

抗真菌性乳酸菌生物保护剂的研究进展

白凤翎, 励建荣

(渤海大学化学化工与食品安全学院, 辽宁省食品安全重点实验室, “食品贮藏加工及质量安全控制工程技术研究中心” 辽宁省高校重大科技平台, 辽宁锦州 121013)

摘要: 霉菌和酵母不仅引起果蔬、谷类、乳制品和肉制品等食品及农产品腐败变质, 造成巨大的经济损失, 而且霉菌还产生有害于人体健康的黄曲霉毒素、伏马菌素、单端孢霉烯、赭曲霉素 A 和棒曲霉素等真菌毒素, 给食用者带来潜在的食品安全隐患。随着消费者对鲜活和微加工食品的需求不断增加, 化学防腐剂在食品中应用受到限制, 食品生物保护剂研究及应用已成为热点。乳酸菌通过生态位竞争、形成酸性环境和产生各种代谢产物对致病菌和腐败微生物具有较强的拮抗作用, 作为一新型生物保护剂已广泛应用于各种食品中。本文对食品中抗真菌性乳酸菌的筛选和应用、乳酸菌产生的抗真菌代谢产物以及发展趋势进行综述, 为进一步探究乳酸菌抗菌机理, 研发高效食品生物保护剂提供借鉴与参考。

关键词: 乳酸菌; 抗真菌; 生物保护剂; 研究进展

文章编号: 1673-9078(2014)5-311-319

Advanced Research on Antifungal *Lactic acid bacteria* of Food Bio-protective Agent

BAI Feng-ling, LI Jian-rong

(College of Chemistry, Chemical Engineering and Food Safety, Bohai University. Food Safety Key Lab of Liaoning Province, Engineering and Technology Research Center of Food Preservation, Processing and Safety Control of Liaoning Province, Jinzhou 121013, China)

Abstract: Yeasts and moulds can cause serious spoilage of all kinds of foods and agricultural products, including fruits, vegetables, cereal, dairy products and meat and lead to sizable economic losses. Moulds also produce health-damaging mycotoxins such as aflatoxins, trichothecenes, fumonisins, ochratoxin A and patulins, and possibly bring great hidden danger to food security. Consumer demands for minimally processed foods and reduced use of chemical preservatives have stimulated to research on antifungal bio-protective agents. Lactic acid bacteria (LAB) has been widely applied as bio-protective agents in all kinds of foods, because of their effective antagonistic activity against pathogenic bacteria and spoilage microorganisms in food by ecological niche competition in which forms an acidic environment and produces various antimicrobial end-products. This review summarized the screenings and potential applications of antifungal *Lactic acid bacteria* in the preservation of food, and antifungal metabolites from lactic acid bacteria and their inhibitory mechanisms. Some tendencies were presented and discussed, aiming to supply reference to the further research in this paper.

Key words: *Lactic acid bacteria*; anti-fungi; bio-protective agent; advanced research

乳酸菌一般生长在营养丰富环境中, 乳制品、果蔬、肉制品、谷类等食品是乳酸菌的天然栖息地^[1]。对传统乳酸发酵食品和青贮饲料而言, 乳酸菌既是产品的发酵剂, 又是天然生物保护剂。乳酸菌的生物保护作用主要依靠其菌体和(或)代谢产物抑制腐败微生物和致病菌的生长繁殖。在延长了食品的货架期的

收稿日期: 2013-12-27

基金项目: “十二五” 国家科技支撑计划课题 (No. 2012BAD29B06); 辽宁省高校重大科技平台开放课题 (No. LNSAKF2011011)

作者简介: 白凤翎 (1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品质量与安全控制和食品微生物学

同时, 也提高了产品的安全性。人们对食品领域乳酸菌的发酵作用得到普遍认知, 而对乳酸菌的生物保护作用认识相对欠缺。本文对真菌引起各类食品腐败及传统控制方法, 乳酸菌生物保护剂在抗真菌领域的研究与应用进行综述, 重点阐述乳酸菌抗真菌代谢产物的种类和抗菌机制, 旨在进一步探究乳酸菌抗真菌机制, 为研发无污染、无残留、高效食品生物保护剂提供借鉴与参考。

1 真菌性食品腐败及传统控制方法

丝状真菌和酵母是导致发酵乳制品、谷类食品、

果蔬以及粮食等食品发生腐败的普通微生物类群。据估计,全球 5%~10% 的食品损失是由真菌引起的^[2]。在西欧,每年由霉菌引起的面包腐败导致的经济损失高达 20 亿英镑^[3-4]。据报道青霉和曲霉是引起食品腐败的主要真菌微生物,其中镰刀菌属 (*Fusarium*) 普遍污染谷类食物,并产生大量的霉菌毒素。冷藏食品中青霉可生长繁殖,导致食品腐败。硬质奶酪的腐败是由萎地青霉 (*Penicillium roqueforti*) 和团青霉 (*Penicillium commune*) 引起的^[5]。近平滑假丝酵母 (*Candida parapsilosis*), 胶红酵母 (*Rhodotorula mucilaginosa*), 马克斯克鲁维酵母 (*Kluyveromyces marxianus*) 和汉森德巴利酵母 (*Debaromyces hansenii*) 是酸奶等发酵乳制品腐败的主体微生物^[6]。

