

# 油酸对植物乳杆菌LIP-1生长及冻干存活率的影响及其机理

何宗柏, 孙瑞胤, 鄂晶晶, 麻丽丽, 张晓宁, 王俊国\*

(内蒙古农业大学食品科学与工程学院, 乳品生物技术与工程教育部重点实验室,

农业农村部奶制品加工重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010018)

**摘要:**以植物乳杆菌LIP-1为研究对象,在培养基中添加不同质量浓度油酸( $C_{18:1\omega9c}$ ),研究 $C_{18:1\omega9c}$ 对该菌株生长及冻干存活率的影响。结果表明:在MRS培养基中添加低质量浓度( $\leq 0.2$  g/L)  $C_{18:1\omega9c}$ 可提高活菌数和冻干存活率, $C_{18:1\omega9c}$ 最适添加质量浓度为0.1 g/L,在此质量浓度下,与未添加 $C_{18:1\omega9c}$ 的空白对照组相比,活菌数提高了 $9 \times 10^8$  CFU/mL,冻干存活率提高了8.38%;当培养基中 $C_{18:1\omega9c}$ 质量浓度 $\geq 0.3$  g/L时,菌株的生长受到抑制。用气相色谱法分析细胞膜脂肪酸构成,结果显示,与空白对照组相比,0.1 g/L组不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸比值提高了0.45%,环丙烷脂肪酸( $C_{19cyc11}$ )比例上升了8.35%;相关性分析表明,棕榈酸与 $C_{19cyc11}$ 之间呈显著负相关,硬脂酸与 $C_{18:1\omega9c}$ 呈显著负相关;荧光显微镜下观察植物乳杆菌LIP-1冻干菌体,实验组发出绿色荧光的菌体明显多于对照组,这说明在冷冻干燥过程中实验组细胞膜完整性维持得较好;测定冻干后植物乳杆菌LIP-1上清液中 $\beta$ -半乳糖苷酶的活性,发现实验组上清液中酶活性低于MRS组,表明低质量浓度 $C_{18:1\omega9c}$ ( $\leq 0.2$  g/L)能维持细胞膜的完整性,降低 $\beta$ -半乳糖苷酶的泄漏量。结论:培养基中添加低质量浓度 $C_{18:1\omega9c}$ 能促进菌体合成 $C_{19cyc11}$ ,诱导饱和脂肪酸转化为不饱和脂肪酸,提高菌株对冷冻干燥的抗性。

**关键词:**油酸;植物乳杆菌LIP-1;冷冻干燥;冻干存活率;细胞膜;不饱和脂肪酸;环丙烷脂肪酸

Effect of Oleic Acid on Growth and Freeze-drying Survival of *Lactobacillus plantarum* LIP-1 and Its Mechanism of Action

HE Zongbai, SUN Ruiyin, E Jingjing, MA Lili, ZHANG Xiaoning, WANG Junguo\*

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education,

Key Laboratory of Dairy Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs,

College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

**Abstract:** The effects of different concentrations of oleic acid on the growth and freeze-drying survival of *Lactobacillus plantarum* LIP-1 were studied. The results showed that low concentration of oleic acid ( $\leq 0.2$  g/L) could increase the viable count and freeze-drying survival rate in MRS medium. The optimum concentration of oleic acid was 0.1 g/L, increasing the viable bacteria count and the freeze-drying survival rate by  $9 \times 10^8$  CFU/mL and 8.38% as compared with the blank control group without oleic acid, respectively. When the concentration of oleic acid was higher than 0.3 g/L, the growth of the strain was inhibited. The fatty acid composition of the cell membrane was analyzed by gas chromatography (GC). The results showed that the ratio of unsaturated fatty acids to saturated fatty acids (UFA/SFA) was increased by 0.45% and the proportion of cyclopropane fatty acids by 8.35% in the 0.1 g/L oleic acid group as compared with the blank control group. There was a significantly negative correlation between stearic acid and oleic acid as well as between palmitic acid and cyclopropane fatty acids. The number of cells exhibiting green fluorescence in the experimental group was significantly higher than that in the control group, which indicated that the integrity of the cell membrane was maintained well in the experimental group during freeze-drying. The activity of  $\beta$ -galactosidase in the supernatant of freeze-dried *L. plantarum* LIP-1 in the experimental group was lower than that in the MRS group, indicating that low concentration of oleic acid

收稿日期: 2019-03-16

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目(31660456); 内蒙古自然科学基金重大项目(2018ZD14)

第一作者简介: 何宗柏(1995—)(ORCID: 0000-0002-7917-9968),男,硕士研究生,主要从事乳品生物技术研究。

E-mail: 1794919164@qq.com

\*通信作者简介: 王俊国(1970—)(ORCID: 0000-0002-8016-4456),男,教授,博士,主要从事乳品工艺与生物技术研究。

E-mail: junguo379@aliyun.com

( $\leq 0.2$  g/L) could maintain the integrity of the cell membrane and reduce the leakage of  $\beta$ -galactosidase. Conclusion: Adding low concentration oleic acid to the medium can promote the synthesis of cyclopropane fatty acids, induce the transformation of saturated fatty acids into unsaturated fatty acids, and improve the resistance of this strain to freeze-drying.

