

# 乳酸菌的抗冷冻性及耐受机理

邵玉宇 陈霞 杨梅 乌兰 张和平\*

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 内蒙古 呼和浩特 010018)

**摘要:** 乳酸菌发酵剂在工业生产过程中, 会受到冷冻的刺激, 如真空冷冻干燥及后期的低温保藏, 此外, 发酵乳制品的保藏和干酪的成熟过程也都在低温中进行。这些均会对乳酸菌发酵剂及发酵乳制品质量产生一定的影响。因此, 掌握乳酸菌在冷冻条件下的反应机理有助于优化发酵剂和发酵乳制品在工业生产中的冷冻、发酵和贮藏条件, 从而提高产品质量和生产效益。本文对乳酸菌的抗冷冻性及机理进行了分析, 并对发酵剂的保护提出具体措施。

**关键词:** 乳酸菌, 抗冷冻机理, 抗冷冻能力

## Anti-freezing Property and Mechanism of Lactic Acid Bacteria

SHAO Yu-Yu CHEN Xia YANG Mei WU Lan ZHANG He-Ping\*

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China)

**Abstract:** During industrial production of starters, Lactic Acid Bacteria are subjected to cold shock by preservative techniques like freezing, frozen storage, and vacuum freeze-drying. Moreover, starters subjected to these pressures need to function effectively during application at low temperature used in the preservation of fermented foods and curing of cheese. All of these factors can influence the quality of starter culture and its fermented foods to some extent. The survival and physiological conditions of the starter bacteria preserved by such techniques (freezing, frozen storage, and lyophilization) will determine their functionality in such applications. Therefore, a better understanding of the responses and mechanisms of Lactic Acid Bacteria under low temperatures and freezing may contribute to the protection of freezing, fermentation and storage for starter culture and fermented foods when they are suffered in low temperature processes. In this study, the protective mechanisms needed for starter bacteria to survive in above mentioned preservative techniques with good functionality were analyzed. Based on these analyses, we have proposed protection methods that would improve the functionality of starter bacteria preserved by freezing, frozen storage and/or lyophilization.

**Keywords:** Lactic Acid Bacteria, Anti-freezing mechanism, Cryotolerance

生产优质商业发酵剂的关键在于优良菌株的筛选。根据不同目的对其筛选的依据也有所区别, 如

筛选耐受人胆汁酸盐和酸性环境的优良菌种以增强其进入人体胃肠道的有效性; 筛选具有良好抑菌效果的优良菌株以防止乳制品受大肠杆菌、芽孢杆菌、沙门氏菌、霉菌等的污染; 筛选一些功能性菌株, 如具有 ACE 阻碍活性和产  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)的优良益生菌等等。同时, 在发酵剂的后期制备过程中, 乳酸菌通常会面临低温处理的问题, 如冻干、深度冻藏、喷雾干燥等。目前, 冷冻干燥是否能保证活菌发酵剂存活率已引起越来越多科学家和乳品生产制造商的关心。因此, 筛选出抗冷冻性较强的菌株, 对乳酸菌抗冷冻机理进行研究, 并提出可行的抗冻菌株筛选方法以及合理的保护措施, 对乳制品工业的发展及发酵剂生产效益的提高具有深远意义。

## 1 机理

目前, 对于大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的冷冻刺激反应及其适应性已经有了较为深入的研究。然而对乳酸菌的研究却很少。乳酸菌在冷冻过程中, 其生理结构主要会产生以下变化: (1) 细胞膜流动性的下降; (2) 通过影响乳酸菌 DNA 和 RNA 二级结构的稳定性, 影响其转录和翻译的效率以及 DNA 的复制<sup>[1]</sup>。具体表现在以下几点。

