

噬菌体裂解酶在食品安全领域的研究进展

孙新城^{1,2,3}, 胡旭阳¹, 许素月¹, 李侠颖¹, 李爽¹, 周杰¹, 赵成鑫¹, 胡金强^{1,2,3},
高辉^{1,2,3}, 耿尧^{1,2,3}, 杨德良⁴, 白艳红^{1,2,3*}, 张晓根^{2,3*}

(1. 郑州轻工业大学食品与生物工程学院, 郑州 450001; 2. 河南省冷链食品质量安全与控制重点实验室, 郑州 450001;
3. 食品生产与安全河南省协同创新中心, 郑州 450001; 4. 长安大学经济与管理学院, 西安 710064)

摘要: 食源性疾病引发的食品安全问题可对人类健康造成严重危害, 其中微生物致病菌是引起食源性疾病的最主要因素, 近年来国内外由微生物致病菌引起的食品安全事件频发, 受到世界各国的高度关注。食品工业中传统防治食源性致病微生物的方法虽可保证微生物方面的安全, 但是存在化学防腐剂具有副作用、天然防腐剂抗微生物活性较弱以及大规模抗生素使用带来耐药性等问题, 使寻求新的杀菌技术迫在眉睫。噬菌体裂解酶是双链 DNA 噬菌体复制后期表达, 能够裂解细菌细胞壁释放子代噬菌体的一种蛋白水解酶。随着近些年针对噬菌体及其产物展开的研究不断深入, 噬菌体裂解酶凭借高度特异性、不影响正常菌群等特性, 从治疗人类耐药感染发展到应用于控制污水处理、水产养殖、动物饲料等多个领域中的细菌污染, 成为了包括食品安全在内多种应用中有效的抗微生物制剂。

关键词: 食品安全; 噬菌体; 裂解酶; 抗菌剂

Research progress of phage lyase in the field of food safety

SUN Xin-Cheng^{1,2,3}, HU Xu-Yang¹, XU Su-Yue¹, LI Xia-Ying¹, LI Shuang¹, ZHOU Jie¹,
ZHAO Cheng-Xin¹, HU Jin-Qiang^{1,2,3}, GAO Hui^{1,2,3}, GENG Yao^{1,2,3}, YANG De-Liang⁴,
BAI Yan-Hong^{1,2,3*}, ZHANG Xiao-Gen^{2,3*}

(1. College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;
2. Henan Provincial Key Laboratory of Cold Chain Food Quality Safety and Control, Zhengzhou 450001, China;
3. Food Production and Safety Henan Collaborative Innovation Center, Zhengzhou 450001, China;
4. School of Economics and Management, Chang'an University, Xi'an 710064, China)

ABSTRACT: Food safety issues caused by food-borne diseases can cause serious harm to human health. Microbial pathogens are the most important factor causing food-borne diseases. In recent years, food safety incidents caused by microbial pathogens have occurred frequently at home and abroad. It has received great attention from countries all over the world. Although the traditional methods of preventing and controlling food-borne pathogenic

基金项目: 河南省重大公益项目(201300110100)、河南省人社厅留学回国人员择优支持项目(2020039)、郑州轻工业大学校内重大培育项目(2020ZDPY0102、2021ZDPY0202)

Fund: Supported by the Major Public Welfare Project of Henan Province (201300110100), the Preferential Support Project for Returned Overseas Students of Henan Provincial Department of Human Resources and Social Security (2020039), and the Major Cultivation Project of Zhengzhou University of Light Industry (2020ZDPY0102, 2021ZDPY0202)

***通信作者:** 白艳红, 教授, 主要研究方向为肉品加工及食品安全检测。E-mail: baiyanhong212@163.com

张晓根, 教授, 主要研究方向为动物微生态学。E-mail: mzzxg2009@126.com

***Corresponding author:** BAI Yan-Hong, Professor, College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, 136 Science Avenue, Zhengzhou 450001, China. E-mail: baiyanhong212@163.com

ZHANG Xiao-Gen, Professor, Zhengzhou University of Light Industry, 136 Science Avenue, Zhengzhou 450001, China. E-mail: mzzxg2009@126.com

microorganisms in the food industry can ensure the safety of microorganisms, there are problems such as the side effects of chemical preservatives, the weak antimicrobial activity of natural preservatives, and the use of large-scale antibiotics to bring about drug resistance. It is extremely urgent to seek new sterilization technology. Phage lyase is a proteolytic enzyme that is expressed in the late stage of double-stranded DNA phage replication and can lyse the bacterial cell wall to release progeny phage. With the continuous deepening of research on bacteriophages and their products in recent years, bacteriophage lyases have developed from the treatment of human drug-resistant infections to the control of sewage treatment, aquaculture, and animal Bacterial contamination in many fields such as feed has become an effective antimicrobial agent in a variety of applications including food safety.

