

以燕麦 β -葡聚糖为主的酵母冻干保护剂优化

李真^{1,2}, 姬生鑫¹, 梁静静¹, 索标^{1,2}, 范会平^{1,2}, 艾志录^{1,2*}

(1. 河南农业大学食品科学技术学院, 河南郑州 450002)

(2. 农业农村部大宗粮食加工重点实验室, 河南郑州 450002)

摘要: 为提高酵母冻干存活率, 以酿酒酵母为研究对象, 菌株存活率为相应指标。冻干保护剂以燕麦 β -葡聚糖为主, 并与 γ -聚谷氨酸和甘露醇复合; 采用单因素轮换试验确定 3 因素的水平并作为响应面优化试验的中心点, 进一步利用 Central Composite 响应面法优化设计试验建立酵母存活率与 3 因素之间的回归方程; 通过响应面分析各个因素对响应值的效应关系, 并采用扫描电子显微镜观察冻干后酵母细胞形态。结果表明, 保护剂最佳配比为: 燕麦 β -葡聚糖 6.56%、 γ -聚谷氨酸 0.15%、甘露醇 1.15%, 菌体与保护剂质量比为 1:2 混合时, 此条件下菌体细胞存活率可达到 90.69%, 与理论预测值 89.86% 接近; 与未添加保护剂组酵母细胞相比, 添加保护剂组酵母细胞形态饱满、结构完整。研究结果可为酵母的冷冻干燥保护及推广应用提供数据支撑。

关键词: 冷冻干燥; β -葡聚糖; 酿酒酵母; γ -聚谷氨酸; 甘露醇

文章编号: 1673-9078(2022)07-63-69

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.7.1148

Optimization of Yeast Lyophilization Protectant Based on Oat β -glucan

LI Zhen^{1,2}, JI Shengxin¹, LIANG Jingjing¹, SUO Biao^{1,2}, FAN Huiping^{1,2}, AI Zhilu^{1,2*}

(1. College of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

(2. Key Laboratory of Staple Grain Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: To improve the survival rate of freeze-dried yeast, *Saccharomyces cerevisiae* was selected as the research object, and the survival rate of the strain was the corresponding index. The main freeze-dried cryoprotector was oat β -glucan, which was combined with γ -poly-glutamic acid and mannitol. The single factor rotation test was used to determine the level of three factors and serve as the central point of response surface optimization test. The regression equation between the survival rate of yeast and the three factors was established by Central Composite response surface method. The effects of various factors on the response values were analyzed by response surface analysis, and the morphology of lyophilized yeast cells was observed by scanning electron microscope. The results showed that the best ratio of cryoprotectors was 6.56% oat β -glucan, 0.15% γ -poly-glutamic acid, 1.15% mannitol, and the mass ratio of bacteria to protective agent was 1:2. Under these conditions, the survival rate of cells could reach 90.69%, which was close to the theoretical predicted value of 89.86%. Compared with the yeast cells without adding cryoprotector, the yeast cells in the group with adding cryoprotector were full in morphology and complete in structure. The results of this study can provide data support for the freeze-drying protection and promotion of yeast.

Key words: freeze-drying; β -glucan; *Saccharomyces cerevisiae*; γ -polyglutamic acid; mannitol

引文格式:

李真, 姬生鑫, 梁静静, 等. 以燕麦 β -葡聚糖为主的酵母冻干保护剂优化[J]. 现代食品科技, 2022, 38(7): 63-69

LI Zhen, JI Shengxin, LIANG Jingjing, et al. Optimization of yeast lyophilization protectant based on oat β -glucan [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(7): 63-69

酿酒酵母是与人类关系最为密切一种酵母, 酿酒酵母菌体中含有多种营养物质成分, 是良好的膳食补

收稿日期: 2021-10-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31601506); 河南省科技攻关项目 (192102110100; 182102110320)

作者简介: 李真 (1983-), 博士, 讲师, 研究方向: 谷物加工及面食制品品质控制, E-mail: zhuhelizhen@163.com

通讯作者: 艾志录 (1965-), 博士, 教授, 研究方向: 农产品加工与贮藏工程、速冻食品、主食工业化等, E-mail: zhilaf@food@sina.com

剂, 这些营养成分经过不断的研究开发可以应用于食品、医药、饲料、化妆品等领域^[1]。但其在食品制造中最主要的应用还是发酵, 如酿酒工业^[2]、奶制品行业^[3]、调味品^[4]以及发酵面食加工领域^[5]等。与湿酵母相比, 活性干酵母具有含水量低、复水快、性能稳定、易于运输和使用方便等优点。

