

真空冷冻干燥提高乳酸菌存活率及延长贮藏期的研究进展

刘开文¹, 马雯^{1,2}, 金刚^{1,2,*}

(1.宁夏大学葡萄酒与园艺学院, 宁夏 银川 750021; 2.宁夏葡萄与葡萄酒研究院, 宁夏 银川 750021)

摘要: 真空冷冻干燥过程中的诸多因素均会影响乳酸菌的存活率及贮藏时间, 优化冻干工艺和贮藏条件是提高乳酸菌存活率及延长贮藏期的有效方法。本文介绍了真空冷冻干燥过程中影响乳酸菌存活率的因素, 并探讨了如何优化冻干工艺及贮藏条件以提高其存活率及延长贮藏期, 旨在为制备活性高且耐贮藏乳酸菌冻干制剂提供依据与参考。

关键词: 乳酸菌; 真空冷冻干燥; 冻干保护剂; 封装材料; 存活率

Research Progress on Improving the Survival Rate and Extending the Storage Period of Lactic Acid Bacteria through Vacuum Freeze-Drying

LIU Kaiwen¹, MA Wen^{1,2}, JIN Gang^{1,2,*}

(1. College of Enology and Horticulture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China;

2. Grape and Wine Research Institute, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: The survival rate and storage period of lactic acid bacteria (LAB) are affected by numerous factors in the vacuum freeze-drying process. Hence, optimizing the freeze-drying process and storage conditions is an effective method to improve the survival rate and prolong the storage period of LAB. This paper reviews the factors that influence the survival rate of LAB during the vacuum freeze-drying process and explores how to optimize the freeze-drying process and storage conditions to improve the survival rate and extend the storage period of LAB. We expect that this review will provide a basis and reference for the preparation of lyophilized LAB formulations with high activity and good storage stability.

Keywords: lactic acid bacteria; vacuum freeze-drying; freeze-drying protective agents; encapsulation materials; survival rate
DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230801-002

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 02-0325-09

引文格式:

刘开文, 马雯, 金刚. 真空冷冻干燥提高乳酸菌存活率及延长贮藏期的研究进展[J]. 食品科学, 2024, 45(2): 325-333.
DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230801-002. <http://www.spkx.net.cn>

LIU Kaiwen, MA Wen, JIN Gang. Research progress on improving the survival rate and extending the storage period of lactic acid bacteria through vacuum freeze-drying[J]. Food Science, 2024, 45(2): 325-333. (in Chinese with English abstract)
DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230801-002. <http://www.spkx.net.cn>

乳酸菌真空冷冻干燥简称冻干, 是指将乳酸菌细胞悬液置于冰点以下的温度进行预冻, 利用真空环境下冰晶低温升华去除水分, 进而以冻干粉形式保存的技术。冻干可使菌体保持原有生化特性及活性^[1]。但冻干过程也会造成乳酸菌的活性降低, 甚至死亡^[2]。

保持较高的存活率是乳酸菌冻干粉充分发挥其功能的重要保障^[3], 为了探究冻干过程中致使乳酸

菌菌粉失活的机制, 国内外学者进行了大量的研究, 发现真空冷冻干燥后乳酸菌存活率降低的原因主要有以下几个方面: 冻干过程造成的细胞膜通透性增加^[4]、膜流动性降低^[5]、酶及蛋白质类物质变性^[6]、遗传物质改变^[7]等。为进一步提高冻干后乳酸菌存活率及延长贮藏期, 本文就冻干过程中影响乳酸菌存活率的因素及提高其存活率、延长贮藏时间的措

收稿日期: 2023-08-01

基金项目: 宁夏重点研发计划项目 (2023BCF01027)

第一作者简介: 刘开文 (2000—) (ORCID: 0009-0009-7168-9363), 男, 硕士研究生, 研究方向为葡萄与葡萄酒学。

E-mail: 17711868264@163.com

*通信作者简介: 金刚 (1984—) (ORCID: 0000-0002-3012-6451), 男, 副教授, 博士, 研究方向为葡萄与葡萄酒学。

E-mail: jin.gang@nxu.edu.cn

施进行总结,旨在为制备活性高且耐贮藏乳酸菌制剂提供依据与参考。

1 真空冷冻干燥对乳酸菌的影响

真空冷冻干燥分为冷冻和干燥两个阶段,均会导致乳酸菌活力下降甚至死亡。目前,诸多学者对冻干引起的乳酸菌失活机理进行了深入的探讨。冻干过程主要通过以下方面影响乳酸菌的存活率。

1.1 冻干对菌体的物理损伤

在冻干过程中温度的急剧下降导致细胞内水分结晶,损伤细胞膜,进而对乳酸菌菌体产生物理损伤。众多研究表明,冷却速率会极大地影响冰晶的产生,冷却速率过快,容易产生较大的冰晶,从而刺破细胞,导致细胞损伤^[8]。在冻干过程中,存在两个最大的冰晶生成温度带,即 $0\sim-3.7\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $-30\sim-37.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。在上述温度区间内,若物料温度升降缓慢,会产生较多冰晶,更易损伤菌体^[9]。因此,快速通过最大冰晶生成带可以有效减少菌数损失。

1.2 冻干对细胞膜的损伤

细胞膜能隔绝外界环境,是乳酸菌的重要保护屏障^[8],其完整性是冻干成功的关键。

在干燥脱水环节,磷脂双分子层头部基团上的水分子被酰基替换,致使链间的作用力增大,同时磷脂分子的状态也从液晶态向凝胶态转化,使磷脂分子之间产生空隙,细胞膜的通透性增大,引起细胞内物质的泄露,从而降低细胞的活力^[7](图1)。Basholli-Saliu等^[10]比较冷冻干燥和冷冻之后的菌体活性时发现,冷冻干燥后的菌体活性较冷冻后的菌体活性有明显的下降。此外,有研究表明未添加保护剂的菌体相较于添加保护剂的菌体 β -半乳糖苷酶(细胞衰老标志物)活性有明显增大^[11-12],这也进一步说明在冻干过程中细胞膜发生变化,造成物质流失,影响细胞活力。

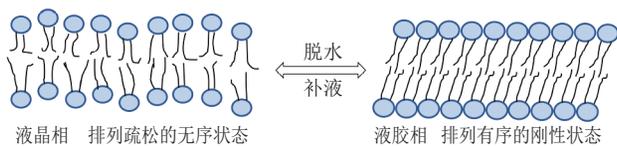


图1 磷脂分子的状态转变

Fig. 1 State transition of a phospholipid molecule

膜的流动性与磷脂分子脂肪酸饱和度及长度密切相关^[13]。增加不饱和脂肪酸的比例可以提高细胞膜对不良环境的抵抗力^[14]。乳酸菌菌体可通过增加胆固醇在细胞膜中的比例、调节饱和/不饱和脂肪酸的比例从而调节外界环境对其造成的影响^[15]。如Zhao Yinsuo等^[16]的研究表明菌体细胞膜的流动性提高与细胞膜中环丙烷脂肪酸

比例的增加有关。Fonseca等^[17]研究表明培养基中加入吐温-80能够增加细胞膜中不饱和脂肪酸的比例,随之改变细胞膜的流动性,降低冻干过程中的菌体死亡率。

1.3 冻干对菌体内外渗透压的损伤(溶质损伤)

由于细胞内外液组成成分不同,故凝固点也不同,即冻干过程中,菌体内外液的冻结时间不同步。胞外液凝固点较内液高,在冷冻过程中更早被冻结、浓缩,为维持细胞内外渗透压平衡,细胞内液向外移动,致使内液溶质浓缩,此现象又称“溶质效应”^[18]。“溶质效应”可使细胞物质代谢紊乱或蛋白失活,甚至造成细胞死亡。

