

## 保护剂对发酵乳杆菌 BLHN3 冻干存活率的影响

左梦楠<sup>1</sup>, 刘伟<sup>3\*</sup>, 全琦<sup>1</sup>, 张菊华<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup> 湖南大学研究生院隆平分院 长沙 410125

<sup>2</sup> 湖南省农业科学院 长沙 410125

<sup>3</sup> 湖南省农产品加工研究所 长沙 410125)

**摘要** 为了提高乳酸菌冷冻干燥存活率,以具有高抗氧化活性的优良发酵乳杆菌 BLHN3 为对象,研究不同保护剂对其冷冻干燥的保护效果及冻干菌粉的贮藏稳定性。结果表明:混合保护剂 3% L-谷氨酸钠+5%麦芽糖+5%脱脂牛奶处理的发酵乳杆菌 BLHN3 存活率最高,活菌数可达到  $1.48 \times 10^{11}$  CFU/g。扫描电镜结果显示:保护剂可维持冻干后乳酸菌细胞膜的完整性。傅里叶红外(FTIR)结果表明:保护剂可通过与细胞发生结合作用,降低乳酸菌冻干损伤。乳酸脱氢酶(LDH)、ATP 酶(ATPase)酶活性显著提高,而丙酮酸激酶(PK)酶活性无显著差异。加速贮藏试验表明:低温贮藏是保存菌粉的有效方法。结论:3% L-谷氨酸钠、5%麦芽糖与 5%脱脂奶粉作为保护剂可制备高活力发酵乳杆菌 BLHN3 冻干发酵剂。

**关键词** 发酵乳杆菌 BLHN3; 保护剂; 冷冻干燥; 冻干发酵剂

文章编号 1009-7848(2024)08-0178-09 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.08.017

乳酸菌是一类能利用可发酵碳水化合物产生大量乳酸的革兰氏阳性细菌,广泛用于传统食品发酵已有数千年的历史。乳酸菌在发酵过程中产生乳酸、醋酸等有机酸和醇、醛、酮等风味物质,能改善食品品质,增加产品营养特性<sup>[1]</sup>。同时,乳酸菌具有调节肠道菌群平衡,提高免疫活性,降低血清胆固醇、抗氧化、抗肿瘤、抗病毒等多种生理功能<sup>[2-5]</sup>。直投式乳酸菌发酵剂具有活力高,体积小,使用方便,发酵周期短等特点,广泛应用于现代食品工业生产中。高活性直投式乳酸菌发酵剂的制备已成为国内外研究的热点。

目前,冷冻干燥是直投式发酵剂制备的常用方法之一,而冻干过程可能使乳酸菌细胞膜结构和功能受损,敏感蛋白和关键酶活性失活,造成发酵剂活性降低,甚至死亡<sup>[6]</sup>。在冻干前加入保护剂,可有效降低冻干损伤。目前以糖类、脱脂牛奶作为冻干保护剂的研究较多。糖类保护剂对嗜酸乳杆菌、德尔布鲁氏乳杆菌、嗜热链球菌、短双歧杆菌冻干细胞具有良好的保护作用<sup>[7]</sup>。脱脂牛奶作保护

剂可以有效提高粪肠乳杆菌、副干酪乳杆菌、发酵乳杆菌的冻干存活率<sup>[8]</sup>。Ambros 等<sup>[9]</sup>发现以醇类为冻干保护剂,也可以显著提高乳酸菌的冻干存活率。此外,研究表明复合保护剂比单一保护剂作用效果更好,如 Chen 等<sup>[10]</sup>研究表明两歧双歧杆菌在甘氨酸、碳酸氢钠、低聚木糖、精氨酸和脱脂牛奶混合保护剂下冻干存活率最高。糖醇和蛋白质是保加利亚乳杆菌 LB6 的最优保护剂组合<sup>[11]</sup>。Chen 等<sup>[12]</sup>研究表明在脱脂牛奶、乳糖和抗坏血酸共同作用下可显著提高乳酸菌冻干存活率。Zayed 等<sup>[13]</sup>研究表明唾液乳杆菌以海藻糖、蔗糖和脱脂乳作保护剂,冻干存活率可提至 83%~85%。保护剂的选择及复配是乳酸菌直投式发酵剂研究的重要内容。

乳酸菌具有菌株特异性,冻干保护剂的选择也因微生物的种类而异。本文以前期从自然发酵刺辣椒中获得的 1 株发酵乳杆菌 BLHN3 为对象,研究不同保护剂对其冻干存活性的影响,确定最佳冻干保护剂。同时探究保护剂作用下菌株高成活率的机理及冻干菌粉的贮藏稳定性,为乳酸菌发酵剂产业化生产提供技术参考。

收稿日期: 2023-08-08

基金项目: 湖南省重点研发计划项目(2023NK2039, 2023NK2036); 湖南农业科技创新项目(2023CX27)

第一作者: 左梦楠,女,硕士生

通信作者: 刘伟 E-mail: liuwei0505@126.com

张菊华 E-mail: 498282528@qq.com

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与试剂

发酵乳杆菌 BLHN3 (*Lactobacillus fermentum*)

BLHN3)分离自发酵剁辣椒,-80℃甘油保藏。

*L*-谷氨酸钠、蔗糖、抗坏血酸、麦芽糖、*D*-甘露醇、甘油,国药集团化学试剂有限公司;海藻糖、脱脂奶粉,上海瑞永生物科技有限公司; $\alpha$ -环糊精,上海麦克林生化科技有限公司;MRS培养基、MRS琼脂培养基,广东环凯微生物科技有限公司;丙酮酸激酶测定试剂盒,苏州科铭生物技术有限公司;三磷酸腺苷酶测定试剂盒、乳酸脱氢酶测定试剂盒,南京建成生物工程研究所。

