

银耳多糖对冻干植物乳杆菌细胞膜 及糖代谢酶的保护作用

李兵兵, 龙慧, 伍恩慧, 李祎, 夏宁*, 滕建文, 黄丽, 韦保耀

(广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 530004)

摘要: 为了探索银耳多糖作为益生菌冻干保护剂的潜在应用, 该研究以植物乳杆菌为试验菌, 通过测定植物乳杆菌冻干前后的活菌数、细胞膜性质以及糖代谢酶活力的变化, 评价了银耳多糖复合酪蛋白酸钠对植物乳杆菌的冻干保护效果。结果表明: 当银耳多糖与酪蛋白酸钠的复合比例为 3:1 时, 菌的最大存活率达到 55.39%, 此时细胞内钙离子荧光强度显著降低, 为 29.98; DPH 的荧光强度最低, 为 4.91; 细胞内乳酸脱氢酶、钠钾 ATP 酶与钙镁 ATP 酶的活力最大, 分别为 0.32 U/mL、121.61 U/g 与 45.64 U/g。银耳多糖使膜受损的菌百分比从 98.35% 最大降低至 37.90%。但冻干前后己糖激酶和丙酮酸激酶的活力无显著性变化。红外扫描结果表明银耳多糖与酪蛋白酸钠之间存在非共价相互作用; 此外, 银耳多糖的保护使菌粉表面的孔隙率降低, 酪蛋白酸钠的复合则增加了菌粉的致密性。因此, 银耳多糖在冷冻干燥过程中对植物乳杆菌细胞膜受到的损伤具有显著的抑制作用, 对植物乳杆菌的乳酸脱氢酶、钠钾 ATP 酶及钙镁 ATP 酶具有明显的保护作用。

关键词: 银耳多糖; 酪蛋白酸钠; 植物乳杆菌; 冷冻干燥

文章编号: 1673-9078(2021)11-85-95

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.11.0608

Protective Effects of Polysaccharides Extracted from Tremella on Cell Membrane and Sugar Metabolism Enzymes of Freeze-dried *Lactobacillus plantarum*

LI Bingbing, LONG Hui, WU Enhui, LI Yi, XIA Ning*, TENG Jianwen, HUANG Li, WEI Baoyao

(College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: To explore the potential effects of polysaccharides extracted from tremella as a probiotic freeze-drying protectant, experiments were conducted using *Lactobacillus plantarum* in this study. The protective effects of polysaccharides extracted from tremella combined with sodium caseinate upon freeze-drying *Lactobacillus plantarum* were evaluated through assessing the viable bacterial counts, properties of the cell membrane, and activities of the sugar metabolism enzymes before and after freeze-drying. As a result, the maximum survival rate of the bacteria reached up to 55.39% when the ratio of polysaccharides extracted from tremella to sodium caseinate was 3:1. At the same time, the intracellular Ca^{2+} fluorescence intensity was found to be significantly reduced to 29.98, whereas the fluorescence intensity of DPH was as low as 4.91. The activities of lactate dehydrogenase, Na^+/K^+ -ATPase, and Ca^{2+}/Mg^{2+} -ATPase were the highest, corresponding to 0.32 U/mL, 121.61 U/g and 45.64 U/g, respectively. The percentage of bacteria with damaged cell membrane reduced from 98.35% to 37.90%. However, there was no significant change observed in the activities of hexokinase and pyruvate kinase before and after freeze-drying. Infrared scans revealed that there were non-covalent interactions between polysaccharides extracted from tremella and sodium caseinate. Additionally, polysaccharides

引文格式:

李兵兵, 龙慧, 伍恩慧, 等. 银耳多糖对冻干植物乳杆菌细胞膜及糖代谢酶的保护作用[J]. 现代食品科技, 2021, 37(11): 85-95

LI Bingbing, LONG Hui, WU Enhui, et al. Protective effects of polysaccharides extracted from tremella on cell membrane and sugar metabolism enzymes of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(11): 85-95

收稿日期: 2021-06-09

基金项目: 广西科技重大专项 (2020AA13005AA)

作者简介: 李兵兵 (1996-), 男, 硕士, 研究方向: 食用菌多糖与益生菌, E-mail: 2609802558@qq.com

通讯作者: 夏宁 (1977-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食物蛋白与多糖的结构与功能, E-mail: xianing@gxu.edu.cn

extracted from tremella reduced the surface porosity of the bacterial powder, while sodium caseinate increased its density. Therefore, polysaccharides extracted from tremella exerted a significant inhibitory effect on the damage of *Lactobacillus plantarum* cell membrane during the freeze-drying process, and they have an evident protective effect on the activities of lactate dehydrogenase, Na^+/K^+ -ATPase and $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase of *Lactobacillus plantarum*.

Key words: polysaccharide; sodium caseinate; *Lactobacillus plantarum*; freeze-drying

联合国粮农组织和世界卫生组织联合专家委员会于2001年提出益生菌科学定义:益生菌是指活的微生物,当摄取足够数量时,对宿主健康有益^[1]。而益生菌在体内产生有益作用的活菌数量应不少于 10^6 cfu/g^[2,3],因此保持益生菌在加工过程中的活性显得十分重要。冷冻干燥是保持益生菌活性最常用和最成功的技术之一^[4,5]。但冷冻干燥会使益生菌遭受低温、冷冻、渗透、低压和干燥胁迫,造成细胞膜功能损伤以及细胞内酶活性降低,从而导致益生菌的活力丧失^[6-8]。影响冷冻干燥后益生菌活力的因素有很多,包括菌的特性、生长介质、冷冻干燥前预处理、冷冻干燥工艺以及冷冻干燥保护剂^[9,10]。其中冷冻干燥保护剂具有提高益生菌的抗冻性及延长益生菌粉储藏时间的双重作用,是目前研究的热点^[11,12]。而蛋白质和碳水化合物由于来源天然、无毒和良好的生物相容性被广泛用作益生菌冷冻干燥保护剂^[13]。其中碳水化合物类保护剂能提高冻干体系的玻璃化转变温度,从而减少益生菌细胞膜和酶因冰晶的生成而受到的损伤^[14,15]。一些具有益生作用的碳水化合物类保护剂如果寡糖^[16]、低聚半乳糖^[17]等在减少冰晶破坏的同时还具有促进益生菌在肠道增殖的功能。然而由于碳水化合物类保护剂的乳化性较差,以及冻干后疏松多孔抗机械压力差,不足以有效保护益生菌,通常会将其与蛋白类保护剂复合以提高冻干保护效果^[18,19]。

银耳多糖(*Tremella polysaccharides*, TPS)是一类具有益生活性的真菌多糖。有研究表明银耳多糖能够促进家禽肠道内乳酸杆菌和双歧杆菌的增殖,改善家禽的肠道有益菌群^[20];目前,银耳多糖已被用于合生元产品中^[21];此外,由于其物理特性上的高黏与乳化性,已有研究将其用于改善酸奶的口感^[22]及提高饮料稳定性^[23]等食品工业中;而且银耳多糖还能减少冰淇淋中冰晶的生成^[24,25]。银耳多糖的界面性质和益生作用使其具备作为益生菌功能性冷冻干燥保护剂的潜力,而益生元作为保护剂以提高益生菌在生产和储藏过程中的活力在研究中受到了广泛的关注^[26]。然而目前还没有研究报道银耳多糖在益生菌冷冻干燥保护剂领域的应用。

因此,基于银耳多糖界面性质差的缺点,本试验以银耳多糖复合酪蛋白酸钠作为冷冻干燥保护剂,以

植物乳杆菌为试验菌株,探讨银耳多糖作为一种具有益生活性的益生菌冷冻干燥保护剂的可行性,为银耳多糖的开发利用提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

