

## 青春双歧杆菌冻干保护剂筛选及高密度冻干工艺优化

潘子怡<sup>1</sup>, 陈则华<sup>2</sup>, 毛丙永<sup>1</sup>, 唐鑫<sup>1</sup>, 宁初光<sup>2</sup>,  
李文治<sup>2</sup>, 崔树茂<sup>\*1</sup>, 赵建新<sup>1</sup>, 陈卫<sup>1</sup>

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 无限极(中国)有限公司, 广东 广州 510405)

**摘要:** 为了探究青春双歧杆菌最适冻干保护剂配方, 提高工业化生产效率, 作者对不同糖与蛋白质类保护剂对双歧杆菌冻干保护特性、不同结构的糖类保护剂复配及其与蛋白质复配的保护效果进行研究, 同时测定复合保护剂添加其他小分子物质对冻干存活率的影响, 最后优化冻干前菌泥干物质与冻干保护剂的比例, 以实现高密度冻干。研究结果表明, 糖(醇)类保护剂对青春双歧杆菌的保护效果普遍高于蛋白类冻干保护剂, 且四糖以下小分子糖的冻干保护效果较好, 其中山梨糖醇和棉籽糖效果最优, 二者复配(质量比 1:1)后冻干存活率提高到 56% 左右; 将其与蛋白质、抗坏血酸、谷胱甘肽、微量元素等小分子复配, 不会提高对菌体的冻干保护效果; 考虑到实际应用, 将山梨糖醇、棉籽糖与乳清蛋白以质量比 3:3:2 复配以提高菌粉的疏松度; 菌泥与保护剂以干物质质量比 1:1.2 混合, 样品干物质总质量分数为 25% 时, 青春双歧杆菌的冻干存活率达到  $(77.08 \pm 5.20)\%$ 。

**关键词:** 青春双歧杆菌; 冻干保护剂; 冻干存活率; 活菌数

中图分类号: TS 201.3 文章编号: 1673-1689(2024)02-0023-07 DOI: 10.12441/spyswjs.20230109001

## Screening of Lyoprotectants and Optimization of High-Density Freeze-Drying Process for *Bifidobacterium adolescentis*

PAN Ziyi<sup>1</sup>, CHEN Zehua<sup>2</sup>, MAO Bingyong<sup>1</sup>, TANG Xin<sup>1</sup>, NING Chuguang<sup>2</sup>,  
LI Wenzhi<sup>2</sup>, CUI Shumao<sup>\*1</sup>, ZHAO Jianxin<sup>1</sup>, CHEN Wei<sup>1</sup>

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Infinitus (China) Company Ltd., Guangzhou 510405, China)

**Abstract:** To investigate the most suitable lyophilization protection formula for *Bifidobacterium adolescentis* and improve the efficiency of industrial production, the authors examined the lyophilization protection properties of various saccharide and protein protectants for *B. adolescentis*, the protection effect of compounding saccharide protectants with different structures and the protective effect of that with protein. Finally, the ratio between the dried mush and the lyophilizing agent was optimized to achieve high-density lyophilization. The results showed that the protective effect of saccharide (alcohol) protectants on *B. adolescentis* was generally higher than that of protein

收稿日期: 2023-01-09 修回日期: 2023-08-28

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFC3401301); 国家自然科学基金面上项目(32172173)。

\* 通信作者: 崔树茂(1986—), 男, 博士, 研究员, 硕士研究生导师, 主要从事益生菌高效增殖与智能控制、增强抗逆的菌体结构定向调控、微胶囊制剂等产业化技术研究。E-mail: cuishumao@jiangnan.edu.cn

lyophilization protectants, and the lyophilization protection effect of small molecule saccharide below tetrasaccharides was better, among which sorbitol and raffinose had the best effect, and the lyophilization survival rate increased to about 56% after the combination at the mass ratio of 1:1. The lyophilization protection effects of the bacteria were not improved after compounding with protein, ascorbic acid, glutathione, trace elements, and other small molecules. Considering the practical production applications, sorbitol and raffinose were compounded with whey proteins to improve the looseness of the bacterial powder at the mass ratio of 3:3:2. The lyophilized survival rate of *B. adolescentis* was  $(77.08 \pm 5.20)\%$  when the wet bacterial mass mixed with the protective agents at the ratio of 1:1.2, and the total dry matter mass fraction of the sample was 25%.