### 1.1 脂肪酸的变化

冷刺激对细胞最重要的影响之一是使细胞膜固有的液态结晶性转变为凝胶态, 从而导致其流动性的下降。在冷冻过程中, 乳酸菌细胞膜上的脂肪酸成分会发生变化, 饱和脂肪酸含量下降, 而不饱和脂肪酸含量增加。由于不饱和脂肪酸磷脂的熔点较低, 可以降低固体转换为液体的温度, 从而增加冷冻过程中细胞膜的流动性。在该转变过程中, 一些脱氢酶类起着重要作用, 如大肠杆菌中  $\beta$ -酮酰基酰基载体蛋白合成酶可以将棕榈油酸转变为异油酸<sup>[1]</sup>。Béal 等研究表明, 不饱和脂肪酸(如 C20: 1)含量的增加, 使嗜热链球菌具有较好的抗冷冻性<sup>[2]</sup>。此外, 一些特异性脂肪酸的合成对于乳酸菌的抗冷冻特性也起着重要的作用。Murga 等对受到冷刺激后的嗜酸乳杆菌进行了研究, 发现 C18: 2 脂肪酸的含量明显增加<sup>[3]</sup>。植物乳杆菌在低温条件下, C18: 1 脂肪酸的含量同样有所增加<sup>[4]</sup>。另外, cycC19: 0 脂肪酸含量的增加有助于保加利亚乳杆菌<sup>[5]</sup>、嗜酸乳杆菌以及瑞士乳杆菌抗冷冻特性的提高<sup>[6]</sup>。因此, 通过测定脂

肪酸的含量及其组成成分, 可检测不同菌株的抗冷冻能力。

### 1.2 冷激蛋白(CSP)的合成

细菌在受到低温刺激时, 会发生冷激反应。此时会合成许多冷诱导蛋白(CIP), 其中最为重要的是冷激蛋白(Cold-shock proteins, CSPs), 分子量大约在 7 kD<sup>[7]</sup>。这类蛋白作为 RNA 陪伴分子<sup>[8]</sup>与 RNA 通过非特异性相结合。该蛋白可防止 mRNA 二级结构的形成, 对低温环境下的转录和翻译起着重要作用<sup>[9]</sup>。研究表明, 低温条件下 CspB 和 CspE 的增加可以提高乳酸乳球菌的存活率<sup>[10]</sup>, 而 CspP 的增多可以提高植物乳杆菌存活的能力<sup>[11]</sup>。由于 Csp 在冷适应过程中起着较重要的作用, 并且对于其他的 CIPs 有调节作用, 因此往往将其与其他 CIPs 相区分。

Csp 最早发现于大肠杆菌, 接着其同源染色体在 60 种革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、嗜温菌、嗜热菌等有所研究。Csp 在乳酸菌的各个种中也有所发现<sup>[12]</sup>, 并且乳酸菌不同种及其亚种以及不同菌株之间 *csp* 基因的数目不尽相同<sup>[13]</sup>。Bolotin 等对乳酸乳球菌乳酸亚种 IL1403 全基因组序列的完成显示其含有 2 个 *csp* 基因: *cspD* 和 *cspE*<sup>[14]</sup>。Wouters 等对乳酸乳球菌乳脂亚种 MG1363 的分子生物学及生化分析发现 MG1363 含有 2 对 *csp* 基因(*cspA-cspB* 和 *cspC-cspD*)以及 1 个单个基因 *cspE*, 并且发现一定量的 *cspC* 可以促进 *cspB*、*cspF* 和 *cspG* 基因的表达。MG1363 中的 7 个 *csp* 基因<sup>[10]</sup>与同种的 IL1403 的 2 个基因显然不同。同样, 植物乳杆菌 C3.8 含有 2 个 *csp* 基因(*cspL* 和 *cspP*)<sup>[15]</sup>, 而植物乳杆菌 NC8 除含有上述两个基因外, 还检测出 *cspC* 基因<sup>[16]</sup>。因此, 对特定菌株应进行特定冷诱导蛋白种类和特性的研究。

此外, 冷诱导蛋白的种类、数量及其诱导效率与菌株处理或存放的温度及时间也密切相关。嗜热链球菌置于 20°C 下 2 h 和 4 h 分别有 14 个和 18 个冷诱导蛋白, 而在 10°C 放置 4 h 只有 4 个冷诱导蛋白<sup>[17]</sup>。通过转录、核酸杂交技术和 2-DE 分析表明, MG1363 的 7 个 CSP 蛋白中至少有 5 个(CspA、CspB、CspC、CspD、CspE)可以被诱导, 且 10°C 时的诱导效率最高, 而 20°C 和 4°C 时最低<sup>[18]</sup>。30°C 时 CspE 是主要的 CSP, 在 10°C 时却非常少, 而 CspB、CspD