KEY WORDS: food safety; bacteriophage; lyase; antimicrobial

0 引言

近年来,随着人们生活水平质量的不断提高,食品安全成为大家愈发关注的焦点。食物是人类生存的基础,食品安全不仅关系到大众的身体、生命健康,同时也影响着社会经济稳定发展。据美国疾病控制中心统计,美国每年由食源性致病菌导致的感染人数超过 4800 万^[1]。在中国,食源性致病菌导致的感染人数占食物中毒总人数的 53.7%^[2]。给人类健康及社会经济带来巨大影响。在食品种类越来越丰富的同时,新的食品安全问题也不断出现,其中由致病微生物引起的食源性疾病对食品安全构成了重大威胁,此外,由于国际贸易的增加、食物链增长变得更加复杂等原因,可能会导致未来食源性疾病风险持续的增加^[3]。致病微生物引起的食源性感染和食品污染可能发生在原料供给、生产加工、包装储存以及销售等食品供应链的任何阶段,给解决食品安全问题带来很大难度,也对食源性致病菌的防治提出了更高的要求。

传统食品工业中使用的各种化学消毒剂存在腐蚀性、化学残留等缺点,为了解决食品中微生物导致的食源性疾病,科学家们开创了许多新型解决方案。其中,超高压杀菌技术作为一种非热方法,通过破坏菌体蛋白中的非共价键,使蛋白质高级结构破坏来达到杀菌目的,该方法会引起食品感官上的不良变化,同时存在蛋白质凝固及主要酶系失活等缺点^[4];辐射杀菌是通过电离辐射杀灭食品中微生物的一种方法,和传统加热方法不同,辐射以电磁波的形式传递能量,可杀灭固体或液体食品中的细菌、孢子和霉菌等病原菌,但是该方法存在食品营养价值降低和感官变化等缺点,同时因为民众对辐射杀菌技术缺乏了解,降低了消费者对它的接受程度^[5];非热等离子体杀菌是通过电磁场使气体产生电子、离子、原子、紫外光子的混合物,将储存的能量释放到微生物内,与食物基质反应产生带电粒子导致微生物细胞凋亡,然而,这项技术还处于起步阶段,需要对电场、气体类型、曝光时间和介质特性等工艺进一步完善,同时还需要大量研究来验证其对食品特性的

影响^[6]。抗生素防治技术的使用往往会杀死广谱细菌菌株,甚至破坏各种食物的正常且有益的微生物群落^[7],同时,抗生素和其他抗菌类药物存在诸多不规范、不合理的应用,导致病原菌对抗生素等抗菌制剂出现不同程度的耐药性,甚至出现了多重耐药细菌^[8],被世界卫生组织列为 21 世纪最大的公共卫生威胁之一。抗生素耐药感染所带来的困难日益增加^[9],据统计,欧盟每年大约有 33110 人因为耐药性感染而死亡^[10]。如果不采取行动,到 2050 年,抗生素耐药性可能每年导致 1000 万人死亡^[11],在这种情况下我们需要一种既可以单独使用,也可以与传统技术一起使用的安全方法,研究者把视野转向之前因抗生素而被忽略的噬菌体防治上,噬菌体具有特异性,能够只杀死宿主细菌,即食源性病原体,而不干扰食物中有益的微生物区系,噬菌体编码的裂解酶更是具有作为控制食品安全的生物制剂的巨大潜力。

1 噬菌体

1915 年,37 岁的英国微生物学家 TWORT 试图通过琼脂平板培养天花疫苗的主要成分时,观察到平板上出现一些玻璃状透明斑点,这些斑点即使被稀释,仍然可以产生新的清晰斑点。在二十世纪初,人们对病毒学的认识还处于起步阶段,不能准确地描述这种现象的作用机制及原理, TWORT 为这种奇怪的现象提出了 3 种可能的解释:它可能是细菌生命周期的一种尚未被发现的机制,也可能是细菌自身产生的一种酶,或者有可能是某种“超微病毒”。两年后,法裔加拿大微生物学家 D'HERELLE 独立发表了类似的观察结果^[12], D'HERELLE 确信他发现了一种感染细菌的新型病毒,并称之为噬菌体。同年,格鲁吉亚微生物学家 ELIAVA 在霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)中观察到这一现象。D'HERELLE 在观察到噬菌体针对特定的细菌产生噬菌斑这一现象后,创造性地提出了使用噬菌体对人和动物细菌性疾病进行治疗,并且在痢疾患者身上取得显著效果^[13],开辟了噬菌体疗法对抗细菌感染。

噬菌体由核酸和蛋白质构成,是一种能够感染细菌、

真菌和放线菌等微生物的病毒的总称。噬菌体在自然界中分布极其广泛, 例如水生系统、土壤、工厂等各种细菌宿主存在的地方, 都能见到噬菌体的身影, 据保守估计, 在地球上有 10^{31} 个噬菌体^[14]。绝大部分噬菌体的宿主范围只包括一个细菌种甚至一个菌株, 只有少数噬菌体能感染同一属的几个细菌种^[15]。根据噬菌体在宿主内的生命周期可以将噬菌体分为烈性噬菌体和温和噬菌体。烈性噬菌体穿透细菌细胞后, 利用宿主的代谢活性合成大量子代噬菌体, 裂解细菌并释放子代噬菌体; 温和噬菌体能够将自身的遗传物质整合到宿主细菌基因组中, 将这些细菌转化为溶源性细菌, 并以前噬菌体的形式在细胞中持续存在, 与宿主基因组一起复制^[16]。迄今为止, 已经分离出了 6000 多种^[17]不同的噬菌体, 但这些发现仍只是冰山一角, 绝大部分噬菌体物种还没有经过实验研究, 噬菌体被认为是地球上最有影响力的生物实体之一, 并且在人们对生物学进一步探索中发挥重要作用。

