

乳酸菌抗菌机理研究进展

李铁军¹ 李爱云² 张晓峰^{3*}

(浙江国邦兽药厂 新昌 312500)¹ (浙江大学医学院附属妇产科医院 杭州 310006)²

(浙江出入境检验检疫局 杭州 310012)³

摘要: 乳酸菌的抗菌机理涉及其产生的各种代谢产物, 包括酸性物质、乳酸菌素、二氧化碳和过氧化氢等。其中酸性物质可以消耗大量细胞能量并影响细胞膜的稳定性; 乳酸菌素可作用于细胞膜, 造成膜内物质和能量的泄漏。对于它们抗菌机理的认识有助于我们更好的将乳酸菌应用到食品的安全生产中。

关键词: 乳酸菌, 抗菌, 酸性物质, 乳酸菌素

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 05-0081-05

乳酸菌是一类可发酵碳水化合物产生大量乳酸的细菌的通称, 在自然界和食物中广泛存在。乳酸菌是最早被人类用于食品储藏加工的微生物之一, 早在公元前 6, 000 年, 人们就懂得利用乳酸菌发酵食物。他们发现食物经过一定的处理和储存就可改善风味、延长储存期和增加食物的安全性。迄今人们已明确了许多乳酸菌在生产安全优质食品中所起重要作用的生物学机理^[1-2]: 乳酸菌可以发酵食物中碳水化合物, 分泌乳

* 联系人 Tel: 0571-88381111-61702

收稿日期: 2001-10-09, 修回日期: 2001-12-30

酸菌素,产生有机酸、酒精和二氧化碳等,来抑制一些腐败菌或致病菌的生长及改善食品的品质和风味;同时经过发酵,乳酸菌可以增加食品的可消化性并产生一些维生素、抗氧化剂。近几年,乳酸菌抑制食品中一些腐败菌和致病菌的作用引起人们的极大关注。虽然现代生物技术和安全体系(如 HACCP)已被普遍的引入食品加工行业,但食品的安全问题仍然威胁着人类,每年都有许多关于食物中毒和食源性疾病散发或爆发的报道;同时,人们正力图追求不含化学防腐剂及各种添加剂的天然的安全食品。解决这问题需要发展新的食品保鲜技术来控制食品中腐败菌和致病菌的生长。国内外学者对之开展了大量的研究并建立了许多方法,其中最引人注目的就是利用乳酸菌来加强食品安全性和延长储存期。本文就乳酸菌对食物中腐败菌和致病菌拮抗作用的机理作一综述。

1 乳酸菌产生的酸性物质及其抑菌作用

1.1 乳酸菌产生的酸性物质 乳酸菌可产生对食品中微生物具有抑制作用的酸性物质,主要是乳酸菌的代谢终产物及中间产物,包括乳酸、乙酸、乙醇等。

1.2 酸性物质对食品微生物的抑制作用 一般细菌生长的最适 pH 值为 6~7,若低于该值,细菌的生长速率将大大降低或不生长甚至死亡,这在腐败性微生物上尤为可见。乳酸菌产生的酸性物质对食品中微生物的抑制作用已在许多实验中得到证实,这种抑菌作用取决于 3 个相互影响的因素:1. 介质的 pH 值;2. 酸的离解程度;3. 酸的种类。

从 20 世纪 70~80 年代,国内外学者就开始建立 pH 值对食品中各种腐败菌和致病菌抑制作用的预测模型。但在这些模型中都是用无机酸如盐酸、磷酸来降低 pH 值,而乳酸菌产生的多是一些含羧基的弱有机酸。只有未离解的弱有机酸进入细菌细胞才能有效的发挥抑菌作用。这些有机酸的离解度取决于其 pK_a 和 pH 值,可以用 Henderson-Hasselbach 公式计算: $pH = pK_a + \log([A^-]/[HA])$ 。从中不难看出介质的 pH 值影响酸的离解,若在 pH 值固定条件下酸的 pK_a 决定了其离解度。因此乳酸菌产生的弱酸的抗菌能力取决于介质的 pH 值及酸的种类(pK_a)。由于胞质的 pH 值相对较高,当非离解的酸通过细胞膜进入胞质,就发生离解使细胞质酸化并释放酸性阴离子。这就给微生物带来两种后果:首先,若微生物要维持其胞内的 pH 值,就得动用 ATP 酶来清除质子,这将消耗大量细胞能量,加重细胞的代谢负担;其次,细胞内阴性酸离子的积累可影响细胞膜的稳定性并抑制其传递功能。但 Cherrington 等^[3]认为离解的酸亦可影响细胞膜的稳定性和传递功能。

