

交互保护对干酪乳杆菌 ATCC 393TM 存活的影响

薛峰^{1,2}, 张娟^{1,2}, 堵国成^{1,2*}, 陈坚^{2,3*}

(江南大学,¹ 工业生物技术教育部重点实验室,² 生物工程学院,³ 食品科学与技术国家重点实验室, 无锡 214122)

摘要:【目的】以干酪乳杆菌典型株 ATCC 393TM (*Lactobacillus casei* ATCC[®] 393TM) 为实验菌株, 研究其在多重胁迫环境下的交互保护应答机制。【方法】比较不同亚适应条件(热、H₂O₂、酸、胆盐)处理后菌体细胞在热致死条件(>60℃)及氧致死条件 H₂O₂ (>5 mmol/L) 下的存活率变化, 并集中考察了最佳亚适应条件-酸适应的不同处理方式对细胞交互保护存活率、胞内 pH 以及脂肪酸含量的影响。【结果】交互保护对干酪乳杆菌 ATCC 393 生理活性的影响因亚适应及致死条件而异: 酸胁迫预适应能够显著提高细胞的交互胁迫抗性, 其中, 盐酸预适应的交互保护效果优于乳酸, 其预适应引发的生理应答效应使细胞在应对热致死和氧致死胁迫时存活率分别提高了 305 倍和 173 倍; 进一步的研究表明, 酸预适应提高细胞存活率的作用机制可能与其能够显著改善胁迫环境下的胞内 pH 和细胞膜脂肪酸不饱和度相关。【结论】盐酸预适应对干酪乳杆菌典型株 ATCC 393 的交互保护作用最为显著, 并能够维持胁迫条件下细胞生理状态的相对稳定, 本研究将有助于进一步解析干酪乳杆菌在对抗不同胁迫环境的过程中生理应答机制间的相互作用关系。

关键词: 干酪乳杆菌; 交互保护; 胁迫抗性; 胞内 pH; 膜脂肪酸

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 04-0478-07

益生菌是一类“适当摄入对宿主有好处的活的微生物”^[1]。目前研究主要集中在益生菌的安全、功能和工业性质方面^[2]。基于安全与功能的研究认为, 乳酸杆菌与双歧杆菌是益生菌的最重要组成^[3]; 但基于工业性质的研究却发现活菌能力的保持成为大部分有潜力的乳酸杆菌进入实际应用领域的重要瓶颈^[4-5]。近两年, 随着国内益生菌市场的规模壮大, 国内益生菌产品层出不穷。但大部分菌体由于无法耐受工业加工、货架保存以及体内的恶劣环境而无法真正到达肠道, 从而使得目前国内蓬勃发展的益生菌制品的功效性饱受质疑。

活菌能力的保持关键是提高益生菌胁迫抗性, 其手段目前主要有两种: 一是在菌种筛选过程中以胁迫环境作为选择压力而直接获得高耐受菌株^[6]; 二是通过益生菌胁迫机理的研究有目的地影响或改

造菌种, 从而提高其耐受性^[7]。筛选菌种的方法较为常用但却不可避免地遗漏掉一些有应用潜力的益生菌; 而胁迫机理的研究一方面能进一步挖掘成熟菌株的应用潜力, 同时也为筛选具有高胁迫抗性的优良菌株提供了可借鉴的思路。在已经开展的工作中, 单一胁迫环境中乳酸菌的生理状态是研究的热点之一^[8]。研究发现, 分子伴侣 DnaK, DnaJ, GroEL, GroES 等在乳酸菌应对热胁迫时被上调表达并能显著提高菌体对热致死的耐受能力^[9]; 类 FNR 蛋白能够通过调控对二价 Zn 的吸收来保护某些巯基免被氧化成二硫键从而减少菌株应对氧胁迫的敏感性^[10]; 此外, 一种被称为 ATR 的酸预适应机制在多株乳酸菌中被发现并能维持细胞胞内 pH (pH_i) 的恒定^[11-12]。

然而与传统单因素胁迫研究不同, 以干酪乳杆

基金项目: 国家“973 项目”(2007CB714306); 国家自然科学基金重点项目(20836003); 国家自然科学基金(30800008, 30900013)

* 通信作者。Tel: +86-510-85918309; Fax: +86-510-85918309; E-mail: gedu@jiangnan.edu.cn

