胞死亡。然而并不是所有肽都是通过这种机制起杀菌作用的。从分子组成上看, 鱼精蛋白不具有两亲特征, 因为分子中的 32 个氨基酸中有 21 个是 Arg, 由于其多为阳离子、非两亲性质, 而无法插入细胞膜内而形成

膜通道, 所以鱼精蛋白不会引起细胞的水解或改变细胞膜的通透性。进一步的研究发现, 鱼精蛋白的作用机制是抑制线粒体电子传递系统中的一些特定成分, 抑制一些与细胞膜有关的新陈代谢过程<sup>[10]</sup>。经鱼精蛋白处理后, 发现细胞 ATP 含量降低, 氨基酸的转运受到抑制, 这表明产生质子动力的能力受损, 鱼精蛋白可能与磷脂头部的负电荷通过静电引力相互作用, 定位在膜的表面, 与膜中那些涉及营养运输或生物合成系统的蛋白质作用, 而使这些蛋白的功能受损, 从而抑制细胞的新陈代谢而使细胞死亡。

#### 5 天然肽类防腐剂研究趋势

##### 5.1 采用基因工程方法生产

天然肽类防腐剂多为人或动物体正常蛋白质, 故安全性很高, 而且象溶菌酶、鱼精蛋白等对人体还有一定保健作用, 所以是一类值得大力开发的食品防腐剂。但蛋清、鱼类精巢等原料的供应量很有限, 因而妨碍了这些防腐剂的广泛使用。目前人们正在尝试通过基因工程在微生物中直接表达抗菌肽基因, 但这可能造成宿主微生物自杀而不能获得表达产物, 以融合蛋白质的形式表达抗菌肽基因, 虽然可克服这一缺点, 但仍有表达产物少的问题。如何提高这些防腐抗菌肽类的产量、降低成本, 是广泛应用这些天然防腐剂必须解决的问题之一。

##### 5.2 肽的分子改造

天然防腐剂与目前广泛使用的化学防腐剂相比,抗菌谱窄、抗菌效果差。所以人们试图通过分子修饰来提高抗菌性能。例如对昆虫抗菌肽构效关系的研究表明,螺旋与抗菌肽的活性密切相关,改变两性分子螺旋的螺旋度会影响抗菌肽的活性。如用螺旋度倾向高的氨基酸残基代替螺旋倾向低的残基,抗菌肽的活性将明显提高,相反,降低抗菌肽两性分子 $\alpha$ 螺旋的螺旋度将导致抗菌肽活性的急剧下降,可见两性分子螺旋在维持抗菌肽活性中起着重要作用。Jaynes 等以天然抗菌肽中活力最强的 cecropin B 为蓝本,置换了其中的许多氨基酸,只是保持了位置原有的极性,结果新抗菌肽分子的抗菌活性增强了,而且作用范围得以拓宽,甚至可以杀死原虫<sup>[4]</sup>。溶菌酶被咖啡酰共价修饰后,修饰产物可强烈抑制大肠杆菌等革兰氏阴性菌的生长,大大加宽了溶菌酶的抗菌谱<sup>[11]</sup>。溶菌酶被环糊精和半乳甘露聚糖修饰后,不仅抗菌活性稳定,而且具有良好的乳化性能,加工性能大为增强。所以,抗菌肽类分子的改造和设计已成为获得新抗菌肽的主要途径。

### 5.3 与其它防腐剂联合使用

在实际应用中,天然肽类防腐剂常和其它添加剂配合作用以增强其抗菌效果,例如螯合剂 EDTA。EDTA 可从革兰氏阴性菌中部分除去含有脂多糖的外层膜,因而降低了其对其它防腐剂的抗性。例如溶菌酶、nisin 等一般只能作用于革兰氏阳性菌,但与 EDTA 配合使用时,它们对革兰氏阴性菌的抑

制能力也大为增强<sup>[12]</sup>。

## 6 结 语

随着人们在对食品安全性的日益关注,天然防腐剂的开发研究已是食品研究领域一个重要的课题,而且人们开始寻找多功能的食品防腐剂,即不仅要求有很好的抑菌效果,而且要对人体有营养保健作用,肽类防腐剂的研究开发无疑会是防腐剂领域一个很有前途的方向。

## 参 考 文 献

- 1 Laurents D V, Baldwin R L. *Biochemistry*, 1997, 36: 1496~1504
- 2 Wang Wei, David K Smith et al. *J. Biological Chemistry*. 1998, 273(42), 27438~27448
- 3 姜明,尚德静等. *食品科学*, 1993, 14(11): 11~13
- 4 卢晓风,杨星勇等. *药学报*, 1999, 34(2): 156~160
- 5 Harry S R, Jorg W M et al. *Eur. J. Biochem.*, 1996, 241: 716~722
- 6 Palmeri A, Pepe I M et al. *Thin Solid Films*, 1996, 284: 822~824
- 7 Chan W C, Dodd H M, Horn N et al. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(8): 2966~2969
- 8 Cindy V K, Eefjan B et al. *Eur. J. Biochem.*, 1997, 247: 114~120
- 9 松田敏生. *New Food Industry*, 1991, 33(9): 36~46
- 10 Arden A, Eduardo A G. *Microbiology*, 1996, 142: 3389~3397
- 11 Krist S et al. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1998, 65: 301~306
- 12 Delves - Broughton J. *International Biodeterioration Biodegradation*, 1992, 32: 15~16

## The Research Progress of Natural Peptide Preservatives

Guo Xinzhu Ning Zhengxiang

(College of Food and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou, 510640)

**ABSTRACT** The research progress of natural peptide preservatives was reviewed in this paper. The structure, antimicrobial mechanism of nisin, lysozyme, cecropin and protamine were mainly discussed. Finally, some methods to widen their antimicrobial spectrum, increase in their antimicrobial activity and cost decrease were also introduced.

**Key words** peptide preservatives, lysozyme, cecropin, nisin, protamine, antimicrobial mechanism