**Keywords:** *Bifidobacterium adolescentis*, lyoprotectant, freeze-drying survival rate, viable count

双歧杆菌广泛分布于动物和人类的肠道中,在维持宿主健康方面发挥重要作用<sup>[1]</sup>。青春双歧杆菌 CCFM8630 分离自老年人肠道,已被证实具有降血糖和缓解代谢综合征<sup>[2]</sup>、延缓代谢紊乱的发展<sup>[3]</sup>、减轻高脂高胆固醇膳食诱发的非酒精性脂肪肝损伤<sup>[4]</sup>等作用,因此具有潜在的应用价值。益生菌菌株的潜在应用要求开发出最优的工艺用于商业用途。然而,大多数益生菌培养物需要冷藏储运,成本高昂且不方便使用。益生菌粉的稳定性较好,储运成本较低且便于使用,同时双歧杆菌在较低的水分活度下,贮藏期间的生存力往往会增强<sup>[5]</sup>。

目前,制备菌粉最有效的方式为真空冷冻干燥,可以有效维持菌粉的长期稳定性<sup>[6]</sup>。通过将水分活度降低到 0.2 或更低,减少益生菌活力和功能的损失,可以确保 0℃ 以下条件下储存的质量。冷冻干燥的存活率主要受到冻干保护剂<sup>[7]</sup>、细胞的生理状态<sup>[8]</sup>、冻结速度、冷冻干燥参数<sup>[9]</sup>、复水条件和初始细胞浓度等因素的影响。为减少冻干对菌株损伤,通常会加入保护剂<sup>[10]</sup>。不同的菌株具有不同的冻干特性,为菌株选择合适的保护剂是非常重要的,有利于在冻干和贮藏过程中提高它们的存活率。

在常规分批培养过程中,青春双歧杆菌培养密度通常较低<sup>[11]</sup>,其高度厌氧、冻干存活率低等特性导致其工业化生产效率低,因此,迫切需要一种更高效的冻干方式。高密度冻干是指通过提高菌液与冻干保护剂的比例以提高冻干产量并减少能耗,然而减少保护剂的比例可能会降低冻干的可行性。因此,作者根据所获得的青春双歧杆菌 CCFM8630 的最佳冻干保护剂配方,对冷冻干燥中菌泥干物质比例及样品质量进行调整,最终获得了最佳的高密度冷冻干燥工艺。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

青春双歧杆菌 CCFM8630 (*Bifidobacterium adolenscentis* CCFM8630): 由江南大学食品微生物菌种保藏中心保藏。

### 1.2 试剂

胰蛋白胨、牛肉浸膏、酵母浸粉、葡萄糖、乙酸钠、吐温 80、磷酸氢二钾、柠檬酸二铵、七水硫酸镁、一水硫酸锰、半胱氨酸盐酸盐、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钠:国药集团化学试剂有限公司;赤藓糖醇、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、鼠李糖、甘露糖、山梨糖、山梨糖醇、海藻糖、蔗糖、麦芽糖醇、棉籽糖、水苏糖、低聚果糖、低聚木糖、低聚半乳糖、甘露低聚糖、麦芽糊精、菊粉、抗性糊精、胶原蛋白、乳清蛋白、脱脂乳:创赛生物科技有限公司。

### 1.3 培养基与缓冲液配制

MRS 培养基:胰蛋白胨 10 g,牛肉浸膏 10 g,酵母浸粉 5 g,葡萄糖 20 g,乙酸钠 5 g,吐温 80 1 mL,磷酸氢二钾 2.0 g,柠檬酸二铵 2.0 g,七水硫酸镁 0.1 g,一水硫酸锰 0.05 g,半胱氨酸盐酸盐 1 g,蒸馏水 1 L,pH 6.2~6.4,115℃ 灭菌 20 min。

半胱氨酸磷酸盐缓冲液(CYS 缓冲液):半胱氨酸盐酸盐 0.5 g,磷酸氢二钠 6.0 g,磷酸二氢钾 4.5 g,氯化钠 4.0 g,吐温 80 0.6 mL,蒸馏水 1 L,pH 6.8~7.0,115℃ 灭菌 20 min。

### 1.4 仪器与设备

厌氧工作站 AW500SG-7152:英国依莱泰科公司;pH 计、电子天平 EL3002:梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;涡旋振荡器 MS-3-basic:德国

