

张阳阳,吴正钧,刘景,等.嗜冷菌的嗜冷机制及其对乳品质量影响研究进展[J].江苏农业科学,2014,42(2):12-14.

嗜冷菌的嗜冷机制及其对乳品质量影响研究进展

张阳阳^{1,2}, 吴正钧¹, 刘景¹, 王渊龙¹, 任婧¹

(1. 乳业生物技术国家重点实验室/光明乳业股份有限公司技术中心, 上海 200436; 2. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

摘要:从嗜冷菌细胞膜流动性、产冷休克蛋白、冷适应酶 3 个方面详细阐述了嗜冷菌的嗜冷机制,并介绍了乳制品中嗜冷菌的种类及其对乳品质量的影响。

关键词:嗜冷菌;嗜冷机制;乳制品;水解酶

中图分类号: TS201.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)02-0012-03

嗜冷微生物(psychrophilic microorganism)广泛分布在极地、高山、冰川、深海、冻土、冷库等低温环境中。1887年,Forster首次发现了在低温下生长的微生物,这种微生物能够在冰点温度下生长繁殖。此后,科学家从自然界生物中陆续分离出了不同种类的嗜冷微生物。Morita根据嗜冷微生物各自不同的生长温度将它们细分为2类,将最高生长温度不超过20℃、15℃以下生长旺盛、能够在0℃生长繁殖的微生物定义为专性嗜冷菌(psychrotrophile),从极端低温环境中分离出的嗜冷菌通常为专性嗜冷菌;将在低于5℃下能够生长,最高生长温度在20℃以上的嗜冷微生物定义为兼性嗜冷菌(psychrotroph),食品中的腐败菌大部分为兼性嗜冷菌^[1],这种分类方法已被生物界广泛认可。目前,已有不少关于嗜冷菌检测研究,但从分子水平对嗜冷菌嗜冷机制研究较为少见。本研究从细胞表层结构、冷休克蛋白、酶3个方面系统阐述近年来国内外嗜冷菌嗜冷机制的研究进展,并讨论嗜冷菌对乳品质量的影响。

收稿日期:2013-06-10

基金项目:国家“973”计划(编号:2012CB723706);国家科技支撑计划(编号:2012BAD12B08)。

作者简介:张阳阳(1989—),女,江苏无锡人,硕士研究生,研究方向为微生物学与分子生物学。E-mail:zhyy_1018@sina.com。

通信作者:任婧,高级工程师,研究方向为乳酸菌分子生物学。E-mail:renjing@brightdairy.com。

1 嗜冷菌的嗜冷机制

1.1 细胞表层结构

微生物在低温条件下能否生长,取决于其细胞在低温条件下能否转运外源营养物质进入细胞参与一系列反应。细胞膜的作用就是参与细胞内外的物质交换,它通过膜上的镶嵌蛋白来吸收外部营养、交换电子、传输信号,从而保证细胞内正常的生化反应。镶嵌蛋白的功能与膜的流动性息息相关,细胞膜的流动性以及相结构又是由膜脂组成决定的。因此在嗜冷菌众多适应低温环境的机制中,最为重要的一个就是调节膜脂的组成。当温度改变时,微生物需要调节其细胞膜脂类的组成,保证其胞膜的流动性,来适应环境温度的变化。有学者通过对嗜冷菌 *P. arcticus strain 273-4* 的基因组进行测序,发现了有关脂肪酸合成的基因、控制链长的基因,表明不饱和脂肪酸的生成是 *P. arcticus strain 273-4* 在低温下生存的一个重要原因。Diaz等发现,处于低温环境下的枯草芽孢杆菌能利用脂肪酸去饱和酶将胞膜中的饱和脂肪酸转变成不饱和脂肪酸,改变了支链脂肪酸的含量,同时,枯草芽孢杆菌的胞膜流动性也随之增长^[2]。此外,同分异构的脂肪酸也会影响胞膜的流动性。与相应的反式支链脂肪酸比较而言,反式支链脂肪酸在增加膜流动性方面的作用更为明显^[3]。因此,类似枯草芽孢杆菌这样的革兰氏阴性菌在受到低温刺激时,能够通过增加膜脂组分中的不饱和脂肪酸、反式脂肪酸

[53] Chao H, Bautista DL, Litowski J, et al. Use of a heterodimeric coiled-coil system for biosensor application and affinity purification [J]. *Journal of Chromatography B*, 1998, 715(1): 307-329.

