

文章编号: 1673-1689(2011)01-0001-05

微生物液氮超低温保存研究进展

王华^{1,2}, 杜立业^{1,2}, 李华*^{1,2}

(1. 西北农林科技大学 葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 陕西省葡萄与葡萄酒工程技术研究中心, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 菌种保存是微生物研究中的一项基础工作。在 $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下活细胞物质代谢和生长几乎完全停止, 液氮超低温保存使微生物的长期稳定保存成为可能。作者就影响乳酸菌、酵母菌、微藻、原生动液氮超低温保存存活率的因素进行了讨论。此外, 作者还讨论了液氮超低温保存中还存的一些问题。

关键词: 液氮超低温保存; 乳酸菌; 酵母菌; 微藻类; 原生动物

中图分类号: Q 93-336

文献标识码: A

Progress in Cryopreservation of Microorganism in Liquid Nitrogen

WANG Hua^{1,2}, DU Lirye^{1,2}, LI Hua*^{1,2}

(1. College of Enology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 2. Shaanxi Engineering Research Center for Viti Viniculture, Yangling 712100, China)

Abstract: Culture collection is a basic research work in microorganism. Cryopreservation, transfer of biological objects to deep cold anabiosis ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), is an efficient method for long term storage of microorganisms. In this review, the parameters important for development of efficient technologies for cryopreservation of lactic acid bacteria, yeast, microalgae and protozoa are addressed. Furthermore, the problems in liquid nitrogen cryopreservation are discussed in this article.

Key words: liquid nitrogen cryopreservation, lactic acid bacteria, yeast, microalgae, protozoa

为保证生产应用及科研需要, 获得并保持优良菌种成为一项重要的工作, 这就需要长期保持菌种不发生变异, 包括菌种的形态、生理生化、遗传特性等。微生物菌种保藏方法很多, 但从总体上可分为 4 大类: 传代法、干燥法、冷冻法及冷冻干燥法。冷冻干燥保存法和冷冻保存法是目前公认的长期保

存微生物菌种的最安全、可靠的方法。其中冷冻保存法中的液氮超低温保存法适用范围广, 可用于大多数微生物, 特别是对冷冻干燥较困难的微生物^[1,2]。因此该方法已经成为长期保存微生物菌种的最佳方法。

收稿日期: 2010-05-13

基金项目: 农业部“948”项目(2009-Z29)。

作者简介: 王华(1959-), 女, 河北阜城人, 工学博士, 教授, 主要从事葡萄与葡萄酒的研究。Email: wanghua@nwsuaf.edu.cn

* 通信作者: 李华(1959-), 男, 重庆人, 工学博士, 教授, 主要从事葡萄与葡萄酒研究。Email: lihuawine@nwsuaf.edu.cn

1 液氮超低温保存原理

超低温冷冻保存是在液氮(-196℃)中使保存的活细胞物质代谢和生长几乎完全停止的保存方法。在这样的冷冻条件下,调节和控制细胞生长代谢的各种酶的作用受到极大抑制,细胞内部的生化反应十分缓慢,甚至停止,避免了细胞遗传性状的改变和遗传漂变。在最佳条件下活化后,细胞仍可保持其原有的代谢活性^[3,4,5]。

1.1 冷却过程中细胞受损伤的两因素假说

在低温冷冻过程中,冰晶的形成、渗透压、保护剂毒性给细胞造成多种胁迫并对细胞有一定的损害,此方面以Mazur^[6]建立的“双因素假说”最为著名。冷冻损伤由两个独立的因素造成:一是溶液损伤,如果冷却速度很慢,则细胞在高浓度的溶液中暴露时间过长,为达到胞内外溶液浓度平衡,水分由胞内大量流出,细胞剧烈收缩,引起细胞内原质和细胞器的变化;二是胞内冰的形成,如果冷却速率过快,则溶液中形成大量的冰晶,浓度急速升高,但因细胞膜的渗透率有限,胞内溶液的水分子来不及渗出,造成过冷而结冰。

