



## 乳酸菌的耐酸性机制

作者:张艳国 田雷

期号:2007年第4期

乳酸菌是一类能利用可发酵糖产生大量乳酸的细菌的通称。乳酸菌在自然界分布广泛,可栖居于人和动物的肠道以及其它器官内。很久以前人们就利用乳酸菌来发酵动物制品(乳、肉、鱼等)和植物制品(蔬菜、葡萄酒、橄榄等)。随着食品发酵工业的不断发展壮大,开发利用乳酸菌的经济效益也不断在增长。虽然乳酸菌在发酵食品中的含量非常少,但是对食品的感官品质和质量却有决定性作用,因此,发酵剂菌株的质量功能特性和生长特性对于产品的成功发酵是非常必要的。乳酸菌不但包括在食品发酵中使用的一般认为安全(GRAS)的微生物,而且还包括胃肠道中普遍存在的共生体和具有潜在益生作用的益生菌。对这些微生物来说,食品和胃肠道中的酸性环境对它们的生存是一个很大的挑战。例如,益生菌的最佳载体是酸奶和发酵乳制品,益生菌要在其中生存就不得不适应这两类载体的酸性环境,而且益生菌需要能够在酸度更高的胃酸中生存,以便于它们能够顺利地通过胃肠道到达小肠,并在小肠中生存。因此,人们已经把耐酸性作为筛选理想益生菌株的特征之一。乳酸菌可以利用的耐酸性机制有许多种,大体上可以分成8类:质子泵、蛋白质修复、DNA修复、调节因子、细胞密度的改变、细胞膜的改变、产生碱和代谢方式的改变,其中,对质子泵、产生碱的机制研究的比较多。

### 1 质子泵

乳酸菌调控其细胞内pH值的能力是乳酸菌细胞能够正常存活的重要的生理要求之一。乳酸菌在生长过程或在低pH值环境中时,如果它不能够维持其细胞内环境的近中性,那么它就可能丧失活力或者细胞活性。Hutkins等发现,当环境中的pH值低于细胞正常生理pH值范围时,乳酸菌能够通过某些机制维持细胞内的pH值高于环境中的pH值,使其保持在正常的生理pH值范围内。但是当环境中的pH值非常低时,乳酸菌就不能够再维持细胞内pH值的稳定,胞内的pH值也开始下降,最终细胞内外的pH值达到一致,导致乳酸菌的生长停滞直至死亡。大量的研究表明,H<sup>+</sup>-ATPase和谷氨酸脱羧酶(GAD)体系是乳酸菌维持胞内pH值稳定所使用的主要机制。

#### 1.1 H<sup>+</sup>-ATPase

多亚基的H<sup>+</sup>-ATPase(又可称为F1F0-ATPase)将ATP的产生和跨膜的质子动力势(PMF)耦联起来,它既可以利用细胞呼吸作用产生的PMF来生成ATP,又可以利用通过底物磷酸化产生的ATP来产生PMF。PMF能够促进细胞质中质子的外排,导致胞内pH值的降低。F1F0-ATPase由F0蛋白和F1蛋白构成。嵌入细胞膜中的F0亚基复合体是由a、b和c三个亚基组成的,它是一个通道蛋白,具有质子转运活性。它的活性可以通过一些与特定F1蛋白的共同表达而得到提高,这表明F1蛋白可能在F0通道蛋白的装配或开启过程中发挥一定的作用。结合在细胞膜表面的F1亚基复合体是由α、β、γ、δ和ε 5个亚基组成的,当它从膜中释放出来后就具有ATP酶活性,当其同嵌在膜中的F0亚基复合体结合在一起之后就能够在催化耦联的质粒转运和ATP的合成或者水解之间的相互转换。Kullen和Klaenhammer鉴定了嗜酸乳杆菌(Lactobacillus acidophilus)中受pH值诱导的F1F0-ATPase操纵子,他们发现低pH值环境不但同ATP基因转录产物的增加相关,而且还同细胞膜中H<sup>+</sup>-ATPase活性的增加有关。