[54] de Crescenzo G, Pham P L, Durocher Y, et al. Transforming growth factor-beta(TGF-beta) binding to the extracellular domain of the type II TGF-beta receptor: receptor capture on a biosensor surface using a new coiled-coil capture system demonstrates that avidity contributes significantly to high affinity binding [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2003, 328: 1173-1183.

[55] Pechar M, Pola R, Laga R, et al. Coiled coil peptides as universal linkers for the attachment of recombinant proteins to polymer therapeutics [J]. *Biomacromolecules*, 2011, 12(10): 3645-3655.

[56] Pola R, Laga R, Ulbrich K, et al. Polymer therapeutics with a coiled coil motif targeted against murine bcl1 leukemia [J]. *Biomacromolecules*, 2013, 14(3): 881-889.

[57] Larzábal M, Zotta E, Ibarra C, et al. Effect of coiled-coil peptides on the function of the type III secretion system-dependent activity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and *Citrobacter rodentium* [J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2013, 303(1): 9-15.

[58] Kilgore NR, Salzwedel K, Reddick M, et al. Direct evidence that C-peptide inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 entry bind to the gp41 N-helical domain in receptor-activated viral envelope [J]. *Journal of Virology*, 2003, 77(13): 7669-7672.

[59] Zeng X G, Zhou H M. Designing stable antiparallel coiled coil dimers [J]. *Tsinghua Science and Technology*, 2001, 6: 253-256.

[60] McFarlane A A, Orriss G L, Stetefeld J. The use of coiled-coil proteins in drug delivery systems [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2009, 625(1/2/3): 101-107.

的量来维持、修复胞膜的流动性。蓝藻细菌在寒冷环境下,能够通过消耗单不饱和脂肪酸来增加多元不饱和脂肪酸的量,从而保证了细胞在低温下的正常生长,这说明膜脂中的多元不饱和脂肪酸、脂肪酸脱饱和酶对于蓝藻细菌适应低温环境是很必要的^[4]。嗜冷菌 *Pseudomonas syringae* Lz4W 在 28 °C 下测得的饱和脂肪酸、反式结构的单一不饱和脂肪酸的量与 5 °C 时所测的量相比有一定增加^[5]。此外,嗜冷菌也能够通过调节膜上极性头、类胡萝卜素类型、脂肪酸链长度、正式反式脂肪酸的比例来对其细胞膜流动性进行调节^[6]。例如, Jagannadham 等在对嗜冷菌 *Sphingobacterium antarcticus* MTCC 675 的研究中发现,细胞在 5 °C 下生长时,其不饱和脂肪酸、支链脂肪酸含量有所增加,这引起了胞膜流动性的增加。同时,胞膜堆积的极性类胡萝卜素能够促进膜稳定并能够克服脂肪酸的液化作用,嗜冷菌在 5 °C 时能够合成大量极性类胡萝卜素,这些色素很有可能根据温度的改变来稳定膜的流动性^[7]。近年来一些研究结果表明,上述机制并不全部有效。Suutari 等研究发现,极性头的改变在调整膜流动性上并没有太大效果^[8]。Denich 等认为,脂肪链长度的改变可能只会影响细胞的生长^[9]。Epanand 研究发现,蛋白质虽然能和脂肪相互作用从而影响膜流动稳定性,但这个互相作用的过程依然要依赖膜流动性与厚度^[10]。脂肪酸的异构化、饱和度变化是低温下影响膜流动性的主要因素。

