

培养条件对乳酸菌发酵剂抗冷冻干燥性能影响的研究进展

岳林芳¹, 王俊国^{1,*}, 萨如拉², 包秋华¹, 田文静¹, 陈霞¹, 张和平¹

(1. 内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010018;

2. 内蒙古农业大学食品科学与工程学院, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要: 乳酸菌发酵剂应具有高活力、耐贮藏性以及对不同环境的适应性, 特别是在冷冻干燥过程中活性的保持。本文从乳酸菌发酵剂菌种的内在特性、培养时间、培养基成分、培养温度及pH值的变化等方面综述了不同培养条件对乳酸菌发酵剂抗冷冻干燥性能影响的研究进展。说明乳酸菌在冷冻干燥中的存活率依赖于它的内在基因, 基因差别决定了不同的乳酸菌对冷冻干燥的抗性存在差异; 同时与细胞膜成分以及菌株形态有一定的关联; 通常生长在稳定期的乳酸菌其抗冷冻干燥能力较强; 培养基成分对菌株的影响因菌株不同而异; 较低的培养温度和pH值, 有助于提高乳酸菌的抗冷冻干燥性能。本文为提高乳酸菌的冻干存活率提供一些参考。

关键词: 乳酸菌发酵剂; 冷冻干燥; 不同培养条件; 存活率

Effects of Culture Conditions on the Survival of Freeze-Dried Lactic Acid Bacterial Starter Cultures

YUE Linfang¹, WANG Junguo^{1,*}, SA Rula², BAO Qiuhua¹, TIAN Wenjing¹, CHEN Xia¹, ZHANG Heping¹

(1. Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Education of Ministry, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China; 2. College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract: High viability, storability and tolerance to variable environmental conditions, especially to freeze-drying, are key factors in the development of lactic acid bacteria (LAB) starter cultures. The effects of diverse growth conditions on the survival of LAB during subsequent freeze-drying are reviewed in this article, including intrinsic factors of strains, culture time, medium components, and changes in temperature and pH. This review illustrates that the survival of lactic acid bacteria during freeze-drying depends on its inherent genes, and genetic differences determine different resistance of lactic acid bacteria to freeze-drying. At the same time, the survival of lactic acid bacteria is associated with components of the cell membrane and the bacterial morphology. Lactic acid bacteria usually have stronger tolerance to freeze-drying when they are cultured in the stable phase. Medium components have different influences on different LAB strains. The lower culture temperature and pH helps improve the tolerance of lactic acid bacteria to freeze-drying. This paper may provide a reference for improving the survival ability of LAB during freeze-drying.

Key words: lactic acid bacterial starter culture; freeze-drying; diverse culture conditions; survival ability

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201611047

中图分类号: TS252.54

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2016) 11-0270-07

引文格式:

岳林芳, 王俊国, 萨如拉, 等. 培养条件对乳酸菌发酵剂抗冷冻干燥性能影响的研究进展[J]. 食品科学, 2016, 37(11): 270-276. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201611047. <http://www.spkx.net.cn>

YUE Linfang, WANG Junguo, SA Rula, et al. Effects of culture conditions on the survival of freeze-dried lactic acid bacterial starter cultures[J]. Food Science, 2016, 37(11): 270-276. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201611047. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2015-07-03

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (31160315); 内蒙古自然科学基金项目 (2015MS0306; 2013MS1207); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31301516; 31301517); 内蒙古自治区配套中国科学院“西部之光”人才培养计划项目

作者简介: 岳林芳 (1992—), 女, 硕士研究生, 主要从事乳品微生物研究。E-mail: 2897040584@qq.com

*通信作者: 王俊国 (1970—), 男, 教授, 博士, 主要从事乳品工艺与生物技术研究。E-mail: junguo379@aliyun.com

近些年来,伴随着我国发酵乳制品25%以上的年增长率^[1],乳酸菌发酵剂在国内的应用也迅速普及开来。随着科学技术的发展,许多新的方法被用来生产乳酸菌发酵剂,如真空干燥、喷雾干燥及流化床干燥等,但到目前为止冷冻干燥技术被认为是最方便和最成功的方法^[2-3]。尽管费用较高,但它能长久保持发酵剂的活力,便于贮藏和应用^[4-5]。

在冷冻干燥过程中,乳酸菌发酵剂不可避免地会受到冷冻和干燥带来的各种损伤,导致菌株存活率降低、活力下降,进而造成生产成本的增加,产品质量不稳定等问题。因此如何提高菌株在冷冻干燥过程中的存活率是制作高效浓缩型乳酸菌发酵剂的核心技术之一,但由于我国在此项关键技术的缺失,导致目前国内乳制品企业生产发酵乳制品所采用的乳酸菌发酵剂几乎全部被国外企业所垄断。

尽管有大量的研究证明,冷冻干燥保护剂以及冷冻干燥的工艺对乳酸菌的存活率起着非常关键的作用,但越来越多的研究表明,乳酸菌的生长条件对其抗冷冻干燥性能也起着非常重要的作用,通过改变乳酸菌的生长条件可以明显地提高乳酸菌抗冷冻干燥的性能^[2-7]。