## 1.2 仪器与设备

EI204-IC 电子天平,瑞士梅特勒-托利多公司;iS10 傅里叶变换红外光谱仪,美国尼高力公司;日立 SU8020 扫描电子显微镜,天美仪拓实验室设备(上海)有限公司;SW-CJ-1C 型超净工作台,苏州市金净净化设备科技有限公司;LDZM-80L-III 型灭菌锅,上海申安医疗器械厂;Avant J-26XP 冷冻离心机,美国贝克曼库尔特有限公司;电热恒温培养箱,中仪国科(北京)科技有限公司;LGJ-25C 冷冻干燥机,四环福瑞科仪科技发展有限公司。

## 1.3 方法

**1.3.1 菌株培养与样品制备** 发酵乳杆菌 BLHN3 以 3%接种至优化培养基中,37℃培养 14 h。将菌液于 4 000×*g* 离心 20 min,去上清液,菌泥用 0.9%无菌 NaCl 溶液洗涤 2 次,加入 1/6 原发酵液体积的冻干保护剂(以 0.9%无菌 NaCl 溶液为对照)。将混合均匀的菌悬液倒入培养皿中,静置 30 min,-80℃预冻过夜,预冻后放入真空冷冻干燥机冷冻干燥,冷阱温度为-55℃,真空度为 10~20 Pa,时间为 24 h。

**1.3.2 单一保护剂对发酵乳杆菌 BLHN3 存活率的影响** 菌泥离心后分别加入以下冷冻保护剂:甘油(5%,10%,15%)、脱脂奶粉(5%,10%,15%)、海藻糖(5%,10%,15%)、*L*-谷氨酸钠(1%,3%,5%)、蔗糖(5%,10%,15%)、麦芽糖(5%,10%,15%)、*D*-甘露醇(1%,3%,5%)、抗坏血酸(1%,3%,5%)、 $\alpha$ -环糊精(1%,3%,5%),以 0.9%无菌 NaCl 溶液为对照,冻干后测其存活率。

**1.3.3 复合保护剂对发酵乳杆菌 BLHN3 存活率的影响** 根据单因素实验结果设计不同的保护剂组合,分别是 3% *L*-谷氨酸钠、3% *L*-谷氨酸钠+

5%麦芽糖、3% *L*-谷氨酸钠+5%脱脂奶粉、3% *L*-谷氨酸钠+5%麦芽糖+5%脱脂奶粉,以 0.9%无菌 NaCl 溶液为对照,冻干后测量其存活率。

**1.3.4 存活率测定** 冻干样品用无菌生理盐水复水至原体积,并将其在无菌盐水中连续稀释,用标准倒板法测定冻干前、后乳杆菌活菌数,37℃静置培养 48 h。存活率计算公式为:

$$\text{存活率}(\%) = N_1/N_0 \times 100 \quad (1)$$

式中: $N_1$  为冻干后样品单位体积的活菌数,CFU/mL; $N_0$  为冻干前样品单位体积的活菌数,CFU/mL。

**1.3.5 扫描电子显微镜测定** 冷冻干燥菌粉用 PBS 清洗 2 次,4℃戊二醛固定过夜,清洗后采用 30%、50%、70%、90%、100%乙醇梯度脱水,每次置换时间 20 min,然后进行临界点干燥和喷金处理,在扫描电子显微镜下观察。

**1.3.6 傅里叶红外测定** 取约 2 mg 样品和约 100 mg 溴化钾研磨均匀,加压至 20 MPa 下压片,进行红外测试,波数范围是 400~4 000  $\text{cm}^{-1}$ ,光谱仪分辨率 4  $\text{cm}^{-1}$ ,信噪比是 50 000:1,扫描 32 次。

## 1.3.7 酶活性测定

**1.3.7.1 无细胞提取液的制备** 将菌体复水后离心,并用无菌生理盐水洗涤 2 次。加入 2 mL 酶提取液进行超声破碎(超声 3 s,间隔 10 s,7 min),然后 4℃,8 000×*g* 离心 10 min 取上清进行酶活测定。

**1.3.7.2 丙酮酸激酶(PK)测定** 将每毫克组织蛋白每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

**1.3.7.3 三磷酸腺苷(ATP)的测定** 将每小时每毫克组织蛋白中的 ATP 酶分解 ATP 产生 1  $\mu\text{mol}$  无机磷的量定义为一个 ATP 酶活力单位。

**1.3.7.4 乳酸脱氢酶(LDH)的测定** 将每克组织蛋白 37℃时与基质作用 15 min 后反应体系中产生 1  $\mu\text{mol}$  丙酮酸定义为 1 个酶活单位。

**1.3.8 冻干菌粉贮藏稳定性研究** 参考 Shu 等<sup>[14]</sup>的方法并稍加修改,将最优保护剂冷冻干燥下的发酵乳杆菌 BLHN3 冻干菌粉分别置于 50,55,60℃水浴锅中进行加速贮藏试验 12 h,定期取样。测量不同温度下的活细胞数。根据下式估算冻干菌粉冷藏下的失活速率常数。

一级反应动力学方程:  $\lg N_0 - \lg N_t = kt$  (2)

Arrhenius 方程:  $\lg k = \lg k_0 - Ea/2.303R \times 1/T$  (3)

式中:  $t$  为采样时间, h;  $N_0$  为菌粉初始活菌数, CFU/mL;  $N_t$  为  $t$  时刻活菌数, CFU/mL;  $k$  和  $k_0$  是速率常数,  $\text{h}^{-1}$ ;  $Ea$  为活化能, J/mol;  $R$  为理想气体常数,  $8.314 \text{ J}/(\text{mol} \cdot \text{K})$ ;  $T$  为绝对温度, K。