2 噬菌体裂解酶及其结构

噬菌体裂解酶是双链 DNA 噬菌体复制后期表达的蛋白水解酶, 通过攻击细菌细胞壁中的肽聚糖键导致细菌细胞壁裂解释放子代噬菌体。不同细菌的噬菌体编码的裂解酶在结构和作用机制上存在差异, 大多数革兰氏阳性菌噬菌体裂解酶的结构分为 2 部分, 一部分是 N 端催化结构域(catalytic domains, CDs), 另一部分是 C 端结合结构域(cell walls binding domains, CBDs), 两者之间通过一段小肽连接在一起^[18], 如图 1 所示。N 端催化结构域具有特异性作用于

细胞壁肽聚糖中的化学键的功能, 通过对各种裂解酶的序列对比, 催化结构域是高度保守的; C 端结合结构域具有结合细胞壁肽聚糖上相应配体的功能^[19], 通过对各种裂解酶的序列对比, 结合结构域并不保守。革兰氏阴性菌的噬菌体裂解酶大多数只有催化结构域, 缺失了结合结构域^[20], 是一种单域结构。通过对噬菌体裂解酶的结构解析可以发现, 它在抗菌抑菌方面具有良好的结构基础, 有希望成为替代抗生素的新型抗菌制剂, 拥有广阔的发展前景。

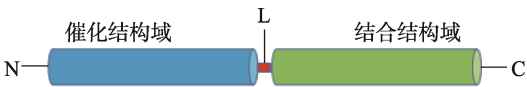


图 1 噬菌体裂解酶结构简图
Fig.1 Structure diagram of phage lyase

噬菌体裂解酶可以按照作用于细胞壁肽聚糖的不同位置分为 6 类^[21]: (1) *N*-乙酰胞壁酸酶, 作用于肽聚糖链上的 GlcNAc 和与其相邻 MurNAc; (2) *N*-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶, 作用于肽聚糖链上 MurNAc 和 GlcNAc 之间糖苷键; (3) *N*-乙酰胞壁酰基-*L*-丙氨酸酰胺酶, 作用于肽聚糖链中 *N*-乙酰胞壁酰基和 *L*-丙氨酸之间的酰胺键; (4) 肽链内切酶, 作用于 2 个氨基酸之间的肽键; (5) 肽酶, 作用于肽聚糖链上的茎肽和肽间桥氨基酸之间的化学键; (6) 转糖苷酶, 作用于肽聚糖链上 MurNAc 和 GlcNAc 之间糖苷键, 如图 2 所示。

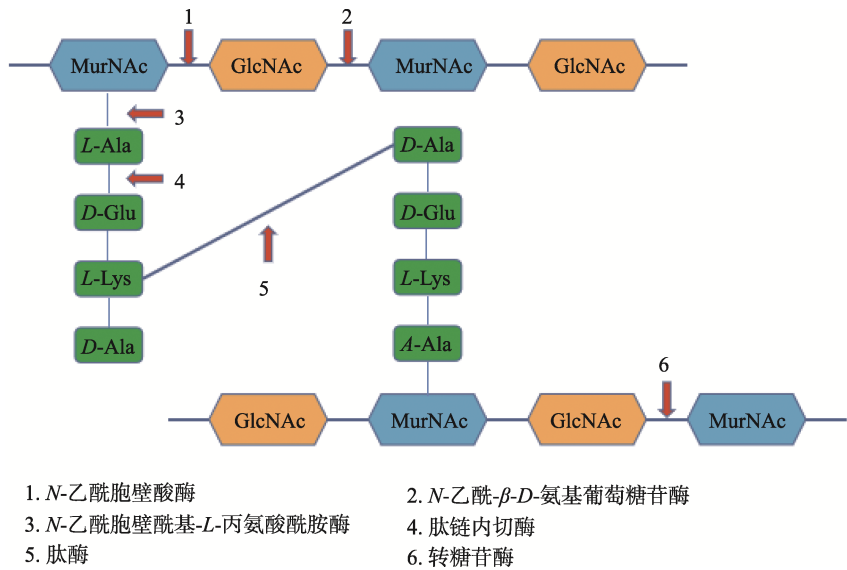


图 2 噬菌体裂解酶对细菌细胞壁结构的作用位点
Fig.2 Sites of action of phage lyase on bacterial cell wall structure

