

乳酸菌细胞膜的冻干损伤

朱琳, 刘宁*, 张英华, 霍贵成

(东北农业大学 乳品科学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 冷冻干燥会造成乳酸菌细胞膜的损伤, 主要有机械损伤、溶质损伤、细胞膜渗透性损伤、DNA 损伤; 导致蛋白质变性失活、pH 的动态平衡被破坏; 以及细胞膜脂肪酸组成的变化。这些不同形式的损伤会使乳酸菌在生产过程中的存活率降低。因此, 应该依据这些损伤机理提出一些相应的降低冻干损伤的保护措施。这些措施包括: 选择将损伤降到最低的最佳冷冻速率; 添加适宜的保护剂; 改变乳酸菌的遗传性状使它们具有较强的冻干抵抗力; 采用自然选择的方法筛选出适应冻干条件的优良菌株。

关键词: 冻干; 乳酸菌; 细胞膜; 损伤

Study on Freeze-drying Damage of Lactic Acid Bacteria Membrane

ZHU Lin, LIU Ning*, ZHANG Ying-hua, HUO Gui-cheng

(Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education of China,
Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Freeze-drying can damage the cell membrane of lactic acid bacteria. These damages will include mechanical damage, solution effect damage, change in membrane permeability, DNA damage, proteins denaturation, damage in dynamic balance, and change in lipids of cell membrane. These different damages decrease will the survivability. To raise relevant methods to decrease freeze-drying damages will depend on the understanding damage mechanism. For example, finding optimal freeze velocity, using some cryoprotectants, changing genetic properties, and choosing excellent strains by natural selection will help lactic acid bacteria resist freeze-drying.

Key words freeze-drying lactic acid bacteria; cell membrane damage

中图分类号: Q939.117

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)02-0266-04

乳酸菌自古以来就被人类作为食品微生物利用, 广泛应用于发酵乳制品、豆制品、肉制品中。它的主要功能是产生乳酸, 同时也会产生一些与风味和质地有关的物质, 它的益生作用也越来越受到人们的关注。乳酸菌对营养条件要求高, 对外界的抵抗力差, 难以制备和长期保存。目前国际上常用冷冻干燥技术制备乳酸菌的冻干菌粉, 对它进行保存, 并可将其直接投入生产。然而, 冷冻干燥过程不可避免会造成部分乳酸菌细胞的损伤甚至死亡, 对生产十分不利。为了减小冻干对乳酸菌造成的损伤, 提高乳酸菌在生产中的活力, 人们进行了一系列的研究阐明冻干对乳酸菌造成损伤的机理, 从而能够根据损伤机理提出相应的保护措施以减轻细胞损伤, 为冻干型乳酸菌发酵剂的制备提供必不可

少的理论基础, 使它得到更广泛的应用^[1]。

1 机械损伤

在微生物冷冻干燥期间细胞内外的水分冻结成冰, 冰晶生长产生的机械力量会引起细胞损伤, 这种损伤叫做“机械损伤”。一般冰晶越大, 细胞膜越易破裂, 造成细胞死亡; 冰晶小, 对细胞膜的机械损伤也较小。不利冰晶的大量形成, 对细胞膜系统造成的机械损伤是直接损伤膜结构, 从而影响细胞的生理、代谢功能的正常发挥。

除此之外, 复水时胞内冰晶会发生重结晶, 有足够的力量破坏细胞质膜或膜的细胞器官, 例如线粒体; 同时也会破坏蛋白质胶体。

收稿日期: 2005-03-02

*通讯作者

基金项目: “十五”奶业重大科技专项课题(2002BA518A-05)

作者简介: 朱琳(1980-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品科学。

2 溶质损伤

由于细胞膜能防止胞外冰蔓延到胞内, 所以虽然细胞质的冷冻点通常在 -1°C 以上, 但细胞在此温度下仍不冻结, 只有在 -10°C 或 -15°C 的过冷状态下才能冻结, 导致胞内的过冷水具有较高的蒸汽压, 细胞只有通过失去部分水分才能重新达到平衡。失水的方式分为, 胞内水分溢出和胞内水分冻结两种。无论是通过那种方式达到平衡, 都要经历下述物理化学过程, 即: 温度降低时细胞内水分的含量下降, 胞外和胞内的电解质就会浓缩, 这些现象叫做“溶质效应”。溶质效应造成细胞损伤有两种状况: (1)当胞内的水分溢出, 即细胞缩水达到临界最小体积时, 会使细胞膜的渗透率产生不可逆的致命增加, 原先不能透过膜的溶液也变成可渗透的, 造成细胞死亡。(2)细胞内的蛋白质^[1]对电解质极为敏感, 尤其是在高浓度的电解质存在时, 会引起蛋白质变性, 丧失其功能, 增加了细胞死亡的可能性。除此之外, 溶质的浓度增加, 细胞内 pH 值和离子含量就会改变, 同时有害化学反应的发生率也会上升。间隙液体的浓度越高, 引起的细胞破坏就越厉害。

