

基因工程乳酸菌在食品发酵生产中的应用前景

孙建中¹ 田晓磊²

(1、天津津强工程公司,天津 300000 2、天津光明梦德乳品公司,天津 32000)

摘 要:介绍了利用 DNA 重组技术将具有特定功能的外源基因导入乳酸菌受体,改善菌株在噬菌体抗性、产细菌素、胞外多糖等生理特性的最新进展,以及在食品发酵生产方面的应用前景。

关键词:基因工程;乳酸菌;噬菌体抗性;细菌素;胞外多糖

引言

使用发酵方法生产食品具有非常悠久的历史,在世界许多国家和地区都能够发现这种古老的技术,发酵能够改变食品原材料的口味、质地、消化的难易程度、营养价值以及保存的时间等。乳酸菌(LAB)在食品发酵生产中起着非常重要的作用,它不仅能够改变食品的消费特性,还可以适当延长食品的保存期限,另外作为肠道益生菌在人类健康方面也做出了有益贡献。

1 乳酸菌

乳酸菌是一类异源的革兰阳性菌,粗略可分为嗜温性和嗜热性两类,前者包括乳球菌属(Lc)和明串珠菌属(L),后者包括嗜热链球菌、保加利亚乳杆菌等^[1]。它们在生理上具有一定的相似性,都具有将碳水化合物发酵生成乳酸这种主要的最终代谢产物的能力。同型发酵乳酸菌可将发酵的碳水化合物几乎全部转化为乳酸,而异型发酵乳酸菌除了产生乳酸外,还产生其他的化合物,例如乙酸、二氧化碳和乙醇等最终代谢产物。某些乳酸菌还产生有气味的化合物,而这些化合物对发酵产品的最终口味是至关重要的。

迄今为止,乳球菌(Lactococcus lactis)是研究的最清楚的乳酸菌,特别是在生理学和分子遗传学方面。研究表明,乳球菌的遗传物质是以质粒形式存在的独立 DNA 小分子,包括染色体 DNA 和非染色体 DNA。菌株之间的质粒是有变化的,有些质粒编码在工业上已显示出重要功能:如细菌素、噬菌体抗性、胞外多糖等。

2 现状与前景

2.1 生物保鲜。在食品中加入拮抗微生物来保藏食物的方法早在几十年前就为人们所熟知,但迄今为止,这种方法仍然没有得到大规模应用。生物保鲜可以通过添加拮抗化合物的细菌来达到目的,或者直接添加经纯化后的细菌拮抗化合物。有些乳酸菌除了产生主要代谢产物外,还能够产生其他大量的抑制性物质(见表1)。

表1 乳酸菌产生的拮抗物质

拮抗物质	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	李斯特单胞杆菌	乳杆菌	乳球菌
乳酸	——	——	——	++	++
过氧化氢	——	——	——	++	++
细菌素	++	+++	+++	++++	++++

注:——不拮抗;+ 具拮抗作用;+++ 具强烈拮抗作用。

细菌素是一种蛋白质类化合物,它能够抑制有密切亲缘关系的细菌生长。从某奶制品环境条件下曾分离到280个细菌菌株,发现其中有5%的细菌能够产生细菌素^[2]。近年来通过遗传学和生物化学分析方法,对这些细菌素进行了大量研究,并将其分成两大类:羊毛硫细菌素I类型;体积较小、具有热稳定性的非羊毛硫细菌素II类型。绝大多数乳酸菌细菌素抑菌范围都比较窄,仅对亲缘关系密切的细菌有效,而有少数细菌素对某些革兰

阳性细菌都能产生抑制作用,包括对一些食品病原菌。乳酸链球菌素(Nisin)属于羊毛硫细菌素类,它是最知名的一种细菌素,也是唯一被批准应用在食品生物保鲜中的细菌素。目前Nisin已被欧盟、美国及东南亚等国家广泛应用于乳制品、罐头食品、高蛋白食品和酒等的防腐和保鲜。国内对Nisin的研究起步也较早,在菌株筛选、分子生物学研究、应用研究等方面已经取得了一定成果^[3]。最近一种名为乳球菌素3147的新细菌素已被发现,该细菌素的pH适应范围较广,作为食品防腐剂比Nisin有更多优势^[4]。

这些细菌素绝大多数都能在异源宿主内进行表达,因此可以利用基因重组技术构建细菌素多产菌株,这将进一步扩大他们在食品防腐中的应用范围。随着对这类细菌素的遗传学和生物化学方面的认识不断深入,将来通过点突变方式对细菌素进行人为的修饰和设计,来改善它们的稳定性、pH适应范围和抑菌范围。

