

## 酒酒球菌液氮超低温保存

杜立业<sup>1,2</sup>, 王华<sup>1,2\*</sup>, 金刚<sup>1,2</sup>, 李翠霞<sup>3</sup>, 李华<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>西北农林科技大学葡萄酒学院, 杨凌 712100

<sup>2</sup>陕西省葡萄与葡萄酒工程技术研究中心, 杨凌 712100

<sup>3</sup>西北农林科技大学生命科学院, 杨凌 712100

**摘要:**【目地】为安全、长期的保藏酒酒球菌, 本文研究了菌体生长时间、冷冻方法、解冻温度、菌密度以及保护剂等对酒酒球菌细胞冷冻存活率的影响, 找到最优液氮超低温保存方法。【方法】采用平板计数法测定冷冻存活率。【结果】实验结果表明酒酒球菌的最佳保存方法为: 首先在稳定期前期离心收集菌体; 其次加入保护剂(20 g/L 酵母浸提物, 40V/V 甘油, 20 g/L 蔗糖, 30 g/L 谷氨酸钠)稀释菌体, 使菌密度为 $10^9$  CFU/mL; 然后直接投入液氮冷冻; 最后在 37℃ 温水浴中迅速解冻。保存 6 个月后, 其中 21 株酒酒球菌的冷冻存活率达到 99% 以上。【结论】初步研究表明酵母浸提物, 甘油, 蔗糖, 谷氨酸钠复合保护剂对酒酒球菌的保护效果较好, 液氮超低温保存可用于酒酒球菌的长期保存。

**关键词:** 酒酒球菌, 液氮超低温保存, 冷冻存活率

**中图分类号:** Q939.97      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2011) 09-1263-07

苹果酸-乳酸发酵 (Malolactic fermentation, MLF) 可使新(生)葡萄酒的酸涩、粗糙等特点消失, 达到理想的酸度平衡, 果香、醇香加浓, 酒体柔软、肥硕, 微生物稳定性增强。而能够适应葡萄酒环境、较专一地进行 MLF、并对葡萄酒质有增益作用的主要是酒酒球菌 (*Oenococcus oeni*)<sup>[1]</sup>。

微生物保藏的最终目的是保持菌株的纯度、活性、基因信息的完整性、避免菌株变异和降低退化<sup>[2]</sup>。为了使自然界分离得到的野生型酒酒球菌优良菌种、菌株尽可能长时间地在科学研究和生产上发挥作用, 需采用各种适宜的方法妥善保存以保证菌种存活, 更重要的是保证菌种的遗

传性状, 使之不发生或尽可能少发生变异<sup>[3]</sup>。微生物菌种保藏方法很多, 如旋塞试管保藏法、真空冷冻干燥保存法、甘油保存法等。本实验室常采用甘油保存法和真空冷冻干燥法对酒酒球菌进行保存。真空冷冻干燥保藏法手续麻烦、需要一定的设备, 所需仪器一般实验室难以配备<sup>[4]</sup>。甘油保存法是将菌种与甘油混合后, 放在低温冰箱中保存。但冰箱产生的微小温度变化可能会引起培养物的反复融化和再结晶, 对菌体形成强烈的损伤<sup>[5]</sup>。

微生物在长期保藏过程中存在着变异的危险。但 Meryman 曾引证在 -130℃ 将无生化活性

**基金项目:** 农业部“948”项目 (2009-Z29)

\* 通信作者。王华, Tel/Fax: +86-29-87091099, E-mail: wanghuawine@nwsuaf.edu.cn; 李华, Tel/Fax: +86-29-87092107, E-mail: lihuawine@nwsuaf.edu.cn

**作者简介:** 杜立业 (1983-), 女, 硕士研究生, 主要从事葡萄酒微生物的研究。E-mail: duliye@163.com

**收稿日期:** 2011-03-02; **修回日期:** 2011-05-11

发生,逻辑上推断,在如此低的温度下可能是所期待的生物变化(异)的截止点。因而设想,在 $-130^{\circ}\text{C}$ 或更低,生物代谢是停顿的,那么能经受超低温冻结以及其后融化的生物,当贮存在液态氮( $-196^{\circ}\text{C}$ )温度下,可能或长或短无定限地保持着原有性状而活下来<sup>[6]</sup>。并且在最佳条件下活化后,细胞仍可保持其原有的代谢活性,因而液氮超低温保存是实现微生物长期保存的一种有效方法<sup>[7]</sup>。本论文对酒酒球菌液氮超低温保存方法进行了研究,并检测了液氮保存后酒酒球菌细胞存活率的变化。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:**西北农林科技大学葡萄酒学院选育并保藏的22株酒酒球菌和由中国食品发酵工业研究所提供的酒酒球菌31-DH。

**1.1.2 ATB培养基:**每升ATB培养基含5g酵母浸粉,10g蛋白胨,0.2g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.05g  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.5g 盐酸半胱氨酸,250mL 番茄汁,121 $^{\circ}\text{C}$ 湿热灭菌20min。