3 细胞膜透性变化

冻干会造成细胞膜脂类物理状态^[2]的变化。细胞膜中的磷脂的极性端在一定程度上以水合形式存在, 而且每个磷脂的极性端与其它磷脂分子的极性端被水分子隔开, 当磷脂干燥脱水时, 与氢键相连的水从磷脂双分子层的头部基团移走, 头部位置出现空位, 酰基会强加到头部空位上, 链间范德华力增强, 结果脂膜会由液晶相向凝胶相转变。而在随后的复水过程^[1~3]中, 处于凝胶相的细胞膜又会向液晶相转变, 膜经过转变有些区域会出现空位, 造成细胞膜的泄漏。细胞膜发生的这些相变会造成膜透性增加, 使胞内的物质与胞外水溶性物质无控制地进行双向交换, 从而造成细胞的代谢损伤。

β -半乳糖苷酶^[4]是乳酸菌发挥其益生菌功能的重要酶类, 它能消化乳糖, 使患有乳糖不耐症的人群能够充分吸收它。刘振民^[5]研究乳酸菌的冷冻损伤发现: 正常菌体上清液、菌体悬浮液中相对 β -半乳糖苷酶活力分别为 0、32.9%; 冻藏菌体为 0.28%、48.9%, 而冻干菌体则为 0.95%、60.8%, 这表明细胞膜的通透性增加, 使 β -半乳糖苷酶从细胞内泄漏出来。对蛋白质和核酸测定发现冷冻后核酸、蛋白质等可溶物增多, 同样表明细胞膜的透性出现损伤。

Castro、Teixeira 和 Kirby 的研究^[6]发现: 冻干后保加利亚乳杆菌(*Lact. bulgaricus*)细胞内钾离子与钠离子的比例发生变化, 也说明细胞膜的透性出现损伤, 使

细胞内外离子发生转移, 细胞内部的离子环境发生改变。

4 蛋白质变性失活

溶质效应会使细胞内某些重要蛋白质变性失活, 尤其是具有生物活性的酶蛋白或抑制因子, 酶和抑制因子的失活, 使微生物细胞正常生理代谢调控失灵, 出现不利物质大量积累, 对细胞造成毒害作用。酶的活性决定了细菌的代谢产物和生长速度, 如果受到影响必然对微生物的生存不利。目前尚无敏感的方法直接证明冻干对微生物细胞内酶活性的影响, 但许多报道证明, 微生物细胞内许多重要的酶类对冻干很敏感, 如过氧化氢酶、乳酸脱氢酶、磷酸甘油脱氢酶、ATP 酶、脂酶等。抑制因子能抑制有害酶的活动, 使机能异常细胞水解酶活力升高, 出现代谢作用损伤。

5 pH 的动态平衡被破坏

在冻干前, 乳酸菌的外部 pH(pH_{out})和内部 pH(pH_{in})都会降低, 但 pH_{in} 总是高于 pH_{out} , 也就是产生了 pH 值梯度(ΔpH)。 ΔpH 是质子移动的动力(pmf), 可以作为横跨膜运输过程的能量来源。由于这种动力, 外部产生的酸会通过细胞膜, 进入细胞质, 在细胞内它转变成质子和带电的衍生物, 使细胞膜变得不可渗透。而冻干后, pH 值梯度(ΔpH)被破坏, 造成乳酸菌细胞的功能性损伤。

除此之外, 冻干也会使一些维持 ΔpH 的酶类失活。例如, K^+ -ATPase^[7]。 K^+ -ATPase 使横跨膜产生电势, K^+ 与 H^+ 互换, 起到维持 pH 梯度(ΔpH)的作用; 而冻干后它失去了这种作用, 从而破坏了 pH 的动态平衡。pH 梯度的破坏也会影响一些酶的活性。又如, ATP 合成酶^[6]要通过质子梯度为 ATP 的合成提供能量; 而冻干后质子梯度被破坏, ATP 合成酶的活性降低, 从而影响了细胞的生理功能。

