

# 真空冷冻干燥微生物的研究进展

李 华 骆艳娥 刘延琳

(西北农林科技大学葡萄酒学院 杨陵 712100)

**摘要:** 真空冷冻干燥法是保藏微生物的最有效的方法之一, 为提高真空冷冻干燥后微生物细胞的成活率人们已进行了大量的研究。综述了真空冷冻干燥方法的原理、应用及提高真空冷冻干燥后微生物细胞成活率的方法。

**关键词:** 真空冷冻干燥, 微生物

**中图分类号:** Q939    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0253-2654 (2002) 03-0078-04

一切从生产实践或科学研究中获得的具有优良性状的微生物都是国家的重要资源,

**收稿日期:** 2001-02-28, **修回日期:** 2001-08-15

并且保藏微生物是一切微生物工作的基础,因此有效地保藏这些微生物并充分地利用它们深受人们关注。目前常用的保藏方法有液体石蜡低温保藏法、斜面低温保藏法、半固体穿刺保藏法、沙土保藏法等,特殊的保藏方法有液氮冷冻保藏法、真空冷冻干燥保藏法等,而后者是目前最有效的保藏方法之一<sup>[1]</sup>。

## 1 真空冷冻干燥法的优点

真空冷冻干燥保藏法具有如下几个突出的优点:①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,其他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<sup>[2]</sup>;②保藏期长,成活率高。Hesseltin等人报道保藏在真空冷冻干燥安培管中的真菌成活期长达40多年<sup>[3]</sup>,一般微生物细胞的成活率在80%以上,固定化微生物细胞的成活率则高于游离微生物细胞的成活率<sup>[4]</sup>;③微生物在保藏期可避免其它杂菌污染;④便于携带运输,易实现商品化生产。

## 2 真空冷冻干燥的原理、操作步骤及特点

**2.1 真空冷冻干燥的原理** 水有3种聚集态(又称相态)即固态、液态和气态,这3种相态之间达到平衡时必有一定的条件,这种条件称为相平衡关系,水相平衡关系是分析研究含水细胞冷冻干燥原理的基础,根据热力学中相平衡理论,水的三相点温度为0.0098℃,三相点的压力为609.3Pa。在水发生相变的过程中,当压力低于三相点的压力时,固态冰可直接转化为气态的水蒸气。真空冷冻干燥即是把含水量大的物质预先冷冻,然后在真空条件下使物质中的冰晶升华,待冰晶升华后再除去物质中的部分吸附水,最终得到残水量很少(常为1~4%)的干制品。

**2.2 真空冷冻干燥的操作步骤** 微生物的真空冷冻干燥分3个步骤进行。首先是预冻过程,预冻的速度与温度根据微生物的种类而定,但大多数微生物的预冻速度宜为3℃/min,预冻温度常为-40℃。在这个过程中微生物体内的游离态水冻结为小冰晶,冰晶体对微生物的细胞有机机械损伤作用。研究表明预冻增大了细胞膜的通透性,破坏了细胞膜的结构,其破坏程度与细胞膜内非饱和脂肪酸/饱和脂肪酸的值有关<sup>[5]</sup>。其次是升华过程,将预冻好的微生物置于高真空度的环境中(常为 $133 \times 10^{-3}$  mbar左右),冰晶吸热而直接变成水蒸气从微生物体内逸出。升华过程是由内向外逐渐推移的,冰晶升华后在微生物体内留下许多微孔隙。再次是解析过程,这一过程使得残留在微生物体内的结合态水解析出来,进一步降低微生物体内水分的含量。

**2.3 真空冷冻干燥制品的特点** 真空冷冻干燥的过程决定了其干制品具有如下的特点:①冻干是在程序升温(-40℃~20℃)、高真空( $133 \times 10^{-3}$  mbar)状态下进行的,因而能保持微生物细胞内酶的活性;②干制品一般不失原有的固体骨架结构,保持原有的形态;③冻干制品是直接由冰晶升华而制成的,因而具有多孔结构,具有理想的速溶性和速复水性;④冻干制品采用真空或充氮包装可保存数10年。

## 3 真空冷冻干燥微生物的研究现状

**3.1 真空冷冻干燥微生物的种类** 真空冷冻干燥是保藏酵母菌、细菌、真菌孢子及霉菌最有效、最成功的方法之一<sup>[1]</sup>。目前适合用真空冷冻干燥法保藏的微生物大致分类如下:酵母菌:椭圆酵母菌(*Saccharomyces ellipsoideus*)、酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)、裂殖酵母菌(*Schizosaccharomyces*)等<sup>[6]</sup>;细菌:保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus*