**Keywords:** oleic acid; *Lactobacillus plantarum* LIP-1; freeze-drying; freeze-drying survival rate; cell membrane; unsaturated fatty acid; cyclopropane fatty acid

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190316-203

中图分类号: TS202.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2020)10-0068-07

引文格式:

何宗柏, 孙瑞胤, 鄂晶晶, 等. 油酸对植物乳杆菌LIP-1生长及冻干存活率的影响及其机理[J]. 食品科学, 2020, 41(10): 68-74. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190316-203. <http://www.spkx.net.cn>

HE Zongbai, SUN Ruiyin, E Jingjing, et al. Effect of oleic acid on growth and freeze-drying survival of *Lactobacillus plantarum* LIP-1 and its mechanism of action[J]. Food Science, 2020, 41(10): 68-74. (in Chinese with English abstract)

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190316-203. <http://www.spkx.net.cn>

乳酸菌真空冷冻干燥技术可将乳酸菌悬液冷冻一定时间后,再提高其环境中的真空度,使菌体中的水分在低温高真空度的环境下升华变成冻干菌粉<sup>[1]</sup>。由于真空冷冻干燥法制备的乳酸菌发酵剂具有遗传稳定、发酵活力高、贮藏条件好等优点,成为乳酸菌发酵剂最常用的制备方法之一<sup>[2]</sup>。然而乳酸菌在冷冻干燥过程中,不可避免地受到一些损伤,冻干后的菌粉存活率明显降低<sup>[3]</sup>。有研究表明,通过优化菌株的培养基组成成分,可提高菌株对冷冻干燥的抗性,从而提高冻干存活率<sup>[4]</sup>。

脂肪酸及其衍生物具有抑菌活性的报道国内外并不少见,已有研究表明,脂肪酸及其衍生物对丝状真菌、酵母菌、细菌的生长均有一定的抑制作用,抑制作用的强弱与碳链长度、不饱和键数目和位置有关,具体机制尚无定论。而脂肪酸及其衍生物对革兰氏阳性菌的抑制作用优于革兰氏阴性菌,有研究者认为与细胞膜的结构有关<sup>[5-6]</sup>。

近年来,长链脂肪酸及其衍生物的生理作用逐渐受到人们的关注。油酸( $C_{18:1\omega9c}$ )是一种单不饱和 $\omega-9$ 脂肪酸,其化学式为 $C_{18}H_{34}O_2$  ( $(CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH)$ ),在自然界中广泛存在,因此人们普遍认可低剂量 $C_{18:1\omega9c}$ 的安全性。Macias等<sup>[7]</sup>发现适当质量浓度的 $C_{18:1\omega9c}$ 可以提高硫胺素的活性,提高菌的产酸能力,菌的生长量有所增加。但 $C_{18:1\omega9c}$ 对乳酸菌生长的影响还存在争议, Sun等<sup>[8]</sup>比较了脂肪酸及其甘油单脂的抑菌活性,发现 $C_{18:1\omega9c}$ 和 $\alpha$ -亚麻酸具有抑菌效果。这可能是因为脂肪酸代谢产生过多的自由基,对DNA造成了损伤<sup>[9]</sup>。有研究显示,在乳酸菌培养基中添加 $C_{18:1\omega9c}$ 、油酸钠和吐温-80可以提高细胞膜中不饱和脂肪酸的相对含量<sup>[10-11]</sup>。而大量研究表明,较高的细胞膜不饱和脂肪酸含量可以提高冷冻过程中形成的冰晶对细胞膜的机械损伤<sup>[12]</sup>。但以 $C_{18:1\omega9c}$ 作为诱导物质提高冻干存活率的研究鲜见报道。

植物乳杆菌LIP-1是1株从新疆地区传统发酵酸马奶中分离出的具有降胆固醇益生功能的菌株<sup>[13]</sup>,减少菌株在冷冻干燥过程中的损伤,制备高活性、高存活率的益生菌制剂具有重要意义。本研究在MRS培养基中添加 $C_{18:1\omega9c}$ ,以植物乳杆菌LIP-1为实验菌株,探究培养基中不同质量浓度 $C_{18:1\omega9c}$ 与植物乳杆菌LIP-1发酵活菌数之间的关系,探究 $C_{18:1\omega9c}$ 培养基对冻干存活率的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

植物乳杆菌LIP-1由内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室提供。

冻干保护剂:脱脂乳10.0 g、蔗糖8.0 g、L-谷氨酸钠0.1 g、蒸馏水82 mL,115℃灭菌7 min,急冷,4℃保存备用。

氯仿-甲醇(1:2, V/V)溶液;1 mol/L甲醇钠-甲醇溶液(13.5 g甲醇钠溶于250 mL甲醇配制);荧光染料LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit L7012 美国Invitrogen公司; $\beta$ -半乳糖苷酶试剂盒 北京索莱宝试剂公司。

MRS液体培养基:葡萄糖20.0 g、大豆蛋白胨10.0 g、牛肉膏10.0 g、酵母粉5.0 g、无水乙酸钠5.0 g、无水磷酸氢二钾2.0 g、柠檬酸钠2.0 g、七水硫酸镁0.2 g、五水硫酸锰0.05 g、吐温-80 1 mL,加蒸馏水1 000 mL,121℃灭菌15 min。MRS固体培养基:液体培养基的基础上添加琼脂12 g,121℃灭菌15 min。 $C_{18:1\omega9c}$ 培养基: $C_{18:1\omega9c}$  0.1~0.9 g、吐温-80 1 mL、1 000 mL蒸馏水,充分溶解后,加入液体MRS培养基的其他成分,配制成 $C_{18:1\omega9c}$ 培养基,121℃灭菌15 min。