作者简介: 薛峰(1983-), 男, 江苏无锡人, 硕士研究生, 主要从事食品功能微生物的研究。E-mail: texuefeng@126.com

收稿日期: 2009-11-24; **修回日期:** 2010-01-29

菌为代表的乳酸杆菌在实际应用中所遇到的胁迫条件却是复杂和交叉的,各种胁迫往往同时出现,简单的单因素研究在描述细胞在实际过程中的变化时具有一定的局限性。有趣的是,在某些传统单因素实验中,意外发现不同胁迫之间似乎存在关联性,如嗜酸乳杆菌 LA1-1 在胆盐中的预适应能显著提高其在热胁迫下的存活率,而热适应却对其在胆盐胁迫的抗性提高没有任何帮助^[13];本实验室前期的研究也发现在冷冻胁迫过程中,旧金山乳杆菌胞内的 $[NAD^+]/[NADH^+]$ 比值持续上升,SOD 活性和胞内巯基水平下降,这表明冷冻胁迫诱发了细胞内氧胁迫的产生,从而进一步验证了乳酸杆菌中单一胁迫诱发细胞产生交互保护效应的观点。然而遗憾的是,目前对于上述交互保护现象的研究更多的是集中在乳酸菌模式菌株乳酸乳球菌上,而对于具有重要益生功能和应用价值的乳酸菌菌株如干酪乳杆菌的研究还罕有报道。

基于上述原因,作者选取干酪乳杆菌标准株 *Lactobacillus casei* ATCC® 393™ 为研究对象,通过考察交互胁迫作用下细胞的不同生理应答反应,初步研究了不同胁迫条件影响干酪乳杆菌生理活性的作用相关性,探索了干酪乳杆菌细胞应对外界不同胁迫环境时启动自适应机制的协同作用方式,并对上述交互保护的作用机理进行了初步探讨,从而为高活性乳酸菌益生菌的筛选、遗传、定向改造和工业应用提供了必要的理论指导。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:本实验所用干酪乳杆菌 *L. casei* ATCC 393™ 购自美国标准菌种保藏中心 ATCC (American Type Culture Collection),是 ATCC 认可的干酪乳杆菌标准株。

1.1.2 试剂:MRS 培养基与胆盐均购自 Oxoid 公司。尼日利亚菌素、缬氨霉素和 HEPES 均购自 Sigma-Aldrich (上海)公司。羧基荧光素二乙酸琥珀酰亚胺酯[5 (and 6-) -carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester, cFDASE]购自 Axxora 生命科学公司。其他化学试剂为国药集团化学试剂公司分析纯产品。重悬培养液:蛋白胨 10 g/L,酵母提取物 5 g/L,牛肉膏 10 g/L,葡萄糖 20 g/L,硫酸镁 0.58 g/L,硫酸锰 0.05 g/L。

1.1.3 主要仪器:紫外可见分光光度计(日本 Shimadzu 公司),GC-14A 型气相色谱仪(日本

Shimadzu 公司),Q-Mass 910 型质谱仪(加拿大 Sciex 公司),F7000 型荧光分光光度计(日本 Hitachi 公司)。

1.2 交互保护实验

1.2.1 预适应:将活化种子培养液以 5% 接种量接入 MRS 培养基中,在 37℃ 条件下,静置培养至 OD 值为 1.5 (以下简称前培养),收集 1 mL 培养液并重悬于等体积的重悬培养液。将重悬液分别在各自的预适应条件(42℃, 90 min; pH 4.0, 90 min; 1 mmol/L H₂O₂, 90 min 和 0.2% 胆盐 90 min)下处理后,洗涤 2 次,分别得到各预适应条件处理后的细胞并进行菌落计数。

1.2.2 最低致死条件下的交互保护:将依据 1.2.1 预适应处理后的菌体细胞依据表 1 的最低致死条件分别进行胁迫处理并重悬,以前述方法点种于 MRS 培养基平板并计数得到亚适应处理细胞经历最低致死条件后的存活菌落数。

1.2.3 以酸为预适应条件的交互保护:在收集的前培养细胞菌体中分别加入预先用盐酸或乳酸调好的各 pH 浓度(pH 分别为 4.5, 4.2, 4.0, 3.8, 3.5, 3.2 和 3.0)重悬培养液重悬于 37℃ 静置 90 min,洗涤并点板计数预适应后的菌落数;余下菌液(900 μL)分别在 70℃, 90 min 的热致死条件或 10 mmol/L, 90 min 的 H₂O₂ 致死条件下处理后洗涤并重悬于等体积的生理盐水。以前述方法点种于 MRS 培养基平板 37℃ 培养 48 h 并计数得到不同梯度和种类的酸亚适应处理后细胞热致死及 H₂O₂ 致死存活菌落数。