和 CspF 却可被大量诱导<sup>[19]</sup>。与乳酸乳球菌相似,植物乳杆菌、嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌都会有相对应的最适诱导温度。植物乳杆菌由 37°C 降温至 10°C,可以诱导 CspL 和 CspP 3-5 倍的增长<sup>[15]</sup>。到目前为止,保加利亚乳杆菌 ATCC11842 仅有 1 个 *csp* 基因(*cspA*)被鉴定出。Serror 等在保加利亚乳杆菌 42°C 生长时检测出 *cspA* 的转录,并发现 25°C 时其表达可达最大值<sup>[20]</sup>。低效率的 CSPs 诱导会阻滞乳酸菌的生长。因此,即使是同一菌株,其冷诱导蛋白的种类和活性也会随其存放温度而改变。在工业生产当中,测定最大 CSPs 诱导的最适温度对于优化应对措施是十分重要的。

### 1.3 核糖体的变化

细菌中核糖体对温度具有敏感性<sup>[21]</sup>,其状态会随着温度变化作出反应。随着温度的升高,翻译的速度将高于带有相应氨基酸的 tRNA (氨基酰 tRNA) 的提供速度,核糖体的酰胺基位点随之空缺。此外,核糖体在冷刺激之后翻译的效率将变低,相应酰胺基位点由于氨基酰 tRNA 浓度的增加受到阻碍,进而降低了(p)ppGpp 五磷酸鸟苷(鸟苷 5'-三磷酸-3'二磷酸)的浓度。温度的升高有助于(p)ppGpp 的集中,而温度的降低则会降低(p)ppGpp 的浓度。研究显示,人工诱导的高浓度(p)ppGpp 可以降低 CSP 的表达,而低浓度则增加这类冷应蛋白的表达<sup>[22]</sup>。因此,(p)ppGpp 直接影响机体对于冷刺激的反应。

### 1.4 核酸的变化

DNA 通常为负超螺旋,易受到温度的影响。它的延伸由 DNA 促旋酶和 DNA 拓扑异构酶 I 来调控。研究表明,枯草芽孢杆菌在受到冷刺激之后,负超螺旋迅速增加。DNA 超螺旋的调节对 DNA 相关功能具有重要作用,如复制、转录、重组等。一些与此相关的变化如碱基对数量的改变也是由于超螺旋密度的改变而引起的<sup>[23]</sup>。Mizushima 等将大肠杆菌培养于 6°C 低温水浴中,提取不同培养时间大肠杆菌的质粒 DNA,并用含磷酸氯喹的琼脂糖凝胶电泳进行分析。结果显示,经过低温处理的细胞中质粒 DNA 负超螺旋增加,但是 DNA 超螺旋反应是短暂的,60 min 内 DNA 高度超螺旋状态会恢复到初始状态<sup>[24]</sup>。

### 1.5 其他变化

Kandror 等研究发现海藻糖对细菌的冷适应有重要的作用。在 4°C 时,不能产海藻糖的大肠杆菌

变异菌株较正常菌株更容易死亡。将大肠杆菌的生长温度由 37°C 降至 16°C 时,大肠杆菌细胞中海藻糖的含量增加 8 倍。由此可见,细胞中海藻糖的产量对于冷刺激后细胞的保护作用十分重要<sup>[25]</sup>。

## 2 乳酸菌抗冷冻能力的分析

乳酸菌抗冷冻能力即乳酸菌细胞在冷冻或冷冻储藏于-20°C 之后恢复其酸化活力的能力。通过上述乳酸菌抗冷冻机理,对待选乳酸菌菌株的抗冷冻能力进行筛选,对于工业生产有着重要的意义。通常可以通过以下指标进行衡量。

