

乳酸菌冷冻损伤研究

刘振民¹ 骆承庠²

K252 A

1(均瑶集团乳品研发中心,上海,201315)

2(东北农业大学畜产品加工研究所,哈尔滨,150030)

摘要 通过透射电镜观察表明,经过冻融处理后,乳酸菌菌体会发生溶解、皱缩、断裂等致死损伤现象。杆菌比球菌易于受损。乳酸菌经过冻融处理后,致死率增加。生化指标结果表明,细胞受损后,裂解的菌体会释放出核酸、蛋白质、胞内酶等可溶性物质,细胞膜的通透性增加,菌体发生生理性损伤,使得菌体在增殖期间具有较长的迟滞期。与对照相比,冻藏、冻干菌株胆盐耐受性、不耐受菌数差异不显著。冻藏法比冻干法更容易保护菌种。

关键词 乳酸菌,冷冻损伤,透射电镜观察,损伤机理

20世纪80年代以来,由于热物理学、物理化学、工程学和生物学、医学等学科的渗透、交叉,低温工程理论以及应用设计原理的不断更新及应用,低温生物学研究取得许多突破性进展。

乳酸菌冷冻损伤的研究对乳酸菌冷冻损伤机理的阐明和保护措施的建立具有重要意义,在实践上也可以为制备冻藏、冻干型浓缩型乳酸菌发酵剂提供了一定的理论基础。

1 材料与方 法

1.1 试验用菌株

德氏乳杆菌保加利亚亚种(LDB)、唾液链球菌嗜热亚种(ST)均为本试验室保藏菌种。

1.2 主要仪器与设备

IB-5型离子溅射仪,日本电子公司;

JEM-1200EX透射电镜,日本JEOL公司;

53WB UV/VIS分光光度计,上海光学仪器厂;

XW 80A型旋涡混合器,上海医科大学仪器厂。

1.3 冻融对菌体存活性的影响

LDB菌株于MRS培养基中37℃培养

10h(稳定期早期)于10℃、5 000×g离心8 min。菌体沉淀用去离子水进行清洗,再次离心,菌体沉淀用不同介质悬浮。

1.2 mL菌体悬浮液加入1.5 mL的聚丙烯管中,以2℃/min的速率进行冷冻,于-20℃进行冻藏。冷冻管于37℃融化,加热速率为15℃/min,在此温度下维持5 min。无菌取样测定,接着再次迅速冷冻,再融化。菌数测定用稀释剂为0.1%的蛋白胨。冷冻之前的菌数记为 N_0 ,冻融以后测定的菌数记为 N_i ,存活性以 $\log(N_i/N_0)$ 表示。

1.4 菌体损伤的透射电镜观察

德氏乳杆菌保加利亚亚种以MRS培养基增殖,唾液链球菌嗜热亚种以M17培养基增殖,增殖至稳定期早期以4 000×g离心15 min收获菌体,利用0.01 mol/L、pH 7.0的磷酸缓冲液清洗一次,分别悬浮于新配制的MRS或M17培养基,冻融处理。于-20℃保藏24 h后,于25℃的空气浴中解冻。对照为不经对照处理的菌液。以无菌注射器取数滴菌液于铜网上,吸附30 min;在凹面皿中加入2%的磷钨酸溶液(pH 7.0),将染有菌体的铜网置于溶液中进行染色;以滤纸吸干残液,于灯下烤干,置于透射电镜下观察。

1.5 LDB菌液的制备和生化测定

第一作者:博士。

收稿时间:2002-03-27

LDB菌株在MRS培养基于37℃培养,培养至稳定期早期终止发酵,以 $5000 \times g$ 离心15 min,收获菌体。以pH7.0、0.01 mol/L的 K_2HPO_4 KH_2PO_4 缓冲液清洗。菌体重悬浮于无菌的悬浮于12%的脱脂牛乳中冷藏、冻藏或冻干,进行细胞损伤的生理性试验。

德氏乳杆菌保加利亚亚种以MRS或MRSO(添加0.3%的牛胆盐)为计数培养基,其中MRSO作为区分损伤菌体的培养基。采用梯度稀释平板计数法,于37℃培养48 h。

β -半乳糖苷酶的活力采用ONPG作为底物^[2]进行测定。每一样品的总活力是以丙酮-甲苯对细胞作透性化处理后,测定 β -半乳糖苷酶的活力,总活力以100%处理。

对照样、冻干复水样、冻藏样(原浓度大约为 1×10^9 cfu/mL)于4℃, $5000 \times g$ 离心10 min,经过滤的上清液用于测定蛋白质的浓度(mg/mL)。蛋白质采用Lowry法测定。

1.6 核酸和蛋白质的测定

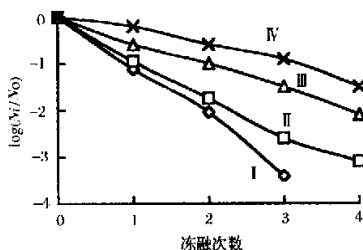
对照样、冻干复水样、冻藏样(原浓度大约为 1×10^9 cfu/mL)于4℃, $5000 \times g$ 离心10 min,上清液于260 nm、280 nm处测定OD值。经过0.22 μm 的膜过滤。以去离子水作空白,于260 nm、280 nm处测定吸光

