

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. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022040274

MIAO Weina, ZHAO Liang. 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. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022040274

· 青年编委专栏—益生菌与抗菌肽 (客座主编: 孙志宏、付才力) ·

# 冷冻干燥影响乳酸菌发酵活力机制的研究进展

苗维娜<sup>1</sup>, 赵亮<sup>1,2,\*</sup>

(1. 功能乳品教育部北京市共建重点实验室, 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083;

2. 中国农业大学益生菌研究中心, 中国农业大学营养与健康系, 北京 100190)

**摘要:** 乳酸菌是食品中常用的发酵菌株或益生菌, 常以冻干粉的形式应用于工业生产。冻干过程中的脱水及低温等条件对乳酸菌形成胁迫, 造成菌株活力下降甚至死亡。冻干粉中菌株活菌数或发酵活力是乳酸菌冻干粉的重要指标。目前大部分研究集中在解析菌株抗冻干机制以及提高菌体冻干存活率等技术, 本文围绕乳酸菌发酵活力指标, 综述了冷冻干燥过程中影响发酵活力的因素, 阐述了细胞膜流动性、通透性和细胞膜损伤异质性等对乳酸菌发酵活力的作用及机制, 为进一步阐明冷冻干燥影响乳酸菌发酵活力的途径, 开发提高乳酸菌冻干粉发酵活力的技术提供依据。

**关键词:** 乳酸菌, 冷冻干燥, 发酵活力, 细胞膜, 异质性

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)21-0036-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022040274



本文网刊:

## Research Progress on the Mechanism of Freeze-drying Affecting the Fermentation Activity of Lactic Acid Bacteria

MIAO Weina<sup>1</sup>, ZHAO Liang<sup>1,2,\*</sup>

(1. Key Laboratory of Functional Dairy, College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. Research Center for Probiotics, Department of Nutrition and Health, China Agricultural University, Beijing 100190, China)

**Abstract:** Lactic acid bacteria (LAB) are commonly used as fermentation strains or probiotics in food. The main application form of LAB in the industry is freeze-dried powder. During freeze-drying, formation of ice crystals and dehydration could damage LAB cells, resulting in decreased metabolic activity or even cell death. The viable count or fermentation activity are important quality indices of the freeze-dried powder for lactic acid bacteria. At present, viability derived freeze-drying stress response mechanisms and survival improvement technology are gained widespread attention. In this study, the factors affecting fermentation activity in freeze-drying process are reviewed. And the effects and mechanisms of cell membrane fluidity, permeability, and heterogeneity of cell membrane damage on the fermentation activity during the freeze-drying were expounded. The study provides a basis for the further clarifying mechanism of freeze-drying affecting the fermentation activity of LAB. It also promotes the development of freeze-drying technique for LAB.

**Key words:** lactic acid bacteria; freeze-drying; fermentation activity; cell membrane; heterogeneity

乳酸菌冷冻干燥是将乳酸菌细胞悬浮液在冰点

以下温度预冻后, 置于真空环境, 通过冰晶在低温条

收稿日期: 2022-04-24

基金项目: 国家自然科学基金 (32072196)。

作者简介: 苗维娜 (2001-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品微生物, E-mail: miaoweinav@163.com。

\* 通信作者: 赵亮 (1983-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品微生物, E-mail: lzhaol@cau.edu.cn。

件下升华的原理脱除水分,制成冻干粉的技术<sup>[1]</sup>。该方法主要以微生物的生理、生化特点为依据,抑制菌株的代谢、生长和繁殖,使菌株达到休眠状态,来保持菌株的原有特性<sup>[2]</sup>。冷冻干燥法最早的雏形可以追溯到 16 世纪初,现代的冷冻干燥技术发明于 20 世纪 60 年代初期<sup>[3]</sup>。乳酸菌冻干粉有活菌数多、接种体积小、运输方便、贮藏期长的优点,因此冷冻干燥技术被国内外广泛应用于乳酸菌发酵剂的制备<sup>[3]</sup>。

冷冻干燥法是有用的菌株保存手段,但也会导致乳酸菌损伤,甚至死亡<sup>[4]</sup>。在冻干过程中,低温和干燥环境的胁迫会对乳酸菌细胞的结构和生理功能造成损害,如冰晶引起的机械损伤、溶质损伤、细胞膜损伤、关键酶的失活和 DNA 结构的改变等。乳酸菌发酵活力会随着细胞受损而下降,影响菌株工业化应用。

在食品生产与加工过程中,乳酸菌保持较高的存活率和细胞代谢活力是其充分发挥益生功能的保障<sup>[5]</sup>。目前大多数研究都集中在如何提高发酵剂中的活菌数量,研究时通常将存活率作为评价乳酸菌冻干粉性能的唯一指标。然而对于用作发酵剂的乳酸菌,其冻干粉的发酵活力指标则更为重要,可直接决定其生产性能,但发酵剂活菌数量与发酵活力之间不能直接关联<sup>[6]</sup>。因此,为了提高冻干粉的发酵性能,需要研究影响乳酸菌冻干粉发酵活力的因素及其机制。本文综述了冷冻干燥过程中影响乳酸菌冻干后发酵活力的主要因素,包括菌株遗传特性、培养条件、冻干工艺、保护剂以及贮藏和复水条件等,分析了细胞膜稳定性对乳酸菌冻干粉发酵活力的重要影响,并基于细胞膜损伤异质性分析了菌株活菌数与发酵活力的关系。本文将为乳酸菌冻干耐受机制研究,以及发酵剂活性提升技术的开发提供思路。

## 1 冷冻干燥过程中影响乳酸菌发酵活力的因素

冷冻干燥过程中影响乳酸菌冻干后发酵活力的因素主要有以下几个方面:内部因素有菌株遗传特性决定的菌体形状、乳酸菌细胞膜上的脂肪酸和脂质组成<sup>[7]</sup>、膜蛋白的构象改变<sup>[8]</sup>、胞外多糖(EPS)的种类与含量<sup>[9]</sup>等;外部因素有冻干保护剂成分、冷冻干燥工艺参数、培养条件等。

### 1.1 菌种遗传特性

不同菌属或者同一菌属的不同菌株,因其遗传物质的不同而在冷冻干燥过程中表现出的抵抗适应能力差异明显<sup>[3,10-11]</sup>。菌体形状会影响菌株的抗冻干能力,一般情况下,球菌的抗冻干能力比杆菌强,杆菌中短杆状菌比长杆状菌抗冻干能力强,原因可能是球菌的比表面积较小,减少了冰晶对细胞膜造成的机械损伤<sup>[12]</sup>。另外,不同种属的菌株细胞膜脂肪酸等的组成也各不相同,而脂肪酸组成会影响菌株抗冻干能力<sup>[11]</sup>。如 Li 等<sup>[13]</sup>发现酸性条件胁迫下酒酒球菌具