IKA公司;高温高压灭菌锅MLS-3750;日本SANYO公司;超净工作台ZHJH-C1115B;上海智诚分析仪器制造有限公司;冻干机LYOBETA-5PS;西班牙Telstar公司;落地式离心机RC-BIOS10;赛默飞世尔公司。

## 1.5 实验方法

**1.5.1 菌株活化与培养** 取-80℃冰箱中冻藏的青春双歧杆菌CCFM8630,在MRS固体平板上用接种环划线接种纯化,37℃厌氧培养36~48 h,挑取单菌落转移至5 mL新的液体培养基中,37℃厌氧生长24 h,再以接种体积分数4%传代至新的液体培养基中,37℃厌氧培养24 h,连续活化3~5次作为种子培养液。

**1.5.2 青春双歧杆菌的冻干** 将青春双歧杆菌在37℃厌氧培养至稳定,4℃以8 000 g离心15 min,取菌泥。为获得菌悬液,将菌泥与无菌CYS缓冲液以1:1的质量比混匀,并将pH调至大约6.5,再以1:1的体积比将菌悬液与冷冻干燥保护剂混匀,加1 mL至西林瓶中,按以下程序进行冻干:在10 min内将层板温度降至-4℃后再降至-50℃预冻,维持1 h;在一次干燥时,降低真空度,将层板在1 h内加热到-30℃,并且为了去除游离水在20 Pa的真空下运行18 h;在二次干燥时,将层板的温度控制在1 h内加热至25℃,连续16 h控制在2 Pa的条件下。

**1.5.3 单一冷冻干燥保护剂的配方** 将各种冷冻干燥保护剂如糖(醇)类、蛋白质类等按一定比例称量,溶于水中,制成200 g/L的溶液。

**1.5.4 复合冷冻干燥保护剂的配方** 每一种复合保护剂的质量浓度均为200 g/L,分别为:1)复合糖类冷冻干燥保护剂溶液,每种糖的质量浓度是100 g/L;2)复合糖类与蛋白质类冷冻干燥保护剂溶液,糖类冷冻干燥保护剂与蛋白质类冷冻干燥保护剂质量浓度分别为100 g/L;3)其他小分子冷冻干燥保护剂复配的最佳复配冷冻干燥保护剂,分别加入MnSO<sub>4</sub> 10 g/L、MgSO<sub>4</sub> 20 g/L、抗坏血酸30 g/L、谷胱甘肽15 g/L、L-酪氨酸15 g/L、甜菜碱0.4 g/L。

**1.5.5 青春双歧杆菌冻干前菌悬液的高密度优化** 将青春双歧杆菌的菌泥置于烘箱中干燥,称得干物质的质量并计算以确定每克菌泥中干物质含量。按照质量比1:1、1:2对干物质与保护剂进行混合,制备质量分数15%、20%、25%的菌悬液,混匀后吸取1 mL至西林瓶。

**1.5.6 单位质量菌粉活菌数与冻干存活率的测定** 将菌泥与保护剂按比例混合,立刻取样通过倾注计数法测定冻干前活菌浓度(CFU/mL),另吸取1 mL至冻干瓶,快速放入冻干机进行真空冷冻干燥。称得冻干后样品的质量,重新溶解在无菌水中至冻干前体积,计数后得到冻干后活菌浓度(CFU/mL),计算单位质量菌粉活菌数(CFU/g)与冻干存活率。

$$S = \frac{N_1}{N_0} \times 100\%$$

式中:S为冻干存活率,%;N<sub>0</sub>为冻干前活菌浓度,CFU/mL;N<sub>1</sub>为冻干后活菌浓度,CFU/mL。

## 1.6 数据分析

每组实验设置3个平行,用Excel软件计算数据的平均值和标准偏差,采用软件SPSS 22.0进行数据差异分析,采用单因素方差分析(ANOVA)和DUNCAN多重比较完成差异显著性分析(P<0.05)。