6 DNA 损伤

细菌细胞在冻干过程中, DNA^[7]的糖基键的破裂使碱基发生质子化作用, DNA 发生了脱嘌呤和脱嘧啶反应。那么 DNA 的修复就会发生错误, 有可能导致生物突变体的产生。DNA 损伤即使不是主要的, 也是细胞生命力丧失的重要因素。

7 膜脂肪酸组成的变化

细胞膜脂肪酸的成分起到维持细胞膜完整性的作用。当微生物处于不利的环境条件下(如冻干)时环丙烷脂肪酸(Cyclopropane $\Delta\text{C}_{19:0}$ acid)能防止脂肪酸过紧的结合到细胞膜上, 使这些脂肪酸更加灵活和富有流动

性,从而起到维持细胞膜的流动性的功能,阻止了细胞的死亡。不饱和脂肪酸和环丙烷脂肪酸能增强膜的抵抗力和通透性,促进细胞内和细胞外介质的交换。Dihydrosterculic acid ($\Delta C_{19:0-9}$)决定膜的弹性和伸缩性。乳杆菌(Lactobacillic acid $\Delta C_{19:0-11}$)决定膜侧面流动性。此外,脂肪酸在调节膜蛋白活性方面也起着重要作用。细胞膜上脂肪酸能够与蛋白质接触面相互作用,维持了蛋白质的结构和活性,抑制或刺激蛋白质的功能。例如,它们携带蛋白质促进溶质间的转移,调节膜上结合酶Na-K-ATPase的活性。

冻干会使细胞膜上的脂肪酸发生变化,那么细胞膜的完整性就会受到破坏,微生物细胞因此出现损伤。冻干造成细胞膜在脂肪酸组成上的变化,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;同时,冻干时脂肪酸的生物合成也会改变,不同种类的细菌有不同的变化方式。细胞膜脂肪酸组成比例会影响微生物对冻干的抵抗力,以及随后储存期间的稳定性。Beal、Goldberg^[8]和Eschar^[9]、Smittle和Gilliland^[10]对不同种类的乳酸菌进行研究发现:饱和脂肪酸如, $C_{14:0}$ 、 $C_{16:0}$ 、 $C_{18:0}$ 含量少;而不饱和脂肪酸如 $C_{20:1}$ 、十八烷酸($C_{18:1-11}$ 、 $C_{18:1-9}$)和环丙烷脂肪酸、Acidooctadecenoic acid含量高;即U/S比例相对较高,那么菌种对冻干的抵抗力随之增强,它们在冻干后的存活率、稳定性也相对理想。确切机理并不清楚,可能是脂肪酸的不饱和指数决定了细胞膜的粘度和厚度,因此提高了细胞膜对冻干的抵抗力。

8 降低冷冻干燥对乳酸菌细胞损伤的方法

8.1 控制冷冻速率

慢速冷却是质量迁移起主要作用的过程。在慢速冷却^{[1][11]}过程中,外部冰形成,胞外液相溶液的浓度升高,高于胞内溶液的浓度,此时内外等渗的平衡条件被破坏,胞内水分就向胞外渗透以达到新的平衡,即通过脱水达到平衡,就会出现溶质损伤。虽然冷却速率不会影响溶质浓缩的平衡或水分的冻结,但显然它会影响细胞处于溶质效应中的时间长短,冷却越慢则处于溶质效应中的时间越长,受到的损伤就越大。

快速冷却^{[1][12]}是传热起主要作用的过程。首先,冷却速率过快,水分来不及渗出胞外,细胞不会通过脱水达到平衡,胞内冰晶开始形成以使细胞达到平衡。胞内冰晶不仅产生机械力量直接损伤细胞膜,而且也会使胞内溶质浓度增加产生溶质效应损伤细胞。其次,细胞内水以比细胞膜渗透速率快的速度从膜内渗透出去,导致细胞膜上形成小空隙,细胞的成分就由此泄漏出去,导致整个细胞都会招到破坏。此外,如果在快速冷却时有足够的细胞水分被保留下来,那么在储存期间和复水

时,胞内的小冰晶就会变得不稳定,这是由于小冰晶比大冰晶拥有更高的表面能,所以在储存期间和复水时,小冰晶会通过重结晶而变大,从而损伤细胞膜。

既然过快冷却和过慢冷却都会对细胞膜造成不同形式的损伤,所以应当选择一个最佳冷却速率既能足够慢从而阻止胞内冰晶的形成,又能足够快足以减小细胞膜的渗透性损伤并且使细胞处于溶质效应下的时间降到最低。