1.4 冻干对酶类及蛋白质的损伤

细胞内酶的活力与菌体的物质交换、能量代谢以及生长速度等密切相关^[19],而冻干会因为脱水引起细胞内酶类及蛋白质失活^[20];细胞失水会破坏蛋白质与水分子、细胞膜之间的相互作用力,从而削弱蛋白质的高级结构,降低酶的活性,进而影响蛋白质的构象,使其失去功能^[4]。故在冻干后细胞中保持一定的水分很关键。

1.5 冻干对遗传物质结构稳定性的损伤

遗传稳定性改变是导致细胞失去活性的主要原因之一。干燥引起的DNA结构变化是导致细胞生理损伤的主要原因^[2]。乳酸菌的遗传物质为DNA双螺旋,常与载体蛋白形成复合体存在。冻干过程中脱水会导致载体蛋白变性,使DNA双螺旋结构稳定性降低。此外,由于失水量的增加,会导致细胞溶质浓度升高,电荷发生改变,削弱DNA中碱基对之间的疏水性,使菌体的双螺旋结构稳定性降低,进而影响其转录、翻译和复制,甚至发生基因变异^[21]。

2 优化冻干保护条件提高乳酸菌存活率

2.1 优化培养基组成提高乳酸菌活菌密度

2.1.1 优化培养基营养能有效提高乳酸菌细胞生理活性

乳酸菌的体外培养与培养基密切相关,培养基是适合微生物生长所需的碳源、微量元素、氮源、水分等各类营养物质组成的混合物^[22]。通过对MRS培养基中各组分的比例进行优化,能够对乳酸菌代谢关键酶(β -半乳糖苷酶、 K^+ -ATP酶等)起到保护作用,从而提高乳酸菌的生理活性^[23]。李娜等^[24]通过优化培养基各成分及比例发现:当培养基为蔗糖43 g/L、玉米浆干粉60 g/L、 Na_2HPO_4 -柠檬酸0.12 mol/L、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.20 g/L、 $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.10 g/L、吐温-80 1 mL/L时,植物乳杆菌ZJ316的活菌数较对照组提高了3.44倍。赵玉鉴等^[25]研究发现,植物乳杆菌C88在优化培养基上的活菌数相比于MRS基础培养基提高了2倍。Choi等^[26]实验结果表明,在优化MRS培养基中,植物乳杆菌200665的生长活

性得到明显增强,相同时间内菌种产生量较对照组提高1.58倍。此外,由于乳酸菌的菌株特异性和多样性,不同种类的乳酸菌对培养基中各种成分的偏爱程度不同,因此,可以根据不同菌株的喜好对培养基进行优化,从而提高菌株的活性。孙瑞胤等^[27]在MRS培养基中加入0.5 mmol/L的Ca²⁺,可以使植物乳杆菌LIP-1的冻干存活率提升21.52%。Chen He等^[28]通过将6种天然分子分别添加到MRS培养基中优化发现,当NaCl、山梨醇二者的质量分数分别为0.6%、0.15%时,对乳杆菌菌株的冻干存活率有显著影响,保加利亚乳杆菌的冻干存活率分别达到了42.7%和45.4%。因此,可以根据不同乳酸菌的特异性,开发出特异性优化培养基,从而增强菌体的生理活性,进而提高菌体的冻干存活率。

2.1.2 促进乳酸菌生物膜的合成从而有效提高菌体抵抗冻干损伤的能力

生物膜是乳酸菌的重要保护屏障,同时也是维持细胞内外物质交换的场所,并具有一定的机械稳定性^[29]。研究表明,细胞膜的形成与培养基中的碳源密切相关,如培养基中缺乏碳源,可使细胞膜形成困难,反之,碳源浓度过高又会抑制细胞膜形成^[30],故合适的碳源浓度有助于菌体细胞膜合成。另外Mn²⁺、Mg²⁺和Fe³⁺等一些金属离子也对细胞膜的形成有影响。E Jingjing等^[31]将细胞膜测定和转录组分析相结合发现,培养基中的K⁺能显著促进植物乳杆菌LIP-1生物膜的形成,增强菌体的抗逆能力。但并非所有的金属离子都对细胞膜形成有积极作用,如Cu²⁺、Al³⁺、Zn²⁺和Pb²⁺等金属离子可抑制生物膜形成,不利于菌体抵抗逆境^[32-33]。因此,在培养基中选择性地添加一些金属离子,如K⁺、Ca²⁺等能够促进细胞膜的形成,增强菌体抗逆性,进而提高冻干存活率。

2.1.3 改变细胞膜不饱和脂肪酸比例从而影响菌体逆境耐受性

冻干过程中细胞会因为脱水导致细胞膜流动性降低,代谢功能受阻,菌株冻干存活率降低。脂肪酸对细胞膜的流动性起着至关重要的作用,其中较高的不饱和脂肪酸含量可提高细胞膜的流动性,从而增强细胞对逆境的抗性。为此,研究者们采用了多种方法,如通过调节培养基pH值、加入适当浓度的油酸、无机盐离子、吐温-80等组分可使不饱和脂肪酸含量增加。陈境等^[34]研究表明,若将MRS培养基的初始pH值从7.4下调至6.8,植物乳杆菌LIP-1冻干存活率也随之变化,其冻干存活率从72.43%增加至81.76%。钱志浩等^[35]研究发现,在培养基中加入2 mL/L吐温-80能够提高细胞膜中不饱和脂肪酸含量,从而提升鼠李糖乳杆菌FJND和短乳杆菌173-1-2的冻干存活率。E Jingjing等^[36]研究表明,K⁺可以上调相关基因的表达,有助于延长脂肪酸碳链,促进不饱和脂肪酸含量的合成,提高细胞膜流动性,增强菌体耐冻干性。

何棕柏等^[37]研究不同浓度油酸对菌株冻干存活率的影响发现,加入0.001%油酸到培养基中,同样可以提高细胞膜中不饱和脂肪酸含量,提升菌体冻干存活率。

总之,通过对培养基组分的优化,能够增强乳酸菌生理活性,提升乳酸菌自我保护能力,增加乳酸菌细胞膜不饱和脂肪酸含量,增强乳酸菌细胞膜的流动性,显著提升其冻干存活率。

2.2 胁迫预处理增强乳酸菌抗冻能力

胁迫预处理是指将乳酸菌菌液放置特定环境中一段时间,锻炼菌体在该环境下的耐受性,增强其对逆境的抵抗能力,从而提升菌株的冻干存活率。一般的胁迫预处理方式有冷胁迫、酸胁迫和热胁迫等^[38-39]。

2.2.1 冷胁迫预处理增强乳酸菌抗冻能力

冷胁迫预处理可以显著增强菌株对低温的耐受性,其作用机理可能与维持细胞膜的流动性及促进冷应激蛋白的表达有关。在此过程中,低温可以使乳酸菌细胞膜上的脂肪酸成分发生变化,进而增强其对低温的耐受性。研究发现,随着不饱和脂肪酸含量的增加,细胞膜的流动性相应增强,抗冻性能也随之增强。王晓萌等^[40]将嗜酸乳杆菌ATCC4356在8℃低温条件下培养16h,其冻干存活率比正常对照组提高了17.56%。此外,冷胁迫还可以促进细胞内冷应激蛋白(cold shock proteins, CSPs)的表达,增强细胞对冷冻的耐受能力。李梦洋等^[41]以保加利亚乳酸菌为材料,采用实时荧光定量聚合酶链式反应技术对其低温胁迫下的应激蛋白表达进行分析,发现被处理的菌株冷应激蛋白基因*csp A* mRNA的拷贝量增加3.34倍左右,说明冷应激蛋白的表达量得到了明显提高。先前有研究发现,微生物菌体内CSPs的蛋白质空间结构在低温环境下有较高的稳定性,并且保持着良好的催化活性。同时,CSPs还能防止细胞由于相关酶的变性失活引起的菌体损伤,提高了细胞的低温耐受性^[42]。因此,针对不同的乳酸菌进行不同的预冷胁迫处理可以提高其冻干存活率。