以上试剂均为分析纯。

## 1.2 仪器与设备

FD-1A-50真空冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司；6850气相色谱仪 安捷伦科技(中国)有限公司；DM4000B正置荧光显微镜 德国Leica公司；UV-1700紫外分光光度计 日本岛津公司。

## 1.3 方法

### 1.3.1 菌种活化

将植物乳杆菌LIP-1冻干粉接种至MRS液体培养基中，37℃条件下活化至3代，再以2%的接种量接种于C<sub>18:1ω9c</sub>培养基中，37℃培养18 h后置于4℃保存备用，此为实验组，对照组以液体MRS培养基活化至4代后置于4℃备用。

### 1.3.2 活菌计数

以MRS固体培养基为计数培养基，采用稀释平板菌落法计数。

### 1.3.3 真空冷冻干燥

在从C<sub>18:1ω9c</sub>培养基收集的菌泥中加入2 mL脱脂乳，充分混匀后取1 mL置于-80℃超低温冰箱中进行预冻，预冻6 h。冷冻后的样品放在冻干机中，冻干24 h，真空度20 Pa，冷阱温度-45℃。

### 1.3.4 植物乳杆菌LIP-1冻干存活率的测定

利用稀释平板菌落计数法测定冻干前后活菌数，冻干后的菌粉用生理盐水复水至冻干前的体积，并在37℃条件下培养10 min恢复活性，再采用MRS倒平板法，37℃培养48 h，计数。实验重复3次，每次实验3个平行。冻干存活率按下式计算：

$$\text{冻干存活率}/\% = \frac{A_1}{A_2} \times 100$$

式中： $A_1$ 为冻干后样品活菌数/(CFU/mL)； $A_2$ 为冻前样品活菌数/(CFU/mL)。

### 1.3.5 脂肪酸的提取及甲酯化

采用Bligh等<sup>[14]</sup>方法提取膜脂肪酸，后以甲醇钠进行甲酯化。C<sub>18:1ω9c</sub>培养基培养18 h后收集的菌体在4℃、4 000 r/min离心5 min，去上清液，洗涤2次，弃上清液，取0.5 g湿菌泥，加入1.9 mL氯仿-甲醇溶液，充分振荡15 min，加入0.625 mL氯仿及0.625 mL无菌去离子水，振荡15 min后，4℃、5 000×g离心10 min，吸取下层液相，转移到新的离心管里，用氮吹仪吹干。以甲醇钠-甲醇溶液作为催化剂，在样品中加入1 mL 1 mol/L甲醇钠-甲醇溶液，冰浴下振荡5 min进行甲酯化；加入0.6 mL正己烷萃取脂肪酸的甲酯，振荡5 min，5 000×g离心5 min，吸取上层液相转入气相瓶，进行气相色谱分析。

### 1.3.6 细胞膜脂肪酸含量的气相色谱测定

气相色谱分析条件：PEG毛细管填充柱(30 m×0.22 mm, 0.25 μm)；载气：氮气；流速：29.6 mL/min；总流量：0.5 mL/min；柱压：63.4 kPa；进样口温度：260℃；检测器温度：280℃；柱温升温程

序：起始温度100℃，保持1 min，随后以4℃/min的速率增至250℃并在250℃保持5 min。计算脂肪酸各峰的峰面积、保留时间及质谱范围，根据标样进行比对(37种脂肪酸和C<sub>19:1ω11</sub>的标样)，对每个样品进行3次重复测定。

脂肪酸含量采用归一化法，所有组分出峰之和按100%计算，各脂肪酸相对含量为该脂肪酸峰面积与总体脂肪酸峰面积和的比值。

### 1.3.7 细胞膜完整性的测定

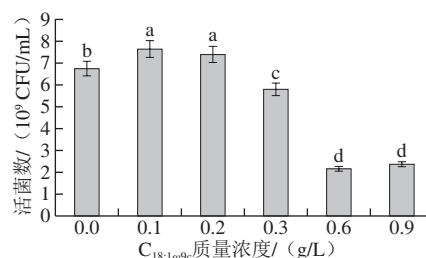
细胞膜完整性利用LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit L7012进行测定。将荧光染料碘化丙啶和SYTO9等体积混合均匀。取3 μL混合染料，加入到1 mL菌悬液中，避光振荡混合均匀，在室温条件下，避光孵育15 min。取5 μL染色的菌悬液，滴加在洁净的载玻片上，盖上盖玻片，压紧，在荧光显微镜下进行观察。

### 1.3.8 胞外β-半乳糖苷酶活性的测定

取不同组别冻干菌粉样品(菌数约为1×10<sup>9</sup> CFU/mL)，加0.05 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>缓冲液10 mL，4℃、4 000 r/min离心5 min，各取上清液1 mL，用β-半乳糖苷酶试剂盒对3组样品的β-半乳糖苷酶活性进行3次重复测定，酶活性的单位以U表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 C<sub>18:1ω9c</sub>质量浓度对菌株生长情况的影响



