

环境因素对酸奶菌株自溶的影响

李艾黎¹ 邓凯波² 霍贵成^{2*}

(1. 东北农业大学食品学院 哈尔滨 150030)
(2. 乳品科学教育部重点实验室 哈尔滨 150030)

摘要: 本论文探究了培养条件对德氏乳杆菌保加利亚亚种 KLDS 1.9201 和唾液链球菌嗜热亚种 KLDS 3.021 自溶的影响。结果表明, 随着培养温度(30℃~55℃)、盐浓度(0%~5%)以及酸度值(pH 5.0~7.5)的升高, KLDS 1.9201 和 KLDS 3.0201 不仅自溶度相应增大, 而且在磷酸缓冲液中释放的核酸和蛋白含量也呈递增趋势。高温 55℃、pH 7.5 和 5%乳酸盐浓度的培养环境使 KLDS 1.9201 和 KLDS 3.0201 在培养 45 h 后的自溶度分别达到了 55%和 36.3%, 显著高于低自溶培养环境下(30℃、pH 5.5 和 0%乳酸盐) KLDS 1.9201 和 KLDS 3.0201 的自溶度 9.96%和 8.6% ($P<0.05$)。透射电镜观察表明高自溶和低自溶培养条件对酸奶菌株菌体形态的影响是截然不同的, 且酸奶菌株自溶时发生的细胞壁降解程度与自溶光密度值相对应。

关键词: 酸奶菌株, 培养条件, 自溶

Effect of the Cultivation Conditions on the Autolysis of Yoghurt Strains

LI Ai-Li¹ DENG Kai-Bo² HUO Gui-Cheng^{2*}

(1. Food Science & Technology College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)
(2. Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract: The influences of cultivated conditions on the autolysis of *Lactobacillus delbeueckii* subsp. *bulgaricus* (KLDS 1.9201) and *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (KLDS 3.0201) were studied in this paper. The results indicated that temperature shift (from 30℃ to 55℃), pH shift (from pH 5.0 to pH 7.5) and salt concentration shift (from 0% to 5%) not only increased the autolysis rate of KLDS 1.9201 and KLDS 3.0201, but also led to increase nucleic acid and protein released by strains. Extensive autolysis of yoghurt strains occurred when incubated in 5% salt concentration at 55℃ and pH 7.5, the extent of autolysis of KLDS 1.9201 and KLDS 3.0201 reached 55% and 36.3% respectively, significantly higher than extent of autolysis of KLDS 1.9201(9.96% lysis) and KLDS 3.0201(8.6% lysis) when incubated in 0% salt concentration at 30℃ and pH 5.5 ($P<0.05$). As observed by transmission electron microscopy, there were remarkable differences on cell lysis between the optimal and suboptimal culture conditions. The observations revealed that cell-wall degradation occurred concomitantly with cell autolysis and were well correlated to optical density measurements during bacterial cell autolysis.

Keywords: Yoghurt strains, Cultivated conditions, Autolysis

在生产酸奶发酵剂时我们常遇到的问题是, 酸奶菌株在密度培养过程中总是受到细胞自溶的不良影响, 因而很难使活菌数达到令人满意的增殖水平。通常把微生物受自身自溶酶类作用开始裂解细胞壁肽聚糖网络结构的过程称为自溶, 其典型特征是原生质体细胞裂解和细胞死亡^[1]。Kang等^[2]证明了自溶酶确实参与了细胞的分裂过程。Buist等^[3]在乳球菌MG1363菌株中发现了一种自溶素-AcmA胞壁质水解酶, 若将AcmA去除可以有效防止菌体自溶。但遗憾的是目前人们仍然不清楚自溶酶的调控机制。

许多条件可以引发自溶, Gianluigi S等^[4]初步推断在营养条件缺乏或在高温下, 微生物的自溶产物可为其后代的生长提供营养源。Rao MS等^[5]在高盐浓度和不同初始pH环境下研究4种乳杆菌的自溶动力学, 发现4%盐浓度和pH 6.0~6.6范围内乳酸菌自溶程度较高。另外, 除了菌株间的遗传差异外, 培养阶段也是影响自溶的重要内在因素, 冯镇^[6]研究结果表明乳酸杆菌LB-3由迟滞期至对数生长期的生长过渡时期内自溶度最大, 有73%的菌体发生自溶。

