

酸应激对 1 株乳酸乳球菌质膜 F_1F_0 -ATPase 活性的影响*

刘怀龙, 孟祥晨

(东北农业大学乳品科学教育部重点实验室 / 食品学院, 黑龙江哈尔滨, 150030)

摘要 评价 10 株乳酸乳球菌的酸应激能力, 选用应激能力较高的菌株, 确定其最佳酸应激条件。将 4 h、10 h、20 h 培养的该菌菌体在此条件下应激, 以硫酸亚铁钼蓝比色法测定应激前后的质膜 F_1F_0 -ATPase 活性。结果表明, 菌株 KLDS 4.0312 具有较高应激能力, 应激后耐酸性可提高 7542 倍, 其最佳酸应激条件为 pH4.5, 30 min。4 h、10 h、20 h 培养的该菌菌体应激后, 质膜 F_1F_0 -ATPase 活性分别提高 56.68%、11.05%、5.16%。

关键词 酸应激, 乳酸乳球菌, F_1F_0 -ATPase, 存活率

随着人们对健康饮食需求的增长, 益生菌的保健功效为广大消费者所接受, 各种益生菌制剂大量涌现, 市场前景广阔。然而, 益生菌本身发酵产生的乳酸、乙酸以及过胃时的胃酸等胁迫作用均会明显降低制剂的活菌数目。而酸应激 (acid tolerance response, ATR) 有助于提高益生菌对酸胁迫 (acid stress) 的耐受力^[1,2], 是其顺利抵达小肠进行定植并发挥保健功效的重要手段。因此, 研究益生菌的酸应激机制, 并采取相应方法来提高益生菌的酸耐受力, 对于解决目前益生菌制剂过胃时存活率普遍偏低的现象具有重要意义。

酸应激机制十分复杂, 主要涉及到胞内质子的泵出、细胞膜脂肪酸组成的变化、应激蛋白和分子伴侣的诱导、碱的产生以及代谢途径的变化等^[3]。本试验选取乳酸乳球菌作为出发菌株, 评价酸应激对菌株耐酸性的影响, 并通过测定酸应激前后菌株质膜 F_1F_0 -ATPase 活性变化, 以判断 F_1F_0 -ATPase 是否作为质子泵在该菌的酸应激过程中发挥作用。

1 材料与与方法

1.1 材料

10 株乳酸乳球菌: KLDS4.0308, KLDS4.0313, KLDS4.0305, KLDS4.0316, KLDS4.0311, KLDS4.0312, KLDS4.0304, KLDS4.0306, KLDS4.0309, KLDS4.0314, 试验编号 C1~C10, 为实验室保藏菌种。MRS 培养基参照文献^[4]配制。

1.2 ATR 菌株的筛选方法

10 株乳酸乳球菌于 37 °C 培养 4~6 h, 6 000 r/min, 10 min 离心, 收集到的菌体均匀分散于等体积

pH 4.5 MRS 液体培养基中, 37 °C 适应 1 h, 未适应组作对照。将适应株和对照株同时转移至 pH 2.5 PBS 中作用 2 h, 计算存活率。

1.3 最佳酸应激条件的测定

筛得的 ATR 菌于 37 °C 培养 4~6 h, 离心收集菌体, 分散于 pH4.0、pH4.5、pH5.0、pH5.5 MRS 液体培养基中, 37 °C 分别适应 30 min、120 min, 未适应组作对照。将适应株和对照株同时转移至 pH 2.5 PBS 中作用 2 h, 计算存活率。

1.4 质膜 F_1F_0 -ATPase 活性的测定^[5]

1.4.1 制备透性细胞

筛得的 ATR 菌 37 °C 分别培养 4 h、10 h、20 h, 各取菌液 25 mL, 4 °C, 6 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用去离子水洗后转至已称重锡纸中, 80 °C 干燥过夜称重, 得细菌干重。另各取 25 mL 菌悬液, 同以上条件离心收集菌体, 将细菌重悬于 2.5 mL 75 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (内含 10 mmol/L $MgSO_4$, pH 7.0) 中, 再加入 250 μ L 甲苯。37 °C, 漩涡振荡, 孵育 5 min, 将菌液以液氮冷冻, 37 °C 冻融, 经 2 个循环, 低温离心, 收集透性细胞。将透性细胞再悬浮于 1.0 mL 75 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (内含 10 mmol/L $MgSO_4$, pH 7.0) 内, 在液氮中快速冷冻后, -80 °C 贮存备用。

1.4.2 酶活的测定

将 750 μ L 透性细胞悬液加至 3.0 mL 50 mmol/L Tris-马来酸缓冲液 (pH6.0, 内含 10 mmol/L $MgSO_4$) 中, 加热至 37 °C, 再加入 300 μ L 0.5 mmol/L ATP (pH6.0) 启动反应, 反应 20 min 后取样测定 ATP 水解所释放出的无机磷量。采用硫酸亚铁钼蓝比色法^[6]在紫外分光光度计上进行比色分析 (660 nm), 酶的活性单位为 μ mol(Pi)/(g·min)。试验重复 2~3 次。

