

海藻糖对乳酸菌的抗逆保护研究

戴秀玉 沈义国 周 坚

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要:研究了在冷冻干燥、高温及冻融等胁迫条件下,海藻糖对嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)和植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)菌体细胞的保护作用。结果表明在冷冻干燥过程中,海藻糖保护的细胞存活率分别达75%和33%,而对照分别为19%和1%;用90°C高温处理干燥状态和溶液状态的嗜热链球菌,证明海藻糖能明显提高细胞的耐热性;用冻融法反复处理嗜热链球菌4次和8次,加海藻糖保护的细胞存活率显著高于对照。在扫描电镜下观察这些冻融细胞,加海藻糖保护的菌体细胞饱满、完整,对照则有明显的破裂、塌缩,细胞间有丝状物粘连,该结果从细胞亚显微表面结构的变化揭示了海藻糖对细菌细胞的抗逆保护作用。

关键词:海藻糖,乳酸菌,抗逆保护

中图分类号:Q93 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2001)02-0046-05

STUDY ON THE TREHALOSE STRESS PROTECTION ON STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS AND LACTOBACILLUS PLANTARUM

DAI Xiu-Yu SHEN Yi-Guo ZHOU Jian

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract: The viability of freeze-dried cells of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus plantarum* by adding different stabilizer and protectants such as skim milk, sucrose and trehalose were investigated. When the bacteria were dried with 150mmol/L trehalose, 75% of *S. thermophilus* and 33% of *L. plantarum* cells were survived, comparing with control of 19% and 1% respectively. When *S. thermophilus* was exposed at 90°C, the cells with trehalose increased tolerance to high temperature. When *S. thermophilus* freeze-thawing for 4 and 8 cycles, the survival was much higher than that of without trehalose protected. Scanning Electro-microscope pictures showed that the cells with trehalose, appeared as normal, but those without the sugar were broken or collapsed. The data confirmed that the disaccharide could protect bacteria against stress conditions.

Key words: Trehalose, *S. thermophilus*, *L. Plantarum*, Stress protection

嗜热链球菌和植物乳杆菌是发酵制作酸奶的重要微生物。研究海藻糖对食品微生物在生产、保存、运输过程中可能遭受的冷冻、干燥、高温、冻融等胁迫环境时的保护作用,将对乳制品生产开发和乳酸活菌制剂的贮存具有积极的意义。

冷冻干燥是保存生物样品的常用方法,但它往往引起蛋白变性和细胞活力下降,在冷冻或冷冻干燥前加入脱脂牛奶、甘油、蔗糖和二甲基亚砜(DMSO)等对生物样品具有保护作用^[1]。近年来研究发现,海藻糖(trehalose)是一种很好的活性物质保护剂。海藻糖是由两个葡萄糖分子经 $\alpha, \alpha-1 \rightarrow 1$ 糖苷键接的非还原性双糖,许多微生物、低等动、植物在遭受不良生活环境时,通过体内调节合成海藻糖以抵御逆境胁迫^[2];研究表明外加海藻糖能够降低冷干过程对细胞膜、脂质体等的伤害作用^[3]。尽管海藻糖保护的物理机制仍有待阐明,但利用这一特性,海藻糖已被开发用于食品、化妆品、药品、保健品、酶和疫苗等多种活性物质的保存^[4-5]。本文报道海藻糖对乳酸菌的抗逆保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:嗜热链球菌(*S. thermophilus*)AS1.1864和植物乳杆菌(*L. plantarum*)AS1.1856为中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC)菌株,本实验室保存。

1.1.2 培养基:MRS培养基^[6]。

1.1.3 试剂和仪器:海藻糖由本实验室制备,纯度 $\geq 99\%$ 。LGJ-冷冻干燥机由军事医学科学院实验仪器厂制造;S-570型扫描电镜、IB-3离子溅射仪为日本日立公司生产。

1.2 方法

1.2.1 菌种的培养和收集:将实验菌株接入100mL MRS液体培养基,37°C静止培养36h至细胞稳定期,5000r/10min离心收集菌体,用150mmol/L(pH6.8)磷酸缓冲液洗涤2次后调节菌浓度至 2×10^9 CFU/mL,取1.5mL等量分装于无菌离心管中,离心,分别重悬于150mmol/L海藻糖、150mmol/L蔗糖、10%脱脂牛奶和生理盐水。

