

微生物冷冻干燥的抗性机理

陈声明 吕 琴

(浙江农业大学环保系, 杭州 310029)

微生物冷冻干燥法是长期保藏菌种的较好方法之一。因其便于批量生产、长期保藏成活力高, 保藏和运输设备简单而成为一种普遍使用的保藏方法, 已广泛应用于保存大部分细菌、真菌和一些病毒。近年来人们对微生物冷冻干燥的抗性机理进行大量的研究。现对其中几个关键问题叙述如下。

1 冷冻干燥过程微生物细胞的损伤

经过冷冻干燥后细胞损伤的主要原因在于: 冰晶形成^[1]、盐浓度改变^[2]、细胞膜透性改变和代谢作用损伤^[3]。另外, 冷冻干燥过程可能造成对细胞内核酸的损伤而诱导突变体的产生^[4]。

微生物冷冻干燥伴随着前期胞内冰晶形成和对细胞膜透性的变化。冰晶是纯水物质。冰晶形成后, 细胞质中盐浓度升高, 造成胞内 pH 值和离子强度改变, 潜在的不利化学反应发生率提高。冷冻干燥后, 水分流失, 导致对细胞膜的稳定产生重大影响。对细胞膜的破坏包括膜融合和从液晶相向凝胶相转变。生物膜中异形混合物的出现和相变会使膜透性增加, 从而使胞内的物质和胞外水溶性物质双向交换。冷冻细胞失去相当一部分细胞蛋白, 包括潜在水解酶和抑制因子。抑制因子的释放使机能异常细胞水解酶活力升高, 出现代谢作用损伤。冷冻干燥中不可避免地会造成部分细菌细胞的损伤, 甚至死亡。如果细菌细胞在冷冻干燥过程中核酸损伤, 那么 DNA 修复过程中的一个错误就可能导致生物突变体的产生。Webb 认为^[4]水分丧失是致突变的。DNA 损伤即使不是主要的, 也是细胞生命力丧失的重要因素。

冷冻干燥中不可避免地会造成部分细菌细胞的损伤, 甚至死亡。然而, 环境条件的骤然变

化会激发细胞内部产生相应的抗逆反应, 其生理生化性质有所不同。

2 微生物冷冻干燥过程中膜流动性与脂肪酸组成变化

膜的完整性对于细胞的生存是至关重要的。膜的组成会随着生长温度的变化而变化。通常人们观察到的脂类组成变化, 反映出脂类在决定细胞膜通透性大小, 调节膜蛋白活性方面的重要性。某些细菌如真细菌、蓝细菌和古细菌能在广泛的生态多样性范围(由零下低温至沸点温度)生长。它们表现出脂类组成变化和对不同温度的适应性。脂肪酸组成的变化表现在不饱和度、链长度、分支状或环状脂肪酸等方面。脂肪酸的生物合成也会改变。不同细菌种类有不同的变化方式, 其中由饱和向不饱和之间的转换是最常见的(除蓝细菌外)。由饱和脂肪酸变为不饱和脂肪酸的过程, 可以在“需氧”情况下, 通过膜磷脂的脂肪酸的去饱和作用, 或者通过“厌氧途径”, 重新合成脂肪酸全部形成双键。

某些种类细菌利用脂酰基链长度变化来调节膜的流动性。嗜冷微球菌(*Micrococcus cryophilus*)具有这种唯一的调节机制。棕榈油酸与油酸(不是指不饱和脂肪酸的总量)相对比例随细菌所处的环境温度的变化而改变。

革兰氏阳性细菌(如芽孢杆菌)常含有相当大比例的甲基分支链的脂肪酸。环境温度降低时, 含甲基分支链的脂肪与直链脂肪酸之比值增大, 芽孢杆菌也呈现出随温度的变化而改变酰基链长度的现象。

该项研究系中俄合作项目

1995-08-22 收稿

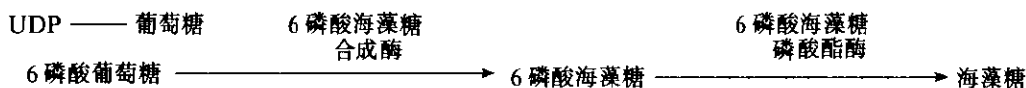
Sulphotokus (一种古细菌) 能通过脂肪酸环化 (伴随着单纯不饱和脂肪酸而产生的环丙烷脂肪酸) 来调节膜流动性。与上述需氧途径去饱和的变化相反, 大肠杆菌则利用“厌氧途径”去饱和, 同时酰基链长度随温度下降而伸长, 而脂肪酸不饱和程度的增加在一定程度上增大了细胞膜的流动性。

所有反应都有敏感的关键酶来触发调节, 对于需氧途径去饱和的关键酶可能是去饱和酶自身或控制此酶合成的调节分子; 对于厌氧途径关键酶则常常是脂肪酸合成酶复合物的组分之一。关于这方面的研究很少, 只有 *M. cryophilus* 延伸酶活性随温度变化而变化的报道。芽孢杆菌中调节酰基链长度的关键性酶还未发现。