### 1.4 统计分析

所测数据由 Excel 软件计算得出, 利用 Origin 8.0 进行数据处理, 采用 SPSS 25.0 和 Duncan 检验进行数据显著性分析, 显著性差异为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 单一保护剂对发酵乳杆菌 BLHN3 存活性影响

不同单一冷冻保护剂对发酵乳杆菌 BLHN3 冻干存活率的影响如图 1 所示。与对照相比, 脱脂奶粉、海藻糖、L-谷氨酸钠、蔗糖、麦芽糖处理组均显著提高了发酵乳杆菌 BLHN3 冻干存活率, 甘油、D-甘露醇、抗坏血酸、 $\alpha$ -环糊精处理组无显著性差异。由图 1 可知, 以 3%、5% L-谷氨酸钠为冻干保护剂的存活效果最好 (53.6%)。谷氨酸钠中的氨基与乳酸菌蛋白质中的羧基发生反应, 可稳定菌体蛋白结构, 维持膜的稳定性。其次是 5% 麦芽糖 (50.8%), 而 10% 和 15% 脱脂奶粉、15% 海藻糖、10% 和 15% 蔗糖为冻干保护剂时存活率为 40%~45%。麦芽糖、海藻糖、蔗糖都属于双糖, 这些双糖具有很高的玻璃化转变温度, 使细胞内水分子具

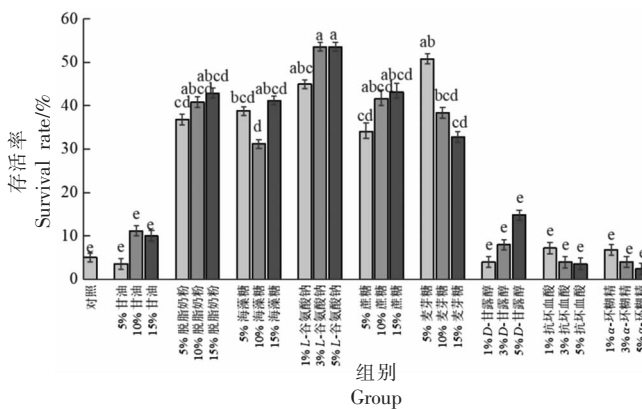


图 1 单一保护剂对发酵乳杆菌 BLHN3 冻干存活率的影响  
Fig.1 Survival rate of *Lactobacillus fermentum* BLHN3 in presence of single cryoprotectant

有高黏度和低流动性, 菌体生长系统更稳定, 细胞活力损伤更小。Basholli-Salih 等<sup>[15]</sup>研究表明双糖不仅可以提高婴儿双歧杆菌冷冻干燥后的活性, 还对  $\beta$ -半乳糖苷酶的活性具有积极的影响。脱脂奶粉能在冻干细胞表面形成保护层, 在乳酸菌冷冻干燥过程中表现优异。Stefanello 等<sup>[16]</sup>的研究表明脱脂奶粉和谷氨酸钠对发酵乳杆菌冻干存活效果最好。You 等<sup>[17]</sup>的研究表明脱脂奶粉对冷冻干燥后的干酪乳杆菌存活率具有积极的影响。醇类物质对发酵乳杆菌 BLHN3 冻干保护效果较蛋白质及糖类差, 这与 Zhao 等<sup>[18]</sup>关于短乳杆菌和酒酒球菌的研究一致。

### 2.2 复合保护剂对发酵乳杆菌 BLHN3 存活性的影响

发酵乳杆菌 BLHN3 在多种复合冷冻保护剂下的冻干存活率如图 2 所示。复合保护剂显著提升发酵乳杆菌 BLHN3 的冻干存活率, 3% L-谷氨酸钠+5%麦芽糖+5%脱脂奶粉的平均存活率最高为 99.27%, 相比 3% L-谷氨酸钠提高了 45.67%, 较对照组冻干菌粉提高了 94.24%。3% L-谷氨酸钠+5%脱脂奶粉的菌株冻干存活率为 74.97%, 3% L-谷氨酸钠+5%麦芽糖可达 66.2%, 相比 3% L-谷氨酸钠, 分别提高了 21.37%和 12.6%, 较对照组分别提高了 69.94%和 61.17%。研究表明复合保护剂较单一保护剂效果更好, 3% L-谷氨酸钠+5%麦芽糖+5%脱脂奶粉为发酵乳杆菌 BLHN3 的最佳冷冻保护剂。

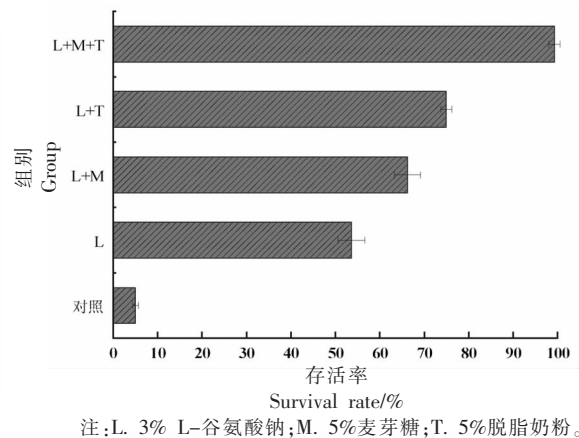


图 2 复合保护剂对发酵乳杆菌 BLHN3 冻干存活率的影响  
Fig.2 Survival rate of *Lactobacillus fermentum* BLHN3 in presence of multiple cryoprotectants