#### 1.2 谷氨酸脱羧酶体系

Small和Waterman描述了一个最简单的谷氨酸脱羧酶体系(GAD)的调控机制模型,它由一个谷氨酸脱羧酶、一个氨基酸通透酶和一个谷氨酸γ-氨基丁酸反向转运体组成。乳酸菌细胞通过特异的转运体摄入谷氨酸之后,在胞内经过谷氨酸脱羧酶脱羧消耗一分子的胞内质子,反应的产物γ-氨基丁酸(GABA),通过反向转运体被排到胞外。最终结果是胞内氢离子的消耗导致细胞内的pH值升高,胞外的谷氨酸被转变成碱性略强的GABA而导致胞外pH值的略微升高。

Waterman和Small在研究氯化物诱导的启动子表达时,鉴定了乳酸乳球菌(Lactococcus lactis)的GadCB操纵子。他们发现乳球菌的gadC基因同大肠杆菌(E. coli)的gadC蛋白基因具有同源性,根据此同源性和乳球菌中存在的12个跨膜疏水结构域,人们认为gadC基因编码是一个氨基酸反向转运体。Nomura等对大量乳酸乳球菌乳酸亚种(L. lactis subsp. Lactis)菌株的Southern blot分析表明,gadB基因是以单拷贝形式存在的。在其上游发现了一个组成型表达基因——gadR基因。GadR蛋白正调控氯化物诱导的gadC和gadB基因的表达。Sanders等的研究表明,乳球菌在低pH值下生长以及培养基中存在NaCl和谷氨酸时,当进入稳定期时其gadC和gadB基因的表达量最大,并且当基因插入而使gadB基因失活时会使得乳球菌的酸敏感性增加。氯化物诱导gadC和gadB基因的表达被假定是乳球菌能够在胃中存活机制,因为在胃里微生物面对的是高酸、高氯化物的生存环境。人们推测gadCB基因可能对乳球菌在干酪生产过程中的存活非常重要。Nomura等对乳酸乳球菌乳脂亚种(L. lactis subsp. Cremoris)的研究表明,它含有一个gadB基因同源物,但是由于移码突变而导致其没有活性。这一发现至少可以在某种程度上解释为什么乳酸乳球菌乳酸亚种(L. lactis subsp. Lactis)和乳酸乳球菌乳脂亚种(L. lactis subsp. Cremoris)的耐酸性不同。

许多乳杆菌能够催化谷氨酸生成GABA的反应。在这些乳杆菌中短乳杆菌(Lactobacillus Brevis)的GAD已经被纯化出来,并发现其在30℃、pH值4.2并有0.2 M嘧啶-HCl存在时活力最大,而不是被NaCl激活。此外,Andrea等在对嗜酸乳杆菌(Lactobacillus acidophilus)NCFM的研究中又发现了一个新的氨基酸脱羧酶-反向转运体系——鸟氨酸脱羧酶体系。

### 2 蛋白质修复

当细菌细胞处于酸性环境中时乳酸菌的某些伴侣蛋白、蛋白酶和热激蛋白会大量表达,从而能够保护蛋白的活性或者降解对细胞有害的蛋白。例如利用蛋白质组学的方法分析某些乳酸菌的酸耐受响应时发现,某些热激蛋白总是增量表达,可能会修复酸诱导损伤的蛋白,有助于新合成蛋白的折叠。尽管经常能够在不同乳酸菌中发现DnaK和GroEL蛋白,然而在不同种的乳酸菌中,酸诱导表达的热激蛋白的种类各不相同。研究者对乳酸乳球菌(L. lactis)groE和clpP操纵子的特异性研究发现,低pH值诱导的酸耐受反应,通常是由它们自身的热激蛋白的调控子HrcA和CtsR介导的。

