

# 益生菌冻干保护剂及工艺优化研究

周莉, 平洋, 谭静, 罗蓓蓓, 王法云\*

(河南省商业科学研究所有限责任公司, 郑州 450002)

**摘要:** **目的** 探究益生菌冻干保护剂对其存活率的影响, 并优化其工艺。**方法** 采用真空冷冻干燥法, 以保加利亚乳杆菌为研究对象, 探究冻干保护剂对益生菌冻干存活率的影响, 并通过单因素和正交试验筛选出最优组合, 优化其工艺。**结果** 经-80℃预冻1h, 冷冻干燥48h(-40℃、25 Pa)后, 益生菌保加利亚乳杆菌的最佳冻干保护剂为甘油2%, 脱脂乳6%, L-半胱氨酸3%, 木聚糖10%, 在此优化条件下, 存活率为82.75%。

**结论** 在冷冻干燥过程中加入冻干保护剂可以提高保加利亚乳杆菌存活率。

**关键词:** 冻干保护剂; 益生菌; 工艺优化

## Freeze-drying protective agent and its process optimization of probiotics

ZHOU Li, PING Yang, TAN Jing, LUO Bei-Bei, WANG Fa-Yun\*

(The Institute of Commercial Sciences Co., Ltd. of Henan Province, Zhengzhou 450002, China)

**ABSTRACT: Objective** To explore the effect of freeze-drying protective agent on the survival rate of probiotics, and optimize the process. **Methods** Vacuum freeze-drying method was used to explore the effect of protective agent on the survival rate of probiotics by taking *Lactobacillus bulgaricus* as the research object, and the optimal combination was selected through single factor and orthogonal tests to optimize the process. **Results** After pre-freezing at -80℃ for 1 h and freeze-drying for 48 h (-40℃, 25 Pa), the optimal freeze-drying protective agent of *Lactobacillus bulgaricus* was 2% glycerin, 6% skim milk, 3% L-cysteine and 10% xylan. Under the optimized conditions, the survival rate was 82.75%. **Conclusion** The survival rate of *Lactobacillus bulgaricus* can be improved by adding freeze-drying protective agent in the freeze-drying process.

**KEY WORDS:** freeze-drying protective agent; probiotics; process optimization

## 0 引言

益生菌是指能够有明确健康作用、改善维持微生态平衡和发挥益生功效的活性微生物<sup>[1]</sup>。保加利亚乳杆菌作为一种常见益生菌, 对人体具有重要的营养健康作用, 具有提高免疫<sup>[2]</sup>、改善人体肠道菌群平衡<sup>[3]</sup>、抑制肠道病原病的繁殖<sup>[4]</sup>及抗癌<sup>[5]</sup>等功能。常被广泛应用于各个领域, 尤其

在食品、药品及保健品领域应用较多。为使益生菌能够长期保存, 最好将其制成干燥状态<sup>[6]</sup>。目前, 常采用的制备菌粉干燥方法有气流干燥法、冷冻干燥法和喷雾干燥法<sup>[7]</sup>。目前较为常用的方法<sup>[8]</sup>是冷冻干燥法, 在保护益生菌活力方面最为有效。冷冻干燥技术不仅方便益生菌运输、销售和应用<sup>[9]</sup>, 而且可以降低其贮藏期内菌体免遭外界侵害, 使益生菌粉性状和菌数保持相对稳定, 进而更好发挥益生

基金项目: 河南省科学院基本科研业务费项目(200611083)、河南省科学院杰青人才培养项目(210411003)

Fund: Supported by the Henan Academy of Sciences Basic Scientific Research Operating Expenses Project (200611083), and the Henan Academy of Sciences Jie Qing Talent Training Project (210411003)

\*通信作者: 王法云, 研究员, 主要研究方向为食品安全研究。E-mail: wangfayun262@sohu.com

\*Corresponding author: WANG Fa-Yun, Professor, The Institute of Commercial Sciences Co., Ltd. of Henan Province, Zhengzhou 450002, China. E-mail: wangfayun262@sohu.com

功效<sup>[10-11]</sup>。而保加利亚乳杆菌真空冷冻干燥<sup>[12]</sup>(vacuum freeze drying)被认为是保存食品的方法中最有价值的选择之一,其首先将被干燥的物料快速冻结,然后在真空环境下进行加热,使冰升华,从而去除水分,达到干燥目的<sup>[13-15]</sup>。与传统干燥技术相比,具有方便运输,维持菌体活性,长期贮藏等优越性。