目前, 常用的酵母干燥保藏方法主要有: 真空冷冻干燥、流化床干燥、喷雾干燥, 相对于流化床干燥和喷雾干燥, 真空冷冻干燥技术酵母的存活率较高,

对于热较为敏感的酵母菌有更大的优势,受到大家的青睐。但在实际干燥过程中依然会不可避免的出现细胞不可逆损伤,细胞死亡活力下降等问题。因此需要采取相应的保护措施,其中冻干保护剂是比较常用的提高菌剂冻干存活率和稳定性的有效方法,目前常用的保护剂主要有脱脂奶粉、山梨醇、甘油^[6]、海藻糖、谷氨酸钠^[7]、蔗糖、乳糖、抗坏血酸、菊粉、甘露醇^[8]等。宋志远^[9]研究得出以脱脂乳粉 5%、甘露醇 4%、抗坏血酸 3%比例作为果蔬生防酵母细胞的复合冻干保护剂,酵母细胞存活率可以达到 83.64%。周秋阳等^[10]研究发现以海藻糖 12.45 g/100 mL、谷氨酸钠 13.56 g/100 mL、山梨醇 5.43 g/100 mL 作为酵母复合冻干保护剂时,酵母细胞冻干存活率达 84.21%。王华等^[11]采用聚乙二醇 1.10 g/100 mL、L-谷氨酸钠 7.07 g/100 mL、蔗糖 14.15 g/100 mL 作为热带假丝酵母菌复合冻干保护剂时,冻干存活率为 82.73%。Han^[12]研究表明以脱脂奶粉 1.5%、聚乙二醇 0.1875%、海藻糖 5.25%配比的复合低温保护剂,冻干海洋酵母 *Sporidiobolus pararoseus* ZMY-1 的存活率为 93.9%。Zhang^[13]研究表明以海藻糖 20%、谷氨酸钠 2%、5%聚乙烯吡咯烷酮和 20%脱脂牛奶配比的复合低温保护剂,冻干毕赤酵母的存活率为 79.4%。蔡孟轩等^[14]优化了橄榄假丝酵母的保护剂配方,最终配方为海藻糖、脱脂乳粉、谷氨酸钠按 15%、10%、2%的比例混合,所得酵母存活率为 69.7%。然而,迄今为止国内外将 β -葡聚糖作为冻干保护剂的研究较少,以燕麦 β -葡聚糖为主,与 γ -聚谷氨酸和甘露醇复合作为酵母冻干保护剂的研究更是未见报道。燕麦 β -葡聚糖和 γ -聚谷氨酸为不能自由通过细胞膜的大分子非渗透型保护剂。

不同类型保护剂的作用机制差异较大,复配使用不同类型保护剂相互协调更能减小微生物在冷冻过程中的死亡率。燕麦 β -葡聚糖和 γ -聚谷氨酸为不能自由通过细胞膜的大分子非渗透型保护剂;甘露醇是可以自由通过细胞膜的小分子渗透型保护剂,并且也可以在水中形成无定型结构来维持蛋白的稳定性,阻止细胞膜蛋白的聚集,保护细胞膜骨架不受损害。因此,为进一步提高酿酒酵母在冷冻及干燥等各种不利环境下的存活率。本研究以燕麦 β -葡聚糖、 γ -聚谷氨酸、甘露醇为冻干保护剂,并利用中心复合试验设计(CCD)优化得出酵母存活率最高时冷冻干燥保护剂最佳添加比,为后期酿酒酵母的应用奠定基础,也为新型酵母冻干保护剂的开发与应用提供理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验菌种及培养基

本试验所使用的酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 从安琪高活性酵母中分离得到; YPD 培养基: 葡萄糖 2.0%、胰蛋白胨 2.0%、酵母浸粉 1%, 121 °C 灭菌 20 min。

1.1.2 主要试剂

燕麦 β -葡聚糖(纯度 80%) 由张家口一康生物科技有限公司提供; 胰蛋白胨、酵母浸粉购于赛默飞世尔科技有限公司; γ -聚谷氨酸购于西安四季生物科技有限公司; 甘露醇购于浙江一诺生物科技有限公司。燕麦 β -葡聚糖、 γ -聚谷氨酸、甘露醇为食品级, 其他试剂均为分析纯。

1.1.3 主要仪器与设备

5430R 型离心机, eppendorf 有限公司; SX-500 型高压蒸汽灭菌锅, 日本 Tomy Digital Biology; BPMJ-150F 型培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; BTP.8XL 型冷冻干燥机, 德祥科技有限公司; SZCL-4A 型智能磁力加热搅拌器, 巩义市予华仪器有限责任公司; TP614000A 型显微镜, 杭州图谱光电科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菌悬液的制备与冷冻干燥

参照邵明倩^[15]酵母冻干粉制备方法略作修改, 将酵母菌培养到稳定期后, 离心速度为 6000 r/min, 离心 5 min, 离心温度为 20 °C, 无菌水洗涤两次。菌泥与保护剂质量比为 1:2, 30 °C 恒温箱中平衡 60 min, 之后于 -18 °C 冰箱中预冻 8 h, 预冻结束后迅速放入真空冷冻干燥机中。冻干工艺: 冷阱温度 -75 °C, 真空度 145~155 mT, 冻干时间 20 h。