# 2 结果与分析

## 2.1 不同糖与蛋白质类保护剂对青春双歧杆菌的冻干保护特性分析

按照保护剂的渗透性特点或物理化学性质来进行划分,根据其渗透性特点划分成3类:1)可以同时渗透进微生物的细胞膜和细胞壁的化学物质,例如甘油,它可以有效增强微生物细胞膜的流动性,并能与水结合从而有效抑制细菌过度脱水以及抑制冰晶形成<sup>[12]</sup>,但甘油会使得冷冻干燥产品黏度升高,所以不常使用<sup>[13]</sup>;2)一类只能透过微生物细胞壁不能穿过微生物细胞膜的化学物质,也被称为半渗透类保护剂,其中有小分子糖,如海藻糖<sup>[14]</sup>、甘露糖<sup>[15]</sup>、蔗糖<sup>[16]</sup>等。小分子糖类的游离端带有一个负电荷的羟基自由基,能与蛋白质中的极性基团和微生物细胞膜上的磷脂形成氢键,产生相互作用,为细菌菌体提供保护作用,在冷冻干燥之前诱导细胞壁细胞质的分离,在微生物细胞膜与细胞壁之间建立起缓冲层<sup>[17]</sup>,从而起到保护菌体的作用;3)不能透过细胞壁和细胞膜的化学物质,在细胞表面形成保护壳,阻止细胞与冰晶和氧气的接触<sup>[18]</sup>。

目前,还没有针对青春双歧杆菌冻干保护剂系统分析的报道,因此作者将常用的糖(醇)类、蛋白质类冷冻干燥保护剂按照其结构特点进行分类,系统研究不同冷冻干燥保护剂的冻干保护效果,见表1。

表 1 青春双歧杆菌在不同种类保护剂中的冻干存活率

Table 1 Freeze-drying survival rate of *B. adolescentis* in different protectants

保护剂种类	保护剂名称	冻干后活菌浓度对数值	冻干存活率/%
空白组	—	8.00±0.09 <sup>jk</sup>	1.89±0.15 <sup>lm</sup>
四碳糖	赤藓糖醇	7.76±0.02 <sup>k</sup>	1.09±0.18 <sup>m</sup>
五碳糖	木糖	9.25±0.18 <sup>e</sup>	31.95±3.16 <sup>e</sup>
	阿拉伯糖	8.87±0.15 <sup>e</sup>	11.86±2.60 <sup>e</sup>
六碳糖(醇)	半乳糖	9.31±0.61 <sup>e</sup>	36.11±2.50 <sup>b</sup>
	鼠李糖	9.10±0.62 <sup>d</sup>	24.76±1.65 <sup>d</sup>
	甘露糖	8.75±0.35 <sup>fg</sup>	10.73±0.44 <sup>efg</sup>
	山梨糖	8.80±0.88 <sup>ef</sup>	11.2±1.84 <sup>ef</sup>
	山梨糖醇	9.39±0.15 <sup>b</sup>	41.59±5.83 <sup>a</sup>
双糖(醇)	海藻糖	8.75±0.77 <sup>fg</sup>	10.59±1.10 <sup>efgh</sup>
	蔗糖	8.84±0.89 <sup>ef</sup>	10.54±3.35 <sup>efgh</sup>
	麦芽糖醇	8.66±0.15 <sup>gh</sup>	11.01±2.71 <sup>ef</sup>
三糖	棉籽糖	9.39±0.25 <sup>a</sup>	40.12±7.08 <sup>a</sup>
四糖	水苏糖	8.56±0.88 <sup>hi</sup>	6.81±1.42 <sup>ghijk</sup>
低聚糖	低聚果糖	8.36±0.58 <sup>ij</sup>	5.62±2.74 <sup>ijkl</sup>
	低聚木糖	8.39±0.82 <sup>ijk</sup>	4.63±1.25 <sup>ijklm</sup>
	低聚半乳糖	8.63±0.92 <sup>gh</sup>	7.99±1.56 <sup>efghi</sup>
	甘露低聚糖	8.59±0.76 <sup>h</sup>	7.42±1.08 <sup>fghij</sup>
多糖	麦芽糊精	8.31±0.40 <sup>ijk</sup>	3.88±0.48 <sup>ijklm</sup>
	菊粉	8.35±0.75 <sup>ij</sup>	4.25±1.07 <sup>ijklm</sup>
	抗性糊精	8.30±0.26 <sup>ijk</sup>	3.78±0.35 <sup>ijklm</sup>
蛋白质类	胶原蛋白	8.20±0.23 <sup>jk</sup>	2.98±0.32 <sup>klm</sup>
	乳清蛋白	8.26±0.82 <sup>jk</sup>	3.45±1.24 <sup>ijklm</sup>
蛋白质复合类	脱脂乳	8.54±0.95 <sup>hi</sup>	6.62±1.67 <sup>hijk</sup>