有更高的耐冻干能力,同时检测到其细胞膜中棕榈酸含量降低,环丙烯脂肪酸含量增加,这证明了酒酒球菌细胞膜脂肪酸组成会影响菌体的耐受性;于小青<sup>[14]</sup>探究了 12 种植物乳杆菌的菌株差异、脂肪酸组成差异与冷冻干燥存活率的关联,通过施加低温胁迫并检测细胞膜上脂肪酸组成,发现低温条件下 12 种菌株的膜脂肪酸均有向不饱和转变的趋势,(以 C18:1 为例)转化后 C18:1 含量增加的菌株冻干后细胞膜完整性及流动性、乳酸脱氢酶以及 ATP 酶比活力等保存较好,使菌株冻干粉发酵活力保存较高。因此,菌株遗传特性造成细胞膜脂肪酸的组成差异,从而影响了菌株的耐冻干能力和发酵活力。

### 1.2 培养条件

乳酸菌冻干粉制备前,会经过菌体培养富集的过程。菌株培养过程中培养基组成、培养温度、pH 等均会对菌株抗冷冻干燥性能有一定的影响。

研究表明,培养基成分对乳酸菌抗冻干能力发挥重要作用<sup>[15]</sup>。通过调控培养基组成可以增强乳杆菌生理活性、促进生物膜形成和改变细胞膜饱和/不饱和脂肪酸比例<sup>[16]</sup>。碳源和氮源的比例可以影响乳酸菌的抗冻能力<sup>[17]</sup>,尚一娜等<sup>[18]</sup>以益生菌植物乳杆菌 LIP-1 为研究对象,通过调整碳源氮源比例得到的最优培养基配方可以显著提高冻干存活率,同时提高冻干粉高密度发酵的活菌数。E 等<sup>[19]</sup>研究发现钾离子可以促进细胞膜形成,提高冻干后的细胞活力。通过调整培养基中碳源和氮源的比例,添加无机离子如钾离子、钙离子等,都可以提高冻干后乳酸菌发酵活力。针对不同菌株开发适宜其特点的优化培养基可以增强菌株活性,减少存活率和发酵活力损伤,有效提高菌株抗冷冻的能力。

通过改善培养环境而得到具有高抗冻干能力的菌株,对工业生产高活力乳酸菌冻干粉起到事半功倍的作用。如李明慧等<sup>[20]</sup>发现在最佳条件(pH6.7、培养温度 36 °C、接种量 8.8%)下培养植物乳杆菌 LIP-1 可以显著提高冻干后发酵活菌数及冻干存活率,这证明改变培养条件可提高植物乳杆菌 LIP-1 的冷冻干燥存活率和高密度发酵活性。

乳酸菌培养有最适温度和 pH,偏离最适条件会诱导菌体产生应激反应,一定程度上胁迫应激反应会产生交叉保护效果,能够提高菌体的耐受能力。如王晓萌等<sup>[21]</sup>通过优化冻干前的嗜酸乳杆菌冷休克处理条件(8 °C 冷休克处理 15 h),使其冻干存活率比未冷休克、添加冻干保护剂的菌体显著提高(提高了 17.65%)。杨婕等<sup>[22]</sup>通过研究单因素胁迫:酸胁迫(pH3.2、3.8、4.0、4.5、5.0)静置 90 min,冷胁迫(4、10 °C)静置 180 min,确定了能提高发酵活性的最佳胁迫条件。进一步研究发现对发酵乳杆菌 ATm 进行 pH4.5 处理 90 min、4 °C 处理 180 min 的酸-冷交互胁迫能够显著提高细胞冷冻干燥存活率及酸化速率,优于单因素胁迫。酸-冷交互胁迫能维持细胞膜

完整性、保护菌株冻干后部分酶活性(乳酸脱氢酶和ATP酶),从而显著提高菌株发酵活力。不同胁迫的作用机制和效果不同,冷胁迫可以通过改善细胞膜流动性、刺激冷应激蛋白(如保加利亚乳杆菌LM1冷应激蛋白)表达<sup>[17]</sup>起到提高菌株冻干存活率的作用;酸胁迫可以通过提高酶活性、加速糖酵解<sup>[23]</sup>等途径保存发酵活力;而交互胁迫综合各胁迫作用机理,对发酵活力的提高效果更显著。但是,胁迫条件具有菌株特异性,同时交互胁迫对预处理条件要求更为严格,针对不同菌株进行具体研究才可能投入实际应用。

### 1.3 冷冻干燥工艺

冷冻干燥过程主要包括预冻和干燥两部分:首先通过预冻步骤将细胞内水分冻结成冰晶,便于脱除。再通过初次干燥、二次干燥分别除去细胞内外的游离水和结合水,降低水分活度,使微生物保持在较低的生命活动状态。工业上一般采用平板式冻干机进行乳酸菌冻干粉制备,可以实现冻干曲线的实时监控和参数控制。冻干曲线是温度、压力与时间之间的关系曲线<sup>[24]</sup>,由冻干各阶段的具体参数设计而成,对冻干效果影响显著。因此工业上主要通过控制冻干曲线达到制备高活力的冻干发酵剂的目的。预冻阶段可通过控制预冻温度和时间提高菌株冻干存活率<sup>[15]</sup>和发酵活力,如龚虹等<sup>[25]</sup>对植物乳杆菌进行产酸、生物膜形成能力及抗氧化能力的检测确定最佳预冻时间为-40℃下2h,此时菌株产酸速率较高,形成膜能力较强,且具有一定的抗氧化能力;干燥阶段主要控制冷阱温度和冻干时间等参数,如徐长隆等<sup>[26]</sup>发现植物乳杆菌H0808在冻干时间为56h、冷阱温度-50℃时活菌数最高。由于不同菌株的含水量和组成不同,针对特定菌株开发的冻干曲线不仅可以提升工业生产效率,还能优化冻干效果、提高冻干粉发酵活力。

另外,为了提高冻干技术的效率,还可将冻干技术与其他技术结合。如通过红外射频技术<sup>[27]</sup>辅助干燥过程,降低能耗的同时提高冻干发酵剂中活菌数。冷冻干燥的预冻过程存在耗时长、控制速率难等问题,而液氮深冷技术<sup>[28]</sup>通过将菌泥和保护剂混合物滴入装有液氮的容器中形成球状颗粒,实现了快速预冻和造粒,降低了冷冻过程对菌体的损伤,使得液氮处理后菌体具有更高的发酵产酸能力(与原菌液相近),相比直接冷冻干燥处理 $\beta$ -半乳糖苷酶、LDH活性也更高,这说明深冷处理后细胞膜完整性保持更好,具有更高的发酵活力。液氮深冷使细胞在极短时间内经历超低温处理,胞内形成较小冰晶体,对细胞和细胞膜的损伤较小。