植物乳杆菌 Lp-115 (*Lactobacillus plantarum* Lp-115),丹尼斯克有限公司;银耳子实体多糖,上海辉文生物技术股份有限公司;酪蛋白酸钠(Sodium caseinate, NaCS),山东德佳生物有限公司;己糖激酶、丙酮酸激酶及ATP酶检测试剂盒,北京索莱宝科技有限公司;MRS培养基所用试剂及其它试剂皆为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

真空冷冻干燥机,德国Christ公司;恒温培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;手提式压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂;SW-CJ-2FD型净化工作台,苏州安泰空气技术有限公司;磁力搅拌器,金坛市医疗仪器厂;涡旋仪,意大利VELP科学仪器有限公司;TLE204E,分析天平、pH计,上海梅特勒-托利多仪器有限公司;Nicolet iS10傅立叶变换红外光谱仪,美国热电公司;SU-1510型扫描式电子显微镜(SEM),日本日立公司。

1.3 方法

1.3.1 菌种培养

购买的植物乳杆菌按3.0%的接种量置于MRS液体培养基中培养24h,活化至第三代,然后在MRS琼脂培养基上划线,37℃培养48h;之后再挑单菌落于10mL MRS液体培养基中,37℃培养24h,最后再按3.0%的接种量转接到30mL MRS液体培养基中进行扩大培养11h后,离心(4℃,4000 r/min,10 min,)收集菌泥,将收集到的菌泥用无菌生理盐水洗涤两次后,重悬于30mL无菌蒸馏水中得到菌液备用;同时用平板计数法对该菌液计数。

1.3.2 植物乳杆菌冻干粉的制备

冷冻干燥保护剂的配制:分别配制浓度为4.0%

(*m/m*) 的银耳多糖和酪蛋白酸钠溶液, 并将两者分别按 1:1、1:2、1:3、2:1、3:1 的质量比 (*m/m*) 混合均匀, 80 °C 灭菌 30 min, 冷却后作为复合保护剂备用。

冻干菌粉制备: 取上述配制的保护剂与菌液混合均匀, 并添加无菌蒸馏水调整保护剂的终浓度为 2.0%, 保护剂与菌液的比例为 5:1 (*m/V*), 空白对照组加相同比例的无菌蒸馏水。将制备的混合液于 -80 °C 预冻 2 h 后, 进行冷冻干燥。冷阱温度 -80 °C, 真空度 0.3 Pa, 温度 25 °C, 干燥时长 48 h。

1.3.3 植物乳杆菌存活率 (Viability) 的测定

取 0.1 g 冻干菌粉于 9.9 mL 无菌生理盐水中完全溶解, 梯度稀释后利用平板计数法计数。根据式 (1) 计算存活率。式中 N_A 是冻干后活菌数, N_B 为冻干前活菌数, 单位为 cfu/g。

$$\text{存活率} / \% = \frac{N_A}{N_B} \times 100\% \quad (1)$$

1.3.4 傅里叶红外光谱 (Fourier transform infrared, FT-IR) 分析

参考 Xue 等^[27]的方法并稍做修改, 称取 1 mg 制备的菌粉与 100 mg 溴化钾研磨混合压片, 然后进行傅里叶红外光谱测定。测定范围为 400~4000 cm^{-1} 的吸收光谱, 分辨率为 4 cm^{-1} , 环境温度为 25 °C, 扫描信号累加 16 次, OPD 速度 0.2 cm/s 。

1.3.5 扫描电镜

参考 Li 等^[7]的方法并稍做修改, 取少量制备的菌粉于贴有导电胶的铝片表面, 将菌粉涂抹均匀, 多余的菌粉用氮气小心吹去, 然后将铝片镀金 5 min。用扫描电子显微镜在 5 kV 的电压下, 图像放大 10000 倍, 获取样品的微观图像。

1.3.6 糖代谢关键酶活性测定

1.3.6.1 乳酸脱氢酶的活性测定^[28]

超声提取乳酸脱氢酶: 取制备的菌粉 0.1 g 溶解于 9.9 mL 无菌生理盐水后, 离心收集菌体, 之后将菌体重新悬浮于同体积且含有 2 mmol/L EDTA 的磷酸钾溶液 (pH 7.0, 0.2 mol/L) 中; 取 5 mL 菌悬液在超声细胞破碎仪中冰浴超声 100 次, 功率为 20%, 每次超声 3 s, 间隔 10 s; 最后离心 (10000 r/min, 4 °C) 收集上清液, 置冰上待测。

酶活测定: 测定体系共 3 mL, 含有 0.2 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.3) 2.7 mL, 6.6 mmol/L NADH 和 30 mmol/L 丙酮酸钠各 0.1 mL, 以及 0.1 mL 酶提取液, 在 25 °C 进行催化反应, 每 0.5 min 读取一次吸光值, 连续 5 min, 以吸收值对时间作图, 取初始的线性范围, 计算每分钟降低的吸收值, 以每分钟降低 1.0 个吸收值为 1 个酶活单位, 以 U 表示。

1.3.6.2 己糖激酶、丙酮酸激酶及 ATP 酶活性测定

己糖激酶 (Hexokinase, HK)、丙酮酸激酶 (Pyruvate kinase, PK) 及 ATP 酶活性测定按照酶活试剂盒 (购自索莱宝) 上的方法对三种关键酶进行活性测定。具体流程如下所述:

酶提取液配制: 按照操作说明将酶活试剂盒中的各种试剂混合配制酶提取液;

超声提取酶: 先收集细菌到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌数量 (10^4 个): 提取液体积 (mL) 为 500:1 的比例加入酶提取液, 超声波破碎细菌 (冰浴, 功率 20%, 超声 3 s, 间隔 10 s, 重复 100 次); 离心 (8000 r/min, 4 °C, 10 min), 取上清, 置冰上待测;

酶活测定: 按照酶活试剂盒说明测定各酶活力。

1.3.7 细胞膜性质分析

1.3.7.1 胞内 Ca^{2+} 含量测定^[29]

采用 Fluo3-AM 荧光探针法测定制备的菌粉胞内 Ca^{2+} 含量: 取 5 mmol/L 的 Fluo3-AM/DMSO 荧光染料 1 μL 置于 5 mL 菌液中 (1.0×10^9 cfu/mL), 避光条件下, 37 °C 孵育 30 min, 离心 (10000 r/min, 5 min) 弃上清, 用生理盐水洗涤后, 重悬于 5 mL 生理盐水中。将染色后的菌液置于荧光分光光度计内测荧光强度, λ_{ex} 为 488 nm, λ_{em} 为 528 nm。

1.3.7.2 细胞膜流动性

参照 Li 等^[30]的方法测定细胞膜的流动性, 具体流程如下所述:

荧光染色剂的配制: 将 1,6-二苯基-1,3,5-己三烯 (1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene, DPH) 溶于四氢呋喃配制 2 mmol/L 的 DPH 染色储备液, 每次实验前用 0.01 mol/L 的 PBS 溶液稀释成 2 $\mu\text{mol/L}$ 。

菌粉前处理: 制备的菌粉用无菌水复溶后离心 (4 °C, 8000 r/min, 10 min) 收集菌体, 洗涤后重悬于无菌水中并调整其浓度为 1×10^7 cfu/mL; 取 2 mL 菌液用 2 mL 体积分数为 0.37% 的甲醛溶液固定 30 min, 离心 (4 °C, 8000 r/min, 10 min) 收集菌体并用 0.01 mol/L 的 PBS 溶液洗涤两次, 加入 2 mL PBS (0.01 mol/L) 溶液重悬细菌, 再加入 0.2 mL DPH 染色液染色 45 min, 离心 (4 °C, 8000 r/min, 10 min) 收集菌体并用 0.01 mol/L 的 PBS 溶液洗涤两次, 重悬于 5 mL PBS (0.01 mol/L) 溶液后置于荧光分光光度计检测荧光强度, λ_{ex} 为 361 nm, λ_{em} 为 443 nm。