2.2.2 热胁迫预处理增强乳酸菌抗冻能力

热胁迫是将乳酸菌置于比其生长适宜温度更高的条件下,使其进行一段时间的高温胁迫,提高乳酸菌的逆境耐受性。研究发现,热胁迫预处理的微生物有较高的冻干存活率,且经过处理的微生物在真空冷冻干燥后能快速恢复生长和产酸^[43]。Zhen Ni等^[44]将嗜酸乳杆菌ATCC4356在45℃条件下胁迫处理30 min,发现菌体冻干存活率提升了17.2%。此外,菌体的糖代谢和能量代谢能力也得到了提高,与对照组相比,多糖含量增加了32.24%,半乳糖产量增加9%。王慧君等^[45]通过单因素实验发现,将培养了10.5 h的嗜酸乳杆菌在56℃环境下热胁迫处理30 min,嗜酸乳杆菌的冻干存活率比对照组提升了50.66%。此外,将热胁迫处理与筛选的优良保护剂结

合, 45 °C热胁迫处理嗜酸乳杆菌ATCC 4356 30 min后, 菌体的冻干存活率达到了92.8%^[46]。综上, 热胁迫处理促进了菌体的热激蛋白的表达, 对维持细胞的能量代谢, 维持细胞的生存有积极作用, 从而提高细胞的抗冻性和存活率。

2.2.3 酸胁迫预处理增强乳酸菌抗冻能力

酸胁迫预处理是指将乳酸菌放置于其适宜酸性环境下一段时间, 以提高菌体的冻干存活率, 不同种类的乳酸菌有各自专属的酸胁迫预处理条件。酸胁迫预处理主要通过调节菌体细胞的糖酵解途径和脂肪酸代谢途径以增强抗冻能力^[47]。有研究发现, 酸胁迫促进了菌株糖酵解途径中丙酮酸与乳酸之间的相互转化, 为菌体细胞提供更多生长所需的能量, 菌体细胞通过利用这些能量增强对逆境的耐受性^[47]。E Jingjing等^[48]研究表明, 乙酰辅酶A羧化酶 (acetyl-CoA carboxylase, ACC) 家族基因、脂肪酸合成 (fatty acid binding, FAB) 家族基因和丙酮酸脱氢酶基因在经过酸胁迫后会表达上调。ACC家族基因和FAB家族基因的表达对延伸脂肪酸碳链和碳链上不饱和双键的产生有促进作用, 从而提高了不饱和脂肪酸的相对含量, 而丙酮酸脱氢酶基因表达上调影响了细胞膜脂肪酸的代谢和合成。综上所述, 经过酸胁迫预处理的乳酸菌, 其在冻干过程中细胞膜的完整性和流动性均得到改善, 冻干存活率也明显提高。

除单一胁迫外, 国内外学者还开展了多因素协同胁迫的研究。如杨婕等^[49]通过对酸-冷交互胁迫条件下乳酸菌ATM的冻干存活率进行研究, 发现其冻干存活率可达87.19%, 较对照组有显著提高。交互胁迫预处理需要在不同的胁迫条件下进行, 故对各种胁迫条件的要求很严格, 因此有待于进一步的研究。

2.3 添加保护剂降低乳酸菌冻干的损伤

国内外学者多年的研究发现, 有很多因素会对乳酸菌冻干存活率产生影响, 包括细胞生理状态、细胞大小、菌液浓度、pH值以及冷冻保护剂等, 其中保护剂对菌体的保护效果较为突出。保护剂可以增强菌体冻干过程中各生理机能的稳定性, 优良的冻干保护剂可以改善菌体冻干时的环境, 能较好地缓解菌体在冷冻干燥过程中受到的各种损伤。最大限度地保留菌体原有的各种生理生化特性和生物活性^[50-54]。如曾小群等^[55]通过使用脱脂乳复合保护剂, 制备出了冻干存活率达98.74%的高活性 *Lactobacillus casei* 发酵剂。

2.3.1 保护剂种类

冻干保护剂分类的方法有很多, 按其渗透性可以分为3类, 即渗透性保护剂、半渗透性保护剂及非渗透性保护剂^[56]。如图2所示, 渗透性保护剂指可以很容易的透过细胞膜进入细胞内部发挥作用的物质, 如甘油就是一种

典型的渗透性保护剂, 它可以提高细胞膜的流动性, 从而抑制细胞内冰晶的形成, 进而实现对菌体的保护^[57]; 半渗透性保护剂指能穿过细胞壁而不能穿过细胞膜发挥作用的物质, 其能诱导菌体物质壁分离, 抑制冰晶的形成, 包括单糖、蔗糖、氨基酸等^[58]; 非渗透性保护剂指被排除在细胞外部, 在细胞外侧为菌体提供保护的物质, 包括多糖、海藻糖、脱脂乳等大分子, 这类保护剂通过在细胞壁外侧形成保护层实现对菌体的保护, 从而减轻细胞的损伤^[57-58]。

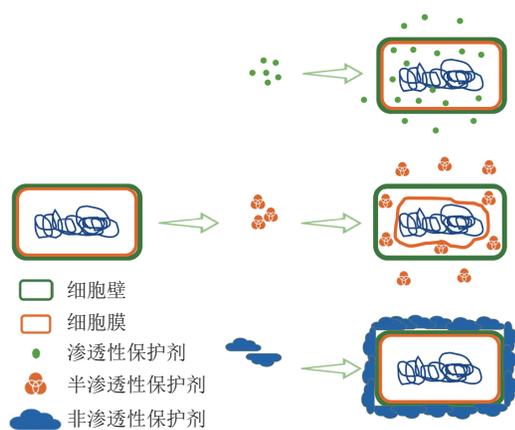


图2 不同渗透性保护剂的作用原理

Fig. 2 Action mechanisms of cryoprotectants with of different permeability

按冻干保护剂的化学结构可以分为有机保护剂和无机保护剂, 如表1所示, 由于有机保护剂所特有的结构与乳酸菌的有效抗冷冻密不可分, 而无机保护剂仅表现为无机盐, 故在乳酸菌发酵剂生产过程中广泛应用有机保护剂提升冻干存活率^[59]。

表1 常见冻干保护剂及其作用机理

Table 1 Common lyophilized protective agents and their action mechanisms

常见保护剂	类型	作用机理	常见物质
有机保护剂	糖类	糖类分子中含有多个羟基, 取代了水分子和细胞膜中的磷酸基团, 或者是菌体中的蛋白质极性基团, 形成了氢键, 从而使细胞膜和蛋白质的结构和功能保持完整	蔗糖 ^[57] 、低聚木糖 ^[60] 、海藻糖、乳糖 ^[58]
	醇类	与糖类相似, 醇类中的羟基可以代替蛋白质表面水分子的羟基, 从而在蛋白质表面形成一层水化膜, 进而稳定蛋白质的结构, 避免在冻干过程中出现变性损伤	甘露醇 ^[61] 、甘油 ^[57]
	氨基酸类	提升制品的塌陷温度, 避免因塌陷而使蛋白质结构破坏	半胱氨酸、谷氨酸 ^[62]
无机保护剂	蛋白质类	能够通过“包裹”的方式对细菌进行保护的大分子保护剂, 同时也有利于小分子保护剂发挥作用	乳清蛋白、胶原蛋白 ^[63] 、脱脂乳粉 ^[57]
	无机盐	通过调节菌体内外渗透压, 缓解冻干过程对菌体的损伤	乙酸钾 ^[64] 、硫代硫酸铵 ^[65]

