冷冻保护剂对直投式木葡萄酸醋杆菌发酵剂菌体细胞特性的影响

邓福明，颜巧丽，王挥，陈卫军

（中国热带农业科学院椰子研究所产品加工研究室，海南文昌 571339）

摘要：本文研究了 1%谷氨酸、5%海藻糖、10%脱脂乳及复合 0.575%谷氨酸+0.075%海藻糖+6.4%脱脂乳作为冷冻保护剂对直投式木葡萄酸醋杆菌（GBX）发酵剂菌体细胞特性的影响，通过测定 GBX 发酵剂菌体细胞的 DNA 泄露、细胞液总抗氧化能力、SOD 活性、纤维素合成酶活性和 ATP 酶活性变化等情况来衡量 GBX 菌体细胞的生理活性变化。结果发现：添加单一 1%谷氨酸、5%海藻糖、10%脱脂乳以及复合 0.575%谷氨酸+0.075%海藻糖+6.4%脱脂乳作为保护剂均能明显抑制冷冻干燥过程中菌体细胞的 DNA 泄露，提高细胞总抗氧化能力、SOD 活性、纤维素合成酶和 ATP 酶活性，表明添加冷冻保护剂能够一定程度上保护菌体细胞，其中复合保护剂对菌体细胞的保护效果最佳，电子扫描显微镜也验证了冷冻保护剂能确实降低菌体细胞在冷冻干燥过程中损害程度，从而使菌体细胞保持良好的生理活性。

关键词：木葡萄酸醋杆菌；发酵剂；细胞特性；直投式；保护剂

文章篇号：1673-9078(2015)11-62-67 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.11.011

Effects of Cryoprotectants on the Cytochemical Properties of DVS *Gluconacetobacter xylinus* Cells

DENG Fu-ming, YAN Qiao-li, WANG Hui, CHEN Wei-jun

（Product Processing Research office, Coconut Research Institute, CATAS, Wenchang 571339, China）

Abstract: Into DVS *Gluconacetobacter xylinums* cell suspension, 1% Glutamic acid, 5% trehalose, 10% skim milk, or a mixture of 0.575% glutamic acid ,0.075% trehalose and 6.4% skim milk was added as a cryoprotectant. Their effects of on the cytochemical properties of Direct-Vat-Starter (DVS) *Gluconacetobacter xylinus (GBX)* cells were determined and compared. Changes in the physiological activity of *GBX* cells was measured in terms of changes in DNA leakage, total antioxidant capacity, superoxide dismutase (SOD) activity, as well as cellulose synthase and ATP activity of the bacterial cells. The results showed that DNA leakage of the bacterial cells was reduced and total antioxidant capacity, SOD activity, cellulose synthase, and ATP synthase activities were increased by adding 1% glutamic acid, 5% trehalose, 10% skim milk or 0.575% glutamic acid + 0.075% trehalose + 6.4% skim milk as a cryoprotectant during freeze-drying process. The results indicated that the *GBX* cells were well protected by cryoprotectants, and the optimum protective effect was observed with the compound cryoprotectant 0.575% glutamic acid + 0.075% trehalose + 6.4% skim milk. The results from scanning electron microscopy (SEM) also verify that the various cryoprotectants could significantly reduce the damage to GBX cells during freeze-drying process, thus maintaining good physiological activity of *GBX* cells.

Key words: *Gluconacetobacter xylinus*, starter culture, cytochemical properties, direct vat set, cryoprotectant

冷冻干燥，也称真空冷冻干燥，是预先将待干燥物料温度降至冰点以下，使物料内的水分凝结成固态，然后在较高真空度下使水由固态直接升华为气态，从而达到脱除水的干燥方式[1]。冷冻干燥是一种结合低温低压下传热传质同步进行的一个复杂相变过程，可能对物料的物化性质、微观结构及生物活性等产生一定破坏。由于微生物细胞膜的存在，物料内部的热质传递比较复杂，无法通过宏观参数控制物料内部的热质传递，不可避免造成部分细胞的损伤甚至死亡[2]，因此，在细胞冻干过程中要保证细胞结构完整性和活