但冻干过程中,由于受到各种因素影响,导致细胞活力下降,甚至菌体死亡。冻干保护剂可以改变益生菌冻干时的环境,减少冷冻干燥过程中对细胞的损害,尽可能保持微生物原有的各种生理生化特性和生物活性<sup>[16]</sup>,从而达到其保护的目。较常使用的保护剂有糖类(乳糖、葡萄糖、木聚糖、海藻糖等)、氨基酸类(丙氨酸、L-丝氨酸、甘氨酸等)和复合物(脱脂乳、明胶)等,它们以不同的方式保护着菌体免遭外界侵害,例如甘油可以减少菌体中的活性物质在冷冻干燥中的损害;木聚糖对益生菌增殖效果较明显,且有保护作用;脱脂乳粉具有保护作用,可在菌体外面形成一层保护膜,阻挡外界恶劣环境。使用不同类型保护剂复配可有效减小益生菌在冷冻过程中的死亡。

为进一步提高保加利亚乳杆菌在各种不利环境下的存活率,本研究采用真空冷冻干燥方法对保加利亚乳杆菌进行冻干,并加入冻干保护剂,考察不同类型冻干保护剂用量对保加利亚乳杆菌在冷冻过程中存活率的影响,进一步通过正交法,对保护剂进行复配研究,从而获得存活率较高的冻干剂配方组合,以期对冻干益生菌的进一步开发利用提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

保加利亚乳杆菌(菌种编号: ATCC 11842),河南省商业科学研究所有限责任公司代传保存。

MRS 培养基(英国 Oxoid 试剂公司); L-半胱氨酸(百灵威科技有限公司); 木聚糖(上海源叶生物科技有限公司); 脱脂乳(京东超市); 甘油、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氯化钙、氯化钠、盐酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

HWS-250 型恒温恒湿培养箱(杭州聚同电子有限公司); YXQ-LS-50 立式压力蒸汽灭菌锅(上海博迅实业有限公司); SCIENTZ-30YG/A 真空冷冻干燥机(宁波新芝冻干设备冻干有限公司); UNIVERSAL 320R 高速离心机(德国 Hettich 公司); QL-866 旋涡振荡器(海门其林贝尔公司); BSC-1500IIB2-X 生物安全柜(济南鑫贝西生物科技有限公司); SHZ-82 恒温振荡器(金坛市万华实验仪器厂); HH-S 恒温水浴锅(常州恒隆仪器有限公司); -80 °C 冰箱(山东博科生物公司); Milli-Q 超纯水仪(密理博中国有限公司)。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 菌株培养

取保加利亚乳杆菌菌液 1 环,划线于 MRS 平板,于 37 °C 恒温密闭培养(10~12 h)。连续活化 3 次(接种量 2%),获取目的菌液用于后续试验。

#### 1.2.2 益生菌的冷冻干燥

接种 2% 的菌至 MRS 液体培养基中,37 °C 恒温厌氧培养 12 h,10000 g、6 °C 条件下离心 10 min,将得到的菌泥加入冻干保护剂,均匀混合,将益生菌粉迅速预冻 1 h (-80 °C),然后真空冷冻干燥机冷冻干燥约 48 h (-80 °C、真空度 25 Pa),得到保加利亚乳杆菌冻干粉。

#### 1.2.3 真空冷冻干燥保护剂的制备

取一定量的甘油、脱脂乳、L-半胱氨酸、木聚糖作为冻干保护剂,溶于无菌水中,其中脱脂乳、甘油、木聚糖 121 °C 灭菌 20 min。L-半胱氨酸用微孔滤膜过滤除菌(0.22 μm)。

#### 1.2.4 冻干保护剂配方的选择

首先进行单因素试验(甘油添加量 0、2%、4%、6%、8%; 脱脂乳粉添加量 0、2%、4%、6%、8%、10%; L-半胱氨酸添加量 1%、2%、3%、4%、5%; 木聚糖添加量 4%、6%、8%、10%、12%),挑选对保加利亚乳杆菌冻干后保护效果最佳的冻干保护剂,进行最优复合保护剂配方的筛选。采取正交试验设计[4 因素 3 水平- $L_9(3^4)$ ],确定最优冻干保护剂组合。正交试验设计见表 1。

