

菌种冷冻干燥保藏的影响因素

常金梅^{1,2} 蔡芷荷² 吴清平² 张鲁斌^{1*}

(1. 南亚热带作物研究所 湛江 524091)
(2. 广东环凯微生物科技有限公司 广州 510070)

摘要: 菌种资源保藏是微生物学及相关学科研究的基础。冷冻干燥保藏法是菌种保藏最有效的方法之一, 为进一步提高菌种保藏质量人们进行了大量的研究。本文介绍了菌种冷冻干燥保藏方法的原理和优点, 同时详细介绍了菌种冷冻干燥保藏方法的影响因素。

关键词: 菌种保藏, 冷冻干燥, 影响因素

Influencing Factors to Freeze-drying Preservation of Culture

CHANG Jin-Mei^{1,2} CAI Zhi-He² WU Qing-Ping² ZHANG Lu-Bin^{1*}

(1. Institute of Southern Subtropical Crops, Zhanjiang 524091)
(2. Guangdong Huankai Microbial Sci&Tech Co., Ltd., Guangzhou 510070)

Abstract: The preservation of culture is the base of microbiology research and correlative specialty. Freeze-drying is one of the most effective methods. Many researches have been performed to improve the effect of freeze-drying method. The paper mainly describes the principle and advantage of freeze-drying. In addition, the paper introduces the influencing factors to freeze-drying method.

Keywords: Preservation of culture, Freeze-drying, Influencing factors

菌种保藏就是对活体微生物群体进行有效的保藏, 其目的是利用一切条件使菌种不死、不衰、不变, 以便于研究和应用。至今保藏方法有 20 多种, 从总体上可分为 4 大类: 传代法、干燥法、冷冻法及冷冻干燥法^[1], 其原理主要是运用干燥、低温和隔绝空气的手段, 降低微生物菌株新陈代谢的速度, 使细菌的生命活动处于半永久性休眠状态, 从而达到保藏的目的。现在简易的保藏方法主要有定期移植法、液体石蜡法、无菌蒸馏水法、硅胶干燥法、玻璃或瓷珠干燥法、滤纸法、麸皮法、沙土管法等。而目前公认冷冻法和冷冻干燥法是长期保存微生物菌种的最安全、可靠的方法。其中制备和保存生物

材料的极佳方法是冷冻干燥法, 此法适用于大多数微生物菌种的保藏。

1 冷冻干燥保藏法

冷冻干燥保藏方法作为一种最安全、可靠的方法之一, 其适用范围广, 除少数不产生孢子只产生菌丝体的丝状真菌不宜采用此方法保藏外, 其它各大类微生物如细菌、放线菌、酵母菌、丝状真菌及病毒均可采用此方法保藏。因为它适合于微生物细胞结构特点、生存环境及其生理状态, 能满足微生物细胞结构和功能的统一性。其原理是微生物在冷冻保护剂又称抗冻剂的环境中处于冷冻状态, 然后

* 通讯作者: ✉ rubinzhang@china.com.cn

收稿日期: 2007-10-23; 接受日期: 2008-03-10

在真空减压情况下利用升华现象除去水分,使微生物在非剧烈的尽量避免细胞直接受到损伤的条件下处于干燥、缺氧状态,生理活动受到抑制。使用此法,不同菌种可选择不同的抗冻剂,目前人们所用的抗冻剂有数十种,有的是单一的,有的是按一定配方混合使用的,根据微生物不同类别不同种群加以选择使用^[2]。

2 影响菌种冷冻干燥保藏的因素

2.1 菌种悬液的浓度

在冻干技术中,为了保证在长期保藏后有足够数量的活细胞,通常采用浓度较大的菌悬液,细菌和放线菌浓度一般要大于 10^8 CFU/mL,酵母菌细胞和霉菌孢子的浓度大于 10^7 CFU/mL,这样在菌种复活时只要能保证有 0.1% 的细胞仍然有活力就可以完成菌种传代过程。但是Costa等也有报道冻干培养物的最佳浓度与保护性培养基相关,例如当保护培养基中加入蔗糖时,冻干培养物浓度以 10^{10} CFU/mL 最佳,而保护性培养基中加入脱脂乳时,培养物最佳浓度为 10^8 CFU/mL^[3]。Palmfeldt等也报道了当在保护培养基中增加蔗糖浓度时,可以降低菌悬液的浓度,以达到最高的细胞存活率^[4]。