1.3.7.3 细胞膜完整性

细胞膜完整性的测定参考 Li 等^[7]的方法并稍作修改。将冻干的菌粉溶解于无菌生理盐水中, 菌浓度调整为 1.0×10^7 cfu/mL; 取 1 mL 菌液与 5 mL 碘化丙啶溶液 (pH 7.2, 60 mmol/L) 混匀, 在 25 °C 暗处孵育

15 min; 离心收集菌体, 用磷酸盐缓冲液 (pH 7.2, 60 mmol/L) 洗涤两次, 去除未结合的染料, 重悬于 10 mL 磷酸盐缓冲液 (pH 7.2, 60 mmol/L) 中备用。在流式细胞仪上测定碘化丙啶荧光, 每个样本分析 10000 个细胞, 根据膜完整细胞数与细胞总数的比值表征膜完整性百分比。

1.3.8 数据统计分析

数据表示为平均值±标准差。采用 Origin 7.5 作图, SPSS 10.0 进行单因素方差分析, $p < 0.05$ 为显著水平。

2 结果与分析

2.1 保护剂对冻干植物乳杆菌存活率的影响

以菌存活率为指标, 评价不同比例的银耳多糖与酪蛋白酸钠复合保护剂的保护效果, 结果如图 1 所示。在未添加保护剂时, 植物乳杆菌在冷冻干燥过程中的存活率只有 0.52%, 几乎全部失活; 添加银耳多糖、酪蛋白酸钠及两者复合物处理, 植物乳杆菌的存活率均可达到 40.00% 以上, 其中不同比例的保护剂对植物乳杆菌的保护效果是有所差异的。单一的银耳多糖与酪蛋白酸钠的保护效果差异不显著, 植物乳杆菌的存活率分别为 42.19% 和 47.98%; 复合保护剂中银耳多糖与酪蛋白酸钠的比例为 1:3、1:2、1:1 时, 复合保护剂的保护效果与单一的银耳多糖保护剂没有显著性差异, 植物乳杆菌的存活率分别为 43.66%、47.41% 和 47.43%; 复合保护剂中银耳多糖与酪蛋白酸钠的比例为 2:1 时, 复合保护剂的保护效果与单一的银耳多糖保护剂具有显著性差异, 植物乳杆菌的存活率为 48.85%; 当银耳多糖与酪蛋白酸钠的比例达到 3:1 时, 植物乳杆菌的存活率达到最大值 55.39%。银耳多糖与酪蛋白酸钠都能显著提高植物乳杆菌在冷冻干燥过程中的存活率, 但当两者复合时, 少量的酪蛋白酸钠会显著提升银耳多糖对植物乳杆菌的冻干保护效果, 过量的酪蛋白酸钠对银耳多糖的保护效果提升不显著。这可能是由于两者复合后银耳多糖能更有效的抑制胞外冰晶的生成从而减少菌细胞受到损伤^[31]。Li 等^[7]发现滑菇多糖在冻干过程中对干酪乳杆菌也有一定的保护作用, 当滑菇多糖浓度为 0.04、0.02、0.01、0.005、0.002 和 0.001 mg/mL 时, 干酪乳杆菌冻干后的存活率分别为 74.5%、74.4%、66.3%、62.2%、56.8% 和 42.5%, 当其与辅助冷冻保护及混合时, 干酪乳杆菌的存活率分别提高至 80.4%、80.5%、75.5%、73.1%、66.2% 和 50.5%, 显示出明显的协同作用且保护效果强于银耳多糖。Guedesa 等^[32]的研究

表明浓度为 10% (m/V) 的 β -葡聚糖作为冻干保护剂时, *Lactobacillus plantarum* LP-49 和 *Lactobacillus plantarum* LP-201 冻干后的存活率为 18.20% 与 12.59%, 保护效果弱于银耳多糖。

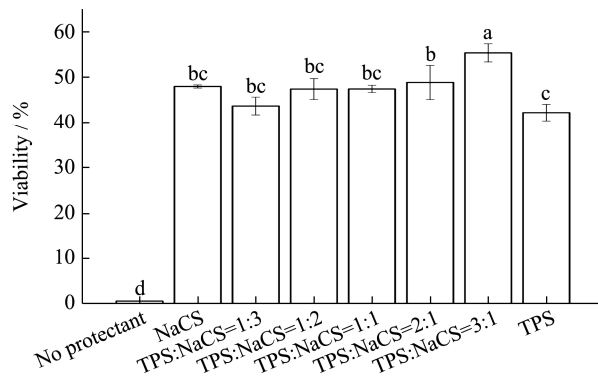


图 1 植物乳杆菌冻干后的存活率

Fig.1 Survival rate of *Lactobacillus plantarum* after freeze-drying

注: 不同字母表示 $p < 0.05$ 。图 4、5、7、8、9 同。

2.2 冻干菌粉的红外光谱图

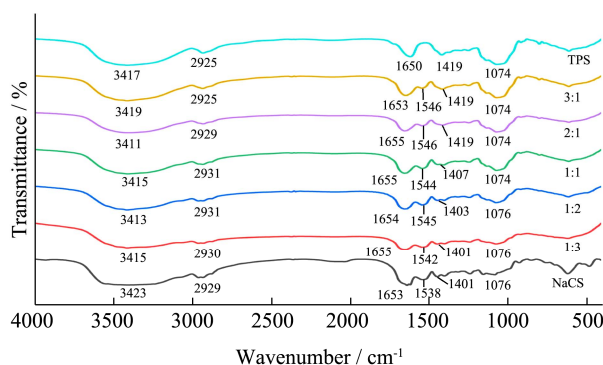


图 2 植物乳杆菌冻干粉的 FT-IR 图

Fig.2 FT-IR spectrum of bacterial powder

注: 图中比例为 TPS:NaCS。

银耳多糖复合酪蛋白酸钠能够提高菌粉存活率, 为了进一步研究两者是否发生相互作用从而对植物乳杆菌的活力保持产生影响, 对制备的菌粉进行红外光谱分析。从图 2 可知, TPS 的吸收峰出现在 3417 cm^{-1} 、2925 cm^{-1} 、1650 cm^{-1} 、1419 cm^{-1} 和 1076 cm^{-1} 附近, 分别代表 O-H 伸缩振动峰, C-H 伸缩振动变角振动峰, 糖醛酸中的羰基 C=O 振动, 羰基上 C-O 的伸缩振动峰以及 C-O-C 变角振动峰^[33,34]。NaCS 的吸收峰出现在 3423 cm^{-1} 、2929 cm^{-1} 和 1076 cm^{-1} 附近, 分别代表 O-H 伸缩振动峰, C-H 键的伸缩振动以及 N-H 面内弯曲振动; 酪蛋白酸钠有两组特征吸收谱带: 酰胺 I 带和酰胺 II 带, 其波长分别对应 1700~1600 cm^{-1} 和 1550~1400 cm^{-1} ^[35], 且随着银耳多糖的加入, 酰胺 I 带和 II 带的伸缩振动峰发生偏移, 这说明酪蛋白酸钠

与银耳多糖发生了相互作用；在 1419 cm^{-1} 附近，银耳多糖羰基上 C-O 的伸缩振动峰向高波长方向移动，这表明银耳多糖与酪蛋白酸钠分子之间可能存在氢键作用；此外，在 1076 cm^{-1} 附近，银耳多糖糖环中的 C-O-C 变角振动峰强度随着酪蛋白酸钠的增加发生偏移，也表明 TPS 与 NaCS 分子间存在相互作用^[36]。Sohrab Sharifiab 等^[37]也利用傅里叶红外光谱技术发现乳清分离蛋白与阿拉伯胶之间形成缩合物提高了植物乳杆菌在奶酪中的活性。