1.2 冷休克蛋白和抗冻蛋白的合成

Jones 等在培养大肠杆菌时发现,当培养温度急剧下降时,细胞会产生冷休克反应^[11]。这种反应能使一些蛋白质顺势表达从而使细菌适应生长。这种蛋白质被称为冷休克蛋白 CSPs (cold-shock protein)。这种蛋白质参与了细胞的很多生理活动,如转录、翻译、蛋白折叠等^[12]。冷休克蛋白包括核酸分子伴侣、RNA 解旋酶、拓扑异构酶、促旋酶亚基 A、H-NS^[13]。尽管嗜冷菌中冷激蛋白作用机制研究仍处于初步阶段,但是与其相似的嗜中温细菌冷休克蛋白作用机制已经被发现。冷休克蛋白的诱导生成数量及种类与温度变化的剧烈程度密切相关,温度变动越大,产生的冷休克蛋白越多。学者普遍认为,低温微生物面对低温环境时,冷休克蛋白可作为 RNA 的分子伴侣与 mRNA 结合,在低温条件下稳定 mRNA 并促进翻译,从而使低温微生物适应低温生长^[14]。但是,常温菌、嗜冷菌对冷刺激的反应是有差异的。常温菌中发现的很多冷休克蛋白的作用相当于嗜冷菌中的冷适应蛋白,在低温下能够持续表达而不是短暂的作用,因此,关于嗜冷菌冷休克蛋白的作用机制仍有待进一步研究。抗冻蛋白 AFPs (antifreeze proteins) 是具有提高生物抗冻能力的蛋白质类化合物的总称。Yamashita 首次在南极地区的细菌中发现了 AFPs 的存在。在耐低温生物中,AFPs 能与冰晶相结合,可以遏制体液内冰核的形成与生长,维持体液的非冰冻状态。近年来,科学家们对嗜冷细菌中的 AFPs 与低温适应性间的关系进行了研究。研究人员在南极湖泊中的 *Marinomonas primoryensis* 中发现了 AFPs 的存在,这种 AFPs 依赖 Ca²⁺,使得 *Marinomonas primoryensis* 在南极冰湖中免受低温的影响。

1.3 嗜冷菌产生的酶

生物的生命活动需要酶的参与,酶能够催化细胞内上百个化学反应,对生物体维持生命活动极为重要,因此嗜冷菌在

低温下生长需要在寒冷环境中具有活性的酶。嗜冷菌细胞内产生的具有冷适应性的酶被称为嗜冷酶或者冷活性酶 (cold adapted enzyme)。1975 年, Morita 最早报道了海产弧菌中分离出的苹果酸脱氢酶,这种酶在 15 ~ 20 °C 具有活性,超过 20 °C 会很快失去活性^[1]。近年来,一些其他种类的冷活性酶陆续被发现,包括 α -淀粉酶、 β -半乳糖苷酶等^[15]。低温酶分子结构一般柔性较高,在低温条件下更容易展开,这就为一些冷适应酶的高活性提供了合理的解释^[16]。有学者从嗜冷菌、常温菌中分离出冷活性酶,比较这 2 种酶的氨基酸组成发现,酶适应低温的条件包括较少的脯氨酸或精氨酸残基量等^[17]。此外, Brenchley 等发现, 1 株嗜冷菌产生的 β -半乳糖苷酶同工酶具有不同的最适温度,因此,产生不同类型的同工酶可能也是嗜冷微生物适应低温的方式之一^[18]。低温菌产生的蛋白酶活化能、最适酶活温度都较低,可以在较低的温度下催化体内生理生化反应。0 ~ 30 °C 条件下,嗜冷菌的酶催化速度常数、生理效率相对中温微生物的酶来说高出很多,这样,由于低温引起的细胞生化反应速率降低就能通过酶的高催化率得到弥补,从而保证细胞在低温下维持正常的生长过程^[19]。这些酶的应用前景对于生物工业来说是很可观的,例如在清洁剂、食品工业、精细化学、生物修复领域都有一定的发展潜力^[20]。

2 嗜冷菌对牛乳质量的影响

由于嗜冷菌的生长繁殖不受低温环境的限制,广泛分布在各种各样的环境中,从而能够通过各种途径进入食品中,危害食品质量。

2.1 牛乳中的嗜冷菌

牛乳中的嗜冷菌几乎覆盖了牛乳中常见的所有类群细菌,主要包括:假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、无色杆菌属 (*Achromobacter*)、气单胞菌属 (*Aeromonas*)、沙雷氏菌属 (*Serratia*)、产碱杆菌属 (*Alcaligenes*)、色杆菌属 (*Chromobacterium*)、黄杆菌属 (*Flavobacterium*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、梭菌属 (*Clostridium*)、棒状杆菌属 (*Corynebacterium*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、微球菌属 (*Microbacterium*),其中假单胞菌属占主导地位^[21-22]。