### 2.3 冻干菌粉的扫描电子显微镜分析

冻干发酵乳杆菌外貌形态如图 3 所示。扫描电镜下冻干发酵乳杆菌 BLHN3 形态均呈杆状。保护剂处理前、后的冻干菌体形态差异显著,对照组冻干菌株表面出现皱纹,细胞缩小,表面粗糙,这可能是由于冻干过程中菌体细胞因冷冻失水结构不稳定,内稳态不平衡,同时产生胞内冰晶,损伤细胞膜,造成细胞溶质损伤和机械损伤,所以菌体出现皱缩和损伤<sup>[6]</sup>;而在保护剂作用下的冻干细胞光滑饱满,大多呈完整的杆状,表明添加保护剂很大程度上能有效降低低温和冷冻等不利环境对细胞膜的损伤,保持细胞膜的完整性,维持细胞正常的生理形态,达到保护菌体的作用。冻干细胞在 3% *L*-谷氨酸钠、5% 麦芽糖和 5% 脱脂奶粉作保护剂下细胞形态外貌最好,这与菌体冻干存活率结果一致。刘敏敏等<sup>[19]</sup>研究表明复合保护剂下植物乳杆菌 CGMCC8198 冻干菌粉结构更光滑平整,较未添加保护剂的菌粉冻干效果更好。Han 等<sup>[20]</sup>研究表明副干酪乳杆菌在保护剂作用下可有效减少冻干对细胞膜的损伤。

### 2.4 冻干菌粉的傅里叶红外分析

不同处理条件下发酵乳杆菌 BLHN3 的 FTIR 光谱图如图 4 所示。以冻干前的吸收峰波长为参考,冷冻干燥后未加保护剂的冻干菌粉为对照组,在 3% *L*-谷氨酸钠、5% 麦芽糖、5% 脱脂奶粉作保护剂的冻干菌粉为试验组,二者红外光谱具有明显差异,表明细胞结构发生变化,波谱偏差越大,损伤越大。在约  $3400\text{ cm}^{-1}$  处吸收峰与 O-H 键振动有关,这与冻干细胞的细胞膜有关<sup>[21]</sup>。冻干后对照组、试验组菌粉吸收峰分别为  $3417.73\text{ cm}^{-1}$  和

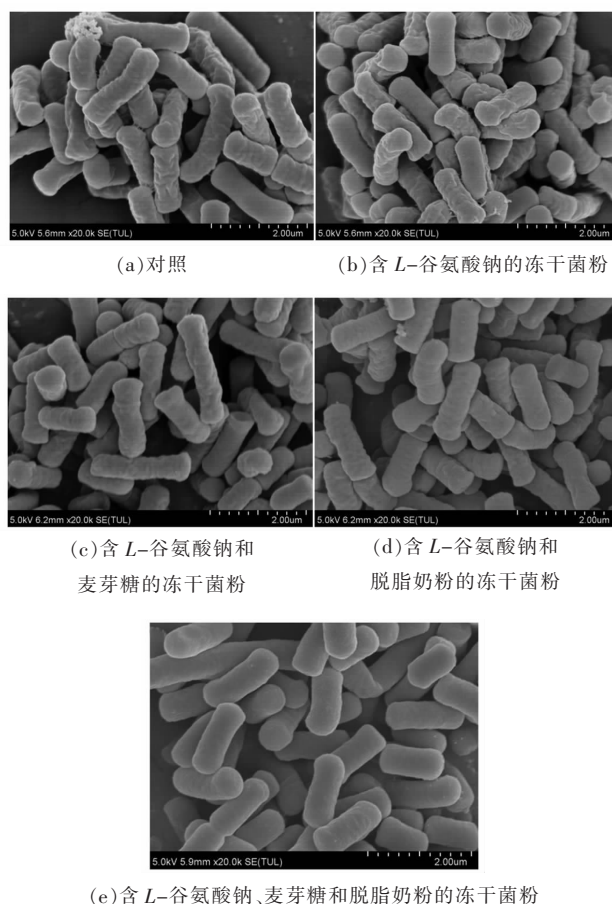


图 3 发酵乳杆菌 BLHN3 冷冻干燥后的扫描电镜图  
Fig.3 Scanning electron microscope image of *Lactobacillus fermentum* BLHN3 after freeze-dried

$3415.69\text{ cm}^{-1}$ , 位移偏差相似,而试验组吸收峰较宽,强度显著强于对照组。在  $2900.00\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰与 C-H 的伸缩振动有关,这也与菌体细胞膜的稳定性息息相关<sup>[22]</sup>。这一波段 C-H 吸收峰变化

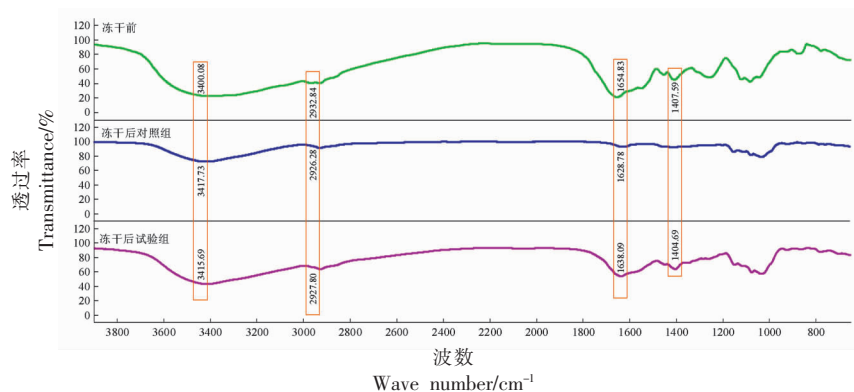


图 4 冷冻干燥前后发酵乳杆菌 BLHN3 的 FTIR 光谱图

Fig.4 FTIR spectra of *Lactobacillus fermentum* BLHN3 before and after freeze-dried