解冻速度过慢时,胞内冰还会发生再结晶^[7]。在冷却和解冻过程中形成的冰晶都可引起细胞体积变大或直接作用于细胞超微结构而造成致命性机械损伤。因此为了实现细胞的超低温保存需在溶剂中加入一定种类的低温保护剂,如甘油、脱脂乳、蔗糖、二甲基亚砷等,不但可以减少胞内水含量,还有保护细胞中大分子物质的作用^[8]。

1.2 溶液玻璃化理论

玻璃化是指液体转变为非晶态的固化过程。它和常见的液体转变为晶体或部分结晶的固体的冻结过程不同,玻璃态固体分子之间的关系和液态无明显变化,而一般的晶体分子之间的关系和液态相差甚远^[1]。使溶液玻璃化的途径有两条:一条是增加溶液中保护剂浓度,当降温速度高于临界冷却速度时即可形成玻璃化,然而过高浓度的保护剂对细胞具有毒性作用;另一条是极大的提高冷却速率,在冷却过程中存在一个结晶高峰温度范围(240~200 K)被称作“危险温度区”,超快速冷却显著缩短了通过“危险温度区”的时间,促进玻璃化的形成^[9]。

2 微生物超低温保存研究进展

微生物体积微小,结构简单,生物学特性比较接近,尤其是结构与功能具有相对的统一性,为微

生物的冷冻干燥保存提供了极为有利的条件,但是不同的微生物细胞在低温下的生存能力又与其本身的物理和生物学特性密切相关^[1]。微生物细胞的大小和形状、生长阶段和速度、接种时间、冷冻保护剂、冷却速度以及解冻速度等都对低温保存效果有影响^[10]。不同细胞的最佳冷却速率不同,Dumont^[8]研究发现不同细胞的低温保存活率与冷却速度有关(图1)。因此针对不同微生物需要采用不同的保存方案,近年来越来越多的微生物被成功保存并且在冷冻机理上也有了更深入的研究。

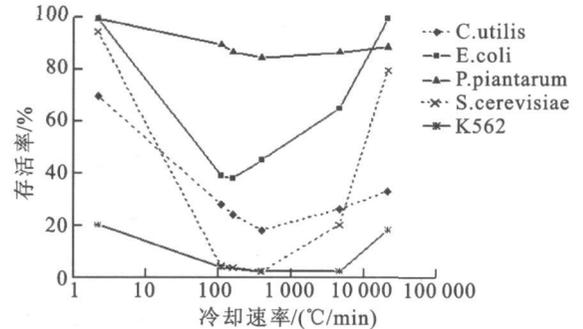


图1 几种细胞的低温保存活率与冷却速率的关系

Fig. 1 The relationship between cryopreservation and cooling rate of several cells

2.1 乳酸菌液氮超低温保存研究

乳酸菌被人类作为食品微生物,广泛用于发酵乳制品、肉制品、酒、水果、蔬菜等。为了使菌种在长期保藏过程中保持稳定的生存能力和功能活性,建立适宜的保存体系是非常必要的。

乳酸菌细胞小并且细胞壁中含有大量肽聚糖,抗冻能力强,在5~30000℃/min冷却速度下存活率波动不大,最高为100%,最低也达到87%^[8]。Cowman^[11]和Johannsen^[12]分别使用脱脂乳和麦芽提取物作为保护剂对乳酸菌进行液氮超低温保存,其成活率均达到了90%以上。甘油、糖类、麦芽糊精等高黏度的保护剂对乳酸菌在快速冷冻下的保护效果显著,而二甲基亚砷、甲醇等因不能改变冷冻浓缩溶液结构,保护效果差,很少作为乳酸菌的冷冻保护剂^[13]。Terezia^[10]对保存了15年的乳酸链球菌进行了检测,结果表明活细胞数、生长特性、生物化学特征以及生产性能都没有显著变化,证明此方法可用于乳酸菌的长期保存。Fonseca^[13]首次对冷却速度和保存温度对乳酸菌活性及冷冻浓缩溶液的影响进行了研究,发现以甘油作为保护剂,乳酸菌在5和2500℃/min下冷却到-196℃胞内均无冰晶形成。通过观察冷冻浓缩物的超微结构发现,冷冻后细胞与细胞之间存在许多相互作用,冻融存活率与细胞密度有关,随着原始菌密度的增