### 2.1 脂肪酸含量的测定

乳酸菌细胞膜脂肪酸的含量可以通过气相色谱法进行快速测定<sup>[26]</sup>。Wang 等人对植物乳杆菌和酒明串珠菌进行了研究。他们提取菌体脂肪酸后并对其进行甲基化作用,而后利用气相色谱对处理后样品进行分析,并总结出酒明串珠菌中除主要成分 C16:0 外,还含有 C14:0 和 C18:0 等。而植物乳杆菌中细胞膜脂肪酸的主要成分为 C18:1 $\omega$ -7。此外,Wang 等对经过冷冻的嗜酸乳杆菌 RD758 的细胞膜脂肪酸进行了气相色谱分析,共得到 13 个脂肪酸,并且发现 15°C 冷冻 8 h 对不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比例以及 *cycC19:0* 相对百分比影响最大<sup>[27]</sup>。Béal 等对嗜热链球菌 CFS2 细胞膜脂肪酸组成进行了气相色谱分析,显示其共由 9 种脂肪酸组成,包含 C16:0、C18:0、C20:1 等<sup>[2]</sup>。

### 2.2 冷应蛋白及其调控基因的测定

将乳酸菌接种于培养基中,培养至一定菌数后,降至某特定温度培养 4 h 后,离心并用 PBS 清洗菌体,加溶菌酶重悬,用超声波破壁后离心收集上清液进行 SDS-PAGE 电泳。通过电泳图分析蛋白质的分子量,可以初步判定 7 kD 左右的条带为冷应蛋白。设计引物对 Csp 控制基因进行扩增,分析电泳条带,与目的基因片段长度进行比较、测序,推导其氨基酸序列,并分析其与标准菌中 Csp 序列的相似性。Wouters 等对嗜热链球菌 CNRZ302 的 Csp 调控基因进行了研究,发现其 *csp* 序列与嗜热链球菌 ST1-1 的同源性达到 95%,氨基酸序列分析显示 CNRZ302 与 ST1-1 的 CspA 十分相似<sup>[17]</sup>。

### 2.3 乳酸脱氢酶的测定

乳酸脱氢酶(LDH)是存在于细胞浆内参与糖酵解最后一步即催化丙酮酸和乳酸相互转化的一种催

化酶。当细胞受损时, LDH 会由细胞流出到培养液。因此在乳酸菌冷冻后测定培养基中的 LDH 的漏出即可知道乳酸菌细胞冷冻后的受损情况, 进而反映出其抗冷冻能力。

乳酸脱氢酶的测定可以采用比色法<sup>[28]</sup>。乳酸与氧化型辅酶 I (NAD) 在 LDH 催化作用下生成丙酮酸与还原型辅酶 I (NADH), 丙酮酸再与 2,4-二硝基苯肼反应生成 2,4-二硝基苯腙, 后者在碱性溶液中呈棕红色, 可通过比色法测定丙酮酸含量并计算出 LDH 的活力。

## 2.4 酸化活力的测定

酸化活力即乳酸菌发酵牛乳产酸的能力。乳酸菌悬液酸化活力的测定可以采用 pH 计。将脱脂乳粉复水, 并将待测菌株接种于特定温度, 设定平行, 对每个样品菌悬液的 pH 进行连续检测, 直至 pH 为 5.5 时停止, 记录时间。所需时间越长, 则表示其酸化活力越弱。检测冷冻前后及不同冷冻储藏时间下的酸化活力, 通过冷冻后及冷冻前的差值对比即可看出不同乳酸菌的抗冷冻能力。

## 3 乳酸菌冻干保护措施的研究

### 3.1 冻干保护剂

乳酸菌在冻干前加入适当的保护性物质, 可以提高细胞存活率, 并且可以改善乳酸菌的稳定性。根据冻干保护剂的渗透性可将其分为 3 类: 第 1 类是既能透过细胞膜又能透过细胞壁的保护剂, 如甘油和二甲基亚砷; 第 2 类是只能透过细胞壁而不能透过细胞膜的保护剂, 如单糖、二糖、氨基酸和一些低分子量的聚合物如聚乙二醇 1000 等; 第 3 类是不能穿透细胞膜的保护剂, 如一些大分子量的聚合物、多糖类、聚乙二醇 6000 等<sup>[29]</sup>。

国内外很多学者对冻干保护剂进行了研究, 其中甘油和二甲基亚砷的研究揭开了现代冻干保护剂研究的序幕。Smittle 等研究表明, 吐温 80 对乳酸菌的冷冻起着保护作用。将保加利亚乳杆菌分别培养于 MRS 培养基和不含吐温 80 的 MRS 培养基中, 液氮冷冻后细胞死亡率分别为 5% 和 100%; 当培养于 TYLCS 培养基时, 死亡率为 68%, 加入吐温 80 后死亡率降至 5%<sup>[30]</sup>。此外, de Valdéz 研究表明戊五醇较甘油, 甘露醇和山梨醇对菌体冷冻有更好的保护作用<sup>[31]</sup>。因此, 对不同菌株, 筛选出其最优的保护剂