表 1 正交因素水平表  
Table 1 Level of factors

水平	因素			
	A 甘油/%	B 脱脂乳粉/%	C L-半胱氨酸/%	D 木聚糖/%
1	2	4	2	8
2	4	6	3	10
3	6	8	4	12

#### 1.2.5 活菌计数及存活率

冷冻干燥后,将制得的益生菌粉取出,然后用无菌水进行与冻干前的等体积复水,充分振荡后,采取国家食品安全标准 GB 4789.35—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验》乳酸菌检验方法,吸取 1 mL 菌悬液进行稀释,采用平板计数法测定保加利亚乳杆菌所含活菌数,见公式(1)。

$$\text{存活率}(\%) = \frac{\text{冻干后保加利亚乳杆菌活菌数}}{\text{冻干前保加利亚乳杆菌活菌数}} \times 100\% \quad (1)$$

### 1.3 数据处理

所有试验均重复 3 次,试验数据用 SPSS 2.0 软件进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验结果

#### 2.1.1 甘油添加量对益生菌冻干存活率的影响

当甘油添加量为 2% 时, 益生菌存活率达到最大为 79%, 见图 1。但是当甘油添加量继续增大时, 益生菌存活率却下降。因此在保护剂中加入 2% 甘油可较好地增强对菌体的保护作用。这与许多研究结果相符, 邵阳阳<sup>[17]</sup>发现甘油浓度在 2% 时, 双歧杆菌和嗜酸乳杆菌的冻干存活率和活菌数达到最大; 张菊等<sup>[18]</sup>以奶粉 20%、海藻糖 10%、甘油 2%、低聚木糖 5% 作为冻干保护剂, 其存活率为 80% 左右。

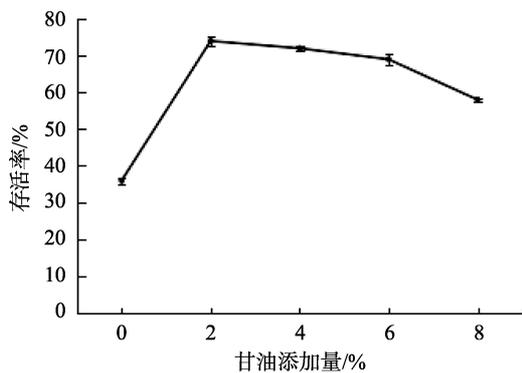


图 1 甘油添加量对益生菌冻干存活率的影响( $n=3$ )

Fig.1 Effects of glycerin on the freeze-drying survival rate of probiotics ( $n=3$ )

#### 2.1.2 脱脂乳粉添加量对益生菌冻干存活率的影响

脱脂乳粉是一种复合保护剂, 不仅是益生菌优良的自然培养基, 且对在保护益生菌方面具有重要意义<sup>[19-20]</sup>。由图 2 得出, 脱脂乳粉的添加量低于 6% 时, 益生菌菌体存活率随脱脂乳粉的添加量而增高。脱脂乳粉添加量为 6% 时, 菌体的存活率为 85%。但添加量大于 6% 时, 菌体的存活率却降低。因此, 脱脂乳粉的最佳添加量为 6%。

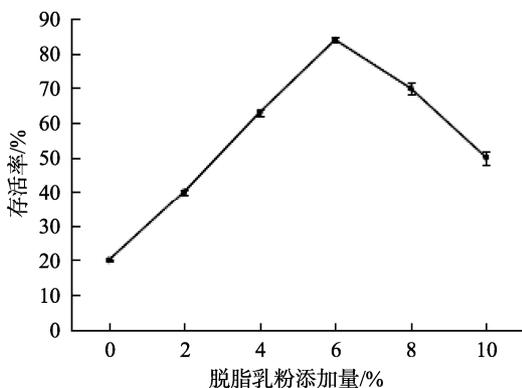


图 2 脱脂乳粉添加量对益生菌冻干存活率的影响( $n=3$ )

Fig.2 Effects of degreasing milk powder on the freeze-drying survival rate of probiotics ( $n=3$ )

#### 2.1.3 L-半胱氨酸添加量对益生菌冻干存活率的影响

YANG 等<sup>[21]</sup>研究表明, L-半胱氨酸可以使双歧杆菌存活率增加 25% 左右。从图 3 中可以看出, L-半胱氨酸的添加量在一定范围内时, 随着添加量的增大, 菌体的存活率也随之提高。添加 3% 的 L-半胱氨酸, 菌体存活率达到最大 (87%)。添加量大于 3% 时, 菌体存活率降低。因此, L-半胱氨酸的最佳添加量为 3%。L-半胱氨酸对菌体具有保护作用, 当与其他保护剂同时使用会加强保护效果。