不是很明显,表明保护剂可有效减少不良环境对细胞膜脂质的损伤。 $1700\sim 1400\text{ cm}^{-1}$ 范围出现的峰主要与蛋白质结构的酰胺 I 和酰胺 II 有关。 $1638.09\text{ cm}^{-1}$ 对应于酰胺 I 的 C=O 拉伸振动, $1404.69\text{ cm}^{-1}$ 归因于酰胺 II 的 C-N 拉伸和 N-H 弯曲振动。与冻干前相比,试验组波峰变化较小,这可能与冷冻干燥过程中菌体与保护剂脱脂牛奶发生蛋白质二级结构变化有关<sup>[23]</sup>。对照组的吸收峰几乎消失,表明对照组经冻干后蛋白质结构损伤严重。约  $1000\text{ cm}^{-1}$  处的谱带与菌体中 C-OH 的 C-O 伸缩振动有关,试验组在此区域的波峰变宽,强度显著增加,主要与糖类的 C-O-C 糖苷连接有关<sup>[24]</sup>。

## 2.5 冻干菌粉的酶活性分析

如图 5 所示,以未加保护剂的冻干菌粉为对照组,以 3% L-谷氨酸钠、5% 麦芽糖、5% 脱脂奶

粉作保护剂的冻干菌粉为试验组,试验组 LDH 和 ATP 酶活性显著高于对照组,而 PK 活性没有显著差异。LDH 冷冻干燥后极容易失活,是乳酸菌糖酵解过程中催化丙酮酸还原为乳酸的关键酶,其酶活力大小主要取决于冻干菌粉的细胞活性,冷冻干燥后的乳酸菌菌株存活率越大,LDH 活性越高。Wang 等<sup>[25]</sup>的研究也表明在最佳复合保护剂下,冻干菌粉的活性最高,LDH 酶活性也最高。ATP 酶是一种膜结合酶,广泛分布于细胞膜系统,与膜特性紧密相关,对维持细胞的正常生理功能起着重要作用,冷冻干燥过程中脱脂牛奶和糖类有利于维持细胞膜及质膜的稳定性,从而可提高 ATP 酶活性<sup>[26]</sup>。PK 酶催化糖酵解反应的最后一步,其反应速率是有限的,保护剂对其活性无显著性影响,此结果与 Li 等<sup>[27]</sup>、Wang 等<sup>[28]</sup>的研究一致。

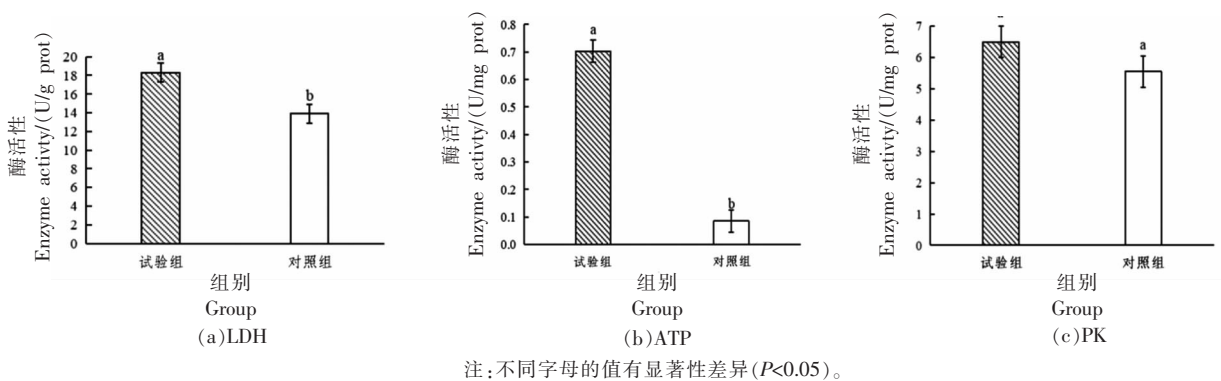


图 5 保护剂对乳酸菌冻干粉的 LDH 酶、ATP 酶、PK 酶活性影响

Fig.5 Effects of cryoprotectants on the activities of LDH enzyme, ATPase, and PK enzyme in freeze-dried *Lactobacillus* powder

## 2.6 冻干菌粉的贮藏稳定性分析

发酵乳杆菌 BLHN3 冻干菌粉分别在 50, 55, 60 °C 下进行加速贮藏试验,每 2 h 进行一次细胞活性测量。根据式(2)和式(3)建立冻干菌粉贮藏动力学曲线和模型,结果如图 6a 所示。

由图 6a 可知,随着时间的增加, $\lg(N/N_0)$  的值不断减小,即发酵乳杆菌 BLHN3 冻干菌粉的存活率不断降低。此外,由各趋势线的斜率可以确定不同温度下发酵乳杆菌菌粉的失活率。结果表明: $k_{50}$  为 0.0984 ( $R^2=0.9827$ ), $k_{55}$  为 0.1155 ( $R^2=0.9617$ ), $k_{60}$  为 0.1832 ( $R^2=0.9919$ )。由 3 种温度下的失活率

可以看出,随着温度的升高,失活率越高,表明温度过高容易损伤细胞,低温贮藏可以降低冻干菌粉细胞死亡率,达到更好的贮藏效果,这与 Gula 等<sup>[29]</sup>、Shu 等<sup>[14]</sup>的研究一致。在低温条件下,乳酸菌细胞膜的饱和脂肪酸含量及比值更高,可以更好地维持细胞膜的完整性。此外,研究表明乳酸菌细胞具有更好的低温耐受性,相比高温条件下易失活效应,低温贮藏减少了对细胞活性及发酵特性的伤害<sup>[30]</sup>。热力学研究还表明细胞在低温条件下,水分子活动速率变慢,对微生物细胞重要代谢功能影响减少<sup>[31]</sup>。