对工业化生产有着深远的意义。

2008 年, 我实验室对瑞士乳杆菌 ND-01 的冻干保护剂进行筛选, 以脱脂乳加 L-谷氨酸钠作为基础保护剂, 添加不同种类保护剂进行复配, 并以菌体存活率为评价指标, 最终得出适合该菌株的保护剂配方为: 10% 脱脂乳, 8% 乳糖, 1% L-谷氨酸钠, 1% 维生素 C, 1% 甘油。菌体与保护剂比例为 1: 10, -40°C 预冻 3 h, 真空冻干, 冻干菌粉的活菌数可达  $(2.5 \pm 0.46) \times 10^{10}$  CFU/g, 存活率可达  $52.08 \pm 3.12\%$ <sup>[32]</sup>。

### 3.2 冻干前的预处理

细胞膜脂肪酸的变化以及 CSP 的合成均发生在冷刺激之后, 以调节自身的抗冷冻能力。因此将细菌在较低的温度下预冷处理可以提高其对于冷冻和低温保藏的耐受能力。一些研究表明较低的 pH 预处理对乳酸菌的抗冷冻性也起着积极的作用。

**3.2.1 预冷处理:** Murga 等将嗜酸乳杆菌 CRL640 分别培养在 25°C、30°C、37°C 和 40°C。25°C 时, 十六酸以及十八碳二烯酸的数量是 37°C 培养时的 3-5 倍, 显示出较高的抗冷冻能力<sup>[33]</sup>。Wang 等通过分析脂肪酸的组成及含量发现, 嗜酸乳杆菌 RD758 在发酵温度为 30°C 时较 42°C 生长表现出较强的抗冷冻性<sup>[34]</sup>。嗜热链球菌 CNRZ302 在 20°C 分别预冷处理 2 h 和 4 h 后, 抗冷冻能力分别是最适生长温度 42°C 下的 100 和 1000 倍<sup>[17]</sup>。乳酸乳球菌乳脂亚种 MG1363 在预冷处理后也表现出较高的抗冷冻性<sup>[18]</sup>。生产干酪的商业发酵剂乳脂乳球菌和乳酸乳球菌在 10°C 预冷 2 h 可以明显增加其存活率<sup>[35]</sup>。由上述机理可知, 经过预冷处理的乳酸菌, 在较低的温度下可以产生冷应激蛋白, 饱和脂肪酸可转变为不饱和脂肪酸, 这些均对乳酸菌后期的冷冻干燥及深度冻藏起着重要的保护作用, 从而增加其抗冷冻能力。

**3.2.2 pH 的调节:** Wang 等对嗜酸乳杆菌 RD758 的发酵酸度及其抗冷冻能力的研究表明, pH 为 5 时, RD758 具有较好的抗冷冻性。对其酸化活力的分析显示, pH 为 5 时, 其酸化活力在冷冻前后的损失最少<sup>[27]</sup>。同样, Palmfeldt 和 Hahn-Hägerdal 研究表明培养基 pH 为 5 时, 罗伊式乳杆菌有较强的抗冷冻性, 而在 pH 为 6 时抗冷冻性较差<sup>[36]</sup>。发酵 pH 为 5.5 时, 嗜热链球菌有较好的抗冷冻性, 对不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比例分析发现, 较低的 pH 可以引起

细胞内不饱和脂肪酸的积累。然而,在添加油酸之后, pH 的影响将会失去<sup>[2]</sup>。

低 pH 与其他物质的协同作用也会对乳酸菌的抗冷冻性产生影响。在嗜酸乳杆菌的培养过程中,添加一些无机盐如钙盐和锰盐, pH 控制为 4.4–4.6 时可以明显提高其冻干后的存活率。通过添加钙盐和锰盐,乳酸菌的细胞壁可以在这个 pH 范围内变得更加坚固,进而抑制乳酸菌在生长过程中由短杆菌变为长杆菌。由于长杆菌在冷冻过程中极易受到损伤,因此低 pH 值与盐离子协同作用对于嗜酸乳杆菌可以起到一定的保护作用。但是,如果低于该 pH 值,嗜酸乳杆菌的生长将由于过高酸度受到抑制,而高于该 pH 值,盐离子将失去其抑制作用。对一些非嗜酸的乳酸菌则需控制 pH 在 5.1–5.2 之间。因此,在乳酸菌培养过程中,控制其无机盐的添加量和培养基的酸度,对于菌体的生长和保护具有重要作用。