8.2 使用保护剂

到目前为止,人们发现的乳酸菌的冻干保护剂有数十种。根据它们是否能渗透到细胞内,可分为渗透型和非渗透型两种。(1)渗透型保护剂有甘油、二甲亚砜(Dimethyl sulfoxide)、乙二醇等。这类保护剂多属于小分子物质,在溶液中易结合水分子,发生水合作用,使溶液粘性增加,弱化了水的结晶过程,达到保护目的。冷却时它们会发生如下变化:冲淡溶液中溶质浓度,细胞摄入盐量减少,由保护剂替代;保护剂进入细胞,改变了胞内过冷的状态,使胞内压接近胞外压,降低了细胞脱水收缩程度和速度;保护剂进出细胞容易,缓解了复温时渗透性引起的损伤。(2)非渗透性保护剂有:聚乙烯吡咯烷酮(Polyvinylpyrrolidone)、聚乙二醇(Polyethylene glycol)、羟乙基淀粉(Hydroxyethyl starch),以及一些二糖,如蔗糖、乳糖、葡聚糖、海藻糖。这类保护剂能溶于水,但不能进入细胞内,它们可在特定的温度下降低溶质浓度,起到保护作用。例如蔗糖在慢速冷却时可以降低胞外溶液的浓度,减少了阳离子进入细胞的数量;快速冷却时由于胞外溶液中已有蔗糖,胞内水分部分渗出,缓解了胞内结晶情况。又如高分子的聚乙烯吡咯烷酮,在慢速冷却时它能降低溶液中低分子溶质的浓度,减轻盐害。山梨糖与细胞膜相互作用,稳定了蛋白质的功能和结构。

α , α -海藻糖(α , α -trehalose)^[13]是由葡萄糖组成的天然二糖,它作为冻干保护剂的效果非常显著,是近来研究的热点。从动力学角度看,海藻糖非常有效地促进非晶形或玻璃状固体(Glassy solids)形成,从而减少了冰晶的形成,起到防止细胞损伤的作用。海藻糖通过氢键与脂质双分子层的脂类或蛋白质表面的水分子相连,降低了脂类由液晶相向凝胶相转移的温度,从而起到保护作用。有研究人员发现将海藻糖与硼酸盐离子结合,它的保护效果会更显著。硼酸盐离子与海藻糖分子形成可逆交联的网状结构,这种结构非常像高分子聚合物,很容易促进玻璃状固体形成。因此,硼酸盐与海藻糖的混合物可以作为保护剂,能结合胞内小分子使它们不会从胞内渗透出去,同时对酶也起到一定的保护作用。

细胞膜上U/S^[8~10]比例并不是不能改变的,可以通过在菌种的培养介质和环境中添加保护剂,改变U/S比

例而得到改善,例如在培养介质中添加油酸、油酸钠和吐温80。它们的保护原理可能是:这些物质成为细胞内的介质,使细胞膜上饱和脂肪酸向不饱和脂肪酸转变,打破了细胞膜上脂肪酸的平衡;同时它们也会增加细胞膜对水的通透性,因此有利于细胞内外物质的转移,结果低温脱水收缩(Cryo-syneresis)增强,导致细胞体积的变小,细胞内游离水从细胞内转移出去,因而在冷冻过程中游离水在细胞内形成冰晶的几率减少,在冻干后的储存过程中水的流动性也有所降低。此外,酸丙酯(PG)^[14]是一种抗氧化剂,它可以抑制细胞膜脂类的氧化损伤,改善干燥细胞的存活率。

此外,作为乳酸菌保护剂悬浮介质的脱脂乳本身也能起到冻干保护剂的作用。这是由于脱脂乳^[7]在干燥时,作为凝胶体的乳中蛋白质在菌体外形成蛋白衣,起到保护乳酸菌的作用;同时它还可以固定冻干的酶类,防止由于细胞膜的损伤而导致胞内物质泄漏。

