

培养基、保护剂和饥饿处理对冻干乳酸菌存活性的影响

靳志强^{1,2}, 李平兰^{2,*}

(1. 长治学院生化系, 山西 长治

046011; 2. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京

100083)

摘 要: 研究了培养基、冻干保护剂、饥饿处理对冻干乳酸菌存活性的交互影响。结果表明, 培养液中加入 NaCl、干燥介质中添加冻干保护剂蔗糖、冻干前对 *L. bulgaricus* S-1 细胞饥饿, 这三种处理都可以提高冻干菌体在贮藏期的存活性; 然而当培养液中含有 NaCl 时, 保护剂蔗糖以及对细胞饥饿处理并不能进一步提高该培养液中生长的细胞在贮藏期的存活性。

关键词: 乳酸菌; 存活性; 培养基; 保护剂; 饥饿处理

Effects of Growth Medium, Cryoprotector and Starvation on Survival during Storage of Freeze-dried Lactic Acid Bacteria

JIN Zhi-qiang^{1,2}, LI Ping-lan^{2,*}

(1. Department of Biochemistry, Changzhi College, Changzhi 046011, China

2. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: Interactive effects of growth medium, cryoprotector and starvation treatment on bacterial survival during the storage of freeze-dried lactic acid bacteria have been studied. Three factors, including addition of NaCl to the growth medium, addition of sucrose to the drying medium and starvation of S-1 in the stationary phase, could help survive during storage in the dried state. However, in the case of NaCl in the growth medium, not only sucrose in the drying medium seemed to be largely ineffective in further increasing the survival rate of dried cells throughout storage, but also starvation was rather inadequate in protecting dried cell survival during storage.

Key words lactic acid bacteria; survival; growth medium; cryoprotector; starvation

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)07-0296-04

乳酸菌培养物在冷冻干燥和随后长期的贮藏过程中, 最大限度的保持乳酸菌的活性无论从经济角度还是从技术角度来讲都是至关重要的。微生物细胞的存活取决于许多因素, 包括微生物起始浓度、培养基、非致死性处理、冻干保护剂和复水环境等^[1-3]。

保护剂可以减轻冷冻干燥或复水对细胞的损害, 尽可能保持原有的各种生理生化特性和生物活性。筛选适宜的冻干保护剂对细胞在冻干和贮藏过程中的存活性至关重要。

目前研究的重点主要放在保护剂对乳酸菌存活率的影响上, 但培养基也是一个关键因素。可混溶溶质的积累、胞外多糖的产生和膜的脂肪酸的改变等因素可以解释各种培养基对冻干菌体的保护作用^[4-6]。可混溶溶质

是一些有机小分子, 溶解性较好, 高渗环境下在细胞质内可以积累到一个高的水平。可混溶溶质具有渗透保护作用, 诸如甜菜碱、肉碱、甘露糖等可混溶溶质在干燥过程中对乳酸菌的保护作用已被报道^[4]。Glaasker 等提出, 加入 NaCl 和蔗糖的培养液都可以使可混溶溶质在细胞内产生和富集^[7]。

另外, 外界环境的改变使菌体通过代谢调控做出反应, 从而使细胞的抗性增强, 例如细胞生长的低 pH 值环境、细胞生长期的饥饿处理等可以提高细胞对冷冻干燥的抗性^[8-9]。Giard 等研究表明, 在生长过程中由于葡萄糖耗尽引起的营养匮乏使粪肠球菌对其它逆境产生了巨大的耐受力^[8]。

本研究就添加蔗糖或氯化钠的培养液、保护剂蔗

收稿日期: 2007-02-28

*通讯作者

基金项目: 国家“863”计划目标导向性项目(2006AA10Z343)

作者简介: 靳志强(1976-), 男, 助教, 硕士, 研究方向为食品微生物与发酵。

糖、细胞的饥饿处理对乳酸菌在贮藏过程中存活性的交互影响进行了探讨,为进一步研究冻干乳酸菌的细胞损伤和保护机理提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