收稿日期：2014-12-10

基金项目：海南省重点实验室和工程技术研究中心建设专项项目（gczx2015004）；国家重大科技成果转化项目（重要热带作物产品加工关键技术产业化应用）

作者简介：邓福明（1986-），男，助理研究员，硕士研究生，研究方向：功能食品

通讯作者：陈卫军（1975-），男，研究员，博士研究生，研究方向：功能食品化学

性需添加保护剂，以平衡冷冻和干燥过程细胞内外液之间的热质传递。按照一般保护剂的化学性质，可分为糖类、多元醇类、氨基酸类、聚合物、盐类、甲胺等在冷冻干燥中均对细胞有较好的保护作用[3]。

早在 1985 年 Lois 等研究了在冷冻干燥过程中海藻糖脂质体的稳定性，发现以 1.89/19 甘油磷脂的比例加入海藻糖，可使冻干单层脂囊中的溶质几乎 100%的保留[4]。Michele 等 2010 年以甘油、甘露醇、山梨糖醇及其它添加剂作为鼠李糖乳杆菌和乳酸杆菌两种益生菌的冻干保护剂对冷冻干燥的保存效果进行了研究，发现多元醇类作为保护剂对提高细胞冻干保存的活性效果良好，且甘油的稳定效果最佳[5]。其它小分子类物质如氨基酸类用于冻干保护剂也有较多研究，其主要应用于发酵菌种的冻干保藏[6~7]。近年来，有研究者发现一类新型保护剂抗冻糖蛋白 C-AFG 可有效抑制冷冻过程中冰晶的形成，进而提高细胞经低温处理后的活力[8]。

在之前研究中，试验发现不仅单一的脱脂奶粉、海藻糖和谷氨酸可作为木葡萄糖醋酸杆菌的冷冻干燥保护剂，且适当比例的复配可使冻干后菌体的存活率最高达 93.346%[9]，但对冷冻保护剂是如何保护菌体细胞免受冻干损伤的原因尚不清楚。因此，本文拟通过测定冷冻保护剂对直投式木葡萄酸醋杆菌发酵剂菌体细胞特性的影响，了解菌体细胞损伤机制、根据其损伤机制选择有效的保护剂，对减轻细胞损伤、提高相应的生产效率具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料

木葡萄糖酸醋杆菌，为中国热带农业科学院椰子研究所实验室保存；椰子水，中国热带农业科学院椰子研究所实验基地提供。

1.1.2 主要仪器设备

仪器名称	型号
紫外及可见分光光度计	UV1200
数显恒温水浴锅	HH-6
离心机	AVANTI J-26XP
冷冻高速离心机	US-32R
水浴恒温振荡器	SHZ-88
智能生化培养箱	SPXD-450
恒温鼓风干燥箱	PYX-DHG-9101-25A
扫描电子显微镜	HITACHI S-3400

1.1.3 主要药品与试剂

谷氨酸、海藻糖、脱脂乳、硫酸铵、硫酸镁、琼脂、MTT、UDP-葡萄糖等均为国产分析纯，总抗氧化能力（T-AOC）测试盒、超氧化物歧化酶（SOD）测试盒、ATP 合成酶测试盒均为南京建成试剂盒，其它试剂没有特殊说明均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种制备

将斜面试管上保存的木葡萄糖醋 酸杆菌菌株接种到 100 mL 椰子水培养基中[$(NH_4)_2SO_4$ 0.2%，$MgSO_4$ 0.05%、琼脂 2%，自然发酵 2 d 的嫩椰子水 90%，其余加水补足，自然 pH，121 ℃灭菌 20 min]中，30 ℃静置活化培养 24 h，连续活化 2 次，镜检无杂菌后，按 5%的接种量接种到装有 100 mL 椰子水培养基的 250 mL 的锥形瓶中，30 ℃静置培养，每隔 2 h 取样，用 MTT 法测定吸光度[10]，绘制生长曲线，取对数期细菌接种到相同条件下培养，然后取对数期发酵液在 4 ℃，7000 r/min，离心 10 min 分钟收集底层细胞。往收集的细胞中加入 pH 7.4，0.01 mol/L PBS 缓冲液（8 g NaCl，0.2 g KCl，1.44 g Na_2HPO_4，24 g KH_2PO_4，溶于 800 mL 蒸馏水中，HCl 调节 pH 值为 7.4，定容 1 L）制成菌悬液后，镜检进行细胞计数；再将 1 mL 菌悬液与 4 mL 相应保护剂混合分别装于 10 mL 的离心管中，混匀，活菌计数。最后将制备好的菌悬液置于 4 ℃冰箱中平衡 1 h，放置于-35 ℃预冻至其完全冻结，迅速将样品冷冻干燥，直至样品水分降低到 3%左右，获得直投式发酵剂备用。