目前国内在细胞自溶这方面的研究主要集中于啤酒工业的酵母细胞^[7], 故本文通过研究典型酸奶菌株的自溶特性, 为今后酸奶发酵剂的工业化生产提供一定理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验菌种

乳杆菌属德氏乳杆菌保加利亚亚种 KLDS 1.9201 和链球菌属唾液链球菌嗜热亚种 KLDS 3.021 为东北农业大学乳品科学教育部重点实验室提供。

1.2 仪器和设备

2.5 L 全自动机械搅拌发酵罐(瑞士比欧)、UV-2401PC 分光光度计(日本岛津株式会社)、pH 计(梅特勒—托利多 Delta320)、低温冷冻离心机(上海离心机机械研究所)。

1.3 实验方法

1.3.1 菌体培养: 实验菌株按3%接入MRS发酵培养基中, 在2.5 L发酵罐中流加20% (V/V)氨水恒定pH 6.0~6.2, 42℃培养12 h后放罐。

1.3.2 菌体收集: 取出菌体离心收集(5000 g, 15 min, 4℃), 用预冷的磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 6.5)清洗并悬浮菌体, 置于4℃冰箱中储存备用。

1.3.3 酸度对酸奶菌株自溶的影响: 细胞以3%接种量悬浮于相同浓度(0.1 mol/L)不同pH值(pH 5.5, pH 6.2, pH 7.5)磷酸钠缓冲液中, 将菌体悬浮液吸光值(OD_{650})调整到0.4~0.6, 30℃振荡培养45 h后测定菌体悬浮液的 OD_{650} 值。

1.3.4 乳酸盐浓度对酸奶菌株自溶的影响: 细胞以3%接种量悬浮于乳酸钠浓度为0%、1%、3%和5%的磷酸钠缓冲液(0.1 mol/L, pH 6.2)中, 调整吸光值到0.4~0.6, 30℃的振荡培养45 h后测定其 OD_{650} 值。

1.3.5 温度对酸奶菌株自溶的影响: 细胞以3%接种量悬浮于磷酸钠缓冲溶液(0.1 mol/L, pH 6.2), 调节其 OD_{650} 值到0.4~0.6。分别置于30℃、42℃、55℃培养45 h后测定其 OD_{650} 值。

1.3.6 酸奶菌株自溶的检测方法: (1) 测定自溶释放的核酸和蛋白: 磷酸盐缓冲液作空白实验调零, 待测样品经微孔滤膜(0.22 μm)过滤。澄清滤液分别在 OD_{260} (检测释放的核酸)和 OD_{280} (检测释放的蛋白)条件下检测紫外吸收值。

(2) 自溶度计算方法^[8]:

$$\text{自溶度}(\%) = 100 - \left(\frac{A_1}{A_2} \right) \times 100$$

A1-最低吸光值; A2-最高吸光值

(3) 透射电镜观察^[9]: 将磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 6.2)中悬浮的菌液滴在硫酸纸上, 用带膜铜网膜面向下放在液滴上, 吸附3 min~5 min, 取出后用滤纸吸干。3%磷钨酸染色1 min~2 min, 用滤纸吸干残液, 放入培养皿中待检。电镜观察倍数取10000和20000。观察发生自溶的菌体细胞的细胞壁和细胞形态的变化。

2 结果与讨论

2.1 环境因子对酸奶菌株自溶的影响

2.1.1 pH值对酸奶菌株自溶的影响: 如图1所示, 从自溶角度考虑, 较低pH值可以在一定程度上抑制菌株自溶, 但是大量乳酸积累对酸奶菌株生长繁殖同样是不利的, 这就要求选择一个既可以让乳酸