综上,在冻干工艺方面,可以针对菌株特性、利用冻干曲线确定最佳工艺参数来提高菌株冻干后的发酵活力,也可以通过结合液氮深冷等技术改进现有工艺,减少冻干过程对菌体的损伤,获得高发酵活性的发酵剂。

### 1.4 冻干保护剂

冻干保护剂在冷冻干燥过程中对乳酸菌有不同程度的保护作用,可以减少细胞受损和死亡。保护剂按照渗透性可以分为渗透、半渗透和不渗透三类。渗透保护剂主要是能够透过细胞壁和细胞膜的小分子,可调节细胞内外渗透压<sup>[16]</sup>。如常用的甘油就是典型的渗透型保护剂,通过改善细胞膜的流动性,抑制细胞过度脱水形成冰晶来保护菌株。半渗透保护剂只能透过细胞壁无法透过细胞膜,可以分布在细胞壁和细胞膜之间阻止冰晶生长<sup>[29]</sup>。一般包括一些小分子糖,如蔗糖<sup>[30]</sup>、海藻糖<sup>[31]</sup>等,其含有的游离羟基能够与细胞膜上磷脂结合形成氢键,为细胞提供机械保护。公丕民<sup>[32]</sup>发现海藻糖可以在干燥过程中提高菌株的发酵活菌数和产酸能力,这与海藻糖具有的抗脱水、冷冻、高温、氧化等胁迫<sup>[33]</sup>的保护机制有关。而不渗透保护剂只能在细胞外侧提供保护,如乳清蛋白<sup>[34]</sup>、脱脂乳<sup>[35]</sup>。这类大分子吸附在细胞外侧,可以提供一个相对封闭的环境,从而阻止细胞与冰晶和氧气的接触,减少菌株损伤<sup>[36]</sup>。如刘飞等<sup>[37]</sup>发现用普鲁士多糖作为冻干保护剂不仅可以显著提高保加利亚乳杆菌的存活率,还能在长期保藏中保护菌种活力。

将多种保护剂以一定的比例进行复配能够使其保护细胞的效果更好,提高活菌数和发酵活力。杨辉等<sup>[38]</sup>以发酵果渣的复合乳酸菌为研究对象,优化了冻干保护剂配方(低聚木糖、菊糖、NaHCO<sub>3</sub>且添加量分别为14.5%、6.28%、0.92%),冻干菌粉与空白组相比存活率提高了68.27%。辛明等<sup>[39]</sup>优化了植物乳杆菌L5、L12的冻干保护剂中脱脂乳、海藻糖和硫酸锰的比例,发现发酵液pH降低速度较快且终点pH较低,说明优化后发酵剂生长快、产酸能力较好。赵延胜等<sup>[40]</sup>发现添加了菊粉复合保护剂的植物乳杆菌冻干粉活化后生长快、产酸能力强、还原糖和总糖消耗速度快,总体效果优于脱脂乳复合保护剂组,且维持的发酵活力较高、接近菌液水平。综上所述,保护剂的不同成分和配比对乳酸菌的发酵活力和冻干存活率有着显著的影响。

但是,菌株之间存在很大差异,并且不同种类的保护剂保护机制不同,因此并不能找到一种普适的保护剂配方可以有效地保护所有乳酸菌。例如,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的最佳保护剂配方<sup>[41]</sup>;而Cheng等<sup>[42]</sup>研究发现,发酵乳杆菌L2加入10%脱脂乳、7%海藻糖、2%山梨醇和0.6%酪氨酸的复合冻干保护剂冻干后,存活率高达92%,植物乳杆菌L1在10%脱脂牛奶、13%蔗糖、2%山梨糖醇和0.8%酪氨酸的复合保护剂保护下,冻干存活率高达97%。此外,在最佳复合保护剂存在下可以检测到两菌株的细胞膜中不饱和脂肪酸的含量增加,例如油酸(C18:1)和C19cyc11,细胞膜完整性得到维持、 $\beta$ -半乳糖苷酶和乳酸脱氢酶泄露减少,从而较好地保持了



两菌株冻干的发酵活力。因此,针对不同的菌株,需要独立研究而不能套用其他菌株的最佳保护剂配方来提高冻干后菌株发酵活力,以便实现不同的冻干后特性。

### 1.5 贮藏和复水

冻干后,冻干粉的包装和贮藏条件是影响乳酸菌发酵剂中活菌数和活力的重要因素之一。冻干粉的稳定性一般随着贮藏时间延长而降低,低温保藏可以较好地保存冻干粉中菌株活力<sup>[43]</sup>。马雁等<sup>[44]</sup>发现乳杆菌 grx07 长期储藏的适宜温度为 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,贮藏 12 个月活化后发酵 pH 达到 4.30,优于对照组( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ )的 4.83,同时 $\beta$ -半乳糖苷酶、乳酸脱氢酶的活力仍保持在贮藏前的 80% 以上,与对照组酶活(65%)相比得到了较好的保存。此外,贮藏环境的气体成分和氧气含量<sup>[45]</sup>也是影响冻干粉保藏活性的重要因素。张晓宁<sup>[46]</sup>研究发现,真空环境贮藏冻干后的植物乳杆菌 LIP-1 存活率最高,氮气次之,有氧环境最差,同时发现真空贮藏条件下菌株的 $\beta$ -半乳糖苷酶、乳酸脱氢酶及 $\text{Na}^+\text{K}^+-\text{ATP}$  酶酶活均显著高于氮气贮存和氧气贮藏条件,因此在氧气含量低的环境贮藏有利于冻干菌粉活菌数的提高和发酵活力的保存。