试验涉及空白组、谷氨酸组、海藻糖组、脱脂乳组和复合组别分别为：不添加保护剂、1%谷氨酸、5%海藻糖、10%脱脂乳和 6.4%脱脂乳+0.075%海藻糖+0.575%谷氨酸组成。

1.2.2 菌体 DNA 的吸光值

参照刘振民等 2002 年的方法并做一定改进[11]，将 1.2.1 获得的直投式发酵剂复水后于 4 ℃，7000 r/min，离心 10 min，取上清液，稀释 3 倍，空白组为无菌去离子水，分别于 260 nm 波长处测定吸光值。

1.2.3 细胞总抗氧化能力

菌体细胞内有多种功能性抗氧化性物质，促使 Fe^{3+}还原成 Fe^{2+}，Fe^{2+}可以与菲啉类物质形成稳定络合物，该物质在 520 nm 处具有较好的吸光值，因此，通过测定其在 520 nm 处的吸光值可以评估细胞抗氧化能力。试验用南京建成试剂盒（总抗氧化能力（T-AOC），南京建成生物工程研究所）检测复水后菌体细胞的总抗氧化能力。

（抗氧化能力单位：在 37 ℃时，每分钟每毫升样

品使反应体系的吸光度 OD 值每增加 0.01 时为一个总抗氧化能力单位）

1.2.4 菌体细胞 SOD 活性

菌体细胞 SOD 活性测定参照南京建成试剂盒（超氧化物歧化酶 SOD，WST-1 法，南京建成生物工程研究所）。

1.2.5 菌体纤维素合成酶及 ATP 酶活性

1.2.5.1 纤维素合成酶活性

试验参照 Swissa 和 Aloni 等人的方法并作一定改进[12~13]。

首先配制 TEM 缓冲液：由 50 mM pH 7.5 HCl-Tris 缓冲液，10 mM $MgCl_2$ 和 1 mM EDTA 混合而成。然后制备粗酶液：往含有直投式发酵剂细胞管内加 5 mL，0.01 mol/L 磷酸缓冲液，用细胞破碎仪在 150 W，40 kHz 的条件下冰浴破碎 1 h，4 ℃，1500 r/min 离心 20 min 后，取上清液经 15000 r/min，离心 30 min，弃上清液，用 TEM 缓冲液将沉淀配置成浓度为 200 mg/mL 的粗酶液，4 ℃保存待用。

试验时取粗酶液 3 mL 加入 1 mg/mL UDP-Glucose 溶液 1.5 mL，在 30 ℃水浴锅中反应 30 min（酶最终反应体系 pH 8.6，Tris-HCl 70 mmol/L、$MgCl_2$ 9 mmol/L、EDTA 0.9 mmol/L），灭活，260 nm 波长下测定样品吸光值，每组重复 3 次；吸光值大小表示剩余 UDP-Glucose 含量，吸光值越大表示酶活性越低。因此，可以通过在 260 nm 波长下测定其 OD 值来间接表示纤维素合成酶的活性。

1.2.5.2 ATP 酶活性

参照 Belli 等人 1991 年的方法并作一定改进[14]。先往直投式发酵剂样品中加 5 mL 无菌生理盐水，4 ℃，1500 r/min 条件下 10 离心，取上层液体细胞置于 Tris-HCl 缓冲液（pH 7.0，75 mM）配制的 $MgSO_4$ 溶液（2.5 mL，mM）中，再加入 50 μL 甲苯，用漩涡混匀器混匀，37 ℃条件下培养 5 min 后，置于干冰中，再在 37 ℃水浴条件下融化，最后采用南京建成试剂盒（ATP 合成酶测试盒，南京建成生物工程研究所）测定其酶活性。ATP 酶活力以每分钟每克细胞释放 1 μmol P 为一个酶活力单位。

