

乳酸鏈球菌素(Nisin)的應用限制

吳建威

水產試驗所水產加工組

Gram negative, G(-)

前言

雖然根據許多研究顯示，乳酸菌細菌素可做為食品加工之天然防腐劑使用，但是實際上其應用仍會遭到諸多限制，除了細菌素本身純化上的問題，導致生產成本偏高外，細菌素的真正效用仍會受到目標細菌的影響，因該些細菌以先天或後天上對細菌素存有拮抗性。以 nisin 為例，雖然它可抑制相當範圍的革蘭氏陽性菌[Gram positive, G(+)]，如 *Lactococcus*、*Streptococcus*、*Staphylococcus*、*Listeria* 和 *Mycobacterium* 以及一些產孢菌如 *Bacillus* 與 *Clostridium* 等孢子的成長，但是卻無法對革蘭氏陰性菌[Gram negative, G(-)]產生抑制能力。許多文獻記載，由於 G(-)菌天生具備抵抗性，因此影響到許多抑菌物質的功能。其原因到底何在？本篇將從其細胞結構上來加以探討。

革蘭氏陰性菌的抵抗機制

G(-)菌之所以對於細菌素具有先天的抵抗能力，可從其與 G(+)菌的細胞壁構造看出端倪。該兩個菌種之細胞膜外都包覆著一層肽聚糖 (peptidoglycan)，雖然 G(-)菌細胞壁的厚度比 G(+)菌來得薄，但 G(-)菌還擁有另外一層由磷脂質、蛋白質和脂多糖類 (lipopolysaccharides, LPS) 所組成的外膜 (outer membrane, OM)，可阻斷大部分的分子 (圖 1)。但是存在這層膜間有一個物質稱為孔洞蛋白 (porine)，可允許分子量小於 600 Da 的分子自由擴散進出。然而乳酸菌細菌素的分子最小的為 3 kDa 仍大於孔洞蛋白允許的範圍 (Abee et al., 1995)，所以無法達到它的作用目標—細胞膜。由於這層得天獨厚的天然屏障物，使得 G(-)菌具有與生俱來的抗抑菌物質的能力，其中即包含了 nisin。

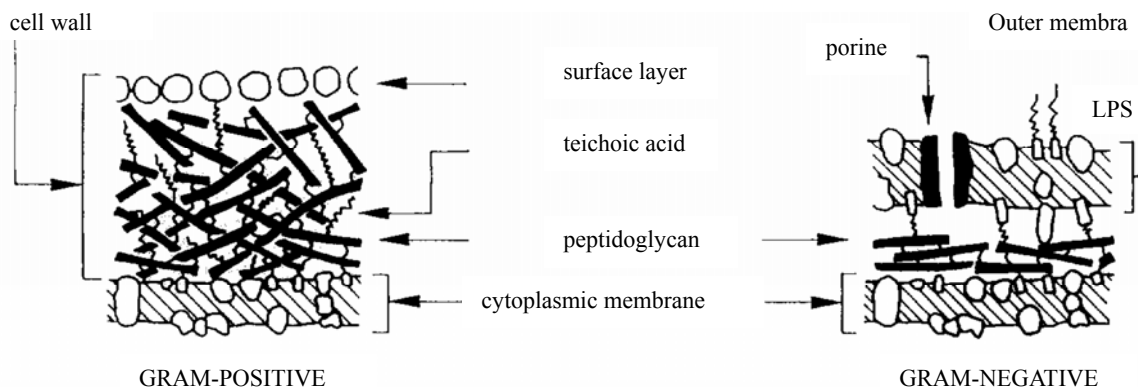


圖 1 革蘭氏陽性菌與陰性菌細胞外層概略圖 (Abee et al., 1995)