由表 1 可以看出,没有冻干保护剂时,青春双歧杆菌的冻干存活率仅为 (1.89±0.15)%,添加糖(醇)类保护剂后,大部分的冻干存活率较空白组均有提高,同时糖(醇)类比蛋白类的保护效果好;四糖以下的小分子(除赤藓糖醇外)均有较好的保护作用,其中棉籽糖和山梨糖醇的保护效果最好,冻干存活率分别为(40.12±7.08)%、(41.59±5.83)%。在冻干过程中,从细菌细胞中去除结合水会导致表面蛋白质、细胞壁和细胞膜的损伤。研究发现,细胞膜的脂质部分是冻干过程中损伤的主要区域,其中可能发生脂质过氧化<sup>[19]</sup>。因此,冻干保护剂应集中于最小化冻干过程中的细胞膜损伤。研究表明,山梨糖醇可以通过相互作用来防止膜损伤,并稳定蛋白质的结构和功能<sup>[20]</sup>,同时能够保护细胞膜的不饱和脂肪酸,减少由于 ROS 清除导致的脂质过氧化,从而保护细胞免受氧化损伤<sup>[21]</sup>;棉籽糖作为半渗透类保

护剂,其保护作用主要作用于细胞膜上,这可能是山梨糖醇与棉籽糖优于其他保护剂的主要原因之一。综上,半渗透类保护剂对青春双歧杆菌的冻干保护效果最优,不渗透类保护剂次之,可渗透类保护剂的保护效果最差。

## 2.2 不同结构的糖类保护剂复配对青春双歧杆菌冻干存活的影响

一般来说,每种保护剂都有自己的缺点,可复配其他保护剂来弥补。按照一定的比例复配不同效果的保护剂,从而实现更好的冻干保护效果<sup>[21]</sup>。考虑到棉籽糖及山梨糖醇对青春双歧杆菌具有较好的冻干保护效果,因此,将两者按照一定比例混合来进一步优化冻干保护剂,研究其对细菌菌体的冻干保护效果。

从图 1 可以看出,与单一保护剂相比,山梨糖醇与棉籽糖复配可以明显提高冻干存活率,达到



(56.03±1.82)%。由于山梨糖醇与棉籽糖的保护机制不尽相同,两种保护剂的复配从不同方面保护了青春双歧杆菌,减少了冻干过程中的损伤。

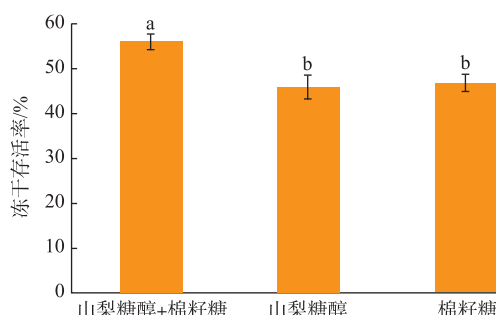


图1 青春双歧杆菌在糖类复合冷冻干燥保护剂中的冻干存活率

Fig. 1 Freeze-drying survival rate of *B. adolescentis* in carbohydrate compound protectant

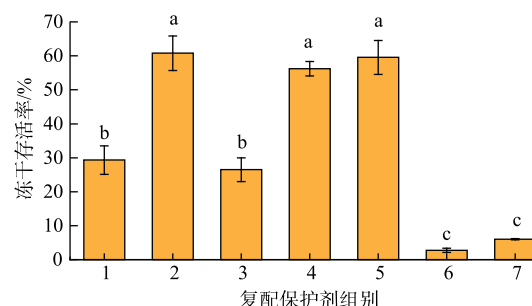
### 2.3 糖类保护剂复配蛋白质对青春双歧杆菌冻干存活的影响

糖类和蛋白质类保护剂对细菌菌体的保护机理并不相同,所以其保护效果也有一定差异。尽管前面的实验已经证明蛋白质类保护剂对青春双歧杆菌的保护效果比其他保护剂差,将非渗透类保护剂与渗透类保护剂复配后会提高渗透类保护剂的玻璃化温度,延迟结晶从而提高玻璃态无定形基质的稳定性<sup>[23]</sup>。因此,复配糖类与蛋白质类保护剂的效果应优于单一保护剂。