2.3 冻干菌粉的形态观察

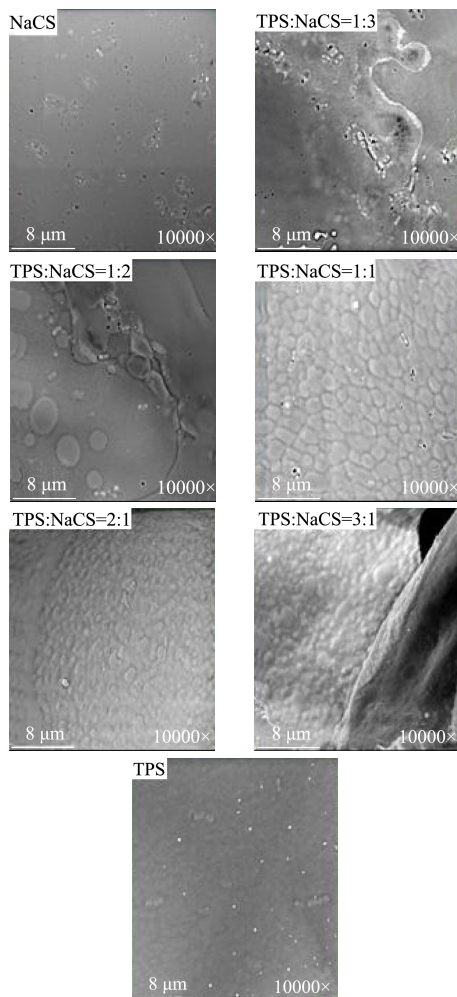


图3 植物乳杆菌冻干粉的扫描电子显微镜图

Fig.3 Scanning electron microscope of bacterial powder

通过扫描电子显微镜观察冷冻干燥制得的菌粉，结果如图3所示。添加保护剂后冷冻干燥制得的菌粉为形状和尺寸不规则的薄片状，植物乳杆菌附着在保护剂表面，且菌体随机分布。由于冷冻干燥过程涉及到冷冻、初级干燥（升华）、次级干燥（解吸），溶液中水分在真空环境中直接从冰升华成水蒸气，因此菌粉表面会因失水而出现微孔。通过对比不同比例保护剂菌粉的扫描电镜图，发现其微观结构具有明显差异。

酪蛋白酸钠冻干后结构致密，但表面孔隙较多；银耳多糖冻干后结构疏松，但表面孔隙少。两者复合后，随着复合保护剂中银耳多糖的增加，菌粉表面的微孔越来越少，出现这一现象可能是由于银耳多糖一方面能够提高保护剂的玻璃化转变温度，从而减少冰晶的生成^[38]，另一方面会增强保护剂的黏性，进而使菌粉表面结构更加稳固，减少了冻干过程中的坍塌现象；同时可以看出，酪蛋白酸钠的添加使得菌粉表面更加致密。菌粉微观结构表明，银耳多糖能够抑制冻干过程中冰晶的生成，降低菌粉表面的孔隙率；同时复合保护剂结合了单一保护剂各自的优势，改善了菌粉的表面性质，可能会有利于菌粉的储藏稳定性。Diako 等^[39]的研究也发现明胶包埋的益生菌粉表明光滑、均匀、结构更为致密，而果胶包埋的益生菌粉则呈现出粗糙、网状、有裂隙的结构，两者结构上的差异导致了在储藏过程中对益生菌保护效果的不同；而银耳多糖包埋的菌粉表面没有明显的裂隙，表现出比果胶更好的包埋效果。

2.4 冷冻干燥保护剂对植物乳杆菌细胞膜性质的影响

2.4.1 冷冻干燥保护剂对细胞膜通透性的影响

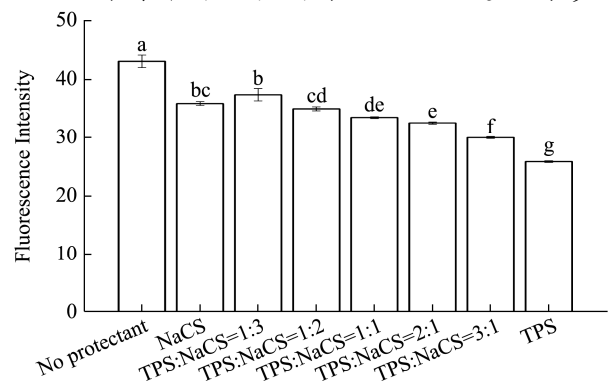


图4 不同保护剂对植物乳杆菌胞内钙离子含量的影响

Fig.4 Effect of different protectants on intracellular calcium content of *Lactobacillus plantarum*

通过测定菌体细胞膜的性质变化来进一步说明保护剂的保护效果。由于冷冻过程中形成的冰晶会损伤细胞膜，造成细胞膜通透性增加，导致胞外钙离子内流。因此可以通过测定胞内钙离子含量变化来反映细胞膜的通透性。从图4可知，未添加保护剂时， Ca^{2+} 荧光强度最高，为43.10；添加NaCS后 Ca^{2+} 荧光强度降低到35.89，且随着保护剂中银耳多糖含量的增加， Ca^{2+} 荧光强度越来越低；当银耳多糖与酪蛋白酸钠的比例为1:3、1:2、1:1、2:1、3:1时， Ca^{2+} 荧光强度分别为37.39、34.98、33.50、32.56、29.98。当保护剂为

银耳多糖时, 荧光强度达到最低, 为 25.83。说明银耳多糖对维持细胞膜具有较强的保护作用。这可能是由于多糖类保护剂中的羟基与磷脂双分子层形成氢键, 保持了细胞膜结构的稳定性, 从而减少了胞外 Ca^{2+} 的内流^[40]。王飏等^[41]的研究发现冻干后的德氏乳杆菌胞内钙离子荧光强度远高于正常细胞, 约为正常菌体胞内钙离子荧光强度的 5 倍, 添加有海藻糖保护剂的冻干菌体胞内钙离子荧光强度相对未添加保护剂的菌体降低约 40%, 保护效果优于银耳多糖。

2.4.2 不同冷冻干燥保护剂对细胞膜流动性的影响

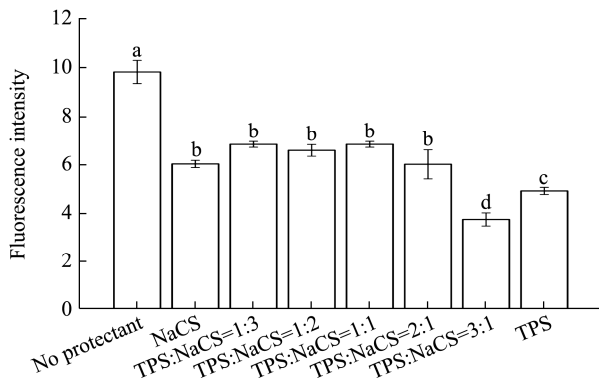
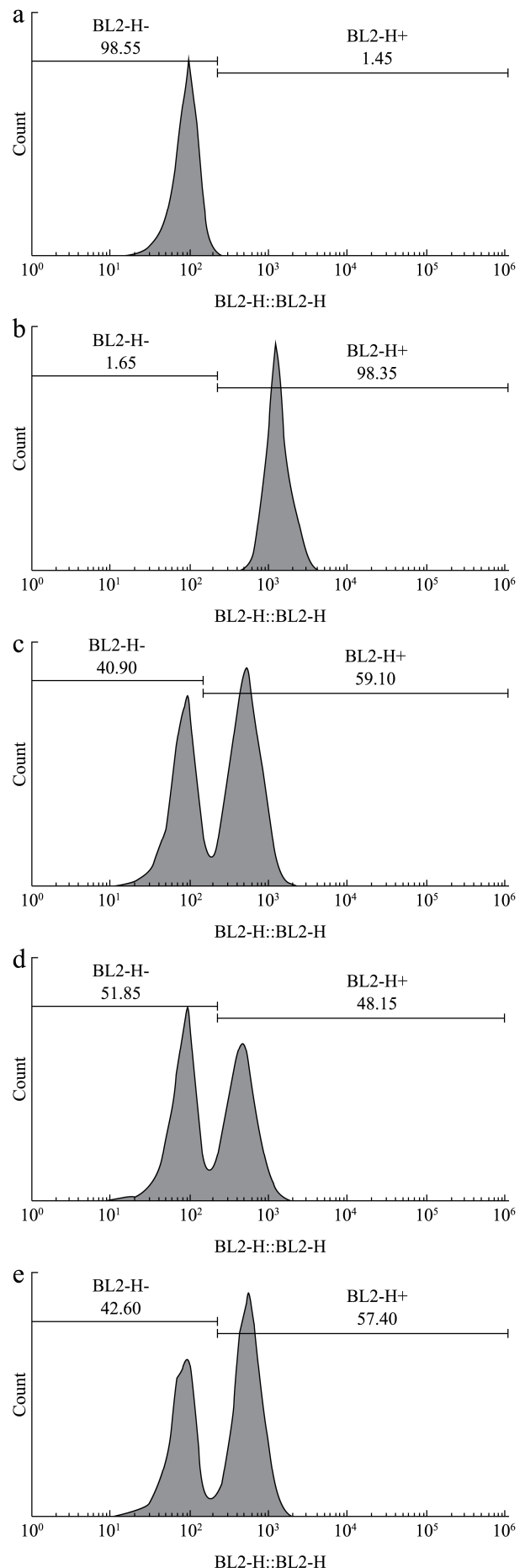


