

## 乳酸链球菌素的特性及应用

### 一、简介

乳酸链球菌素(Nisin)是从乳酸链球菌发酵产物中提制的一种多肽抗菌素类物质,是一种安全的天然生物性食品防腐剂和抗菌剂。早在 1928 年,Rogers 和 Whittier 就发现乳酸链球菌的代谢产物能够抑制部分革兰氏阳性菌的生长。1944 年 Mattic 和 Hirsch 发现血清学 N 群中的一些乳酸链球菌能产生蛋白类抑菌物质,命名为 N\_inhibitory Substance 即 N 群抑菌物质,简称为 Nisin。1951 年,Hirsch 等人应用 Nisin 到食品保藏中,成功的抑制了由产气梭状芽孢杆菌引起的奶酪腐败,极大改善了奶酪的品质。1953 年由英国的阿普林和巴雷特公司首次以商品的形式出售了这种新的防腐剂—乳酸链球菌素。1969 年,FAO/WHO 食品添加剂联合专家委员会批准 Nisin 作为一种生物型防腐剂应用于食品工业。1988 年美国食品和药物管理局(FDA)也正式批准将 Nisin 应用于食品中。我国在 GB2760-2017 中批准 Nisin 可用于乳及乳制品、食用菌和藻类罐头、八宝粥罐头、其他杂粮食品、方便米制品、方便面制品、预制肉制品、熟肉制品、熟制水产品、蛋制品、醋、酱油、酱及酱制品、复合调味料、除水之外的所有饮料。迄今为止,Nisin 已在全世界约 60 多个国家和地区被用作防腐剂。Nisin 分子由 34 个氨基酸残基组成,分子式为  $C_{143}H_{228}N_{42}O_{37}S_7$ ,分子量为 3330.31。Nisin 分子结构中包含 5 种稀有氨基酸即 ABA、DHA、DHB、ALA-S-ALA 和 ALA-S-ABA,它们通过硫醚键形成五个内环,其活性分子常为二聚体或四聚体。二聚体分子量为 7000,四聚体分子量为 14000。经过几十年的研究,人们已发现 Nisin 分子有 6 种类型,它们分别是 A、B、C、E、Z 中以 Nisin A、Z 类型的研究最为活跃。Nisin A, Nisin Z 的差异仅在于氨基酸顺序上第 27 位氨基酸的种类不同。Nisin A 是组氨酸(His),而 Nisin Z 是天门冬酰胺(Asn)。资料表明,同样浓度下 Nisin Z 的溶解度和抗菌能力都比 Nisin A 强。

## 二、抑菌机理及使用

Nisin 的抗菌作用呈浓度依赖型，即和 Nisin 自身浓度、敏感菌细胞或芽孢浓度相关。Nisin 具有抑菌(bacteriostatic)或杀菌(bacteridal)作用，这要依赖于目标微生物的生理状态和情况。处于能量状态的营养繁殖细胞较处于静止状态的营养繁殖细胞更易被杀死，研究证明处于发芽时期的孢子更容易被 NISIN 杀死，杀菌作用最常发生在目标微生物的最适 pH、温度和水活度 ( $a_w$ ) 的情况下，相反食品中菌的抑制是在多重保护系统中获得最好的效果，这种多层保护系统称之为障碍技术(hurdle technology)，它发生在菌的非最适 pH， 温度和水活度( $a_w$ )的情况下。

Nisin 对敏感 Gram 阳性营养繁殖细胞的作用缘于破坏细胞质膜。早期研究表明 Nisin 的作用于营养繁殖细胞后，细胞内物质迅速漏出，包括 ATP 和其它离子，伴随着膜电势的完全丧失。如果细胞质膜受到的作用较严重，可能发生细胞的完全溶解，主要的 Gram 阴性菌对 Nisin 呈耐受性，但能增加细胞壁穿透性的任何处理或试剂应用均会大大改善它们对 Nisin 的敏感性，实验表明当采用 EDTA 与 NISIN 联合使用时 G-细菌表现得极度敏感。

Nisin 对芽孢菌的作用模式是不同的，研究表明芽孢对 Nisin 远较产生芽孢的营养繁殖细胞敏感，虽然对有限数量的菌芽孢子作用已被证实，但对大多数菌是抑制芽孢作用，这种抑制芽孢作用是在芽孢上进行的，此作用在芽孢变模糊后，膨胀和生长前开始，这种作用在热加工食品如加工干酪的保藏中是重要的，这是因为有效量的 Nisin 可在整个食品贮存期内保存，另外芽孢的进一步热处理导致其对 Nisin 敏感性的增加。

Nisin 能有效地抑杀许多 G+ 菌，如乳杆菌 (*Lactobacillus*)、分支杆菌 (*Mycobacterium*)、微球菌 (*Micrococcus*)、葡萄球菌 (*Staphylococcus*)、肠球菌 (*Enterococcus*)、片球菌 (*Pediococcus*)、明串珠菌 (*Leuconostoc*)、李斯特氏菌 (*Listeria*) 和链球菌属 (*Streptococcus*) 等;对芽孢杆菌 (*Bacillus*)