传统食品保藏控制真菌性腐败的通用技术包括物理法和化学法,物理法包括干燥、冷冻干燥、低温、气调贮藏、辐射和热处理等保藏方式^[3],化学法应用乙酸、乳酸、丙酸、山梨酸、苯甲酸等有机酸作为化学性食品防腐剂控制真菌的生长。山梨酸和苯甲酸具有广谱的抗菌活性^[7],苯甲酸及其钠盐作为首选的抗真菌制剂。随着微生物对抗生素耐药菌株的不断增多,引起人类疾病的病原性真菌和食品腐败性霉菌对抗生素抗性越来越强。同时,由于化学防腐剂的广泛应用,霉菌和酵母对山梨酸和苯甲酸以及一些化学制剂的抵抗力也在增加^[8-10]。很多青霉、酵母能够在山梨酸钾存在环境中生长,并有一定数量的霉菌可降解山梨酸盐。一些研究已经分离获得对苯甲酸盐有抗性的萎地青霉^[11]。研究还发现一种引起硬质奶酪腐败不产生色素的青霉对那他霉素具有抵抗力^[7]。在乳中分离的诸如汉逊德巴利酵母、皱状假丝酵母、戴尔有孢圆酵母对化学消毒剂和清洗剂也表现出很强的抗性。由于频繁使用抗生素和防腐剂,导致食品中真菌对化学防腐剂和抗生素的抗性现象普遍增加,如此给食品产业和人类健康带来巨大的潜在风险。同时,由于消费者对在食品中限制使用化学防腐剂和食品添加剂的要求越来越强,因此,在不影响食品品质的前提下,急需研制出满足消费者需要的无残留、安全、高效的食品保护剂,满足延长食品的货架期和食品安全性的需要^[7]。

2 乳酸菌生物保护剂

乳酸菌天然栖息在各种传统乳酸发酵食品中,不仅对人体无害,作为益生菌制剂能够改善人类和动物的健康状况,被国际公认为 GRAS 生物制剂。欧洲国家中发酵食品占食物总量的 25%,而在发展中国家则达到 60% 以上^[12]。众所周知,乳酸菌作为发酵剂用于

制作各种酸奶、奶酪等乳制品及发酵果蔬食品中。乳酸菌和真菌的协同作用在食品生物技术也有应用实例^[1],如在面包制作时,酵头中乳酸菌和酵母的比例一般为 100:1,这种协同发酵对面包的品质具有良好的贡献作用^[13-16]。随着人类对乳酸菌益生性的不断认识和传统发酵食品中的广泛应用,乳酸菌作为食品生物保护剂的优势日益突出,是替代化学防腐剂的最佳选择。

2.1 乳酸菌在自然界的分布

乳酸菌广泛分布于含有碳水化合物的动植物发酵产品中,人和温血动物的口腔、阴道和肠道内存在一定数量的乳酸菌,低等生物如鱼类肠道中也有乳酸菌的踪迹。由于乳酸菌分解糖的能力强,分解蛋白质的能力极低,对营养要求十分苛刻。在发酵乳制品、发酵肉制品、啤酒、葡萄酒、果汁、麦芽汁、发酵面团等食品中均可分离到乳酸菌。在中国传统如泡菜、酸菜、榨菜、腌菜、酸奶、奶酪、火腿和酿酒等发酵食品中,充分利用乳酸菌的保藏技术。此外,一些发酵海产品中乳酸菌对产品的风味形成也起到重要的作用,如 *Lactobacillus plantarum* IFRPD P15 和 *L. reuteri* IFRPD P17 来自于发酵泰国鱼产品^[17]。

2.2 抗真菌性乳酸菌

乳酸菌主要以生态位竞争和营养物竞争、形成各种拮抗性代谢产物和抗微生物物质等方式抑制发酵产品中腐败性微生物和致病菌的生长繁殖,其所产生的抗菌物质包括乳酸、乙酸、甲酸、丙酸等酸性物质,还包括过氧化氢、双乙酰、罗伊氏菌素、乳酸菌素等代谢产物^[12, 18]。由于不同拮抗物质彼此之间存在着普通而复杂的协同作用关系,因此很难精确地阐明乳酸菌的抗菌作用机制^[19-20]。目前的研究主要是在生物体外直接分离鉴定具有抗菌作用的拮抗物质,结果表明大多数真菌对乳酸菌的正常代谢产物乳酸和乙酸的敏感机制十分复杂,而对食品环境中复杂防腐体系的概况知之甚少^[18, 21-22]。大多数有关抗真菌性乳酸菌的研究还停留在很低的水平,主要是描述乳酸菌的抑菌活性。至今有关于拮抗物质特性和机制方面的报道寥寥无几。

2.3 抗真菌性乳酸菌研究概况

对抗真菌性乳酸菌从上世纪 80 年代末期开始研究,基本概况如表 1 所示。首先,从乳酸菌来源和种类来看,呈现来源与应用相一致的特点,即控制哪种食品中真菌的生长即从该食品中分离乳酸菌,乳酸菌

主要为乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、乳球菌属 (*Lactococcus*) 和足球菌属 (*Pediococcus*)。其次, 从控制真菌对象来看, 主要是镰刀菌、青霉、黑曲霉和酵母。第三, 从抗真菌物质研究来看, 乳酸菌所形成的抗真菌化学物质多种多样, 包括有机酸、苯乳酸、

羟基脂肪酸、过氧化氢、双乙酰、乳酸菌素、罗伊菌素和环状肽等等。最后, 从年代来看, 先期的研究受到分析技术的限制, 对一些抗菌物质只是初步判断, 而近些年的研究基本能够确定抗菌物质。

表1 抗真菌性乳酸菌研究文献统计

Table 1 Compilation of publications reporting antifungal activity of lactic acid bacteria