字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ )。图4同。

图1 C<sub>18:1ω9c</sub>对植物乳杆菌LIP-1生长情况的影响

Fig. 1 Effects of oleic acid concentration on the growth of *L. plantarum* LIP-1

目前，C<sub>18:1ω9c</sub>对菌生长的作用是促进还是抑制存在争议<sup>[7-8]</sup>，本实验探究在MRS培养基中添加不同质量浓度C<sub>18:1ω9c</sub>对植物乳杆菌LIP-1发酵活菌数的影响。由图1可知，在培养基中低质量浓度C<sub>18:1ω9c</sub>(≤0.2 g/L)可提高活菌数，高质量浓度(≥0.3 g/L)C<sub>18:1ω9c</sub>会降低活菌数。相比于对照组，当培养基中C<sub>18:1ω9c</sub>质量浓度为0.1 g/L和0.2 g/L时，活菌数分别提高到7.6×10<sup>9</sup>、7.4×10<sup>9</sup> CFU/mL，两组之间没有显著差异，说明低质量浓度C<sub>18:1ω9c</sub>(≤0.2 g/L)能促进菌的生长。可能是因为C<sub>18:1ω9c</sub>提高了硫酸素的活性，提高了菌的能量代谢水平，促进了菌的生长<sup>[7]</sup>。

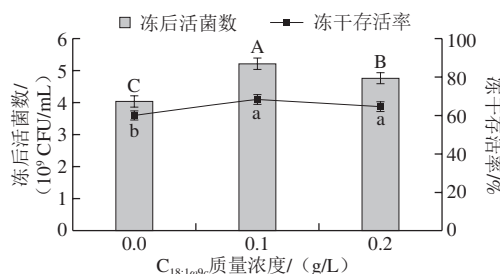


当培养基中质量浓度提高到0.3 g/L时,活菌数开始降低;当 $C_{18:1\omega9c}$ 质量浓度提高到0.6 g/L时,实验组活菌数不到对照组的1/3,这说明高质量浓度 $C_{18:1\omega9c}$  ( $\geq 0.3$  g/L)会抑制菌的生长。本研究表明, $C_{18:1\omega9c}$ 对植物乳杆菌最低抑制质量浓度在0.2~0.3 g/L之间,促进作用质量浓度在0~0.3 g/L之间。

有研究表明脂肪酸及其衍生物(包括 $C_{18:1\omega9c}$ )对革兰氏阳性菌具有抑菌活性<sup>[15]</sup>。宋宇航等<sup>[16]</sup>用透射电子显微镜观察 $C_{18:1\omega9c}$ 组菌体状态,发现细胞壁变薄,细胞膜变厚,细胞壁和细胞膜中的间隙增大,这样有利于脂肪酸的跨膜运输,但也有可能引起细胞内重要酶和功能蛋白的丢失。除此之外有文献报道,不饱和脂肪酸的自动氧化作用会产生具有抗菌活性的氧脂质和短链醛<sup>[6,17]</sup>。由此推断 $C_{18:1\omega9c}$ 对菌株的益生作用与抑制作用存在一个平衡点, $C_{18:1\omega9c}$ 质量浓度低于平衡点时,益生作用大于抑制作用,从而促进菌的生长;当 $C_{18:1\omega9c}$ 质量浓度大于平衡点时, $C_{18:1\omega9c}$ 会在细胞内过多积累,产生有害的代谢产物,对菌体产生抑制作用。

## 2.2 $C_{18:1\omega9c}$ 质量浓度对菌株冻干存活率的影响

冷冻干燥中,由于水分的升华,细胞液浓缩,细胞外溶质质量浓度升高,形成高渗透压的环境;低温、高渗透压、缺水的环境还会引起蛋白质变性、酶活性降低、DNA超螺旋结构的破坏<sup>[18]</sup>。这些不利条件和极端的环境,最终都会导致菌株的活力下降和冻干存活率的降低<sup>[19]</sup>。为提高冻干存活率,在菌株培养期间,优化培养条件,使菌株获得对冷冻干燥抗性,从而提高冻干存活率<sup>[4]</sup>。选取对植物乳杆菌LIP-1生长有促进作用的 $C_{18:1\omega9c}$ 添加质量浓度0.1 g/L和0.2 g/L,与普通MRS培养基进行对比,探究 $C_{18:1\omega9c}$ 对菌株冻后活菌数及冻干存活率的影响。



同一指标字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图2  $C_{18:1\omega9c}$ 对植物乳杆菌LIP-1冻干存活率的影响

Fig. 2 Effect of oleic acid concentration on the survival rate of *L. plantarum* LIP-1 during freeze-drying

从图2可以看出,在培养基中添加 $C_{18:1\omega9c}$ ,显著提高了植物乳杆菌LIP-1冻后活菌数和冻干存活率。相比于对照组,0.1 g/L和0.2 g/L组冻干存活率分别提高了8.38%和4.46%,而0.1 g/L组与0.2 g/L组无显著差异 ( $P > 0.05$ )。实验组冻后活菌数分别提高了 $1.18 \times 10^9$ 、

$7.19 \times 10^8$  CFU/mL,而0.1 g/L组冻后活菌数要高于0.2 g/L组,可能是因为0.2 g/L组的菌体内 $C_{18:1\omega9c}$ 的有害代谢产物开始累积,并对菌产生了抑制作用<sup>[5]</sup>,但这种抑制作用与 $C_{18:1\omega9c}$ 的积极作用存在一个平衡点,最终的结果是0.2 g/L冻后活菌数高于对照组,低于0.1 g/L组。总而言之,培养基中添加低质量浓度 $C_{18:1\omega9c}$ 能提高菌株冻后活菌数和冻干存活率,冻干存活率的提高与 $C_{18:1\omega9c}$ 质量浓度有关。可能的原因是,在培养期间, $C_{18:1\omega9c}$ 能促进菌株合成不饱和脂肪酸,细胞膜的流动性提高,增强了菌株对冷冻干燥的抗性,此推论在后续实验中进行验证。