2.2 嗜冷菌对牛乳质量的影响

大多数嗜冷菌能产生耐热水解酶,这些水解酶能破坏牛乳的主要成分,这些酶在常规热处理后还能够保持 30% ~ 100% 的活性。这些水解耐热酶主要来自于假单胞菌属、芽孢杆菌属。嗜冷菌分泌的蛋白酶能够水解酪蛋白,促使牛乳形成凝胶结构,从而使其在储藏过程中凝固变质。此外,蛋白水解对牛乳产品的风味会产生不利影响,例如苦味、异味、果味、酵母味^[23]。嗜冷菌分泌的脂肪酶水解牛乳脂肪过程中,一些游离脂肪酸被释放出来,这些脂肪酸是造成牛乳制品腐臭、异味、碱味的主要原因。这种脂肪水解产生的风味缺陷在牛乳及其他一些乳制品如奶油、黄油、干酪中体现尤为明显^[24]。卵磷脂醇素及其他磷脂酶能够破坏脂肪球膜,使得牛乳中的脂肪被释放出来,被体系中原本存在的脂肪酶分解,导致牛乳乳化变质。嗜冷菌分泌的脂肪酶分子量为 30 ~ 50 ku,最适 pH 值为 7 ~ 9^[25]。近年来,关于嗜冷菌产生的耐热酶及其对牛乳质量的影响研究已经有很多,但关于这些耐热酶的合成

机制,目前尚没有完整明确的解释。因而,从酶机制方面来解决牛乳质量问题仍有一定难度。

2.3 控制方法

嗜冷菌在低温下仍能够快速生长的特性导致这些腐败菌在牛乳中广泛存在,即使是最严苛的加工条件,也无法完全避免牛乳中嗜冷菌造成的污染。Kumarsan 等研究了牛乳在不同储藏温度下的腐败程度,结果表明,采用 2℃ 作为牛乳的储藏温度来代替传统的 4~6℃ 储藏温度能有效减缓嗜冷菌的生长速度,同时也能够降低嗜冷菌分泌的蛋白酶、脂肪酶活性^[26]。但是,这种通过低温降低嗜冷菌生长速度的处理方法有一定的局限性,热处理对嗜冷菌也有一定的抑制作用,Champagne 等发现,巴氏杀菌前若将原料乳在 65~69℃ 下处理 15 s,能够使革兰氏阴性嗜冷菌数量减少 77%~79%,但是,这种预处理方式对产芽孢的革兰氏阳性嗜冷菌没有作用^[27]。此外,乳品工业生产中的灌装设备是最常见的嗜冷菌污染来源,因此,对灌装设备进行卫生控制是保证乳品质量的重要手段。Eneroth 曾提出假设,即产芽孢的革兰氏阳性嗜冷菌能够存在于生产过程中的死角、工厂设备表面的生物膜上,它造成的产品污染存在于整个牛乳加工过程中。这种产芽孢菌相构成非常复杂,很难将它们从牛乳中分离出并定义其生长特性。在这层意义上,若将牛乳冷藏、高温热处理、离心除菌相结合,并使用容易清洁的乳品工业生产设备,能够有效减少嗜冷菌对产品的污染。无论是革兰氏阳性嗜冷菌还是革兰氏阴性嗜冷菌,在生产过程中应用 HACCP 或者其他相似的质量控制系统来控制产品的质量仍然是最有效的措施,但是,根据乳制品的不同种类,采用特异的控制措施也是必要的。

3 结论

近年来,由于生物化学、分子生物学技术的发展,学者们对嗜冷菌嗜冷机制有了更深入的研究。目前的研究还不能明确阐述嗜冷菌内部化学结构与冷适应之间的关系,这些都将是今后的研究热点。对于食品工业中具有危害性的嗜冷菌,目前关于其产生的耐热酶研究已经很多,需要在基因、分子水平上对乳品中嗜冷菌的嗜冷机制进行深入研究,从根本上减轻嗜冷菌的危害。

参考文献:

[1] Morita R Y. Psychrophilic bacteria [J]. Bacteriological Reviews, 1975, 39: 144 - 167.

[2] Diaz A R, Mansilla M C, Vila A J, et al. Membrane topology of the acyl - lipid desaturase from *Bacillus subtilis* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(50): 48099 - 48106.

[3] Kaneda T. Iso - and anteiso - fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance [J]. Microbiological Reviews, 1991, 55(2): 288 - 302.