图5 不同保护剂对植物乳杆菌细胞膜流动性的影响

Fig.5 Effects of different protectants on membrane fluidity of *Lactobacillus plantarum*

细胞膜的流动性可以反映细胞膜的结构是否完整。当荧光探针 DPH 与细胞质膜中磷脂的脂烃链区结合时, 体系的介质黏度增加, 顺反异构化受到抑制而成为唯一能发光的全反构型, 此时 DPH 荧光强度低表明结构有序性低或细胞膜流动性高^[30,42]。由图 5 可知, 未添加保护剂组的荧光强度最高, 为 9.82; 添加保护剂后荧光强度显著降低 ($p < 0.05$), 说明添加保护剂有利于维持细胞膜正常的流动性; 保护剂为 NaCS 的菌粉与保护剂为银耳多糖与酪蛋白酸钠的比例为 1:3、1:2、1:1 和 2:1 的菌粉的荧光强度无显著性差异, 其荧光强度分别为 6.02、6.83、6.58、6.81、6.01; 保护剂为银耳多糖时, 荧光强度为 4.91。同时可以看出, 少量的银耳多糖对复合保护剂的保护效果影响不明显, 只有当银耳多糖与酪蛋白酸钠的比例达到 3:1 时, 保护效果才得到显著增强 ($p < 0.05$) 且达到最大, 此时荧光强度为 3.73。Li 等^[15]以蔗糖 15% (m/V), 海藻糖 5% (m/V), 海藻糖 10% (m/V) 和重组脱脂牛奶 10% (m/V) 作为保护剂对 *Lactobacillus reuteri* CICC6226 细胞膜的保护作用, 发现只有海藻糖 10% (m/V) 和重组脱脂牛奶 10% (m/V) 能够改善细胞膜的流动性。

2.4.3 不同冷冻干燥保护剂对细胞膜完整性的影响



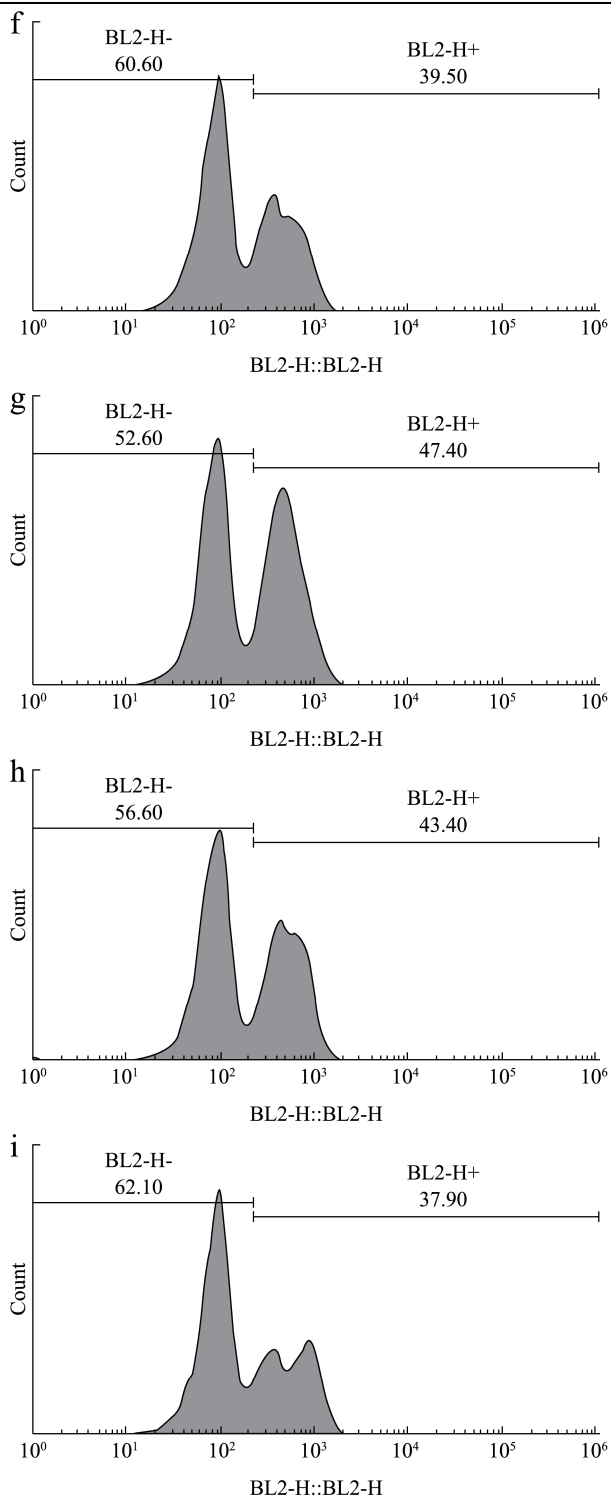


图6 不同保护剂对植物乳杆菌细胞膜完整性的影响

Fig.6 Effects of different protectants on the membrane integrity of *Lactobacillus plantarum*

注: a (未冻干处理), b (无保护剂), c (NaCS), d (TPS:NaCS=1:3), e (TPS:NaCS=1:2), f (TPS:NaCS=1:1), g (TPS:NaCS=2:1), h (TPS:NaCS=3:1), i (TPS)。

为进一步说明保护剂对细胞膜性质的影响,本研究利用 PI 只能进入细胞膜受损的植物乳杆菌体内与其核酸反应发出红色荧光的原理,通过流式细胞仪测

定其染色情况以表征细胞膜的完整性。如图 6 所示,图中峰出现在左侧代表未发出红色荧光的菌体占总菌数的比例,右侧代表发出红色荧光的菌体占总菌数的比例。

未经冷冻干燥的植物乳杆菌(a)中 98.55%的菌未检测出红色荧光,说明大多数菌的细胞膜完整;在无保护剂(b)的情况下,98.35%的植物乳杆菌经冷冻干燥后细胞膜完整性遭到破坏;而在添加保护剂后,细胞膜受损的植物乳杆菌比例显著降低,但各保护剂对细胞膜的保护作用有所差异。保护剂为 NaCS 时,细胞膜受损的植物乳杆菌百分比为 59.10%;保护剂为银耳多糖比酪蛋白酸钠等于 1:3、1:2、1:1、2:1 和 3:1 时,膜受损的植物乳杆菌百分比分别为 48.15%、57.40%、39.50%、47.40%、43.40%;保护剂为银耳多糖时,细胞膜受损的植物乳杆菌百分比最低,为 37.90%。相比于单一的酪蛋白酸钠保护剂,将其与银耳多糖复合后,它的保护效果得到了提升,可能是因为银耳多糖的加入提高了复合保护剂的玻璃化转变温度,从而减少冰晶的形成,进而减少细胞膜受到的机械损伤^[43]。Jessica 等^[32]研究发现 β -葡聚糖包埋的 *Lactobacillus plantarum* LP-49 和 *Lactobacillus plantarum* LP-201 在冷冻干燥过程中膜受损的菌占比分别为 31.90%和 8.90%,而低聚果糖包埋的 *Lactobacillus plantarum* LP-49 和 *Lactobacillus plantarum* LP-201 在冷冻干燥过程中膜受损的菌占比分别为 16.20%和 18.80%,多糖对细胞膜的保护作用受益生菌的固有特性影响。