乳酸菌	真菌	抗真菌物质	参考文献及年限
<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	可能是蛋白性物质	[23] (1989)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CHD 28.3	<i>A. Aspergillus flavus</i> ; <i>A. parasiticus</i> ; <i>Fusarium</i> spp.	可能是蛋白性物质	[24] (1996)
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> CB1	<i>Fusarium</i> spp; <i>Penicillium</i> spp; <i>Aspergillus</i> spp; <i>Monilia</i> spp.	己酸; 丙酸; 丁酸; 戊酸	[19] (1998)
<i>Lactobacillus pentosus</i>	<i>Candida albicans</i>	戊糖乳酸杆菌素 TV35b	[58] (1999)
<i>Lactobacillus plantarum</i> VTT E78076	<i>Fusarium avenaceum</i>	苯甲酸; 5-甲基-2,4 咪唑烷二酮; 甲基戊酸内酯; 环二肽 (Gly-L-Leu)	[20] (1999)
<i>Lactobacillus plantarum</i> 21B	广谱, 面包腐败真菌	苯乳酸; 4-羟基苯乳酸	[15] (2000)
<i>Lactobacillus plantarum</i> MiLAB 393	<i>Fusarium sporotrichioides</i> ; <i>Aspergillus fumigatus</i>	3-羟基苯乳酸; 环二肽 Phe-OH-Pro 和 Phe-Pro	[25] (2002)
<i>L. rhamnosus</i>	<i>Penicillium</i> spp; <i>Aspergillus</i> spp; <i>Fusarium</i> spp; <i>Alternaria</i> spp	乙酸钠	[26] (2002)
<i>Lactobacillus plantarum</i> MiLAB14	广谱	羟基脂肪酸; 苯乳酸; 环二肽 Phe-Pro 和 Phe-OH-Pro	[27] (2003)
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Penicillium expansum</i>	可能是环二肽	[28] (2008)
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Rhizopus oryzae</i> ; <i>Aspergillus</i>	双乙酰; 过氧化氢	[29] (2008)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>niger</i> ; <i>Aspergillus flavus</i> ; <i>Penicillium</i>		
<i>Lactobacillus reuteri</i> 1100	<i>Fusarium graminearum</i>	乙酸, 苯乳酸	[30] (2009)
<i>Lactobacillus plantarum</i> AF1	<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 22546	环二肽 Leu-Leu	[31] (2010)
<i>L. plantarum</i> CRL 778	<i>P. digitatum</i>	苯乳酸, 乙酸	[32] (2010)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	广谱	3-苯乳酸	[33] (2010)
<i>Lactobacillus plantarum</i> LB1	<i>P. roqueforti</i> DPPMAF1	4 种肽和有机酸的混合物	[34] (2011)
<i>Lactobacillus rossiae</i> LB5			
<i>L. plantarum</i> 1A7 (S1A7)	广谱	肽的混合物	[35] (2011)
<i>L. fermentum</i> Te007; <i>P. pentosaceus</i> Te010; <i>L. pentosus</i> G004; <i>L.</i> <i>paracasi</i> D5	<i>A. niger</i> 和 <i>A. oryzae</i>	可能是蛋白性物质	[14] (2011)
<i>L. amylovorus</i> DSM 19280	<i>A. niger</i> FST 4.21; <i>A. fumigatus</i> J9; <i>F. culmorum</i> TMW 4.0754; <i>P. expansum</i> FST 4.22 ; <i>P. roqueforti</i> FST 4.11	9 种羧酸; 2 种核苷; 癸酸钠和 5 种环二肽	[36] (2011)
<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Wickerhamomyces anomalus</i>	广谱	苯乳酸和 3-羟基脂肪酸	[37] (2011)
<i>L. plantarum</i> IMAU10014	<i>Botrytis cinerea</i> ; <i>Glomerella cingulata</i> ; <i>Phytophthora drechsleri</i> Tucker; <i>P.</i> <i>citrinum</i>	3-苯乳酸, 苯乙酸, 2-丙烯基酯	[38] (2012)

3 乳酸菌抗真菌性物质及分离鉴定技术

乳酸菌抗真菌性物质种类繁多,不同乳酸菌产生的抗菌物质不同。图1是不同乳酸菌产生的主要抗真菌物质,主要包括有机酸、双乙酰、过氧化氢、苯乳酸、蛋白类物质、罗伊氏菌素、羟基脂肪酸、环状肽等。其抗真菌低分子活性物质分离鉴定技术以现代分离固相萃取(solid phase extraction, SPE)和高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)分离为主,鉴定多采用核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)和质谱(mass spectrum, MS)分析手段。

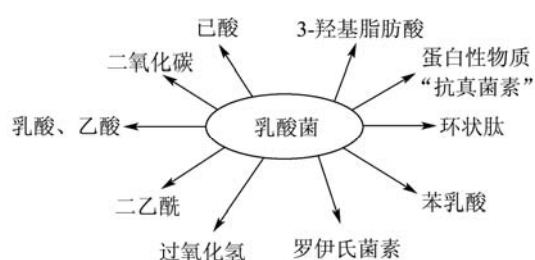


图1 现已知的不同乳酸菌产生的主要抗真菌物质

Fig.1 Current knowledge of the main antifungal compounds produced by different LAB