除了 pH 值、 pK_a 的影响外,不同酸的混合使用可加强对微生物的抑制作用,如乙酸($pK_a = 4.76$)和乳酸($pK_a = 3.86$)混合使用的抑菌能力大于等量乙酸或乳酸的单独使用^[4]。这是由于两者混合后,乳酸除了其本身的抗菌作用外还降低了介质的 pH 值,这就减少了乙酸离解,使得更多非离解状态的乙酸进入细菌细胞发挥抑菌作用。这也解释了虽然异型发酵的乳酸菌产生酸的总量比同型发酵的乳酸菌少,但前者对细菌的抑制作用却大于后者的原因。

为了有效抑制食品中腐败菌和致病菌的生长,必须需要有一定数量的乳酸菌来产生足够量的酸性物质。只有当食品中的乳酸菌达到一定数量, pH 下降至一定程度,方可有效的抑制一些致病菌的生长。但 Yusof^[5]把乳酸菌(乳酸乳球菌)产生的酸性物质

与大肠杆菌一起接种到一类婴幼儿食品中培养发现,虽然介质的 pH 明显下降,但大肠杆菌仍可生长并达到 10^2 CFU。这说明仅靠乳酸菌产生酸性物质的抑菌作用是有限的。

2 乳酸菌素的抑菌作用

乳酸菌素是在乳酸菌代谢过程中合成并分泌到环境中的一类对革兰氏阳性菌(尤其是亲缘性较近的细菌)具有抑制作用的杀菌蛋白或多肽,大多对热稳定。近几年,乳酸菌对其他细菌拮抗作用的机理被研究最多的是乳酸菌素,这是由于乳酸菌产生的乳酸菌素被认为是一种“天然”的食品添加剂而容易为人们接受。国外关于乳酸菌素的报道很多,早在 1926 年 Rosers 发现一些乳链球菌产生的代谢产物(后被命名为 Nisin 乳链菌肽)可抑制其他乳酸菌的生长,1951 年 Hirsh 提出将 Nisin 用于食品保藏,1961 年 FHO/WHO 批准将 Nisin 作为食品添加剂。至此,国外学者对乳酸菌素展开了较为深入的研究,已被鉴定的乳酸菌素数以百计。并且有许多新的乳酸菌素正不断的被发现。Klaenhammer 曾把乳酸菌素分为窄抗菌谱和广抗菌谱两类,在此基础上 Nes 等将乳酸菌素分为 4 类^[1]:羊毛硫抗生素(I)、肽类乳酸菌素(II)、蛋白类乳酸菌素(III)、复合型乳酸菌素(IV)。乳酸菌素,主要是 I 和 II 类,可有效的抑制革兰氏阳性菌,如一些腐败菌、致病菌和芽孢菌,而对革兰氏阴性菌不起作用的。但食品经 UHP 和 PEF 处理或添加 EDTA 或柠檬酸盐可以使乳酸菌素有效的抑制革兰氏阴性菌,这说明乳酸菌素作用的靶目标是细胞膜。不同的乳酸菌素由于结构不同,其活性和对细胞膜的作用方式也不同。

2.1 羊毛硫抗生素(I类) 这类细菌素的活性部分含有羊毛硫氨酸(A-L-A)、 β -甲基羊毛硫氨酸(A-B-A)、脱氢丙氨酸(DH_a)和脱氢丁氨酸(DH_b)等稀有氨基酸,其活性形式的形成必须经过翻译后的酶修饰。根据分子结构,这类细菌素可分成线型和环型两类,其典型的代表就是 Nisin。Nisin 是由乳酸乳球菌乳酸亚种(*Lactococcus .lactis subsp. lactis*)分泌的一种线型多肽,对革兰氏阳性菌(包括各种致病菌)有较广的抑制作用,并可使芽孢杆菌和梭状芽孢杆菌的芽孢对热敏感。目前,乳酸菌素中研究最深、应用最广的就是 Nisin,国内外均有许多关于 Nisin 结构与抗菌机理的综述。Nisin 是一种含 34 个氨基酸的小肽,分子量约为 3500D。Nisin 的前体肽在核糖体上合成,由 57 个氨基酸组成,N 端前导序列有 23 个氨基酸。Nisin 前体肽经翻译后修饰加工去掉 N 端前导序列后成为成熟的、有生物活性的 Nisin,其中的 A-L-A、A-B-A、DH_a 和 DH_b 4 个稀有氨基酸通过硫醚键形成五环结构。Nisin 的抑菌作用最初被认为是一种表面活性剂;亦有人认为 Nisin 的作用是由于其中的两个脱水氨基酸(脱水丙氨酸和脱水丁氨酸)与细菌细胞中酶的巯基发生反应;目前认为除了以上两种原因外,还存在 Barrel-stave 机制,即孔道形成机制^[6-7]。