由图2可以看出,添加蛋白质类保护剂不会显著提高复合保护剂的保护效果,当山梨糖醇、棉籽糖与乳清蛋白以质量比3:1复合时,冻干存活率为(60.80±5.09)%,但与糖类复合保护剂并没有显著性差异。说明糖类复合保护剂(山梨糖醇+棉籽糖)为最优保护配方。然而,如果保护剂配方中只有糖类物质,会导致冻干样品品质较差、容易结块,因此考虑到实际生产应用,将添加乳清蛋白的糖类复合保护剂(糖类与蛋白类质量比为3:1)作为优势保护剂,进行后续研究。

### 2.4 复合保护剂复配其他类小分子物质对青春双歧杆菌冻干存活的影响

除常见的糖(醇)类、蛋白质类保护剂外,许多小分子物质如硫酸锰、抗坏血酸、谷胱甘肽等也有一定的冻干保护效果。硫酸锰作为保护剂中的缓冲盐,属于渗透类保护剂,可调节菌体内部的理化平衡,也可与保护剂中的其他成分协同保护细菌<sup>[23]</sup>;抗

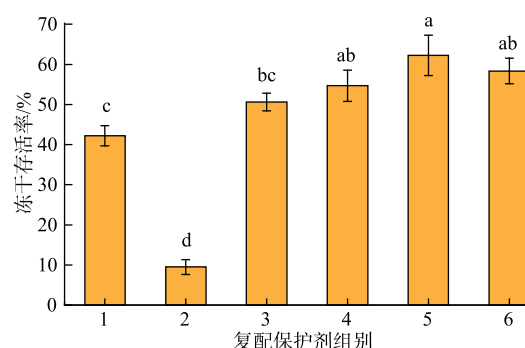


1. *m*(山梨糖醇、棉籽糖复配):*m*(乳清蛋白)=1:1;2. *m*(山梨糖醇、棉籽糖复配):*m*(乳清蛋白)=3:1;3. *m*(山梨糖醇、棉籽糖复配):*m*(胶原蛋白)=1:1;4. *m*(山梨糖醇、棉籽糖复配):*m*(胶原蛋白)=3:1;5. 山梨糖醇、棉籽糖复配;6. 胶原蛋白;7. 乳清蛋白。

图2 青春双歧杆菌在复配蛋白类保护剂中的冻干存活率

Fig. 2 Freeze-drying survival rate of *B. adolescentis* in the compound of protein protectants

坏血酸作为常用的抗氧化剂,可以延缓膜磷脂的氧化<sup>[24]</sup>;谷胱甘肽通过减少细胞膜脂肪酸的氧化,提高细胞膜中不饱和脂肪酸的比例来保护微生物,同时也可以改善冻干过程中细胞膜的流动性<sup>[25]</sup>;相容性溶质(如L-酪氨酸等)可以从培养基进入细胞作为胞内缓冲液;甜菜碱常作为相容性溶质添加至培养基中提高菌株的抗性,但作为冻干保护剂在干燥过程中能稳定蛋白质和细胞膜。因此,作者以这些小分子物质复配前期得到的优势冻干保护剂,进一步研究其对青春双歧杆菌冻干存活率的影响,见图3。



1. 最优保护剂、硫酸锰、硫酸镁;2. 最优保护剂、抗坏血酸;3. 最优保护剂、谷胱甘肽;4. 最优保护剂、L-酪氨酸;5. 最优保护剂、甜菜碱;6. 最优保护剂。

图3 青春双歧杆菌在复配其他小分子保护剂中的冻干存活率

Fig. 3 Freeze-drying survival rate of *B. adolescentis* in the compound of other small molecules

由图3可以看出,将复合保护剂与已报道的其他小分子复配后保护效果并不会变好,与硫酸锰、硫酸镁、抗坏血酸、谷胱甘肽复配后冻干存活率反

而显著下降,与甜菜碱复配后冻干存活率略有提高,为 $(62.21\pm 5.02)\%$ ,但与前期研究得到的最优保护剂效果没有显著差异,说明这些物质对不同菌株有不同的保护特性。

### 2.5 双歧杆菌的高密度冻干优化

提高保护剂与菌泥的比值可以提高细菌的冻干存活率,但冻干菌粉的产量会随之下降。因此,为顺应实际工业生产的需要,需要采用高密度冻干。目前工业生产中,冻干样品干物质总质量分数通常在 $15\%\sim 20\%$ ,作者为了降低生产成本、提高产量,设定干物质总质量分数分别为 $15\%$ 、 $20\%$ 、 $25\%$ 的菌悬液样品,每组样品设定2个菌泥干物质与保护剂的比例,探究在保证活菌数条件下进一步提升冻干样品的浓度,见表2。