2.3.2 复配保护剂的保护作用

不同的组织、细胞对冷冻处理有不同的响应。由于不同保护剂的作用机理存在很大差别, 并且在多数情况下, 单一的保护剂只能发挥单一的效果, 不能为组织、细胞提供最佳的保护效果^[66]。因此, 复配多种保护剂以达到最佳保护效果是重要的优化途径。

国内外研究表明,通过正交试验和响应面法,将不同种保护剂以一定比例进行复配对菌体的保护效果更好,显著提高了活菌数和发酵活力。辛明等^[67]采用响应面法对植物乳杆菌L5、L12冻干保护剂中的脱脂奶、海藻糖、硫酸锰的最佳配比进行了研究,结果表明,当冻干保护剂的配比为脱脂奶30.98 g/100 mL、海藻糖22.15 g/100 mL、硫酸锰0.19 g/100 mL时,植物乳杆菌L5发酵剂的生长速度更快,产酸能力更强,且冻干存活率达82.55%;而植物乳杆菌L12的最佳冻干保护剂配方为15.98 g/100 mL脱脂乳、10.85 g/100 mL海藻糖、0.05 g/100 mL硫酸锰,冻干存活率达到了83.66%^[67]。Stefanello等^[68]研究发现,海藻糖、蔗糖和脱脂牛奶的组合为乳杆菌IAL454提供了最有效的保护,使其冻干存活率保持在83%~85%之间。综上所述,不同的保护剂配方对冻干乳酸菌的存活率有很大的影响。

但截至目前,由于菌种的特异性以及不同保护剂的保护机理不同,仍没有发现一种有效适合所有乳酸菌的冻干保护剂配方。如表2所示,为了最大限度地提高乳酸菌真空冷冻干燥的存活率,研究者们针对不同种类的乳酸菌筛选出了不同的保护剂组合。其中,5%蔗糖、2%甘油、0.8%谷氨酸钠、1%抗坏血酸、5%海藻糖为嗜热链球菌MN002的最优保护剂配方;而10%脱脂乳、7%海藻糖、2%山梨醇和0.6%酪氨酸为复合冻干保护剂时,冷冻干燥植物乳杆菌L2的存活率高达92%。双歧乳杆菌的最佳保护条件为甘氨酸5.5%、碳酸氢钠0.8%、低聚木糖7%、精氨酸4.5%、脱脂乳25%时,可使其冻干存活率达到90.37%。因此,对于不同的种类要筛选不同的保护剂配方。

表2 不同乳酸菌对应的冻干保护剂

Table 2 Cryoprotectants for freeze drying of different lactic acid bacteria

菌株	保护剂组成/%	冻干存活率/%	参考文献
乳杆菌ED25	17.28%脱脂牛奶、2.12%乳糖、10%蔗糖	99	[69]
嗜热链球菌MN002	5%蔗糖、2%甘油、0.8%谷氨酸钠、1%抗坏血酸、5%海藻糖	84.8	[70]
植物乳杆菌L2	10%脱脂乳、7%海藻糖、2%山梨醇和0.6%酪氨酸	92	[66]
植物乳杆菌KJ03	蔗糖10%、谷氨酸钠2.5%、甘露醇5%	>75	[71]
干酪乳杆菌	1.0%谷胱甘肽、1% VC	86.6	[72]
鼠李糖乳杆菌LR-1	7%海藻糖、10%脱脂乳粉、5%谷氨酸钠	89.86	[73]
植物乳杆菌LP-7501S	24.66%脱脂乳粉、12.26%山梨醇、18.92%蔗糖	86.44	[50]
弯曲乳杆菌N19	20%脱脂乳粉、3.57%乳糖、10%蔗糖	98	[74]

2.4 优化真空冷冻干燥工艺条件降低乳酸菌的冻干损伤

为获得更高的菌体存活率,需要严格控制真空冷冻干燥工艺。目前有研究表明菌体在冻干过程中的活性损失大部分发生在预冻阶段。预冻处理是将物料中的游离水冻结,为之后的干燥处理做准备,预冻处理主要影响菌体产生的冰晶大小。故合适的预冻温度和冷却速率也是真空冷冻干燥工艺的重要环节。若冷却速率过快,会

产生大的冰晶,同时延长细胞的脱水过程,会对菌体造成极大的伤害,但快速冷却可以避免溶质效应和细胞过度收缩^[75]。同时冻干厚度、菌泥与保护剂的比例也对冷冻干燥质量产生影响。

2.4.1 预冷冻温度对乳酸菌冻干存活率的影响

如果冷冻温度不够,则会使菌液冻结得不够彻底,造成菌液在升华干燥时发生膨胀、起泡现象,从而影响菌粉的品质;但若预冻温度太低,不但会造成菌液的浪费,而且还会加剧对菌体的伤害,影响其冻干存活率。因此,合适的预冻温度对乳酸菌的冻干至关重要。不同类型的乳酸菌,其最适预冷冻温度差别很大。如表3所示,针对不同种类的乳酸菌,研究人员筛选了不同的预冷冻温度,鼠李糖乳杆菌LR-1的最佳预冷冻温度为-20℃^[73],植物乳杆菌LP-7501S的最佳预冷冻温度为-80℃^[50],而植物乳杆菌SC1的最佳预冷冻温度为-70℃^[76];同属的乳酸菌处在不同条件下,最佳的预冷冻温度也会有所差异。Wang Guangqiang等^[77]的研究表明,当使用山梨醇作为保护剂时,植物乳杆菌AR113、AR307、WCFS1的最佳预冷冻温度分别为-196、-40℃和-20℃,而当使用海藻糖为保护剂时,它们三者的最佳预冷冻温度为-20、-60℃和-60℃。因此,最佳预冻温度的选择是乳酸菌冻干过程中的重要环节。

表3 不同乳酸菌对应的预冷冻温度

Table 3 Pre-freezing temperatures for freeze drying of different lactic acid bacteria

乳酸菌种类	预冷冻温度/℃	参考文献
鼠李糖乳杆菌LR-1	-20	[73]
弯曲乳杆菌N19	-80	[74]
植物乳杆菌LP-7501S	-80	[50]
干酪乳杆菌	-80	[72]
植物乳杆菌SC1	-70	[76]
嗜酸乳杆菌LA-5	-18	[78]
植物乳杆菌ZJ2868	-80	[52]

2.4.2 冷却速率对乳酸菌冻干存活率的影响

在预冻过程中,冷却速率是乳酸菌活力的关键因素。如图3所示,在预冷冻阶段,合适的冷却速率可以减轻细胞在冻干过程中受到的损伤^[54]。a表示冷却速率过慢,细胞由于过度脱水收缩,容易发生“溶质损伤”,过度收缩,可导致蛋白失去活性,从而使细胞失去活性而死亡;c表示冷却速率过快,易导致胞内和胞外的水分子结成冰晶,进而穿透细胞,给菌体带来严重的物理伤害;b表示最适的冷却速率,在此条件下,细胞不会出现过度脱水收缩和胞内结冰,能够最大程度降低细胞受到的损伤。不同种的乳酸菌有其不同的最适冷却速率,在冷却速率为-1℃/min时植物乳杆菌ST-3的冻干存活率最高,而在-10℃/min条件下,干酪乳杆菌LC2W可以得到最高的冻干存活率^[53]。目前,冷却速率在乳酸菌真空