本文从菌种的内在特性、培养条件等方面分析了影响乳酸菌发酵剂抗冷冻干燥的一些因素,为我国生产拥有自主知识产权的高效浓缩型乳酸菌发酵剂提供一定的理论参考。

1 乳酸菌的内在特性

制备高效浓缩型冷冻干燥发酵剂对菌株的要求不仅体现在良好的发酵产酸、产香以及较弱的后酸化等生产性能方面,同时也应具有较强的抗冷冻抗干燥的性能。只有这样才能保证冷冻干燥后的发酵剂菌株具有足够的活菌数。与乳酸菌抗冷冻干燥特性相关的内在因素主要有以下几个方面。

1.1 遗传物质

众所周知,微生物的冷冻干燥存活率依赖于它的内在基因,这种基因差别决定了不同的乳酸菌对冷冻干燥的抗性存在差异,有些特定的菌株对冷冻干燥特别敏感,常常在冻干后丧失了活性。但对大多数乳酸菌而言,对冷冻干燥未显示出特别的敏感性^[2,4,7]。研究表明在冷冻干燥过程中,细胞内的大分子物质如DNA、RNA及核糖体等将受到影响,这将导致遗传物质的转录、翻译、DNA的复制以及蛋白质的合成出现问题^[4,8]。

除了遗传物质外,不同乳酸菌间的细胞膜结构以及菌株形态等差异也会造成其对冷冻干燥的抗性不同^[9]。

1.2 细胞膜结构

细胞膜是将乳酸菌与外界环境隔离的主要屏障,因

此在冷冻干燥过程中它将是首要被伤害目标,这种伤害体现在膜完整性的破坏^[10]。细胞膜中较高含量的不饱和脂肪酸或环丙烷化脂肪酸(cycC_{19:0})有助于增强菌株的抗冷冻能力^[5,6,11-12]。不饱和脂肪酸的熔点较低,可以保持菌株在冷冻过程中细胞膜的流动性,从而起到维持细胞膜的功能,增强其抗冷冻性^[12]。关于环丙烷化脂肪酸的作用有所争论:有些人认为同不饱和脂肪酸的作用一样,体现在增加细胞膜的流动性上,当冻干时其能防止脂肪酸过紧地结合到细胞膜上^[13-15];也有人认为与顺式双键的结构相比,环丙烷的环状结构会使膜变得僵化,流动性下降,它约束了酰基链的移动和失序,从而防止了在冷冻干燥过程中膜的完整性受到破坏^[5,16]。因此,可通过测定菌株细胞膜中脂肪酸的组成成分及其含量判断不同菌株的抗冷冻能力。

1.3 菌株形态

研究发现,菌体细胞形态、大小对冷冻干燥过程中乳酸菌的存活率有一定的影响,如形状呈小球型的球菌比长杆状的杆菌对冷冻干燥具有更强的抵抗力;短棒状杆菌比长纤细状杆菌对冷冻干燥抵抗力强^[17-18]。出现这些现象的原因可能是乳酸菌细胞的表面积越大,在冷冻过程中,形成的冰晶对其细胞膜的机械损伤越大^[19]。但对于明串珠菌与保加利亚乳杆菌来说恰恰相反,在相同的冻干条件下,明串珠菌的活力要远远低于杆菌的,这说明抗冷冻干燥性能和菌株间的形态、遗传物质及细胞膜组成等多种因素密切相关^[19-20]。

以上研究内容表明,菌株的抗冷冻干燥性能首先取决于乳酸菌的内在基因,在此基础上与细胞膜的脂肪酸构成以及细菌的形态有一定的关联性。总体而言,细胞膜中高含量的不饱和脂肪酸及环丙烷化脂肪酸有助于提高菌体的抗冷冻干燥能力,形状是小球形、短棒状的乳酸菌抗冷冻干燥能力略强。

2 培养时间

研究表明,处在不同生长期的菌株对冷冻干燥的抗性有很大的差别^[21-22]。生产乳酸菌发酵剂最理想的培养时间因具体菌株而异。一般来说,乳酸菌通常生长在对数期末期或稳定期早期,除了考虑在此阶段收获的活菌数最多外,还有一个原因是处在这个时期的菌株在冷冻干燥过程中其存活率较高^[23]。有研究表明,处在幼龄期和老龄期的菌体细胞在冷冻干燥过程中,死亡率较高,而处在对数生长末期和稳定期前期的菌体细胞其存活率较高^[24]。Nagawa等^[25]研究发现,对处于稳定期早、末期的长双歧杆菌进行冷冻干燥,其处于稳定早期的活菌数是处于后期的100倍。Bisutti等^[2]也得到相似的结论,造成这一现象的原因可能是对数生长末期和稳定前期的菌体

细胞生长代谢最旺盛、活力也最强,与其他生长阶段的菌体细胞相比,耐受不良环境的能力也要强。

进一步的研究显示,处在稳定期的菌株对冷冻干燥的抗性要强于对数生长期的^[10-11,21,26]。Teixeira等^[27]比较了生长在对数期和稳定期的保加利亚乳杆菌对干燥的抗性,结果显示,其干燥后的存活率分别是5.80 (lg (CFU/mL)) 和7.45 (lg (CFU/mL)) ; Corcoran等^[28]也研究了在相同干燥条件下的不同生长时期鼠李糖乳杆菌的存活率,发现在稳定期乳酸菌的存活率为31%~50%,在对数期的为14%; Rault等^[29]在实验中证明了保加利亚乳杆菌CFL1处在稳定期的抗冷冻性好于其处于对数期; Ampatzoglou等^[30]也发现在不控制酸度的情况下,生长在稳定期的鼠李糖乳杆菌GG的抗冷冻干燥性能要明显好于对数期的; Louesdon等^[31]对长双歧杆菌RO175的研究也揭示出在稳定期收获的菌株抗冷冻干燥性能要明显好于对数期的。