3.1 乳酸菌抗真菌性物质

3.1.1 有机酸

乳酸是乳酸菌的主要代谢产物,在引起pH值降低的同时,抑制很多微生物的生长繁殖。未解离的乳酸以疏水性的形式扩散在细胞膜外,而解离后的乳酸释放氢离子进入酸化的细胞浆中^[39-40]。未解离的乳酸破坏了细菌细胞的质子梯度,导致易感细菌的死亡,产生抑菌作用。在相对多的外源电子受体存在条件下,异型乳酸发酵型乳酸菌分解糖类也可产生乙酸,却只形成痕量丙酸。与乳酸相比,乙酸和丙酸都具有较高的pKa值,在一定pH值下形成较高比例的未解离酸。依赖乳酸的pH值,对微生物也具有与乳酸相类似的损伤细胞膜和中和化学质子梯度的作用^[41]。特别在pH值低于4.5时,丙酸具有抑制真菌生长的作用。同时,低pH值的丙酸和乙酸也具有抑制真菌细胞吸收氨基酸的作用,如丙酸钠和丙酸铵等对酵母和丝状真菌生长具有抑制作用^[41]。Moon发现乳酸、乙酸和丙酸的混合物对酵母和丝状真菌具有抑制作用。相反,一些真菌可在相对高浓度(100 mM)的乳酸和乙酸环境中生长^[42]。乳酸菌在含乙酸钠的MRS(de Man-Rogosa-Sharpe)培养基中生长易于形成乳酸,乙酸钠对乳酸菌形成抗真菌物质具有协同作用。

Magnusson等进一步研究还发现不具有抑制活性的乳酸菌比抗真菌性较强的乳酸菌能够产生更多的乳酸^[27]。总之,乳酸、乙酸和丙酸等有机酸的抗菌作用还不十分清楚,这将使关于乳酸菌的抑菌作用研究更加趋于复杂化,下一步关于有机酸的抗菌机理将在严格地纯化底物和特性研究方面逐步展开^[27,43-44]。

3.1.2 过氧化氢和双乙酰

大多数乳酸菌具有黄素蛋白氧化酶,在有氧的条件下能够形成过氧化氢,由于乳酸菌不形成过氧化氢酶,致使环境中过氧化氢积累。过氧化氢对细菌细胞具有强烈的氧化作用,通过摧毁细胞蛋白的基础分子结构达到抗菌杀菌目的。过氧化氢在低于抑制浓度时也具有抗菌作用,这是由来自乳和唾液中乳过氧化物酶和硫氰酸盐刺激而增强抗菌活性的^[45]。乳中存在乳过氧化物酶和硫氰酸盐,一些乳酸菌在乳或乳制品中生长时形成过氧化氢,因此构建了乳过氧化物酶—硫氰酸盐—过氧化物反应体系。该体系的抗菌作用是乳过氧化物酶催化过氧化氢和硫氰酸盐反应,形成次硫氰酸盐及其中间代谢产物对他种微生物产生抑制作用^[46-47]。Fitzsimmons和Berry报道该体系对白假丝酵母生长也具有抑制作用^[48]。

Rodríguez等建议MRS可作为筛选除过氧化氢以外的抗微生物活性物质的培养基,因为过氧化氢在MRS中迅速降解,这可能是由于酵母浸出物具有过氧化氢酶活性的缘故^[49]。一些菌属的乳酸菌在进行柠檬酸发酵时可形成双乙酰,在低pH值下,双乙酰具有抗微生物作用^[50]。然而,当双乙酰含量接近具有抑菌作用浓度200 mM时,产品的味道和风味却戏剧性地发生改变^[40]。

3.1.3 蛋白类物质

哺乳动物、鸟类、两栖动物、昆虫、植物和微生物都能够通过核糖体合成抗菌肽,这些抗菌肽一般是由20至50氨基酸组成的含有亲水和疏水末端的阳离子化合物^[51]。很多乳酸菌具有合成抗菌活性的肽或蛋白即乳酸菌素的能力^[52]。一般而言,乳酸菌素只对相近菌属的细菌才具有抑制活性,很少资料表明乳酸菌素对真菌生长有抑制作用。与大量关于乳酸菌素研究文章相反,几乎很少有关于乳酸菌产生抗真菌性肽的报道。

一些研究报道了乳酸菌在蛋白酶处理后抗真菌活性消失。如Batish等推测乳酸菌形成的抗真菌物质可能是蛋白性的,因为经蛋白酶处理后失去活性^[53]。Roy等获得1株对几种丝状真菌具有拮抗活性的乳酸乳球菌(*Lc. lactis*),当用糜蛋白酶、胰蛋白酶和链霉菌蛋白酶E处理细胞上清液后,其抗真菌活性消失^[24]。

Gourama 发现一株对两种青霉的抑制活性的干酪乳杆菌(*L. casei*), 经胰蛋白酶和胃蛋白酶处理后活性迅速降低^[54]。Gourama 和 Bullerman 研究表明由植物乳杆菌(*L. plantarum*)、保加利亚乳杆菌(*L. bulgaricus*)和嗜酸乳杆菌(*L. acidophilus*)组成的复合菌种发酵的商业青贮饲料对黄曲霉的生长和毒素形成都具有抑制作用。进一步研究发现 1 株非发酵剂干酪乳杆菌伪植物亚种 (*L. casei* subsp. *pseudopantarum*)具有抗真菌活性, 这种抗真菌活性物质是一种对胰蛋白酶和糜蛋白酶敏感的小肽 (<1 kDa) ^[55-56]。乳酸菌的抗黄曲霉毒素形成作用依赖其细胞对真菌毒素的吸附作用^[57]。