冷冻干燥过程中对其冻干存活率影响的研究比较匮乏,因此,研究乳酸菌的最适冷却速率至关重要。

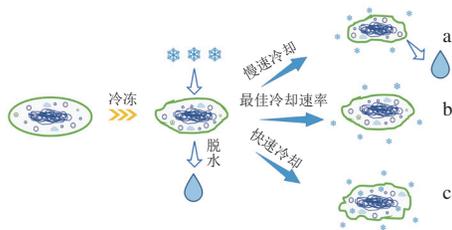


图3 不同冷却速率对乳酸菌存活的影响

Fig. 3 Effect of cooling rate on the survival of lactic acid bacteria

2.4.3 保护剂与菌泥的混合比例对乳酸菌冻干存活率的影响

冻干保护剂与菌泥的配比也会影响乳酸菌的冻干活性。保护剂浓度过低,不能充分保护乳酸菌在真空冷冻干燥过程中的活性;保护剂浓度过高,细胞冻干存活率也会下降,究其原因可能是保护剂浓度过高时阻碍了水分的挥发,导致冰晶的生成,从而提升了细胞的死亡率^[79]。如许女等^[80]的研究表明,以甘油0.5%、山梨醇2%、麦芽糊精1%、脱脂奶粉10%、海藻糖1.5%为冻干保护剂配方,保护剂与菌泥的混和比例为1:3时,植物乳杆菌MA2的冻干存活率为61%。因此,选择合适的混合比例非常重要。

2.4.4 冻干厚度对乳酸菌冻干存活率的影响

在冻干过程中,冻干厚度也是一个重要的环节。冻干厚度会对后续冻干时间以及最后冻干产品的性状产生影响,研究表明,如果样品太薄,不仅极易融化,而且在真空冷冻干燥后,样品的冻干存活率较低,复水率也相对较低;反之,增加样品厚度则不易融化,降低了对菌体的伤害;但是,过厚的样本,会延长冻干所需的时间^[81]。张雅硕等^[79]研究发现,0.5 cm是副干酪乳杆菌的最佳冻干厚度。植物乳杆菌299的最佳冻干厚度为1.2 cm^[82]。因此,选择最优的冻干厚度有利于乳酸菌的冻干保护。

3 优化贮藏条件以降低乳酸菌活菌数的损失

3.1 贮藏温度

贮藏温度对保持益生菌的活性至关重要,过高的温度会导致氧化反应或膜脂质相转变,这对益生菌的存活不利^[83];而低温环境保存能使冻干菌体的活力得到很好的保护^[84]。如马雁等^[85]研究表明,-20℃是乳杆菌grx07可以长时间贮藏的最适温度,在该温度下,菌粉的存活率、 β -半乳糖苷酶、乳酸脱氢酶等活力得到了较好维持。杨一兵^[86]、姚国强^[87]等研究表明,4℃有利于短期贮藏菌粉,而对于长期贮藏,-20℃的贮藏效果更好。

Shu Guowei等^[88]研究发现,低温可以有效保持菌粉活性,而常温状态下贮藏的菌粉,由于细胞内水分比较活跃,故容易导致细胞丧失活力。因此,冻干粉最好保存在低温环境中,并且在使用时必须进行低温诱导,以免引起过敏现象。

3.2 气体成分

众多研究表明冻干粉贮藏环境中的气体组成、含氧量等对冻干菌体的保存性能有很大的影响。如张晓宁等^[89]的研究表明,当冻干后的植物乳杆菌LIP-1在真空环境下贮藏,菌体的 β -半乳糖苷酶、乳酸脱氢酶、 K^+ -ATP酶活性都比氮、氧两种贮藏环境下的酶活性高。因此,在低氧环境下贮藏冻干粉,可有效地增加微生物数量,并保持其良好的活性。

3.3 水分含量

含水量对乳酸菌贮藏期间的存活具有显著影响。乳酸菌的酶活性、物理反应速率等都对应水分活度有所依赖。如王淑敏等^[90]研究表明,乳双歧杆菌A04菌粉水分活度在0.03~0.1之间时,其贮藏效果最好。Jiménez等^[91]将副干酪LBC81用胶囊包裹起来,在25、35℃和45℃,水分活度为0.103~0.846条件下贮存7周,结果发现该菌粉的菌体存活率在水活度为0.536时下降得很快。任琳等^[92]研究发现,具有不同水分含量的冻干样品中,植物乳杆菌在冻干过程中的存活率无明显变化,而随水分含量的减少,样品复水后进入对数生长阶段的时间变长,其恢复能力变弱。因此,只有保持较低且稳定的含水量和水分活度,才能保证乳酸菌冻干粉的贮藏稳定性。

3.4 包装形式

包装指使用一种或多种封装材料,在微生物与周围环境之间形成物理屏障,从而保护微生物^[93]。一般冻干菌粉的贮藏时间受阳光、湿度、氧气、pH值、渗透变化等因素的影响,为保存冻干产品常采用阻氧、阻光的包装材料以排除这些因素的影响^[94]。此外,还需考虑冻干产品和包装材料之间的交互作用。如桑跃等^[95]发现充氮包装的乳杆菌A6菌粉和BBMN68菌粉与普通包装的菌粉相比,其存活率分别提升了4.2倍和7.2倍。张敏等^[96]研究发现,采用不同包装材料的植物乳杆菌LN66在4℃环境下贮藏1个月,真空铝箔袋、棕色玻璃瓶包装的菌粉存活率均高于普通铝箔纸包装的菌粉,并分别上升2.8%和2.10%。

目前,真空冷冻干燥制品的包装材料使用最多的是玻璃、塑料、橡胶和一些金属材料,但玻璃具有易碎性、质量大等缺点;塑料的阻氧性等客观因素使其推广受限^[96]。因此,将不同材料复合应用可以弥补缺陷,多层复合薄膜外层是可印刷的双向拉伸聚丙烯薄膜、聚对苯二甲酸乙二醇酯,内部是封热性能高的流延聚丙烯薄膜、聚乙烯材料等,中间还可采用铝箔、乙烯-乙醇共聚物等材料提高阻隔能力。

4 结 语

近年来,真空冷冻干燥技术已经成为医药、食品工业中的一种非常重要的技术。利用真空冷冻干燥技术生产出高活菌数且能长期保持活性的乳酸菌菌粉是医药及食品发酵工业的重要研究目标。本文分析了乳酸菌细胞在真空冷冻干燥过程中的损伤及保护机理,并在此基础上对其生长培养基、胁迫预处理、冻干保护剂、工艺条件、封装材料等方面对乳酸菌冻干存活率和贮藏时间的影响因素进行了总结,对乳酸菌发酵剂的冻干保藏技术在保护性条件选择方面有一定的参考作用。保护性条件不仅能够提高乳酸菌在冻干过程中的存活率,同时也对贮藏过程中乳酸菌的活力与稳定性有一定积极的影响。

目前研究者在提高乳酸菌生物膜合成与抗冻性、筛选最佳保护剂组合、贮藏保护性条件等方面开展了大量研究,但仍有不足。首先,有关具有普适性保护效果冻干保护剂的配方研究较少;其次,研究表明,乳酸菌冻干粉在低温、避光及真空环境下能基本实现长期贮藏,开发新型复合封装材料能更好地维持其贮藏稳定性;最后,应加强促进开发乳酸菌生长发育的新型益生元类保护剂,减少在冻干过程中营养元素的损失,进而提高乳酸菌冻干存活率、延长贮藏期。