3 噬菌体裂解酶在食品安全中的应用

常见的食源性致病菌有单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、埃希氏菌属大肠杆菌、副溶血性弧菌和沙门氏菌^[22]。噬菌体凭借其特异性和高效性成为了替代化学防腐剂和抗生素的理想产品,在食品的运输、保存、加工过程中展现出巨大潜力。近些年针对噬菌体及其产物展开的研究不断深入,基于噬菌体生物学特性和遗传机制探索噬菌体在食品安全方面的作用以及对食源性致病菌的防治效果十分必要。噬菌体裂解酶应用至今并未发现宿主细菌产生耐药性,可以作用于细菌肽聚糖内高度保守的键,与其他抗微生物剂相比具有明显优势。迄今为止,已经鉴定、表征和测试了许多噬菌体裂解酶对多种致病菌的功效,发现它们在食品工业中对抗食源性病原体具有良好的效果和广阔的用途。革兰氏阳性菌噬菌体裂解酶可以作用于肽聚糖,从外部裂解细菌的细胞壁,而革兰氏阴性菌在肽聚糖层外部有外膜包裹,革兰氏阴性菌噬菌体裂解酶无法从外部穿过外膜作用于肽聚糖层,需要借助穿孔素协助才能完成裂解,这也解释了为什么大部分革兰氏阴性菌噬菌体裂解酶是具小的球状蛋白。在食源性致病菌防治的研究中发现,噬菌体裂解酶表现出高效的抑菌活性以及在食品中的安全性。

3.1 噬菌体针对革兰氏阳性菌的研究进展

3.1.1 单核细胞增生李斯特菌

单核细胞增生李斯特氏菌是常见的食源性致病菌之一,它广泛存在于自然界中,人们主要通过食用牛奶、生肉制品、蔬菜等而被感染,感染后会导致败血症、脑膜炎等疾病。30%以上的肉制品被单核细胞增生李斯特菌污染(下文简称“单增李斯特菌”),而且该菌在 4 °C 的环境中仍可生长繁殖,是冷藏食品中威胁人类健康的主要病原菌之一。STONE 等^[23]报道了单增李斯特菌噬菌体 vB_LmoH_P61 在人工污染食品中具有杀灭单增李斯特菌的效果,用噬菌体 P61 处理贮存的人工污染牛奶,在产品保质期内单增李斯特菌数量显著减少,同样,污染的菠菜在经过噬菌体 P61 处理后单增李斯特菌数量也显著减少,验证了噬菌体 vB_LmoH_P61 对单增李斯特菌具有较好的抑制效果,为食品中单增李斯特菌的防治提供了一种安全、环保的途径。SIMMONS 等^[24]扩增单增李斯特菌株 4b 的 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶基因的核苷酸序列,诱导表达并纯化得到 PlyLM 与蛋白酶 K 协同作用下可清除单增李斯特菌形成的单分子层。伴随着有关噬菌体裂解酶的研究越来越多,其在食品安全领域的重要作用愈发凸显,研究者通过蛋白质工程和基因工程等手段改造出的人工重组噬菌体裂解酶克服了天然噬菌体裂解酶的局限性^[25],得到了适用于食品生产和加工等复杂环境的定向改造产物。同时,噬菌体能够和其他抗菌剂产生协同作用,具有十分广阔的发

展前景。

3.1.2 金黄色葡萄球菌

金黄色葡萄球菌是严重危害人类身体健康的食源性致病菌之一,一般会通过加工、运输等途径造成食品污染,在贮藏过程中很容易受到二次污染,感染金黄色葡萄球菌会导致机体免疫功能下降,引起败血症、中毒性休克综合征等疾病^[26]。1968 年,波士顿报告了首例人感染耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的病例^[27],在随后的几十年中该病患者不断增加。随着抗生素治疗成为普遍的治疗手段,出现了对标准疗法的抗生素产生了耐药性的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和耐万古霉素金黄色葡萄球菌。据临床数据统计,耐甲氧西林金黄色葡萄球菌成为引起肺炎和败血症的主要菌株^[28],感染后死亡率高达 30%~40%。MANOHARADAS 等^[29]通过 2 种不同的金黄色葡萄球菌噬菌体裂解酶 PhiNM3 和 Twot 中重组了一种嵌合噬菌体裂解酶 ClyS。在小鼠败血症模型中,在使用 ClyS 治疗 1 h 的情况下,耐甲氧西林金黄色葡萄球菌细胞的生存能力降低了 2 倍,同时实验证明,纯化后的 ClyS 在体外也能够高效裂解耐甲氧西林金黄色葡萄球菌。RAZ 等^[30]利用主要的葡萄球菌噬菌体裂解酶 CLYs 和 PlySs2 的结合结构域与人 IgG1 的 Fc 区融合而产生的 3 种不同的金黄色葡萄球菌特异性裂解酶,对细菌表面的碳水化合物决定簇具有高亲和力和特异性,3 个不同的结合域对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌具有特异性,细胞结合裂解酶诱导补体在细菌表面的固定,促进巨噬细胞和中性粒细胞的吞噬,并保护小鼠免受耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染。迄今为止,分离的裂解酶具有热稳定性,并且相对容易以纯化状态大量生产,可以通过蛋白质工程、结构域交换和基因改组等手段获得更符合要求的裂解酶来对抗环境中的细菌病原体^[31]。