冻干菌粉在长期储藏过程中不可避免受到损伤, 确保冻干菌粉仍具备足够的活细胞水平和良好的特性是其应用的先决条件, 利用 Arrhenius 方程对冻干菌粉的长期储存有一定可预测性<sup>[21]</sup>。根据式(3), 以上述发酵乳杆菌菌粉不同温度下失活

速率常数的对数 $[\lg(k)]$ 与绝对温度的倒数 $(1/T)$ 绘制曲线, 结果如图 6b 所示。根据趋势线方程  $\lg k = -2898.6/T + 7.9408$  ( $R^2=0.9228$ ), 估算冷藏温度时的冻干发酵乳杆菌菌粉的失活速率常数  $k_{-20}$  为  $3 \times 10^{-4}$ 。

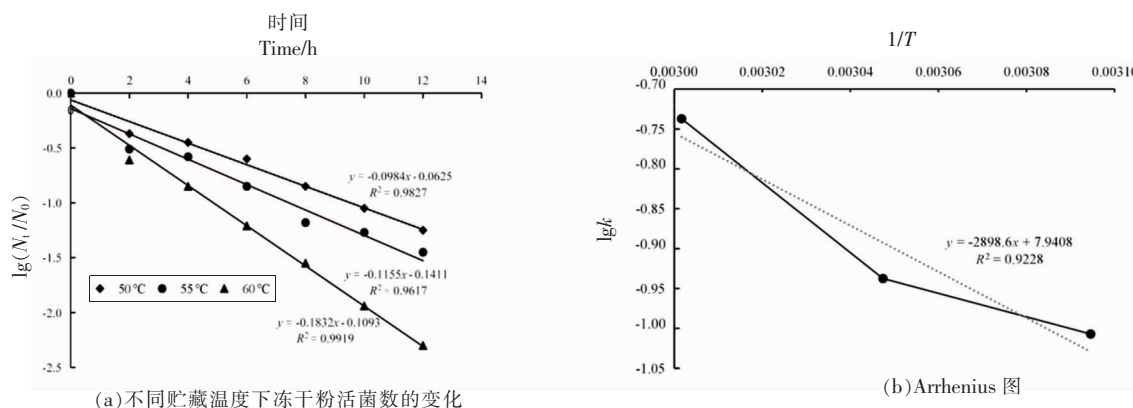


图 6 发酵乳杆菌 BLHN3 冻干菌粉贮藏动力学曲线

Fig.6 The accelerated storage test for *Lactobacillus fermentum* BLHN3 freeze-dried powder

### 3 讨论

本文研究了不同保护剂对发酵乳杆菌 BLHN3 冻干存活率的影响, 结果表明 L-谷氨酸钠、麦芽糖和脱脂奶粉混合物是其最有效的保护剂。Chen 等<sup>[32]</sup>对黄酒发酵剂的研究也得出了类似的结果。不同保护剂对菌体的保护效果不同, 复配保护剂具有协同作用, 可以增强菌株抵抗不良环境的能力。陈延等<sup>[33]</sup>发现谷氨酸钠和脱脂乳结合显著提高乳明串珠菌的冻干存活率。蛋白质类和糖类保护剂也是经典的应用组合。Zayed 等<sup>[13]</sup>研究表明唾液乳杆菌在海藻糖、蔗糖和脱脂牛奶下冻干效果最好。Savedboworn 等<sup>[34]</sup>研究表明植物乳杆菌 TISTR 2075 以蛋白质和海藻糖作保护剂时冻干存活率最高。

细胞膜是维持细胞完整性及保持能量代谢的基础, 冷冻干燥会对乳酸菌细胞膜造成不可逆的损伤, 破坏乳酸菌正常生理代谢, 导致菌体活性降低甚至死亡。扫描电镜结果显示, 发酵乳杆菌 BLHN3 在复合保护剂下冻干后, 菌体饱满光滑, 维持了乳酸菌冷冻干燥过程中细胞膜形态的完整性, 这与苏萍等<sup>[35]</sup>的研究结果一致。FTIR 结果也表明保护剂可以提高乳酸菌冷冻干燥过程中细胞膜脂质和蛋白质的稳定性。这是因为脱脂牛奶能够

稳定细胞膜磷脂双分子层, 避免冷冻干燥过程引起细胞壁和细胞膜皱损、胞内物质泄漏等不良后果<sup>[36]</sup>。麦芽糖可与菌体进行氢键结合或其它相互作用, 提高玻璃化转变温度, 阻碍冰晶的形成, 降低对菌体的破坏<sup>[37]</sup>。谷氨酸钠在冷冻干燥过程中可与微生物蛋白发生氨基反应, 稳定蛋白质结构, 还可防止蛋白质因 pH 值和缓冲盐结晶而变性, 保留更多的残留水分。研究表明以谷氨酸钠为保护剂不仅能提高冻干存活率及贮藏活性, 还能提高冻干菌体的发酵特性<sup>[38]</sup>。

冷冻干燥对乳酸菌细胞膜造成强烈的物理损伤, 还会导致酶的损伤泄漏。酶活试验表明菌体在复合保护剂下冻干后 LDH 酶、ATP 酶活力显著提高, 而 PK 酶无显著变化。Wang 等<sup>[25]</sup>研究表明复合保护剂可以改善细胞膜完整性, 提高乳酸菌酶活性。Cheng 等<sup>[39]</sup>研究表明以 10% 脱脂牛奶、12% 蔗糖、0.767% 酪氨酸和 2.033% 山梨糖醇为保护剂能有效保护发酵乳杆菌 Lf01 细胞膜通透性和结构完整性, 避免细胞内容物的渗漏。潘海博等<sup>[40]</sup>研究也表明复配保护剂可以降低冷冻干燥对乳酸菌关键代谢酶活性的损伤。综上, 在选择保护剂应用于乳酸菌发酵剂生产时, 不仅要考虑对其生存活力的影响, 还要研究其膜脂结构和酶活性的变化。