1.2.4 细胞存活率的计算:取 10 μL 菌液以不同稀释度点种于 MRS 培养基平板上测定单位体积菌落数(colony forming per unit, CFU/mL)。将平板放置在 37℃ 下培养 48 h,计数菌落数。以上所有实验若无特殊说明,均设 3 个平行样。用 Excel 软件计算平均值和标准偏差。计算存活率时,考虑了误差的传递。

$$[\text{误差传递公式: } \Delta C = C \times \sqrt{\left(\frac{\Delta A}{A}\right)^2 + \left(\frac{\Delta B}{B}\right)^2} = \frac{A}{B} \times \sqrt{\left(\frac{\Delta A}{A}\right)^2 + \left(\frac{\Delta B}{B}\right)^2},$$

A:胁迫后的菌落数(个/mL);ΔA:胁迫后的误差(个/mL);B:对照的菌落数(个/mL);ΔB:对照的误差(个/mL);C:存活率(%);ΔC:存活率误差(%)]。

1.3 胞内 pH 的测定

本实验胞内 pH 的测定按照 Breeuwer 等报道的方法进行^[14]。

1.4 细胞膜脂肪酸成分的分析

细胞膜脂肪酸样品的制备按照 Miller 和 Berger^[15] 的方法进行。

气相色谱分析条件: PEG 毛细管填充柱 (30 m × 0.22 mm i. d., 0.25 μm film, Restek); 载气: 氦气; 流速: 29.6 mL/min; 柱压: 63.4 kPa; 柱流量: 0.5 mL/min; 进样口温度: 260°C; 检测器温度: 280°C; 柱温升温程序: 起始温度为 100°C, 保持 1 min, 随后以 4°C mL/min 的速率增至 250°C 并在 250°C 保持 5 min。C9-C20 的脂肪酸成分均可根据各自的保留时间和质谱范围在图库中进行查找, 每个样品重复测定 3 次。

2 结果

2.1 单因素胁迫对菌株 ATCC 393TM 存活率的影响

针对工业生产和应用环节的胁迫条件, 实验分别选取热、酸、H₂O₂ 和胆盐的不同梯度进行单因素胁迫实验, 并以存活率为指标, 进行亚适应及致死条件的确定 (在专一胁迫条件下, 存活率不低于 50% 为

该胁迫亚适应条件, 低于 1% 为该胁迫致死条件)。结合实验结果, 选取表 1 为交互保护的亚适应和最低致死条件。有趣的是, 研究中发现 ATCC 393TM 对于胆盐耐受性极强, 即使在 4% 胆盐浓度下胁迫 4 h, 仍能保持 1% 以上的存活率, 这为进一步揭示干酪乳杆菌的益生性及应用潜力提供了有力的证据。

2.2 交互保护对菌株 ATCC 393TM 存活率的影响

以表 1 中的预适应和致死条件进行交互保护实验, 结果表明, 本实验采用的预适应条件对于干酪乳杆菌 ATCC 393TM 酸致死交互保护作用不明显, 但能提高细胞热致死和氧致死存活率 (图 1)。

热致死交互保护实验中 (图 1-A), 4 种预适应处理均能激活细胞应对热致死条件的防御机制, 其中胆盐和酸预适应效果最为显著, 分别使 60°C 处理 60 min 的细胞存活率提高 14.0 倍和 13.6 倍。而在氧致死交互保护实验中 (图 1-B), 经历了胆盐预适应处理的细胞存活率与对照相比不增反降; 其他预适应处理中, pH 4.0, 90 min 的酸适应对保护细胞耐受氧致死环境最为有效, 使细胞存活率提高了 11.2 倍。

表 1 本研究中亚适应及最低致死条件

Table 1 Adaptive and minimum lethal conditions in this study

Adaptive condition			Minimum lethal condition		
Heat	42°C	90 min	Heat	60°C	60 min
Acid	pH 4.0	90 min	Acid	pH 2.5	90 min
H ₂ O ₂	1 mmol/L	90 min	H ₂ O ₂	5 mmol/L	60 min
Bile salts	0.2%	90 min	NA ¹	NA ¹	NA ¹