2.5 不同保护剂对冻干菌粉的糖代谢酶活性的影响

2.5.1 乳酸脱氢酶活性变化

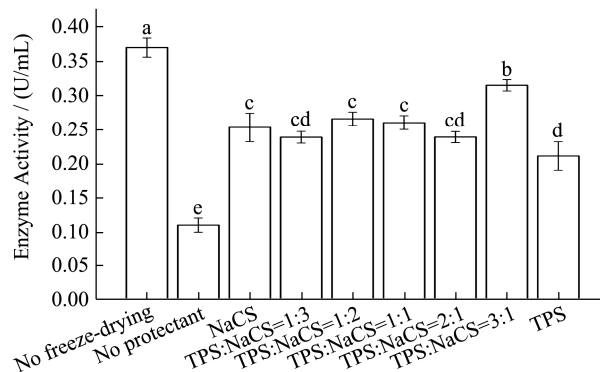


图7 不同保护剂对乳酸脱氢酶活性的影响

Fig.7 Effect of different protectants on LDH activity

冻干后菌粉的活性变化还表现在对细胞内糖代谢酶的影响上^[44]。有研究表明,冷冻干燥会对乳酸脱氢

酶造成损伤,从而导致植物乳杆菌细胞的活力下降^[45]。从图7可知,未冻干的菌乳酸脱氢酶活力为0.37 U/mL,冻干后菌的乳酸脱氢酶活力会明显降低;未添加保护剂时酶活为0.11 U/mL,同时可以看出,在冻干过程中添加保护剂能显著降低乳酸脱氢酶受到的损伤,当保护剂为NaCS以及银耳多糖与酪蛋白酸钠的比例为1:3、1:2、1:1、2:1时,乳酸脱氢酶活力分别为0.25、0.24、0.27、0.26、0.24 U/mL,酶活无显著性差异;当银耳多糖与酪蛋白酸钠的比例为3:1时,保护剂对乳酸脱氢酶的保护效果达到最高水平,此时酶活为0.32 U/mL;但单一的银耳多糖保护剂对乳酸脱氢酶的保护效果最低,酶活为0.21 U/mL。结果表明,冷冻干燥会对植物乳杆菌的乳酸脱氢酶造成损伤,而保护剂能降低此种损伤,其中复合保护剂比单一的银耳多糖保护剂的效果更好,并且银耳多糖只有在高添加量时才会显著提高复合保护剂对乳酸脱氢酶的保护效果。Li等^[15]研究也发现不同保护剂对乳酸脱氢酶活力有显著性影响,蔗糖15% (m/V)、海藻糖10% (m/V)以及重组脱脂牛奶10% (m/V)作为保护剂时,乳酸脱氢酶的活力分别为9.11 U/mg、8.38 U/mg和8.96 U/mg,与未冻干的菌的酶活无显著性差异,而海藻糖5% (m/V)则无法有效保护乳酸脱氢酶。

2.5.2 己糖激酶和丙酮酸激酶活性变化

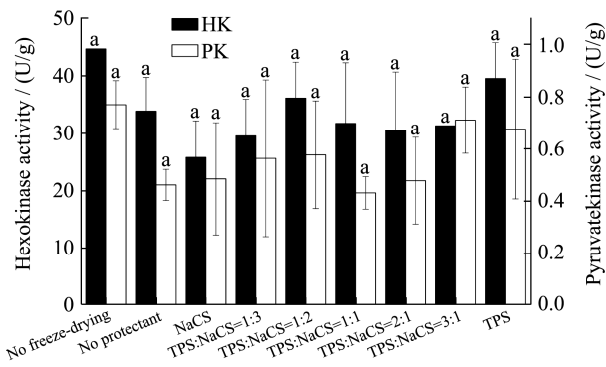


图8 不同保护剂对己糖激酶(HK)和丙酮酸激酶(PK)活性的影响

Fig.8 Effects of different protectants on the activities of hexokinase (HK) and pyruvate kinase (PK)

己糖激酶和丙酮酸激酶都是糖酵解途径中的关键酶,其活性大小与乳酸菌的糖代谢速率有关,本研究通过测定冷冻干燥对其活性大小的影响,结果如图8所示。从图中可以看出,未冻干的植物乳杆菌己糖激酶和丙酮酸激酶的活力分别为44.52 U/g和0.77 U/g;无保护剂的植物乳杆菌己糖激酶和丙酮酸激酶分别为33.73 U/g和0.46 U/g;保护剂为NaCS和TPS的植物乳杆菌己糖激酶活力分别为25.69 U/g与39.39 U/g,丙酮酸激酶的活力分别为0.48 U/g与0.67 U/g;保护

剂中银耳多糖比酪蛋白酸钠等于1:3、1:2、1:1、2:1及3:1时,植物乳杆菌粉的己糖激酶活力分别为29.42、35.98、31.59、30.38、31.18 U/g,丙酮酸激酶的活力分别为0.56、0.57、0.43、0.48、0.71 U/g。尽管不同比例保护剂菌粉的己糖激酶和丙酮酸激酶活性大小不同,但与未添加保护剂的冻干菌粉及未冻干的菌相比,没有显著性差异,这一结果表明冷冻干燥过程中,己糖激酶和丙酮酸激酶的活性并不会受到太大影响,具体原因尚不明确,推测可能与己糖激酶和丙酮酸激酶的亚细胞定位以及分子量大小有关。Li等^[15]在研究蔗糖、海藻糖、酪蛋白酸钠、脱脂乳等不同保护剂对冷冻干燥后乳酸杆菌的己糖激酶和丙酮酸激酶活力的影响时,也发现冷冻干燥对己糖激酶和丙酮酸激酶的影响不大。

2.5.3 ATP酶活性变化

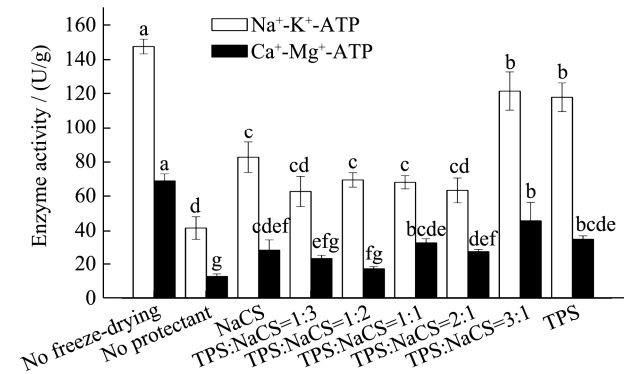


图9 不同保护剂对ATP酶活性的影响

Fig.9 Effect of different protectants on ATPase activity

通过测定冷冻干燥后菌粉ATP酶的活性来反映菌粉活力大小,结果如图9所示。从图9可知,未冻干的菌Na⁺-K⁺-ATP酶和Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶的活力分别为147.62 U/g和68.75 U/g;未添加保护剂的菌冻干后Na⁺-K⁺-ATP酶和Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶的活力分别为41.45 U/g和12.73 U/g;保护剂为NaCS时,菌冻干后Na⁺-K⁺-ATP酶和Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶的活力分别为82.50 U/g和28.61 U/g;保护剂为TPS时,菌冻干后Na⁺-K⁺-ATP酶和Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶的活力分别为117.97 U/g和34.95 U/g;冻干前后两种ATP酶的活性都具有显著性变化,而保护剂的添加能降低冷冻干燥对ATP酶活性的损伤。少量添加银耳多糖并不能显著提高保护剂对Na⁺-K⁺-ATP酶和Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶的保护效果,只有当银耳多糖与酪蛋白酸钠的比例达到3:1时,保护效果才得到显著提高,此时Na⁺-K⁺-ATP酶和Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶的活力分别为121.61 U/g和45.64 U/g;同时也可以看到单一的银耳多糖对Na⁺-K⁺-ATP酶的保护作用也很强,说明银耳多糖在对Na⁺-K⁺-ATP酶的保护方面做出了更大的贡献。银耳多糖与酪蛋白