产生这些现象的可能原因有:处在稳定期的菌株因为碳源或其他可利用营养物的耗尽,从而诱导微生物产生应激反应,提高了其对不良环境的抗性^[4,32-33]; 同时在特定环境下,细胞膜脂类成分发生改变,如Velly^[11]、Louesdon^[31]等证实了与处在对数期的乳酸菌相比,稳定期菌体的细胞膜成分发生了改变,环丙烷化脂肪酸(cycC_{19:0})的含量显著增加,从而使菌株抗冷冻干燥性能增强。环丙烷化脂肪酸被认为是当乳酸菌进入稳定期后,以C_{18:1}为底物合成的,已有大量研究显示细胞膜中的环丙烷化脂肪酸含量与其抗冷冻干燥性能呈现正相关^[6,11-12,31,34]。Schwab等^[10]也通过实验证实了这些原因,发现处在稳定期的乳酸菌在应激蛋白的表达水平、膜脂类的成分以及细胞壁的结构上都发生了剧烈变化,导致其对冷冻干燥等不利条件的抗性增加。

然而, Palmfeldt等^[35]对稳定期早、中、晚期的罗伊氏乳杆菌进行冷冻干燥,结果发现其存活率没有明显的差别; 同样Louesdon等^[31]对分别处在对数期和稳定期的布氏乳杆菌R1102进行抗冷冻干燥存活率的测定,并没有发现二者存在显著差异。这些现象的出现可能是由于不同菌株间的差异造成的^[31-32]。

以上综述表明,一般情况下,处在稳定生长期的乳酸菌其抗冷冻干燥性能要强于其他生长阶段,同时也要考虑到菌株间的特异性。

3 培养基成分

人们在早期的研究中关注的是保护剂和不同生长阶段对乳酸菌抗冷冻干燥性能的影响,但近来研究发现,乳酸菌在冷冻干燥过程中的存活率与其生长培养基的成分也有着十分密切的联系^[6,8,36-39]。

3.1 碳源和氮源

Carvalho等^[40]发现当用果糖、乳糖或甘露糖替代MRS培养基中的葡萄糖时,保加利亚乳杆菌具有更好地抗冷冻干燥性能,其中甘露糖的效果最好。Li Chun等^[6]发现与不含葡萄糖的MRS生长培养基相比,添加单糖(果糖、葡萄糖)或双糖(乳糖、蔗糖)可以明显提高保加利亚乳杆菌L2的冷冻干燥生存率; Chen He等^[39]发现在生长培养基中加入海藻糖可以提高保加利亚乳杆菌Lb6的冷冻存活率。所以,选择合适的碳源可以增强菌株抗冷冻干燥的能力。

Shao Yuyu等^[8]发现在MRS培养基中生长的保加利亚乳杆菌ND02,冷冻干燥后的存活率为55.3%,当在培养基中额外添加4%酵母浸膏时,其冷冻干燥后的存活率下降到12%。Senz等^[41]调整MRS培养基的配方,加入一定量的猪源蛋白胨,发现可以明显改善嗜酸乳杆菌NCFM抗冷冻干燥性能; 与此类似,包维臣等^[42]将培养基的氮源由酵母浸膏改为动物蛋白胨时,保加利亚乳杆菌ND02在真空冷冻干燥过程的存活率明显升高; Li Chun等^[6]在MRS培养基中额外添加氨基酸,发现对提高保加利亚乳杆菌L2的抗冷冻干燥能力有一定的促进作用。

造成这些现象的原因是多方面的。不同种类的氮源及碳源会造成乳酸菌在形态上和生理上的差异,进而导致了其对外界不良环境的抗性不同。Shao Yuyu等^[8]通过显微镜观察发现,在额外添加酵母浸膏的MRS培养基上生长的保加利亚乳杆菌ND02,其细菌长度是空白对照的2倍多,菌体表面积的增加将导致在冷冻过程中形成的冰晶对其细胞膜的机械损伤增大,进而导致细胞死亡; Senz等^[41]发现在MRS培养基中加入猪源蛋白胨后,嗜酸乳杆菌NCFM形成短粗杆状的形态,其比细长杆状的在冷冻干燥过程中稳定性更强。

乳酸菌对不同种类的氮源及碳源有不同的代谢途径,进而产生不同的代谢产物,有些代谢产物对乳酸菌抗冷冻干燥的能力有促进作用^[36-37]。例如肠膜明串珠菌在含有蔗糖或果糖的培养基生长时,可以产生甘露醇,它可以维持菌体在低水分下的活性,并能防止细菌受到氧化伤害^[43]; 同样对于海藻糖,当它被吸收进入细胞内时,可以稳定细胞质内大分子物质,如DNA、核糖体等,从而起到抗冷冻干燥的保护作用; 但当它被乳酸菌作为碳源代谢时,反而会使酸度增加,导致菌体在冷冻干燥过程中死亡率增加^[4]。同时研究发现,当乳酸菌在含有某些碳水化合物培养基中生长时,代谢产生的胞外多糖也起到很好的抗冷冻干燥作用^[23,37]。