1 NA, Not Available

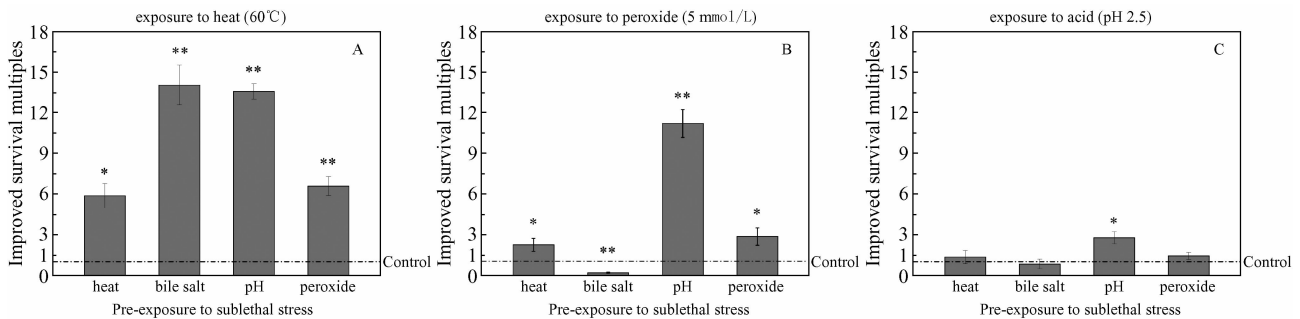


图 1 亚适应处理后干酪乳杆菌 ATCC 393TM 在热致死 (A)、H₂O₂ 致死 (B) 和酸致死 (C) 下存活率变化

Fig. 1 Assessment of cross-protection of log-phase cultures. The sublethal stresses during pre-exposure were heat (A), peroxide (B) and acid (C) stress, respectively. Control lines represent the survival rate of cultures exposed to the lethal stress directly. Samples were run in triplicate, and experiments were repeated three times. Asterisks indicate the level of statistical significance (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$) in comparison to the control in Student's t test, and standard error bars are indicated.

可见, 4 种预适应中亚适应条件的酸处理能最大程度引发 ATCC 393TM 的交互保护。

2.3 不同酸适应条件对细胞交互保护的影响

图 2 是经过不同 pH 的盐酸和乳酸胁迫预适应后, 干酪乳杆菌应对热致死和氧致死环境的存活率对比。从图中可以看到, 随着致死条件的加强, 盐酸

胁迫预适应对细胞的保护作用表现得更为显著: 酸适应后的细胞应对 70°C, 90 min 的热致死和 10 mmol/L, 90 min 的氧致死存活率最大分别提高了 305 倍 (图 2-A) 和 173 倍 (图 2-B)。