[4] Nishida I, Murata N. Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: the crucial contribution of membrane lipids [J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1996, 47: 541 - 568.

[5] Kiran M D, Annapoorani S, Suzuki I, et al. Cis - trans isomerase gene in psychrophilic *Pseudomonas syringae* is constitutively expressed during growth and under conditions of temperature and solvent stress [J]. Extremophiles, 2005, 9(2): 117 - 125.

[6] Chintalapati S, Kiran M D, Shivaji S. Role of membrane lipid fatty

acids in cold adaption [J]. Cellular and Molecular Biology, 2004, 50(5): 631 - 642.

[7] Jagannadham M V, Chattopadhyay M K, Subbalakshmi C, et al. Carotenoids of an Antarctic psychrotolerant bacterium, *Sphingobacterium antarcticus*, and a mesophilic bacterium, *Sphingobacterium multivorum* [J]. Archives of Microbiology, 2000, 173(5/6): 418 - 424.

[8] Suutari M, Laakso S. Microbial fatty acids and thermal adaption [J]. Critical Reviews in Microbiology, 1994, 20(4): 285 - 328.

[9] Denich T J, Beaudette L A, Lee H, et al. Effect of selected environmental and physico - chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes [J]. Journal of Microbiological Methods, 2003, 52(2): 149 - 182.

[10] Epanand R M. Lipid polymorphism and protein - lipid interactions [J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1376(3): 353 - 368.

[11] Jones P G, Inouye M. The cold - shock response—a hot topic [J]. Molecular Microbiology, 1994, 11(5): 811 - 818.

[12] Phadtare S. Recent developments in bacterial cold - shock response [J]. Current Issues in Molecular Biology, 2004, 6(2): 125 - 136.

[13] Eriksson S, Hurme R, Rhen M. Low - temperature sensors in bacteria [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2002, 357(1423): 887 - 893.

[14] Margesin R, Schinner F. Properties of cold - adapted microorganisms and their potential role in biotechnology [J]. Journal of Biotechnology, 1994, 33(1): 1 - 14.

[15] Groudieva T, Kambourova M, Yusef H, et al. Diversity and cold - active hydrolytic enzymes of culturable bacteria associated with Arctic sea ice, Spitzbergen [J]. Extremophiles, 2004, 8(6): 475 - 488.

[16] 唐 赟. 嗜冷菌适应低温的分子机制及其应用 [J]. 西华师范大学学报: 自然科学版, 2004, 25(4): 388 - 393.

[17] D'amico S, Claverie P, Collins T, et al. Molecular basis of cold adaptation [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2002, 357(1423): 917 - 925.

[18] 李 晶, 王继华, 崔 迪, 等. 嗜冷菌适冷代谢机制的研究 [J]. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 2007, 23(5): 88 - 91.

[19] 陈秀兰, 张玉忠, 高培基. 低温蛋白酶的研究进展与应用前景 [J]. 工业微生物, 2001, 31(1): 52 - 53, 57.

[20] Gerday C, Aittaleb M, Bentahir M, et al. Cold - adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology [J]. Trends in Biotechnology, 2000, 18(3): 103 - 107.

[21] Sørhaug T, Stepaniak L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects [J]. Trends in Food Science & Technology, 1999, 8(2): 35 - 41.

[22] Samagh B S, Cunningham J D. Numerical taxonomy of the genus *Pseudomonas* from milk and milk products [J]. Journal of Dairy Science, 1971, 55(1): 19 - 24.

[23] Ren T J, Frank J F, Christen G L. Characterization of lipase of *Pseudomonas fluorescens* 27 based on fatty acid profiles [J]. Journal of Dairy Science, 1988, 71(6): 1432 - 1438.

[24] Stead D. Microbial lipases: their characteristics, role in food spoilage and industrial uses [J]. Journal of Dairy Research, 1986, 53(3): 481 - 505.

[25] Chen L, Daniel R M, Coolbear T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders [J]. International Dairy Journal, 2003, 13(4): 255 - 275.

[26] Kumarsan G, Annalvilli R, Sivakumar K, et al. Psychrotrophic spoilage of raw milk at different temperatures of spoilage [J]. Journal of Applied Science Research, 2007, 3(11): 1383 - 1387.

[27] Champagne C P, Laing R R, Roy D, et al. Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1994, 34(1): 1 - 30.