复水是乳酸菌冻干粉菌株从休眠向复苏转变的过程<sup>[47]</sup>。复水液的渗透压、成分等都会对菌体活力产生影响<sup>[48]</sup>。朱东升<sup>[49]</sup>使用四种不同营养成分的复水介质(生理盐水、无菌水、MRS 培养基和 10% 脱脂乳)复水乳酸菌后发现,生理盐水组存活率最高,可能因为生理盐水在复水时有减少细胞内外渗透压的作用,使菌体不易受到再次损伤。Valdez 等<sup>[50]</sup>通过研究 16 株不同乳酸菌发现,稀溶液会显著提高乳酸菌的复水活力,但是用蒸馏水会导致菌株活力下降显著。同时,实验还发现不同成分的复水液会使乳酸菌冻干后修复细胞损伤的能力存在显著差异,在检测的 16 株乳酸菌中,苹果酸对嗜酸乳杆菌 ATCC 4356、发酵乳杆菌 ATCC 9338 和奶油乳杆菌 CRL242 的损伤细胞有明显修复作用;磷酸根对发酵乳杆菌复水后活力的提升作用最强;这表明成分相同的复水液对不同菌株活力的抑制或促进作用与菌株特异性有关。综上,冻干粉的贮藏条件和复水液的成分、渗透压等通过影响乳酸菌的冻干存活率、发酵关键酶活力和菌体细胞活力来影响乳酸菌转化为活菌状态后的发酵活力。同时能够保护菌体活力的最佳复水液配方与菌株特异性密切相关,需要针对不同菌株进行具体研究。

## 2 冻干过程中细胞膜稳定性对发酵活力的影响

细胞膜具有隔离菌体与外部环境、保护乳酸菌的重要作用。由于乳酸菌中的碳水化合物、能量代谢相关酶一般附着在细胞膜上,冻干过程导致的细胞膜损伤、稳定性变化对冻干后菌体活力影响显著<sup>[51]</sup>。研究发现,冻干后乳酸菌发酵活力下降的原因可能是

冻干使菌体细胞膜完整性和稳定性(包括流动性、通透性等)受损且无法修复,导致代谢酶流失,酶活力下降及菌体生理代谢能力受损;进一步分析冻干对细胞膜损伤机制发现,冷冻干燥会引起细胞膜不饱和脂肪酸含量显著上升,并且部分菌株冻干受损程度较大可能与细胞膜脂肪酸调节能力弱有关;同时,出现细胞膜损伤异质性是菌株冻干后存活率高但发酵活力低的主要原因<sup>[52]</sup>。本部分将重点介绍冷冻干燥过程中细胞膜稳定性变化及其对冻干后菌体发酵活力的影响。

### 2.1 细胞膜流动性对发酵活力的影响

冷冻干燥过程中细胞膜流动性变化使细菌冻干耐受力下降,生理代谢能力受损、发酵产酸速率下降,导致冻干后乳酸菌发酵活力的损失<sup>[53]</sup>。已有研究证明,冷冻干燥会导致细胞膜流动性的变化。如乔颖等<sup>[54]</sup>通过透射电子显微镜发现嗜热链球菌冷冻后细胞膜部分消失,细胞质成团聚集,细胞膜流动性下降。李宝坤<sup>[3]</sup>和王学良<sup>[55]</sup>分别利用 DPH 作为荧光探针来测定冻干后保加利亚乳杆菌和胚芽乳杆菌 ST-III 的细胞膜流动性,结果发现细胞膜流动性与菌体活力具有相关性。因此,可以通过提高细胞膜流动性提高菌株对不良环境中的抗性,使冻干后菌株的发酵活力得到较好保存。

在冷冻干燥的过程中,乳酸菌细胞膜流动性变化与其细胞膜脂肪酸组分的特异性变化有关<sup>[56]</sup>,调节细胞膜饱和/不饱和脂肪酸的比例有助于抵抗冻干造成的膜流动性下降,从而调节菌株发酵活力。不饱和脂肪酸因其熔点较低,能够增强细胞膜的流动性,因此含量较高时有助于增强细胞对恶劣环境的耐受能力<sup>[57]</sup>。另外,不饱和脂肪酸中的环丙烷脂肪酸因其为环状结构,化学性质稳定,减少了不饱和脂肪酸向饱和脂肪酸的转化,有利于提高细胞膜脂肪酸的不饱和度,一定程度上也可以增强乳酸菌的耐受能力<sup>[58]</sup>。如陈境等<sup>[59]</sup>在初始 pH6.8 和 7.4 的条件下培养乳酸菌,发现初始 pH 为 6.8 时可提高植物乳杆菌 LIP-1 细胞膜不饱和脂肪酸的含量、提高细胞膜的流动性,通过保持冻干过程中酶活性来提高菌株发酵酶活力。张晓宁等<sup>[60]</sup>发现特定配方的优化培养基可以显著提高菌株细胞膜中不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比值和环丙烷脂肪酸的含量,增加了细胞膜的流动性,减少了细胞膜冻干损伤。同时检测发酵过程中 pH 和滴定酸度变化发现优化组的 pH 下降较快且发酵时间较短,发酵结束的时间显著快于对照组( $P<0.05$ ),可见优化培养基后菌株较对照组的乳酸脱氢酶的活力更高,发酵性能更好。这说明优化培养基通过增加菌株冻干后的细胞膜流动性,提高了冻干菌粉的发酵活力。

因此,冷冻干燥中细胞膜流动性降低会削弱菌体的冻干耐受力,如检测到菌株活力和代谢产酸速率下降等,导致发酵活力损失;但通过改变培养基成分或培养条件可以改变细胞膜脂肪酸组成,改善细胞膜

冷冻干燥后的流动性,从而改善冻干后菌株的发酵性能。

## 2.2 细胞膜通透性对发酵活力的影响

细胞膜是分隔细胞内外环境的屏障,如果细胞膜的完整性受损,通透性增加,会使细胞内的关键代谢物质流失(例如与发酵相关的酶等),从而导致乳酸菌冻干后发酵活力损失。王飏等<sup>[61]</sup>研究发现德氏乳杆菌保加利亚亚种的细胞膜在冻干前后通透性有显著增加,并与活力的损失成反相关关系,说明在冻干过程中细胞受到了损伤,细胞膜通透性的改变可能是导致乳酸菌在冻干过程中致死和失活的原因之一。李明慧等<sup>[8]</sup>研究发现冻干后乳酸菌细胞膜完整性受损、细胞膜通透性增大,导致发酵相关酶泄露,胞内酶活力显著降低。因此,冷冻干燥过程中乳酸菌细胞受损、膜通透性增大可能是冻干菌株发酵活力损失的关键因素。

Mimoza 等<sup>[62]</sup>测定添加和未添加保护剂的婴儿双歧杆菌 UV16PR 菌株冻干后胞外 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力,发现未添加保护剂的菌株冻干后胞外酶活力显著高于添加了保护剂的样品,证明冷冻干燥导致细胞膜渗透性增大,使 $\beta$ -葡萄糖苷酶保留率下降并且活力降低,因此冻干后菌株的存活率和发酵活力下降。焦琳等<sup>[63]</sup>通过实验发现添加保护剂配方的组发酵活力较高,扫描电镜观察下可见该组菌体细胞完整,表面光滑,直观地表明了该组菌体在冻干过程中受到的细胞膜完整性、形态和生理结构方面的损伤较小。综上,减少冷冻干燥过程对菌体细胞膜的损伤、更好地保存冻干后细胞膜完整性和通透性,提高发酵相关酶的保留率可以增强发酵酶活力,有利于提高冻干粉的发酵活力。