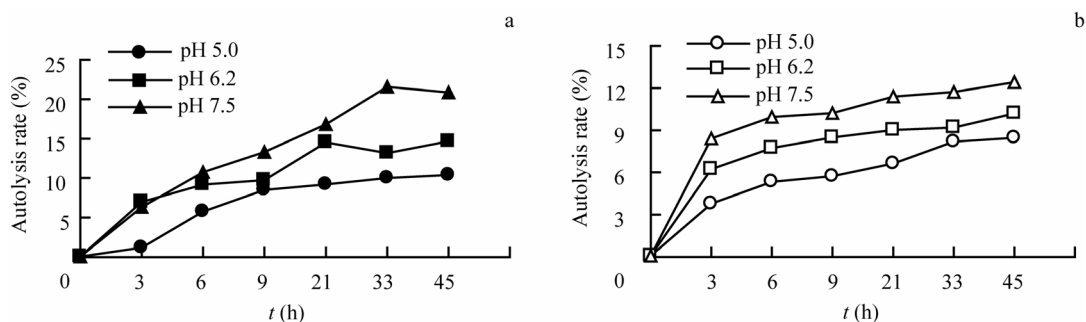


图 1 不同 pH 值对酸奶菌株自溶的影响

Fig. 1 Effect of different pH on the autolysis of yoghurt strains

Note: a: KLDS 1.9201; b: KLDS 3.0201

菌良好生长,又在一定程度上抑制菌体自溶的酸度环境。从实验结果看,以 pH 5.5~6.0 为宜,在该酸度范围内,估算 KLDS 1.9201 自溶度约为 6%~14.6%, KLDS 3.0201 自溶度约为 5%~10%。

2.1.2 乳酸盐浓度对酸奶菌株自溶的影响: 由图 2 可知,不同浓度乳酸钠对 KLDS 1.9201 自溶度的促进要远高于 KLDS 3.0201 ($P<0.05$),这可能与德氏乳

杆菌保加利亚亚种更易受到盐溶液损伤有关^[10]。在 5% 乳酸钠溶液中分别培养 KLDS 1.9201 和 KLDS 3.0201 45 h 后,两者最高自溶度达到 31.6% 和 18.41%,显著高于 0% 乳酸钠培养后的 15.6% 和 8.86% ($P<0.05$)。由此可见,若想使乳中的酸奶菌株达到较高数量级,应尽可能将培养环境中的乳酸钠通过某些理化方法除去。

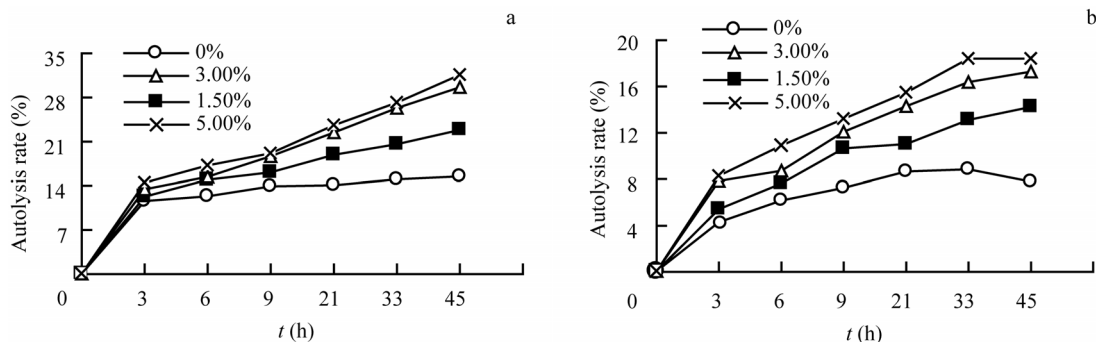


图 2 不同盐浓度对酸奶菌株自溶的影响

Fig. 2 Effect of different salt concentrations on the autolysis of yoghurt strains