2.2 冻干菌种材料的菌龄

冻干菌种材料的菌龄对其在长期真空冷冻干燥保藏后的细胞存活率有重要影响,例如鼠李糖乳杆菌在生长稳定期进行冷冻干燥,其菌株细胞存活率最高为 31%~50%,而在对数生长期为 14%,在延滞期仅有 2%^[5]。相反对 *Sinorhizobium* 和 *Bradyrhizobium* 在延滞期进行冻干,其存活率较高。研究表明:处于稳定期的细胞或成熟的孢子对不良环境具有较强的抗性,因而,保藏非芽孢细菌、酵母菌,应采用对数末期或稳定初期的细胞;而保藏芽孢细菌、放线菌和霉菌,要用成熟的孢子。

2.3 培养基的影响

实践证明,由于各类食品微生物菌种之间生物学特性存在较大差异,要对其进行冻干保藏,往往需根据菌种的特性对冻干培养基进行优化,提高微生物细胞的存活率,延长菌种保藏期;如Huang等在对 *L. bulgaricus* 进行冻干保藏时,在保护培养基中加入山梨醇、脱脂乳等抗冻剂,细胞存活率提高了 86.53%^[6]。Carvalho等的研究表明,选择不同的

生长培养基对保藏菌种的存活率也有重要的影响,如 *Lactobacillus bulgaricus* 菌株的生长培养基中加入甘露糖时,其经冻干后细胞存活率比加入果糖、乳糖以及葡萄糖要高,同时也显示了在培养基中添加 4 种碳水化合物,均可以提高对冻干菌株的保护作用^[7]。但同一菌种在相同成分的培养基中培养,其为液体或固体培养对微生物的存活率影响不大。

2.4 抗逆能力

通常认为,菌株在培养过程中,若处于某种逆境下,则会发生诱导抗逆反应,提高菌株的抗逆性。Palmfeldt 和 Hahn-Hagerdal 报道,在 *Lactobacillus reuteri* 菌株的培养过程中,如果将 pH 从 6 降至 5,则有助于菌株细胞在冻干过程中更好地被保护,细胞存活率将由 65% 上升至 90%,其机理可能是环境 pH 的变化诱导细胞产生了抗性物质,从而提高了它在冻干过程中的免疫力^[4]。Maus 和 Ingham 也报道了相似的结果,即 *Bifidobacterium* 培养在 6 条件下或使其培养基的 pH 由 6.2 降至 5.2,菌株将会增强抗寒和抗冻能力^[8]。一般认为,细胞处在逆境中 60 min,就会诱导抗性基因表达产生抗逆蛋白,如当降低培养基的 pH 时,微生物的细胞膜脂肪酸成分发生变化,并同时产生酸性休克蛋白。另外,也有研究报道菌株的保藏期和存活率还依赖材料的干燥程度和真空的密闭性^[9]。

2.5 保护剂

保护剂对于微生物菌株冷冻干燥保藏的存活率有较大的影响,选择得当的保护剂是提高微生物冷冻干燥保藏存活率、延长菌种保藏期的关键因素。保护剂可分为小分子保护剂(如低聚糖类、醇类、缓冲盐类、氨基酸和维生素类)和大分子保护剂(如蛋白质、多肽类和多糖类)。作为小分子保护剂,一般具有很强的亲水性,分子结构含有 3 个以上氢键,在冷冻或干燥过程中,可与菌体细胞膜磷脂中的磷酸基团或菌体蛋白质极性基团形成氢键,保护细胞膜和蛋白质结构与功能的完整性。而大分子保护剂通过“包裹”形式保护菌体,同时,促进低分子保护剂发挥作用^[4]。保护剂类型的选择主要取决于菌株的生物学特性,如海藻糖对乳酸菌的冻干保藏效果显著^[10]。但也有一些保护剂可以用于多种微生物,如脱脂牛乳、血清、甘油、甜菜碱、阿东糖、蔗糖、