## 2.3 $C_{18:1\omega9c}$ 对细胞膜脂肪酸构成的影响

研究结果表明,培养基中添加0.1 g/L  $C_{18:1\omega9c}$ ,能促进菌的生长,且能提高菌的冻干存活率,而0.2 g/L  $C_{18:1\omega9c}$ 培养基的效果比0.1 g/L组略差。为探究低质量浓度 $C_{18:1\omega9c}$ 提高菌株冻干存活率的机理,以MRS培养基中收获的菌为对照组,选取更有代表性的0.1 g/L  $C_{18:1\omega9c}$ 培养基收获的菌体为实验组,用气相色谱法对细胞膜脂肪酸构成进行分析。

在冷冻干燥过程中,细胞膜的流动性与细胞膜中不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸比值有密切的关系,乳酸菌可以通过乳酸脱氢酶调节不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸比例<sup>[20-21]</sup>。细胞膜中不饱和脂肪酸比例增加,可以降低膜从液晶态转化为结晶态的温度,保持菌株在冷冻干燥过程中细胞膜的流动性,防止冰晶的形成对细胞膜的机械损伤<sup>[22-23]</sup>。

表1  $C_{18:1\omega9c}$ 对植物乳杆菌LIP-1细胞膜脂肪酸构成的影响  
Table 1 Effects of oleic acid concentration on membrane fatty acid composition of *L. plantarum* LIP-1

脂肪酸种类	相对含量/%	
	对照组	实验组
$C_{16:0}$ (棕榈酸)	$29.11 \pm 0.21^a$	$22.84 \pm 0.25^b$
$C_{16:1}$ (棕榈油酸)	$2.97 \pm 0.21^a$	$4.57 \pm 0.28^a$
$C_{18:0}$ (硬脂酸)	$30.02 \pm 0.27^a$	$23.82 \pm 0.35^b$
$C_{18:1\omega9c}$	$26.54 \pm 0.31^b$	$29.06 \pm 0.34^a$
$C_{19:1\omega7}$ (环丙烷脂肪酸)	$11.36 \pm 0.07^b$	$19.71 \pm 0.21^a$
饱和脂肪酸	$59.13 \pm 0.48^a$	$46.66 \pm 0.60^b$
不饱和脂肪酸	$40.87 \pm 0.79^a$	$53.34 \pm 0.83^b$
不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸	$0.69 \pm 0.38^b$	$1.14 \pm 0.24^a$
冻前活菌数/ ( $10^9$ CFU/mL)	$6.73^b$	$7.63^a$
冻干存活率/%	$59.90^b$	$68.28^a$

注:同行字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

从表1可知,对照组植物乳杆菌LIP-1细胞膜主要由5种脂肪酸构成,分别为 $C_{16:0}$ 、 $C_{16:1}$ 、 $C_{18:0}$ 、 $C_{18:1\omega9c}$ 和 $C_{19:1\omega7}$ (此处作为不饱和脂肪酸),相对含量2%~40%不等,占细胞膜总脂肪酸比例的89%以上,说明这5种脂肪酸是植物乳杆菌LIP-1的主要脂肪酸。除此之外还检测到 $C_{4:0}$ 、 $C_{6:0}$ 、 $C_{8:0}$ 、 $C_{10:0}$ 、 $C_{12:0}$ 、 $C_{14:0}$ 、 $C_{14:1}$ 、 $C_{15:0}$ 、 $C_{17:0}$ 、 $C_{18:1\omega7}$ 、 $C_{18:3}$ ,但因为含有比例较少或不能被稳定检测而没有进行比较分析。

总体上看,在培养基中添加C<sub>18:1ω9c</sub>,对植物乳杆菌LIP-1细胞膜脂肪酸构成产生了很大的影响,主要体现为饱和脂肪酸含量降低,不饱和脂肪酸含量增加。当培养基中含有0.1 g/L C<sub>18:1ω9c</sub>时,C<sub>16:0</sub>和C<sub>18:0</sub>相对含量不同程度下降,其中C<sub>16:0</sub>相对含量下降6.27%,C<sub>18:0</sub>下降7.2%。C<sub>16:1</sub>、C<sub>18:1ω9c</sub>和C<sub>19cyc11</sub>相对含量不同程度增加。C<sub>18:1ω9c</sub>含量增加了3.52%,与反式脂肪酸和饱和脂肪酸的线性结构不同,C<sub>18:1ω9c</sub>的顺式结构中存在一个突出“结”的分子,这种特殊结构能够引起脂质双分子层疏水核心的改变,导致细胞膜的流动性增加<sup>[24]</sup>。C<sub>19cyc11</sub>比例上升得最为显著,增加了8.35%,这表明C<sub>18:1ω9c</sub>能促进C<sub>19cyc11</sub>的合成。而C<sub>19cyc11</sub>决定了细胞膜的弹性和伸缩性,能防止脂肪酸过紧地结合到细胞膜上,维持细胞膜的流动性,从而提高冻干存活率<sup>[3,25]</sup>。此外,不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸比值上升了0.45%,可能是因为C<sub>18:1ω9c</sub>能诱导饱和脂肪酸转化为不饱和脂肪酸。随着不饱和脂肪酸含量的增加,菌株冻干存活率也显著提高,相比对照组提高了8.38%。

2.4 相关性分析

表2 主要膜脂肪酸和生长量及冻干存活率相关性分析  
Table 2 Correlation analysis among fatty acids, biomass and freeze-drying survival rate