根据完成脂肪酸的变化的合成模式将各种脂肪酸组成和热反应方式分为“修改”(modification)和“附加”(addition)两类。当环境温度突然降低, 修改合成模式中存在的脂类在去饱和酶作用下去饱和, 细胞膜更富流动性。古细菌的脂肪酸环化过程可能也属于修改合成模式。但这方面的研究尚未报道。除以上那些脂肪酸变化属修改合成模式外, 其他各种需重新合成, 以形成新膜脂肪酸变化的都属于“附加”合成模式。

修改合成模式受去饱和酶合成的诱导调节或受去饱和酶活性影响。从理论上说, 修改合成模式对脂肪酸变化的影响比附加合成模式的影响更为迅速。这使通常发生需氧去饱和途径调节膜流动性机会更多的现象得以解释。

以上这些都不能形成一个完整的理论, 因为人们对脂肪酸组成的变化研究较多, 而对脂肪酸合成途径的变化及其对膜性质 (如流动性) 的影响知之甚少^[5]。



因此, 海藻糖在微生物细胞中的主要功能是一种典型的应激代谢物^[10]。

3 微生物冷冻干燥过程中的抗性机理

3.1 冷冻干燥: 冷冻干燥过程实际上是细胞脱水浓缩, 细胞内处于高渗状态。而细胞对高渗胁迫的适应是保护生物免受致死效应的重要生物学过程。自然界存在一类低温干燥下处于休眠状态的生物^[6]如真菌孢子, 酵母细胞等, 存在几十年而不死, 当环境恢复正常的温度、水份时, 能迅速恢复活性, 这些生物体内经常含有大量的糖类和糖醇类物质, 这些物质的存在与其活力有关。

1982 年 Kennedy^[2]提出了大肠杆菌 (*E. coli*) 细胞内膜中存在一种“渗透感应”蛋白的观点。这种感应蛋白在调节大肠杆菌在高渗透压环境下低聚糖的生物合成方面起着重要作用。低聚糖的生物合成是与环境渗透强度的变化相一致的。1984 年 Rudulier 提出大肠杆菌中存在渗透调节基因 (*Osmgenes*), 它控制一系列分子如甜菜碱和脯氨酸的生成, 从而使大肠杆菌能抵御失水的不良环境^[7]。

3.2 海藻糖的作用: 近年来, 人们对微生物耐高渗环境时细胞质中海藻糖的含量变化产生了浓厚兴趣, 海藻糖具有稳定细胞膜和蛋白质结构的抗逆保护作用。海藻糖是由两个葡萄糖分子 α - α -1-1 键连接的非还原性双糖, 它广泛存在于低等植物、藻类、细菌、真菌、酵母, 昆虫及无脊椎动物中。研究表明, 存在于细胞质内的海藻糖含量依外界环境的变化而变化, 当细胞处于饥饿, 失水胁迫环境时, 这种化合物开始合成, 胞内海藻糖含量迅速上升; 当细胞恢复到正常条件时, 积累的海藻糖大部分被降解。细胞内海藻糖含量与其细胞对逆境忍受程度呈平行增减关系^[8,9]。海藻糖在微生物细胞如大肠杆菌酿酒酵母细胞中的合成, 是由两种酶催化的反应:

3.3 “水分替代”假说: 生物膜在冷冻干燥脱水时, 结构和功能的完整性会发生不可逆的反

应,近年来研究证明某些小分子物质(如单糖、双糖、甘油等)可以代替膜磷脂和蛋白质的极性基团周围的分子,在缺少水分时,保留膜和蛋白质结构、功能和完整性^[10],因此,人们提出了“水分替代”假说。糖类物质上的羟基与磷酸基团连接形成氢键,从而阻止和限制细胞膜因失水而融合,并降低相变温度,不易向凝胶相转变而保持细胞液晶相,从而增加膜的流动性。由于糖类物质在细胞中能起着与水分相同的作用,所以冷冻干燥失水对膜和蛋白质的结构没有影响^[6]。1984年 Crowe 等^[11]运用红外光谱分析研究发现海藻糖与极性基团作用模式:羟基与磷酸基团形成氢键。还有很多事例证明“水分替代”假说的正确性^[12~14]。

4 保护剂在微生物冷冻干燥中的应用

大多数微生物在冷冻干燥条件下存活较长时间,有的微生物贮存几十年仍有活力。通常在冷冻之前加入一些保护剂(特别是糖类)到微生物悬浮液中,能增加冷冻干燥后微生物的存活率^[15,16]。