番茄汁的制备:新鲜西红柿,沸水浸泡,去皮,挤汁过滤后,在沸水中煮2h,过滤后4 $^{\circ}\text{C}$ 低温过夜,高速离心( $10000 \times g$ , 10min),取上清液。

**1.1.3 主要试剂和仪器:**MJ-2508型培养箱:上海跃进医用光学器械厂;TGL-16G\TGL-16冷冻离心机:上海安亭科学仪器厂;AIR-TECH型超净工作台:苏净集团安泰公司;低温冰箱:沈阳北斗星制冷设备有限公司;PhS-3B型精密pH计:上海磁仪器厂;液氮罐:乐山市东亚机电工贸有限公司。甘油:西安三浦精细化工厂;脱脂乳:内蒙古伊利实业集团股份有限公司;酵母提取物:北京奥博星生物技术有限公司;蔗糖:汕头市西陇化工厂有限公司;谷氨酸钠:国药集团化学试剂有限公司;海藻糖:北京奥博星生物技术有限公司;乳糖:北京奥博星生物技术有限公司;葡萄糖:汕头市西陇化工厂有限公司;抗坏血酸:西安化学试剂厂;二甲基亚砜:天津市博迪化工有限公司。

### 1.2 酒酒球菌液氮超低温保存方法的优化

**1.2.1 生长时间对冷冻存活率的影响:**分别离心( $6000 \times g$ , 5min, 4 $^{\circ}\text{C}$ )收集生长至对数期、稳定期前

期、稳定期末期的菌体,弃上清液,然后加入同体积的10%甘油,在漩涡混合器上混匀后直接投入液氮中冷冻。24h后取出,迅速在32 $^{\circ}\text{C}$ 温水浴中解冻。

**1.2.2 冷冻程序对冷冻存活率的影响:**离心( $6000 \times g$ , 5min, 4 $^{\circ}\text{C}$ )收集生长至稳定期前期的菌体,弃上清液,然后加入同体积的10%甘油,在漩涡混合器上混匀。一部分直接投入到液氮中,使用一步冷冻法冷冻;一部分采用分步冷冻法(4 $^{\circ}\text{C}$ 放置30min,  $-20^{\circ}\text{C}$ 放置30min,然后再在 $-40^{\circ}\text{C}$ 下放置1h,投入液氮中冷冻)。24h后取出,迅速在32 $^{\circ}\text{C}$ 温水浴中解冻。

**1.2.3 解冻温度对冷冻存活率的影响:**离心( $6000 \times g$ , 5min, 4 $^{\circ}\text{C}$ )收集生长至稳定期前期的菌体,弃上清液,然后加入同体积的10%甘油,在漩涡混合器上混匀。24h后取出,分别在27 $^{\circ}\text{C}$ 、32 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 、42 $^{\circ}\text{C}$ 、47 $^{\circ}\text{C}$ 、52 $^{\circ}\text{C}$ 温水浴中迅速解冻。

**1.2.4 菌密度对冷冻存活率的影响:**离心( $6000 \times g$ , 5min, 4 $^{\circ}\text{C}$ )收集生长至稳定期前期的菌体,弃上清液,然后加入10%甘油作为保护剂,分别稀释菌密度至 $10^{10}$ 、 $10^9$ 、 $10^8$ 、 $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ ,在漩涡混合器上混匀后直接投入液氮中冷冻。24h后取出,迅速在37 $^{\circ}\text{C}$ 温水浴中解冻。

**1.2.5 酒酒球菌液氮超低温保存保护剂的选择:**(1)单一保护剂对酒酒球菌液氮超低温保存存活率的影响:脱脂乳(10% W/V)、甘油(10% V/V)、酵母提取物(10% W/V)、蔗糖(5% W/V)、谷氨酸钠(5% W/V)、乳糖(5% W/V)、海藻糖(5% W/V)、葡萄糖(5% W/V)、抗坏血酸(5% W/V)、二甲基亚砜(10% V/V)10种保护剂进行单因素实验,以蒸馏水进行对照,对试验结果进行分析。(2)酒酒球菌液氮超低温保存复合保护剂优化设计:在单因素试验基础上,选取保护效果较好的因素进行正交试验,确定最佳复合保护剂。

**1.2.6 酒酒球菌活菌计数及保藏试验:**将菌体在液氮中保存24h、1个月、2个月、4个月、6个月取出解冻,涂平板计数,计算细胞冷冻存活率。

$$\text{保存活率} = N_1 / N_0 \times 100\%$$

$N_0$  是液氮保存前活菌数(CFU/mL)

$N_1$  是液氮保存后的活菌数(CFU/mL)