项目	C <sub>16:0</sub>	C <sub>16:1</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18:1ω9c</sub>	C <sub>19cyc11</sub>	不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸	活菌数	冻干存活率
C <sub>16:0</sub>	1							
C <sub>16:1</sub>	-0.11	1						
C <sub>18:0</sub>	0.478	-0.769	1					
C <sub>18:1ω9c</sub>	-0.15	0.556	-0.872*	1				
C <sub>19cyc11</sub>	-0.975**	-0.061	-0.289	-0.046	1			
不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸	-0.45	0.142	-0.657	0.693	0.627	1		
活菌数	-0.231	0.497	0.766	0.689	0.213	0.713	1	
冻干存活率	-0.833*	0.568	-0.838*	0.513	0.829*	0.964**	0.664	1

注:\*,显著相关,  $P<0.05$ ; \*\*,极显著相关,  $P<0.01$ 。

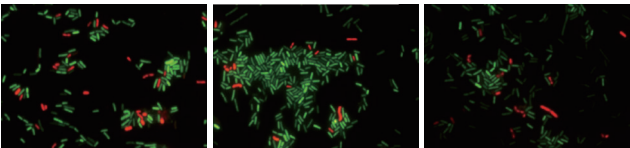
为进一步确定C<sub>18:1ω9c</sub>与菌株细胞膜脂肪酸构成及冻干存活率之间的关系,对0.1 g/L C<sub>18:1ω9c</sub>培养基下收获的菌株各主要脂肪酸、活菌数及冻干存活率作相关性分析,相关系数及P值如表2所示。不饱和脂肪酸和C<sub>19cyc11</sub>的比例对菌应对冷冻胁迫非常重要<sup>[10]</sup>。在C<sub>18:1ω9c</sub>的作用下,C<sub>19cyc11</sub>和不饱和脂肪酸相对含量显著增加,而Pearson相关性分析表明,C<sub>19cyc11</sub>相对含量与冻干存活率呈显著正相关。这表明C<sub>19cyc11</sub>能在冷冻干燥过程中对细胞起到的保护作用,与张国强等<sup>[26]</sup>的研究结果一致。C<sub>19cyc11</sub>可以提高细胞膜的流动性,且由于其存在的环状结构决定了其化学性质的稳定,可以稳定细胞膜组成成分<sup>[27]</sup>。有研究表明C<sub>19cyc11</sub>由C<sub>18:1ω9c</sub>转化而来,但本研究中,C<sub>19cyc11</sub>与C<sub>16:0</sub>之间呈显著负相关,说明在C<sub>18:1ω9c</sub>的作用下,C<sub>16:0</sub>可转化为C<sub>19cyc11</sub>,这可能是菌株之间差异性决定的,同时也说明不同菌株之间C<sub>19cyc11</sub>的生物合成方式存在差异。

C<sub>18:0</sub>与C<sub>18:1</sub>存在显著负相关性,可推测培养基中的C<sub>18:1ω9c</sub>可以促进饱和脂肪酸(C<sub>18:0</sub>)转化为不饱和脂肪酸(C<sub>18:1ω9c</sub>),提高细胞膜中不饱和脂肪酸的比例。不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸比值与冻干存活率存在显著正相关性,不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸比值越高,冻干存活率也越高。不饱和脂肪酸中的顺式双键能阻止脂肪酸分子之间的整齐排列,这种整齐的排列会导致脂肪膜的流动性下降<sup>[21]</sup>。不饱和脂肪酸含量高还可降低细胞膜由液晶相转化为凝胶相的温度,从而提高细胞对低温胁迫的抗性,减少细胞在冷冻干燥过程中的损伤<sup>[28]</sup>。这可能是C<sub>18:1ω9c</sub>提高菌株冻干存活率的一个重要原因。

此外,相关性分析还显示出,C<sub>16:1</sub>相对含量与C<sub>18:0</sub>有较大的负相关系数,虽然不具有显著性,但能显示出在C<sub>18:1ω9c</sub>的作用下,短链脂肪酸有向长链脂肪酸转化的趋势。长链脂肪酸能降低细胞膜上H<sup>+</sup>的透过性,减缓细胞内pH值的下降速率,维持细胞内pH值的动态平衡,以维持细胞的正常生理功能<sup>[29]</sup>。这可能是C<sub>18:1ω9c</sub>提高菌株冻干存活率的另一个潜在原因。

2.5 C<sub>18:1ω9c</sub>对细胞膜完整性的影响

细胞膜的完整性直接关系到细胞的活性,细胞膜的完整性受到破坏,生理功能必然受到影响<sup>[30]</sup>。碘化丙啶是一种排斥性染料,可以对DNA染色,只有细胞膜完整性被破坏的细胞才允许染料进入胞浆,因此碘化乙啶可区分细胞膜是否完整的细胞<sup>[31]</sup>。



A. 对照组 B. 0.1 g/L 组 C. 0.2 g/L 组  
红色荧光表示死菌,绿色荧光表示活菌。

图3 C<sub>18:1ω9c</sub>对植物乳杆菌LIP-1冷冻干燥后细胞膜完整性的影响  
Fig. 3 Effect of oleic acid concentration on cell membrane integrity of *L. plantarum* LIP-1 after freeze-drying