## 4 结论

本文研究表明发酵乳杆菌 BLHN3 在 3% L-谷氨酸钠、5% 麦芽糖、5% 脱脂奶粉混合保护剂下冻干, 其存活率可以提高到 99.27%, 较对照组及其它保护剂具有显著优势。扫描电镜、FTIR 和细胞酶活性试验表明混合保护剂对于冻干菌粉膜完整性、酶活性方面的改善作用显著优于未加保护剂组。此研究可为高活性发酵乳杆菌 BLHN3 冻干发酵剂的工业化制备提供参考。

## 参 考 文 献

- [1] 时胜阳, 王帅, 梁会朋, 等. 康普茶直投式发酵剂的制备及其发酵性能的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(20): 6577-6584.  
SHI S Y, WANG S, LIANG H P, et al. Preparation of Kombucha directed vat set and its fermentation performance[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2022, 13(20): 6577-6584.
- [2] GUERRERO SANCHEZ M, PASSOT S, CAMPOY S, et al. *Ligilactobacillus salivarius* functionalities, applications, and manufacturing challenges[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106(1): 57-80.
- [3] QIAN B J, XING M Z, CUI L, et al. Antioxidant, antihypertensive, and immunomodulatory activities of peptide fractions from fermented skim milk with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LB340[J]. Journal of Dairy Research, 2011, 78(1): 72-79.
- [4] SILVA L A, PEREIRA LOPES NETO J H, CARDARELLI H R. Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum*: Technological properties, biological activity, and potential application in the food industry[J]. Annals of Microbiology, 2019, 69(4): 321-328.
- [5] NODA M, DANSHIITSOODOL N, SAKAGUCHI T, et al. Exopolysaccharide produced by plant-derived *Lactobacillus plantarum* SN35N exhibits antiviral activity[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2021, 44(12): 1886-1890.
- [6] 苗维娜, 赵亮. 冷冻干燥影响乳酸菌发酵活力机制的研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(21): 36-44.  
MIAO W N, ZHAO L. Research progress on the mechanism of freeze-drying affecting the fermentation activity of lactic acid bacteria[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(21): 36-44.
- [7] 蒋文鑫, 崔树茂, 毛丙永, 等. 短双歧杆菌冻干保护剂的优选及高密度冻干工艺优化[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(9): 31-36.  
JIANG W X, CUI S M, MAO B Y, et al. Optimization of lyoprotectants for high-density freeze-drying *Bifidobacterium breve*[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(9): 31-36.
- [8] KIM S H, OH J K, HWANG I C, et al. Protective effect of cryoprotectants on the viability of freeze-dried *Lactobacillus fermentum* SK152[J]. Journal of Dairy Science and Biotechnology, 2019, 37(3): 206-212.
- [9] AMBROS S, HOFER F, KULOZIK U. Protective effect of sugars on storage stability of microwave freeze-dried and freeze-dried *Lactobacillus paracasei* F19[J]. Journal of Applied Microbiology, 2018, 125(4): 1128-1136.
- [10] CHEN H, TIAN M Q, CHEN L, et al. Optimization of composite cryoprotectant for freeze-drying *Bifidobacterium bifidum* BB01 by response surface methodology[J]. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 2019, 47(1): 1559-1569.
- [11] CHEN H, CHEN S W, CHEN H L, et al. Effects of sugar alcohol and proteins on the survival of *Lactobacillus bulgaricus* LB6 during freeze drying[J]. Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria, 2015, 14(2): 117-124.
- [12] CHEN H, CHEN S W, LI C N, et al. Response surface optimization of lyoprotectant for *Lactobacillus bulgaricus* during vacuum freeze-drying[J]. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 2015, 45(5): 463-475.
- [13] ZAYED G, ROOS Y H. Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage[J]. Process Biochemistry, 2004, 39(9): 1081-1086.
- [14] SHU G W, XIN Y, CHEN L, et al. Comprehensive optimization of composite cryoprotectant for *Saccharomyces boulardii* during freeze-drying and evaluation of its storage stability[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2019, 49(9): 846-857.
- [15] BASHOLLI-SALIHU M, MUELLER M, SALAR-BEHZADI S, et al. Effect of lyoprotectants on  $\beta$ -