8.3 改变遗传性状

细胞在冷冻过程中会经历一些重要的生理变化,例如膜流动性的降低, RNA 和 DNA 二级结构稳定性的下降,这些变化都会导致翻译、转录和 DNA 复制效率的下降。为了克服这些作用,微生物会出现短暂的适应反映,叫做冷休克反映,在此过程中会产生冷冻诱导蛋白质(CIPs)。CIPs^[15]对冷冻具有抵抗力,首先,它增加了短链脂肪酸或不饱和脂肪酸在细胞膜脂类中的比例,维持膜的流动性;其次,它能维持DNA超螺旋结构,并且使细胞能更适应低温下的转录和翻译。此外,CIPs会参与细胞的生理活动,例如糖代谢(Hpr, CcpA, β -phosphoglucosyltransferase),染色体构成(HU-like protein HslA),信号转换(LlrC)。

诱导蛋白中低分子量(~7.5kDa)的蛋白质叫做冷休克蛋白(Csp)^{[7][14~16]}。冷休克蛋白(Csp)对mRNA稳定性和翻译效率起一定作用。冷休克蛋白(Csp)是 β -折叠桶蛋白质带有两个RNA-结合基元能连到单链DNA和RNA上,它没有特异性也不会破坏RNA的二级结构。因此,在冻干过程中,冷休克蛋白可以作为RNA伴侣蛋白(RNA chaperones),通过保护mRNA二级结构使低温下发生的转录和翻译不被破坏。

根据上述的原理,研究人员发现对乳酸菌施加适当的冷冻压力,使其遗传性状发生改变,产生冷休克蛋白(Csp)和其他的CIPs,可以改善乳酸菌对冷冻抵抗力,减小冻干对它的损伤。

8.4 自然选择的方法

除了上述方法外,还可以通过自然选择的方法选择出更加适应冻干的遗传变异体。要达到这个目的要对乳酸菌进行一系列连续的冷冻-复温培养过程。理论上,所需的抵抗冻干的遗传性状会通过自发的基因突变而产生。Monnet和Corrieu^[16]将自然选择法加以实施,结果发现经过这种方法选择出的乳酸菌的酸化活性和对冻干的抵抗力都较原菌株有所改善,说明这种方法切实可行。

参考文献:

- [1] Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems[J]. Cryobiology, 1970.
- [2] Samuel B, Eitan Israeli, et al. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61: 3592-3597.
- [3] Bray, J Jezeski, F busta. Repair of injury in freeze-dried salmonella anatum[J]. Applied Microbiology, 1971, 22: 401-407.
- [4] Lorrene, Howard, Dennis. A comparison of beta-galactosidase specific activities in strains of Streptococcus thermophilus[J]. Journal of Dairy Science, 1986, 69: 2583-2588.
- [5] 刘振民, 骆承庠. 乳酸菌冷冻损伤研究[J]. 食品发酵工业, 2002, 28: 18-21.
- [6] Castro, Teixeira, Kirby. Evidence of membrane damage in *Lactobacillus bulgaricus* following freeze drying[J]. Journal of Applied microbiology, 1997, 82: 87-94.
- [7] Serror, Chervaux, Smokvina, et al. Stress responses in lactic acid bacteria[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2002, 82: 187-216.
- [8] C Beal, F Fonseca, G Corrieu. Resistance to freezing and frozen storage of *Streptococcus thermophilus* is related to membrane fatty acid composition[J]. J Dairy Science Association, 2001, 84: 2347-2356.
- [9] I Goldberg, L Eschar. Stability of Lactic acid bacteria to freezing as related to their fatty acid composition[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1977, 33: 489-496.
- [10] RB Smittle, SE Gillil, ML Speck, et al. Relationship of cellular fatty acid composition to survival of *Lactobacillus bulgaricus* in liquid nitrogen[J]. Applied Microbiology, 1974, 27: 738-743.
- [11] Jason P, Locksley E. Protective effect of intracellular ice during freezing[J]. Cryobiology, 2003, 46: 197-202.
- [12] Thunell, Sandine. Frozen starters from internal-pH-control-growth cultures[J]. Journal of Dairy Science, 1984, 67: 24-36.
- [13] Conrad, Miller, et al. Stabilization and preservation of *Lactobacillus acidophilus* in *Saccharide matrices*[J]. Cryobiology, 2000, 41: 17-24.
- [14] Wouters, Kamphuis, Hugenholtz, et al. Changes in glycolytic activity of *Lactococcus lactis* induced by low temperature[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66: 3689-3691.
- [15] Pascale Serror, Christian Chervaux, Tamara Smokvina, et al. Stress responses in lactic acid bacteria[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2002, 82: 187-216.
- [16] Monnet, Beal, Corrieu. Improvement of the resistance of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* to freezing by natural selection[J]. Journal of Dairy Science, 2003, 86: 3048-3053.