葡萄糖和乳糖等^[11]。很多研究表明利用海藻糖作为冷冻保护剂可以使微生物的存活率比蔗糖更高, 其中一个重要原因是海藻糖的玻璃化温度(即由玻璃态变为高弹态所需温度)较高, 而玻璃化温度越高, 冻干物在温度升高时更容易保持稳定^[12,13]。由于蛋白的玻璃化温度相对更高, 所以其稳定性较糖类更好, 因此蛋白在菌种保藏中的作用比糖类更重要^[11]。Abadias等^[14]实验表明*Candida sake*在利用脱脂牛乳和碳水化合物做保护剂, 菌株细胞存活率可达 85.9%。因此, 蛋白和糖的混合物作为保护剂更有效。另外, 对于经常需要反复冻融的样品, 加入甘油有助于保持细胞活力^[15]。

2.6 冻结速度

在真空冷冻干燥保藏菌种的过程中, 冻结速度是影响微生物存活率的重要因素, 不同微生物最佳冷冻速度不同, 其主要原因是冻结速度必须与微生物细胞对水分的渗透率相平衡, 而细胞对水分的渗透率取决于细胞表面积与体积的比率以及细胞膜的渗透率。当冷冻速度过慢时, 细胞严重脱水, 细胞体积严重收缩, 超过一定程度时细胞将失去活性。同时冷冻速度过慢, 还会引起细胞外溶液部分结冰, 从而使细胞外未结冰的溶液中溶质浓度过高, 产生溶质损害; 当冷冻速度过快时, 细胞内的水分来不及外渗, 会形成较大冰晶, 使细胞膜及细胞器遭到破坏, 造成细胞内冰晶机械损伤。另也有研究报道, 冷冻速度在 5 /min~180 /min 之间时, 冷冻过程中胞内水分会完全渗出细胞, 胞内不会出现结晶, 细胞存活率较高; 当冷冻速度大于 5000 /min 时, 胞内水分迅速形成结晶, 不发生外渗, 细胞存活率也比较高; 但是如果冷冻速度在 180 /min~5000 /min 之间时, 细胞内水分容易在外渗过程中形成结晶对细胞造成机械损伤。但是也有人认为真核微生物菌种适宜慢速冻结; 而原核微生物菌种经慢速冻结和快速冻结后, 细胞存活率差异并不显著^[16]。

2.7 复活处理

保藏的菌种在使用时往往需要复活处理。对于液氮冷冻状态的菌种, 通常采用 38 ~40 °C 水浴快速升温解冻, 因为慢速升温解冻有可能造成胞内冰晶增大而损伤细胞。对于真空干燥和冻干菌种复活培养时, 复水介质产生的渗透压和复水条件(温度、

pH)都有可能对细胞膜以及酶蛋白分子的结构和性质产生影响, 造成细胞损伤死亡。因此, 一般采用最适该菌株生长的培养液或生理盐水并在适合其培养的温度下进行复水。Louis(1990)等人的研究表明, 冻干固定化胚芽乳杆菌在 pH 4.5 的无菌水中活化后, 菌株的存活率接近 100%, 游离胚芽乳杆菌菌株的存活率为 75%左右。其原因可能是在复水处理的过程中复水溶液的流速及用量对微生物细胞存在渗透冲击作用, 固定化微生物细胞因受固定化材料的保护而几乎不受复水溶液的渗透冲击作用, 其存活率明显高于游离微生物细胞。

3 结束语

目前, 真空冷冻干燥微生物的技术与设备日益完善, 而且已有许多冻干的菌种应用于工业化大生产, 如活性干酵母、活性干乳酸菌等。由于固定化微生物易于实现大型化、自动化、连续化的现代化生产, 真空冷冻干燥固定化微生物的研究也日益受到人们重视。