加而增大。在冷冻过程中,未冻结的甘油保护剂黏度不断增大从而限制细胞内水分的扩散,冷冻速度成为决定冷冻浓缩溶液中冰晶量的主要因素。快速冷却不仅使玻璃化温度降低还导致冰晶没有充足的生长时间,减少结冰量,细胞在快速冷却下成活率达到最高。快速冷却的细胞在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存下发生皱缩现象,在超低温电子显微镜下观察未发现再结晶现象。然而,超低温条件下保存的细胞维持良好,推测导致细胞受损的原因可能是升温过程中渗透压不平衡造成的。

2.2 酵母菌液氮超低温保存研究

酵母菌是人类文明史中被应用的最早的微生物,关于其超低温保存的研究也较为丰富。贾建华^[14]对以体积分数 10% 甘油水溶液为保护剂,采用两步法液氮超低温保存 48 属 129 种 1 630 株酵母菌的效果进行了检测,结果表明存活率为 96.5%,其中 57 株未存活。国外,Hubálek^[15]以麦芽提取物、酵母提取物、蛋白胨、牛血清和二甲基亚砷混合物为保护剂与菌体混匀后直接投入到液氮中,20 株酵母菌株中 4 株成活率低于 50%。

最近研究发现酿酒酵母在低速冷冻和超高速冷冻下都可获得较高的成活率,冷却速度与细胞存活率之间呈“U”形曲线,低速($5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$)和超高速($30\,000\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$)冷冻下细胞存活率达到 80% 以上,以 $180\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 冷冻存活率最低^[8,16]。在低速和中速($5\sim 2\,000\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$)冷却条件下,渗透压是影响酿酒酵母存活率的主要因素。低速冷却时水慢慢流出细胞,渗透压变化很小对细胞无严重损伤。而中速冷却时冰的生成和热的发生同冷却速度同步进行使胞内的水分以很大的速度流向胞外,胞外渗透压升高引起细胞死亡。超高速冷却时,由于热量大量流出使得酿酒酵母菌细胞内的水分进入玻璃化状态,既没有溶液效应对细胞的损伤,也没有冰晶对细胞的损伤^[16,17]。Dumont^[8]认为酵母菌的上述抗冻行为与细胞本身的物理和生物学特性密切相关,对于细胞表面积与体积比值大、透水性高、含水量大的细胞应采用低速冷却。酿酒酵母的细胞表面积与体积比值为 $0.7\ \mu\text{m}^{-1}$,透水性为 $6.0\times 10^{11}\ \text{m}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$,两个值均较高,但其在快速冷却时细胞的存活率却很高,可能是细胞壁对细胞膜起到了保护作用并促进了细胞膜的修复。关于酵母细胞在快速冷却下水的玻璃化数量以及冰晶的分布状态还有待深入研究。

2.3 微型藻类液氮超低温保存研究

微型藻类是一类能进行光合作用的真核低等

生物,种类繁多,形态各异。由于微藻类具有多种价值待于开发,如微藻细胞和细胞高价值代谢产物的利用,因此需要建立稳定的超低温保存体系以保证其生物多样性的可持续利用。

不同微藻在传统的两步控温冷冻法下的保存效果有显著差异。随着冷却速度的增大,解冻速度对微藻细胞存活率的影响越来越大^[18]。以体积分数 15% 二甲基亚砷为保护剂,当冷却温度高于 $0.5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 时,多数微藻在快速解冻条件下的存活率远高于慢速解冻。Santiago Vázquez^[19]首次以体积分数 10% 乙醇和 20% 甲醇作为保护剂,分别采用低速冷冻法($1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$)、三步冷冻法($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 2 h, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 2 h,投入液氮)、两步冷冻法($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 2 h,投入液氮)、一步冷冻法(直接投入液氮)对共生甲藻进行了超低温保存,其中两步冷冻法的保存效果最佳,19 周后甲藻细胞仍保持很高活性。Harding^[5]采用玻璃化和藻酸盐包埋脱水法替代两步控温冷冻法对部分微藻成功进行了保存并利用差示扫描量热法和氧胁迫生物化学标记研究了不同保护剂中水的状态变化(冰核形成、融化、玻璃化)和不同方法中造成细胞损伤的关键因素。此外,细胞密度对藻类超低温保存也有重要的影响,但是经常被人们忽视,最新研究发现衣藻在高细胞密度下的冻融存活率很低。高密度哺乳动物红细胞冻融损伤是由细胞间的相互作用造成的,而造成衣藻死亡的原因是冷冻和解冻时细胞壁释放的一种有害物质,这种物质在正常培养条件下对细胞无毒害作用而在低温条件下可降低细胞的活性^[20]。目前还有大量藻类不能利用超低温保存法进行保存,造成保存失败的因素还有待研究。