碳水化合物对菌体的保护作用也有可能得益于它具有羟基基团的空间结构,大量的羟基可以代替水分子,通过氢键与蛋白质的极性基团结合维持菌体蛋白质的空间结构,防止在冷冻干燥过程中由于脱水而导致的蛋白质变性^[37,39]。

除了生长培养基中不同的碳源和氮源外,在培养基中的其他成分也会影响在冷冻干燥过程中乳酸菌的存活率。

3.2 相容性物质

一些研究发现,当乳酸菌在含有特定成分的培养基中生长时,能从生长培养基中吸收些相容性物质,这些相容性物质的存在不影响细胞正常的功能,并能通过调节乳酸菌细胞内的渗透压来保护细胞膜和蛋白质等成分进而增强菌体的抗冷冻干燥能力。乳酸菌自身不能合成这些物质,同时它们进入菌体是个耗能过程,需要有糖类等作为能量来源,而冷冻干燥过程时间太短,不足以使菌体积累这些物质,所以乳酸菌只能从生长培养基中吸收这些相容性物质或它们的前体物质^[23]。这些相容性物质通常是一些小的有机化合物,包括一些氨基酸(谷氨酸、脯氨酸等)、季铵盐(甜菜碱、肉毒碱等)和一些糖类(蔗糖、海藻糖等)^[37,44]。Santivarangkna等^[23]认为相容性物质的存在,加强了水分子与细胞内生物大分子物质的亲和性,从而维持了蛋白质的结构、酶的活性以及细胞膜磷脂的稳定性,进而改善了菌株在冷冻干燥中的生存率。相容性物质的吸收与培养基的渗透压有一定的关联,增加培养基的渗透压可以促进相容性物质的吸收^[4,37,45]。

3.3 其他成分

Wright^[46]、Beal^[47]等发现在生长培养基中添加一定量的 Ca^{2+} 可以增强嗜酸乳杆菌NCFM及保加利亚乳杆菌1234-O和F对抗冷冻干燥的能力,分析其可能的原因有以下几点:在培养基中加入 Ca^{2+} 可以促进乳杆菌形成短棒状菌,从而抑制了长纤细状菌的形成,而表面积的减少可以增强菌株对冷冻的抵抗力^[46];添加 Ca^{2+} 形成的钙盐有一定的缓冲能力,可以减少培养过程产生的乳酸对其形成的伤害^[46-47];同时 Ca^{2+} 的添加还可以提高油酸和吐温-80的效力,从而增强了细胞膜在冷冻过程中的流动性^[41]。

研究发现,生长培养基中所含的吐温-80对细菌的抗冷冻性影响也非常大。Hansen等^[48]分别在MRS培养基中加入吐温-80、吐温-20、亚油酸及亚麻酸等不同脂肪酸,发现在含有吐温-80培养基中生长的嗜酸乳杆菌La-5抗冷冻性最强;Smittle等^[49]将保加利亚乳杆菌分别培养于MRS培养基和不含吐温-80的MRS培养基中,液氮冷冻后细胞死亡率分别为5%和100%;当培养于TYLCS培养基时,死亡率为68%,加入吐温-80后死亡率降至5%。在培养液中加入吐温-80后可能是促进了乳酸菌的代谢,使得细胞膜上饱和脂肪酸向不饱和脂肪酸转变速率加快,不饱和脂肪酸的增加有助于保持膜在冻干过程中的流动性^[48,50-51];同时添加吐温-80也会增强细胞膜对水的通透性,防止冷冻过程中细胞内形成冰晶对细胞的伤害^[48];而Hillgren等^[52]认为在冻干过程中与蛋白质结合的水分子

逐渐脱落,蛋白质结构受到破坏导致细胞的死亡,而吐温-80可以取代水分子与蛋白质结合,维持其构象和功能的稳定性,从而提高了细菌的存活率。

3.4 培养基成分的缺失

研究发现,培养基成分的缺失也有可能产生额外的效果。为了验证饥饿是否会对菌株的抗冷冻干燥性能产生影响,Carvalho等^[36]将保加利亚乳杆菌悬浮在20℃水中处理20 min,发现与没有处理过的菌体相比,其抵抗冷冻干燥的性能明显增加;Wang等^[34]将经过饥饿诱导的嗜酸乳杆菌RD758与正常菌株相比,结果发现饥饿诱导可以显著提高其抗冷冻干燥性能。但Siaterlis等^[38]却得出相反的结论,当将MRS生长培养基中的葡萄糖减少一半时,植物乳杆菌和鼠李糖乳杆菌GG对冷冻干燥的抵抗力大幅度降低。

为什么相似的饥饿实验会产生不同的现象?主要原因有可能存在两点:一是菌株间内在基因差异造成的;另一个是实验的菌株处在不同的生长期。前者是将存在稳定期的菌株进行饥饿刺激,而后者是还未到达对数生长末期的菌株。不同生长期决定了菌株对不利环境的抗性不同,大量研究表明只有进入稳定期的菌株在饥饿条件下才有可能合成大量的应激蛋白^[32,34,36,38]。