关于保护剂对细菌细胞存活影响的研究国外已有许多报道。科学家们分别用甘油^[17]聚乙二醇吡咯烷酮^[18]、海藻糖和脱脂牛奶^[19]作保护剂,冷冻干燥保藏 *Helicobacter pylori*、布鲁氏菌属(*Brucella*)细菌和保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*)等微生物,表现出较高的存活力,但效果最明显的是海藻糖和脱脂牛奶对保加利亚乳杆菌的保护作用。Deanton 等^[19]报道了 0.3mol/L (12%) 的海藻糖能提高保加利亚乳杆菌的冷冻干燥保藏存活力。郑从义等也报道了^[17]不同浓度的海藻糖和蔗糖作为保护剂对盐生盐杆菌(*Halobacterium halobium*)R₁菌株冷冻干燥存活力的影响。结果表明两种糖在不同浓度水平(海藻糖 6%、蔗糖 18%)时分别对盐生盐杆菌冷冻干燥的保护效果相似,当用 6%海藻糖与 18%蔗糖混合作为保护剂比单纯使用某种糖时的保护效果明显,存活率提高。海藻糖和蔗糖对盐生盐杆菌 R₁菌株在冷冻干燥条件下的保护作用进一步

证实了海藻糖在细胞冷冻脱水过程中具有与细胞膜磷脂相互作用,从而取代水分子保护细胞完整性的功能^[6]。说明细菌在冷冻干燥过程中,细胞膜的完整性直接影响着生理功能和存活率。

保护剂在冷冻干燥过程中常与其能结合水和阻止胞内、外冰晶形成的能力有关。以上各种保护剂之所以具有保护效能,可能与其组分中存在类似于糖类的物质或本身就包含糖类物质有关。但糖类稳定细胞膜和磷脂的能力存在很大差异,其中海藻糖至少在已测定的各种糖类中是最有效的^[6]。例如,蔗糖和海藻糖都能起到保护冷冻干燥膜的作用,但所需蔗糖的含量更多^[20]。1987年 Leopold 和 Vertucci 提出一种想法来解释蔗糖和海藻糖保护效果的差异。他们指出因为蔗糖比海藻糖具有更容易形成结晶的趋势。可以推想,蔗糖的结晶状态是不易与脂类发生作用的。1988年 Caffery 等人利用 X 射线光谱分析对这一设想进行测试。结果发现,蔗糖与磷脂膜泡共同干燥确实趋于形成结晶^[23]。

海藻糖具有稳定细胞膜和蛋白质结构、抗逆保鲜的作用。它作为保护剂、添加剂在菌种保藏、食品保鲜及营养饮料和化妆品的生产中具有广泛用途。因此,微生物经冷冻干燥保藏过程后在外加介质(海藻糖等)和内在机制调节的共同作用下,仍然能保持其生物学性状和活力。

参 考 文 献

- [1] Mazur P. Cryobiology, 1966, 3: 213~244.
- [2] Serivin-Massieu M. Appl Microbiol. 1969, 18: 689~691.
- [3] Heckly R J. Cryobiology, 1981, 18: 592~597.
- [4] Webb S J. J Appl Bacteriol, 1963, 26: 307~313.
- [5] Allgood G S, Perry J J. J Bact, 1986, 168(2): 563~566.
- [6] Crowe J. H, Croule L M. Biochem Biophys Acta., 1988, 947: 367~384.
- [7] Rudulier D L. Science, 1984., 223: 1064~1068.
- [8] Grba S, Rur J. Appl Microbiol, 1975, 2: 29~37.
- [9] 戴秀玉, 程 苹, 周 坚等, 微生物学通报, 1995, 22(2): 102~104.
- [10] Wanner D T. Water Activity: Influence on Food Quali-

(下转第 254 页)

(上接第 238 页)

- ty, Eds L. B. Rockland, G. F. Stewart Acad. Press, 1981, 435~440.
- [11] Crowem J H. Science, 1984, **223**: 701~703.
- [12] Anchoroguy T, Carpenter J F, Loonis S H, *et al.* BBA, 1988, **946**: 299~302.
- [13] Crowe J H, Crowe L M, Chapman D. Science, 1984, **223**: 701~704.
- [14] Strauss G. BBA (Biomembrances), 1986, **858**: 169~172.
- [15] Heckly R J. Appl Microbiol, **3**: 1~76.
- [16] Merryman H J, Cryobiology, Academic Press, Inc, New York, 1966.
- [17] Spengler A J. Clin Pathol, 1992, **45**(8): 737.
- [18] Zakhiebnaya C D. LAB, DELD, 1991, **2**: 62~63.
- [19] Deantoni G Z. Cryobiology, 1989, **26**: 149~153.
- [20] 郑从义, 屈三再, 张珞珍等, 微生物学通报, 1994, **21**(4): 247~250.
- [21] Crowe L M, Mouradian R, Crowe J H, *et al.* Biochem Biophys Acta, 1984, **769**: 141~150.
- [22] Leopold A C, Vertucci C W. in Membranes, Macromolecules and stability in the Dry state (Leopold, C., ed.), Cornell university press, Uthaca, 1987, 22~34.
- [23] Caffery M, Fonseca V, Leopold A C. Plant Physioul., in Press, 1988.