2.2 噬菌体抗性。在发酵过程中出现的噬菌体抑制现象是人们始终面临的一个难题,特别是在奶制品工业和其他深层发酵工业(例如乙酸生产)中尤其如此,它们可以造成巨大的经济损失。因此发酵用菌种的噬菌体抗性就成为一个非常重要的特性,吸引着科研工作者的广泛关注。

一般而言,细菌具有多种噬菌体防御机制,可分别作用于噬菌体增殖的各个阶段,从噬菌体吸附开始,到DNA注入、DNA复制、噬菌体基因表达,最后直至噬菌体颗粒的组装和成熟。在乳球菌中,噬菌体防卫系统主要由位于质粒上的基因进行编码,而这些质粒大都可以自我转移。通过接合作用,质粒有机会将噬菌体抗性基因转移到其他的乳酸菌或重要的工业生产用菌株内,而接合作用是一种天然的食品生产可以接受的基因转移方式。目前具有噬菌体防卫系统、细菌素产生能力、抗性或缺乏选择标记等的乳酸菌已被构建,所得菌株表现出很高的噬菌体抗性,并已被成功地应用于奶酪工业生产^[5]。这种方法在构建工业用新菌株方面还有很大局限性,原因在于:一是缺乏显性选择标记基因;二是所导入的质粒并不稳定。质粒的不稳定性很可能是由导入的质粒与受体菌株的内生性质粒不相容引起的。

迄今为止,在工业用菌株生理特性的改善方面应用DNA重组技术还受到相应法规的限制,但食品生产可接受的基因转移技术的发展将会突破这种限制。

2.3 胞外多糖。胞外多糖是一类差异非常大的大分子聚合物,具有重要的生理功能,例如抗肿瘤活性、免疫调节活性、抗高血压等^[6]。大分子量的胞外多糖(EPS)是许多食品的重要组成部分,例如用作增稠剂、稳定剂、乳化剂、胶化剂和脂肪替代物等,也是影响许多发酵奶制品品质和感官的一个重要因素。绝大多数大分子多糖来自于植物,但有些

可通过其他途径(例如乳酸菌)获得。乳酸菌所产生的胞外多糖在化学组成、体积、分子结构和理化性质方面差异都非常大,乳酸乳球菌(Lactis)、嗜热链球菌(Sthermophilus)和乳酸乳杆菌(Lactobacillus spp)中决定胞外多糖的遗传基因都已经完成核苷酸序列分析,结果发现它们具有一个相同的操纵子结构,这也表明它们具有相同的生物合成机制。

胞外多糖基因的遗传改造将会产生具有不同重复单位和不同长度糖链的胞外多糖,这就使胞外多糖具有了不同特性。大多数乳酸菌不产生或只产生少量的胞外多糖,因此无法用于大规模工业生产。然而,在改善胞外多糖的产量研究中发现,胞外多糖的生产受到细菌生长阶段、碳源、氮源、pH和温度的影响^[7]。

有关胞外多糖结构与功能之间的相互关系以及特殊胞外多糖与食品成分之间的相互作用的机制,现在人们还知之甚少,这些都是科学研究正在探索的目标。对它们之间相互关系的进一步认识,结合遗传学和生物化学的相关知识,无疑将为构建新的重组乳酸菌提供更多机遇,这些细菌将能够产生经过特殊修饰的胞外多糖,可更好地应用于食品生产。

3 结论

就大规模、工业化生产发酵奶制品而言,经过过去几十年的研究,现在对微生物的发酵过程已经有了比较深入的认识。奶发酵过程所采用的一些微生物,特别是对乳酸乳球菌也已进行了深入而广泛的研究。利用现有的分子和遗传学技术可以从多方面对这些菌株进行修饰和改造,各种乳酸菌新菌株先后被开发和研制出来。它们仍将被继续改造以便更好地控制传统的发酵生产过程,生产出具有高营养价值的新产品。基因工程乳酸菌在将来也可以应用在与食品相关的一些产品的生产中,例如营养滋补品或其他食品添加剂如风味化合物和酶类。

参考文献

- [1]Ralph Early.乳制品生产技术(第二版)[M].北京:中国轻工业出版社,2003:113-118.
- [2]Geis A, Singh J, and Teuber M. Potential of lactic streptococci to produce bacteriocin[J].Appl Environ Microbiol, 1983, 45:205-211.
- [3]张柏林, 杜为民, 郑彩霞等. 生物技术与食品加工[M].北京:化学工业出版社, 2005: 207-209.
- [4]Ross R P, Galvin M, McAuliffe O, Morgan S M, Ryan M P, Twomey D P, Meaney W J and Hill C. Developing applications for lactococcal bacteriocins [J].Antonie van Leeuwenhoek, 1999, 76:337-346.
- [5]O'Sullivan D, Coffey A, Fitzgerald G F, Hill C and Ross R P. Design of a phage-insensitive lactococcal dairy starter (下转27页)