3.1.3 无乳链球菌

无乳链球菌(*Streptococcus agalactia*)在乳制品行业中十分常见,是健康成人胃肠道菌群中最常见的致病菌之一^[32],通过对其致病性和流行病学研究发现,无乳链球菌是一种能够在新生儿、婴幼儿和非妊娠成人^[33]中引起皮肤和软组织感染^[34],严重感染还会导致败血症、脑膜炎和心内膜炎^[35]。随着抗生素的过量使用,对青霉素、头孢曲松^[36]、红霉素和克林霉素^[37]敏感性降低甚至完全耐药的无乳链球菌分离株已经出现,开发功能机制不同的抗生素替代疗法迫在眉睫。HUANG 等^[38]创造一种新型抗无乳链球菌活性的制剂,通过融合 PlyGBS 噬菌体裂解酶的活性结构域(GBS180)和来自 PlyV12 噬菌体裂解酶的细胞壁结合结构域(V12CBD)构建了嵌合噬菌体裂解酶 ClyV。在无乳链球菌感染模型中,单次腹腔注射 0.1 mg ClyV 可以将死亡率降低为零,0.8 mg CyV 的高剂量对小鼠的健康没有任何不利影响。CyV 通过结构域改组具有强大的杀菌活性和良好的安全性。SHAN 等^[39]对噬菌体 K 的裂解酶 CHAPk 进行

异源表达, 并分析了其对无乳链球菌的抗菌和抗生物膜作用。在大肠杆菌 BL21(DE3) 中表达的 CHAPk 纯度高达 95%, 能够在 25 min 内使牛奶中无乳链球菌下降 3.3 $\mu\text{g/mL}$, 同时, CHAPk 能够有效抑制早期生物膜。结果论证了 CHAPk 对无乳链球菌生物膜的抑制作用和杀菌作用。这些研究对开发一种替代抗生素治疗无乳链球菌感染的新型抗菌剂提供思路, 有希望成为治疗无乳链球菌感染的潜在候选药物。

3.2 噬菌体裂解酶针对革兰氏阴性菌的研究进展

在革兰氏阳性细菌中, 噬菌体裂解酶在细菌细胞壁中的分子靶标是肽聚糖, 通过降解细胞壁肽聚糖使细菌低渗裂解; 而在革兰氏阴性细菌中, 裂解酶的活性受到细菌间细胞结构差异的限制, 细胞外膜阻止大多数裂解酶到达肽聚糖层, 从而阻止它们的活性^[40]。革兰氏阴性细菌噬菌体裂解酶通常不含细胞壁结合结构域, 而是由一个单独的催化结构域组成, 该结构域带有用于结合的带末端电荷的残基^[41]。裂解酶的独立活性和模块化性质允许与其他裂解酶或抗微生物成分进行有效的催化或结合结构域交换, 对于增强杀菌特性的噬菌体裂解酶的开发提供了可能^[42]。

越来越多的研究人员对作用于革兰氏阴性细菌的裂解酶产生兴趣, 并采用了不同的方法来增加膜对裂解酶的渗透性, 例如同时加入膜去稳定剂多粘菌素 B 和乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA), 或修饰裂解酶本身。WANG 等^[43]通过对其全基因组测序从极端嗜温菌噬菌体 TSP4 中鉴定出来一种新的噬菌体裂解酶 TSPphg, 对 9 种不同的肺炎克雷伯菌耐药菌株进行处理, 其中, 50 $\mu\text{g/mL}$ TSP 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下处理 1 h 后观察到细菌被完全清除。PlyE146 作为一种靶向革兰氏阴性菌的新型噬菌体裂解酶, 显示出相当大的杀菌活性。XU 等^[44]鉴定出一种在不添加膜破坏剂的情况下控制革兰氏阴性病原污染的噬菌体裂解酶 PlyEc2, 并在大肠杆菌表达系统中生产出 27 mg/100 mL 的可溶性 PlyEc2。大肠杆菌表达的裂解酶 PlyEc2 具有良好的广谱活性, 可以高效杀灭 8 种不同的抗生素抗性大肠杆菌分离株、沙门氏菌、志贺氏菌、不动杆菌和假单胞菌, 但是对肺炎克雷伯菌具有较弱的作用。重要的是, PlyEc2 被证明是一种强有力的农产品净化剂, 能够清除 99.7% 的污染 STEC O157:H7, 根除污染洗涤液的 99.8% 的细菌, 大大降低了洗涤过程中交叉污染的风险。GUO 等^[45]分离并鉴定出一种新型噬菌体并将其命名为 LPSTLL, 分别通过建立固体和液体模型来测定 LPSTLL 的杀菌能力。首先人工将沙门氏菌接种于食物样品, 然后对其进行噬菌体处理, 在液体模型牛奶中的结果显示, 12 h 后沙门氏菌活菌数在 4 $^{\circ}\text{C}$ 时减少 0.87 $\log\text{CFU/mL}$, 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 时减少 2.61 $\log\text{CFU/mL}$; 在固体模型生鸡肉中的结果显示, 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 中培养 12 h, LPSTLL 沙门氏菌的活菌数下降 0.98 $\log\text{CFU/mL}$, 效果显著。在杀菌能力显著的基础上, 对被测食品进行了视觉和触觉评估,

在外观、颜色和质地等方面均没有发现对照组和治疗组有显著差异, 表明用噬菌体 LPSTLL 处理不会改变食物基质的视觉或触觉质量。GUENTHER 等^[46]评估了噬菌体 FO1-E2 在不同食品中减少鼠伤寒沙门氏菌的效果, 将噬菌体 FO1-E2 处理带有沙门氏菌的火鸡熟肉和巧克力牛奶时, 可使菌落形成单位降低 5 个数量级, 处理热狗和海鲜时降低 3 个数量级, 显示出该噬菌体在食品工业中具有控制沙门氏菌的潜力。