## 2.3 细胞膜损伤的异质性对发酵活力的影响

在以往研究中,以菌体增殖为基础的菌落计数技术(如平板计数)被广泛用作活力测定的方法。然而,近年来研究发现了菌落计数方式的缺陷<sup>[64-65]</sup>。研究表明,乳酸菌功能特性依赖于菌株代谢活动,而不是细胞复制<sup>[66]</sup>。实验室中菌株的分裂形成菌落能力与代谢能力不直接相关<sup>[59]</sup>。因此,活菌数较高的冻干发酵剂可能由于菌株代谢发酵能力差而使发酵活力偏低。

目前已有研究发现乳酸菌在酸<sup>[67]</sup>、碱<sup>[68]</sup>和啤酒花<sup>[69]</sup>等胁迫条件下会出现损伤异质性,产生一种损伤菌亚群。应用流式细胞术(FCM)结合荧光探针检测发现,损伤菌亚群虽然仍存活,但在不同生理参数上明显区别于总群体中的活菌亚群,例如细胞膜完整性受损、细胞内酶活性降低、细胞活力下降和膜电位部分丧失等<sup>[70]</sup>。冷冻干燥过程同样会使乳酸菌损伤出现异质性。Rault 等<sup>[71]</sup>通过 FCM 荧光探针测定四种冷冻后的德氏乳杆菌,鉴定出三个主要亚群:活菌亚群、损伤菌亚群和死菌亚群。随冷冻胁迫时间延长,菌株的损伤细胞比例下降、死细胞比例上升。

Kramer 等<sup>[72]</sup>发现冷冻干燥后的嗜酸乳杆菌和动物双歧杆菌均出现了 10%~15% 的损伤细胞,低温储藏 90 d 发现死细胞比例显著增加(约 10%),同时活菌比例变化较小,这表明该实验中两菌株的损伤菌更容易失活甚至死亡。由于菌株在胁迫条件下产生的损伤亚群可能处在一种存活但低活性的状态,胁迫后的菌株虽然“存活亚群”数量较多,但是细胞活力弱、代谢能力低,这可能是相同活菌数下冻干粉发酵活力有差异的主要原因<sup>[69]</sup>。对乳酸菌的不同亚群生理差异研究较少,但在其他种属的细菌中已发现这一现象。如 Li 等<sup>[73]</sup>发现超声和温和加热联合使用会使金黄色葡萄球菌处于亚致死状态,此时菌株的膜损伤和脂肪酶抑制是同步的,说明损伤菌体亚群虽然存活但代谢能力确实有所降低;Shao 等<sup>[74]</sup>发现欧姆加热胁迫导致金黄色葡萄球菌出现生理损伤,存活率虽然高,但是检测发现菌株形成生物膜、发酵甘露醇的能力降低,并且溶血能力和凝固酶活性也有所降低。

对于乳酸菌,本课题组研究发现,通过流式细胞术检测冻干后的副干酪乳杆菌 L9 和 LC01 均出现了三种形态的菌体:完整菌、损伤菌和死亡菌。对比两菌株实验结果发现,损伤菌比例较高且经过活化后短时间内仍不能恢复活力,可能是导致副干酪乳杆菌 L9 冻干后存活率与 LC01 相近,但发酵活力损失显著的原因<sup>[50]</sup>。

综上,乳酸菌在冷冻干燥胁迫下会产生响应不同的亚群,其中,能够存活但生理功能已经丧失的“损伤菌体亚群”尤为重要,因为在存活率计算时,它们被认为是存活的菌体,但由于细胞活力弱、发酵能力下降,所以在发酵活力测定时成为了失活群体,导致冻干发酵剂存活率较高但发酵活力损失显著。因此乳酸菌在冷冻干燥胁迫下出现部分损伤菌体,单纯用冻干存活率评价发酵剂可能存在不足,同时有必要开展乳酸菌冻干胁迫异质性研究,明确损伤亚群出现的机制,分析影响损伤亚群比例的因素,从而针对性提高乳酸菌冻干粉的发酵活力。

## 3 结语

在冷冻干燥处理后仍保持较高的发酵活力是提高乳酸菌发酵剂性能和充分发挥乳酸菌益生功能的重要条件。影响冷冻干燥后乳酸菌发酵活力的因素主要分为内部和外部两大部分,如培养基成分、冻干工艺、菌体遗传性质等多个方面。由于细胞膜可以使菌体与外部环境隔离,是保护乳酸菌的主要屏障,因此细胞膜稳定性在众多影响因素中非常关键。细胞膜稳定性主要包含了细胞膜流动性对生长速率的影响,细胞膜通透性对关键代谢物质,如发酵相关酶(如 $\beta$ -半乳糖苷酶、乳酸脱氢酶)流失的影响等不同方面。尤其是细胞膜损伤异质性,可能是导致冻干乳酸菌发酵剂存活率高但发酵活力低下的原因。因此,通过对冷冻干燥胁迫中乳酸菌细胞膜稳定性机制等的进一步探究,并结合菌体不同的细胞膜特性可提高



乳酸菌的抗冷冻干燥能力。

为了提高乳酸菌在食品中的应用水平, 目前已经开展了大量以提高冻干乳酸菌活菌数为目标的研究探索, 未来需要针对冻干后乳酸菌发酵活力的变化, 深入解析其机制, 明确细胞膜稳定性与发酵活力的量效关系, 进一步分析菌株细胞膜组成、酶表达的调控机制。此外, 针对乳酸菌冻干粉出现“高菌数低发酵活力”的问题, 可从环境胁迫响应异质性层面, 重点解析低发酵活力亚群形成机制和控制技术, 为开发高活性冻干保护剂和冻干工艺提供理论依据。