2.4 原生动动物液氮超低温保存研究

原生动物的种类与数量很多,分布极广,生活周期短,与人类关系极其密切。反刍动物瘤胃纤毛虫类原生动动物占瘤胃微生物总量的 50% 以上并与许多瘤胃功能有关,如纤维素、淀粉、蛋白质的消化。它们还可以降解植物和霉菌毒素,维持瘤胃内环境稳定,清除消化道中某些病原菌,增强动物免疫力从而提高肉食品的安全性^[21]。

瘤胃纤毛虫原生动动物在体外很难培养,采用传统传代保种方法不仅浪费人力物力而且菌种容易丧失活性甚至死亡,实验结果的重复性差^[22]。超低温保存为对纤毛虫进行体内外消化、基因组和生物技术研究提供了方便并且可以长期保持细胞活性。早期,研究人员采用一步慢速冷冻法保存纤毛虫成活率只有 5% 左右;后来人们对冷冻方法进行改

进,形成两步冷冻法。第一步慢速冷冻至保温温度,使胞外水结冰;第二步保持恒温使细胞充分脱水,然后将样品直接投入到液氮中保存^[21]。细胞的超低温保存活性与冷冻液、保护剂的种类和浓度、保护剂与细胞混合时的平衡温度和时间、冷却速度和解冻液等多个因素有关。使用甘油或二甲基亚砷作为保护剂,以 25 °C 替代 5 °C 作为平衡温度,纤毛虫解冻后的活性增强^[23]。Nsabimana^[24] 研究发现不同种类纤毛虫的最佳冷却速度不同,*I. prostoma*, *D. ruminantium*, *E. caudatum*, *E. caudatum caudatum*, *P. multivesiculatum* 和 *E. maggii* 的最佳冷却速度分别是 1.5, 1.7, 1.5, 1.2, 1.6, 2.3 °C/min。其它条件不变,以瘤胃液作为冻融液可显著提高纤毛虫冻融存活率。遗憾的是,至今还未见关于使用其它超低温保存方法保存原生动物的报道。

在超低温保存研究中,简单快速的检测细胞活性的方法也是非常必要的。通过显微镜观察菌运动性确定菌活性是原生动物的研究中常用的方法,但这种方法存在两个不足:一是把不运动的活细胞误认为是死细胞而导致结果不准确,二是外部环境影响细胞运动,为观察带来不便。双重荧光染色法的变异系数低,其结果的准确性更高,可作为一个快速测定原虫细胞损伤程度的工具^[22]。

3 结 语

传统保护剂对细胞都有一定的毒害作用,研究人员发现了具有抗冻作用的新型保护剂:抗冻蛋白(AFP)^[24, 26]和冰结合蛋白(IBF)^[27-29]。AFP 具

有与冰晶结构相似的性质并且可以降低冰晶以针状沿中心轴生长的速度,IBF 则可以抑制再结晶,从而保护细胞膜^[30]。目前广泛使用的极地鱼抗冻蛋白由于价格昂贵受到限制,而从微生物中提取抗冻蛋白可大大降低成本,其将成为研究的热点并取代鱼蛋白而占有市场。