参考文献:

- [1] SANTIVARANGKNA C, WENNING M, FOERST P, et al. Damage of cell envelope of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 102(3): 748-756. DOI:10.1111/j.1365-2672.2006.03123.x.
- [2] SADIKOGLU H, LIAPIS A I. Mathematical modelling of the primary and secondary drying stages of bulk solution freeze-drying in trays: parameter estimation and model discrimination by comparison of theoretical results with experimental data[J]. Drying Technology, 1997, 15(3/4): 791-810. DOI:10.1080/07373939708917262.
- [3] 黄刚. 希氏乳杆菌Q19直投式苹果酸-乳酸发酵剂的制备及其酿酒特性研究[D]. 银川: 宁夏大学, 2023. DOI:10.27257/d.cnki.gnxhc.2022.001027.
- [4] WANG G Q, CHEN P Y, YU X Q, et al. C_{18:1} improves the freeze-drying resistance of *Lactobacillus plantarum* by maintaining the cell membrane[J]. ACS Applied Bio Materials, 2020, 3(8): 4933-4940. DOI:10.1021/acsabm.0c00444.
- [5] BODZEN A, JOSSIER A, DUPONT S, et al. Uloga fluidnosti membrane u povećanju stope preživljavanja sojeva bakterije *Lactococcus lactis* tijekom sušenja zamrzavanjem nakon uzgoja u kiselom mediju[J]. Food Technology and Biotechnology, 2021, 59(4): 443-453. DOI:10.17113/ftb.59.04.21.7076.
- [6] LIM J Y, LIM D G, KIM K H, et al. Effects of the annealing on the physical properties of therapeutic proteins during freeze drying process[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 107: 41. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2017.09.041.
- [7] SHAHMORADI E, BAHEIRAEI N, HALVAEI I. Trehalose attenuates detrimental effects of freeze-drying on human sperm parameters[J]. Biopreservation and Biobanking, 2022, 20(1): 31-37. DOI:10.1089/bio.2020.0167.
- [8] HAN B, BISCHOF J C. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing[J]. Cryobiology, 2004, 48(1): 8-21. DOI:10.1016/j.cryobiol.2003.11.002.
- [9] 刘振民, 骆承庠. 乳酸菌冻干特性的研究[J]. 中国乳品工业, 2002(5): 30-33. DOI:10.3969/j.issn.1001-2230.2002.05.009.
- [10] BASHOLLI-SALIHU M, MUELLER M, SALAR-BEHZADI S, et al. Effect of lyoprotectants on β -glucosidase activity and viability of *Bifidobacterium infantis* after freeze-drying and storage in milk and low pH juices[J]. LWT-Food Science and Technology, 2014, 57(1): 276-282. DOI:10.1016/j.lwt.2014.01.011.
- [11] 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. DOI:10.7666/d.D260156.
- [12] JOFRÉ A, AYMERICH T, GARRIGA M. Impact of different cryoprotectants on the survival of freeze-dried *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei/paracasei* during long-term storage[J]. Beneficial Microbes, 2015, 6(3): 381-386. DOI:10.3920/bm2014.0038.
- [13] BISUTTI I L, STEPHAN D. Influence of fermentation temperature and duration on survival and biocontrol efficacy of *Pseudomonas fluorescens* Pf153 freeze-dried cells[J]. Journal of Applied Microbiology, 2020, 128(1): 232-241. DOI:10.1111/jam.14458.
- [14] WANG Y, DELETTRE J, GUILLOT A, et al. Influence of cooling temperature and duration on cold adaptation of *Lactobacillus acidophilus* RD758[J]. Cryobiology, 2005, 50(3): 294-307. DOI:10.1016/j.cryobiol.2005.03.001.
- [15] 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.
- [16] ZHAO Y S, HINDORFF L A, CHUANG A, et al. Expression of a cloned cyclopropane fatty acid synthase gene reduces solvent formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(5): 2831-2841. DOI:10.1128/aem.69.5.2831-2841.2003.
- [17] FONSECA F, CATHERINE B, CORRIEU G. Operating conditions that affect the resistance of lactic acid bacteria to freezing and frozen storage[J]. Cryobiology, 2001, 43(3): 189-198. DOI:10.1006/cryo.2001.2343.
- [18] 朱琳, 刘宁, 张英华, 等. 乳酸菌细胞膜的冻干损伤及保护[J]. 现代食品科技, 2005(4): 103-106.
- [19] KANDIL S, SODA M E. Influence of freezing and freeze drying on intracellular enzymatic activity and autolytic properties of some lactic acid bacterial strains[J]. Advances in Microbiology, 2015, 5(6): 371-382. DOI:10.4236/aim.2015.56039.
- [20] GUERIN J, PETIT J, BURGAIN J, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG encapsulation by spray-drying: milk proteins clotting control to produce innovative matrices[J]. Journal of Food Engineering, 2017, 193: 10-19. DOI:10.1016/j.jfoodeng.2016.08.008.
- [21] 于小青. 植物乳杆菌在冷冻干燥过程中生理损伤及保护策略的研究[D]. 上海: 上海理工大学, 2019.
- [22] KIM M, NAM D G, KIM S B, et al. Enhancement of viability, acid, and bile tolerance and accelerated stability in lyophilized *Weissella cibaria* JW15 with protective agents[J]. Food science & Nutrition, 2018, 6(7): 1904-1913. DOI:10.1002/fsn3.762.
- [23] 张晓宁, 陈境, 麻丽丽, 等. 优化培养基对冷冻干燥后植物乳杆菌LIP-1活性的影响[J]. 食品科技, 2019, 44(7): 1-9. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2019.07.001.
- [24] 李娜, 杨江华, 韦宇拓. 植物乳杆菌ZJ316高密度发酵条件优化[J]. 中国酿造, 2021, 40(5): 43-48. DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2021.05.008.