目前关于纯化乳酸菌抗真菌蛋白性物质报道的文章寥寥无几, Okkers 等从 *Lactobacillus pentosus* 中分离一条对白假丝酵母具有抑制活性的中等长度肽 TV35b, 但它对丝状真菌没有进行抑制活性研究^[58]。Okkers 等从 *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* 菌株 Si3 中获得一种分子量大约为 3 kDa 的小肽, 对几种霉菌和酵母具有抑制作用^[43]。该小肽对热稳定, 在 pH 3.0~6.0 范围内具有活性, 被蛋白酶 K 处理后失活, 这种热稳定特性与 II 型乳酸菌素类似。食淀粉乳杆菌 (*Lactobacillus amylovorus*) 分泌的细菌胞外多糖, *Lactobacillus sakei* 产生的 Lactocin S 和 *L. pentosus* 形成的抑真菌肽 TV35b 都具有相同的动力学特征^[58-60]。当液体培养基中添加乙醇、甲酸或乙酸时, 菌株 *L. coryniformis* Si3 形成抗真菌肽的总量会增加。抗真菌肽具有疏水性特征, 能够迅速吸附在真菌细胞的表面, 或自发地形成复合体^[43]。

Atanassova 等研究了 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* M3 产生的具有抗微生物作用的蛋白性物质, 它具有广谱抗菌特征, 对 26 种应试酵母中的 4 种具有拮抗作用。虽然纯化这种物质难度很大, 但最终获得了分子量约 43 kDa 的疏水性蛋白, 它在 pH 6 时具有最大的抗菌活性^[61]。由于该疏水性蛋白不能满足细菌素的定义标准^[62], 因此 Atanassova 等将其称为细菌素类底物蛋白, 如此谨慎地定义很可能揭示抗真菌活性物质的本质。

3.1.4 罗伊氏菌素 Reuterin

大多数乳酸菌缺乏甘油降解的氧化途径, 因此, 不能将甘油作为唯一碳源进行分解代谢^[62]。乳酸菌甘油降解的唯一途径是通过 3-羟基丙醛 (reuterin, 3-HPA) 间接形成。Magnusson 等研究发现培养基中添加甘油可使菌株 *L. coryniformis* Si3 对几种丝状真菌和酵母的抑制活性显著增强^[43]。

在无氧条件下, 罗伊氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*) 饥饿细胞通过分解甘油产生的一种广谱抗微

生物性物质-罗伊氏菌素。目前, 罗伊氏菌素已成为乳酸菌小分子量抑制活性物质研究的热点^[39]。具有活性的罗伊氏菌素是由单体、水合单体和 3-羟基丙醛形式的环状二聚体组成的混合物, 它对包括革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、酵母和丝状真菌等微生物类群都具有抗菌活性, 其中对假丝酵母属 (*Candida*)、球拟酵母属 (*Torulopsis*)、酵母属 (*Saccharomyces*)、曲霉属 (*Aspergillus*) 和镰刀菌属 (*Fusarium*) 的真菌都具有拮抗效果。短乳杆菌 (*L. brevis*)、布氏乳杆菌 (*L. buchneri*)、丘状乳杆菌 (*L. collinoides*) 和棒状乳杆菌 (*L. coryniformis*) 等也可产生罗伊氏菌素^[43, 63]。

自酵头分离的罗伊氏乳杆菌 *L. reuteri* 还展现了产生一种新型抗生素 reutericyclin 的能力, 它对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和酵头中乳酸菌都有抑制作用, 但对酵母却没有作用^[64-65]。在添加甘油条件下, 所有的 *L. coryniformis* 菌株都能够迅速增强抗菌活性。从 *L. coryniformis* 的甘油代谢产物中检测到等量 3-羟基丙酸、1, 3-丙二醇和微量 3-羟基丙醛。与 Sobolov 和 Smiley 应用菌株 *Lactobacillus* sp. 208-A 研究的结果相类似, 提出了乳酸菌从甘油到 3-HPA 的脱水降解途径的推断, 进一步被氧化成 3-羟基丙酸或被还原成 1, 3-丙二醇^[66]。*L. reuteri* 的甘油脱氢酶已经被纯化和分析验证。最近遗传学和生物化学的结果说明乳酸菌的甘油/二醇脱氢酶和其它细菌菌属相应的酶的结构相似^[67]。

3.1.5 脂肪酸

从植物乳杆菌 MiLAB 14 中分离具有抗真菌活性的几种 3-羟基脂肪酸, 与以前所报道的羟基脂肪酸不同的是 MiLAB 14 产生 3-羟基脂肪酸皆来自无细胞上清液, 而不是细胞本身^[44]。

降脂性乳酸菌能产生大量抗微生物脂肪酸, 同时对发酵食品的风味品质具有贡献作用。Rao 和 Reddy 从发酵乳的乳酸菌培养物中分离几种直链脂肪酸, 其抗菌能力随着脂肪酸碳链的延长而增强。除 11 碳酸之外, 辛酸和长链脂肪酸的抗菌活性最强, 但多于 10 碳的脂肪酸很难溶于水^[68]。Baird-Parker 也证明了脂肪酸的抗菌活性随着脂肪链的延长而增强, 由于超过 10 碳或 11 碳的脂肪酸水溶性低, 因此不作为有效的抗菌物质。Sjögren 等发现 12 碳的羟基化脂肪酸具有最强的抗真菌活性^[44]。Bergsson 等研究了脂肪酸和单甘脂对白假丝酵母的抑制作用, 结果发现当用 10 mM 脂肪酸处理酵母菌细胞后, 只有碳 10 的癸酸和碳 12 的月桂酸对酵母细胞具有抑制作用^[69]。Corsetti 等发现从酵头中分离的一株 *Lactobacillus sanfranciscensis* 产生混合酸具有抗霉菌作用, 其中己酸发挥关键的抑菌作用,