虽然液氮超低温保存体系的研究已经较为深入、成熟,并且为自然资源的长期保存做出了重大的贡献,但是仍然存在一些问题需要引起人们的关注。(1)经常使用的液氮是未经灭菌的,将装有材料的冷冻管浸入到液氮中时,液氮可能渗透到管中引起微生物污染^[31]; (2)微生物长期保存不仅要保证菌株的生理性状还要保证遗传信息的完整性,保藏过程中仅以活性指标判断微生物是否保藏完好有些片面。Stoycheva^[32] 研究发现,将酵母菌 *Saccharomyces cerevisi* 投入到液氮中进行快速冷冻无突变被诱发,然而在 4 °C 下预冻 2 h,然后 -10 °C 下冷冻 1 h,再在 -20 °C 下放置 16 h 的逐级降温过程中易诱导线粒体 rho⁻ 突变体生成。同时,Stamenova^[33] 也发现慢速冷冻和逐级冷冻下,线粒体氧化磷酸化、超氧化物阴离子的积累导致基因组 T_y1 转座子转移。然而研究者往往只重视存活率和生理生化性能的稳定,却忽视了对基因组变化及完整性的检测。随着分子生物学的发展,利用 PCR、AFLP、RFLP 等分子标记技术检查基因组变化已经成为可能。因此使用生理生化稳定性和基因组完整性这个双重指标评价一个保存方案的可行性是必要的。

参考文献(References):

- [1] 李广武,郑从义,唐兵. 低温生物学[M]. 湖南: 湖南科学技术出版社, 1998. 127.
- [2] 周德庆. 微生物学教程(第2版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002. 242.
- [3] 徐振波,李彦媚,弓松伟,等. 新型冷冻保存剂在细胞低温冻存中的选择[J]. 制冷, 2004, 23(4): 19-24.
- [4] Tsutsaeva A A, Ana'nina A E, Balyberdina L M, et al. Long term storage of industrial microbial strains[J]. **Microbiology**, 2008, 77(5): 621-624.
- [5] Harding K, Benson E E, M ller J. Cryopreservation of storage recalcitrant algae through fundamental studies of thermal behaviour and oxidative stress physiology[J]. **Cryobiology**, 2006, 53(3): 399-400.
- [6] Mazur P, Leibo S P, Chu E H Y. A two factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue culture cells[J]. **Exp Cell Res**, 1972, 71(2): 345-355.
- [7] Seki S, Mazur P. The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure[J]. **Cryobiology**, 2009, 59(1): 75-82.
- [8] Dumont F, Marechal P A, Gervais P. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2004, 70(1): 268-271.
- [9] Jiao A J, Han X, Critser J K, et al. Numerical investigations of transient heat transfer characteristics and vitrification tendencies in ultra fast cell cooling processes[J]. **Cryobiology**, 2006, 52(3): 386-392.
- [10] Terezia S C, Vlaic A, Collier V, et al. Assessment of cryopreservation systems influence on the survival of *E. coli* recom-