图3显示,从含0.1 g/L C<sub>18:1ω9c</sub>培养基中收获的菌体进行冷冻干燥后,发出红色荧光的菌体明显少于另外两组,这说明菌体细胞膜完整性维持得较好。与没有添加C<sub>18:1ω9c</sub>的对照组相比,0.2 g/L组发出红色荧光的菌体少于对照组,这说明该组菌体细胞膜的完整性受到破坏的程度小于对照组,冷冻干燥对对照组的影响大于实验组。在冷冻干燥的预冻阶段,细胞内外都会形成冰晶,对细胞膜造成机械损伤,破坏细胞膜的完整性,细胞膜的通透性增加,胞内的关键酶如β-半乳糖苷酶、ATP酶等,蛋白质和离子发生泄漏,导致细胞活性降低<sup>[32-33]</sup>。这很好地解释了0.1 g/L组与0.2 g/L组具有较高冻干存活率的原因。同时也间接验证了培养基中低质量浓度的C<sub>18:1ω9c</sub>可以

诱导饱和脂肪酸向不饱和脂肪酸转化, 促进 $C_{19:1n-7}$ 合成, 提高了细胞膜的流动性。

## 2.6 $C_{18:1n-7}$ 对植物乳杆菌LIP-1胞外 $\beta$ -半乳糖苷酶活性的影响

$\beta$ -半乳糖苷酶属于胞内酶, 一般不能在胞外检测到活性, 其在上清液中活性能反映细胞膜通透性的改变, 当细胞膜的完整性受到破坏时, 细胞膜通透性增大,  $\beta$ -半乳糖苷酶会泄露到细胞外, 导致上清液中 $\beta$ -半乳糖苷酶活性增加<sup>[18]</sup>。

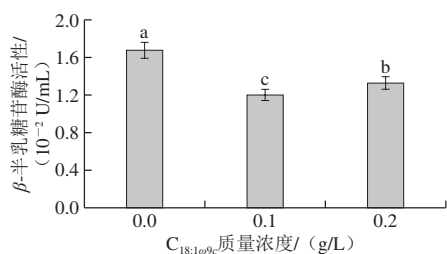


图4  $C_{18:1n-7}$ 对植物乳杆菌LIP-1冻干后 $\beta$ -半乳糖苷酶活性的影响

Fig. 4 Effect of oleic acid concentration on  $\beta$ -galactosidase activity in supernatant of freeze-dried *L. plantarum* LIP-1

由图4可知, MRS组、0.1 g/L组和0.2 g/L组冻干后胞外 $\beta$ -半乳糖苷酶活性分别为 $1.68 \times 10^{-2}$ 、 $1.20 \times 10^{-2}$  U/mL和 $1.33 \times 10^{-2}$  U/mL, 0.1 g/L组、0.2 g/L组冷冻干燥后胞外 $\beta$ -半乳糖苷酶活性均低于MRS组, 0.1 g/L组低于0.2 g/L组, 差异显著 ( $P < 0.05$ )。冷冻干燥过程会对菌体细胞膜造成一定程度的损伤, 细胞膜的通透性增大, 泄漏到细胞外的 $\beta$ -半乳糖苷酶增加<sup>[22]</sup>。本研究中0.1 g/L组和0.2 g/L组胞外 $\beta$ -半乳糖苷酶活性低于MRS组, 表明培养基中添加低质量浓度 $C_{18:1n-7}$ 能有效阻止 $\beta$ -半乳糖苷酶的泄露。培养基中添加低质量浓度 $C_{18:1n-7}$ 可提高细胞膜的流动性, 降低冷冻过程中冰晶对细胞膜的机械损伤, 使细胞膜的完整性维持较好, 因而0.1 g/L组和0.2 g/L组 $\beta$ -半乳糖苷酶泄漏量低于MRS组。

## 3 结论

培养基中低质量浓度 ( $\leq 0.2$  g/L) 的 $C_{18:1n-7}$ 可以促进植物乳杆菌LIP-1生长, 提高冻干存活率。培养基中高质量浓度 $C_{18:1n-7}$ 会抑制菌的生长, 最低抑制质量浓度在0.2~0.3 g/L之间。低质量浓度 $C_{18:1n-7}$ 可以促进 $C_{16:0}$ 转化为 $C_{19:1n-7}$ , 同时诱导饱和脂肪酸向不饱和脂肪酸转化, 通过这两条途径提高菌体对冷冻干燥的抗性。

## 参考文献:

[1] 李明慧, 尚一娜, 王俊国, 等. 真空冷冻干燥对乳酸菌损伤机制的研究进展[J]. 食品科学, 2018, 39(19): 273-279. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201819042.

[2] PEIREN J, BUYSE J, VOS P D, et al. Improving survival and storage stability of bacteria recalcitrant to freeze-drying: a coordinated study by European culture collections[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(8): 3559-3571. DOI:10.1007/S00253-015-6476-6.

[3] 朱琳, 刘宁, 霍贵成, 等. 乳酸菌细胞膜的冻干损伤[J]. 食品科学, 2006, 27(2): 266-269. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2006.02.063.

[4] 岳林芳, 王俊国, 张和平, 等. 培养条件对乳酸菌发酵剂抗冷冻干燥性能影响的研究进展[J]. 食品科学, 2016, 37(11): 270-276. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201611047.

[5] DESBOIS A P, SMITH V J. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85(6): 1629-1642. DOI:10.1007/s00253-009-2355-3.

[6] 张璐. 脂肪酸及其衍生物抑菌活性定量构效关系研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2010.

[7] MACIAS F M. Effect of oleic acid on the response of *Lactobacillus fermenti* to thiamin and its moieties[J]. Journal of Bacteriology, 1958, 75(5): 561.