*bulgaricus*)、胚芽乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)、双歧乳杆菌 (*Lactobacillus parabifidus*)、希莱曼氏乳杆菌 (*Lactobacillus leichmannii*)、嗜热乳杆菌 (*Thermophilic lactobacilli*)、瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*)、德尔布吕克氏乳杆菌 (*Lactobacillus delbrueckii*)、干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)；乳酸乳球菌 (*Streptococcus lactis*)、屎链球菌 (*Streptococcus faecium*)、嗜热唾液链球菌 (*Streptococcus thermophilus*)、酪链球菌 (*Streptococcus cremoris*)；乳明串珠菌 (*Leuconostoc lactis*)、酒类酒球菌 (*Oenococcus oeni*)、肠膜样明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*) 等<sup>[7-10]</sup>；霉菌：犁头霉菌 (*Abisidia blakesleeana* Lendn)、小克银汉霉菌 (*Cunninghamella blakesleeana* Lendn)、赤霉 (*Gilberella persicaria* Hesselt)、螺旋霉菌 (*Helicostylum piriforme* Bainier)、毛霉 (*Mucor caninus* Pers. ex Fr)、念珠霉 (*Mycotypha microspora* Fenner)、无根根霉 (*Rhizopus arrhizus* Fisch)、匍匐根霉 (*Rhizopus stolonifer* Vuill)、支霉 (*Thamnidium elegans* Lk. ex S. F Gray) 等<sup>[3]</sup>。

**3.2 真空冷冻干燥的保护剂** 微生物体内含有 70%~95% 的水分<sup>[11]</sup> (细菌 75%~85%、酵母菌 70%~80%、霉菌 85%~95%)，这些水分以结合态和游离态两种形式存在。微生物的生命活动与游离态的水分紧密相关，细胞失去可利用的水分后将造成干燥状态，这时细胞内的细胞质发生浓缩而粘度增大、电解质浓度增高、细胞质的 pH 值和胶体状态发生改变，甚至细胞内蛋白质部分变性等。

为了提高微生物真空冷冻干燥后细胞的成活率及稳定性，常在冷冻时加入各种保护剂，这些保护剂具有两个作用<sup>[6]</sup>：作为支持物和受体在复水过程中为干物质提供一定的骨架结构；在冷冻干燥过程中保护活细胞。据报道保护剂可以使微生物细胞的成活率接近 99.8%<sup>[4]</sup>，并使得微生物在冷冻干燥过程中保留少量的水分以适应超低温、干燥、低 pH、高酒度等能抑制或致死微生物的不良环境。

一些非斥水性的聚合物、糖类、醇类、氨基酸等可作为保护剂<sup>[6]</sup>。Bemy 等人<sup>[1,4,6,7]</sup>对一些聚合物、糖类、白蛋白、牛奶、蜂蜜、多聚体、氨基酸、醇类的保护作用进行了研究。结果表明凡具有排斥微生物体内水分的高分子聚合物如聚乙二醇、甘露糖醇、半乳糖醇、肌醇、山梨糖醇等对冷冻干燥微生物均不具有保护作用。脱脂乳不论是单独使用还是与其他保护剂混用均有较好的效果，聚丙烯吡咯烷酮 (PVP) 保护效果较差，羧甲基纤维素 (CMC) 与羟甲基纤维素 (HMC) 只可以使酵母菌在冷冻干燥后的成活率为 20% 左右。脱脂奶粉与葡聚糖为冻干的微生物提供一种轻而多孔的结构，使微生物容易复水。聚丙烯吡咯烷酮、羧甲基纤维素、羟甲基纤维素冻干后虽轻而多孔但复水困难。肌醇、固态谷氨酸、葡萄糖、甘露糖、海藻糖、棉子糖及蜂蜜的用量小于 10% 时冻干后变得粘稠且残留量很少，当大于 10% 时则无法冻干。

目前脱脂乳、蔗糖、聚乙烯吡咯烷酮、羟甲基纤维素、裂殖体糖及藻酸通常与其他物质如阿东糖醇、谷氨酸、甘油等混和使用。微生物在真空冷冻干燥后成活率与干物质的结构无关，但与微生物冻干时的成分紧密相关<sup>[1]</sup>。通常配方如下：

细菌：5g 谷氨酸 + 95g 水；1mol/L 甘油 + 10g 脱脂乳 + 80.8g 水；0.75mol/L 阿东糖醇 + 10g 脱脂乳 + 74.8g 水；酵母菌：葡聚糖 + 10g 脱脂乳 + 蜂蜜 (或谷氨酸、海藻糖、棉子糖) + 80~90g 水；5g 谷氨酸 + 10g (或 20g) 脱脂乳 + 10g 海藻糖 (或棉子糖、蜂蜜) + 75g 水；霉菌：10g 脱脂乳 + 5g 谷氨酸钠 + 10g 蜂蜜 (或 5% 蜂蜜、10g 棉子糖、10g 海藻糖) + 75g 水<sup>[6]</sup>。