### 1.3 数据处理

采用DPSv3.01数据处理软件对实验数据的方差显著性进行分析。

2 结果和分析

2.1 酒酒球菌液氮超低温保存方法的优化

2.1.1 生长时间对酒酒球菌 SD-2a 冷冻存活率的影响:从表 1 中可以看出,在 3 个生长阶段中,稳定期前期对酒酒球菌进行液氮超低温保存的细胞冷冻存活率最高,其平均冷冻存活率达到了 73.3%;其次是对数期,其平均冷冻存活率为 66.6%;冷冻存活率最低的是稳定期末期,平均冷冻存活率为 25.0%。

表 1 酒酒球菌 SD-2a 不同生长阶段对细胞冷冻存活率的影响

Table 1 Influence of <i>Oenococcus oeni</i> SD-2a age on survival	
Growth time	Cryosurvival rate/%
Logarithmic phase	66.6 ± 1.1 <sup>b</sup>
Early stationary phase	73.3 ± 0.9 <sup>a</sup>
Late stationary phase	25.0 ± 0.3 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c</sup> statistically different significance ( $p < 0.05$ )

2.1.2 冷冻方法对酒酒球菌 SD-2a 冷冻存活率的影响:从表 2 中可以看出,在两种冷冻方法中,一步冷冻法更适用于酒酒球菌液氮超低温保存,平均冷冻存活率为 73.3%;两步冷冻法的细胞冷冻存活率较低,其平均冷冻存活率只有 55.9%。

表 2 冷冻方法对酒酒球菌 SD-2a 冷冻存活率的影响

Table 2 Influence of freezing on <i>Oenococcus oeni</i> SD-2a survival	
Freezing method	Cryosurvival rate/%
One-step freezing	73.3 ± 0.9 <sup>a</sup>
Two-step freezing	55.9 ± 1.8 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> statistically different significance ( $p < 0.05$ )

2.1.3 解冻温度对酒酒球菌 SD-2a 冷冻存活率的影响:从图 1 中可以看出,随着解冻温度的升高,酒酒球菌 SD-2a 的冷冻存活率先是升高,37℃ 左右达到了最大值,然后随着温度的升高冷冻存活率逐渐降低。27℃ 解冻后的细胞存活率最低,平均冷冻存活率只有 17.6%;解冻温度升高到 32℃ 时,细胞存活率大幅度提高,平均冷冻存活率达到了 73.3%;随后细胞存活率变化较小,在 37℃ 左右最高,平均冷冻存活率升高至 83.6%;之后随着温度升高细胞存活率开始缓慢下降,42℃、47℃ 的平均冷冻存活率分别为 76.3% 和 57.1%;47℃ 至 52℃ 的细胞存活率趋于平稳,52℃ 平均冷冻存活率为 53.6%。

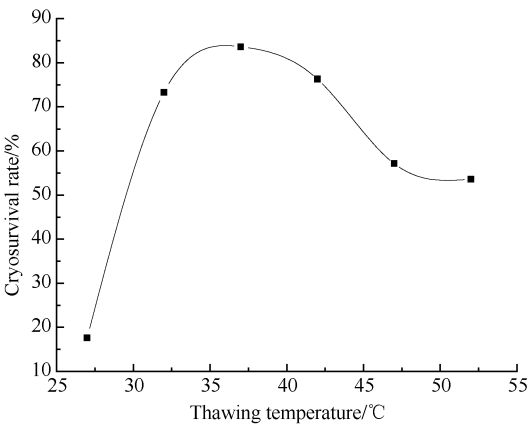


图 1 解冻温度对酒酒球菌 SD-2a 冷冻存活率的影响

Fig.1 Influence of thaw temperature on *Oenococcus oeni* SD-2a survival.

2.1.4 菌密度对酒酒球菌 SD-2a 冷冻存活率的影响:从图 2 中可以看出,菌密度对细胞冷冻存活率有显著影响。随着菌密度的增大,酒酒球菌 SD-2a 的冷冻存活率先是升高,10<sup>9</sup>CFU/mL 左右达到了最大值,然后随着菌密度的增加细胞冷冻存活率逐渐降低。菌密度为 10<sup>5</sup>CFU/mL 时,其平均冷冻存活率为 63.4%;在 10<sup>5</sup>CFU/mL 到 10<sup>7</sup>CFU/mL 之间冷冻存活率增长缓慢,10<sup>7</sup>CFU/mL 时平均冷冻存活率仅有 67.5%;在 10<sup>7</sup>CFU/mL 到 10<sup>9</sup>CFU/mL 之间冷冻存活率增长较快,10<sup>9</sup>CFU/mL 时平均冷冻存活率已达到 83.6%;然后随着菌密度的增大开始急剧下降,10<sup>10</sup>CFU/mL 时冷冻存活率仅有 53.5%。

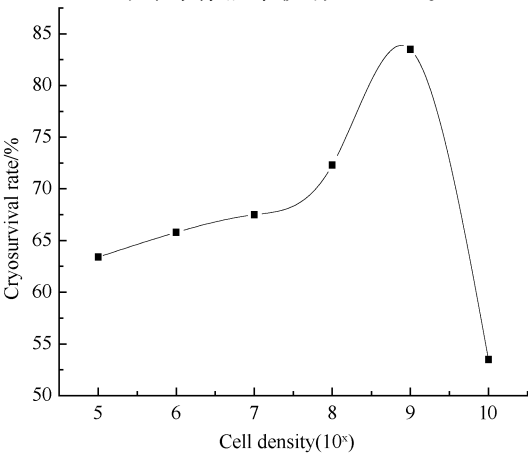


图 2 菌密度对酒酒球菌 SD-2a 冷冻存活率的影响

Fig.2 Influence of cell density on *Oenococcus oeni* SD-2a survival.