目前研究解決趨勢

倘若將這個天然屏障移除後，可發現 nisin 對這些菌亦具有抑制能力。Branen and Davidson (2004) 利用金屬螯合劑 (chelating agent) 以二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) 結合 nisin，探討 *Listeria monocytogenes*、*Escherichia coli*、*Salmonella enteritidis* 和 *Pseudomonas fluorescens* 的最小抑制濃度 (minimum inhibition concentration, MIC) 及最小殺菌濃度 (minimum bactericidal concentration, MBC)，結果發現單獨使用 EDTA 下對 *L. monocytogenes* 的 MIC 為 250 $\mu\text{g/mL}$ ，其他的 G(-) 菌則在 1,250 – 5,000 $\mu\text{g/mL}$ 範圍，但是 EDTA 本身對這些菌而言卻無殺菌力。

Nisin 對 *L. monocytogenes* 的 MIC 為 7.8 $\mu\text{g/mL}$ ，但無法抑制其他 G(-) 菌 ($> 46.9 \mu\text{g/mL}$)，結合 nisin 與 EDTA 後，對 *Escherichia coli* 的 MIC 量，在 EDTA 的量為 313 $\mu\text{g/mL}$ 時，nisin 可降至 31.3 $\mu\text{g/mL}$ ；一旦 EDTA 的量倍增時，nisin 即可降至 7.8 $\mu\text{g/mL}$ ，與 nisin 對 *L. monocytogenes* 的 MIC 相同。由此得知，結合這類的金屬螯合劑，nisin 還是具有抑制 G(-) 菌的能力。

LPS 層是構成 G(-) 菌抵抗 nisin 等抑菌物質的主因，在結構上，LPS 彼此間透過靜電力反應與二價離子如 Mg^{2+} 等形成穩固的 LPS 層，而此時 EDTA 的作用則將這些金屬離子予以螯合，導致 LPS 無法穩固聚集而被釋放出，結果只露出了磷脂質層，造成 OM 的去安定性，一旦 OM 出現了滲透性，一些疏水性物質，如 nisin 等物質就容易穿透過去，而到達細胞膜上產生抑菌效果 (圖 2) (Helander et al., 1997)。

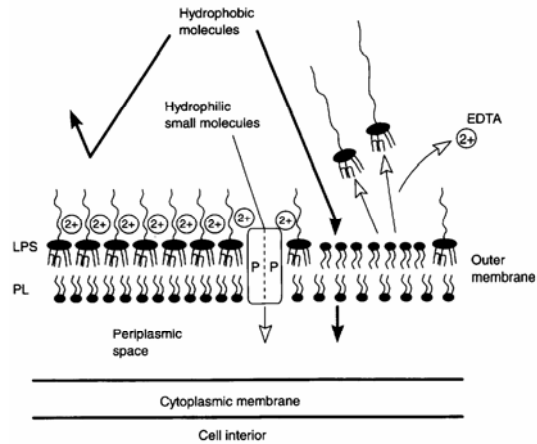


圖 2 革蘭氏陰性菌細胞外層概略圖 (Helander et al, 1997)

除了上述使用金屬螯合劑外，有學者利用其他的加工技術做為延長食品保存方法，例如利用大於 200 Mpa 的靜水壓 (hydrostatic pressure, HP) 能將一些巨分子物質的結構及功能完整性予以破壞，特別是那些細胞的細胞壁與細胞膜，接下來若結合 nisin 就可大幅抑制 G(-) 菌。如 Kachayanand et al. (2004) 利用 *Escherichia coli* O157 : H7 與 *Salmonella typhimurium* 做為指示菌觀察 HP 作用，結果發現經 HP 處理的菌數可由 9 log CFU/mL 降到 1 log CFU/mL，再結合 nisin 與 pediocin AcH 混合細菌素處理後，則已偵測不到活菌體。

結論

為了使細菌素對 G(-) 菌產生抑制的能力，勢必要破壞其天然屏障，如此才有辦法抑制 G(-) 細菌，所以未來除了結合不同的處理方式來抑制 G(-) 菌是使用乳酸菌細菌素做為抑制劑所必須考慮的方式，尋找乳酸菌細菌素的天然輔助物質也是值得研究的領域。