Note: a: KLDS 1.9201; b: KLDS 3.0201

2.1.3 温度对酸奶菌株自溶的影响: 由图 3 可知在 30 ~55 温度范围内,酸奶菌株自溶度随温度逐渐升高而增大。30 培养 KLDS 1.9201 和 KLDS 3.0201 时,两菌株的自溶度均低于 15%。经 42 培养 45 h 后, KLDS 1.9201 和 KLDS 3.0201 的自溶度分别升高到 23.8% 和 22.3%。而在 55 高温下, KLDS 1.9201 在 21 h 内的自溶度已攀升至 27.65%,这可能与自溶酶在温度较高时活性增强加快了对菌株细胞壁的水解作用有关。KLDS 3.0201 的自溶度在 33 h 也达到高峰值 30.4%,在 45 h 时自溶度却略微回落,推测可能是该菌的主要自溶酶在长时间热处理过程

中变性,或者由于菌体细胞死亡而使某些自溶酶作用消失。

2.2 菌体自溶后释放的核酸和蛋白

由图 4、5 可见酸奶菌株在磷酸缓冲液中释放的核酸和蛋白含量随温度的升高呈递增趋势。同时发现,培养过程中酸奶菌株的自溶可分为三个变化阶段:第一阶段在 0 h~6 h,细胞释放蛋白质与核酸的量有限,对应 KLDS 1.9201 和 KLDS 3.0201 在这一时段内的自溶度均低于 15% (见图 1)。第二阶段在 6 h~21 h,细胞释放核酸和蛋白的量出现激增,对应菌体自溶度也显示急剧上升。这可能是由于胞内的