酸钠的比例为 1:3 和 1:2 时,菌冻干后 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶的活力分别为 62.62 U/g 和 69.33 U/g, $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATP}$ 酶的活力分别为 23.17 U/g 和 17.20 U/g; 与未添加保护剂组相比, $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATP}$ 酶活性大小并没有显著性差异,当银耳多糖与酪蛋白酸钠的比例达到 3:1 时,保护效果达到最大,说明银耳多糖含量低对 $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATP}$ 酶的保护效果没有促进作用;同时可以看出单一的酪蛋白酸钠和银耳多糖保护剂也具有明显的保护作用。Castro 等^[45]的研究也表明冷冻干燥过程中 ATP 酶活性的降低是造成菌粉活力降低的原因之一。Li 等^[15]研究发现 10% (m/V) 的海藻糖对 *Lactobacillus reuteri* CICC6226 的 ATP 酶具有显著的保护效果,菌冻干后的 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATP}$ 酶和 $\text{Mg}^{2+}\text{-ATP}$ 酶的活力分别为 23.44、23.44、24.00 U/mg,与未冻干菌的酶活力大小相比基本不变,表现出比银耳多糖更佳的保护效果。

3 结论

本文研究了银耳多糖与酪蛋白酸钠在冻干菌粉的制备过程中对植物乳杆菌细胞膜和糖代谢酶的保护作用。结果表明,银耳多糖与酪蛋白酸钠之间产生了非共价相互作用,菌粉表面的孔隙率随银耳多糖含量的增加而降低,当银耳多糖与酪蛋白酸钠的质量比为 3:1 时:植物乳杆菌的存活率最高 (55.39%);DPH 的荧光强度最低 (4.91);菌的乳酸脱氢酶、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶和 $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATP}$ 酶的活力最高,分别为 0.32 U/mL、121.61 U/g 及 45.64 U/g,但冷冻干燥前后己糖激酶和丙酮酸激酶活力无显著性变化。此外,菌体细胞内 Ca^{2+} 荧光强度随保护剂中银耳多糖含量的增加从 43.10 降低到 25.83;保护剂为银耳多糖时膜受损的菌百分比从 98.35% 最大降低至 37.90%。因此,银耳多糖对冻干植物乳杆菌的细胞膜和糖代谢酶具有较强的保护作用。与一些常见的碳水化合物类保护剂如蔗糖、海藻糖和乳糖等二糖相比,银耳多糖对益生菌的保护效果并没有优势,但其它二糖并不具备银耳多糖的益生作用;后续研究可从优化冻干工艺、优化保护剂配比和种类以及对银耳多糖改性等方面提高银耳多糖对益生菌的冻干保护效果。

参考文献

[1] 马卓云,于泽,於佳龙.益生菌在食品中的应用现状及其功效[J].现代食品,2020,2(4):129-131
MA Zhuoyun, YU Ze, YU Jialong. Application status and efficacy of probiotics in food [J]. Modern Food, 2020, 2(4): 129-131

[2] Ouwehand A C, Salminen S J. The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria [J]. International Dairy Journal, 1998, 8(9): 749-758
[3] Bandiera N S, Carneiro I, Silva A S D, et al. Viability of probiotic *Lactobacillus casei* in yoghurt: defining the best processing step to its addition [J]. Archivos Latinoamericanos De Nutrición, 2013, 63(1): 58-63
[4] 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
[5] 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, 2015, 117(3): 729-740
[6] Tymczyszyn E E, Sosa N, Gerbino E, et al. Effect of physical properties on the stability of *Lactobacillus bulgaricus* in a freeze-dried galacto-oligosaccharides matrix [J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 155(3): 217-221
[7] Haiping L, Pei Z, Shuhai Z, et al. Protective effect of polysaccharides from *Pholiota nameko* on *Lactobacillus casei* ATCC 334 subjected to freeze-drying [J]. LWT, 2019, 115: 108463
[8] Guedes J D S, Pimentel T C, Diniz-Silva H T, et al. Protective effects of β -glucan extracted from spent brewer yeast during freeze-drying, storage and exposure to simulated gastrointestinal conditions of probiotic lactobacilli [J]. LWT - Food Science and Technology, 2019, 116: 108496
[9] Fowler A, Toner M. Cryo-injury and biopreservation [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2010, 1066(1): 119-135
[10] Fernanda Fonseca, Catherine Béal, Georges Corrieu. Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage [J]. Journal of Dairy Research, 2000, 67(1): 83-90
[11] Marta A, Wojciech B A, Rados Aw D, et al. Method of preservation and type of protective agent strongly influence probiotic properties of *Lactococcus lactis*: a complete process of probiotic preparation manufacture and use [J]. Food Chemistry, 2018, 274: S2120200987
[12] Raddatz G C, Poletto G, Deus C D, et al. Use of prebiotic sources to increase probiotic viability in pectin microparticles obtained by emulsification/internal gelation followed by freeze-drying [J]. Food Research International, 2019: 108902
[13] Haffner F B, Diab R, Pasc A. Encapsulation of probiotics:

- insights into academic and industrial approaches [J]. AIMS Materials Science, 2016, 3(1): 114-136
- [14] Fowler A, Toner M. Cryo-injury and biopreservation [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2005, 1066(Dec): 119-135
- [15] Li B, Tian F, Liu X, et al. Effects of cryoprotectants on viability of *Lactobacillus reuteri* CICC6226 [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2011, 92(3): 609-616
- [16] Schwab C, Vogel R, Gnzle 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
- [17] Tymczyszyn E E, Gerbino E, Illanes A, et al. Galacto-oligosaccharides as protective molecules in the preservation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* [J]. Cryobiology, 2011, 62(2): 123-129
- [18] Chen B. Optimization of extraction of *Tremella fuciformis* polysaccharides and its antioxidant and antitumour activities *in vitro* [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 81(2): 420-424
- [19] Hu J, Zhao T, Li S, et al. Stability, microstructure, and digestibility of whey protein isolate - *Tremella fuciformis* polysaccharide complexes [J]. Food Hydrocolloids, 2019, 89(APR.): 379-385
- [20] Guo F C, Kwakkel R P, Williams B A, et al. Effects of mushroom and herb polysaccharides on cellular and humoral immune responses of *Eimeria tenella* - infected chickens [J]. Poultry Science, 2004, 83(7): 1124-1132
- [21] 李志鹏,刘梦莹,廖瑜玲,等.一种合生元及其应用:中国专利, CN202010071355.5 [P]. 2020.06.12[2021.06.09]. <https://www.zhangqiaokeyan.com/patent-detail/06120103713874.html>
- LI Zhipeng, LIU Mengying, LIAO Yuling, et al. A synbiotic and its application: Chinese patent, CN202010071355.5 [P]. 2020.06.12[2021.06.09] <https://www.zhangqiaokeyan.com/patent-detail/06120103713874.html>
- [22] Tang R, Lu Y, Hou C, et al. Co-supplementation of *Flos sophorae* extract with *Tremella fuciformis* polysaccharides improves physicochemical, textural, rheological, and antioxidant properties of low-fat yogurts [J]. Journal of Food Quality, 2020, 2020: 1-9
- [23] 陶瑞霄. 银耳粗多糖对姜汁乳饮料稳定性的研究[J]. 粮食与油脂, 2018, 31(11): 93-97
- TAO Ruixiao. Study on the stability of *Tremella fuciformis* polysaccharide on ginger milk beverage [J]. Food and Oil, 2018, 31(11): 93-97
- [24] 王飞,王金阳,吴迪,等. 银耳冰淇淋的研制[J]. 农业技术与装备, 2020, 1: 45-46
- WANG Fei, WANG Jinyang, WU Di, et al. Development of *Tremella* ice cream [J]. Agricultural Technology and Equipment, 2020, 1: 45-46
- [25] 张姗姗,秦丹丹,吴琼. 银耳多糖对冰淇淋品质的影响[J]. 广东化工, 2018, 45(17): 8-10
- ZHANG Shanshan, QIN Dandan, WU Qiong. Effect of tremella polysaccharide on ice cream quality [J]. Guangdong Chemical Industry, 2018, 45(17): 8-10
- [26] Prisco A D, Mauriello G. Probiotication of foods: a focus on microencapsulation tool [J]. Trends in Food Science & Technology, 2016, 48: 27-39
- [27] Xue Z, Chen Z, Gao X, et al. Functional protection of different structure soluble dietary fibers from *Lentinus edodes* as effective delivery substrate for *Lactobacillus plantarum* LP90 [J]. LWT - Food Science and Technology, 2021, 136: 110339
- [28] Bergmeyer H U, Bernt E. UV-Assay with pyruvate and NADH [J]. Methods of Enzymatic Analysis, 1974: 574-579
- [29] Favián T, Elena A M, Luis A, et al. Cryopreservation induces mitochondrial permeability transition in a bovine sperm model [J]. Cryobiology, 2018, 83: 65-74
- [30] Li Y, Chang W, Zhang M, et al. Diorcinol D exerts fungicidal action against *Candida albicans* through cytoplasm membrane destruction and ROS accumulation [J]. PLoS One, 2015, 10(6): e128693
- [31] Aguilar Zoraida P, Wang L, Yu X, et al. Effect of skim milk coated inulin-alginate encapsulation beads on viability and gene expression of *Lactobacillus plantarum* during freeze-drying [J]. LWT - Food Science & Technology, 2016, 68: 8-13
- [32] Da Silva Guedes J, Pimentel T C, Diniz-Silva H T, et al. Protective effects of β -glucan extracted from spent brewer yeast during freeze-drying, storage and exposure to simulated gastrointestinal conditions of probiotic lactobacilli [J]. LWT, 2019, 116: 108496
- [33] Miao M, Bai A, Jiang B, et al. Characterisation of a novel water-soluble polysaccharide from *Leuconostoc citreum* SK24.002 [J]. Food Hydrocolloids, 2014, 36(MAY): 265-272
- [34] Wang M, Zhao S, Zhu P, et al. Purification, characterization and immunomodulatory activity of water extractable polysaccharides from the swollen culms of *Zizania latifolia* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017: S1787137942

- [35] Surewicz W K, Mantsch H H. New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1988, 952(none): 115-130
- [36] M Rehan O A A S. Green and sustainable encapsulation of guava leaf extracts (*Psidium guajava* L.) into alginate/starch microcapsules for multifunctional finish over cotton gauze [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2019, 7: 18612-18623
- [37] Ssa B, Rb B, Ma B, et al. Use of whey protein isolate and gum Arabic for the co-encapsulation of probiotic *Lactobacillus plantarum* and phytosterols by complex coacervation: enhanced viability of probiotic in Iranian white cheese [J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 113: 106496
- [38] Maity T, Chauhan O P, A Shah P S R, et al. Quality characteristics and glass transition temperature of hydrocolloid pre-treated frozen pre-cut carrot [J]. *International Journal of Food Properties*, 2011, 14(1): 17-28
- [39] Khodaei D, Hamidi-Esfahani Z, Lacroix M. Gelatin and low methoxyl pectin films containing probiotics: film characterization and cell viability [J]. *Food Bioscience*, 2020, 36: 100660
- [40] Tang M, Waring A J, Hong M. Trehalose-protected lipid membranes for determining membrane protein structure and insertion [J]. *Journal of Magnetic Resonance*, 2007, 184(2): 222-227
- [41] 王飏,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 Fengwei, LI Jianrong, et al. Effect of frozen drying on the membrane permeability of *Lactobacillus* [J]. *Microbiology Bulletin*, 2009, 36(5): 684-688
- [42] Haiping Li, Jing C, Tao F, et al. Differential effects of insecticides on mitochondrial membrane fluidity and ATPase activity between the wolf spider and the rice stem borer [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2015, 14(12): 2574-2580
- [43] Bumsoo H, C B J. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing [J]. *Cryobiology*, 2004, 48(1): 8-21
- [44] 刘丽凤,孟祥晨.冷冻干燥对婴儿双歧杆菌损伤作用的研究[J].*食品科学*,2007,1:32-35
LIU Lifeng, MENG Xiangchen. Study on the effect of cryodrying on *Bifidobacterium* in infants [J]. *Food Science*, 2007, 1: 32-35
- [45] Castro H P, Teixeira P M, Kirby R. Evidence of membrane damage in *Lactobacillus bulgaricus* following freeze drying [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 82(1): 87-94

(上接第 166 页)

- [35] 邹宗胜,王婧雅,赵运英,等.高产纤维素酶突变株的筛选及其产酶条件优化[J].*食品科学*,2019,40(6):48-54
ZOU Zongsheng, WANG Jingya, ZHAO Yunying, et al. Screening of *Trichoderma reesei* mutants and optimization of fermentation conditions for higher cellulase production [J]. *Food Science*, 2019, 40(6): 48-54
- [36] 朱孟峰,许伟,邵荣,等.桑叶中 α -葡萄糖苷酶抑制剂产生菌的分离鉴定及诱变选育[J].*食品科学*,2017,38(10):111-116
ZHU Mengfeng, XU Wei, SHAO Rong, et al. Isolation, identification and mutation breeding of an endophytic strain producing α -Glucosidase inhibitor from mulberry leaf [J]. *Food Science*, 2017, 38(10): 111-116
- [37] 朱永瑞,曾柏全,曾磊,等.黑曲霉C112纤维二糖酶基因的克隆与生物信息学分析[J].*生物技术通报*,2016,32(2):116-122
ZHU Yongrui, ZENG Baiquan, ZENG Lei, et al. Cloning and bioinformatics analysis of cellobiase gene from *Aspergillus niger* C112 [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(2): 116-122
- [38] 张鑫鑫,陈叶福,付更新,等.新型木糖发酵酵母*Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907与传统木糖发酵酵母*Pichia stipitis* NRRL Y-7124乙醇发酵性能比较[J].*酿酒科技*,2014, 7:20-25
ZHANG Xinxin, CHEN Yefu, FU Gengxin, et al. Comparison of xylose-ethanol fermenting performance between *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 and *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 [J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2014, 7: 20-25
- [39] 康富帅,颜兵,吕南拳,等.低嘌呤酿酒酵母的ARTP法诱变育种[J].*现代食品科技*,2014,30(2):188-191
KANG Fushuai, YAN Bing, LYU Nanquan, et al. Mutation breeding of *Saccharomyces cerevisiae* with low purine by atmospheric and room temperature plasma [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(2): 188-191