表2 青春双歧杆菌在不同高密度冻干方案中的存活率及活菌数

Table 2 Survival rate of *B. adolescentis* in different high density freeze-drying schemes

菌泥干物质与保护剂的质量比	菌悬液干物质质量分数/%	冻干后单位质量菌粉活菌浓度的对数值	冻干存活率/%
1:1	15	$10.85\pm 0.05^{bc}$	$46.70\pm 5.52^{bc}$
	20	$10.78\pm 0.08^c$	$45.92\pm 5.68^{bc}$
	25	$10.95\pm 0.02^b$	$59.87\pm 2.16^b$
1:1.2	15	$10.80\pm 0.06^c$	$43.50\pm 8.34^c$
	20	$10.88\pm 0.07^{bc}$	$50.98\pm 7.67^{bc}$
	25	$11.06\pm 0.05^a$	$77.08\pm 5.20^a$

保护剂由山梨糖醇、棉籽糖与乳清蛋白组合而成,质量比为3:3:2。冻干样品的初始活菌数会影响冻干存活率,过高或过低都不利于冻干存活<sup>[26]</sup>。这与

本研究结果一致,即适当提高冻干前活菌数,有利于菌株的存活。对于相同的菌悬液中的干物质质量分数,当其中干物质与冷冻干燥保护剂的质量比为1:1.2时,CCFM 8630冻干存活率相对更高。表明在冻干过程中,略高于菌泥干物质的冻干保护剂的量能够更好地保护细胞。综上,菌泥中干物质与冷冻干燥保护剂的质量比为1:1.2,样品中干物质总质量分数为 $25\%$ ,是青春双歧杆菌的最优高密度冻干方案。

## 3 结 语

作者通过单因素法对青春双歧杆菌的最适冻干保护剂特性进行探究,发现糖(醇)类保护剂的保护效果优于蛋白质类保护剂,相对分子质量在五碳糖与三糖之间的糖类对青春双歧杆菌冻干保护效果普遍较好,四碳糖赤藓糖醇几乎没有冻干保护效果。进一步复配糖(醇)类保护剂、糖(醇)类保护剂及蛋白质类保护剂、以及与其他小分子保护剂复配,发现质量比1:1的山梨糖醇与棉籽糖混合后制得的保护剂溶液的冻干保护效果最好,冻干存活率为 $(56.03\pm 1.82)\%$ ,复合保护剂中添加蛋白质类保护剂与其他小分子类保护剂对青春双歧杆菌的保护效果并没有显著区别。从工厂生产和实际应用角度看,青春双歧杆菌的最优冷冻干燥保护剂配方为质量比为3:1复配的糖类复合保护剂与乳清蛋白。在保证活菌数的情况下,实现青春双歧杆菌的高密度冻干,最优冻干方案为:山梨糖醇、棉籽糖与乳清蛋白以质量比3:3:2复配得到冷冻干燥保护剂溶液,与菌泥中干物质以质量比1.2:1混匀,样品中干物质总质量分数为 $25\%$ ,此时青春双歧杆菌的冻干存活率高达 $(77.08\pm 5.20)\%$ 。

## 参考文献:

- [1] AGUIRRE-EZKAURIATZA E J, AGUILAR-YANEZ J M, RAMIREZ-MEDRANO A, et al. Production of probiotic biomass (*Lactobacillus casei*) in goat milk whey: comparison of batch, continuous and fed-batch cultures[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(8): 2837-2844.
- [2] WU J, WANG X, CAI W, et al. *Bifidobacterium adolescentis* supplementation ameliorates parenteral nutrition-induced liver injury in infant rabbits[J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 2010, 55(10): 2814-2820.
- [3] ZHU G, MA F, WANG G, et al. *Bifidobacteria attenuate* the development of metabolic disorders, with inter- and intra-species differences[J]. *Food & Function*, 2018, 9(6): 3509-3522.
- [4] WANG G, JIAO T, XU Y, et al. *Bifidobacterium adolescentis* and *Lactobacillus rhamnosus* alleviate non-alcoholic fatty liver disease induced by a high-fat, high-cholesterol diet through modulation of different gut microbiota-dependent pathways[J]. *Food & Function*, 2020, 11(7): 6115-6127.
- [5] MENG X C, STANTON C, FITZGERALD G F, et al. Anhydrobiotics: the challenges of drying probiotic cultures[J]. *Food Chemistry*, 2008, 106(4): 1406-1416.