1.2.6 扫描电镜观察

参照张玉华等人 2010 年的方法并作一定改进[15]。先用 0.1 mol/L pH 7.0 的无菌磷酸缓冲液将发酵剂样品复水，5000 r/min 离心 10 min，弃去上清液，将底层样品置于 4 ℃，3%（*V/V*）戊二醛溶液中 24 h，再用 0.1 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液反复洗涤 3 次，离心，弃上清液，然后依次用 50%、70%、80%、90%的乙醇对样品分别进行脱水处理 15 min，再用 100%的乙醇处理两次，每次 20 min。将处理完后的样品在 40 ℃下真空干燥，最后用导电胶将样品固定在样品台上，离子溅射仪镀金，置于扫描电镜下观察 。

1.2.7 直投式发酵剂与传统发酵剂发酵性能对比

直投式发酵剂发酵：将 5 mL 10%的无菌脱脂乳与直投发酵剂混合，静止 10 分钟，将其接种到 10 mL 椰子水发酵培养基中发酵培养，观察并记录发酵完成后椰纤果的重量。

传统液体发酵：接种含与直投式发酵剂相同活菌数的液体发酵剂到相应的培养基中，观察并记录发酵完成后椰纤果的重量。

1.3 数据处理

所有试验重复三次，图表中所有试验数据采用均值±SD值表示，数据涉及的统计分析采用SPASS17.0配对*t*检验（$p \leq 0.05$）和最小显著性差异（LSD）。

2 结果与讨论

2.1 保护剂添加对菌体 DNA 泄露的影响

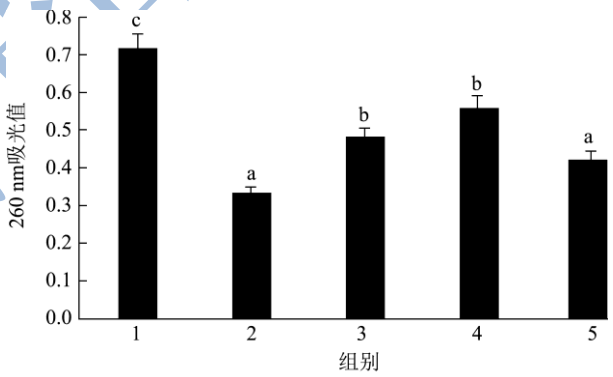


图 1 添加保护剂对菌体 DNA 泄露的影响

Fig.1 Effects of cryoprotectants on DNA leakage from the bacterial cells

注：图中字母不同表示差异显著 $p<0.05$；1：空白；2：复合保护剂；3：1%谷氨酸；4：10%脱脂乳；5：5%海藻糖；下同。

根据冻干后再水化样品离心上清液的核酸对应吸收波长分别为260 nm，测得冻干前上清液的吸光值接近于0，说明无明显核酸泄露。由图1可知，空白组、复合组、谷氨酸组、脱脂乳组和海藻糖组的吸光值分别是0.72、0.31、0.48、0.55和0.42，空白组的吸光值明显高于其它添加保护剂组（$p<0.05$），说明冻干后细胞泄露核酸类物质增多，添加保护剂有利于减少菌体细胞核酸泄露，但不同保护剂对菌体的保护效果不同。这些结果与张玉华等人2010年用单一海藻糖、糖类、

透明质酸和复配保护剂对双歧杆菌研究结果相似[15]。王飚等2009年研究也发现细胞膜在冻干前后通透性有显著增加，导致细胞内蛋白和核酸类物质泄露到细胞外[16]。因此，细胞膜通透性的改变可能是导致菌体细胞在冻干过程中DNA物质泄露和损伤的原因。

2.2 添加保护剂对菌体细胞总抗氧化能力的影响

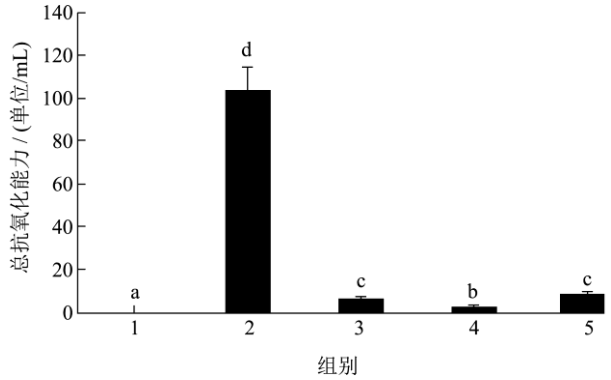


图 2 添加保护剂对菌体细胞总抗氧化能力的影响

Fig.2 Effects of cryoprotectants on the total antioxidant capacity of the bacterial cells