1.2.2 抗逆处理和存活率测定:按照实验设计和要求,将上述制备的细胞分别经冷冻干燥、高温及冻融处理。样品经适当稀释后涂布于MRS培养基,每一稀释度做3个重复,平皿置37°C培养36h,活菌计数。细胞存活率计算(%):处理后活菌数(mL)/处理前活菌数(mL) $\times 100$ 。

1.2.3 电镜样品的制备:5000r/10min离心收集细胞,菌体用150mmol/L(pH6.8)磷酸缓冲液洗涤2次,加2.5%戊二醛溶液固定2h,离心,再用缓冲液洗涤3次,在冰浴中依次用从低到高不同浓度的乙醇脱水,每次10min,再用100%乙醇脱水1次,经CO₂临界点干燥后于离子溅射仪中表面喷金,扫描电镜下进行观察。

2 结果与讨论

2.1 不同保护剂对菌体冷冻干燥保护作用的比较

将加入不同保护剂的嗜热链球菌和植物乳杆菌于-40°C真空冷冻干燥12h,用未经冷冻干燥处理的培养细胞与上述样品同时稀释后取0.1mL涂布于MRS培养基,置37°C温箱培养,以未经冷干的活菌细胞基数为100,计算存活率,结果如图1所示。添加海藻糖的嗜热链球菌和植物乳杆菌的存活率比生理盐水对照分别提高了3倍和32倍。以蔗糖为保护剂,比对照分别提高2.5倍和20倍,但海藻糖比蔗糖具有更好的冷干保护效果。用脱脂牛奶作保护剂,存活率与蔗糖的相近,说明奶粉本身是一种较好的保护剂。同时使用脱脂奶粉和蔗糖或海藻糖时,

其保护效果大大加强。

将加有上述保护剂的冷干菌粉放置室温,间隔一定时间取样涂平皿计算活菌数,60d后加海藻糖保护菌株的存活率是对照的100倍以上,而同时使用加有脱脂奶粉的海藻糖或蔗糖保护的细胞存活率比单独使用的奶粉保护剂分别提高了1.5~10倍.说明随着放置时间的延长,海藻糖和蔗糖对细胞存活率影响更加明显.此外,植物乳杆菌对冷干等逆境的耐受力极低,不易培养及观察存活率,以下实验均以嗜热链球菌为材料进行。

2.2 双糖对嗜热链球菌的耐热性保护

为了进一步比较海藻糖和蔗糖这两种双糖对细菌的抗逆保护,我们将嗜热链球菌培养物离心后分别重悬于150mmol/L海藻糖和150mmol/L蔗糖溶液,制成冷干菌粉和菌悬液,经50°C、60°C、70°C、80°C、90°C不同温度处理后涂平皿计算活菌数,图2A为50°C处理60min、图2B为90°C处理60min后的存活率比较。由图2看出,50°C处理60min海藻糖和蔗糖保护