**2.1.5 酒酒球菌液氮超低温保存保护剂选择:**(1)单一保护剂对酒酒球菌液氮超低温保存存活率的影响:在 DPS v3.01 中进行保护剂的单因素的方差分析。由表 4 可知不同保护剂对酒酒球菌 SD-2a 冷冻存活率的影响达到了极显著水平( $p < 0.01$ )。从表 4 的冷冻存活率值可以看出,10 种不同保护剂的效果均显著高于对照,11 号处理以蒸馏水作为保护剂冷冻存活率仅有 33.1% 左右。其它添加保护剂的样品冷冻存活率大部分在 50% – 85% 之间。

由表 3 冷冻存活率平均数极差比较可知:甘油,蔗糖,脱脂奶粉,谷氨酸钠,酵母浸提物对酒酒球菌冷冻保护较好,其对应的冷冻存活率分别为  $83.6 \pm 2.7\%$ 、 $78.5 \pm 3.5\%$ 、 $83.3 \pm 2.0\%$ 、 $77.4 \pm 3.9\%$ 、 $68.7 \pm 3.2\%$ 。下一步选取醇类物质甘油、糖类物质蔗糖、氨基酸类物质谷氨酸钠和蛋白质类物质酵母

浸提物对保护剂进行复配,以获得更好的试验效果。

表 3 保护剂单因素试验结果

Table 3 Screening of cryoprotectant					
Serial number	Protective agent	Cryosurvival rate/%			Average cryosurvival rate/%
1	Glycerol	83.8	86.2	80.8	$83.6 \pm 2.7^a$
2	Trehalose	62.3	60.0	58.5	$60.3 \pm 1.9^e$
3	Lactose	63.1	66.2	57.7	$62.3 \pm 4.3^{de}$
4	Sucrose	77.7	75.4	82.3	$78.5 \pm 3.5^a$
5	Glucose	68.5	65.4	61.5	$65.1 \pm 3.5^{de}$
6	Skim milk	83.1	81.5	85.4	$83.3 \pm 2.0^a$
7	Yeast extract	72.3	67.7	66.2	$68.7 \pm 3.2^{bc}$
8	Sodium glutamate	76.9	73.8	81.5	$77.4 \pm 3.9^{ab}$
9	Ascorbic acid	29.2	30.0	24.6	$27.9 \pm 2.9^f$
10	Dimethyl sulfoxide	46.2	49.2	52.3	$49.2 \pm 3.1^f$
11	water	34.6	29.2	33.1	$32.3 \pm 2.8^f$

<sup>a,b,c,d,e,f,g</sup> statistically different significance ( $p < 0.05$ )

表 4 冷冻存活率结果的方差分析

Table 4 Variance analysis of survival rate

Source of variation	Square sum	Degree of freedom	Mean square	F Value	Significant level
different treatments	11069.2421	10	1106.924	112.061	* *
Inline processing	217.3133	22	9.8779		
total variation	11286.5554	32			

(2)酒酒球菌液氮超低温保存复合保护剂优化设计:由表 7 极差分析可知: $R_B > R_A > R_C > R_D$ ,说明影响酒酒球菌液氮超低温保存冷冻活率的保护剂中,酵母浸提物最大,甘油、蔗糖次之,谷氨酸钠最小,最优的组合是  $B_1A_2C_2D_3$ 。结合保护剂四因素三水平正交试验的方差分析见表 8,A、B、C 对酒酒球菌液氮超低温保存冷冻活率的影响达到了极显著的水平,D 达到了显著水平。所以最优的组合是  $B_1A_2C_2D_3$ ,即最优的保护剂是:酵母浸提物: 20 (g/L),甘油: 40 (V/V),蔗糖: 20 (g/L),谷氨酸钠: 30 (g/L)。

表 5 保护剂正交试验设计

Table 5 Factor level of orthogonal experiment

A		B	C	D
levels	c(Glycerol)/ (v/v)	c(Yeast extract)/ (g/L)	c(Sucrose)/ (g/L)	c(Sodium glutamate)/ (g/L)
1	20	20	10	10
2	40	40	20	20
3	60	60	30	30