注：图中字母不同表示差异显著 p<0.05。

由图 2 可知，空白组、复合组、谷氨酸组、脱脂乳组和海藻糖组等木葡糖醋酸杆菌发酵剂细胞的总抗氧化能力分别 0.1 单位/mL、103.7 单位/mL、6.2 单位/mL、2.3 单位/mL 和 8.1 单位/mL，添加复合保护剂组抗氧化能力明显高于其它组（p<0.05），达 103.7 单位/mL，这可能与保护剂所含成分有关。Han 等研究发现保护剂中的小分子物质如海藻糖等可渗透到细胞内维持细胞的渗透压，防止冷冻休克时冰晶形成的机械力对细胞生物膜产生机械性损伤[17]。朱琳等阐明菌体保护剂中的大分子如如脱脂乳能包裹菌体，促使海藻糖等小分子物质填充到蛋白质分子的空隙中，抑制蛋白质分子内部结构发生变化[18]。因此，这可能是同时含有大小分子的复合保护剂的保护效果最佳的原因。

2.3 添加保护剂对菌体细胞 SOD 活性的影响

超氧化物歧化酶（SOD）是生物体内重要的抗氧化酶，具有特殊的生理活性，它能够催化超氧化物阴离子发生歧化作用，生成过氧化氢（H_2O_2）和氧气（O_2）。SOD 可以抑制（O_2^-）形成，使亚硝酸盐减少，从而使吸光度降低。如果所得胞浆溶液 SOD 活性高，则会使吸光度降低[11,19]。由图 3 可知，空白组、复合组、谷氨酸组、脱脂乳组和海藻糖组等木葡糖醋酸杆菌发酵剂细胞的 SOD 活性分别是 18.97、19.63、20.73、20.96 和 19.36 U/mL。可见，添加保护剂的 SOD 活性均比未添加保护剂高，且添加脱脂奶粉组与谷氨酸组的 SOD 活性显著高于其它组（p<0.05），说明各保护剂的添加均能提高木葡萄糖醋酸杆菌细胞的 SOD 活性，脱脂奶粉组与谷氨酸组效果最好。这些研究结果与刘振民等人 2002 年的研究相似，他发现在冷冻干燥过程中不可避免的造成菌体细胞内蛋白酶、ß-半乳糖苷酶等酶外泄导致菌体细胞的死亡[11]。

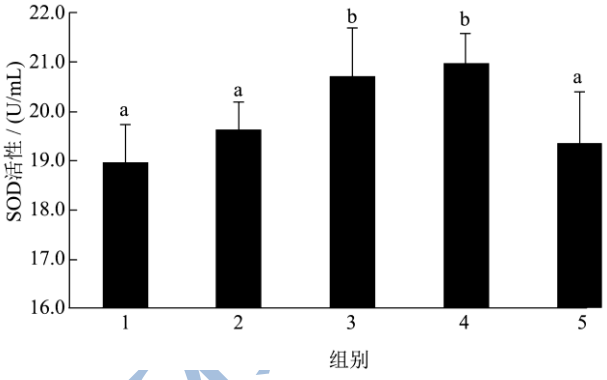


图 3 添加保护剂对菌体细胞 SOD 活性的影响

Fig.3 Effects of cryoprotectants on SOD activity of the bacterial cells

注：图中字母不同表示差异显著 p<0.05。

2.4 纤维素合成酶活性

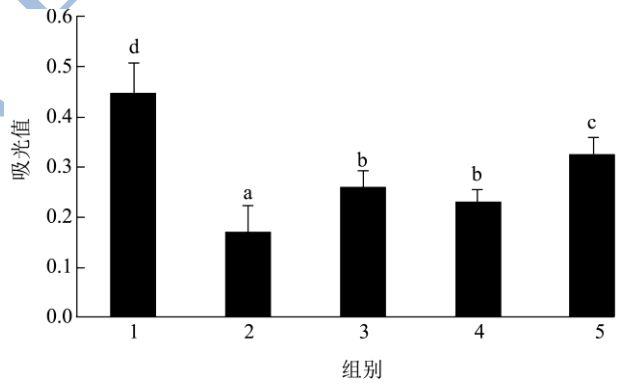


图 4 添加保护剂对纤维素合成酶活性的影响

Fig.4 Effects of cryoprotectants on cellulose synthase activity of the bacterial cells