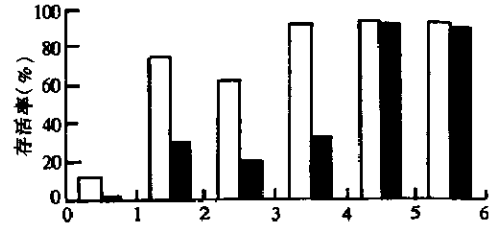


图1 不同保护剂对菌体冷干保护作用比较

□ 嗜热链球菌, ■ 植物乳杆菌

1 生理盐水, 2 海藻糖, 3 蔗糖,

4 脱脂奶粉, 5 海藻糖和奶粉, 6 蔗糖和奶粉

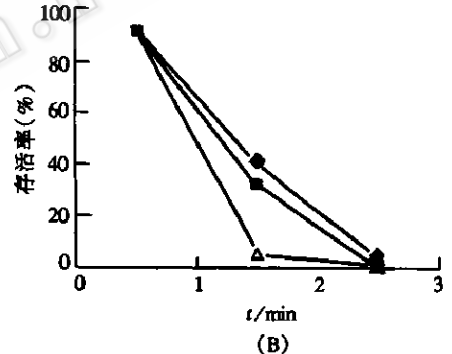
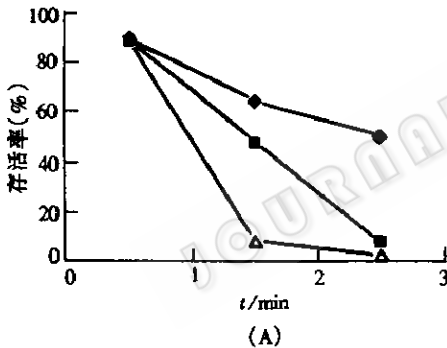


图2 双糖对干燥状态下菌体耐热性的保护

(A) 50°C 处理 60min

(B) 90°C 处理 60min

◆-海藻糖, -■-蔗糖, -△-生理盐水

菌的存活率分别达50%和8%,经90°C处理60min,蔗糖保护菌已全部死亡,海藻糖保护菌仍有9%的细胞存活,表明海藻糖对干燥状态下细菌细胞的耐热性有重要保护作用,且这种作用明显高于蔗糖。

为了观察比较溶液状态下海藻糖和蔗糖的抗热保护作用,我们将上述制备的菌悬液分别进行经50°C、70°C、80°C、90°C不同温度处理,发现存活率随温度的提高而急剧下降,图3结果为90°C高温处理5min和20min的活菌计数图(50°C、70°C、80°C处理菌存活率未列)。

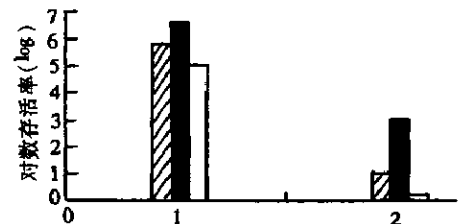


图3 双糖对溶液状态下菌体耐热性的保护

1 90°C 处理 5min, 2 90°C 处理 20min

▨蔗糖, ■ 海藻糖, □ 生理盐水

由图3可见,细胞对瞬时高温(90°C 5min)尚能忍受,延长处理时间至20min时对照菌全部死亡,当加有蔗糖的菌液中尚有 10^1 细胞存活时,加海藻糖保护的则仍有 10^3 的细胞存活,说明双糖特别是海藻糖对溶液状态的细胞也具有一定的抗热保护作用。经同样高温处理溶液状态的细胞存活率比干燥状态的低3~4个数量级,这可能是因为高温下水分子剧烈运动、酶失活、代谢紊乱等,使得细菌耐热性降低,导致细胞大量死亡。海藻糖对干燥状态下细胞的耐高温保护效果更好。

2.3 海藻糖对嗜热链球菌的冻融保护

除高温外,冻融是微生物可能遭遇的另一种胁迫,我们试验了冻融条件下海藻糖对细胞的保护作用。用150mmol/L海藻糖、150mmol/L蔗糖和生理盐水溶液分别悬浮细胞,置-30°C冷冻1h后37°C融化20min,如此反复4次、8次,观察细胞存活数。图4以未作冻融处理的细胞存活数为100%计,添加海藻糖保护菌经冻融4次、8次后的细胞存活数分别为95%和74%;蔗糖的分别为55%和36%;生理盐水对照分别降至19%和2%。可见海藻糖具有明显的保护细胞抵抗冻融的作用。

2.4 冻融细胞的扫描电镜观察

冻融涉及冷冻及复水两个过程,Rudolph等^[7]认为冷冻对微生物的损伤主要有冰晶机械应力和冷冻脱水导致细胞膜相变成为非层状结构,复水时膜蛋白分离引起细胞内容物泄漏。为了能够直观地观察海藻糖对冻融微生物的保护作用,我们将冻融细胞按材料与方法所述制备成电镜样品并在扫描电镜下观察。