WANG 等^[47]基于预测的 lysep 3-D8 的三级结构的蛋白质融合的最佳方式, 与解淀粉芽孢杆菌噬菌体裂解酶的 N 末端区域融合, 获得能够从外部裂解细菌的工程化噬菌体裂解酶 lysep 3-D8。通过改造革兰氏阴性菌噬菌体裂解酶的细胞壁结合域, 可以有效摆脱裂解酶不能从外部水解革兰氏阴性菌肽聚糖的困境。结果表明, lysep 3-D8 的杀菌谱很广, 可以杀灭 14 种大肠杆菌菌株、3 种铜绿假单胞菌菌株、1 种鲍曼不动杆菌菌株和 1 种链球菌菌株, lysep 3-D8 在 60 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度下, 可抑制细菌生长达 12 h。LARPIN 等^[48]使用基于噬菌体基因组的筛选方法, 鉴定并表征了一种由大肠杆菌前噬菌体编码新的噬菌体裂解酶 PlyE146, PlyE146 由一个 C 端阳离子肽和一个 N 端 N-乙酰溶菌酶结构域组成。在不含氯化钠和 pH 6.0 的条件下, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下以 400 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度作用 2 h 后, PlyE146 对大肠杆菌 K12 表现出最佳的体外杀菌活性。同时, PlyE146 对其他几种大肠杆菌、铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌显示出抗菌活性。工程化噬菌体裂解酶的细胞壁结合结构域可以破坏细菌外膜的完整性, 从而允许催化结构域到达其靶肽聚糖, 以溶解细菌, 为我们如何对抗革兰氏阴性菌提供了又一思路。

4 展 望

+噬菌体和噬菌体裂解酶凭借自身优势成为了新型食品安全制剂, 这些技术需要进一步开发, 以充分发挥其潜力, 成功融入食品体系^[49]。目前, 噬菌体成为科研人员们研究的热点, 对噬菌体及其裂解蛋白在治疗由多药耐药细菌引起的感染中应用的研究表明, 噬菌体疗法可以是抗生素治疗的有效替代物^[50]。噬菌体裂解酶区别于抗生素的一个关键特征是它们的宿主范围窄, 可以靶向致病的抗生素抗性细菌以及对抗生素敏感的细菌, 同时保留健康的宿主微生物群并防止生物失调^[51]。裂解酶的特异性、安全性和高效性使其在控制耐药方面具有巨大的发展潜力, 但是具有研发成本较高、抗菌谱较窄等局限性^[52]。裂解酶可以通过基因工程, 设计改造和修饰来克服其局限性, 与天然噬菌体裂解酶相比, 人工改造的裂解酶显示出更好的抗微生物能力。目前报道的抗革兰氏阳性菌的噬菌体裂解酶的数量远远超过抗革兰氏阴性菌的裂解酶的数量^[53], 这与革兰氏阴性菌的结构有着密不可分的关系。噬菌体裂解酶可以

通过与抗生素、柠檬酸和 EDTA 等联合作用来提高其裂解活性和靶向特异性,更重要的是拓宽了其裂菌谱,这些研究的逐步深入使裂解酶抗菌剂应用于食源性致病微生物防控成为可能。随着蛋白质工程技术的不断进步,可以改造裂解酶的结构,使其能够适应各种不同的物理化学环境,从而能够适应食品生产的不同工艺要求,同时在食品工业中,噬菌体裂解酶可以联合食品添加剂、抗菌肽等来提高杀菌效果;还可与巴氏消毒法等不同的杀菌工艺结合使用,为食品生产和保存环节安全提供保障。