第一作者: 硕士研究生 (孟祥晨教授为通讯作者)。

* 东北农业大学创新团队资助项目

收稿日期: 2007-11-21, 改回日期: 2008-01-02

1.5 活菌数的测定

选用 MRS 培养基,采用传统的平板计数法。

2 结果与分析

2.1 ATR 菌株的筛选结果(图 1)

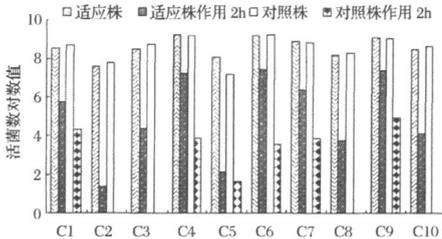


图 1 10 株 *L. lactis* 适应株和对照株在 pH2.5 PBS 中作用 2 h 后的存活率

10 株 *L. lactis* 中,9 株具有一定的酸应激能力。相比于对照株,适应株在 pH 2.5 PBS 中作用 2 h 后,活菌数可分别提高 2~4 个数量级。其中 C6 株适应后耐酸性提高了 7542 倍,酸应激能力最强,选取该菌株进行下一步试验。一些乳杆菌也具有酸应激能力,*L. bulgaricus* VI-10¹⁰ 酸适应(pH4.75, 30 min)后耐酸性提高了 250 倍^[2]。但酸应激现象并不存在于所有乳酸菌中,如 *L. lactis* C5 在酸适应后其耐酸性反而下降了。另外,酸应激仅对适应后的菌体有酸保护效应,不能稳定遗传,且应激能力在菌种和菌株水平上存在重大差异。

2.2 最佳酸应激条件的测定结果

C6 在 pH4.0、pH4.5、pH5.0、pH5.5 处分别适应 30 min 后,菌体在 pH2.5 PBS 中作用 2 h 后的存活率分别为:3.90%、7.96%、4.84%、4.11%;若在以上 pH 条件下适应 120 min,则菌体的存活率分别为:2.67%、5.35%、3.71%、2.18%;而对对照株在 pH2.5 PBS 中作用 2 h 后,未能检出活菌数。由以上结果可知,pH4.5 适应 30 min 后,该菌在酸胁迫中的存活率最高,菌体耐酸性最好,为 C6 的最佳酸应激条件。

从图 2 可看出,C6 适应 30 min 后 ATR 效果最显著,适应 120 min 后存活率反而因长时间的酸作用有所降低。JAN 等人^[7]认为菌体细胞在酸适应的 3 min 内就引发了 ATR,而后菌体对酸的抵抗力在 10 min 内呈对数值增加,并在一定时间内达到最大值。因而针对不同菌种和菌株,应分别确立其最佳酸应激条件,以最大限度的提高菌株在低 pH 环境下的存活率。

2.3 不同培养阶段适应株与对照株 F_1F_0 -ATPase 活

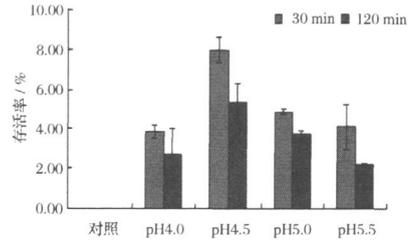


图 2 KLDS 4.0312 最佳酸应激条件的测定结果性测定结果

从图 3 可以看出,C6 在培养过程中,对照株和适应株的 F_1F_0 -ATPase 活性均呈上升趋势。4 h、10 h、20 h 培养的菌体在最佳酸应激条件下适应后,相比于对照株 F_1F_0 -ATPase 活性分别提高 56.68%、11.05%、5.16%。但随着培养基 pH 值的降低,适应株与对照株之间的酶活差异逐渐缩小。原因在于菌体的自身发酵也是一个缓慢的酸适应过程,导致 F_1F_0 -ATPase 活性不断增加,使得稳定期菌体应激能力不如对数期菌体明显。

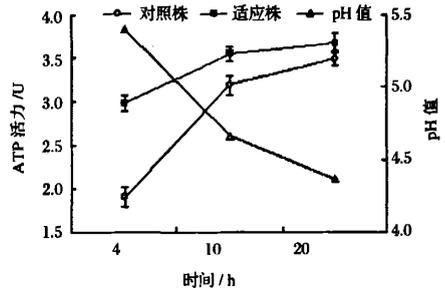


图 3 不同生长阶段 C6 适应株与对照株 F_1F_0 -ATPase 活性的比较

通常,细菌胞内外存在一定的 pH 值梯度差,当 pH 值梯度差增加,胞内 pH 值达到威胁的值时,诱导产生的 F_1F_0 -ATPase 就通过质子排除产生质子迁移力(proton motive force, PMF),PMF 促进质子从细胞质排出提高胞内 pH 值,以维持 pH 稳定和细胞存活。乳杆菌^[8]和双歧杆菌^[9]也能在酸应激过程中诱导产生 F_1F_0 -ATPase,是其得以在酸胁迫环境中存活的重要原因。而质膜 F_1F_0 -ATPase 水平的高低与菌体耐酸性之间有重要关联,当菌体经 DCCD(ATP 酶抑制剂)处理后,其对酸胁迫的耐受力远低于未处理菌体^[10]。