表 6 保护剂正交试验结果

Table 6 Result of orthogonal experiment

Test number	Glycerol	Yeast extract	Sucrose	Sodium glutamate	Cryosurvival rate/%		
1	1	1	1	1	94.12	91.76	90.59
2	1	2	2	2	90.48	91.57	86.90
3	1	3	3	3	78.82	82.83	82.35
4	2	1	2	3	100.00	102.03	102.5
5	2	2	3	1	90.29	93.04	92.03
6	2	3	1	2	88.64	82.95	94.32
7	3	1	3	2	89.61	85.71	84.42
8	3	2	1	3	92.68	90.24	86.59
9	3	3	2	1	87.38	87.38	85.44

表 7 保护剂正交试验极差分析结果

Table 7 Analysis of range of orthogonal experiment

	A	B	C	D
K1	1052. 57	1120. 99	1082. 53	1082. 71
K2	1127. 74	1085. 1	1111. 57	1059. 47
K3	1052. 6	1026. 82	1038. 81	1090. 73
k1	87. 71	93. 42	90. 21	90. 23
k2	93. 98	90. 42	92. 63	88. 29
k3	87. 72	85. 57	86. 57	90. 89
optimization levels	A <sub>2</sub>	B <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>
R	6. 26	7. 85	6. 06	2. 6

表 8 保护剂正交试验方差分析结果

Table 8 Analysis of variance of orthogonal experiment

Source of variation	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F value	Significant level
A	313.806772	156.9033831	1.6495		**
B	376.463372	188.2316837	3.8754		**
C	223.576292	111.7881522	2.0393		**
D	43.928192	21.964094	3.6262		*
error	135.9344727	5.03461			