### 3 DNA修复

由于内部pH值降低,受损的DNA可以通过错误碱基序列的剪切或已停止的复制又重新起始复制而被修复。当乳酸菌细胞内的pH值过低时会导致DNA的脱嘌呤和脱嘧啶,这种现象的发生涉及碱基的质子化以及随后的碱基和戊糖之间的糖苷键的剪切,碱基丢失位点处的残基通常称为无碱基或AP(无嘌呤,无嘧啶)位点。通常只有单个碱基缺陷,乳酸菌才可以利用碱基切除修复方式来进行修复。如果DNA损伤造成DNA螺旋结构较大变形,则需要以核苷酸切除修复方式进行修复。最常见的是短片断修复,只有多处发生严重的损伤才会诱导长片断修复。损伤由切除酶切除,编码此酶的基因是uvr基因,由多个亚基组成。Hanna等发现,在低pH值环境中生存时,突变链球菌(Smutans)的野生型和含有recA基因的突变株中都具有能够切除AP位点的内切酶活性,而且还诱导了uvrA基因的表达。这说明,在细菌的酸应激过程中,它们可能同时使用碱基切除和核苷酸切除修复方式对DNA进行修复。

### 4 细胞膜的改变

细胞膜是细菌生存的外部环境中物理化学压力的首要侵袭目标之一。细菌能够通过改变细胞膜的结构、成分、稳定性和活性来保护细胞,而细胞膜的脂肪酸成分的改变是最常见的细菌对外部环境压力的一种反应。如Quivey等发现,突变链球菌(S. mutans)在低pH值环境中生存时,细胞膜中的单不饱和脂肪酸和长链脂肪酸会增多,这会降低细胞膜对质子的通透性。

### 5 产生碱

### 相关文章

- 发酵豆粕在水产饲料中的应用...
- 哺乳动物斯钙素-1的研究
- 微生物制剂降低胆固醇研究进...
- 饲料企业库存系统的系统动力...
- 糊皮素的生物学效应及应用前...
- 类胡萝卜素在水产饲料中的应...
- 瘤胃微生物来源的纤维降解酶...
- 中草药植物内生菌产生抗生素...
- 蒸汽压片玉米加工工艺及其对...
- SPF实验动物饲料的灭菌

### 合作伙伴



First you add knowledge...

### 5.1 精氨酸脱亚氨酸酶体系

科学家在许多乳酸菌中都发现了ADI体系的存在。ADI体系主要由精氨酸脱亚氨酸酶、鸟氨酸转氨酶和鸟氨酸氨基甲酸激酶3种酶组成，它们分别是由arcA、arcB和arcC基因编码的，能够催化精氨酸生成鸟氨酸、氨和二氧化碳，产生的氨会中和细胞内的H<sup>+</sup>，升高胞内pH值，从而提高细菌的耐酸性。普遍认为，口腔细菌所具有的ADI体系对人类来说是有益的，如格氏链球菌(*Streptococcus gordonii*)、副血链球菌(*S. Parasanguis*)和血链球菌(*S. sanguis*)以及某些乳杆菌都利用游离的精氨酸(平均分泌浓度为50 μM)，或者利用唾液中的多肽和蛋白质中的精氨酸。它们能够提高乳酸菌的耐酸性，这对某些很少具有固有的酸抗性的口腔乳酸菌(也就是说非突变体)来说是非常重要的。对这些细菌来说，ADI体系非常重要，因为它使得那些有益的产酸较少的微生物能够同嗜酸、产酸更强的微生物在牙菌斑上共生。虽然具有ADI体系的口腔细菌能够利用宿主膳食中的精氨酸，但是人们还发现，唾液中的精氨酸、赖氨酸或者含有这些氨基酸的多肽对降低人群龋齿率的发生有部分积极作用。