注：图中字母不同表示差异显著 p<0.05。

由图 4 可知，空白组、复合组、谷氨酸组、脱脂乳组和海藻糖组的吸光值分别是 0.45、0.16、0.25、0.23 和 0.33，其中空白组的吸光值显著高于其它组（p<0.05），复合组最低，说明添加保护剂有利于保护细胞内纤维素合成酶活性，且复合保护剂的效果最佳。早在 1995 年 Tonouchi 研究就发现，纤维素合成酶是一种膜结合蛋白，冷冻干燥会破坏细胞蛋白质结构，造成对纤维素合成酶活性的抑制作用[20]。这些与 Sung 等 2001 研究结果相似，他认为如细胞内一些对冻干敏

感的酶活性蛋白失活是微生物死亡重要原因[21]。

2.5 ATP 酶活性

ATP 酶活性的高低，直接关系到生物细胞的生命活动的强弱。Belli 等 1991 年发现可根据 ATP 酶活性变化来评价细胞膜的功能性质变化[14]。由图 5 可知，加入保护剂各组 ATP 酶活性均高于空白组，其中添加复合保护剂组与谷氨酸组的 ATP 酶活性最高，二者没有显著性差异。张玉华等人 2010 年也发现添加保护剂的 ATP 酶活性高于空白组，与之不同的是，他发现复合保护剂组与海藻糖组的 ATP 酶活性最高[15]。本研究结果的出现可能是由于添加复合保护剂组和谷氨酸组内都含有能与细胞膜磷脂基团形成氢键的氨基酸小分子物质，使细胞膜保持较好的功能性质，从而保护菌体细胞在冷冻干燥过程中免受过大损害。

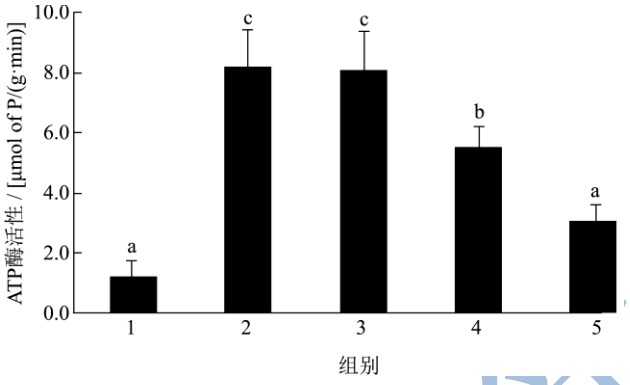


图 5 添加保护剂对 ATP 酶活性的影响

Fig.5 Effects of cryoprotectants on ATP activity of the bacterial cells

注：图中字母不同表示差异显著 $p<0.05$。

2.6 菌体扫描电镜观察

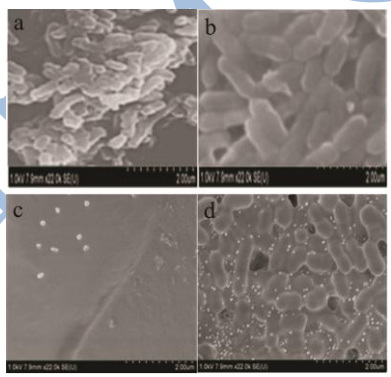


图 6 直投式发酵剂菌体的扫描电镜图

Fig.6 SEM images of DVS *Gluconacetobacter xylinus*

注：a：空白组；b：复合组；c：脱脂乳组；d：谷氨酸组。

从图 6 可以看出，空白组菌体细胞相互堆积，胞间有丝状物相互黏连，这可能是由于部分细胞变形或破裂造成的；谷氨酸组和复合组菌体形态完整、细胞饱满，说明谷氨酸、复合保护剂能够有效地保持细胞膜渗透性和结构完整性，避免内容物泄漏。脱脂乳粉组基本看不到明显的细胞形态，这可能是菌体细胞被脱脂乳粉完全包埋，这种形态一定程度上可减少菌体与氧气的接触机会，减少氧化作用。电子显微镜的观察结果与前面的研究结果保持一致。Jagannath 等 2010 年通过电镜研究也发现 10%脱脂乳能完全包埋菌体细胞，其它以多糖、藻酸钙类等物质作为保护剂时菌体在电镜下呈现颗粒状[22]。同样，张玉华等人 2010 年也发现类似的结果。