- [25] 赵玉鉴, 李盛钰, 赵玉娟, 等. 益生性植物乳杆菌C88的高密度培养条件优化研究[J]. 中国乳品工业, 2014, 42(1): 7-10. DOI:10.3969/j.issn.1001-2230.2014.01.002.
- [26] CHOI G H, LEE N K, PAIK H D. Optimization of medium composition for biomass production of *Lactobacillus plantarum* 200655 using response surface methodology[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2021, 31(5): 717-725. DOI:10.4014/jmb.2103.03018.
- [27] 孙瑞胤, 王瑞雪, 鄂晶晶, 等. 钙离子对植物乳杆菌LIP-1抗冷冻干燥性能的影响[J]. 食品工业科技, 2021, 42(17): 100-106. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2020110151.
- [28] CHEN H, HUANG J, SHI X Y, et al. Effects of six substances on the growth and freeze-drying of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*[J]. Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria, 2017, 16(4): 403-412. DOI:10.17306/j.Afs.0512.
- [29] SCHWAB C, VOGEL R, GÄNZLE 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.
- [30] YUNDA E, QUILÈS F. *In situ* spectroscopic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG flow on an abiotic surface reveals a role for nutrients in biofilm development[J]. Biofouling, 2019, 35(5): 494-507. DOI:10.1080/08927014.2019.1617279.
- [31] E J J, MA R Z, CHEN Z C, et al. Improving the freeze-drying survival rate of *Lactobacillus plantarum* LIP-1 by increasing biofilm formation based on adjusting the composition of buffer salts in medium[J]. Food Chemistry, 2021, 338: 128134. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.128134.
- [32] 张国丽, 彭瑶, 魏露, 等. 植物乳杆菌SCP53生物膜的形成条件[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(4): 7-14. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.201704002.
- [33] GRITSCH L, LOVELL C, GOLDMANN W H, et al. Fabrication and characterization of copper(II)-chitosan complexes as antibiotic-free antibacterial biomaterial[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 179: 370-378. DOI:10.1016/j.carbpol.2017.09.095.
- [34] 陈境, 张晓宁, 麻丽丽, 等. 初始pH值对植物乳杆菌LIP-1抗冷冻干燥性能的影响[J]. 中国食品学报, 2020, 20(12): 81-89. DOI:10.16429/j.1009-7848.2020.12.011.
- [35] 钱志浩, 崔树茂, 唐鑫, 等. 基于细胞膜脂肪酸调控提高乳杆菌冻干存活率[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(16): 1-8. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.026748.
- [36] E J J, MA L L, CHEN Z C, et al. Effects of buffer salts on the freeze-drying survival rate of *Lactobacillus plantarum* LIP-1 based on transcriptome and proteome analyses[J]. Food Chemistry, 2020, 326: 126849. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.126849.
- [37] 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.
- [38] 印伯星, 车舒雅, 张臣臣, 等. 酸胁迫和冷胁迫对鼠李糖乳杆菌的交叉保护作用[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(12): 37-41. DOI:10.12161/j.issn.1005-6521.2020.12.007.
- [39] CHANG C M, CHIANG M L, CHOU C C. Response of heat-shocked *Vibrio parahaemolyticus* to subsequent physical and chemical stresses[J]. Journal of Food Protection, 2004, 67(10): 2183-2188. DOI:10.4315/0362-028x-67.10.2183.
- [40] 王晓萌, 甄妮, 田启远, 等. 冷休克处理提高嗜酸乳杆菌的冻干存活率[J]. 中国食品学报, 2021, 21(3): 203-209. DOI:10.16429/j.1009-7848.2021.03.023.
- [41] 李梦洋, 宋永, 程丽, 等. 低温处理对保加利亚乳杆菌冷应激蛋白表达影响的研究[J]. 黑龙江大学自然科学学报, 2016, 33(4): 521-526. DOI:10.13482/j.issn1001-7011.2016.04.112.
- [42] BROADBENT J R, LIN C. Effect of heat shock or cold shock treatment on the resistance of *Lactococcus lactis* to freezing and lyophilization[J]. Cryobiology, 1999, 39(1): 88-102. DOI:10.2337/diabetes.54.5.1297.
- [43] SHIN Y, KANG C H, KIM W, et al. Heat adaptation improved cell viability of probiotic *Enterococcus faecium* HL7 upon various environmental stresses[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2019, 11(2): 618-626. DOI:10.1007/s12602-018-9400-4.
- [44] ZHEN N, ZENG X Q, WANG H J, et al. Effects of heat shock treatment on the survival rate of *Lactobacillus acidophilus* after freeze-drying[J]. Food Research International, 2020, 136: 109507. DOI:10.1016/j.foodres.2020.109507.
- [45] 王慧君, 曾小群, 潘道东, 等. 热休克法提高嗜酸乳杆菌的抗冻干胁迫作用[J]. 中国食品学报, 2016, 16(1): 147-153. DOI:10.16429/j.1009-7848.2016.01.020.
- [46] 何亚婷, 曾小群, 彭刘杨, 等. 热休克预处理结合保护剂对嗜酸乳杆菌的冻干保护作用[J]. 中国食品学报, 2018, 18(7): 122-128. DOI:10.16429/j.1009-7848.2018.07.016.
- [47] 鄂晶晶. 培养条件对植物乳杆菌LIP-1冷冻干燥存活率的影响及其内在机制的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2022.
- [48] E J J, CHEN J, CHEN Z C, et al. Effects of different initial pH values on freeze-drying resistance of *Lactiplantibacillus plantarum* LIP-1 based on transcriptomics and proteomics[J]. Food Research International, 2021, 149: 110694. DOI:10.1016/j.foodres.2021.110694.
- [49] 杨婕, 郭金凤, 李宝坤, 等. 酸-冷交互胁迫对保护冷冻干燥发酵乳杆菌活性的作用[J]. 食品科学, 2020, 41(2): 101-106. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181228-343.
- [50] 陈颜红, 王俊修, 张二康, 等. 植物乳杆菌LP-7501S冻干保护剂优化研究[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2021, 42(2): 99-104. DOI:10.16872/j.cnki.1671-4652.2021.02.016.
- [51] 田文静, 王俊国, 宋娇娇, 等. 适宜冷冻干燥保护剂提高植物乳杆菌LIP-1微胶囊性能[J]. 农业工程学报, 2015, 31(21): 285-294. DOI:10.11975/j.issn.1002-6819.2015.21.038.
- [52] 于平, 胡淳玉, 黄星星, 等. 产肌醇的植物乳杆菌ZJ2868菌粉制备工艺[J]. 中国食品学报, 2021, 21(9): 142-149. DOI:10.16429/j.1009-7848.2021.09.015.
- [53] WANG G G, YU X Q, ZHI L, et al. Optimal combination of multiple cryoprotectants and freezing-thawing conditions for high *lactobacilli* survival rate during freezing and frozen storage[J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 99: 217-223. DOI:10.1016/j.lwt.2018.09.065.
- [54] RAJU R, BRYANT S J, WILKINSON B L, et al. The need for novel cryoprotectants and cryopreservation protocols: insights into the importance of biophysical investigation and cell permeability[J]. Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects, 2021, 1865(1): 129749. DOI:10.1016/j.bbagen.2020.129749.
- [55] 曾小群, 潘道东, 包红燕, 等. 干酪乳杆菌冻干保护剂研究[J]. 中国食品学报, 2013, 13(1): 44-50. DOI:10.16429/j.1009-7848.2013.01.015.
- [56] DE LARA JANZ J, DE AGUIAR DEBES A, DE CÁSSIA CAVAGLIERI R, et al. Evaluation of distinct freezing methods and cryoprotectants for human amniotic fluid stem cells cryopreservation[J]. Journal of Biomedicine & Biotechnology, 2012, 2012: 649353. DOI:10.1155/2012/649353.
- [57] 张冬生, 刘宗, 宋莉, 等. ChIFN酿酒酵母工程菌冻干保护剂的优化[J]. 山地农业生物学报, 2018, 37(1): 90-94. DOI:10.15958/j.cnki.sdnyswb.2018.01.017.
- [58] 张风华, 黄俊逸, 李新福, 等. 嗜酸乳杆菌冻干保护剂及其直投式复合发酵剂的开发[J]. 现代食品科技, 2019, 35(9): 248-257. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.9.032.
- [59] 任艳, 陈明, 邵宇宇, 等. 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.