Lactobacillus delbeueckii subsp. *bulgaricus* S-1 (简称 S-1) CGMCC 1358 (专利保藏菌种) 以冻干菌粉的形式贮存于 -20°C 的冰箱中,用于所有的实验中。

1.2 培养基

MRSa: 标准 MRS; MRSb: 将 MRSa 中的 20g 葡萄糖替换为 10g 葡萄糖+10g 蔗糖; MRSc: MRSa+5g 氯化钠, NaCl 对 MRS 培养液中生长的 S-1 的最小抑制剂量 (MIC) 为 6.25g/L, 因此选择 5g/L NaCl 的添加浓度, 该添加量仍然可以使细胞在 40°C 下生长良好。

1.3 仪器

YX-280D 自动蒸汽消毒器 江阴市滨江医疗设备厂; DNP-9162 电热恒温培养箱 上海精宏实验设备有限公司; SCL-1300 型垂直流洁净工作台 北京赛伯乐实验仪器有限公司; E 系列生物显微镜 麦克奥迪实业集团有限公司; GL-20G-II 高速冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂; FD-1 冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司。

1.4 方法

1.4.1 细胞制备

菌株 S-1 在培养液 MRSa、MRSb 和 MRSc 中 40°C 培养 12h 进入稳定期后, 8000r/min 10min 离心收集, 磷酸缓冲液清洗两次。每种培养液中所得菌体沉淀都分为三组: a 组样品悬浮于无菌的脱脂奶中作为对照; b 组样品在无菌水中室温下饥饿处理 20min, 然后悬浮于无菌的脱脂奶中; c 组样品悬浮于添加冻干保护剂蔗糖 (10g/L) 的脱脂奶中。细胞悬浮液在室温下平衡 20min, 不停振荡以使细胞适应。

1.4.2 冻干与贮藏

装有 1ml 细胞悬浮液的小瓶放置于 -20°C 冰箱中冻结 24h。然后在冻干机中 -45°C , 1Pa 压力下干燥 24h。冻干菌粉密封避光保存于室温下。

1.4.3 菌株 S-1 在冻干和贮藏过程中存活性的测定

冻干前后及在贮藏期每隔半个月, 随机取出样品用 11% 的脱脂奶复水到原体积, 然后梯度稀释倾倒在平板上进行计数。

2 结果与分析

许多因素影响到乳酸菌在冻干和贮藏过程中的存活性。在本研究中, 就添加蔗糖或氯化钠的培养液、保

护剂蔗糖、细胞的饥饿处理对 S-1 在贮藏过程中存活性的交互影响进行了探讨, 实验结果如图 1~3 所示。

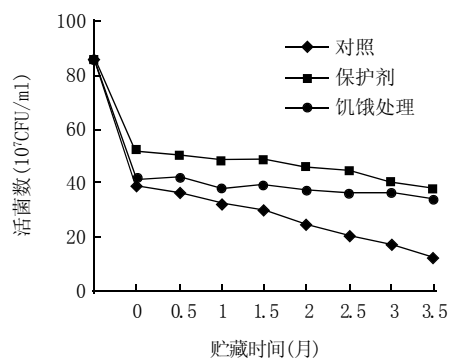


图1 MRSa 培养液中生长的细胞在贮藏过程中的存活性
Fig.1 Cellular survival in MRSa culture medium during storage

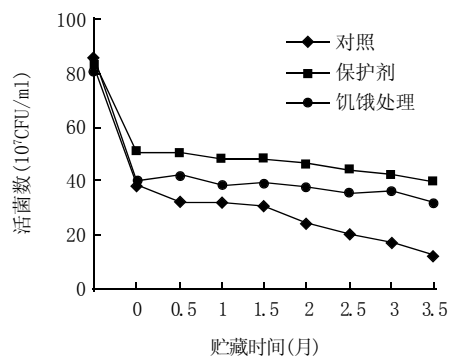


图2 MRSb 培养液中生长的细胞在贮藏过程中的存活性
Fig.2 Cellular survival in MRSb culture medium during storage