图5-A为加海藻糖保护的菌悬液冻融8次的电镜照片,显示细胞饱满、均匀、分散性好;图5-B是未加海藻糖的对照,可以看出,细胞间有清晰的丝状物相互粘连、变形成团,显然因细胞破裂后内容物泄露所致。电镜结果进一步证明在冻融过程中海藻糖能够有效地保持细胞膜的渗透屏障和结构完整性,避免细胞内容物的外漏。

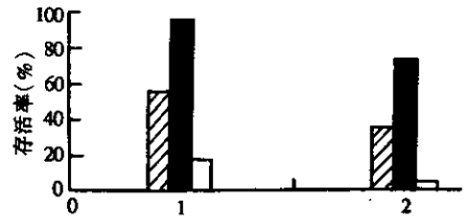


图4 海藻糖对冻融细胞的保护

1 冻融4次, 2 冻融8次

▨ 蔗糖, ■ 海藻糖, □ 生理盐水

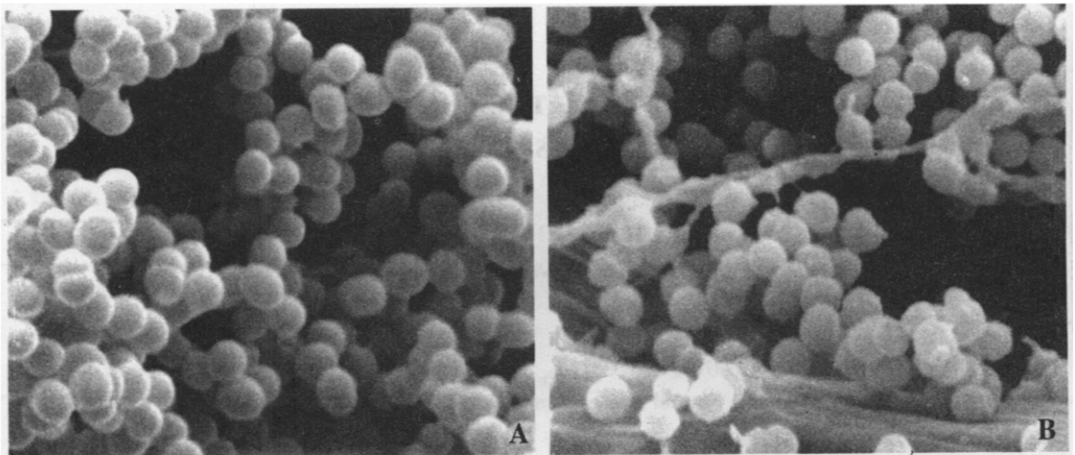


图5 冻融细胞的扫描电镜照片(8000×)

以上实验数据说明海藻糖和蔗糖都能提高乳酸菌的冻干存活率,但海藻糖的保护效果最佳。海藻糖能显著提高乳酸菌对高温和冻融等逆境的耐受性,其耐受程度因菌株不同而有差异。海藻糖对干燥状态菌体细胞的保护作用显著优于液体状态的。扫描电镜结果提供了在冻融胁迫条件下不加海藻糖保护的细胞受损、破坏的直观证据。证明海藻糖对乳酸菌在遭受冷冻干燥和再复水时能有效地保存细胞的内容物,使细胞存活。这些结果对乳酸菌应用行业,如食品、饮料的发酵及保健品、药品生产中,活菌产品的质量稳定性和新产品的开发、研制有一定的理论指导作用。

参 考 文 献

- [1] Simione F P, Brown E M. 2nd ed. American Type Culture Collection, Rockville MD, USA. 1991.
- [2] Kaasen I, Falkenberg P, Styrvoid O B, *et al.* J Bacteriol. 1992, 174:889~898.
- [3] Crowe L M. Biophysicoc J. 1996, 71:2087~2093.
- [4] 戴秀玉,程 苹,周 坚,等. 微生物学通报,1995,22:102~104.
- [5] 黄成垠,安国瑞,戴秀玉,等. 微生物学通报,1997,24:341~343.
- [6] 周宇光. 中国普通微生物菌种保藏管理中心菌种目录(第三版). 北京:中国农业科技出版社,1997.
- [7] Rudolph A S, Crowe J H. Cryobiology, 1985, 22:367~377.