经过一定时间饥饿处理的细胞可以诱导基因编码一些转录因子来调节应激蛋白的产生。由此产生的应激蛋白可以增强与水的氢键作用,从而提高了那些大分子周围非冻结水的含量,避免了过量水分流失对乳酸菌造成的伤害;同时在饥饿状态下乳酸菌代谢水平和生理状态会做出适当的调整,如限制RNA合成,诱导特定基因表达和改变某些氨基酸的生物合成等多效性反应,经饥饿胁迫的乳酸菌能够更好的抵御热胁迫、乙醇胁迫、酸胁迫和渗透压胁迫等^[32,34]。还有一个显著的变化是饥饿效应引起的细胞膜脂质成分的改变,不饱和、环状以及分枝状脂肪酸明显增加,这些脂类含量的增加可以降低细胞膜脂质的固液相转化温度进而维持其在冷冻干燥状态下的流动性。它们和菌株的抗冻性的相关性已经被许多研究证实^[5,12,34]。

综上所述,我们可以看到培养基的碳源和氮源对不同菌株的影响各不相同,选择合适的碳源和氮源可以增强菌株抗冷冻干燥的能力;添加适量的 Ca^{2+} 以及吐温-80可以增强菌株的抗冷冻干燥能力;同样对处在稳定生长期的乳酸菌而言,培养基营养成分的缺失可以增强菌株的抗冷冻干燥能力。

4 培养温度以及pH值

大量证据表明细胞膜的脂肪酸构成和流动性与生长环境有着一定的关联性^[10,53-55]。在乳酸菌培养过程中当

发酵条件（如温度和pH值等）发生改变时，乳酸菌会调整膜中脂类的成分来保障磷脂双分子层膜的流动性，以便使磷脂双分子层膜保持在一个理想的状态，从而维持细胞的正常功能。这种调整包括改变脂肪酸的饱和程度、碳链的长度、分支的位置、顺反异构化以及环丙烷化等^[12,31,34,47]。研究显示，有些脂肪酸成分的增加与菌株抗冷冻干燥性能的提高呈现正相关性，如不饱和脂肪酸、环丙烷化脂肪酸（cycC_{19:0}）等^[5,11-12,15,31,34,47]。考虑到在冷冻干燥过程中乳酸菌暴露在极端的压力下，菌体自身不能通过调整细胞膜的性能来阻止对膜的破坏，因此在发酵过程中通过调整发酵条件以精确控制脂肪膜的成分来提高乳酸菌的抗冷冻性被认为是一个非常有效的方法^[12,31,55]。

4.1 培养温度

Wang等^[14]发现较低的发酵温度使嗜酸乳杆菌RD758具有更好的抗冻性，与42℃的生长温度相比，当温度为30℃时，在冷冻过程中其存活率较高；其在冷冻贮藏期间发酵温度为30℃或37℃较42℃的抗冻性更强；通过分析脂肪酸的组成及含量发现低温有助于细胞膜中形成高含量的C_{16:0}和cycC_{19:0}脂肪酸、低含量的C_{18:0}脂肪酸，同时不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比值（unsaturated fatty acids/saturated fatty acids, UFAs/SFAs）也会升高。以上研究表明，在相对低的温度下，细胞膜中脱氢酶的活性增加，导致不饱和脂肪酸含量增加，膜的流动性增强^[14]。但值得注意的是，细胞膜中较高含量的不饱和脂肪酸容易造成乳酸菌在贮藏期间氧化失活，特别是当水分含量较低时^[56]。低温培养提高抗冻性的另一原因是促进某些乳酸菌菌体多糖的合成。如嗜热链球菌在30℃比40℃培养时产生的不溶性多糖高2~5倍，这种物质可提高冷冻干燥存活率^[15]。

4.2 培养pH值

同样Wang等^[14]研究发现嗜酸乳杆菌RD758生长在酸性pH 4.5和pH 5.0较pH 6.0在冷冻中的抗冻性更强，活力下降更少；而在冻藏过程中，菌体生长在pH 5.0条件下，细胞抗冻性最强。通过分析细胞膜脂肪酸的组成及含量发现，在酸性条件下菌株具有较高含量的cycC_{19:0}脂肪酸以及不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸比值较高。Palmfeldt等^[35]研究表明培养基pH值为5.0时，罗伊氏乳杆菌有较强的抗冷冻性，而pH值为6.0时抗冷冻性较差。Beal等^[47]也发现发酵pH值为5.5时，嗜热链球菌有较好的抗冷冻性，对不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比例分析发现，较低的pH值可以引起细胞内不饱和脂肪酸的积累。

值得注意的是并非所有的菌株都能在低酸或低温下，其抗冷冻性得到增强。为了研究培养温度和pH值对乳酸菌细胞膜脂肪酸以及抗冷冻干燥性能的影响，将稳定期的罗伊氏乳杆菌I5007放入pH 6.7的MRS培养基

中培养6 h后，与对照组（pH 5.7）相比其冷冻存活率从12.95%提高到27.38%；同样将菌株培养温度从37℃提高到47℃，保持6 h，与对照组（37℃）相比其冷冻存活率提高到17.87%，分析发现这与细胞膜中不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比例（UFAs/SFAs）的明显提高有关^[12]。