参考文献

- [1] KIRK MD, PIRES SM, BLACK RE, *et al.* World health organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: A data synthesis [J]. *Plos Med*, 2015, 12(12): e1001921.
- [2] WU W, YU CY, WANG Q, *et al.* Research advances of DNA aptasensors for foodborne pathogen detection [J]. *Crit Rev Food Sci*, 2020, 60(14): 2353–23688.
- [3] XU YM. Phage and phage lysins: New era of bio-preservatives and food safety agents [J]. *J Food Sci*, 2021, 86(3): 3349–3373.
- [4] SEVENICH R, MATHY A. Continuous versus discontinuous ultra-high-pressure systems for food sterilization with focus on ultra-high-pressure homogenization and high-pressure thermal sterilization: A review [J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2018, 17(3): 646–662.
- [5] DELORME MM, GUIMARES JT, COUTINHO NM, *et al.* Ultraviolet radiation: An interesting technology to preserve quality and safety of milk and dairy foods [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2020, 102: 146–154.
- [6] BOURKE P, ZIUZINA D, BOEHM D, *et al.* The potential of cold plasma for safe and sustainable food production [J]. *Trends Biotechnol*, 2018, 36(6): 615–626.
- [7] BLASER M. Stop the killing of beneficial bacteria [J]. *Nature*, 2011, 476(7361): 393–394.
- [8] JADAV R, GOVEAS JJ, CHANDRA GS, *et al.* Resisting bacterial resistance [J]. *Curr Sci India*, 2020, 118(2): 177–178.
- [9] ALEJANDRO RG, MASSIMILIANO Z, ERNESTINA MR. Public health and epidemiology informatics: Can artificial intelligence help future global challenges? An overview of antimicrobial resistance and impact of climate change in disease epidemiology [J]. *Yearbook Med Inf*, 2019, 28(1): 224–231.
- [10] CASSINI A, HOGBERG LD, PLACHOURAS D, *et al.* Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: A population-level modelling analysis [J]. *Lancet Infect Dis*, 2019, 19(1): 56–66.
- [11] BALCAZAR JL. Implications of bacteriophages on the acquisition and spread of antibiotic resistance in the environment [J]. *Int Microbiol*, 2020, 23(4): 475–479.
- [12] DHERELLE F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques [J]. *Acad Sci*, 1917, 165: 373–375.
- [13] KEEN EC. Phage therapy: Concept to cure [J]. *Front Microbiol*, 2012, 3: 238.
- [14] GREBER UF. Editorial: Physical virology and the nature of virus infections [J]. *Phys Virol*, 2019, 1215: 1–11.
- [15] KAWATO Y, ISTIQOMAH I, GAARFAR AY, *et al.* A novel jumbo tenacibaculum maritimum lytic phage with head-fiber-like appendages [J]. *Arch Virol*, 2020, 165(2): 303–311.
- [16] GILCREASE E, WILLIAMS R, GOEL R. Evaluating the effect of silver nanoparticles on bacteriophage lytic infection cycle—a mechanistic understanding [J]. *Water Res*, 2020, 181: 115900.
- [17] GARCIA R, LATZ S, ROMERO J, *et al.* Bacteriophage production models: An overview [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 1187.
- [18] GUO XH, SODERHOLM A, KANCHUGAL PS, *et al.* Structure and mechanism of a phage-encoded SAM lyase revises catalytic function of enzyme family [J]. *Elife*, 2020, 10: e61818.
- [19] HONG S, SON B, RYU S, *et al.* Crystal structure of lysB4, an endolysin from *Bacillus cereus*-targeting bacteriophage B4 [J]. *Mol Cell*, 2019, 42(1): 79–86.
- [20] STRATTON H, KHANNA R. Just in time! Identification of a novel mechanism for treating PIPN [J]. *J Phys Lon*, 2020, 598(12): 2283–2284.
- [21] GUTIERREZ D, FERNANDEZ L, RODRIGUEZ A, *et al.* Are phage lytic proteins the secret weapon to kill *Staphylococcus aureus*? [J]. *Mbio*, 2018, 9(1): e01923–17.
- [22] GARCIA-ANAYA MC, SEPULVEDA DR, SAENZ-MENDOZA AI, *et al.* Phages as biocontrol agents in dairy products [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2020, 95(5): 10–20.
- [23] STONE E, LHOMEY A, NEVE H, *et al.* Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* phage vB_LmoH_P61, a phage with biocontrol potential on different food matrices [J]. *Front Sustain Food Syst*, 2020, 4: 521645.
- [24] SIMMONS M, MORALES CA, OAKLEY BB, *et al.* Recombinant expression of a putative amidase cloned from the genome of *Listeria monocytogenes* that lyses the bacterium and its monolayer in conjunction with a protease [J]. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2012, 4(1): 1–10.
- [25] SRINIVASAN R, CHAITANYAKUMAR A, SUBRAMANIAN P, *et al.* Recombinant engineered phage-derived enzymatic in *Pichia pastoris* X-33 as whole cell biocatalyst for effective biocontrol of *Vibrio parahaemolyticus* in aquaculture [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 154: 1576–1585.
- [26] MARSHALL C, MCBRYDE E. The role of *Staphylococcus aureus* carriage in the pathogenesis of bloodstream infection [J]. *BMC Res Notes*, 2014, 7(1): 428.
- [27] BARRETT FF, MCFEHEE RFJ, FINLAND M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at Boston city hospital: Bacteriologic and epidemiologic observations [J]. *New Engl J Med*, 1968, 279(9): 441–8.
- [28] ITO T, IJIMA M, FUKUSHIMA T, *et al.* Pediatric pneumonia death caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Japan [J]. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14(8): 1312–1314.
- [29] MANOHARADAS S, WITTE A, BLASI U. Antimicrobial activity of a chimeric enzymatic towards *Staphylococcus aureus* [J]. *J Biotechnol*, 2009, 139(1): 118–123.
- [30] RAZ A, SERRANO A, LAWSON C, *et al.* Lysibodies are IgG Fc fusions with lysin binding domains targeting *Staphylococcus aureus* wall carbohydrates for effective phagocytosis [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2017, 114(18): 4781–4786.