与盐酸相比, 相同 pH 的乳酸预适应对细胞保护作用较弱。在相同条件的热致死和氧致死下细胞

存活率分别最大提高了 42 倍(图 2-C)和 33 倍(图

2-D),且引发交互保护的最显著值均比盐酸要低。

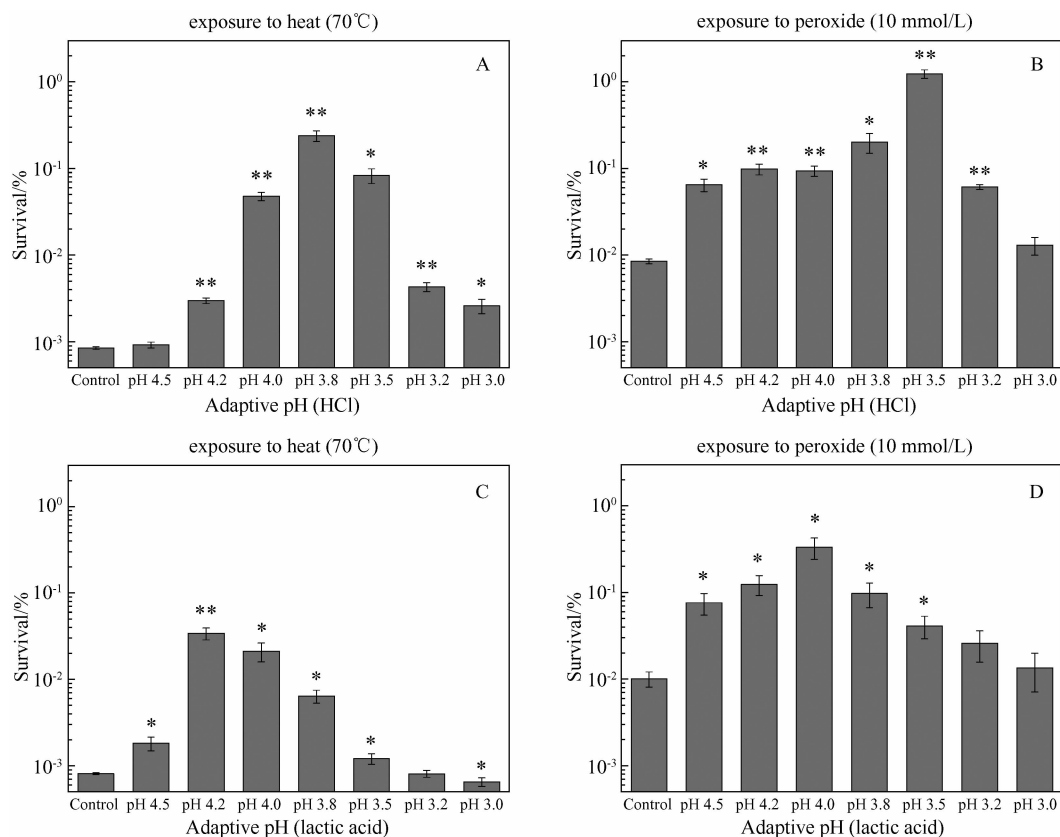


图 2 不同 pH 盐酸 (A,B) 和乳酸 (C,D) 亚适应处理后干酪乳杆菌 ATCC 393TM 在热致死 (A,C) 或 H₂O₂ 致死 (B, D) 下的存活率变化

Fig. 2 Comparison of cross-protection with HCl and lactic acid pre-exposure at different pH. Data reported were means of experiments repeated three times. Samples were run in triplicate, and experiments were repeated three times. Asterisks indicate the level of statistical significance (*, P < 0.05; **, P < 0.01) in comparison to the control in Student's t test, and standard error bars are indicated.

2.4 酸适应交互保护对胞内 pH 含量的影响

图 3 是 ATCC 393TM 在酸适应交互保护过程中 pH_i 的变化。从图中可以看出,直接经历热胁迫和氧胁迫的细胞 pH_i 明显下降(热胁迫下 7.48 → 6.65,氧胁迫下 7.48 → 7.01);而酸适应虽然本身会引起 pH_i 的少量下降,但却能维持细胞在之后的热胁迫和氧胁迫下 pH_i 的相对稳定。两种酸适应相比较,盐酸的稳定作用更为显著(热胁迫下 7.48 → 7.25,氧胁迫下 7.48 → 7.18)。

2.5 酸适应交互保护对细胞膜脂肪酸含量的影响

酸适应交互保护过程中细胞膜脂肪酸的组成变化如图 4 所示。与对照相比,热胁迫或氧胁迫后细胞膜脂肪酸中饱和脂肪酸如棕榈酸(C16:0)下降而不饱和脂肪酸十八碳烯酸(C18:1)及乳杆菌酸(Cyc-19)上升,同时,细胞膜的不饱和度分别从 1.24 上升为 1.87 和 1.88,这一结果与 Guillot 的报道相似^[16],表明这两种胁迫均能增加细胞膜的不饱和度,但增加程度与处理方式有关。有趣的是,细胞

在经历酸适应后细胞膜脂肪酸不饱和度虽然少量增加(1.24 → 1.55),但在随后经历的热致死或氧致死时不饱和度改变较小(1.55 → 1.57 和 1.55 → 1.65),这与直接经历两种致死条件后细胞膜脂肪酸不饱和度的显著增加存在较大的差异。

3 讨论

干酪乳杆菌的抗胁迫能力是其能否作为益生菌食品定殖肠道并发挥益生功效的关键,热、酸、氧和胆盐胁迫是其作为益生菌制品在生产应用环节中不可避免的几种主要胁迫环境^[17],在实际应用中,上述几种胁迫往往又是同时出现的^[18]。因此,本研究从热、酸、H₂O₂ 和胆盐的单因素胁迫手段入手,通过预适应与致死处理的协同作用,初步揭示了干酪乳杆菌 ATCC 393TM 通过生理应答机制对自身进行的交互保护。研究表明,干酪乳杆菌 ATCC 393TM 在应对胁迫环境时存在不同程度的交互保护现象,而酸预适应对提高致死条件下细胞的存活率