4.3 协同作用

考虑到培养温度和pH值有可能对乳酸菌细胞膜脂肪酸构成存在协同作用，Li Chun等^[15]通过研究保加利亚乳杆菌L2在不同发酵pH值（5.0、5.5、6.0、6.5）和温度（30、35、37、39℃）条件下对其在冷冻干燥中存活的影响。通过不同组合试验，最后得出：L2在30℃、pH 5.0的培养条件下其冷冻干燥存活率最大为63.2%；或在39℃和pH 6.0条件下，其冷冻干燥存活率可达57.6%。以上两种培养条件下的L2细胞膜上的cycC_{19:0}含量都较高。这说明培养温度和pH值共同改变脂肪酸的含量，进而影响菌体细胞的抗冷冻性。

综合分析，我们可知选择适当的培养温度和培养pH值，可以提高菌株抗冷冻干燥性能；对一些乳酸菌来说，在较低温度、pH值的条件下培养可以提高其抗冷冻干燥能力。

5 结 语

在冷冻干燥过程中，乳酸菌的存活性受到内在与外在多种因素的影响。从内在因素分析，首先取决于乳酸菌的内在基因，在此基础上与细胞膜的脂肪酸构成以及细菌的形态有一定的关联性，总体而言，细胞膜中高含量的不饱和脂肪酸及环丙烷化脂肪酸有助于提高菌体的抗冷冻干燥能力，形状呈小球型、短棒状的乳酸菌抗冷冻干燥能力略强。

对外在的培养条件而言，处在稳定生长期的乳酸菌其抗冷冻干燥性能要强于其他生长阶段；培养基的碳源和氮源对不同菌株的影响各不相同，选择合适的碳源和氮源可以增强菌株抗冷冻干燥的能力；添加适量的Ca²⁺以及吐温-80可以增强菌株的抗冷冻干燥能力；同样对处在稳定生长期的乳酸菌而言，培养基营养成分的缺失可以增强菌株的抗冷冻干燥能力；选择适当的培养温度和培养pH值，可以提高菌株抗冷冻干燥性能，对一些乳酸菌来说，在较低温度、pH值的条件下培养可以提高其抗冷冻干燥能力。

参考文献：

- [1] 张和平. 中国益生乳酸菌及益生发酵乳研究开发现状及发展对策[J]. 乳业科学与技术, 2009, 32(2): 51-54. DOI:10.3969/j.issn.1671-5187.2009.02.001.