参 考 文 献

- [1] 李 雁, 郑从义. 微生物物种多样性的保护与其资源保藏. 氨基酸和生物杂志, 2003, 25(3): 4-6.
- [2] 李 华, 骆艳娥, 刘延林. 真空冷却干燥微生物的研究进展. 微生物学通报, 2002, 29(3): 78-82.
- [3] Costa E, Usall J, Teixido N, *et al.* Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze drying. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 89(5): 793-800.
- [4] Palmfeldt J, Radstrom P, Hahn-Hagerdal B. Optimisation of initial cell concentration enhances freeze-drying tolerance of *Pseudomonas chlororaphis*. *Cryobiology*, 2003, 47(1): 21-29.
- [5] Corcoran BM, Ross RP, Fitzgerald GF, *et al.* Comparative survival of probiotic *Lactobacilli* spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 96(5): 1024-1039.
- [6] Huang Lijin, Lu Zhaoxin, Yuan Yongjun, *et al.* Optimization of a protective medium for enhancing the viability of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* based on response surface methodology. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2006, 33(1): 55-61.
- [7] Carvalho AS, Silva J, Ho P, *et al.* Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotoler-

- ance and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Biotechnology Progress*, 2004, **20**(1): 248–254.
- [8] Maus JE, Ingham SC. Employment of stressful conditions during culture production to enhance subsequent cold-and acidtolerance of bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, **95**(1): 146–154.
- [9] Yukie Miyamoto-Shinohara, Junji Sukenobe, Takashi Imaizumi, *et al.* Survival curves for microbial species stored by freeze-drying. *Cryobiology*, 2006, **52**(1): 27–32.
- [10] B De Giulio, Orlando P, Barbal G, *et al.* Use of alginate and cryo-protective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2005, **21**(5): 739–746.
- [11] Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 2003, **46**(3): 205–229.
- [12] Gomez ZA, Tymczyszyn E, De AG, *et al.* Action of trehalose on the preservation of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* by heat and osmotic dehydration. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, **95**(6): 1315–1320.
- [13] Streeter JG. Effect of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, **95**(3): 484–491.
- [14] Abadias M, Teixido N, Usall J, *et al.* Viability, efficacy, and storage stability of freeze-dried biocontrol agent *Candida sake* using different protective and rehydration media. *Journal of Food Protection*, 2001, **64**(6): 856–861.
- [15] Acha SJ, Kuhn I, Mbazimaa G, *et al.* Changes of viability and composition of the *Escherichia coli* flora in faecal samples during long time storage. *Journal of Microbiological Methods*, 2005, **63**(3): 229–238.
- [16] Frédéric Dumont, Pierre-André Marechal, Patrick Gervais, *et al.* Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. *Applied and environmental microbiology*, 2004, **70**(1): 268–272.

科技信息

清除蚊子的两种方法

蚊子会侵扰民众, 尤其是农村更为突出, 同时它是传播疾病的“帮凶”。清除蚊子有多条途径, 其中有两种方法值得注意:

1) 微生物方法: 包括细菌方法和真菌方法。早在二十几年前, 中科院微生物研究生范云六和徐婉学在研究微生物治蚊方面发现侧芽孢杆菌(*Bacillus laterosporus*)对于消除蚊幼具有良好的效果; 中科院病毒研究所袁志明研究小组长期从事细菌灭蚊的基础和应用研究, 研制的球形芽孢杆菌(*Bacillus sphaericus*)灭蚊幼制剂, 对库蚊和按蚊有特异性的毒杀作用, 对人畜禽和水生物无毒害, 不污染环境, 是我国灭蚊幼的一种高效安全的“生物灭蚊制剂”, 近二十年来, 该菌剂应用于 150 万亩的灭蚊实践, 取得了显著的社会效益和生态效益。目前该所对自己遴选的 *Bacillus sphaericus* C3-41 进行了分子生物学的基础研究, 该菌的全基因组测序工作已完成。至于真菌治蚊已进入实用化, 如我国研制的球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)灭蚊取得了成功, 它不仅毒杀马尾松松毛虫(通过酶的作用), 而且对蚊幼有较强毒杀力。

2) 有效的非微生物方法: 日本研究人员尝试铜制硬币消灭蚊子幼虫取得了良好的效果, 避免了使用化学杀虫剂而产生的抗药性和环境污染, 实验结果表明, 将铜制硬币放入带有蚊子幼虫的积水中, 可防止幼虫转化为成虫。

总之, 炎热天气, 蚊子是传播疾病的重要“帮凶”之一, 清除蚊幼是从根本上控制蚊子发展的捷径。

(柯为 供稿)