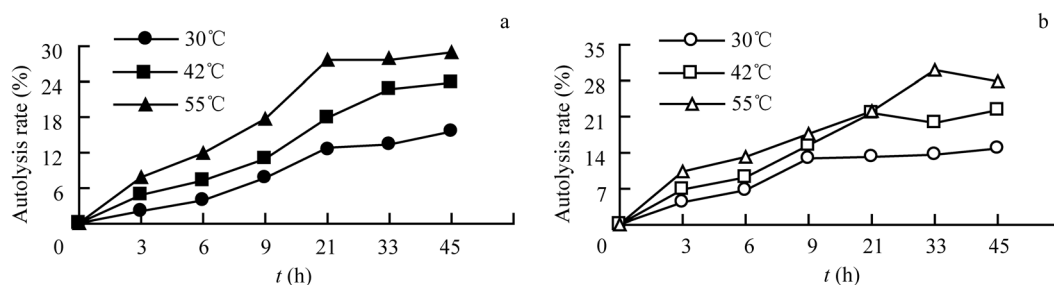


图3 不同培养温度对酸奶菌株自溶的影响

Fig. 3 Effect of different temperture on the autolysis of yoghurt strains

Note: a: KLDS1.9201; b: KLDS 3.0201

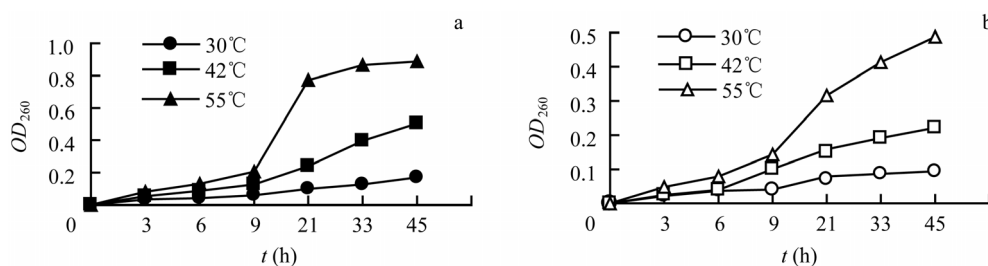


图4 酸奶菌株自溶时细胞内核酸的释放

Fig. 4 Evolution of nucleic acid during yoghurt strains autolysis

Note: a: KLDS1.9201; b: KLDS 3.0201

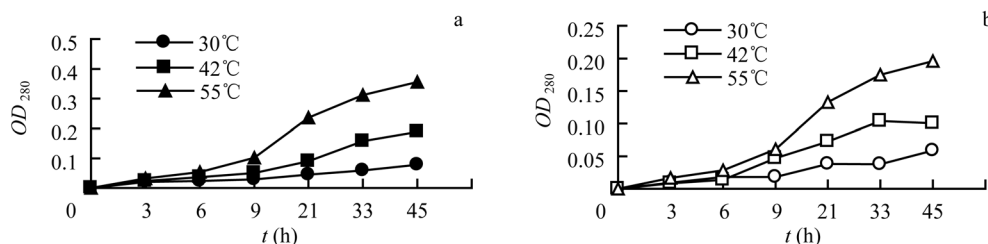


图5 酸奶菌株自溶时细胞内蛋白质的释放

Fig. 5 Evolution of protein during yoghurt strains autolysis

Note: a: KLDS1.9201; b: KLDS 3.0201

蛋白酶在指数生长期被充分活化, 蛋白质需要快速周转和分泌到胞外以降解和利用培养基中的外源蛋白质所致。第三阶段是在发酵 21 h~45 h 内, 蛋白质与核酸释放缓慢, 这可能与酸奶菌株对营养需求减少导致细胞增殖分裂的速率减缓有关。

2.3 菌体自溶的验证实验

2.3.1 最优和最差环境的对比实验: 如图 6 所示, 高温 55 °C、pH 7.5 和 5% 乳酸盐浓度的培养环境使 KLDS 1.9201 和 KLDS 3.0201 在 45 h 内的自溶度分别达到了 55% 和 36.3%, 显著高于自溶度低的培养环境下(30 °C、pH 5.5 和 0% 乳酸盐) KLDS 1.9201 和 KLDS 3.0201 的自溶度 9.96% 和 8.6% ($P < 0.05$), 进一步说明了实验优选出的最优环境因素组合符合实

际情况。

2.3.2 菌体形态的变化: 如图 7(a)所示, 在 KLDS 1.9201 菌体完整的细胞中可清晰看到细胞质和细胞核。如图 7(b)所示, 良好培养环境下 KLDS 1.9201 的细胞壁在电镜下观察完好无损。但在高自溶培养环境下(图 7(c)), KLDS 1.920 部分细胞壁被水解, 并将细胞中的内容物释放到了周围的环境中, 只剩下了菌体细胞的空壳。

如图 8(a, b)所示, 低自溶培养环境下 KLDS 3.0201 个体形态与正常菌体相比几乎没有发生形态学上的变化, 但高自溶培养环境下(如图 8(c)所示), KLDS 3.0201 的菌体细胞变得透明, 在菌体细胞内有颗粒状物质出现, 这可能是由于自溶酶已经部分