- binant strains[J]. **Lucruri științifice Zootehnie și Biotehologii**, 2008, 41(1): 138– 142.
- [11] Cowman E A, Speck M L. Ultra low temperature storage of lactic streptococci[J]. **Journal of Dairy Science**, 1965, 48(11): 1531– 1532.
- [12] Johannsen E. Malt extract as protective medium for lactic acid bacteria in cryopreservation [J]. **J appl Bact**, 1972, 35(3): 423– 429.
- [13] Fonseca F, Marin M, Morris G J. Stabilization of frozen lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus in glycerol suspensions: freezing kinetics and storage temperature effect[s][J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2006, 72(10): 6474– 6482.
- [14] 贾建华. 液氮超低温冻结保藏酵母菌十年的检测报告[J]. 微生物学报, 1998, 25(2): 65– 68.
JIA Jian hua. The Study of liquid nitrogen storage of yeast cultures for ten years[J]. **Microbiology**, 1988, 25(2): 65– 68. (in Chinese)
- [15] Hulák Z, Kocková- Kratochvílová A. Liquid nitrogen storage of yeast cultures I. Survival, and literature review of the preservation of fungi at ultralow temperatures[J]. **Antonie van Leeuwenhoek**, 1978, 44(2): 229– 241.
- [16] Dumont F, Marechal P A, Gervais P. Influence of cooling rate on *Saccharomyces cerevisiae* destruction during freezing: unexpected viability at ultra rapid cooling rates[J]. **Cryobiology**, 2003, 46(1): 33– 42.
- [17] Dumont F, Marechal P A, Gervais P, et al. Involvement of two specific causes of cell mortality in freeze thaw cycles with freezing to 196 C[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2006, 72(2): 1330– 1335.
- [18] Canavate J P, Lubian L M. Effects of slow and rapid warming on the cryopreservation of marine microalgae[J]. **Cryobiology**, 1997, 35(2): 143– 149.
- [19] Santiago V zquez L Z, Newberger N C, Kerr R G. Cryopreservation of the dinoflagellate symbiont of the octocoral *Pseudopteroorgia elisabethae*[J]. **Mar Biol**, 2007, 152(3): 549– 556.
- [20] Piasecki B P, Diller K R, Brand J J. Cryopreservation of *Chlamydomonas reinhardtii*: A cause of low viability at high cell density[J]. **Cryobiology**, 2009, 58(1): 103– 109.
- [21] Abdel Aziz H M, Hassan H Y, Abdel Raof Y M, et al. Trials for cryopreservation of rumen protozoa in sheep[J]. **Global Veterinaria**, 2007, 1(1): 9– 16.
- [22] De la Fuente G, Cebri n J A, Fondevila M. A cryopreservation procedure for the rumen protozoon *Entodinium caudatum*: estimation of its viability by fluorescence microscopy[J]. **Letters in Applied Microbiology**, 2004, 38(2): 164– 168.
- [23] De la Fuente G, Cebri n J A, Fondevila M. Effect of the cryopreservation conditions on the viability of the rumen ciliate *Diploplastron* (*Metadinium*) *affine*[J]. **Letters in Applied Microbiology**, 2005, 42(6): 573– 577.
- [24] Nsabimana E, Kidayov S, Macheboeuf D, et al. Two step freezing procedure for cryopreservation of rumen ciliates, an effective tool for creation of a frozen rumen protozoa bank[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2003, 69(7): 3826– 3832.
- [25] Garnham C P, Gilbert J A, Hartman C P, et al. A Ca^{2+} - dependent bacterial antifreeze protein domain has a novel beta helical ice binding fold[J]. **Biochem J**, 2008, 411(1): 171– 180.
- [26] Muryoi N, Sato M, Kaneko S. Cloning and expression of *afpA*, a gene encoding an antifreeze protein from the arctic plant growth promoting rhizobacterium *pseudomonas putida* GR12- 2[J]. **Journal of Bacteriology**, 2004, 186(17): 5661– 5671.
- [27] Raymond J A, Christner B C, Schuster S C. A bacterial ice binding protein from the Vostok ice core[J]. **Extremophiles**, 2008, 12(5): 713– 717.
- [28] Raymond J A, Fritsen C, Shen K. An ice binding protein from an Antarctic sea ice bacterium[J]. **FEMS Microbiol Ecol**, 2007, 61(2): 214– 221.
- [29] Gilbert J A, Davies P L, Laybourn Parry J. A hyperactive, Ca^{2+} - dependent antifreeze protein in an Antarctic bacterium [J]. **FEMS Microbiology Letters**, 2005, 245(1): 67– 72.
- [30] Christner B C. Bioprospecting for microbial products that affect ice crystal formation and growth[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2010, 85(3): 481– 489.
- [31] Chen H I, Tsai C D, Wang H T, et al. Cryovial with partial membrane sealing can prevent liquid nitrogen penetration in submerged storage[J]. **Cryobiology**, 2006, 53(2): 283– 287.
- [32] Stoycheva T, Venkov P, Tsvetkov T. Mutagenic effect of freezing on mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. **Cryobiology**, 2007, 54(3): 243– 250.
- [33] Stamenova R, Dimitrov M, Stoycheva T, et al. Transposition of *saccharomyces cerevisiae* Ty1 retrotransposon is activated by improper cryopreservation[J]. **Cryobiology**, 2008, 56(3): 241– 247.