度^[3,4]。

2 结果与分析

2.1 冻融对菌体存活率的影响

以德氏乳杆菌保加利亚亚种为试验菌株,经过冻融处理,研究冻融对菌体存活率的影响,试验结果见图1。



1-生理盐水; II-MRS培养基; III-12%的脱脂牛乳; IV-12%的脱脂牛乳+2%的乳糖+2%的葡萄糖

图1 冻融对菌体存活率的影响

由图1可以看出,随着冻融次数的增加,菌体存活率显著降低。其中生理盐水降低程度最为剧烈,以12%脱脂牛乳+保护剂为悬浮基质的菌液相对降低程度较小。

2.2 菌体损伤的透射电镜观察

将冻融处理后的菌体进行电镜观察,结果见图2~图5。

完整的LDB菌体外缘整齐、两端钝圆平

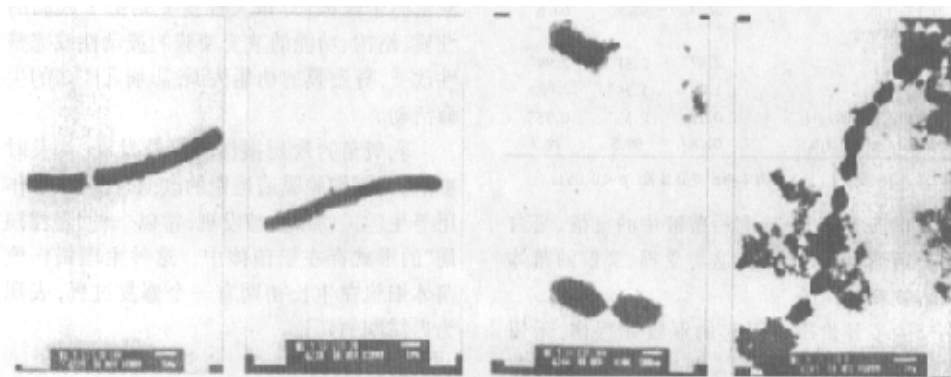


图2 中间断裂的菌体
(LDB)

图3 末端发生严重损伤的菌体
(LDB)

图4 链长变短、菌体皱缩
(ST)

图5 生长良好的菌体
(ST)

整;经过3次冷冻、融化后菌体致死率增加,菌体损伤严重,出现中间断裂、后端溶解,见图2、图3。

从图4、图5的唾液链球菌的电镜照片来看,完好的菌体呈长链状排列,菌体饱满,外缘整齐;而受损的菌体首先出现链的断裂,菌体单一或少数几个存在,菌体发生皱缩。

杆菌与球菌相比,体积大,易于受到损伤;因此受到应激处理时一般杆菌的存活率较低,球菌的存活率较高。

2.3 冷冻对菌体生理特性的影响

以LDB为试验菌株,研究了正常细胞、冻藏、冻干菌体的 β -半乳糖苷酶活力、上清液中吸光物质的变化及蛋白质含量,结果如表1。

由表1可以看出,正常菌体上清液、菌体悬浮液中相对 β -半乳糖苷酶活力分别为0、32.9%;冻藏菌体则为0.28%、48.9%;冻干菌体则为0.95%、60.8%。冻干、冻藏菌体上清液、菌体悬浮液中相对 β -半乳糖苷酶活力的升高,表明在冷冻、冷藏过程中,细胞膜发生变化,细胞膜的通透性增加。

表1 冷冻对菌体生理特性的影响

指标值	正常菌体	冻藏菌体	冻干菌体
β -半乳糖苷酶活力/%			
总活力		100	
上清液	0	0.28*	0.95*
菌体悬浮液	32.9	48.9*	60.8*
上清液的吸光度			
260nm	2.67	2.81*	2.99*
280nm	1.89	1.96*	2.05*
上清液中的蛋白质/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0.29	0.33*	0.35*
(MRSO/MRS) $\times 100\%$	99.8	99.5	99.7

注:同一指标值,与正常菌体相比差异显著($p < 0.05$)。

由表1可知,冷冻后菌液中的核酸、蛋白质等可溶性物质增多,这与受损、裂解的菌体内容物释放有关。

为了评价冷冻引起的亚致死损伤,采用含3 g/L的胆盐培养基来计数未受损的菌体^[5]。从乳酸菌耐盐菌株和非耐盐菌株的比例来看,冻干样、冻藏样和对照则差别不显著($p > 0.05$)。