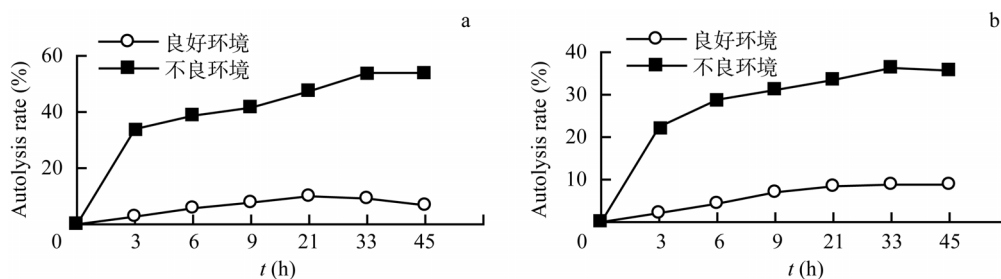


图 6 不同环境条件下酸奶菌株的自溶

Fig. 6 Autolysis activity of yoghurt strains under different conditions

Note: a: KLDS1.9201; b: KLDS 3.0201

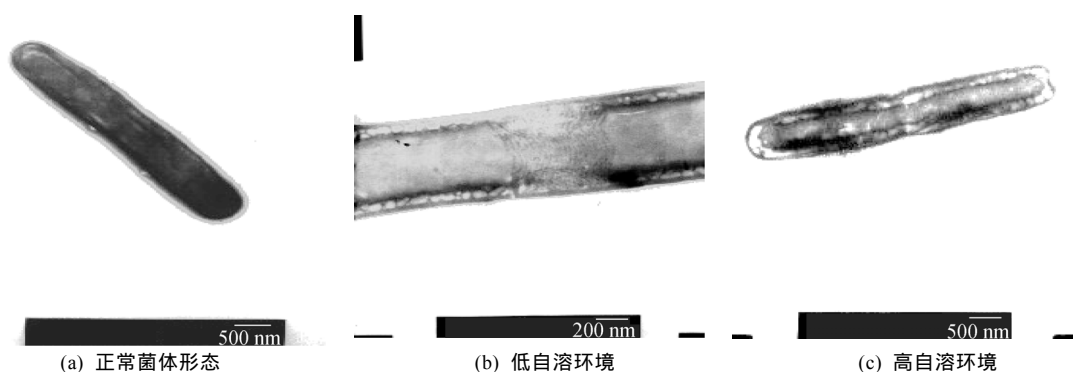


图 7 KLDS 1.9201 菌体形态的透射电镜观察

Fig. 7 The shape of KLDS 1.9201 observed by transmission electron microscopy

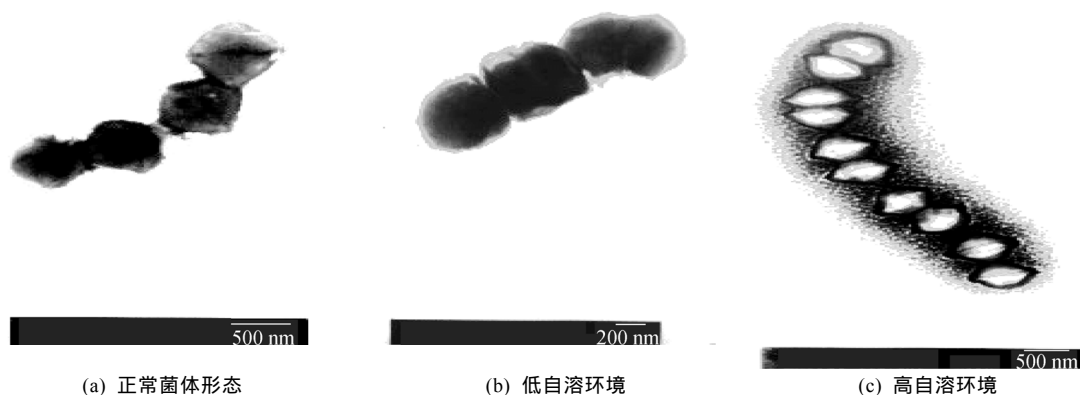


图 8 KLDS 3.0201 菌体形态的透射电镜观察

Fig. 8 The shape of KLDS 3.0201 observed by transmission electron microscopy

裂解了细胞壁(见菌体下端的较亮部分),造成细胞内细胞质等成分释放到周围环境中,使得细胞质中的 DNA 和其他物质浓缩所导致的。

3 结论

酸奶菌株自溶使大量的胞内酶得以释放,这些酶可以将乳中的蛋白质降解为菌体生长所必须的小肽和氨基酸。但在发酵乳中酸奶发酵剂的自溶不仅

降低了乳酸菌的活菌数,还可能改变制品的流变学特性和产品固有的感官特性。

培养温度、环境盐浓度以及环境酸度值均对德氏乳杆菌保加利亚亚种 KLDS 1.9201 和唾液链球菌嗜热亚种 KLDS 3.021 的自溶有显著影响。自溶的菌体会发生细胞壁破裂和细胞内容物释放的现象。今后还应综合考虑发酵时间延长,营养物质匮乏和菌株自身特性等影响因素对酸奶菌株自溶的影响,

并尝试从基因角度分析乳酸菌细胞的自溶机理。

致 谢: 感谢导师霍贵成教授的悉心指导和乳品科学教育部重点实验室的刘丽波等老师的热心帮助。感谢 863 课题组对本项目的实施给予了及时到位的资助, 使得实验得以顺利进行。