和梭状芽孢杆菌(*Clostridium*)细胞及其芽孢的萌发也有抑制作用。通常情况下, Nisin 对 G-没有作用, 然而, 在某些情形下能对外膜破裂的 G-菌起作用, Nisin 对一般 G-菌、霉菌和酵母性没有作用, 许多因素影响 Nisin 抑菌洁性与效力。

表一 典型的乳链菌素添加浓度和 Nisinpro 在食品中的应用情况

食品应用	典型微生物	NisinPro 浓度 mg/L
融化干酪	梭菌属、芽孢杆菌属	200-600
巴氏灭菌牛奶和奶制品	梭菌属、芽孢杆菌属	10-400
巴氏灭菌冷汤	蜡状芽孢杆菌、巴氏芽孢梭菌	100-200
烤饼	蜡状芽孢杆菌	150-250
罐装食品 (高酸)	肉毒梭状芽孢杆菌、热解糖梭菌	100-200
意大利乳清干酪	单核细胞增生李斯特氏菌	100-200
早餐型烹调香肠	乳酸菌、 单核细胞增生李斯特氏菌	200-1000
浸蘸酱油	乳酸菌	50-250
沙拉调味品	乳酸菌	50-200
啤酒	乳酸菌	1000-1500
酒花酵母		
啤酒 (威尔士)		
快速发酵		10-50

Nisin 对敏感营养繁殖细胞和 G+性菌芽孢的最小抑制浓度明显不同, 既使在相同菌的不同品系亦有不同, G+性敏感菌包括下列菌:*Pediococcus*、*Lactobacillus*、*Lactococcus*、*leuconostoc* 和 *Micrococcus*, 产芽孢菌 *cocstridium*, *Desulfotolmaculum* 和 *Bacillus*。能被 Nisin 有效抑制的 *Clostridium* 包括 *C.Sporogenes*、*C.lentoputrescens*, *C.tyrobutyricum* 和 *C.butyricum*, 它们和加工干酪的腐败密切相关。由于 Nisin 主要用于营养繁殖细胞已被热处理杀死的食品, 耐热菌 *B.Stearothermophilus* *C.thermosaccharolyticum*的芽孢对 Nisin 呈高敏感性, 25mg/kg 的 Nisin 对它们表现出有效性。其它 *Bacillus* 芽孢在 >2500mg/kg, 情况下被抑制, 而 *B.cereus* *IB*, *megaterium* 和 *B.polymyxa* Nisin 抑制的有效范围分别为 1870~2500、650~2500、650~1250mg /kg。

表二、乳酸链球菌素的抗菌谱

Organism (no. of strains)	(1000IU/mg) MIC. (ppm)
<i>Micrococcus</i> spp. (4) 微球菌属	44
<i>Enterococcus</i> spp. (12) 肠球菌属	668
<i>Listeria</i> spp. (23) 李斯特菌属	168
<i>Staphylococcus</i> spp. (19) 葡萄球菌属	168
<i>Streptococcus</i> spp. (17) 链球菌属	336
<i>Bacillus</i> spp. (5) 杆菌属	168
<i>Clostridium</i> spp. (4) 梭状芽孢杆菌属	44
<i>Actinomyces viscosus</i> (2) 粘质放线菌属	3344

<i>Peptostreptococcus</i> spp. (2) 消化链球菌属	84
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> (1) 白喉杆菌	168
<i>Gardnerella vaginalis</i> (1) 加德纳菌属	44
<i>Mycobacterium smegmatis</i> (2)	336
<i>Propionibacterium acnes</i> (2) 痤疮丙酸杆菌	84
<i>Campylobacter jejuni</i> (1)	44
<i>Haemophilus influenzae</i> (1) 流感嗜血杆菌	2676
<i>Helicobacter pylori</i> (2) 幽门螺杆菌	12
<i>Neisseria</i> spp. (13) 奈瑟菌属	336

Nisin 对 *C.botulinum* 芽孢的敏感性应给予特别注意, 美国的研究表明在培养基中 Nisin 能有效防止 *C.botulinum* 的 A, B, C 型芽孢生长, Nisin 对 *C.botulinum* 芽孢防止的有效性随下列因素的变化而增加: 降低 pH、增加热击昏的时间和温度、减少芽孢负载。

Nisin 是由原料乳中天然存在的 *Lactococcus* 菌产生的, 故认为它是无害的, 因为人和动物摄人数个世纪也没有引起任何副作用。产 Nisin 的 *L.lactis* 在天然大量存在, 科学工作者进行的 251 个原料乳样品的检测中发现, 109 个样品中含有产 Nisin 的 *L.lactis*。对远超过食品应用量的 Nisin 的毒性研究表明, Nisin 是无毒的, Nisin 在肠道可被消化酶迅速失活, 在食用含 Nisin 的液体 10min 后就无法在人的唾液中测定到 Nisin 的存在, 现也没有发现对 Nisin 过敏的情况, 大量的微生物学研究表明: Nisin 和治疗的抗生素间无任何交叉性的互相抵消作用。1963 年 FAO/WHO 专家委员会确认了 Nisin 的毒性数据, 推荐了它在食品中的应用量, 现在 Nisin 已在约 60 个国家得到应用, 包括欧共体、美国和中国。它在食品中的用量在各不同国家间有所不同, 以加工干酪产品和罐头食品应用最为