20

对整个数据进行分析,可以看出冻藏比冻干法更容易保护菌株。

3 讨论

Kamal等^[11]研究了乳油链球菌KHA2的冷冻损伤,认为非冻部分的高浓度溶质效应造成细胞膜的收缩或冰结晶成长,增大引起菌体物理或化学性损伤。

Valdez等^[6]研究了德氏乳杆菌保加利亚种的冷冻损伤,研究认为,受冻菌体的结构损伤引起氨基酸转运活力的降低。Ray等^[7]研究认为,磷酸盐和丙酮酸盐可以用于菌体修复阶段高能化合物的合成;而镁离子则与受冷激的菌体的细胞壁和细胞膜的稳定性有关。

引起乳酸菌在冷冻、冻干过程中的致死性损伤的主要因素有:(1)机械损伤效应。一般冰晶越大,细胞膜越易破裂,而造成细胞死亡;冰晶小,对细胞膜的机械损伤也较小。(2)溶质损伤效应。水的冻结使细胞间隙内的液体逐渐浓缩,电解质的浓度显著增加,细胞内的蛋白质对电解质极为敏感,尤其是在高浓度的电解质存在时,会引起蛋白质变性,丧失其功能,增加了细胞死亡的可能性。此外,细胞内电解质浓度增加还会导致细胞脱水死亡。(3)干燥对菌体的致死性损伤。乳酸菌的干燥损伤,很大程度上是由于膜脂的性质、结构、功能的改变使膜的流动性或完整性改变,导致膜的功能失调,影响乳酸菌的生命活动。

乳酸菌的致死损伤容易被发现,并及时被清除;而细胞膜通透性的改变、代谢调节作用等生理损伤不易被发现,常以一种“隐性损伤”的形式存在于菌体中。这种生理损伤使菌体细胞在生长初期有一个修复过程,表现为迟滞期的延长。

4 结论

乳酸菌经过冻融处理后,致死率增加。引起致死损伤的主要因素是机械效应、溶质

效应和干燥效应。在冷冻保存菌种时加入保护剂或采取适宜的冻藏、冻干条件,可以减轻菌体的生理性或致死性损伤。

透射电镜观察表明乳酸菌经过冻融处理,菌体皱缩、溶解或裂解等现象,细胞内的蛋白酶、 β -半乳糖苷酶、核酸类物质释放到介质中,菌体发生代谢性损伤甚至致死。损伤的菌体在增殖期具有较长的迟滞期。

参 考 文 献

- 1 Kamal M Kamaly, Elmer H Marth. Cryobiology, 1989, 26:496~507
- 2 Todd H Dechter, Dallas G Hoover. Food Biotechnology, 1998, 12(1):73~89
- 3 Teixeira P, Castro H, Kirby R. Journal of Applied Bacteriology, 1995, 78:456~462
- 4 Graziella Montanari, Larlo Zambonelli, Luigi Grazia et al. Food Technology Biotechnology, 2000, 38(2):129~133
- 5 Wright C T, Klaenhammer T R. Applied and Environmental Microbiology, 1981, 41:807~815
- 6 Valdez D F de, Giori G S de. Cryobiology, 1993, 30:329~334
- 7 Ray B, Speck M L. Applied Microbiology, 1972, 24(2):258~263

Studies on Freezing Damage of Lactic Acid Bacteria

Liu Zhenmin¹ Luo Chengxiang²

¹(R & D Center of Dairy Product, Junyao Group, Shanghai, 201315)

²(Institute of Animal Products Processing, Northeast Agricultural University, Haerbin, 150030)

ABSTRACT The observations by transmission electricity microscope showed that cells of LAB through freezing-thawing circles were injured violently. Some cells were ruptured in the middle, and others solved at their ends. *Lactobacillus* was more injured easily than *Lactococcus*. The lethal rate of LAB after the freezing-thawing circles increased. Biochemical experiments showed that the permeability of cell membrane increased and ruptured cells released more materials. Nucleic acid, protein and other soluble solutes existed more in the suspended medium. A longer lag period existed during the growth of injured cells. Contrary to control, bile tolerance strains and non-bile tolerance ones in the frozen and frozen-dried samples didn't change more. Frozen storage protected LAB cells better than freezing-dried.

Key words lactic acid bacteria, freezing damage, SEM observation, mechanism of injury



自国家免检制度实施以来,已有 652 家企业的

24 类产品获准免检

获得免检资格的食品,涉及人们生活的方方面面,如大米、小麦粉、食用植物油、酱油、食醋、瓶装饮用水、婴幼儿配方乳粉、灭菌奶、火腿肠、葡萄酒等,这些食品生产企业包括北京古船面粉集团、黑龙江省北大荒米业有限公司、西安嘉里油脂工业公司、佛山市海天调味食品有限公司、北京龙门和田宽食品有限公司、河南省漯河市双汇实业集团有限责任公司、海口椰树矿泉水有限公司、陕西和氏乳品有限公司、烟台中粮葡萄酒有限公司等,262 家企业获得免检证书。获得免检证书的企业在免检有效期内可以自愿在免检产品或者其包装上使用规定的免检标志,在免检有效期内免于各级政府部门的质量监督检查。