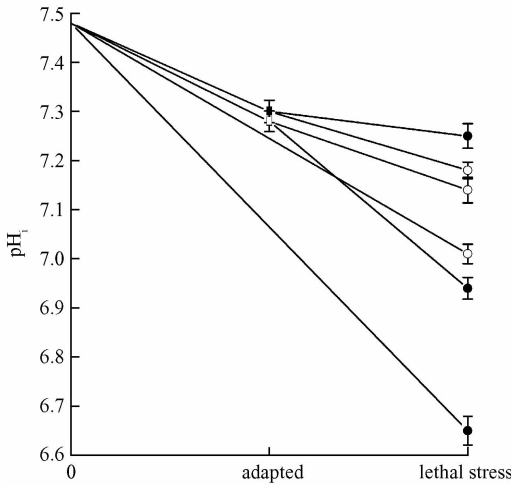


图3 交互保护前后 ATCC 393TM 胞内 pH 的变化

Fig. 3 Intracellular pH of *L. casei* ATCC 393TM before and after lethal treatment with or without acid adaption. (●) heat stress at 70°C for 90 min; (○) oxygen stress with 10 mmol/L H₂O₂ for 90 min; (■) cells adapted with HCl at pH 3.8 for 90 min; (□) cells adapted with lactic acid at pH 4.2 for 90 min. Samples were run in triplicate, and experiments were repeated three times. Error bars represent standard deviations.

效果最为显著。进一步研究表明,酸预适应在不同致死条件下引发的交互保护程度不同,其中酸适应后的细胞在应对热致死条件时存活率提高最为显著,这表明酸适应虽然能引发细胞对多种胁迫耐受性的增强,但是其保护机制可能不同。此外,本研究中发现干酪乳杆菌 ATCC 393TM 中胆盐处理能增加细胞对于热致死条件的抗性,而低浓度胆盐处理

提高细胞热胁迫抗性这一结论与最近通过二维电泳研究粪肠球菌蛋白质组分的分析结果相符:该实验发现,胆盐胁迫下的保加利亚乳杆菌的 23 个胞内蛋白、粪肠球菌的 45 个蛋白上调,而这些蛋白类别中正包含了高度保守的热应激蛋白 DnaK 和 GroEL^[17]。本研究的相似发现进一步印证了在乳酸杆菌中可能较为普遍地存在类似的交互保护机制。

为了进一步反映交互保护对细胞生理状态的影响,本研究考察了酸适应交互保护过程中胞内 pH 和细胞膜脂肪酸组成的变化。研究发现,与直接经历致死条件的细胞相比,经过酸预适应处理后,细胞在经历热致死或氧致死时胞内 pH 下降减缓;就酸适应条件而言,盐酸较乳酸有更强的维持胞内 pH 稳定的能力,这与盐酸预适应后细胞具有更高的热胁迫及氧胁迫抗性的研究结果相一致(图 2)。在细胞膜脂肪酸组成分析中发现,直接进行热致死及氧致死处理的细胞,其细胞膜脂肪酸的不饱和度显著增加,这与 Guerzoni 等发现瑞士乳杆菌在热胁迫及氧胁迫下细胞膜脂肪酸不饱和度随胁迫条件增强而持续增加的研究结果类似^[19]。胁迫条件下不饱和度增加的原因目前尚无定论,但有学者认为由于不饱和脂肪酸的合成是一个耗氧过程,氧胁迫下细胞可能是通过形成不饱和脂肪酸来减少自由基对胞内物质的损伤^[19];而热胁迫导致的蛋白变性会迫使细胞产生修复蛋白的分子伴侣 GroES-GroEL,不饱和值的增加有助于分子伴侣与磷脂双分子层的结