- [2] BISUTTI I L, HIRT K, STEPHAN D. Influence of different growth conditions on the survival and the efficacy of freeze-dried *Pseudomonas fluorescens* strain Pf153[J]. Biocontrol Science and Technology, 2015, 25(11): 1-25. DOI:10.1080/09583157.2015.1044498.
- [3] SHARMA R, SANODIYA B S, THAKUR G S, et al. Standardization of lyophilization medium for *Streptococcus thermophilus* subjected to viability escalation on freeze drying[J]. Microbiology Research, 2014, 5(1): 1-3. DOI:10.4081/mr.2014.5402.
- [4] PEIREN J, BUYSE J, de VOS P, et al. Improving survival and storage stability of bacteria recalcitrant to freeze-drying: a coordinated study by European culture collections[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(8): 3559-3571. DOI:10.1007/s00253-015-6476-6.
- [5] VELLY H, BOUIX M, PASSOT S, et al. Cyclopropanation of unsaturated fatty acids and membrane rigidification improve the freeze-drying resistance of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TOMSC161[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 99(2): 907-918. DOI:10.1007/s00253-014-6152-2.
- [6] LI Chun, LIU Libo, LIU Ning. Effects of carbon sources and lipids on freeze-drying survival of *Lactobacillus bulgaricus* in growth media[J]. Annals of Microbiology, 2011, 62(3): 949-956. DOI:10.1007/s13213-011-0332-4.
- [7] MONTEL M G, PASTERIS S E, OTERO M C, et al. Survival and beneficial properties of lactic acid bacteria from ranculture subjected to freeze-drying and storage[J]. Journal of Applied Microbiology, 2014, 116(1): 157-166. DOI:10.1111/jam.12359.
- [8] SHAO Yuyu, GAO Shuran, GUO Huiling, et al. Influence of culture conditions and preconditioning on survival of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* ND02 during lyophilization[J]. Journal of Dairy Science, 2014, 97(3): 1270-1280. DOI:10.3168/jds.2013-7536.
- [9] SELMER-OLSEN E, BIRKELAND S E, 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. DOI:10.1046/j.1365-2672.1999.00839.x.
- [10] SCHWAB C, VOGEL R, GANZLE 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.
- [11] VELLY H, FONSECA F, PASSOT S, et al. Cell growth and resistance of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TOMSC161 following freezing, drying and freeze-dried storage are differentially affected by fermentation conditions[J]. Journal of Applied Microbiology, 2014, 117(3): 729-740. DOI:10.1111/jam.12577.
- [12] 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.
- [13] ZAVAGLIA A G, DISALVO E A, DEANTONI G L. Fatty acid composition and freeze-thaw resistance in lactobacilli[J]. Journal of Dairy Research, 2000, 67(2): 241-247. DOI:10.1017/s0022029900004179.
- [14] WANG Y, CORRIEU G, BEAL C. Fermentation pH and temperature influence the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758[J]. Journal of Dairy Science, 2005, 88(1): 21-29. DOI:10.3168/jds.s0022-0302(05)72658-8.
- [15] LI Chun, ZHAO Jialiang, WANG Yutang, et al. Synthesis of cyclopropane fatty acid and its effect on freeze-drying survival of *Lactobacillus bulgaricus* L2 at different growth conditions[J]. World Journal Microbiology Biotechnology, 2009, 25(9): 1659-1665. DOI:10.1007/s11274-009-0060-0.
- [16] TO T M H, GRANDVALET C, TOURDOT-MARECHAL R. Cyclopropanation of membrane unsaturated fatty acids is not essential to the acid stress response of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(10): 3327-3334. DOI:10.1128/aem.02518-10.
- [17] BOZOGLU T F, OZILGEN M, BAKIR U. Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze-drying[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1987, 9(9): 531-537. DOI:10.1016/0141-0229(87)90082-2.
- [18] FONSECA F, BÉAL C, CORRIEU G. Method for quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage[J]. Journal of Dairy Research, 2000, 67: 83-90. DOI:10.1017/s00220299900401x.
- [19] CARVALHO A S, SILVA J, HO P, et al. Protective effect of sorbitol and monosodium glutamate during storage of freeze-dried lactic acid bacteria[J]. Le Lait, 2003, 83: 203-210. DOI:10.1051/LAIT:2003010.
- [20] TSVETKOV T S, BRANKOVA R. Viability of micrococci and lactobacilli upon freezing and freeze-drying in the presence of different cryoprotectants[J]. Cryobiology, 1983, 20(3): 318-323. DOI:10.1016/0011-2240(83)90020-2.
- [21] MULLER J A, ROSS R P, FITZGERALD G F. Manufacture of probiotic bacteria[M]//CHARALAMPOPOULOS D, RASTALL R A. Prebiotics and probiotics science and technology. New York: Springer, 2009: 725-759.
- [22] FATEMEH S, MUSTAFA S, ARIFF A, et al. Optimization of a cryoprotective medium and survival of freeze-dried *Bifidobacterium infantis* 20088 throughout storage, rehydration and gastrointestinal tract transit for infant formula probiotic applications[J]. African Journal of Microbiology Research, 2011, 5(21): 3373-3384. DOI:10.5897/ajmr11.319.
- [23] SANTIVARANGKNA C, HIGL B, FOERST P. Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures[J]. Food Microbiology, 2008, 25(3): 429-441. DOI:10.1016/j.fm.2007.12.004.
- [24] SAARELA M, VIRKAJARVI I, ALAKOMI H L, et al. Influence of fermentation time, cryoprotectant and neutralization of cell concentrate on freeze-drying survival, storage stability, and acid and bile exposure of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* cells produced without milk-based ingredients[J]. Journal of Applied Microbiology, 2005, 99(6): 1330-1339. DOI:10.1111/j.1365-2672.2005.02742.x.
- [25] NAGAWA M, NAKABAYASHI A, FUJINO S. Preparation of the bifidus milk powder[J]. Journal of Dairy Science, 1988, 71(7): 1777-1782. DOI:10.3168/jds.s0022-0302(88)79745-3.
- [26] SAARELA M, RANTALA M, HALLAMAA K, et al. Stationary-phase acid and heat treatments for improvement of the viability of probiotic lactobacilli and bifidobacteria[J]. Journal of Applied Microbiology, 2004, 96(6): 1205-1214. DOI:10.1111/j.1365-2672.2004.02286.x.
- [27] TEIXEIRA P, CASTRO H, KIRBY R. Spray-drying as a method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1995, 78(4): 456-462. DOI:10.1111/j.1365-2672.1995.tb03433.x.
- [28] CORCORAN B M, ROSS R P, FITZGERALD G F, et al. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances[J]. Journal of Applied Microbiology, 2004, 96(5): 1024-1039. DOI:10.1111/j.1365-2672.2004.02219.x.