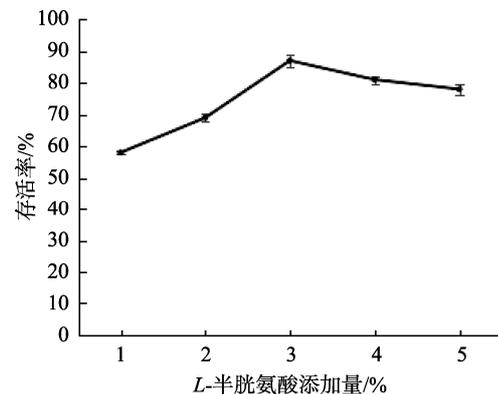


图 3 L-半胱氨酸添加量对益生菌冻干存活率的影响( $n=3$ )

Fig.3 Effects of L-cysteine content on the freeze-drying survival rate of probiotics ( $n=3$ )

#### 2.1.4 木聚糖添加量对益生菌冻干存活率的影响

当木聚糖添加量在 4%~10% 时, 益生菌存活率与木聚糖添加量呈正相关, 即随着木聚糖添加量增大, 存活率提高; 添加量为 10% 时, 存活率最高 (图 4)。但木聚糖添加量继续增加时, 存活率反而降低。因此, 木聚糖的最佳添加量为 10%。

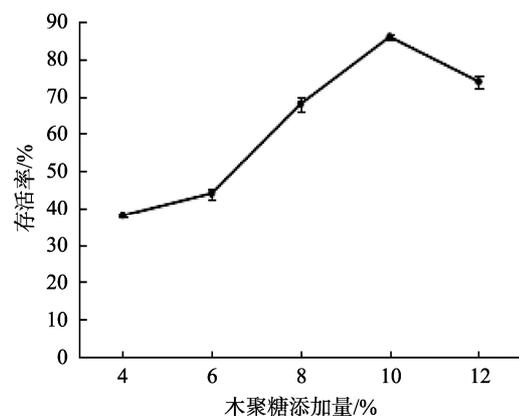


图 4 木聚糖添加量对益生菌冻干存活率的影响( $n=3$ )

Fig.4 Effects of xylan addition on the freeze-drying survival rate of probiotics ( $n=3$ )

## 2.2 正交优化

以单因素试验中获得的最适条件为基础, 进行正交

试验, 考察各种冻干保护剂对益生菌存活率的影响, 所得结果如表 2 所示。

由表 2 得出, 脱脂乳粉为影响菌体存活率的最重要因素, 其次为木聚糖和甘油, 最后是 *L*-半胱氨酸。因此, 正交试验得到的最佳配方为  $A_1B_2C_2D_2$ , 即甘油 2%、脱脂乳 6%、*L*-半胱氨酸 3%、木聚糖 10%。

### 2.3 验证试验

根据正交试验结果, 进行 3 次验证试验, 见表 3, 存活率分别为 83.00%、82.65%和 82.60%, 平均值为 82.75%, 与正交试验基本相符。

## 3 结论与讨论

为解决益生菌不耐贮藏, 进入人体后的活菌数少等问题, 将益生菌进行真空冷冻干燥, 最大限度地保护了益生菌的活性, 有效提高了益生菌的存活率。通过正交试验结果可以看出, 优化后得到的冻干保护剂配方为: 甘油 2%, 脱脂乳粉 6%, *L*-半胱氨酸 3%, 木聚糖 10%。利用验证试验对冻干保护剂配方进行验证, 按此配方得到的复合保护剂大大提高了冻干后菌体存活率(82.75%)。目前我国真空冻干技术的成熟度还不够, 可重复性不强<sup>[22]</sup>, 虽然已有保加利亚乳杆菌真空冷冻干燥方面的相关研究, 但采取甘油、脱脂乳、*L*-半胱氨酸、木聚糖作为冻干保护剂进行复配还尚未见报道。利用真空冷冻干燥技术对保加利亚乳

杆菌进行冻干, 为下一步的深入研究打下良好基础, 并为其他益生菌的研究提供参考依据。未来真空冷冻干燥技术将以其特有的优越特性在我国得到越来越广泛的应用, 益生菌产品的需求量也将大大增加。