2.2 酒酒球菌计数及保藏试验

将生长至稳定期前期的 23 株酒酒球菌分离

表 9 酒酒球菌液氮超低温保存细胞存活率

Table 9 Survival of the *Oenococcus oeni* cultures after liquid-nitrogen storage

Strains	Cryosurvival rate/ %				
	One day	One month	Two months	Four months	Six months
hb-1a	100.3 ± 0.6 <sup>a</sup>	99.9 ± 0.2 <sup>a</sup>	99.4 ± 5.7 <sup>a</sup>	99.3 ± 2.4 <sup>a</sup>	99.3 ± 1.2 <sup>a</sup>
sd-1c	99.6 ± 0.4 <sup>a</sup>	99.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	99.5 ± 1.0 <sup>a</sup>	99.2 ± 0.8 <sup>a</sup>	99.4 ± 0.7 <sup>a</sup>
sd-2gh	99.6 ± 0.9 <sup>a</sup>	98.9 ± 0.3 <sup>a</sup>	99.0 ± 2.0 <sup>a</sup>	99.4 ± 1.1 <sup>a</sup>	99.2 ± 1.2 <sup>a</sup>
sa-1a	99.7 ± 0.7 <sup>a</sup>	100.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	98.9 ± 3.1 <sup>a</sup>	99.5 ± 0.9 <sup>a</sup>	99.0 ± 0.9 <sup>a</sup>
sd-2kj	99.6 ± 0.5 <sup>a</sup>	98.5 ± 1.3 <sup>a</sup>	99.5 ± 3.0 <sup>a</sup>	99.3 ± 1.6 <sup>a</sup>	99.1 ± 1.4 <sup>a</sup>
sx-1a	99.9 ± 0.5 <sup>a</sup>	99.8 ± 0.5 <sup>a</sup>	100.0 ± 4.6 <sup>a</sup>	99.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	99.8 ± 1.3 <sup>a</sup>
sd-1g	100.0 ± 0.9 <sup>a</sup>	100.0 ± 0.9 <sup>a</sup>	99.2 ± 5.2 <sup>a</sup>	99.5 ± 1.4 <sup>a</sup>	99.4 ± 1.2 <sup>a</sup>
sd-2h	99.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	99.3 ± 0.6 <sup>a</sup>	99.7 ± 3.5 <sup>a</sup>	99.4 ± 1.2 <sup>a</sup>	99.2 ± 2.1 <sup>a</sup>
hb-2b	99.7 ± 0.3 <sup>a</sup>	100.4 ± 1.8 <sup>a</sup>	99.6 ± 1.4 <sup>a</sup>	99.8 ± 0.3 <sup>a</sup>	99.8 ± 0.4 <sup>a</sup>
sd-2d	99.4 ± 0.4 <sup>a</sup>	98.7 ± 1.2 <sup>a</sup>	98.5 ± 3.5 <sup>a</sup>	98.8 ± 0.8 <sup>a</sup>	98.9 ± 1.8 <sup>a</sup>
sd-2a	101.5 ± 1.3 <sup>a</sup>	99.9 ± 0.2 <sup>a</sup>	99.7 ± 0.6 <sup>a</sup>	99.7 ± 0.9 <sup>a</sup>	99.6 ± 0.6 <sup>a</sup>
sx-1b	101.1 ± 1.0 <sup>a</sup>	97.8 ± 1.6 <sup>a</sup>	97.6 ± 2.7 <sup>a</sup>	97.5 ± 2.1 <sup>a</sup>	97.5 ± 1.5 <sup>a</sup>
sd-2gf	100.2 ± 0.8 <sup>a</sup>	99.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	99.5 ± 2.1 <sup>a</sup>	99.1 ± 1.2 <sup>a</sup>	99.2 ± 2.3 <sup>a</sup>
hb-1b	100.7 ± 2.0 <sup>a</sup>	99.9 ± 0.2 <sup>a</sup>	99.3 ± 5.9 <sup>a</sup>	99.0 ± 0.9 <sup>a</sup>	99.4 ± 0.8 <sup>a</sup>
sd-1b	99.7 ± 0.9 <sup>a</sup>	100.2 ± 1.0 <sup>a</sup>	98.7 ± 2.6 <sup>a</sup>	98.2 ± 1.8 <sup>a</sup>	99.0 ± 1.2 <sup>a</sup>
hb-1c	100.0 ± 0.4 <sup>a</sup>	99.7 ± 0.5 <sup>a</sup>	98.7 ± 1.3 <sup>a</sup>	98.5 ± 2.6 <sup>a</sup>	98.7 ± 2.2 <sup>a</sup>
sd-2ji	100.0 ± 0.7 <sup>a</sup>	99.8 ± 0.2 <sup>a</sup>	100.0 ± 5.7 <sup>a</sup>	99.6 ± 0.7 <sup>a</sup>	99.7 ± 0.4 <sup>a</sup>
sd-1f	100.3 ± 0.5 <sup>a</sup>	100 ± 0.9 <sup>a</sup>	99.0 ± 1.9 <sup>a</sup>	99.4 ± 1.4 <sup>a</sup>	99.3 ± 0.9 <sup>a</sup>
31-dh	99.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	100.6 ± 1.8 <sup>a</sup>	99.1 ± 4.6 <sup>a</sup>	98.9 ± 3.1 <sup>a</sup>	99.2 ± 2.8 <sup>a</sup>
sd-2b	100.0 ± 0.7 <sup>a</sup>	100.2 ± 1.4 <sup>a</sup>	99.5 ± 2.4 <sup>a</sup>	99.2 ± 0.8 <sup>a</sup>	99.3 ± 1.7 <sup>a</sup>
sd-1e	99.9 ± 0.3 <sup>a</sup>	99.9 ± 1.0 <sup>a</sup>	99.2 ± 1.4 <sup>a</sup>	99.3 ± 0.6 <sup>a</sup>	99.3 ± 1.2 <sup>a</sup>
sd-2e	100.4 ± 1.1 <sup>a</sup>	99.9 ± 0.2 <sup>a</sup>	99.4 ± 1.8 <sup>a</sup>	99.2 ± 1.4 <sup>a</sup>	99.1 ± 3.0 <sup>a</sup>
sd-1d	99.9 ± 0.9 <sup>a</sup>	99.9 ± 1.3 <sup>a</sup>	99.6 ± 2.6 <sup>a</sup>	99.7 ± 0.9 <sup>a</sup>	99.6 ± 1.7 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> statistically different significance ( $p < 0.05$ )

3 讨论

微生物体积小,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<sup>[8]</sup>。目前,已成功采用液氮超低温保存法对多种微生物进行了长期保存,如藻类<sup>[9-10]</sup>、原生动物<sup>[11]</sup>、酵母菌<sup>[12-13]</sup>、乳酸菌<sup>[14-16]</sup>、铁细菌、硫细菌<sup>[17]</sup>等。

本论文首次对酒酒球菌液氮超低温保存条件及保存活率进行了研究,建立了酒酒球菌液氮超低温的优化保存条件。菌体生长时间、冷冻方法、解冻温度、菌密度以及保护剂是影响酒酒球菌液氮超低温保存冷冻存活率的关键要素。对数期、稳定期后

心收集,以酵母浸提物: 20(g/L),甘油: 40(V/V),蔗糖: 20(g/L),谷氨酸钠: 30(g/L)复合物作为保护剂与菌体混合,调整菌密度为 10<sup>9</sup>CFU/mL,直接投入到液氮中保存。解冻时,从液氮中取出菌种后迅速在 37℃ 水浴解冻。由表 9 可知,保存 24h 时,23 株酒酒球菌的细胞存活率均达到了 99% 以上。随着保存时间的增长,23 株酒酒球菌的细胞存活率变化不大。6 个月后,SX-1b 的细胞存活率最低,也达到了 97.5%。