- [31] WANG F, LIU XH, DENG ZY, *et al.* Design, overproduction and purification of the chimeric phage lysin MLTphg fighting against *Staphylococcus aureus* [J]. *Processes*, 2020, 8(12): 1587.
- [32] TAN LKK, ECCERSLEY LRJ, SRISKANDAN S. Current views of haemolytic streptococcal pathogenesis [J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2014, 27(2): 155–164.
- [33] GUAN XS, MU XP, JI WJ, *et al.* Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in infants from urban area of south China, 2011–2014 [J]. *Biomed Cent*, 2018, 18(1): 14.
- [34] KALIMUDDIN S, CHEN SL, LIM CTK, *et al.* 2015 Epidemic of severe *Streptococcus agalactiae* sequence type 283 infections in Singapore associated with the consumption of raw freshwater fish: A detailed analysis of clinical, epidemiological, and bacterial sequencing data [J]. *Clin Infect Dis*, 2017, 64: s145–s152.
- [35] LIEN CY, LEE JJ, TSAI WC, *et al.* The clinical characteristics of spontaneous gram-negative bacterial meningitis in adults: A hospital-based study [J]. *J Clin Neurosci*, 2019, 64: 101–105.
- [36] KATHIRVEL S, MANI M, KRISHNAN GKG, *et al.* Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* isolates from urinary tract infection and interaction between *Enterococcus faecalis* encountered dendritic and natural killer cells [J]. *Microbiol Pathogen*, 2020, 140(5): 103944.
- [37] RUPPE E, CHERKAoui A, CHARRETIER Y, *et al.* From genotype to antibiotic susceptibility phenotype in the order enterobacterales: A clinical perspective [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2020, 26(5).
- [38] HUANG L, LUO DH, GONDIL VS, *et al.* Construction and characterization of a chimeric lysin ClyV with improved bactericidal activity against *Streptococcus agalactiae* *in vitro* and *in vivo* [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2020, 104(14): 1609–1619.
- [39] SHAN YX, YANG N, TENG D, *et al.* Recombinant of the staphylococcal bacteriophage lysin CHAPk and its elimination against *Streptococcus agalactiae* biofilms [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(2): 216.
- [40] GHOSE C, EULER CW. Gram-negative bacterial lysins [J]. *Antibiotics-Basel*, 2020, 9(2): 74.
- [41] LOOD R, WINER BY, PELZEK AJ, *et al.* Novel phage lysin capable of killing the multidrug-resistant gram-negative bacterium *Acinetobacter baumannii* in a mouse bacteremia model [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(4): 1983–1991.
- [42] KIM S, LEE DW, JIN JS, *et al.* Antimicrobial activity of LysSS, a novel phage endolysin, against *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *J Glob Antimicrob Resist*, 2020, 22(5): 32–39.
- [43] WANG F, JI XY, LI QP, *et al.* TSPphg lysin from the extremophilic thermus bacteriophage TSP4 as a potential antimicrobial agent against both gram-negative and gram-positive pathogenic bacteria [J]. *Viruses-Basel*, 2020, 12(2): 192.
- [44] XU SY, CAMPISI E, LI JQ, *et al.* Decontamination of *Escherichia coli* O157: H7 on fresh romaine lettuce using a novel bacteriophage lysin [J]. *Int J Food Microbiol*, 2021, 341: 109068.
- [45] GUO YT, LI J, ISLAM MS, *et al.* Application of a novel phage VB_SaLS-LPSTLL for the biological control of *Salmonella* in foods [J]. *Food Res Int*, 2021, 147(4): 110492.
- [46] GUENTHER S, HERZIG O, FIESELER L, *et al.* Biocontrol of *Salmonella typhimurium* in RTE foods with the virulent bacteriophage FO1-E2 [J]. *Int J Food Microbiol*, 2012, 154(1-2): 66–72.
- [47] WANG S, GU JM, LV M, *et al.* The antibacterial activity of *E. coli* bacteriophage lysin lysep3 is enhanced by fusing the *Bacillus amyloliquefaciens* bacteriophage endolysin binding domain D8 to the C-terminal region [J]. *J Microbiol*, 2017, 55(5): 403–408.
- [48] LARPIN Y, OECHSLIN F, MOREILLON P, *et al.* In vitro characterization of PlyE146, a novel phage lysin that targets gram-negative bacteria [J]. *PLoS One*, 2018, 13(2): e0192507.
- [49] YAMAKI S, YAMAZAKI K. Development of a novel food antimicrobial technology: Application of bacteriophages [J]. *J Jpn Soc Food Sci*, 2020, 67(10): 352–359.
- [50] SIEIRO C, AREALHERMIDA L, PICHAEDO-GALLARDO A, *et al.* A hundred years of bacteriophages: Can phages replace antibiotics in agriculture and aquaculture? [J]. *Antibiotics-Basel*, 2020, 9(8): 493.
- [51] REHMAN S, ALI Z, KHAN M, *et al.* The dawn of phage therapy [J]. *Rev Med Virol*, 2019, 29(4): e2041.
- [52] HESELPOTH RD, EULER CW, SCHUCH R, *et al.* Lysocins: Bioengineered antimicrobials that deliver lysins across the outer membrane of gram-negative bacteria [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019, 63(6): e00342–19.
- [53] MACIEJEWSKA B, OLSZAK T, DRULIS-KAWA Z. Applications of bacteriophages versus phage enzymes to combat and cure bacterial infections: An ambitious and also a realistic application? [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2018, 102(6): 2563–2581.

(责任编辑: 李磅礴 于梦娇)

作者简介



孙新城, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: biosxc@126.com



白艳红, 教授, 主要研究方向为肉品加工及食品安全检测。
E-mail: baiyanhong212@163.com



张晓根, 教授, 主要研究方向为动物微生物学。
E-mail: mzzxg2009@126.com