2.7 椰纤果生产对比

表 1 直投式发酵剂与传统液体发酵剂产椰纤果生产对比

Table 1 Comparison of the productions between two different starter cultures

时间/d	添加复合保护剂的冻干发酵剂	相同活菌数传统液体发酵剂
1	无明显现象	出现絮状沉淀
2	无明显现象	絮状沉淀
3	出现絮状沉淀	出现物色透明凝胶物质
4	絮状沉淀	凝胶物质增多
5	絮状沉淀增多	凝胶物质增多
6	出现物色透明凝胶物质	液体表面出现乳白色的椰纤果
7~8	凝胶物质增多	椰纤果增厚
9	液体表面出现乳白色的椰纤果	椰纤果增厚
10~12	椰纤果增厚	椰纤果增厚
13	椰纤果厚度不再增加	椰纤果厚度不再增加
14/(g/10 mL)	8.03±1.19aA	8.55±2.04aA
15/(g/10 mL)	8.47±1.86aA	8.65±2.10aA
16/(g/10 mL)	8.59±2.21aA	8.72±1.92aA

表 1 是直投式发酵剂与传统液体发酵剂产椰纤果生产效率对比情况。由表可知，从 14~16 d，两者产椰纤果量分别是 8.03、8.49、8.59 g/10mL 和 8.55、8.65、8.72 g/10 mL，自 14 d 开始，两者发酵椰纤果的重量无显著差异。然而，相比传统液体发酵剂，直投式发酵剂发酵产椰纤果的时间延迟 1~2 d。

注：小写字母表示组内显著性差异（$P<0.05$），大写字母表示组间显著性差异（$P<0.05$）。

3 结论

通过研究冷冻保护剂对直投式木葡萄酸醋杆菌发酵剂菌体细胞特性的影响，发现保护剂的添加能明显抑制冷冻干燥过程中菌体细胞 DNA 泄露和提高细胞

液总抗氧化能力、SOD 活性、纤维素合成酶和 ATP 酶活性，进而使菌体细胞保持良好的活力和生理特性，但不同保护剂的效果不同，推测可能与保护剂本身所含的成分有关，其中同时含有小分子和大分子物质成分的复合保护剂（0.575%谷氨酸+0.075%海藻糖+6.4%脱脂乳）能够实现细胞内外的双重保护，保护效果最好。

参考文献

[1] 关志强,李敏.食品冷冻冷藏原理与技术[M].北京:化学工业出版社,2010
GUAN Zhi-qiang, LI Min. Food refrigeration principle and technology [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2010

[2] RAGOONANAN V. Mechanisms and models of dehydration and slow freezing damage to cell membranes [D]. The University of Minnesota, 2010

[3] 詹神,王云鹏,郭坚华.保护剂和再水化剂对冷冻干燥保存的生防菌 YTll 的存活率及生防效果的影响[J].中国生物防治学报,2011,27(1):110-114
ZHAN Shen, WANG Yun-peng, GUO Jian-hua. Impact of protective agents and rehydration media on viability and efficacy of the freeze-dried biocontrol agent *pantoea ananatis* strain yt11 [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2011, 27(1): 110-114

[4] CROWE L M, CROWE J H, RUDOLPH A, et a1. Preservation of freeze-dried liposomes by trehalose [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1985, 242(1): 240-427

[5] SAVINI M, CECCHINI C, VERDENELLI M C, et al. Pilot-scale production and viability analysis of freeze-dried *probiotic bacteria* using different protective agents [J]. Nutrients, 20l0, 2(3): 330-339

[6] MATTERN M, WINTER G, KOHNEIT U, et a1. Formulation of proteins in vacuum dried glasses, ii. process and storage stability in sugar-free amino acid systems [J]. Pharmaceutical Development and Technology, 1999, 4(2): 199-208