2.2 肽类乳酸菌素(II类) 近 20 年来,世界范围的食物源性李斯特菌病不断发生,而 II 类乳酸菌素尤其是 II a 类可有效的抑制李斯特菌,因此这类细菌素正越来越受到国内外学者的关注。通过对其结构的分析和比较,II 类细菌素又可分为 3 类:II a, N-端具有保守序列 YCNGVXaaC 的多肽;II b,由两条不同蛋白多肽构成的聚合物;II c,具有硫醇活性和信号肽依赖的细菌素。其中 II a 类细菌素对食物源性致病菌李斯特菌具强的抑制作用而被认为是最具前景的食品级生物保鲜剂。

2.2.1 II a 类细菌素的结构:目前已发现的 II a 类细菌素含有 37~48 个氨基酸,其 N

端有着保守序列 YGNGVXaaC, 这区域可能是膜蛋白受体的识别位点。但 Bhugalo^[8] 通过比较后认为 II a 类细菌素 N 端保守序列为: YGNGVXaaCXaa (K/N) XaaXaaCXaaV (N/D) - (W/K/R) Xaa (G/A/S) (A/N) (Xaa 表示可变, 括号内的第一个氨基酸残基可被后面氨基酸残基取代)。也有人认为 II a 类细菌素 N 端的保守序列是 YGNC^[9]。一直以来, 人们都认为 II a 类细菌素的 C 端序列的保守性较差。然而 Ennahar 等^[10] 认为 C 端序列亦有一定的保守性, 据此可将目前已有的 II a 类细菌素进行再分类, 并发现以 C 端序列进行分类的各亚类细菌素 N 端保守序列前的氨基酸残基亦有惊人的相似, 但两者之间是否有必然的联系还不甚清楚。

II a 类细菌素的另一重要特征就是含有两个或两个以上的半胱氨酸。在 N 端的两个半胱氨酸通过二硫键相连接, 二硫键环绕这两个半胱氨酸残基形成一环状结构, 而 PA-1/AcH、enterocin A 和 divercin V41 具有两对半胱氨酸并形成两个二硫键结构。这些二硫键结构对 II a 类细菌素 N 端的发夹结构起稳定作用, 而这发夹结构赋予 II a 类细菌素 N 端两性分子的特性, 这种特性在这类细菌素的活性中起着重要的作用。另外, 在 II a 类细菌素的 C 端有一 α 螺旋的结构, 此结构被认为可能是在细胞膜孔道形成时插入膜的部分。

2.2.2 IIa 类细菌素的抗菌机理: 与 Nisin 不同, II a 类细菌素的抗菌机理在近几年才渐为人知, 主要是由于细菌素吸附在细胞膜并在上形成孔道, 使得细胞膜的通透性增加从而引起细胞内各种离子的渗漏和能量物质的消耗, 导致细胞解体死亡。

II a 类细菌素 N 端的发夹结构 (YGNGV) 可为细胞膜上的蛋白受体特异识别, 随后, 发夹结构后带正电荷的 β 折叠与膜上带负电荷的磷脂以静电引力使这类细菌素结合到靶细胞膜上。当 II a 类细菌素结合到敏感细胞膜上后, 其疏水性的 C 端可与膜上的脂质酰基发生反应, 并插入膜内聚集形成充水的膜孔道。Fimland 等人^[11] 认为, 这种反应是发生在 II a 类细菌素 C 端一特异性的区域 (可能是 N 端的 α 螺旋结构) 和某种膜成分之间, 并具有一定的方向性, 但具体还不明确。