[8] SUN C Q, O'CONNOR C J, ROBERTSON A M. Antibacterial actions of fatty acids and monoglycerides against *Helicobacter pylori*[J]. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2003, 36(1/2): 9-17. DOI:10.1016/S0928-8244(03)00008-7.

[9] HANSEN M L R W, PETERSEN M A, RISBO J, et al. Implications of modifying membrane fatty acid composition on membrane oxidation, integrity, and storage viability of freeze-dried probiotic *Lactobacillus acidophilus* La-5[J]. Biotechnology Progress, 2015, 31(3): 799-807. DOI:10.1002/btpr.2074.

[10] BEAL C, FONSECA F, CORRIEU G. Resistance to freezing and frozen storage of *Streptococcus thermophilus* is related to membrane fatty acid composition[J]. Journal of Dairy Science, 2001, 84(11): 2347-2356. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(01)74683-8.

[11] GOLDBERG I, ESCHAR L. Stability of lactic acid bacteria to freezing as related to their fatty acid composition[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1977, 33(3): 489-496. DOI:10.1002/jobm.3630181007.

[12] 李宝坤. 乳酸杆菌冷冻干燥生理损伤机制及保护策略的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2011.

[13] 王俊国. 降胆固醇益生乳杆菌的筛选及其降胆固醇作用的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2008: 82-94.

[14] BLIGH E G, DYER W J. A rapid method for total lipid extraction and purification[J]. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 1959, 37: 911-917. DOI:10.1139/o59-099.

[15] DILIKA F, BREMNER P D, MEYER J J. Antibacterial activity of linoleic and oleic acids isolated from *Helichrysum pedunculatum*: a plant used during circumcision rites[J]. Fitoterapia, 2000, 71(4): 450-452. DOI:10.1016/S0367-326X(00)00150-7.

[16] 宋宇航, 倪丽娟, 张白曦, 等. 含油酸培养基培养对重组解脂酶母全细胞催化合成反10,顺12-共轭亚油酸的影响[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(10): 1-7. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.201610001.

[17] ADOLPH S. Cytotoxicity of diatom-derived oxylipins in organisms belonging to different phyla[J]. Journal of Experimental Biology, 2004, 207(17): 2935-2946. DOI:10.1242/jeb.01105.

[18] 王飏. 乳酸菌冷冻干燥生理损伤的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2009.

[19] 崔树茂. 乳酸菌的生长抑制和冻干存活的影响因素及规律[D]. 无锡: 江南大学, 2017.

[20] 赵文英. 酒球菌SD-2a胁迫适应性反应及其机制初探[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008.



- [21] VELLY H, BOUIX M, PASSOT S, et al. Cyclopropanation of unsaturated fatty acids and membrane rigidification improve the freeze-drying resistance of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TOMSC161[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(2): 907-918. DOI:10.1007/s00253-014-6152-2.
- [22] 李宝磊. 真空冷冻干燥对乳酸菌损伤机制及关键保护技术研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2011.
- [23] 任艳. 真空冷冻干燥过程中保护剂对乳酸菌的保护机理[J]. 中国乳品工业, 2013, 41(9): 41-45. DOI:10.3969/j.issn.1001-2230.2013.09.011.
- [24] 蒋琳. 油酸通过诱导凋亡和自噬抑制舌鳞癌细胞增殖机制的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2018.
- [25] 田雨. 酒球菌环丙烷脂肪酸合酶基因的功能解析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- [26] 张国强. 酒球菌胁迫诱导抗冷冻干燥机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013.
- [27] MUÑOZROJAS J, BERNAL P, DUQUE E, et al. Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2006, 72(1): 472-477. DOI:10.1128/AEM.72.1.472-477.2006.
- [28] 陈声明, 吕琴, 汪志平, 等. 冷冻干燥条件下酿酒酵母细胞脂肪酸组成变化的研究[J]. 微生物学报, 1997(1): 47-52. DOI:10.1088/0256-307X/13/12/010.
- [29] LIU X T, HOU C L, ZHANG J, et al. Fermentation conditions influence the fatty acid composition of the membranes of *Lactobacillus reuteri* I5007 and its survival following freeze-drying[J]. Letters in Applied Microbiology, 2014, 59(4): 398-403. DOI:10.1111/lam.12292.
- [30] SCHWAB C, VOGEL R, GAENZLE M G. Influence of oligosaccharides on the viability and membrane properties of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 during freeze-drying[J]. Cryobiology, 2007, 55(2): 108-114. DOI:10.1016/j.cryobiol.2007.06.004.
- [31] 张波, 陈君, 卢启威, 等. 应用流式细胞术对啤酒酵母在含油酸培养基中生长的定量研究[J]. 现代仪器, 2008, 14(2): 16; 17-20. DOI:10.3969/j.issn.1672-7916.2008.02.005.
- [32] CASTRO H P, TEIXEIRA P M, KIRBY R. Evidence of membrane damage in *Lactobacillus bulgaricus* following freeze drying[J]. Journal of Applied Microbiology, 1997, 82(1): 87-94. DOI:10.1111/j.1365-2672.1997.tb03301.x.
- [33] LOUESDON S, CHARLOT-ROUGÉ S, JUILLARD V, et al. Osmotic stress affects the stability of freeze-dried *Lactobacillus buchneri* R1102 1 as a result of intracellular betaine accumulation and membrane characteristics[J]. Journal of Applied Microbiology, 2014, 117(1): 196-207. DOI:10.1111/jam.12501.