- [6] 付博,马齐,王卫卫,等.真空冷冻干燥与喷雾干燥长双歧杆菌的工艺比较研究[J].食品科学,2012,33(7):188-192.  
FU B,MA Q,WANG W W,et al. Comparison of vacuum freeze-drying and spray-drying processes for active *Bifidobacterium longum* powder production[J]. **Food Science**,2012,33(7):188-192. (in Chinese)
- [7] 王琳.干酪乳杆菌冷冻干燥保护剂筛选及作用机理研究[D].天津:天津科技大学,2012.
- [8] COULIBALY I,DUBOIS-DAUPHIN R,DESTAIN J,et al. The resistance to freeze-drying and to storage was determined as the cellular ability to recover its survival rate and acidification activity[J]. **International Journal of Microbiology**,2010,2010:625239.
- [9] PETER G,REICHART O. The effect of growth phase, cryoprotectants and freezing rates on the survival of selected micro-organisms during freezing and thawing[J]. **Acta Alimentaria**,2001,30(1):89-97.
- [10] COSTA E,USALL J,TEIXIDO 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.
- [11] 朱蒙蒙,李国莹,顾秋亚,等.响应面法优化青春双歧杆菌增殖培养基[J].食品与生物技术学报,2019,38(4):111-117.  
ZHU M M,LI G Y,GU Q Y,et al. Optimization of enrichment medium for *Bifidobacterium adolescentis* by response surface methodology[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2019,38(4):111-117. (in Chinese)
- [12] KAITO S,TOYA T,YOSHIFUJI K,et al. Fecal microbiota transplantation with frozen capsules for a patient with refractory acute gut graft-versus-host disease[J]. **Blood Advances**,2018,2(22):3097-3101.
- [13] BELLALI S,KHALIL J B,FONTANINI A,et al. A new protectant medium preserving bacterial viability after freeze drying[J]. **Microbiological Research**,2020,236:126454.
- [14] YUSTE A,LEONARDO A E,CALVO M A. 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.
- [15] JENA S,SURYANARAYANAN R,AKSAN A. Mutual influence of mannitol and trehalose on crystallization behavior in frozen solutions[J]. **Pharmaceutical Research**,2016,33(6):1413-1425.
- [16] 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**,2021,143:110235.
- [17] 张玉华,孟一,凌沛学,等.海藻糖和透明质酸对冻干双歧杆菌细胞的保护作用[J].食品科学,2010,31(7):236-241.  
ZHANG Y H,MENG Y,LING P X,et al. Protective mechanisms of trehalose and hyaluronic acid on lyophilized *Bifidobacterium longum*[J]. **Food Science**,2010,31(7):236-241. (in Chinese)
- [18] 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.
- [19] BRENNAN M,WANISMAIL B,JOHNSON M C,et al. Cellular damage in dried *Lactobacillus acidophilus*[J]. **Journal of Food Protection**,1986,49(1):47-53.
- [20] ONNEBY K,PIZZUL L,BJERKETORP J,et al. Effects of di- and polysaccharide formulations and storage conditions on survival of freeze-dried *Sphingobium* sp. [J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**,2013,29(8):1399-1408.
- [21] STEELS E L,LEARMONTH R P,WATSON K. Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically[J]. **Microbiology**,1994,140(3):569-576.
- [22] SCHOUG A,MAHLIN D,JONSON M,et al. Differential effects of polymers PVP90 and Ficoll400 on storage stability and viability of *Lactobacillus coryniformis* Si3 freeze-dried in sucrose[J]. **Journal of Applied Microbiology**,2010,108(3):1032-1040.
- [23] 陈俊亮,张慧芸,田芬,等.乳酸乳球菌乳脂亚种冷冻干燥保护剂优化及其贮藏稳定性[J].食品科学,2014,35(11):109-114.  
CHEN J L,ZHANG H Y,TIAN F,et al. Optimization of cryoprotectants for *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* KLDs 4. 0326 and its storage stability[J]. **Food Science**,2014,35(11):109-114. (in Chinese)
- [24] KURTMANN L,CARLSEN C U,RISBO J,et al. Storage stability of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* (La-5) in relation to water activity and presence of oxygen and ascorbate[J]. **Cryobiology**,2009,58(2):175-180.
- [25] 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.
- [26] TRIPATHI M K,GIRI S K. Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage[J]. **Journal of Functional Foods**,2014,9:225-241.