- [29] RAULT A, BOUIX M, BEAL C. Cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 is influenced by the physiological state during fermentation[J]. International Dairy Journal, 2010, 20(11): 792-799. DOI:10.1016/j.idairyj.2010.05.002.
- [30] AMPATZOGLOU A, SCHURR B, DEEPIKA G, et al. Influence of fermentation on the acid tolerance and freeze drying survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG[J]. Biochemical Engineering Journal, 2010, 52(1): 65-70. DOI:10.1016/j.bej.2010.07.005.
- [31] LOUESDON S, CHARLOT-ROUGEËS, TOURDOT-MARECHAL R, et al. Membrane fatty acid composition and fluidity are involved in the resistance to freezing of *Lactobacillus buchneri* R1102 and *Bifidobacterium longum* R0175[J]. Microbial Biotechnology, 2015, 8(2): 311-318. DOI:10.1111/1751-7915.12132.
- [32] MORGAN C A, HERMAN N, WHITE P A, et al. Preservation of micro-organisms by drying: a review[J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 66(2): 183-193. DOI:10.1016/j.mimet.2006.02.017.
- [33] MENG Xiangchen, STANTON C, FITZGERALD G F, et al. Anhydrobiotics: the challenges of drying probiotic cultures[J]. Food Chemistry, 2008, 106(4): 1406-1416. DOI:10.1016/J.FOODCHEM.2007.04.076.
- [34] WANG Y, DELETTRE J, CORRIEU G, et al. Starvation induces physiological changes that act on the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758[J]. Biotechnology Progress, 2011, 27(2): 342-350. DOI:10.1002/btpr.566.
- [35] PALMFELDT J, HAHN-HAGERDAL B. Influence of culture pH on survival of *Lactobacillus reuteri* subjected to freeze-drying[J]. International Journal of Food Microbiology, 2000, 55(1/2/3): 235-238. DOI:10.1016/S0168-1605(00)00176-8.
- [36] CARVALHO A S, SILVA J, HO P, et al. Effects of addition of sucrose and salt, and of starvation upon thermotolerance and survival during storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*[J]. Journal of Food Science, 2003, 68(8): 2538-2541. DOI:10.1111/j.1365-2621.2003.tb07057.x.
- [37] 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. DOI:10.1016/j.idairyj.2004.02.001.
- [38] SIATERLIS A, DEEPIKA G, CHARALAMPOPOULOS D. Effect of culture medium and cryoprotectants on the growth and survival of probiotic lactobacilli during freeze drying[J]. Letters in Applied Microbiology, 2009, 48(3): 295-301. DOI:10.1111/j.1472-765x.2008.02529.x.
- [39] CHEN He, CHEN Shiwei, CHEN Hongli, et al. Effects of carbon sources and prebiotics added to growth media on proliferation and survival of *Lactobacillus bulgaricus* LB6 during freeze-drying[J]. Journal of Chemical & Pharmaceutical Research, 2014, 6(6): 894-899.
- [40] CARVALHO A S, SILVA J, HO P, et al. Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*[J]. Biotechnology Progress, 2008, 20(1): 248-254. DOI:10.1021/bp034165y.
- [41] SENZ M, van Lengerich B, BADER J, et al. Control of cell morphology of probiotic *Lactobacillus acidophilus* for enhanced cell stability during industrial processing[J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 192: 34-42. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.015.
- [42] 包维臣. 保加利亚乳杆菌高密度培养及冷冻保护的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2012.
- [43] WISSELINK H W, WEUSTHUIS R A, EGGINK G, et al. Mannitol production by lactic acid bacteria: a review[J]. International Dairy Journal, 2002, 12(2): 151-161. DOI:10.1016/S0958-6946(01)00153-4.
- [44] BERGENHOLTZ Å S, WESSMAN P, WUTTKE A, et al. A case study on stress preconditioning of a *Lactobacillus* strain prior to freeze-drying[J]. Cryobiology, 2012, 64(3): 152-159. DOI:10.1016/j.cryobiol.2012.01.002.
- [45] le MARREC C, BON E, LONVAUD-FUNEL A. Tolerance to high osmolality of the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni* and identification of potential osmoprotectants[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 115(3): 335-342. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.039.
- [46] WRIGHT C T. Survival of *Lactobacillus bulgaricus* during freezing and freeze-drying after growth in the presence of calcium[J]. Food Science, 1983, 48: 773-776. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.039.
- [47] BEAL C, FONSECA F, CORRIEU G. Resistance to freezing and frozen storage of *Streptococcus thermophilus* is related to membrane fatty acid composition[J]. Journal of Dairy Science, 2001, 84(11): 2347-2356. DOI:10.3168/jds.s0022-0302(01)74683-8.
- [48] HANSEN M L R W, PETERSEN M A, RISBO J, et al. Implications of modifying membrane fatty acid composition on membrane oxidation, integrity, and storage viability of freeze-dried probiotic, *Lactobacillus acidophilus* La-5[J]. Biotechnology Progress, 2015, 31(3): 799-807. DOI:10.1002/btpr.2074.
- [49] SMITTLE R B, GILLILAND S E, SPECK M L. Death of *Lactobacillus bulgaricus* resulting from liquid nitrogen freezing[J]. Applied Microbiology, 1972, 24(4): 551-554.
- [50] FONSECA F, BEAL C, 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.
- [51] KIMOTO H, OHMOTO S, OKAMOTO T. Enhancement of bile tolerance in lactococci by Tween 80[J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 92: 41-46. DOI:10.1046/j.1365-2672.2002.01505.x.
- [52] HILLGREN A, LINDGREN J, ALDEN M. Protection mechanism of Tween 80 during freeze -thawing of a model protein, LDH[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2002, 237(1/2): 57-69. DOI:10.1016/S0378-5173(02)00021-2.
- [53] OLDENHOF H, WOLKERS W F, FONSECA F, et al. Effect of sucrose and maltodextrin on the physical properties and survival of air-dried *Lactobacillus bulgaricus*: an *in situ* fourier transform infrared spectroscopy study[J]. Biotechnology Progress, 2005, 21(3): 885-892. DOI:10.1021/bp049559j.
- [54] WU Chongde, ZHANG Juan, WANG Miao, et al. *Lactobacillus casei* combats acid stress by maintaining cell membrane functionality[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2012, 39(7): 1031-1039. DOI:10.1007/s10295-012-1104-2.
- [55] GAUTIER J, PASSOT S, PENICAUD C, et al. A low membrane lipid phase transition temperature is associated with a high cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* CFL1[J]. Journal of Dairy Science, 2013, 96(9): 5591-5602. DOI:10.3168/jds.2013-6802.
- [56] BOYLAN J A, LAWRENCE K A, DOWNEY J S, et al. *Borrelia burgdorferi* membranes are the primary targets of reactive oxygen species[J]. Molecular Microbiology, 2008, 68(3): 786-799. DOI:10.1111/j.1365-2958.2008.06204.x.