### 参考文献

- [1] 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.
- [2] CHEN H, CHEN S, LI C, et al. Response surface optimization of lyoprotectant for *Lactobacillus bulgaricus* during vacuum freeze-drying[J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2015, 45(5): 463-475.
- [3] 李宝坤. 乳酸杆菌冷冻干燥生理损伤机制及保护策略的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2011. [LI B K. Study on physiological damage mechanism and protection strategy of *Lactobacillus* during freeze drying[D]. Wuxi: University of Jiangnan, 2011.]
- [4] SANTIVARANGKNA C, WENNING M, FOERST P, et al. Damage of cell envelope of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 102(3): 748-756.
- [5] CARVALHO A S, SILVA J, HO P, et al. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria[J]. *International Dairy Journal*, 2004, 14(10): 835-847.
- [6] 冯镇, 张兰威. 变温培养对乳酸菌高密度培养的影响[J]. *中国乳品工业*, 2009, 37(7): 4-7. [FENG Z, ZHANG L W. Effect of variable temperature culture on high density culture of lactic acid bacteria[J]. *China Dairy Industry*, 2009, 37(7): 4-7.]
- [7] 钱志浩. 通过调节细胞膜组成提高乳酸菌冻干存活率的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2021. [QIAN Z H. Study on improving freeze-drying survival rate of *Lactobacillus* by regulating cell membrane composition[D]. Wuxi: Southern Yangtze University, 2021.]
- [8] 李明慧, 尚一娜, 霍麒文, 等. 真空冷冻干燥对乳酸菌损伤机制的研究进展[J]. *食品科学*, 2018, 39(19): 273-279. [LI M H, SHANG Y N, HUO Q W, et al. Research progress on damage mechanism of vacuum freeze drying on lactic acid bacteria[J]. *Food Science*, 2018, 39(19): 273-279.]
- [9] 王继锋. 酒酵母胞外聚合物在冷冻干燥过程中保护作用的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019. [WANG J F. Study on the protective effect of extracellular polymers from *S. cerevisiae* during freeze-drying[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2019.]
- [10] FONSECA F, BÉAL C, CORRIEU G. Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage[J]. *The Journal of Dairy Research*, 2000, 67(1): 83-90.
- [11] 钱志浩, 崔树茂, 唐鑫, 等. 基于细胞膜脂肪酸调控提高乳酸菌冻干存活率[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(16): 1-8. [QIAN Z H, CUI S M, TANG X, et al. Improving freeze-drying survival rate of *Lactobacillus* based on membrane fatty acid regulation[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(16): 1-8.]
- [12] SELMER-OLSEN E, BIRKELAND S, SORHAUG T. Effect of protective solutes on leakage from and survival of immobilized *Lactobacillus* subjected to drying, storage and rehydration[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1999, 87(3): 429-437.
- [13] LI H, ZHAO W, WANG H, et al. Influence of culture pH on freeze-drying viability of *Oenococcus oeni* and its relationship with fatty acid composition[J]. *Food and Bioproducts Processing*, 2008, 87(1): 56-61.
- [14] 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. [YU X Q. Study on physiological damage and protection strategy of *Lactobacillus plantarum* during freeze drying[D]. Shanghai: University of Shanghai for Science and Technology, 2019.]
- [15] 严涛, 朱建国, 姜甜, 等. 高密度发酵乳酸菌抗冻性影响因素分析[J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(17): 209-213. [YAN T, ZHU J G, JIANG T, et al. Analysis of factors affecting frozen resistance of high density fermentation lactic acid bacteria[J]. *Food Research and Development*, 2018, 39(17): 209-213.]
- [16] 寇佳祥, 乔建军, 朱宏吉, 等. 提高乳杆菌属冷冻干燥存活率研究进展[J/OL]. *食品与发酵工业*: 1-9 [2022-04-17]. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.030078. [COU J X, QIAO J J, ZHU H J, et al. Research progress on improving freeze-drying survival rate of *Lactobacillus*[J/OL]. *Food and Fermentation Industries*: 1-9 [2022-04-17]. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.030078.]
- [17] YUNDA E, QUILLÈS 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.
- [18] 尚一娜, 李明慧, 霍麒文, 等. 培养基成分对植物乳杆菌 LIP-1 抗冷冻性的影响[J]. *乳业科学与技术*, 2018, 41(6): 18-25. [SHANG Y N, LI M H, HUO Q W, et al. Effect of medium components on freezing resistance of *Lactobacillus plantarum* LIP-1[J]. *Journal of Dairy Science and Technology*, 2018, 41(6): 18-25.]
- [19] 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.
- [20] 李明慧, 尚一娜, 霍麒文, 等. 培养条件对植物乳杆菌 LIP-1 抗冷冻活性的影响[J]. *中国食品学报*, 2019, 19(11): 70-78. [LI M H, SHANG Y N, HUO Q W, et al. Effect of culture conditions on antifreezing activity of *Lactobacillus plantarum* LIP-1[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2019, 19(11): 70-78.]
- [21] 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. [WANG X M, ZHEN N, TIAN Q Y, et al. Improvement of freeze-drying survival rate of *Lactobacillus acidophilus* by cold shock treatment[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021,