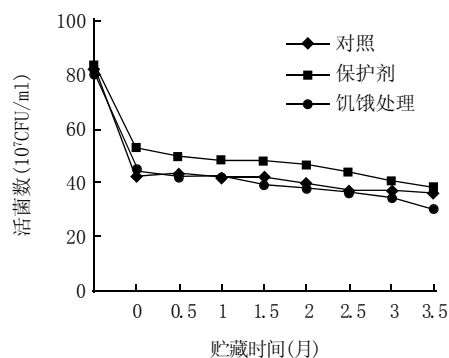


图3 MRSc 培养液中生长的细胞在贮藏过程中的存活性
Fig.3 Cellular survival in MRSc culture medium during storage

2.1 生长培养基的影响

比较图 1~3 中的对照处理, 可以看出 S-1 在贮藏期的存活性与培养液的成分密切相关。在贮藏期间, MRSa 和 MRSb 中生长的 S-1 的存活率不断下降, 在贮藏后期下降更为迅速, 二者之间没有显著差异。添加氯化钠的培养液 (MRSc) 中生长的 S-1 在贮藏期的存活率虽然也呈下降趋势, 但下降平缓。与 MRSa 和 MRSb 中生长的 S-1 的存活率相比, MRSc 中生长的 S-1 在贮藏

末期的存活率显著高于前两者。

在培养液中加入氯化钠或蔗糖等化合物,提高了渗透压,降低了水分活度。在此高渗环境下,诸如甜菜碱、肉碱等可混溶溶质在胞内积累,从而使细胞可以重建渗透平衡^[10]。由于可混溶溶质在细胞处于不利条件下可以稳定蛋白,因此对高渗环境和干燥过程的乳酸菌都有益处^[11]。

本研究中,向培养液中加入氯化钠或蔗糖提高培养液的同渗容摩,对S-1在贮藏过程中的稳定性有不同的影响,只有含NaCl的MRS培养液中生长的细胞在贮藏过程中才具有更高的存活率。有研究证实,植物乳杆菌和保加利亚乳杆菌在上述两种高渗培养液中积累的可混溶溶质并不相同^[7]。可混溶溶质的不同可以一定程度上解释本研究中两种培养液内生长的S-1在贮藏阶段表现出不同的存活性。

2.2 将蔗糖加入干燥介质(脱脂奶)中的影响

由图1、2看出,冻干保护剂蔗糖可以显著增加MRSa和MRSb中生长的S-1在冻干过程中和贮藏期的存活性。然而从图3看出,MRSc培养液中生长的S-1在三种干燥条件下均表现出很好的存活性。保护剂蔗糖似乎并不能进一步提高冻干细胞在贮藏期间的存活性。

Leslie等研究表明,蔗糖可以保护脂质体、生物膜以及一些完整的细胞免于冷冻干燥的有害作用^[12]。由于在冻干过程中形成了高粘性、低流动性的玻璃态基质,而且束缚在蛋白上的溶质在蛋白质周围的水化层被去除后可以充当水分子的替代物,因此保护了蛋白质的功能,从而提高了细胞的存活率^[13]。除了保护干燥过程中蛋白质的结构和功能以外,蔗糖和其他碳水化合物降低了细胞膜的相变温度,阻止了相变,因此防止了复水时细胞内容物的泄漏^[13]。

本研究中,保护剂蔗糖对MRSc培养液中生长的S-1在贮藏期并没有显示出有效的保护作用,可能是因为蔗糖的保护效果被培养液的保护效果所平衡的缘故。延长贮藏期,蔗糖加入干燥介质中的积极的保护作用可能体现出来。