表 2 正交试验方案结果表  
Table 2 Results table of orthogonal test scheme

试验号	A	B	C	D	存活率/%
1	1	1	1	1	68.5
2	1	2	2	2	82.75
3	1	3	3	3	74.75
4	2	1	2	3	74
5	2	2	3	1	76.25
6	2	3	1	2	74.25
7	3	1	3	2	74.75
8	3	2	1	3	74
9	3	3	2	1	73.5
k1	75.33	72.42	72.25	72.75	
k2	74.83	77.67	76.75	77.25	
k3	74.08	74.17	75.25	74.25	
R 较优水平	1.25 A <sub>1</sub>	5.25 B <sub>2</sub>	4.5 C <sub>2</sub>	4.5 D <sub>2</sub>	

表 3 最佳组合的试验验证  
Table 3 Experimental validation of optimal combinations

配方	冻干前活菌数/(CFU/g)	冻干后活菌数/(CFU/g)	存活率/%
甘油 2%	$1.00 \times 10^9$	$8.36 \times 10^8$	83.60
脱脂乳 6%	$1.00 \times 10^9$	$8.24 \times 10^8$	82.40
<i>L</i> -半胱氨酸 3%	$1.00 \times 10^9$	$8.29 \times 10^8$	82.90
木聚糖 10%	$1.00 \times 10^9$	$8.25 \times 10^8$	82.50
	$1.00 \times 10^9$	$8.16 \times 10^8$	81.60
	$1.00 \times 10^9$	$83.8 \times 10^8$	83.60

### 参考文献

- [1] 陶阳, 廖小军, 韩永斌. 益生菌发酵蓝莓花色苷的代谢规律[J]. 食品工业科技, 2020, 41(20): 12–19.  
TAO Y, LIAO XJ, HAN YB. Metabolism of anthocyanins in blueberry fermented by probiotics [J]. Sci Technol Food Ind, 2020, 41(20): 12–19.
- [2] 周莉, 平洋, 谭静, 等. 益生菌中乳酸菌概况及检测技术的研究进展[J]. 中国调味品, 2019, 44(10): 190–194.  
ZHOU L, PING Y, TAN J, et al. General situation of lactic acid bacteria in probiotics and research progress of detection techniques [J]. Chin Cond, 2019, 44(10): 190–194.
- [3] 程娜. 基于组学技术解析保加利亚乳杆菌 LJJ 的耐酸机制[D]. 临汾: 山西师范大学, 2018.  
CHENG N. Analysis of acid resistance mechanism of *Lactobacillus bulgaricus* LJJ based on group technology [D]. Linfen: Shanxi Normal University, 2018.
- [4] 周莉, 王晓瑞, 平洋, 等. 保加利亚乳杆菌微胶囊的制备及特性研究[J]. 食品工业科技, 2020, 11: 188–193.  
ZHOU L, WANG XR, PING Y, et al. Preparation and characterization of *Lactobacillus microcapsule bulgaricus* [J]. Sci Technol Food Ind, 2020, 11: 188–193.
- [5] 蒋鸿波. 耐酸保加利亚乳杆菌在酸奶中的应用[J]. 食品工业, 2018, 39(4): 166–168.  
JIANG HB. Application of acid *Lactobacillus bulgaricus* in yoghurt [J].