- 21(3): 203-209. ]
- [ 22 ] 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. [ YANG J, GUO J F, LI B K, et al. Protective effect of acid-cold interaction stress on activity of *Lactobacillus* fermented by freeze drying[J]. *Food Science*, 2020, 41(2): 101-106. ]
- [ 23 ] WANG J F, LING H, WEI A, et al. Lyoprotective effect of soluble extracellular polymeric substances from *Oenococcus oeni* during its freeze-drying process[J]. *Process Biochemistry*, 2019, 84: 205-212.
- [ 24 ] 王洁, 黄传伟, 安源, 等. 真空冷冻干燥的工艺流程[J]. *医疗卫生装备*, 2012, 33(9): 90-91. [ WANG J, HUANG C W, AN Y, et al. Process of vacuum freeze-drying[J]. *Chinese Medical Equipment Journal*, 2012, 33(9): 90-91. ]
- [ 25 ] 龚虹, 马征途, 冯谦, 等. 植物乳杆菌发酵、冻干工艺及其益生特性的研究[J]. *中国微生物学杂志*, 2017, 29(5): 526-530. [ GONG H, MA Z T, FENG Q, et al. Study on fermentation, freeze-drying and probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum*[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2017, 29(5): 526-530. ]
- [ 26 ] 徐长隆, 王雅丽, 范翠翠, 等. 不同冻干工艺对植物乳杆菌 H0808 活菌数的影响[J]. *食品安全导刊*, 2019(6): 133. [ XU C L, WANG Y L, FAN C C, et al. Effect of different freeze-drying processes on viable count of *Lactobacillus* H0808[J]. *China Food Safety Magazine*, 2019(6): 133. ]
- [ 27 ] 杨大恒, 付健, 李晓燕. 食品红外辅助冷冻干燥技术的研究进展[J]. *包装工程*, 2021, 42(3): 100-106. [ YANG D H, FU J, LI X Y. Research progress of food infrared assisted freeze drying technology[J]. *Packaging Engineering*, 2021, 42(3): 100-106. ]
- [ 28 ] 李让, 葛绍阳, 刘松玲等. 副干酪乳杆菌 L9 直接式深冷发酵剂制备工艺研究[J]. *中国奶牛*, 2015(17): 51-55. [ LI R, GE S Y, LIU S L, et al. Study on preparation technology of direct-cast cryogenic fermentation of *Lactobacillus paracasei* L9[J]. *China Dairy Cattle*, 2015(17): 51-55. ]
- [ 29 ] 黄刚, 金刚. 真空冷冻干燥乳酸菌的研究进展[J]. *食品安全导刊*, 2022(16): 148-150. [ HUANG G, JIN G. Research progress of vacuum freeze-drying lactic acid bacteria[J]. *China Food Safety Magazine*, 2022(16): 148-150. ]
- [ 30 ] ROMANO N, MARRO M, MARSAL M, et al. Fructose derived oligosaccharides prevent lipid membrane destabilization and DNA conformational alterations during vacuum-drying of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*[J]. *Food Research International*, 2021: 143.
- [ 31 ] YUSTE A, AROSEMENA E L, CALVO M, et al. Study of the probiotic potential and evaluation of the survival rate of *Lactiplantibacillus plantarum* lyophilized as a function of cryoprotectant[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 19078.
- [ 32 ] 公丕民. 保加利亚乳杆菌喷雾干燥过程中损伤机制及保护方法研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2019. [ GONG P M. Damage mechanism and protection methods of *L. bulgaricus* during spray drying[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2019. ]
- [ 33 ] 杨友馨, 王瑞雪, 王俊国. 海藻糖对乳酸菌保护机制的研究进展[J]. *乳业科学与技术*, 2021, 44(6): 45-50. [ YANG Y X, WANG R X, WANG J G. Progress in research on the protective mechanism of trehalose on lactic acid bacteria[J]. *Journal of Dairy Science and Technology*, 2021, 44(6): 45-50. ]
- [ 34 ] TURUVEKERE S L, BASAVARAJ M. 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.
- [ 35 ] HUANG J J, CHEUNG P C K. Cold stress treatment enhances production of metabolites and biodiesel feedstock in porphyrin cruentum via adjustment of cell membrane fluidity[J]. *The Science of the Total Environment*, 2021, 780: 146612-146612.
- [ 36 ] 张秉胜, 李锦, 张永立. 乳酸菌发酵后处理工艺研究[J]. *现代食品*, 2021(11): 50-51, 57. [ ZHANG B S, LI J, ZHANG Y L. Study on post-fermentation process of lactic acid bacteria[J]. *Modern Food*, 2021(11): 50-51, 57. ]
- [ 37 ] 刘飞, 张艳艳, 张金华, 等. 普鲁兰多糖作为冻干保护剂对乳酸菌的影响[J]. *药物生物技术*, 2020, 27(6): 501-505. [ LIU F, ZHANG Y Y, ZHANG J H, et al. The effect of pullulan polysaccharides as freeze-protector on lactic acid bacteria[J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2020, 27(6): 501-505. ]
- [ 38 ] 杨辉, 闫晓哲, 杜姣姣, 等. 响应面法优化乳酸菌冻干保护剂配方[J]. *陕西科技大学学报*, 2018, 36(2): 31-38. [ YANG H, YAN X Z, DU J J, et al. Optimization of cryoprotectant formulation for lactic acid bacteria by response surface methodology[J]. *Journal of Shaanxi University of Science & Technology*, 2018, 36(2): 31-38. ]
- [ 39 ] 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. [ XIN M, LI C B, LI J M, et al. Optimization of cryoprotectant for *Lactobacillus plantarum*[J]. *Food Science and Technology*, 2021, 46(2): 1-9. ]
- [ 40 ] 赵延胜, 吴超, 王慧, 等. 不同保护剂影响植物乳杆菌冻干菌粉发酵活力的研究[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(12): 19-24. [ ZHAO Y S, WU C, WANG H, et al. Effect of different protective agents on fermentation activity of *Lactobacillus plantarum* frozen-dried powder[J]. *Food Research and Development*, 2019, 40(12): 19-24. ]
- [ 41 ] 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. [ LI Z Y, WANG F, LUAN S M, et al. Preparation of freeze-dried powder of *Streptococcus thermophilus* MN002[J]. *China Dairy Industry*, 2019, 47(12): 19-24. ]
- [ 42 ] 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.
- [ 43 ] 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. [ LI J J, WANG X Y, LI J, et al. Screening of cryoprotectants for *L. plantarum* freeze-drying and study on accelerated storage stability[J]. *Feed Research*, 2021, 44(6): 97-100. ]
- [ 44 ] 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. [ MA Y, SHEN G Q, TAO Z Q, et al. Effect of storage temper-