2.3 饥饿处理的影响

细胞的饥饿处理对S-1在贮藏过程中的存活性的影响因培养液不同而不同。如图3所示,与对照相比,当S-1生长在添加了氯化钠的培养液(MRSb)中时,饥饿处理对贮藏期冻干细胞的保护作用并不明显;从图1、2看出,与对照相比,饥饿处理对MRSa和MRSb中生长的S-1则表现出积极的保护作用。

Beney等报道,热激产生的热激蛋白对膜蛋白和脂质体具有稳定效果^[14]。正如热激和冷激对乳酸链球菌的作用一样,饥饿处理对贮藏期冻干细胞的保护作用可能归因于:(1)应激反应引起细胞膜的变化,膜的变化增强

了细胞对冷冻和干燥的忍耐力。(2)合成应激蛋白,应激蛋白作为高分子稳定物,可以增强水分子的氢键结构,从而提高高分子周围非冻结水的水平^[15]。

培养液MRSb和MRSc中生长的细胞所积累的可混溶溶质的不同可能使细胞处于不同的生理状态,从而对饥饿处理引起的应激表现出不同的忍耐力。在MRSb中生长的S-1胞内富集了可混溶溶质,由于可混溶溶质的保护作用,对细胞饥饿处理20min可能不足以在细胞内产生任何应激反应。

3 结 论

向培养液中加入电解液(NaCl)或非电解液(蔗糖)来提高培养液的同渗容摩,二者对S-1菌体贮藏期间的存活率有不同的影响,只有含NaCl的MRS培养液中生长的细胞在贮藏过程中才具有更高的存活率;保护剂蔗糖、冻干前对S-1细胞饥饿处理都可以提高冻干菌体在贮藏期间的存活性;然而当培养液中含有NaCl时,保护剂蔗糖以及对细胞饥饿处理并不能进一步提高该培养液中生长的细胞在贮藏期间的存活性。

乳酸菌在冷冻、干燥和贮藏过程中,细胞的损伤和保护机理是相当复杂的,至今尚未完全搞清楚。由于众多原因,不同研究的实验数据加以比较是困难的,大多数报道的研究重点是干燥过程中的存活而不是贮藏期间的存活。此外,由于不同研究中应用的微生物菌种不同、干燥方法不同和保护剂的浓度不同,造成文献中研究结果间的差异。然而,多数研究均表明,为给贮藏期间的冻干细胞提供保护,培养基和保护剂的适当选择是必需的。需要强调指出的是,每一保护剂对每一乳酸菌菌株的存活率的影响都应当逐一确定。而且,搞清楚不利环境因素(例如冷冻干燥、贮藏、复水)给细胞带来的损伤以及应激蛋白(尤其是那些在干燥和贮藏期间提供抗性的应激蛋白)的诱导产生,这对乳酸菌菌种的保存及商品化直投式发酵剂的生产均具有十分重要的理论与实践意义。

参考文献:

- [1] COSTA E, RSALL J, TEIXIDO N, et al. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* CPA-2 subjected to freeze-drying[J]. *Applied Microbiology*, 2000, 89: 793-800.
- [2] CARVALHO A S, SILVA J, HO P, et al. Effect of various growth media upon survival during storage of freeze-dried *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus durans*[J]. *Applied Microbiology*, 2003, 94: 947-952.
- [3] DESMOND C, STANTON C, FITZGERALD G F, et al. Environmental adaptations of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying[J]. *International Dairy Journal*, 2001, 11: 801-808.
- [4] O'CALLAGHAN J, CONDON S. Growth of *Lactococcus lactis* strains at low water activity: Correlation with the ability to accumulate glycine

鸡胸大肌中焦磷酸酶的分离纯化及特性研究

姚蕊, 彭增起*, 周光宏, 何燕, 靳红果

(南京农业大学 教育部肉品加工与质量控制重点实验室, 江苏 南京 210095)