期的冷冻存活率分别为 66.6% 和 25.0%,而稳定期前期的冷冻存活率大幅度提高,达到了 73.3%。在稳定期前期,存在一些死亡的菌体,细胞裂解释放出来大量的含氮物被存活的菌体利用,从而使存活的菌体可以生长并且获得抵抗低温的能力<sup>[18]</sup>。而在稳定期末期,虽然大量的死亡细胞可提供充分的营养物质,但是活细胞本身的活力降低。细胞冷冻存活率与冷冻速率密切相关<sup>[19-20]</sup>,一步冷冻法比两步冷冻法的冷冻效果更佳,存活率提高了 17.4%。Mazur<sup>[21]</sup>认为冷冻损伤由两个独立的因素造成:一是溶液损伤,二是胞内冰的形成。如果冷却速率很慢,则细胞在高浓度的溶液中暴露时间过长,胞外渗透压增大,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,引起细胞内原生质、细胞

器的变化和膜脂相变;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,刺透细胞膜,对细胞产生致命伤害<sup>[19-21]</sup>。在两因素的综合作用下,存在某一最佳冷却速率,对应于低温保存的最佳存活率。由此可见,一步冷冻法的冷却速率更接近于最佳冷却速率。与冷冻方法相比,解冻方法比较固定,大多数是将从液氮罐中取出的冷冻材料立即放置在 37℃ 左右的温水浴中快速解冻,直到内部结冰全部融解为止。超速冷冻时细胞内溶质成玻璃化状态,慢速解冻使胞内水发生再结晶,由此产生的力学效应对细胞及胞内细胞器有致命的伤害。快速解冻则可以避免再结晶的产生,使细胞存活率提高<sup>[22]</sup>。关于菌密度对冷冻存活率影响的研究较少,本研究发现酒酒球菌密度为  $10^9$  CFU/mL 时存活率最高,密度过高或过低都不利于冷冻保存。菌密度过高时,可能由于细胞不能完全被保护剂覆盖而使存活率降低。除了菌体生长时间、冷冻方法、解冻温度、菌密度以外,适宜的保护剂是保持较高的细胞冷冻存活率的必要条件。使用 20g/L 酵母浸提物,40V/V 甘油,20g/L 蔗糖,30g/L 谷氨酸钠复合保护剂对酒酒球菌液氮冷冻的保护效果最佳。甘油和谷氨酸钠可进入细胞发生水合作用,使溶液的粘性增加,从而弱化了水的结晶过程,达到保护的目;蔗糖能溶于水,但不能进入细胞,它使溶液成过冷状态,即可在特定温度下降低溶质浓度,从而起到保护作用<sup>[23]</sup>;而二甲基亚砜、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<sup>[24]</sup>。

采用优化的液氮超低温保存方法对酒酒球菌进行了保存。6 个月后,其中 21 株酒酒球菌的存活率高于 99%,另外两株菌体的细胞存活率也在 95% 以上,而使用真空冷冻干燥法保存酒酒球菌 SD-2a 6 个月后的细胞存活率只有 50%<sup>[25]</sup>。初步研究证明,液氮超低温保存可用于酒酒球菌的长期保藏。但还需要对保存活化后的酒酒球菌苹果酸乳酸酶、ATPase 活性以、酿酒特性等生理生化特性,遗传性状以及保存 10 年、20 年甚至更长时间后的细胞存活率进行检测。

**致谢** 在研究过程中得到西北农林科技大学园艺学院王乔春老师的悉心指导,他科学态度严肃、治学精

神严谨、工作作风精益求精。在此谨向王老师致以诚挚的谢意和崇高的敬意!

## 参考文献

- [1] 李华. 葡萄酒工艺学. 北京:科学出版社, 2007.
- [2] 顾金刚, 李世贵, 姜瑞波. 真菌保藏技术研究进展. 菌物学报(*Mycosystema*), 2007, 26(2): 316-320.
- [3] 许丽娟, 刘红, 魏小武. 微生物菌种的保藏方法. 现代农业科技(*Modern Agriculture Science and Technology*), 2008, 16: 99-101.
- [4] 张子林, 阮仕立, 任亚梅. 葡萄酒酿酒菌种的保藏方法. 中外葡萄与葡萄酒(*Sino-overseas Grapevine Wine*), 2001, 6: 16-18.
- [5] 沈萍. 微生物学. 北京:高等教育出版社, 2000. 19.
- [6] 李钟庆. 微生物菌种保藏技术. 北京:科学出版社, 1989, 44.
- [7] Tsutsaeva AA, Ana' nina AE, Balyberdina LM, Stepanyuk LV, Pavlenko NV. Long-term storage of industrial microbial strains. *Microbiology*, 2008, 77(5): 621-624.
- [8] 李广武, 郑从义, 唐兵. 低温生物学. 长沙:湖南科学技术出版社, 1998. 127.
- [9] Santiago-Vázquez LZ, Newberger NC, Kerr RG. Cryopreservation of the dinoXagellate symbiont of the octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Marine Biology*, 2007, 152(3): 549-556.
- [10] Piasecki BP, Diller KR, Brand JJ. Cryopreservation of *Chlamydomonas reinhardtii*: A cause of low viability at high cell density. *Cryobiology*, 2009, 58(1): 103-109.
- [11] Abdel-Aziz HM, Hassan HY, Abd-El-Raof YM, Hala AA Abou-Zeina, Galbt SA. Trials for cryopreservation of rumen protozoa in sheep. *Global Veterinaria*, 2007, 1(1): 9-16.
- [12] Hubálek Z, Kocková-Kratochvílová A. Liquid nitrogen storage of yeast cultures I. Survival, and literature review of the preservation of fungi at ultralow temperatures. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1978, 44(2): 229-241.
- [13] 贾建华. 液氮超低温冻结保藏酵母菌十年的检测报告. 微生物学通报(*Weishengwuxue Tongbao*), 1998, 25(2): 65-68.
- [14] Terezia SC, Vlaic A, Coşier V, Adriana C. Assessment of cryopreservation systems influence on the survival of *E. coli* recombinant strains. *Lucrări Stiinţifice Zootehnie şi Biotehnologii*, 2008, 41(1): 138-142.
- [15] Cowman EA, Speck ML. Ultra-Low temperature Storage of Lactic Streptococci. *Journal of Dairy Science*, 1965, 48(11): 1531-1532.