在许多不同发酵食品中的乳酸菌也都含有ADI体系，虽然需要量不同。在肉品发酵中使用的米酒乳杆菌(*Lactobacillus sakei*)是非常特殊的，因为它是兼性异型发酵乳酸菌，并且也具有ADI代谢途径。Zuniga等利用缺少ADI活性的米酒乳杆菌(*Lactobacillus sakei*)的突变株来确定米酒乳杆菌(*Lactobacillus sakei*)的ADI体系在肉品发酵中的重要性。虽然在突变株和野生型之间没有明显的不同，但是他们指出，这可能是由于菌株之间蛋白酶活性的差异，导致菌株生长环境中的游离精氨酸的浓度有很大的不同。De Angelis等从来源于酸面团的70株乳酸菌中筛选具有ADI、鸟氨酸转氨酶和鸟氨酸氨基甲酸激酶的菌株，结果发现，只有专性异型发酵的菌株同时具有这3种酶。他们对这些菌株中的旧金山乳杆菌(*Lactobacillus sanfranciscensis*)进行了详细的研究，结果发现，ADI体系不但能够增加菌株的耐酸程度，而且还有助于细胞的生长、有助于细胞在7℃储存时的存活以及促进一种重要风味化合物前体物质——鸟氨酸的产生。

### 5.2 脲酶体系

脲酶能够催化一分子的尿素水解成一分子的CO<sub>2</sub>和一分子的氨，而氨可以中和H<sup>+</sup>，升高pH值。人们已经在嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)和唾液链球菌(*Streptococcus salivarius*)中发现了脲酶的存在。Chen等发现，当培养基中的尿素浓度为25 mM、pH值为3时，唾液链球菌(*Streptococcus salivarius*)能够将胞外的pH值升高到7.6，与不添加尿素的对照组相比，存活率提高了1 000倍。由于在唾液中存在尿素，因此尿素水解可能对唾液链球菌(*Streptococcus salivarius*)在其它嗜酸的乳杆菌和口腔链球菌正常生长导致的极低pH环境中生存尤其重要。

### 6 代谢方式的改变

虽然人们已经了解了微生物在温和酸性环境中生长、适应酸性环境和在极端pH值下存活的抗酸性机制，但是还不是很了解乳酸菌对其发酵过程中的自酸化作用的响应机制。但是，人们已经发现，随着生存环境的酸化，乳酸菌改变了ATP的代谢方式，它们利用ATP来产生质子梯度，同时伴随着供给细胞用于生物量合成和新陈代谢的能量减少，直到最后细胞的生长被抑制。代谢的紊乱是由于同主要代谢途径相关基因的转录方式改变导致的，令人感到惊讶的是，虽然这些转录方式的改变在pH值剧烈降低的过程中并不明显，但是在某些情况下，这种改变可能是由于mRNA稳定性的增加所致。实际上，在酸化后期同糖酵解相关的几种酶的浓度开始增加，这有利于当生存环境中的pH值回复正常之后细胞快速恢复生长。

### 7 小结

乳酸菌可以利用的耐酸性机制有许多种。乳酸菌在低pH值下生存的最有效的途径就是完全避免在极端酸性环境中生长，显然这种方式不可能所有的乳酸菌都具有。对于提高食品安全来说，可以筛选具有高GAD活性的发酵剂菌株，能够最大程度地降低食品中残留谷氨酸的含量，从而减少可供不良细菌代谢的谷氨酸，这些细菌通过分解谷氨酸而延长在低pH值下生存的时间。当然也可以合成谷氨酸类似物，能够特异性的抑制或者竞争细菌的脱羧酶，从而使得人们可以不依赖发酵剂菌株的GAD活性来生产更安全的食品。对于解决酸奶后酸化来说，可以筛选或者构建低GAD活性的发酵剂菌株，从而降低其耐酸性，使其在低pH值下生长停滞，甚至死亡，这就可以避免酸奶在发酵成熟后发生后酸化。以上仅仅列出了最可能应用的例子，然而，虽然本综述中阐述了许多乳酸菌的抗酸性机制，但是开发新的技术来增加或者减少微生物在低pH值下的存活率，仍然会受益匪浅。

(参考文献26篇，刊略，需者可函索)

(编辑：高雁，snowyan78@tom.com)

...评论...

发  
表  
评  
论

\*40字以内

提交

重置