酸应激后 C6 耐酸性提高, F_1F_0 -ATPase 发挥着关键作用,该酶活性的提高有利于泵出质子维持胞内 pH 稳定, F_1F_0 -ATPase 机制是该菌的 ATR 机制之

一。Lorca^[11]证实, *L. acidophilus* CRL 639 的酸应激也主要是 F_1F_0 -ATPase 机制。酸适应后, 该菌 F_1F_0 -ATPase 活性是适应前的 1.6 倍, 且不依赖于新蛋白的合成(氯霉素存在时, 该菌 ATR 未被阻止)。

但 ATR 机制十分复杂, 可能是多种机制交互作用的结果, 且在菌株水平上存在着差异。Fozo 等^[12]发现, *Streptococcus mutans* UA159 在酸性条件下细胞膜脂肪酸组成从短链饱和脂肪酸向长链单不饱和脂肪酸转化。细胞膜的这种适应性改变降低了膜的流动性和质子渗透性, 从而保护细胞以防受到低 pH 环境的毒害。微生物在酸胁迫下还可通过诱导应激蛋白和分子伴侣的合成来适应环境, 保护细胞免受损伤^[13]。另外, 热胁迫、饥饿胁迫、盐胁迫等交叉应激也能提高菌株对酸胁迫的耐受力。

3 结 论

(1) 10 株乳酸乳球菌中, 9 株具有酸应激能力, 菌体酸应激后对酸胁迫的耐受力明显增加, 活菌数可分别提高 2~4 个数量级。KLDS 4.0312 应激能力最强。

(2) 乳酸乳球菌 KLDS 4.0312 的最佳酸应激条件为 pH 4.5, 30 min。

(3) 酸应激后 KLDS 4.0312 质膜 F_1F_0 -ATPase 活性增加, 是该菌的酸应激机制之一, 与菌体耐酸性存在着重要关联。另外, 菌体的自身发酵也是一个缓慢的酸适应过程, 此过程中质膜 F_1F_0 -ATPase 活性不断增加, 是菌体的一种自身酸保护机制。

参 考 文 献

1 Hartke A, Bouché S, Giard J C, et al. The lactic acid stress response of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* [J].

- Current Microbiology, 1996, 33: 194~199
- 2 Eng Mong Lim, Anne Lafon, Larbi Dridi, et al. Identification of stress proteins in *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* by two-dimensional electrophoresis [J]. Lait, 2001, 81: 317~325
- 3 Paul D Cotter, Colin Hill. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2003, 67(3): 429~453
- 4 凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999
- 5 Matsumoto, Hifumi Ohishi, Yoshimi Benno. H^+ -ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance [J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 93: 109~113
- 6 李影林. 中华医学检验全书上篇 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000
- 7 Jan Gwénaél, Annette Rouault, Jean Louis Maubois. Acid stress and acid adaptation of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* [J]. Lait, 2000, 80: 325~336
- 8 Corcoran B M, Stanton C, Ross R P, et al. Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(6): 3 060~3 067
- 9 J. Mättö, Hanna Leena Alakomi, Anu Vaari, et al. Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it [J]. International Dairy Journal, 2006, 16: 1 029~1 037
- 10 Lorca, G Font de Valdez. A low-pH-inducible stationary-phase acid tolerance response in *Lactobacillus acidophilus* CRL 639 [J]. Current Microbiology, 2001, 42: 21~25
- 11 Elizabeth M Fozo, Robert G Quivey Jr. Shifts in the membrane fatty acid profile of *Streptococcus mutans* enhance survival in acidic environments [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(2): 929~936
- 12 Angelis Maria, Luca Bini, Gobetti, et al. The acid-stress response in *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1 [J]. Microbiology, 2001, 147: 1 863~1 873

Influence of Acid Tolerance Response on Membrane F_1F_0 -ATPase Activity in *Lactococcus lactis*

Liu Huailong, Meng Xiangchen

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

ABSTRACT Acid Tolerance Response (ATR) effects of 10 *Lactococcus lactis* strains were evaluated, the strain which has the best ATR effect was used in this research, and the optimal conditions for ATR were set out. Under the optimal condition for ATR, the membrane F_1F_0 -ATPase activity of adapted cells and non-adapted cells was assessed by measuring inorganic phosphate released from ATP hydrolysis. Results KLDS4.0312 has the best ATR effect and the optimal conditions for ATR were pH 4.5, 30 min. The acid tolerance of KLDS4.0312 was increased by 7542 times after acid adaptation. Membrane F_1F_0 -ATPase activity after optimal ATR was increased by 56.68%, 11.05% and 5.16% when the bacteria were incubated for 4h, 10h and 20h, respectively.

Key words acid tolerance response, *Lactococcus lactis*, F_1F_0 -ATPase, survival rate