- [16] Johannsen E. Malt extract as protective medium for lactic acid bacteria in cryopreservation. *Journal of Applied Bacteriology*, 1972, 35(3): 423-429.
- [17] Wu XL, Xin XH, Jiang Y, Liang RX, Yuan P, Fang CX. Liquid-nitrogen cryopreservation of three kinds of autotrophic bioleaching bacteria. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 2008, 18: 1386-1391.
- [18] Lee K. Cold shock response in *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis*: a comparison of the protection generated by brief pre-treatment at less severe temperatures. *Process Biochemistry*, 2004, 39: 2233 - 2239.
- [19] Frédéric D, Pierre-André M, Patrick G. Involvement of two specific causes of cell mortality in freeze-thaw cycles with freezing to -196°C *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(2): 1330-1335.
- [20] Frédéric D, Pierre-André M, Patrick G. Influence of cooling rate on *Saccharomyces cerevisiae* destruction during freezing: unexpected viability at ultra-rapid cooling rates. *Cryobiology*, 2003, 46: 33-42.
- [21] Mazur P, Leibo S P, Chu E H Y. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Experimental Cell Research*, 1972, 71(2): 345-355.
- [22] Shinsuke S, Peter M. Effect of Warming Rate on the Survival of Vitified Mouse Oocytes and on the Recrystallization of Intracellular Ice. *Biology of reproduction*, 2008, 79: 727-737.
- [23] 蒲丽丽, 刘宁, 张英华, 霍贵成. 乳酸菌冻干保护剂及保护机理的研究进展. 现代食品科技 (*Modern Food Science and Technology*), 2005, 21(1): 147-150.
- [24] Fonseca F, Marin M, Morris GJ. Stabilization of frozen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in glycerol suspensions: freezing kinetics and storage temperature effects. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(10): 6474-6482.
- [25] 罗华. 真空冷冻干燥酒球菌 (*Oenococcus oeni*) SD-2a 工艺研究. 西北农林科技大学博士论文, 2007.

## Storage of *Oenococcus oeni* in liquid nitrogen

Liye Du<sup>1,2</sup>, Hua Wang<sup>1,2\*</sup>, Gang Jin<sup>1,2</sup>, Cuixia Li<sup>3</sup>, Hua Li<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> College of Enology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

<sup>2</sup> Shaanxi Engineering Research Center for Viti-Viniculture, Yangling 712100, China

<sup>3</sup> College of Life Science, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

**Abstract:** [ **Objective** ] To develop cryopreservation for *Oenococcus oeni*. [ **Methods** ] We investigated the influence of the age and concentration of the strain in the protective medium, rate of freezing, temperature of thawing and the protective medium on the number of viable cells after cryopreservation by colony counting. [ **Results** ] We got the highest number of viable cells after cryopreservation by collecting cells in the early stationary growth phase, keeping their concentration in the protective medium at 10<sup>9</sup> CFU/mL, transferring cells into liquid nitrogen directly and thawing in a water bath at 37°C. The ratio of viable cells was above 99% for 21 of the *Oenococcus oeni* after storing in liquid nitrogen for 6 months. [ **Conclusion** ] We The storage of *Oenococcus oeni* in liquid nitrogen is convenient for strains preserved in culture collections.

**Keywords:** *Oenococcus oeni*, liquid nitrogen cryopreservation, viable cells after cryopreservation

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Program of Ministry of Agriculture "948" (2009-Z29)

\* Corresponding authors. Tel/Fax: +86-29-87091099, E-mail: wanghuawine@nwsuaf.edu.cn; Tel/Fax: +86-29-87092107, E-mail: lihuawine@nwsuaf.edu.cn

Received: 2 March 2011/ Revised: 11 May 2011