摘 要: 经匀浆、0.6 mol/L NaCl 提取、硫酸铵分级分离、DEAE-纤维素离子交换柱层析, 从鸡胸肉中纯化了焦磷酸酶。该酶有较强的底物专一性, 只对添加到肉中的焦磷酸四钠发生作用。 Mg^{2+} 不仅是其激活剂, 还对酶的稳定性发挥作用, Ca^{2+} 、EDTA- Na_2 抑制酶活性。以焦磷酸四钠为底物, 测得该酶的最适 pH 为 7.4, 最适温度为 40 °C。

关键词: 鸡胸肉; 焦磷酸酶; 分离纯化; 性质

Study on Isolation and Purification of Pyrophosphatase from Chicken Breast and Its Properties

YAO Rui, PENG Zeng-qi*, ZHOU Guang-hong, HE Yan, JIN Hong-guo

(Key Laboratory of Animal Products Processing and Quality Control, Ministry of Education,
Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The pyrophosphatase was isolated and partially purified from chicken breast, by means of homogenation, 0.6 mol/L NaCl extractions, ammonium sulfate precipitation, and ion-exchange chromatography on DEAE cellulose column. This enzyme catalyzes the hydrolysis of sodium pyrophosphate but not that of other phosphate esters. Mg^{2+} not only is its activator, but also stabilizer, Ca^{2+} and EDTA- Na_2 have inhibiting effects. With PPI as the substrate of pyrophosphatase. Its optimum pH and temperature are 7.4 and 40 °C respectively.

Key words chicken breast; pyrophosphatase; isolation and purification; properties

中图分类号: TS201.25

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)07-0299-06

收稿日期: 2007-01-26

*通讯作者

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(Q200633)

作者简介: 姚蕊 (1981-), 女, 硕士研究生, 研究方向为畜产品加工与质量控制。

- and betaine[J]. International Journal of Food Microbiology, 2000, 55(3): 127-131.
- [5] RUAS-MADIEDO P, HUGENHOLTZ J, ZOON P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria[J]. International Dairy Journal, 2002, 12: 163-171.
- [6] MURGA M L F, CABRERA G M, FONT D E V G, et al. Influence of growth temperature on cryotolerance and lipid composition of *Lactobacillus acidophilus*[J]. Applied Microbiology, 2001, 88: 342-348.
- [7] GLAASKER E, STEEG P F T, KONINGS W N, et al. Physiological response of *Lactobacillus plantarum* to salt and nonelectrolyte stresses[J]. Bacteriol, 1998, 180: 4718-4723.
- [8] GIARD J F, HARTKE A, FLAHAUT S, et al. Starvation-induced multiresistance in *Enterococcus faecalis* JH2-2[J]. Current Microbiology, 1996, 32: 264-271.
- [9] SILVA J, CARVALHO A S, DOMINGUE P, et al. Effect of the pH of growth on the resistance of *Lactobacillus delbrueckii* spp. *Bulgaricus* to stress conditions[J]. Applied and Environmental Microbiology, submitte, 2003.
- [10] BAYLES D O, WILKINSON B J. Osmoprotectants and cryoprotectants for *Listeria monocytogenes*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2000, 30: 23-27.
- [11] ROEBLER M, MUILE V. Osmoadaptation in bacteria and archaea: common principles and difference[J]. Environmental Microbiology, 2001 (3): 743-754.
- [12] LESLIE S B, ISRAELI E, LIGHTHART B, et al. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61: 3592-3597.
- [13] CARPENTER J E, ARAKAWA T, CROWE J H, et al. Interactions of stabilizing additives with proteins during freeze-thawing and freeze-drying[J]. Developments in Biological Standardization, 1991, 74: 225-239.
- [14] BENEY L, GERVAIS P. Influence of the fluidity of the membrane in response of microorganisms to environmental stresses[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 57: 34-42.
- [15] BROADBENT J R, LIN C. Effect of heat shock or cold shock treatment on the resistance of *Lactococcus lactis* to freezing and lyophilization[J]. Cryobiology, 1999, 39: 88-102.