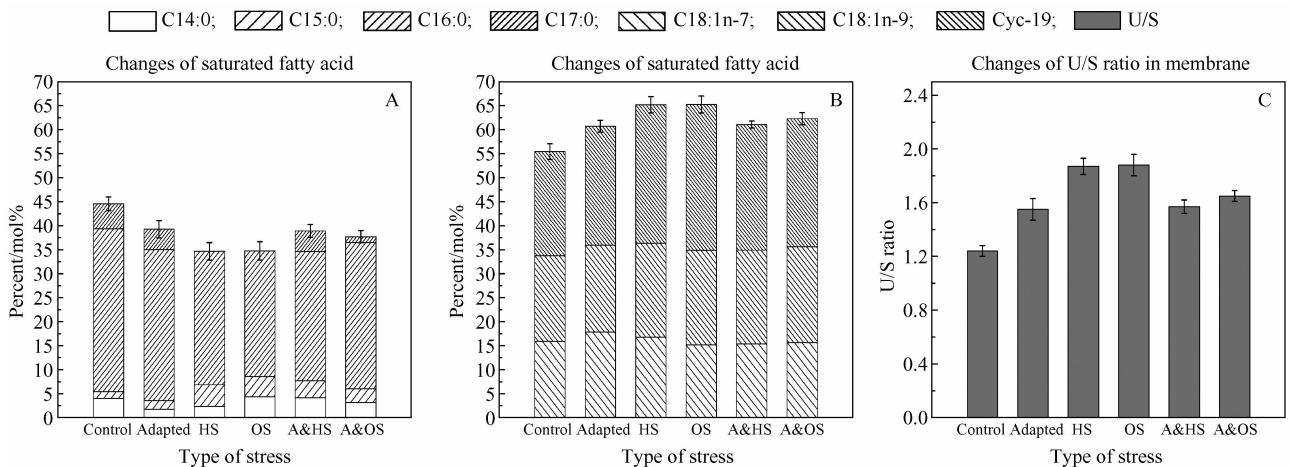


图4 不同胁迫处理方式下的 ATCC 393TM 饱和脂肪酸(A), 不饱和脂肪酸(B) 及 U/S 值(C) 变化情况

Fig. 4 Composition changes of saturated fatty acid (A), unsaturated fatty acid (B) and U/S ratio (C) of *L. casei* ATCC 393TM with different stress treatment. Adapted: Cells adapted with HCl at pH 3.8 for 90 min; HS: Heat stress at 70°C for 90 min; OS: Oxygen stress with 10 mmol/L H₂O₂ for 90 min; A&HS: Cells adapted before heat stress; A&OS: Cells adapted before oxygen stress. Samples were run in triplicate, and experiments were repeated three times. Error bars represent standard deviations. U/S ratio: (total number of unsaturation mol × number of double bonds) / (total number of saturation mol).

合^[20]。有趣的是,酸预适应后的细胞在应对上述胁迫环境时细胞膜脂肪酸不饱和度的增加趋势与直接进行相应致死胁迫处理的细胞相比则显著减小。上述研究结果表明,酸预适应所引发的交互保护可能是通过维持胁迫条件下细胞生理状态的相对稳定来减少其他胁迫对细胞造成的不利影响,具体的调控机制有待进一步研究。

本研究从干酪乳杆菌典型株 ATCC 393TM出发,研究其在单因素胁迫引发的交互保护下应对复杂环境的能力,发现了酸预适应处理能极大提高其应对热致死和氧致死条件下的存活率,并对预适应机制引发的生理应答交互作用机制进行了初步的探讨。上述研究结果有助于深入理解乳酸菌细胞应对胁迫环境的作用机制,并为进一步通过蛋白质组学分析和分子改造确定提高干酪乳杆菌交互胁迫抗性的关键调控因子提供了可借鉴的思路。