- ature on the activity of *Lactobacillus* grx07 fermented by vacuum freeze-drying starter[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(2): 84–88, 94. ]
- [ 45 ] IBOURAHEMA C, ELISÉE K K, ELISE N G, et al. Lyophilization (drying method) cause serious damages to the cell viability of lactic acid bacteria[J]. *Annual Research & Review in Biotechnology*, 2018, 24(4): 1–15. ]
- [ 46 ] 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]. 内蒙古: 内蒙古农业大学, 2019. [ ZHANG X N. Effects of different drying methods and storage environments on LIP-1 activity of *L. plantarum*[D]. Inner Mongolia: Inner Mongolia Agricultural University, 2019 ]
- [ 47 ] COSTA E, USALL J, TEIXIDÓ N, et al. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 89(5): 793–800. ]
- [ 48 ] CHAMPAGNE C P, GARDNER N, BROCHU E et al. The freeze-drying of lactic acid bacteria. A review[J]. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 1991, 24(3-4): 118–128. ]
- [ 49 ] 朱东升. 乳酸菌冻干保活关键技术研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2010. [ ZHU D S. Research on the key technology of freeze-drying preservation of lactic acid bacteria[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2010. ]
- [ 50 ] DE VALDEZ G F, DE GIORI G S, DE RUIZ H A P, et al. Effect of the rehydration medium on the recovery of freeze-dried lactic acid bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 50(5): 1339–1341. ]
- [ 51 ] CLARISSA S, RUDI V, MICHAEL G 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. ]
- [ 52 ] 梁晶晶. 冷冻干燥对副干酪乳杆菌 L9 发酵活力的影响及其机制研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2020. [ LIANG J J. Effects of lyophilization on fermentation activity of *Lactobacillus paracasei* L9 and its mechanisms[D]. Beijing: China Agricultural University, 2020. ]
- [ 53 ] 张佳, 韩璠, 吴正钧, 等. 乳酸菌抗冷胁迫作用研究进展[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(4): 463–469. [ ZHANG J, HAN J, WU Z J, et al. Research progress on cold stress resistance of lactic acid bacteria[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(4): 463–469. ]
- [ 54 ] 乔颖, 马锐, 陈志刚. 天然低共熔溶剂对冷冻干燥期间嗜热链球菌活力的影响 [J]. *南京农业大学学报*, 2018, 41(5): 931–938. [ QIAO Y, MA R, CHEN Z G. Effect of natural eutectic solvents on the activity of *Streptococcus thermophilus* during freeze-drying[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2018, 41(5): 931–938. ]
- [ 55 ] 王学良. 相容性溶质对 *L. bulgaricus* 3 的渗透保护作用及其对细胞膜影响研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2015. [ WANG X L. The osmotic protection of compatible solute on *L. bulgaricus* 3 and its effect on cell membrane[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2015. ]
- [ 56 ] GOLDBERG I, ESCHAR L. Stability of lactic acid bacteria to freezing as related to their fatty acid composition[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1977, 33(3): 489–96. ]
- [ 57 ] 吴文茹, 汪政煜, 范梦茹, 等. 乳酸菌的抗冷冻性及冻干保护 [J]. *食品工业*, 2017, 38(5): 246–249. [ WU W R, WANG Z Y, FAN M R, et al. Freezing resistance and freeze-drying protection of lactic acid bacteria[J]. *The Food Industry*, 2017, 38(5): 246–249. ]
- [ 58 ] YUAN Y C, MICHAEL G G. Influence of cyclopropane fatty acids on heat, high pressure, acid and oxidative resistance in *Escherichia coli*[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 222: 16–22. ]
- [ 59 ] 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. [ CHEN J, ZHANG X N, MA L L, et al. Effect of initial pH value on freeze-drying resistance of *L. plantarum* LIP-1 [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(12): 81–89. ]
- [ 60 ] 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. [ ZHANG X N, CHEN J, MA L L, et al. Effect of optimized medium on activity of *Lactobacillus plantarum* LIP-1 after freeze-drying[J]. *Food Science and Technology*, 2019, 44(7): 1–9. ]
- [ 61 ] 王颺, 田丰伟, 励建荣, 等. 冷冻干燥对乳酸菌细胞膜通透性的影响 [J]. *微生物学通报*, 2009, 36(5): 684–688. [ WANG B, TIAN F W, LI J R, et al. Effect of freeze drying on cell membrane permeability of lactic acid bacteria[J]. *Microbiology China*, 2009, 36(5): 684–688. ]
- [ 62 ] MIMOZA B, MONIKA M, SHARAREH 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. ]
- [ 63 ] 焦琳, 郑晓卫, 屈晓宇, 等. 嗜热链球菌 M5-5 冻干保护剂配方的优化 [J]. *中国酿造*, 2017, 36(3): 95–98. [ JIAO L, ZHENG X W, QU X Y, et al. Optimization of cryoprotectant formulation for *Streptococcus thermophilus* M5-5 [J]. *China Brewing*, 2017, 36(3): 95–98. ]
- [ 64 ] BUNTHOF C J, BLOEMEN K, BREEUWER P, et al. Flow cytometric assessment of viability of lactic acid bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(5): 2326–2335. ]
- [ 65 ] LAHTINEN S J, OUWEHAND A C, REINIKAINEN J P, et al. Intrinsic properties of so-called dormant probiotic bacteria, determined by flow cytometric viability assays[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(7): 5132–5134. ]
- [ 66 ] VON WRIGHT A, SALMINEN S, et al. Probiotics: Mechanisms and established effects[J]. *International Dairy Journal*, 1999, 11(11): 1195–1198. ]
- [ 67 ] SAÚL A, MÓNICA H, MANUEL R, et al. Physiological heterogeneity in *Lactobacillus casei* fermentations on residual yoghurt whey[J]. *Process Biochemistry*, 2014, 49(5): 732–739. ]
- [ 68 ] OLSZEWSKA M A, KOCOT A M, ANIEWSKA-TROKENHEIM U. Physiological functions at single-cell level of *Lactobacillus* spp. isolated from traditionally fermented cabbage in response to



different pH conditions[J]. *Journal of Biotechnology*, 2015, 200: 19–26.

[69] ZHAO Y, KNOCH S, SIEGUMFELDT H. Heterogeneity between and within strains of *Lactobacillus brevis* exposed to beer compounds[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 239.

[70] STRAUBER H, MULLER S. Viability states of bacteria—Specific mechanisms of selected probes[J]. *Cytometry Part A*, 2010, 77A(7): 623–634.

[71] RAULT A, BEAL C, GHORBAL S, et al. Multiparametric flow cytometry allows rapid assessment and comparison of lactic acid bacteria viability after freezing and during frozen storage[J]. *Cryobiology*, 2007, 55(1): 35–43.

[72] KRAMER M, OBERMAJER N, BOGOVIC M B, et al. Quantification of live and dead probiotic bacteria in lyophilised product by real-time PCR and by flow cytometry[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 84(6): 1137–47.

[73] LI J, SUO Y J, LIAO X Y, et al. Analysis of *Staphylococcus aureus* cell viability, sublethal injury and death induced by synergistic combination of ultrasound and mild heat[J]. *Ultrasonics-Sonochemistry*, 2017, 39: 101–110.

[74] SHAO L, ZHAO Y, ZOU B, et al. Recovery and virulence factors of sublethally injured *Staphylococcus aureus* after ohmic heating[J]. *Food Microbiology*, 2022, 102: 103899–103899.

---

## 客座主编



孙志宏，内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室研究员、博士生导师。近五年主持承担国家自然科学基金、优秀青年科学基金等科研项目 11 项，入选内蒙古自治区“草原英才”工程。围绕乳酸菌生物多样性和功能基因组方面在 *Nat Commun*、*ISME J* 和 *Gut Microbes* 期刊发表高水平学术论文 50 余篇，ESI 前 1% 论文 2 篇，授权发明专利 19 项，获教育部技术发明一等奖、内蒙古自治区科技进步一等奖和内蒙古自治区自然科学二等奖各 1 项，获内蒙古自治区优秀科技工作者称号和内蒙古自治区青年创新人才奖。



付才力，博士，男，研究员，省高层次人才，市高层次人才团队负责人，江苏省产业教授，新加坡国立大学苏研院杰出员工，《食品工业科技》青年编委。近年来主持国家海洋局、教育部及省市科技项目 15 项，主持横向项目 8 项；发表 SCI 论文 50 余篇，影响因子总和超过 100，单篇最高影响因子为 10.618，授权发明专利 11 项，获省部级科技进步奖一等奖 2 项、二等奖 2 项，参编“十三五”规划教材 1 部。服务企业成效显著，获批“省鳗业突出贡献专家”等荣誉。