而丙酸、丁酸和戊酸也有一定的抑制作用^[19]。

羟基脂肪酸对霉菌和酵母具有强烈的抗真菌活性, 最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 在 10~100 $\mu\text{g/mL}$ 。相对而言, 酵母比霉菌更加敏感。这与标准抗真菌药物两性霉素 B 相近, 其抑制真菌浓度在 $\mu\text{g/mL}$ 水平。由细菌生长产生的羟基脂肪酸不足以导致细胞的溶解, 羟基脂肪酸在自然生态环境中潜在的抗真菌活性还不十分清楚^[44]。

3.1.6 苯乳酸

Lavermicocca 等报道从酵头中分离到 1 株具有抑制几种丝状真菌作用的植物乳杆菌 21B, 其抗菌活性物质为苯乳酸和 4-羟基苯乳酸^[15]。同时, *L. plantarum* MiLAB 393、*L. coryniformis* Si3、*Pediococcus pentosaceus* 和 *L. sakei* 等菌株的上清液中也分析鉴定出苯乳酸^[25], 其抗霉菌和酵母的活性浓度在 $\mu\text{g/mL}$ 水平。然而, 可能是苯乳酸与乳酸菌的其他代谢物协同发挥抗真菌作用的结果。用 *L. plantarum* 21B 作酵头发酵的面包抑制了黑曲霉的生长, 比用不产生苯乳酸 *Lactobacillus brevis* 的发酵面包黑曲霉生长延迟了 7 天^[15]。

3.1.7 环肽和其他低分子化合物

Niku-Paavola 等从 *L. plantarum* VTT E-78076 菌株的滤过液中分离出一种新型的抗微生物化合物, 其活性成分包括苯甲酸、5-甲基-2,4-咪唑烷二酮、甲羟戊酸内酯和甘氨酸和亮氨酸的环状肽^[20]。Ström 等在 *L. plantarum* MiLAB 393 的上清液中发现两种环状肽 (Phe-Pro 和 Phe-OH-Pro)。对几种不同环状肽的抗菌作用研究发现环肽 Phe-Pro 和 Phe-OH-Pro 也可由 *P. pentosaceus*, *L. sakei* 和 *L. coryniformis* 等乳酸菌产生, 可能是乳酸菌的普通代谢物^[25]。这些环状肽在 $\mu\text{g/mL}$ 浓度具有抗真菌活性, 抗菌效果不及前面提到的羟基脂肪酸。最近发现在 MRS 和一些几种符合乳酸菌培养基中存在几种低浓度的环状肽, 但检出量不足以达到拮抗微生物的作用效果^[64, 70]。

3.2 抗真菌性物质的分离鉴定技术

Magnusson 等设计了纯化乳酸菌无细胞上清液中疏水性低分子抗菌物质的程序, 包括 SPE 和 C18 柱的 HPLC 分析。无细胞上清液经固相 C18 萃取柱分离后, 亲水相中含有大量的乳酸、乙酸等有机酸。疏水相用乙晴作为流动相经过 C18 反相柱分离, 然后用 96 孔微量滴定板收集分离物。不同分离物的抗真菌活性应用烟曲霉 *Aspergillus fumigatus* 进行分析评价。将具有抑菌活性的分离物进一步用多孔石墨碳柱在 HPLC 分离纯化, 最后应用 NMR 和 MS 测定经纯化的抗菌化

合物的分子结构。这种抗真菌化合物的生物分析具有高重复性, 不同乳酸菌具有不同的抑菌模式^[43-44]。

4 结论和发展趋势

4.1 抗真菌乳酸菌还是一个很新的研究领域。至今, 大多数关于乳酸菌抗真菌作用研究仅仅局限在抗菌作用研究, 还很少有鉴定到的活性物质或拮抗作用机制研究。从目前乳酸菌分离纯化的大多数抗真菌物是小分子化合物, 例如苯乳酸、环状肽和短或中链脂肪酸。许多抗真菌性乳酸菌产生多种活性物质, 可能是这些物质具有协同作用, 其中羟基脂肪酸的产量最低。

4.2 对分离的抗真菌代谢物的分析检测只有采取新的技术才可能实现。对分离痕量的活性物质而言, 由于缺乏有效的技术手段, 许多低分子活性物还无法检测出来。因此, 需投入大量的时间和精力研发在复杂环境中检测抗菌物质的方法。

4.3 应用一般发酵产物 (乳酸、乙酸等) 的抗微生物作用机制研究乳酸菌和真菌之间的特殊相互作用关系是难以理解的, 可能是多种抗真菌物质协同作用的结果。事实上, 对微生物之间相互作用的结果可能是十分重要的。食品保藏中各种生物技术和乳酸菌的拮抗微生物物质的协同应用将对腐败微生物形成额外的栅栏效应。

4.4 总之, 抗真菌性乳酸菌及其代谢物能够在复杂的食品环境中取代传统化学防腐剂, 如作为面包发酵剂的植物乳杆菌产生的苯乳酸已经防止焙烤面包中霉菌的生长得到应用, 延长产品的货架期。多年来, 消费者一直要求没有化学添加剂的食品保藏方式, 抗真菌乳酸菌可取代化学防腐剂应用于食品工业。然而, 大规模使用生物保护剂还需详尽的食品安全评估和风险分析。利用有限的微生物资源期待开发出有潜质的抗真菌性乳酸菌, 发现新的代谢物。有理由期待乳酸菌及其各种抗真菌化合物作为生物保护剂在食品贮藏领域得到广泛应用。