**3.3 真空冷冻干燥的速度** 冷冻速度是真空冷冻干燥的关键因素，且最佳冷冻速度因

微生物细胞种类不同相差极大,其主要取决于水分渗透率是否跟得上降温速率,取决于细胞表面积与体积之比以及膜的渗透率。当冷冻速度低于最适速度时,细胞内溶液与细胞外溶液的浓度差将对细胞造成损害;当冷冻速度高于最适速度时,细胞内的冰晶也会损伤细胞,降低细胞的成活率<sup>[12]</sup>。据报道酵母菌合适的冷冻速度为 $3^{\circ}\text{C} \sim 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ,乳酸菌的合适冷冻速度为 $3^{\circ}\text{C} \sim 5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ <sup>[1]</sup>。

**3.4 干活性微生物的复水处理** 在实际生产中直接将干活性菌接入需要进行处理的液体中,如葡萄酒、废水、苹果汁、酸牛奶等,常导致接种失败。微生物的生长繁殖与环境的温度、pH值、渗透压、超声波、辐射等因素有关,不良的环境容易使冻干的微生物的生长受到抑制甚至致死,因此常在使用冻干微生物之前将其进行复水处理,有的微生物还需要进行驯化培养<sup>[13]</sup>,等微生物刚进入稳定期时再接种于需要进行处理的液体中。

Louis Kearney (1990) 等人的研究表明冻干固定化胚芽乳杆菌在 pH4.5 的温无菌水中活化后菌株的成活率接近 100%, 游离胚芽乳杆菌菌株的成活率为 75% 左右<sup>[4]</sup>。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<sup>[14]</sup>, 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, 其成活率明显高于游离微生物细胞。

## 4 真空冷冻干燥微生物存在的问题与展望

**4.1 真空冷冻干燥微生物存在的问题** ①有些微生物在真空冷冻干燥后成活率较低,需要经过大量的实验才能得到合适的真空冷冻干燥条件或冷冻干燥前的预处理方法;②冻干的微生物在使用前需要经过复水活化处理,具体的活化方法根据微生物的特异性而定;③真空冷冻干燥微生物耗时较长,一般为 6~18h,且费用较高。

**4.2 真空冷冻干燥微生物的展望** 随着 21 世纪 70 年代兴起的固定化微生物细胞技术的蓬勃发展,人们发现固定化微生物细胞因受固定化材料的保护而提高了微生物对环境的适应性。Champagne 等人研究了固定化嗜热乳杆菌的牛奶酸化特性,结果表明冻干的固定化嗜热乳杆菌的酸化特性与传统的游离活性干嗜热乳杆菌的酸化特性相似,并且干固定化嗜热乳杆菌的酸化能力比游离嗜热乳杆菌的酸化能力强<sup>[15]</sup>。Louise Kearney 等人也报道了加冷冻干燥保护剂的固定化胚芽乳杆菌在真空冷冻干燥过程中的成活率明显高于加同样保护剂的游离的胚芽乳杆菌的成活率,并且在复水处理中这一关系仍成立<sup>[4]</sup>。

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] Berry J, Hennebert G. *Mycologia*. 1991, 83 (6): 805~815.
- [2] Anne E, Priest P. *Letters in Applied Microbiology*, 1986 2: 69~70.
- [3] Hesselstine C, Baradle J, Benjamin C. *Mycologia*, 1960, 52: 762~774.
- [4] Louis K. *Applied and Environment Microbiology*, 1990, 3112~3116.
- [5] Castro H. *Journal of Applied Microbiology*, 1997, 82: 87~94.

- [6] Coutinho C, Bernardes E, Felix D, *et al.* Journal of Biotechnology, 1988, 7: 23 ~ 32.
- [7] Graciela Fgiori G, Ruiz A, *et al.* Applied and Environment Microbiology, 1985, 413 ~ 415.
- [8] Valdez D, Giori G, Ruiz A, *et al.* Applied and Environment Microbiology, 1983, 45: 302 ~ 304.
- [9] Henick-Kling T. Journal of Applied bacterial Symposium Supplement, 1995, 79: 29s ~ 37s.
- [10] Valdez G, Giori G, Ruiz A, *et al.* Applied and Environment Microbiology, 1985, 1339 ~ 1341.
- [11] 无锡轻工业大学, 天津轻工业学院. 食品微生物学. 北京: 中国轻工业出版社, 1997.
- [12] Mazur P. Science, 1970, 168: 939.
- [13] Micas S, Pardo I, Farrer S. International Journal of Food science and Technology, 2000, 35: 75 ~ 79.
- [14] Lamoley L, Lacroix C, Champagne C, *et al.* Biotechnology and Bioengineering, 1997, 56: 502 ~ 510.
- [15] Champagne C, Gardner N, Soullignac L, *et al.* Journal of Applied Microbiology, 2000, 88: 124 ~ 131.