参考文献

- [1] Joint FAO. WHO Expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Available online at: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf. Accessed May. 2003, 27.
- [2] Saarela M, Mogensen G, Fonden R, Matto J, Mattila-Sandholm T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*. 2000, 84 (3): 197-215.
- [3] Prasad J, Gill H, Smart J, Gopal PK. Selection and Characterisation of Lactobacillus and Bifidobacterium Strains for Use as Probiotics. *International Dairy Journal*. 1998, 8 (12): 993-1002.
- [4] Ross RP, Desmond C, Fitzgerald GF, Stanton C. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. *Journal of Applied Microbiology*. 2005, 98 (6): 1410-1417.
- [5] Sanders JW, Venema G, Kok J. Environmental stress responses in Lactococcus lactis. *FEMS Microbiology Reviews*. 1999, 23 (4): 483-501.
- [6] Chung HS, Kim YB, Chun SL, Ji GE. Screening and selection of acid and bile resistant bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 1999, 47 (1-2): 25-32.
- [7] Gouesbet G, Jan G, Boyaval P. Two-Dimensional Electrophoresis Study of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus Thermotolerance. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002, 68 (3): 1055-1063.
- [8] De Angelis M, Gobbetti M. Environmental stress responses in Lactobacillus; A review. *Proteomics*. 2004, 4 (1): 106-122.
- [9] Broadbent JR, Oberg CJ, Wang H, Wei L. Attributes of the heat shock response in three species of dairy Lactobacillus. *Systematic and Applied Microbiology*. 1997, 20 (1): 12-19.
- [10] Scott C, Rawsthorne H, Upadhyay M, Shearman CA, Gasson MJ, Guest JR, Green J. Zinc uptake, oxidative stress and the FNR-like proteins of Lactococcus lactis. *FEMS Microbiology Letters*. 2000, 192 (1): 85-89.
- [11] O'Sullivan E, Condon S. Relationship between acid tolerance, cytoplasmic pH, and ATP and H⁺-ATPase levels in chemostat cultures of Lactococcus lactis. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, 65 (6): 2287-2293.
- [12] Rallu F, Gruss A, Maguin E. Lactococcus lactis and stress. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1996, 70 (2): 243-251.
- [13] Kim WS, Perl L, Park JH, Tandianus JE, Dunn NW. Assessment of stress response of the probiotic Lactobacillus acidophilus. *Current Microbiology*. 2001, 43 (5): 346-350.
- [14] Breeuwer P, Drocourt J, Rombouts FM, Abee T. A novel method for continuous determination of the intracellular pH in bacteria with the internally conjugated fluorescent probe 5 (and 6)-carboxyfluorescein succinimidyl ester. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996, 62 (1): 178-183.
- [15] Miller L, Berger T. Bacterial identification by gas chromatography of whole cell fatty acids. *Hewlett-Packard application note*. 1985, 228-241.
- [16] Guillot A, Obis D, Mistou MY. Fatty acid membrane composition and activation of glycine-betaine transport in Lactococcus lactis subjected to osmotic stress. *International Journal of Food Microbiology*. 2000, 55 (1-3): 47-51.
- [17] van de Guchte M, Serror P, Chervaux C, Smokvina T, Ehrlich SD, Maguin E. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2002, 82 (1): 187-216.
- [18] Lacroix C, Yidirim S. Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality. *Current Opinion in Biotechnology*. 2007, 18 (2): 176-183.
- [19] Guerzoni ME, Lanciotti R, Cocconcetti PS. Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid,

oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus*. *Microbiology*. 2001, 8 (147): 2255-2264.

[20] Török Z, Horváth I, Goloubinoff P, Kovács E, Glatz A, Balogh G, Vigh L. Evidence for a lipochaperonin;

association of active protein folding GroESL oligomers with lipids can stabilize membranes under heat shock conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997, 94 (6): 2192-2197.

Influence of cross-protection on the survival of *Lactobacillus casei* ATCC 393

Feng Xue¹, Juan Zhang¹, Guocheng Du^{1,2,*}, Jian Chen^{2,3,*}

(¹The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, ²School of Biotechnology,

³State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: [**Objective**] In this study, we investigated the cross-protection of *Lactobacillus casei* ATCC[®] 393[™] under multi-stress conditions. [**Methods**] Cells pre-adapted to mild conditions (heat, H₂O₂, acid or bile salts) were then treated at lethal temperature (>60°C) or hydrogen peroxide stress (>5 mmol/L). Furthermore, the changes of survival rate, intracellular pH and membrane fatty acid under lethal conditions with or without acid adaption were compared. [**Results**] The cross-protection in *Lactobacillus casei* ATCC 393[™] were affected by different stress conditions. Acid pre-adaption, especially hydrochloride treatment, would increase the resistance of cells to lethal heat and peroxide stresses significantly, with the survival rate of 305-fold and 173-fold, respectively. Further study suggested that the effect of acid pre-adaption might be related to the regulation on intracellular pH and the saturation of cell membrane. [**Conclusion**] Hydrochloride adaption was the best inducer for the cross-protection of *Lactobacillus casei* ATCC 393[™] to maintain relatively stable physiological status of cells. The results supplied a novel way to investigate the relationship between different protective mechanisms in *L. casei* under different kinds of stresses.

Keywords: *Lactobacillus casei*; cross-protection; stress resistance; intracellular pH; membrane fatty acid

(本文责编:张晓丽)