参考文献

- [1] Carr F J, Chill D, Maida N. The *Lactic acid bacteria*: a literature survey [J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2002, 28: 281-370
- [2] Pitt J I, Hocking A D. *Fungi and food spoilage* [M]. Springer Dordrecht Heidelberg London New York, 2009
- [3] Legan J D. Mould spoilage of bread: the problem and some solutions [J]. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 1993, 32: 33-53
- [4] Schnürer J, Magnusson J. Antifungal *Lactic acid bacteria* as

- biopreservatives [J]. Trends in Food Science and Technology, 2005, 16: 70-78
- [5] Filtenborg O, Frisvad J C, Thrane U. Moulds in food spoilage [J]. International Journal of Food Microbiology, 1996, 33: 85-102
- [6] Loureiro V, Querol A. The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages [J]. Trends in Food Science and Technology, 1999, 10: 356-365
- [7] Brul S, Coote P. Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms [J]. International Journal of Food Microbiology, 1999, 50: 1-17
- [8] Loureiro V. Spoilage yeasts in foods and beverages: characterisation and ecology for improved diagnosis and control [J]. Food Research International, 2000, 33: 247-256
- [9] Sanglard D. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs [J]. Current Opinion in Microbiology, 2002, 5: 379-385
- [10] Viljoen B C. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments [J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 69: 37-44
- [11] Nielsen P V, de Boer E. Food preservatives against fungi [M]. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, 2000, pp. 357-363
- [12] Stiles M E. Biopreservation by lactic acid bacteria [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1996, 70: 331-345
- [13] Gobbetti M. The sourdough micro flora: interactions of lactic acid bacteria and yeasts [J]. Trends in Food Science and Technology, 1998, 9: 267-274
- [14] Lavermicocca P, Valerio F, Evidente A, et al. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66: 4084-4090
- [15] Muhialdin B J, Hassan Z, Sadon S K. Antifungal activity of *Lactobacillus fermentum* Te007, *Pediococcus pentosaceus* Te010, *Lactobacillus pentosus* G004 and *L. paracasi* D5 on selected foods [J]. Journal of Food Science, 2011, 76: 493-499
- [16] Ryan L A M, Dal Bello F, Arendt E K. The use of sourdough fermented by antifungal LAB to reduce the amount of calcium propionate in bread [J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 125: 274-278
- [17] Saithong P, Panthavee W, Boonyaratanakorn K, et al. Use of a starter culture of lactic acid bacteria in pla-som, a Thai fermented fish [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2010, 110: 553-557
- [18] Lindgren S E, Dobrogosz W J. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations [J]. FEMS Microbiology Reviews, 1990, 87: 149-164
- [19] Corsetti A, Gobetti M, Rossi J, et al. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1998, 50: 253-256
- [20] Niku-Paavola M L, Laitila A, Mattila-Sandholm T, et al. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum* [J]. Journal of Applied Microbiology, 1999, 86: 29-35
- [21] Bonestroo M H, Dewit J C, Kusters B J M, et al. Inhibition of the growth of yeasts in fermented salads [J]. International Journal of Food Microbiology, 1993, 17:311-320
- [22] Piard J C, Desmazeaud M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances [J]. Lait, 1992, 72: 113-142
- [23] Vandenberg P A, Kanka B S. Antifungal product [J]. United States Patent, 1989, 4: 877, 615
- [24] Roy U, Batish V K, Grover S, et al. Production of antifungal substance by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CHD-28.3 [J]. International Journal Food Microbiology, 1996, 32: 27-34
- [25] Ström K, Sjörgen J, Broberg A, et al. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo (L-Phe-L-Pro) and cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3 phenyllactic acid [J]. Applied and Environment Microbiology, 2002, 68: 4322-4327
- [26] Stiles J, Penkar S, Plockova N, et al. Antifungal activity of sodium acetate and *Lactobacillus rhamnosus* [J]. Journal of Food Protection, 2002, 65: 1188-1191
- [27] Magnusson J, Ström K, Roos S, et al. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of *Lactic acid bacteria* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 219: 129-135
- [28] Rouse S, Harnett D, Vaughan A, et al. *Lactic acid bacteria* with potential to eliminate fungal spoilage in foods [J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 104: 915-923
- [29] Ogunbanwo S T, Adebayo A A, Ayodele M A, et al. Effects of lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* co-cultures used as starters on the nutritional contents and shelf life of cassava-wheat bread [J]. Journal of Applied Biosciences, 2008, 12: 612-622
- [30] Gerez C L, Torino M I, Rollan G, et al. Prevention of bread mould spoilage by using *Lactic acid bacteria* with antifungal properties [J]. Food Control, 2009, 20: 144-148
- [31] Yang E J, Chang H C. Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated

- from kimchi [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 139: 56-63
- [32] Gerez C L, Torino M I, Obregozo M, et al. A ready-to-use antifungal starter culture improves the shelf life of packaged bread [J]. Journal of Food Protection, 2010, 73: 758-762
- [33] Prema P, Smila D, Palavesam A, et al. Production and characterization of an antifungal compound (3-phenyllactic acid) produced by *Lactobacillus plantarum* strain [J]. Food Bioprocess Technology, 2010, 3: 379-386
- [34] Rizzello C G, Cassone A, Coda R, et al. Antifungal activity of sourdough fermented wheat germ used as an ingredient for bread making [J]. Food Chemistry, 2011, 127: 952-959
- [35] Coda R, Cassone A, Rizzello C G, et al. Antifungal activity of *Wickerhamomyces anomalus* and *Lactobacillus plantarum* during Sourdough fermentation: identification of novel compounds and longterm effect during storage of wheat bread [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77: 3484-3492
- [36] Ryan L A M, Zannini E, Dal Bello F, et al. *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280 as a novel food-grade antifungal agent for bakery products [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 146: 276-283
- [37] Ndagano D, Lamoureux T, Dortu C, et al. Antifungal activity of 2 lactic acid bacteria of the *Weissella* genus isolated from food [J]. Journal of Food Science, 2011, 76: 305-311
- [38] Wang H, Yan Y, Wang J, et al. Production and characterization of antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* IMAU10014 [J]. PLoS ONE, 2012, 7(1): e29452
- [39] Axelsson L. *Lactobacillus reuteri*, a member of the gut bacterial flora [D]. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, 1990
- [40] Piard J C, Desmazeaud M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products [J]. Lait, 1991, 71: 525-541
- [41] Freese E, Sheu C W, Galliers E. Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives [J]. Nature, 1973, 241: 321-325
- [42] Moon N J. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate, and their synergistic mixtures [J]. Journal of Applied Bacteriology, 1983, 55: 453-460
- [43] Magnusson J, Schnürer J. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain S13 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67: 1-5
- [44] Sjögren J, Magnusson J, Broberg A, et al. Antifungal 3-hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69: 7554-7557
- [45] Condon S. Responses of *Lactic acid bacteria* to oxygen [J]. FEMS Microbiology Reviews, 1987, 46: 269-280
- [46] Björck L. Antibacterial effect of the lactoperoxidase system on psychrotrophic bacteria in milk [J]. Journal of Dairy Research, 1978, 45: 109-118
- [47] Björck L, Rosen C, Marshall V, et al. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system in milk against *Pseudomonads* and other gram negative bacteria [J]. Applied Microbiology, 1975, 30: 199-204
- [48] Fitzsimmons N, Berry D R. Inhibition of *Candida albicans* by *Lactobacillus acidophilus*: evidence for the involvement of a peroxidase system [J]. Microbios, 1994, 80: 125-133
- [49] Rodríguez J M, Martínez M I, Suárez A M, et al. Unsuitability of the MRS medium for the screening of hydrogen peroxide-producing *Lactic acid bacteria* [J]. Letters in Applied Microbiology, 1997, 25: 73-74
- [50] Jay J M. Antimicrobial properties of diacetyl [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1982, 44: 525-532
- [51] Nissen-Meyer J, Nes I F. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action [J]. Archives of Microbiology, 1997, 167: 67-77
- [52] Nes I F, Diep D B, Håvarstein L S, et al. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1996, 70: 113-128
- [53] Batish V K, Grover S, Lal R. Screening lactic starter cultures for antifungal activity [J]. Cultured Dairy Products Journal, 1989, 24: 21-25
- [54] Gourama H. Inhibition of growth and mycotoxin production of penicillium by *Lactobacillus* species [J]. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie, 1997, 30: 279-283
- [55] Gourama H, Bullerman L B. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species [J]. Journal of Food Protection, 1995, 58: 1249-1256
- [56] Gourama H, Bullerman L B. Anti-aflatoxicogenic activity of *Lactobacillus casei pseudoplantarum* [J]. International Journal of Food Microbiology, 1997, 34: 131-143
- [57] El-Nezami H, Polychronaki N, Salminen S, et al. Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative alpha-zearalenol [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68: 3545-3549
- [58] Okkers D J, Dicks L M T, et al. Characterization of pentocin

- TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans* [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1999, 87: 726-734
- [59] Callewaert R, Holo H, Devreese B, et al. Characterization and production of amylovorin L471, a bacteriocin purified from *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 by a novel three-step method [J]. *Microbiology*, 1999, 145: 2559-2568
- [60] Mørtvedt-Abildgaard C I, Nissen-Meyer J, Jelle B, et al. Production and pH-dependent bactericidal activity of lactocin S, a lantibiotic from *Lactobacillus sake* L45 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61: 175-179
- [61] Atanossova M, Choiset Y, Dalgalarondo M, et al. Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3 [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 87: 63-73
- [62] Slininger P J, Bothast R J, Smiley K L. Production of 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1983, 46: 62-67
- [63] Claisse O, Lonvaud-Funel A. Assimilation of glycerol by a strain of *Lactobacillus collinoides* isolated from cider [J]. *Food Microbiology*, 2000, 17: 513-519
- [64] Gänzle M G, Hölzel A, Walter J, et al. Characterization of reuterocyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66: 4325-4333
- [65] Hölzel A, Gänzle M G, Nicholson G J, et al. The first low molecular weight antibiotic from *Lactic acid bacteria*: reuterocyclin, a new tetramic acid [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2000, 39: 2766-2768
- [66] Sobolov M, Smiley K L. Metabolism of glycerol by an acrolein-forming *Lactobacillus* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1960, 79: 261-266
- [67] Sauvageot N, Pichereau V, Louarme L, et al. Purification, characterization and subunits identification of the diol dehydratase of *Lactobacillus collinoides* [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269: 5731-5737
- [68] Rao D R and Reddy J C. Effects of lactic fermentation of milk on milk lipids [J]. *Journal of Food Science*, 1984, 49: 748-750
- [69] Bergsson G, Arnfinnsson J, Steingrimsson O, et al. In vitro killing of *Candida albicans* by fatty acids and monoglycerides [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, 45: 3209-3212
- [70] Graz M, Jamie H, Versluis C, et al. Mechanism of an antifungal action of selected cyclic peptides [J]. *Pharmazie*, 2001, 56: 900-901