[7] RUDOLPH A S, CROWE J H. Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline [J]. Cryobiology, 1985, 22(4): 367-377

[8] LECLERE M, KWOK B K, WU L K, et a1. C-Linked antifreeze glycoprotein (c-afgp) analogues as no-vel cryoprotectants [J]. Bioconjugate Chemistry, 2011, 22(9): 1804-1810

[9] 颜巧丽,邓福明,陈卫军,等.直投式木葡萄糖醋酸杆菌发酵剂的保护剂筛选研究[J].广东农业科学,2014,18:105-109
YAN Qiao-li, DENG Fu-ming, CHEN Wei-jun, et al. Research on screening of freeze-dried protectants for dvs *gluconacetobacter xylinum* [J]. Guangdong Agriculture Science, 2014, 18: 105-109

[10] 王忠朝,范丽苑,蒋俊强,等.MTT 法测量血链球菌的应用[J].海南医学,2010,21(7):38-40
WANG Zhong-chao, FAN Lun-yuan, JIANG Jun-qiang, et al. The counting of *s. sanguis* with mtt colorimetric method [J]. Hainan Medical Journal. 2010, 21(007): 38-40

[11] 刘振民,骆承痒.乳酸菌冷冻损伤研究[J].食品与发酵工业,2002,28(10):18-21
LIU Zhen-ming, LUO Cheng-yang. Studies on freezing damage of *lactic acid bacteria* [J]. Food and Fermentation Industries, 2002, 28(10): 18-21

[12] ALONI Y, DELMER D P, BENZIMAN M. Achievement of high rates of in vitro synthesis of 1, 4-ss-d-glucan: activation by cooperative interaction of the *acetobacter xylinum* enzyme system with gtp, polyethylene glycol, and a protein factor [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1982, 79(21): 6448-6452

[13] SWISSA M, ALONI Y, WEINHOUSE H, et al. Intermediatry steps in *acetobacter xylinum* cellulose synthesis: studies with whole cells and cell-free preparations of the wild type and a celluloseless *mutant* [J]. Journal of Bacteriology. 1980, 143(3): 1142-1150

[14] BELLI W A, MARQUIS R A. Adaptation of *streptococcus mutans* and *enterococcus hirae* to acid stress in continuous culture [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57: 1134-1138

[15] 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,2010,7:236-241
ZHANG Yu-hua, MENG Yi, LING Pei-xue, et al. Protective mechanisms of trehalose and hyaluronic acid on lyophilized *bifidobacterium longum* [J]. Food Science, 2010, 7: 236-241

[16] 王飚,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 Biao, TIAN Feng-wei, LI Jian-rong, et al. Impact of membrane permeability in *lactic acid bacteria* during freeze-drying [J]. Microbiology, 2009, 36(5): 684-688

[17] HAN B, BISCHOF J C. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing [J]. Cryobiology, 2004 (48): 8-21

[18] 朱琳,刘宁,张英华,等.乳酸菌细胞膜的冻干损伤[J].食品科

[19] 学,2006,27(2):266-269
ZHU Lin, LIU Ning, ZHANG Ying-hua, et al. Study on freeze-drying damage of *lactic acid bacteria* membrane [J]. Food Science, 2006, 27(2): 266-269

[20] DE VALDEZ G F, DE GIORI G S, DE RUIZ HOLGADO A P, et al. Comparative study of the efficiency of some additives in protecting *lactic acid bacteria* against freeze-drying [J]. Cryobiology, 1983, 20(5): 560-566

[21] TONOUCHI N, TAHARA N, TUCHIDA T, et al. Addition of a small amount of an endoglucanase enhances cellulose production by *acetobacter xylinum* [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1995, 59(5): 805-808

[22] SUNG H H, ROBERT T M. Natural exopolysaccharides enhance survival of *lactic acid bacteria* in frozen dairy desserts [J]. Journal of Dairy Sciences, 2001, 84(6): 1367-1374

[23] JAGANNATH A, RAJU P S, BAWA A S. Comparative evaluation of bacterial cellulose (nata) as a cryoprotectant and carrier support during the freeze drying process of probiotic *lactic acid bacteria* [J]. LWT-Food Science and Technology, 2010 (43): 1197-1203

现代食品科技