- [60] 张菊, 苏成文, 亓鹏, 等. 植物乳杆菌冻干保护剂的筛选及冻干工艺的研究[J]. 中国饲料, 2020(17): 53-57. DOI:10.15906/j.cnki.cn11-2975/s.20201711.
- [61] 孔保华. 发酵肉制品直投式发酵剂制备及其对肉制品品质影响的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2015.
- [62] 陈大卫, 郭聪聪, 任晨瑜, 等. 真空冷冻干燥保护剂对植物乳杆菌67黏附能力的影响[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(9): 16-26. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.034090.
- [63] 周佳豪, 雷文平, 刘成国, 等. 高活菌数干酪乳杆菌LZ183E冻干保护剂的制备[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(24): 138-143. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.024870.
- [64] 陈萱, 赵瑞峰, 陶志强, 等. 嗜热链球菌grx90冻干保护剂的制备[J]. 中国乳品工业, 2020, 48(3): 10-14; 30. DOI:10.19827/j.issn1001-2230.2020.03.002.
- [65] 李晶晶, 王效禹, 李娟, 等. 植物乳杆菌冷冻干燥保护剂筛选及加速储存稳定性研究[J]. 饲料研究, 2021, 44(6): 97-100. DOI:10.13557/j.cnki.issn1002-2813.2021.06.023.
- [66] CHENG Z Y, YAN X, WU J Y, et al. Effects of freeze drying in complex lyoprotectants on the survival, and membrane fatty acid composition of *Lactobacillus plantarum* L1 and *Lactobacillus fermentum* L2[J]. Cryobiology, 2022, 105: 1-9. DOI:10.1016/j.cryobiol.2022.01.003.
- [67] 辛明, 李昌宝, 李杰民, 等. 植物乳杆菌冻干保护剂的优化研究[J]. 食品科技, 2021, 46(2): 1-9. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2021.02.002.
- [68] STEFANELLO R F, NABESHIMA E H, IAMANAKA B T, et al. Survival and stability of *Lactobacillus fermentum* and *Wickerhamomyces anomalus* strains upon lyophilisation with different cryoprotectant agents[J]. Food Research International, 2019, 115: 90-94. DOI:10.1016/j.foodres.2018.07.044.
- [69] GUL L B, GUL O, YILMAZ M T, et al. Optimization of cryoprotectant formulation to enhance the viability of *Lactobacillus brevis* ED25: determination of storage stability and acidification kinetics in sourdough[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2020, 44(4): e14400. DOI:10.1111/jfpp.14400.
- [70] 李周勇, 王凡, 栾少萌, 等. 嗜热链球菌MN002冻干菌粉的制备工艺[J]. 中国乳品工业, 2019, 47(12): 19-24.
- [71] NUYLERT A, JAMPAPHAENG K, TANI A, et al. Survival and stability of *Lactobacillus plantarum* KJ03 as a freeze-dried autochthonous starter culture for application in stink bean fermentation (Sataw-Dong)[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2022, 46(3): e16367. DOI:10.1111/jfpp.16367.
- [72] ZHANG J, LIU Q, CHEN W, et al. Short communication: protection of lyophilized milk starter *Lactobacillus casei* Zhang by glutathione[J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(3): 1846-1852. DOI:10.3168/jds.2015-9540.
- [73] 徐颖, 贺黎, 吕嘉彬, 等. 富硒鼠李糖乳杆菌稳定性及其冻干保护剂研究[J]. 中国食品学报, 2020, 20(9): 102-108. DOI:10.16429/j.1009-7848.2020.09.013.
- [74] GUL L B, CON A H, GUL O. Storage stability and sourdough acidification kinetic of freeze-dried *Lactobacillus curvatus* N19 under optimized cryoprotectant formulation[J]. Cryobiology, 2020, 96: 122-129. DOI:10.1016/j.cryobiol.2020.07.007.
- [75] FOWLER A, TONER M. Cryo-injury and biopreservation[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2005, 1066: 119-135. DOI:10.1196/annals.1363.010.
- [76] 陈胜杰, 高翔, 袁戎宇. 真空冷冻干燥法制备益生菌粉的冻干保护剂配方优化[J]. 食品工业科技, 2021, 42(1): 182-187; 196. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2020020317.
- [77] WANG G Q, PU J, YU X Q, et al. Influence of freezing temperature before freeze-drying on the viability of various *Lactobacillus plantarum* strains[J]. Journal of Dairy Science, 2020, 103(4): 3066-3075. DOI:10.3168/jds.2019-17685.
- [78] WANG C N, WANG M, WANG H, et al. Effects of polymerized whey protein on survivability of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 during freeze-drying[J]. Food Science & Nutrition, 2019, 7(8): 2708-2715. DOI:10.1002/fsn3.1130.
- [79] 张雅硕, 侯一超, 张紫薇, 等. 高活性副干酪乳杆菌冻干菌粉的制备及工艺优化[J]. 食品工业科技, 2019, 40(16): 90-96. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2019.16.015.
- [80] 许女, 习傲登, 张玢. 真空冷冻干燥工艺参数对植物乳杆菌MA2活性的影响[J]. 中国酿造, 2011(11): 34-38. DOI:10.3969/j.issn.0254-5071.2011.11.010.
- [81] 宫俊峰, 张国柱, 赵玉明, 等. 植物乳杆菌真空冷冻干燥工艺的优化[J]. 食品工业, 2022, 43(9): 71-74.
- [82] 杨加怀. 植物乳杆菌299高密度培养及冷冻干燥保护的研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2015.
- [83] CALINOIU L F, VODNAR D, PRECUP G. A review: the probiotic bacteria viability under different conditions[J]. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca Food Science and Technology, 2016, 73(2). DOI:10.15835/buasvmcn-fst:12448.
- [84] WANG L, HUANG G, MA W, et al. Preparation and application of directed vat set indigenous freeze-drying *Lentilactobacillus hilgardii* Q19 starter in winemaking[J]. Foods, 2023, 12(5): 1053. DOI:10.3390/foods12051053.
- [85] 马雁, 沈桂奇, 陶志强, 等. 贮藏温度对真空冻干发酵剂发酵乳杆菌grx07活性的影响[J]. 食品工业科技, 2020, 41(2): 84-88; 94. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2020.02.014.
- [86] 杨一兵, 刘冬梅. 制备冷冻干燥乳酸菌的相关影响因素的研究进展[J]. 江西食品工业, 2008(4): 31-34. DOI:10.3969/j.issn.1674-2435.2008.04.011.
- [87] 姚国强, 高鹏飞. 乳酸菌发酵剂在生产存储及使用中的活性研究[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(21): 131-136. DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2013.21.037.
- [88] SHU G W, WANG Z, CHEN L, et al. Characterization of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* in goat milk powder and tablet: optimization of the composite cryoprotectants and evaluation of storage stability at different temperature[J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 90: 70-76. DOI:10.1016/j.lwt.2017.12.013.
- [89] 张晓宁. 不同干燥方式及贮藏环境对植物乳杆菌LIP-1活性影响的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019.
- [90] 王淑敏, 桑跃, 侯彩云, 等. 冷冻干燥乳双歧杆菌A04菌粉的贮藏活性研究[J]. 中国食品学报, 2021, 21(9): 192-202. DOI:10.16429/j.1009-7848.2021.09.021.
- [91] JIMÉNEZ M, FLORES-ANDRADE E, PASCUAL-PINEDA L A, et al. Effect of water activity on the stability of *Lactobacillus paracasei* capsules[J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 60(1): 346-351. DOI:10.1016/j.lwt.2014.09.050.
- [92] 任琳, 李家鹏, 田寒友, 等. 含水量对植物乳杆菌冻干粉细胞活性的影响及其贮藏稳定性的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(23): 388-392. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2009.23.087.
- [93] ALTAMIRANO-RÍOS A V, GUADARRAMA-LEZAMA A Y, ARROYO-MAYA I J, et al. Effect of encapsulation methods and materials on the survival and viability of *Lactobacillus acidophilus*: a review[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2022, 57(7): 4027-4040. DOI:10.1111/ijfs.15779.
- [94] 范珺. 从包装技术的角度探讨提高益生菌活性的方法[J]. 中国包装, 2015, 35(5): 55-57. DOI:10.3969/j.issn.1003-062X.2015.05.030.
- [95] 桑跃, 冯海红, 蒙璐, 等. 充氮包装和贮藏温度对益生菌粉贮藏稳定性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(19): 143-147. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.024006.
- [96] 张敏, 刘雅豪, 殷诚, 等. 不同包装形式和贮藏温度对植物乳杆菌LN66贮藏活性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(9): 27-31. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.032641.