细胞膜上孔道的形成引起了膜内外离子失衡和磷酸盐的渗漏。膜内外离子的失衡直接造成 PMF (质子驱动力 proton motive force) 的耗散, 而 PMF 可影响跨膜电位 ($\Delta\psi$) 和 pH 梯度 (ΔpH)。另外, 消耗细胞内 ATP 和氨基酸也是 II a 类细菌素的活性之一。由于其形成的膜孔道要比 I 类细菌素小的多, 因此 II a 类细菌素不能造成 ATP 从膜孔道直接渗漏。因此 ATP 的消耗可能是由于为维持细胞内 PMF, ATP 的消耗量急剧增加或由于磷酸盐的流失造成细胞内 ATP 代谢失衡。Chen 和 Montville^[12] 认为 ATP 消耗的最主要原因在于 PMF 的耗散, 而不是磷酸盐的流失。氨基酸消耗的原因一方面是由于氨基酸的摄取途径被堵塞, 另一方面是由于氨基酸通过膜孔道 (或和 PMF 转移系统) 渗漏。可以说, PMF 的耗散是 II a 类细菌素活性的主要原因。

3 二氧化碳的抑菌作用

异型发酵的乳酸菌可发酵己糖产生 CO_2 以抑制霉菌和一些革兰氏阴性菌, 但对一些酵母菌和乳杆菌则无效。 CO_2 的抑菌作用机制现在还不甚清楚, 但普遍认为通过两种途径而实现的^[2]: 一是 CO_2 吸附在食物成分上, 造成厌氧环境以抑制需氧微生物如一些酵母菌的生长; 另一是环境中 CO_2 浓度的增加可引起细胞内 pH 值和酶活性的下降

以及细胞膜传递功能的减弱。

4 过氧化氢的抑菌作用

乳酸菌具有黄素蛋白氧化酶活性, 在有氧条件下可产生过氧化氢。由于乳酸菌不含过氧化氢酶, 产生的过氧化氢可以在食物环境中不断的积蓄, 而对其他微生物(如假单胞菌和金色葡萄球菌等)产生抑制作用。但是这种过氧化氢的产生和积蓄有赖于食物介质中氧的浓度、食物的形态和温度等, 一般以在较低温度、具有较高氧浓度的液态或半液态的食物环境为佳。

总之, 乳酸菌可以通过其代谢产物, 主要是酸性物质和乳酸菌素, 有效的抑制食物中大部分致病菌和腐败菌的生长。现在, 对乳酸菌抗菌机理的研究主要集中于乳酸菌素, 尤其是 Nisin 和 II a 类细菌素。对这方面的深入研究有助于我们更好的将乳酸菌应用到食品的储藏加工上。但是有一点我们应该明确, 仅靠乳酸菌的作用是不能完全抑制食物中致病菌和腐败菌的生长, 只有将之与各种食品加工技术(如 UHP 和 PEF)相配合才能真正做到食品的安全卫生。

参考文献

- [1] Elizabeth C, Gerald F. *International Journal of Microbiology*, 1999, **50**: 131 ~ 149.
- [2] Martin R, Linda N. *Food Control*, 1997, **8**: 227 ~ 239.
- [3] Cherrington C A, Hinton M, Mead G C, *et al.* *Adv Microbiol Phys*, 1991, **32**: 87 ~ 108.
- [4] Adams M R, Hall C J. *International Journal of Food Science and Technology*, 1988, **23**: 287 ~ 292.
- [5] Yusof R M, Morgan J B, Adams M R. *Journal Food Protection*, 1993, **56**: 414 ~ 417.
- [6] 许 扬, 孙红斌. *中国畜产与食品*, 1998, **5**: 131 ~ 133.
- [7] 胡国平, 叶嗣颖. *中国微生态学杂志*, 2001, **13**: 115 ~ 117.
- [8] Bhugaloo V P, Dousset X, Metivier A, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 4410 ~ 4416.
- [9] Eijisink V G H, Skeie M, Metivier A, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 3275 ~ 3281.
- [10] Ennahar S, Toshihiro S, Kenji S, *et al.* *FEMS Microbiology Review*, 2000, **24**: 85 ~ 105.
- [11] Fimland G, Jack R, Jung G, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 5057 ~ 5060.
- [12] Chen Y, Montville T J. *J Appl Bacteriol*, 1995, **79**: 684 ~ 690.