- 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.
- [16] 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.
- [17] YOU Q Q, JUAN P, XIE Y P, et al. Optimization of protective agents and freeze-drying conditions for *Lactobacillus casei* LT-L614[J]. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 2019, 13(1): 123-128.
- [18] ZHAO G, ZHANG G. Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 99(2): 333-338.
- [19] 刘敏敏, 席茂盛, 李中媛, 等. 植物乳杆菌 CGMCC8198 冻干菌粉的制备工艺优化[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(21): 9-14.
- LIU M M, XI M S, LI Z Y, et al. Preparation process optimization of *Lactobacillus plantarum* CGMCC8198 lyophilized powder[J]. *Food Research and Development*, 2020, 41(21): 9-14.
- [20] HAN D J, JUN S J, LEECA B H, et al. Cryoprotective effect of turanose on lyophilized *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *L. casei* 431[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2022, 31(3): 343-347.
- [21] 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.
- [22] LAISANA S, MARA G, MARITA G, et al. *Lactobacillus acidophilus* La5 and *Bifidobacterium lactis* Bb12 cell surface hydrophobicity and survival of the cells under adverse environmental conditions[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2012, 40(1): 85-93.
- [23] RAJAM R, ANANDHARAMAKRISHNAN C. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying (Article)[J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2015, 60(2): 773-780.
- [24] SANTOS M, ARAUJO -ANDRADE C, TYMCZYSZYN E, et al. Determination of amorphous/rubbery states in freeze-dried prebiotic sugars using a combined approach of near-infrared spectroscopy and multivariate analysis[J]. *Food Research International*, 2014, 64: 514-519.
- [25] WANG G Q, LUO L Y, CHAO D, et al. Polysaccharides can improve the survival of *Lactiplantibacillus plantarum* subjected to freeze-drying[J]. *Journal of Dairy Science*, 2021, 104(3): 2606-2614.
- [26] TANG M, WARING A J, HONG M. Trehalose-protected lipid membranes for determining membrane protein structure and insertion[J]. *Journal of Magnetic Resonance*, 2007, 184(2): 222-227.
- [27] LI B K, TIAN F W, LIU X M, et al. Effects of cryoprotectants on viability of *Lactobacillus reuteri* CICC6226[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 92(3): 609-616.
- [28] 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.
- [29] GULA L B, CONA A H, GULB O. Storage stability and sourdough acidification kinetic of freeze-dried *Lactobacillus curvatus* N19 under optimized cryoprotectant formulation[J]. *Cryobiology*, 2020, 96: 122-129.
- [30] WANG Y, CORRIEU G, BÉAL C. Fermentation pH and temperature influence the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758[J]. *Journal of Dairy Science*, 2005, 88(1): 21-29.
- [31] JIMENEZ M, PASCUAL-PINEDA L A, FLORES-ANDRADE E, et al. Effect of water activity on the stability of *Lactobacillus paracasei* capsules[J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2015, 60(1): 346-351.
- [32] CHEN C, LIU Z, ZHOU W Y, et al. Comparison of the fermentation activities and volatile flavor profiles of chinese rice wine fermented using an artificial starter, a traditional JIUYAO and a commercial starter[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 716281.
- [33] 陈延, 应铁进. 萧山萝卜干发酵乳酸菌冻干保护剂的优化研究[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(7): 164-170.



- CHEN Y, YING T J. Optimization of stabilizer for lyophilization of *Leuconostoc lactis* from Xiaoshan pickle radish[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(7): 164–170.
- [34] SAVEDBOWORN W, KERDWAN N, SAKORN A, et al. Role of protective agents on the viability of probiotic *Lactobacillus plantarum* during freeze drying and subsequent storage [J]. International Food Research Journal, 2017, 24(2): 787–794.
- [35] 苏萍, 董英, 程新, 等. 植物乳杆菌冻干保护剂的优化及其保护机制[J]. 中国食品学报, 2014, 14(11): 56–63.
- SU P, DONG Y, CHENG X, et al. Optimization and protective mechanisms for cryoprotectant of *Lactobacillus plantarum* CGMCC 6016 [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14(11): 56–63.
- [36] LAKSHMINARAYANA T S, MADHUSUDHAN B. Statistical modelling for optimized lyophilization of *Lactobacillus acidophilus* strains for improved viability and stability using response surface methodology [J]. AMB Express, 2018, 8(1): 129.
- [37] TERPOU A, PAPADAKI A, LAPPA I K, et al. Probiotics in food systems: Significance and emerging strategies towards improved viability and delivery of enhanced beneficial value[J]. Nutrients, 2019, 11(7): 1591.
- [38] KANDYLIS P, DIMITRELLOU D, LYMNAIOU P, et al. Freeze-dried *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized on potato pieces for low-temperature winemaking[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 173(3): 716–730.
- [39] CHENG Z Y, HE X L, WU Z F, et al. Improving the viability of powdered *Lactobacillus fermentum* LF01 with complex lyoprotectants by maintaining cell membrane integrity and regulating related genes [J]. Journal of Food Biochemistry, 2022, 46(8): 46.
- [40] 潘海博, 覃璐琪, 黄燕婷, 等. 人工神经网络结合遗传算法优化保护剂提高罗伊氏乳杆菌抗冻性能[J]. 食品科学, 2021, 42(14): 70–77.
- PAN H B, QIN L Q, HUANG Y T, et al. Artificial neural network-genetic algorithm-based optimization of the formulation of lyoprotectants to improve the freezing resistance of *Lactobacillus reuteri* [J]. Food Science, 2021, 42(14): 70–77.

### Effects of Cryoprotectant to Freeze-dried Survival Rate of *Lactobacillus fermentum* BLHN3

Zuo Mengnan<sup>1</sup>, Liu Wei<sup>3\*</sup>, Quan Qi<sup>1</sup>, Zhang Juhua<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Long Ping Branch, Graduate School of Hunan University, Changsha 410125

<sup>2</sup>Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125

<sup>3</sup>Hunan Agricultural Product Processing Institute, Changsha 410125)

**Abstract** In order to improve the freeze-dried survival rate of *Lactobacillus fermentum* BLHN3, the effect of cryoprotectant on the freeze-dried resistance of *Lactobacillus fermentum* BLHN3 and the storage stability of freeze-dried *Lactobacillus* powder were investigated. The experimental results showed that the survival rate of *Lactobacillus fermentum* BLHN3 was the highest with 3% L-glutamate +5% maltose +5% skim milk, and the number of viable count reached  $1.48 \times 10^{11}$  CFU/g. Scanning electron microscopy showed that cryoprotectants could maintain the integrity of the cell membrane of *Lactobacillus* after freeze-dried. The FTIR results showed that the cryoprotectant could reduce the damage of freeze-dried cells by binding with the cells. The activities of lactate dehydrogenase (LDH) and ATPase were significantly increased, but the pyruvate kinase (PK) activity was not significantly different after freeze-dried. In addition, the accelerated storage test showed that low temperature storage was an effective method for the preservation of powder. Conclusion: *Lactobacillus fermentum* BLHN3 could be prepared into a high activity freeze-dried starter with 3% L-glutamate sodium, 5% maltose, 5% skim milk as cryoprotectants.

**Keywords** *Lactobacillus fermentum* BLHN3; cryoprotectant; freeze-dried; freeze-dried starter