#### 4 结论

乳酸菌对冷刺激会产生不同程度的反应,例如细胞膜的变化,由 DNA 的变化引起其对转录、翻译的影响以及对新陈代谢的影响等。全面了解乳酸菌抗冷冻机理,对解决乳酸菌产品工业生产中的难题,提高生产效益至关重要。然而,乳酸菌菌株应对冷刺激的反应过程是一个十分复杂的反应体系,各影响因素之间也有着复杂的相互联系。尽管近些年有很多相关研究,但是仍然有很多问题尚未解决,如为什么细菌有多样的 CspA 的类似物,热刺激对乳酸菌抗冷冻的保护作用机理和一些保护剂的作用机理等等。因此,对乳酸菌的抗冷冻性机理进行更系统深入研究,对相关的工业化生产有深远的指导意义。

#### 参考文献

- [1] Storz G, Hengge-Aronis R. Bacterial Stress Responses. Washington: ASM Press, 2000: 33–45.
- [2] Béal C, Fonseca F, Corrieu G. Resistance to freezing and frozen storage of *Streptococcus thermophilus* is related to membrane fatty acid composition. *Journal of Dairy Science*, 2001, **84**(11): 2347–2356.
- [3] Murga MLF, Cabrera GM, de Valdez GF, et al. Influence of growth temperature on cryotolerance and lipid compo-

sition of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, **88**(2): 342–348.

- [4] Russell NJ, Evans RI, ter Steeg PF, et al. Membranes as a target for stress adaptation. *International Journal of Food Microbiology*, 1995, **28**(2): 255–261.
- [5] Smittle RB, Gilliland SE, Speck ML, et al. Relationship of cellular fatty acid composition to survival of *Lactobacillus bulgaricus* in liquid nitrogen. *Applied Microbiology*, 1974, **27**(4): 738–743.
- [6] Zavaglia AG, Disalvo AE, de Antoni LG. Fatty acid composition and freeze–thaw resistance in *Lactobacilli*. *Journal of Dairy Research*, 2000, **67**(2): 241–247.
- [7] Wouters JA, Frenkiel H, de VOS Willem M, et al. Cold shock proteins of *Lactococcus lactis* MG1363 are involved in cryoprotection and in the production of cold-induced proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**(11): 5171–5178.
- [8] Graumann PL, Marahiel MA. A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. *Trends in Biochemical Sciences*, 1998, **23**(8): 286–290.
- [9] Jiang W, Hou Y, Inouye M. CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, **272**(1): 196–202.
- [10] Wouters JA, Mailhes M, Rombouts FM, et al. Physiological and regulatory effects of controlled overproduction of five cold shock proteins of *Lactococcus lactis* MG1363. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**(9): 3756–3763.
- [11] Derzelle S, Hallet B, Ferain T, et al. Improved adaptation to cold-shock, stationary-phase, and freezing stresses in *Lactobacillus plantarum* overproducing cold-shock proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(7): 4285–4290.
- [12] Kim WS, Khunajakr N, Ren J, et al. Conservation of the major cold shock protein in lactic acid bacteria. *Current Microbiology*, 1998, **37**(5): 333–336.
- [13] Champomier-Vergès MC, Maguin E, Mistou M, et al. Lactic acid bacteria and proteomics: current knowledge and perspectives. *Journal of Chromatography B*, 2002, **771**(1/2): 329–342.
- [14] Bolotin A, Wincker P, Mauer S, et al. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* IL1403. *Genome Research*, 2001, **11**(5): 731–753.
- [15] Mayo B, Derzelle S, Fernández M, et al. Cloning and characterization of csp L and csp P, two cold-inducible genes from *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology*, 1997, **179**(9): 3039–3042.
- [16] Derzelle S, Hallet B, Francis KP, et al. Changes in cspL, cspP, and cspC mRNA abundance as a function of cold shock and growth phase in *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology*, 2000, **182**(18): 5105–5113.
- [17] Wouters JA, Rombouts FM, de VOS WM, et al. Cold