参 考 文 献

- [1] Wilkinson MG, Guinee TP, Fox PF, *et al.* Autolysis and proteolysis in different strains of starter bacteria during cheddar cheese ripening. *J Dairy Res*, 1994, **61**: 249–262.
- [2] Kang OJ, Vézinz LP, Laberge S, *et al.* Some factors influencing the autolysis of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei*. *J Dairy Sci*, 1998, **81**: 639–646.
- [3] Buist G, Venema G, Kok J. Autolysis of *Lactococcus lactis* is influenced by proteolysis. *J Bacteriol*, 1998, **180**: 5947–5953.
- [4] Gianluigi S, Marisa V. Lysis of *Lactobacillus casei* 5Mn 373 accelerates Grana cheese ripening. *Eur Food Res Technol*, 2005, **220**: 477–482.
- [5] Rao MS, Pintado J, Stevens WF, *et al.* Kinetic growth parameters of different amylolytic and non-amylolytic *Lactobacillus* strains under various salt and pH conditions. *Bioresource Technology*, 2004, **94**: 331–337.
- [6] 冯 镇, 张兰威, 姚 伟. 培养时间对乳酸菌自溶影响及菌体形态学变化. 中国乳品工业, 2006, **34** (7): 28–30.
- [7] 张晓鸣, 袁信华, 章克昌. 理化处理对啤酒酵母自溶的影响. 无锡轻工大学学报, 2001, **20** (3): 154–157.
- [8] Girbe B, Gerard V, Jan K. Autolysis of *Lactococcus lactis* is influenced by proteolysis. *J Bacteriol*, 1998, **180** (22): 5947–5953.
- [9] 诸葛健等编著. 工业微生物实验技术手册. 北京: 中国轻工业出版社, 1994, pp.35–41.
- [10] Wright CT, Klaenhammer TR. Phosphated milk adversely affects growth, cellular morphology and fermentative ability of *lactobacillus bulgaricus*. *J Dairy Sci*, 1984, **67**: 44–51.

编辑部公告

关于《微生物学通报》2008 年度开始专题刊申请的通知

当前, 随着生物技术的飞速发展, 微生物学涵盖的领域越来越广, 交叉学科的研究也越来越受到关注。除了已有的微生物学、病毒学、基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程之外, 基因组学、代谢工程、纳米科学、生物炼制、生物质能等也逐步成为微生物学研究的热门领域。为了更加系统、集中地反映各个领域的研究成果, 以及该领域学科的热点难点问题, 充分发挥《微生物学通报》的学科引领和导向作用, 促进学科发展, 为某个领域的科研人员提供一个交流的平台, 《微生物学通报》编委会决定自 2008 年起, 每年出版一定数量的专题刊。专题刊将系统地反映微生物学相关领域或新学科生长点的最新进展, 及时介绍国内外微生物相关前沿领域的突破性成果, 以及面向国家和社会发展需要并具有重大应用前景的研究成果。真诚欢迎本领域各学科的学术带头人, 申请并组织专题刊。申请得到编委会批准后, 申请人将被邀请担任本专题刊的特约编辑, 负责组织稿件、确定审稿专家, 并撰写专题刊序言。

根据专刊工作计划, 编辑部已开始接受 2008 年度专题刊申请, 现将有关事项通知如下:

1. 专刊申请的有关规定附在通知的下面, 请申请者仔细阅读;
2. 提交形式: 请到我刊主页(<http://journals.im.ac.cn>)的“文件下载”下载专题刊申请表; 填写好之后, 以 E-mail 附件的形式发送到编辑部信箱: tongbao@im.ac.cn, 请在邮件主题中注明: “专题刊申请”字样;
3. 申请者如有疑问, 请咨询编辑部, 联系方式: E-mail: tongbao@im.ac.cn 或 Tel: 010-64807511。

《微生物学通报》编辑部

2007 年 8 月 29 日