- Food Ind, 2018, 39(4): 166–168.
- [6] 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 WX, CUI SM, MAO BY, *et al.* Optimization of freeze-drying protector for *Bifidobacterium brevis* and optimization of high-density freeze-drying process [J]. Food Ferment Ind, 2020, 46(9): 31–36.
- [7] 欧阳碧妍, 崔树茂, 毛丙永, 等. 益生菌干酪乳杆菌 CCFM711 耐酸冻干粉的制备[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(11): 62–68.  
OUYANG BY, CUI SM, MAO BY, *et al.* Preparation of acid-resistant freeze-dried powder CCFM711 *Lactobacillus casei* [J]. Food Ferment Ind, 2020, 46(11): 62–68.
- [8] SOLANKI HK, PAWAR DD, SHAH DA, *et al.* Development of microencapsulation delivery system for long-term preservation of probiotics as biotherapeutics agent [J]. Bio Med Res Int, 2013, (2013): 1–21.
- [9] MORGAN C, HERMAN N, WHITE P, *et al.* Preservation of microorganisms by drying: A review [J]. J Microbiol Methods, 2006, 66(2): 183–193.
- [10] FONSECAP F, PASSOT S, LIEBEN P, *et al.* Collapse temperature of bacterial suspensions: The effect of cell type and concentration [J]. Cryo Lett, 2004, 25(6): 425–434.
- [11] 徐显睿, 李翠凤, 隋勇军, 等. 响应面法优化乳双歧杆菌 Z-1 冷冻干燥保护剂配方[J]. 乳业科学与技术, 2020, 43(3): 6–11.  
XU XR, LI CF, SUI YJ, *et al.* Effect surface optimization of Z-1 freeze-drying protector formula for *Lactobacillus bifidobacterium* [J]. Dairy Sci Technol, 2020, 43(3): 6–11.
- [12] 山丽杰. 利用真空冷冻干燥技术制备高效浓缩型酸奶发酵剂的研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2004.  
SHAN LJ. A study on preparation of high efficiency concentrated Yogurt fermentation agent by vacuum freeze-drying technology [D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2004.
- [13] 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 DH, FU J, LI XY. Advances in food infrared assisted freeze drying [J]. Packag Eng, 2021, 42(3): 100–106.
- [14] 吴燕燕, 石慧, 李来好, 等. 水产品真空冷冻干燥技术的研究现状与展望[J]. 水产学报, 2019, 43(1): 197–205.  
WU YY, SHI H, LI LH, *et al.* Research status and prospects of vacuum freeze-drying technology for aquatic products [J]. J Fish, 2019, 43(1): 197–205.
- [15] 蒋鹏飞, 王赵改, 史冠莹, 等. 不同干燥方式的苦瓜粉品质特性及香气成分比较[J]. 现代食品科技, 2020, 36(3): 234–244.  
JIANG PF, WANG ZG, SHI GY, *et al.* Quality characteristics and aroma components of balsam pear powder with different drying methods [J]. Mod Food Sci Technol, 2020, 36(3): 234–244.
- [16] 田文静, 王俊国, 宋娇娇, 等. 适宜冷冻干燥保护剂提高植物乳杆菌 LIP-1 微胶囊性能[J]. 农业工程学报, 2015, 31(21): 285–293.  
TIAN WJ, WANG JG, SONG JJ, *et al.* Improved microcapsule LIP-1 *Lactobacillus plantarum* by suitable freeze-drying protector [J]. J Agric Eng, 2015, 31(21): 285–293.
- [17] 邵阳阳. 双歧杆菌和嗜酸乳杆菌复合益生菌制剂的研制及稳定性评价[D]. 烟台: 烟台大学, 2017.  
SHAO YY. Development and stability evaluation of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus acidophilus* combined probiotic preparation [D]. Yantai: Yantai University, 2017.
- [18] 张菊, 苏成文, 亓鹏, 等. 植物乳杆菌冻干保护剂的筛选及冻干工艺的研究[J]. 中国饲料, 2020, (17): 53–57.  
ZHANG J, SU CW, YU P, *et al.* Screening of lyophilized protective agents of *Lactobacillus plantarum* and its lyophilized process [J]. Chin Feed, 2020, (17): 53–57.
- [19] 张英华, 霍贵成, 郭鸽. 乳酸菌冷冻干燥保护剂的筛选[J]. 食品科技, 2006, (11): 72–75.  
ZHANG YH, HUO GC, GUO J. Screening of freeze-drying protective agents for lactobacillus [J]. Food Sci Technol, 2006, (11): 72–75.
- [20] 周佳豪, 雷文平, 刘成国, 等. 高活菌数干酪乳杆菌 LZ183E 冻干保护剂的制备[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(24): 138–143.  
ZHOU JH, LEI WP, LIU CG, *et al.* Preparation of lyophilized protective agent LZ183E *Lactobacillus casei* [J]. Food Ferment Ind, 2020, 46(24): 138–143.
- [21] YANG CY, ZHU XL, FAN DD, *et al.* Optimizing the chemical compositions of protective agents for freeze-drying *Bifidobacterium longum* BIOMA 5920 [J]. Chin J Chem Eng, 2012, 20(5): 930–936.
- [22] 徐冲, 陈杰, 陈丽媛, 等. 真空冷冻干燥技术在食用菌加工中的应用研究[J]. 微生物学杂志, 2015, 35(6): 96–99.  
XU C, CHEN J, CHEN LY, *et al.* Application of vacuum freeze-drying technology in edible fungus processing [J]. J Microbiol, 2015, 35(6): 96–99.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)

## 作者简介



周莉, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为食品安全研究。

E-mail: zhoulizuo@126.com



王法云, 研究员, 主要研究方向为食品安全研究。

E-mail: wangfayun262@sohu.com