- shock proteins and low-temperature response of *Streptococcus thermophilus* CNRZ302. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**(10): 4436–4442.
- [18] Wouters JA, Jeynov B, Rombouts FM, *et al.* Analysis of the role of 7 kD cold-shock proteins of *Lactococcus lactis* MG1363 in cryoprotection. *Microbiology*, 1999, **145**(11): 3185–3194.
- [19] van de Guchte M, Serror P, Chervaux C. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2002, **82**(1/4): 187–216.
- [20] Serror P, Dervyn R, Ehrlich SD, *et al.* Csp-like genes of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and their response to cold shock. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, **226**(2): 323–330.
- [21] VanBogelen RA, Neidhardt FC. Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990, **87**(15): 5589–5593.
- [22] Jones PG, Cashel M, Glaser G, *et al.* Function of a relaxed-like state following temperature downshifts in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1992, **174**(12): 3903–3914.
- [23] Krispin O, Allmansberger R. Changes in DNA supertwist as a response of *Bacillus subtilis* towards different kinds of stress. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, **134**(2/3): 129–135.
- [24] Mizushima T, Kataoka K, Ogata Y, *et al.* Increase in negative supercoiling of plasmid DNA in *Escherichia coli* exposed to cold shock. *Molecular Microbiology*, 1997, **23**(2): 381–386.
- [25] Kandror O, Deleon A, Goldberg AL. Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, **99**(15): 9727–9732.
- [26] Rozès N, Gatbay S, Denayrolles M, *et al.* A rapid method for the determination of bacterial fatty acid composition. *Applied Microbiology*, 1993, **17**(3): 126–131.
- [27] Wang Y, Delettre J, Guillot A, *et al.* Influence of cooling temperature and duration on cold adaptation of *Lactobacillus acidophilus* RD758. *Cryobiology*, 2005, **50**(3): 294–307.
- [28] 洪庆涛, 宋岳涛, 唐一鹏, 等. 细胞培养液乳酸脱氢酶漏出率的比色测定及其应用. *细胞生物学杂志*, 2004, **26**(1): 89–92.
- [29] Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 2003, **46**(3): 205–229.
- [30] Smittle RB, Gilliland SE, Speck ML. Death of *Lactobacillus bulgaricus* resulting from liquid nitrogen freezing. *Applied Microbiology*, 1972, **24**(4): 551–554.
- [31] de Valdéz GF, de Giori GS, de Ruiz HAAP, *et al.* Protective effect of adonitol on lactic acid bacteria subjected to freeze-drying. *Applied and Environmental Microbiology*, 1983, **45**(1): 302–304.
- [32] 崔利敏, 周琦, 艾日登才次克, 等. *Lactobacillus helveticus* ND-01 培养条件的优化及冻干发酵剂的制备. *中国农业科技导报*, 2008, **10**(6): 74–82.
- [33] Murga MLF, Cabrera GM, de Valdez GF, *et al.* Influence of growth temperature on cryotolerance and lipid composition of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, **88**(2): 342–348.
- [34] Wang Y, Corrieu G, Béal C. Fermentation pH and temperature influence the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758. *Journal of Dairy Science*, 2005, **88**(1): 21–29.
- [35] Broadbent JR, Lin C. Effect of heat shock or cold shock treatment on the resistance of *Lactococcus lactis* to freezing and lyophilization. *Cryobiology*, 1999, **39**(1): 88–102.
- [36] Palmfeldt J, Hahn-Hägerdal B. Influence of culture pH on survival of *Lactobacillus reuteri* subjected to freeze-drying. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, **55**(1/3): 235–238.

编辑部公告

## 《微生物学通报》英文刊名变更通知

《微生物学通报》目前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名,造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱,这大大影响了本刊在国际上的传播,也不利于对我刊引用数据的统计。经本届编委会讨论,以及主办单位批准,本刊英文刊名自2010年起变更为“Microbiology China”,请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。

《微生物学通报》编辑部

2009-12-25