广泛。

Nisin 在酸性底物中较易溶解，pH 上升溶解性下降，当 pH 为 2 时溶解约为 5.6%，pH5 时为 3%， pH7 仅为 1%，因为在食品保藏中 Nisin 的应用水平很少大于 250PPM (0.025%)，故溶解性不是其食品中应用的问题，商业制备物含有来自发酵的蛋白质，溶解时会产生絮状沉淀，它们对 Nisin 的效率没有不良影响。随着提取技术的不断进步这种问题正在逐步得到解决。

### 三、稳定性研究：

(一)、pH=2 条件下，在不同温度下加热 20 分钟，乳酸链球菌素失活数据对照表。

对照	100%
45℃	98.50%
65℃	97.70%
80℃	96.20%
100℃	94.80%
115℃	92.50%
121℃	85.10%

配制 100ppmNisin 溶液，滤膜过滤消毒于灭菌试管中，分别放置于 4、20、30 度环境下 6 周，每周分别测其抑菌活性，结果见图。各组随时间的延长，Nisin 活性均逐渐下降。

放置温度	4℃	20℃	30℃
对照	100%	100%	100%
7 天	98.50%	93.30%	91.80%
14 天	94.00%	91.80%	85.50%

21 天	92.50%	85.50%	81.90%
28 天	83.70%	85.90%	75.70%
35 天	85.90%	75.70%	69.30%
42 天	83.70%	69.30%	65.80%

### (二)、pH 对 NISIN 抑菌活性的影响

Nisin 溶液，用 1mol/L 氢氧化钠溶液和 1mol/L 盐酸溶液分别调 pH 值 (2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0)，进行抑菌实验，结果表明在酸性条件下抑菌活性最高，随 pH 的上升抑菌活性逐渐下降。

pH	相对抑菌活性
2.0	99.2%
3.0	100.0%
4.0	96.2%
5.0	88.8%
6.0	72.9%
7.0	55.0%

### (三)、不同温度及不同 pH 条件下处理 20 分钟后抑菌活性

数据表明在酸性条加下 nisin 在高温条件下仍具有较高的活性。对照组 pH=3.3，不进行热处理为 100%。

pH	80 度	100 度	115 度	121 度
2.0	97.70%	97.70%	91.00%	83.70%

3.0	98.50%	91.80%	84.40%	75.00%
4.0	90.30%	83.70%	75.00%	68.60%
5.0	77.10%	75.00%	65.20%	51.80%
6.0	67.20%	58.40%	43.00%	10.00%
7.0	53.70%	45.50%	38.30%	10.00%

#### 四、质量指标

乳酸链球菌素(Nisin)是从乳酸链球菌发酵产物中提取的一种多肽抗菌素,由于乳酸链球菌素为非结晶性物质,因此制备高纯度产品是困难的。根据 GB 1886.231-2016 质量标准之规定共有以下检测项目:

项目	标准	检测方法
产品外观	乳白色至浅棕色粉末	将适量试样均匀置于白瓷盘内,在自然光线下观察其色泽 和状态
含量	≥900 IU/mg	生物效价法
干燥失重	≤3.0%	GB/T5009. 3
氯化钠	≥50%	GB/T5009. 42
pH(1%溶液)	3.2-3.8	GB/T5009.237
铅 (Pb)	≤1mg/Kg	GB/T5009. 75
菌落总数	≤10cfu/g	GB/T4789.2
大肠埃希菌	<3.0MPN/g	GB/T4789.3
大肠菌群	<3.0MPN/g	GB/T4789.38





LuoYang Chihon Biotechnology Co., Ltd.  
No.11 Qinlingbei Road, Industry zone, Xigong Disdriect,,  
LuoYang, Henan, China  
PC 471000 Tel: 86-379-64382868 ;Fax:86-379-64382223  
www.chihonbio.com

沙门氏菌

不得检出

GB/T4789.4

根据以上项目分析，如果产品质量指标达到最低要求，产品中可能会含有 44.75%的未知物质，这些物质为发酵液中不能分离的蛋白质或者干燥中加入的辅料。未知物质的存在将会对产品的外观、气味产生不良的影响，甚至会影响产品的溶解特性及在食品中的分散。因此，我们认为衡量产品是否有优质的重要指标是不仅满足法定指标，更重要的是使氯化钠的含量达到最大化，这样可保证未知杂质的最小化。奇泓生物产品氯化钠一般在 90-93%之间，乳酸链球菌素含量控制在 2.5-2.75%，这样未知杂质含量在 1.25-4.5%之间。独特的生产工艺确保了产品质量。