1.2.2 冻干存活率的计算

酵母冻干粉用 0.85% 的无菌生理盐水复水至冻干前体积, 溶解之后放入 30 °C 恒温培养箱中活化 30 min, 利用美兰染色法测定酵母冻干存活率^[16], 存活率计算见下式。

$$\text{冻干存活率} / \% = \frac{\text{冻干菌粉复水至原菌液体积的存活率}}{\text{冻干前原菌液存活率}} \times 100\%$$

1.2.3 单因素轮换试验

选取燕麦 β -葡聚糖、 γ -聚谷氨酸、甘露醇作为冻干保护剂, 首先固定 γ -聚谷氨酸、甘露醇添加量为 0.167%、1.33%, 燕麦 β -葡聚糖添加量依次为 4%、5%、6%、7%、8%, 可以得到最优燕麦 β -葡聚糖添加量。固定最优燕麦 β -葡聚糖添加量和甘露醇添加量

1.33%, γ -聚谷氨酸的添加量依次为 0.033%、0.1%、0.167%、0.233%、0.3%, 得到最优 γ -聚谷氨酸添加量。最后固定最优燕麦 β -葡聚糖和 γ -聚谷氨酸添加量, 甘露醇的添加量依次为 0.33%、0.67%、1%、1.33%、1.67%, 得到最优甘露醇添加量。上述保护剂的配置均用无菌水在恒温 75 °C 磁力搅拌器中溶解均匀, 冷却至室温备用。

1.2.4 中心组合设计

根据单因素轮换试验结果得到的燕麦 β -葡聚糖、 γ -聚谷氨酸、甘露醇三个最优的添加量, 将这三个点作为中心组合设计的中心点进行试验设计, 以酵母冻干存活率为响应值, 确定酿酒酵母冷冻干燥保护剂的最优组合。试验因素水平见表 1。

表 1 中心优化组合试验变量和水平

Table 1 Test variables and levels of the centrally optimized

因素	水平				
	-1.68	-1	0	1	1.68
燕麦 β -葡聚糖/%	4.32	5.00	6.00	7.00	7.68
γ -聚谷氨酸/%	0.06	0.10	0.17	0.23	0.27
甘露醇/%	0.45	0.67	1.00	1.33	1.55

1.2.5 扫描电镜观察

扫描电镜样品的处理参考张嗣萍等^[17]的方法。

1.2.6 数据处理

每组试验均重复 3 次, 结果用 $X \pm SD$ 表示。试验数据全部采用 SPSS 16.0 软件进行显著性检验和单因素方差分析, 利用 Design-Expert 8.06 软件的 Central Composite Design 进行响应面设计与分析。

2 结果与分析

2.1 单因素轮换试验

2.1.1 燕麦 β -葡聚糖对酵母冻干存活率的影响

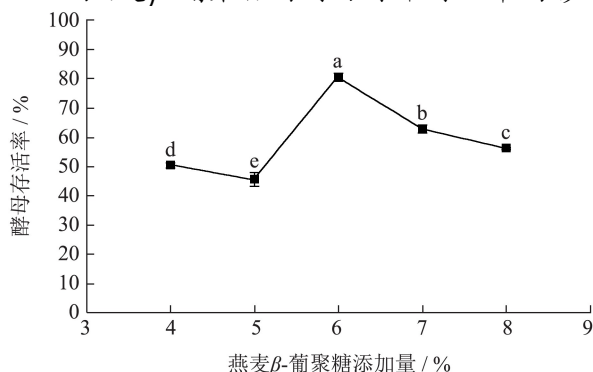


图 1 燕麦 β -葡聚糖添加量对酵母存活率的影响

Fig.1 Effect of oat β -glucan addition on yeast survival

在冷冻干燥过程中, 以氢键形式与蛋白质极性基

团连接的水分子逐渐被脱去, 导致蛋白质结构破坏, 功能失调; 但是含有多羟基结构的保护剂能够代替水分子的位置, 并以“水化膜”的形式包裹蛋白表面, 从而维持蛋白结构和功能^[18]。由表 1 可知, 随着燕麦 β -葡聚糖添加量的增大, 酵母细胞的冻干存活率呈现一个先上升后下降的趋势。当燕麦 β -葡聚糖添加量为 6% 时, 酵母细胞存活率达到最大, 为 80.57%。可能是因为燕麦 β -葡聚糖作为大分子化合物能够以“包裹”的方式来保护细胞也可能是大分子化合物在保护细胞的同时还可以促进小分子化合物对细胞作用效果^[19]。Crowe 等^[20]研究发现糖能够取代细胞膜表面的水分子, 从而避免干燥引起的细胞膜的有害相变。Desmond 等^[21]发现冻干 *Lactobacillus paracasei* NFBC338 时, 在脱脂乳保护剂基础上, 另外添加葡聚糖后菌体的贮藏稳定性较单独添加脱脂乳组显著改善。试验过程中, 我们发现浓度越高 β -葡聚糖 ($\geq 7\%$), 冷却时越易形成凝胶, 不利于后期操作和酵母的均匀分散, 也可能是此原因致使 β -葡聚糖浓度过高时酵母活菌数反而降低。

2.1.2 γ -聚谷氨酸对酵母冻干存活率的影响

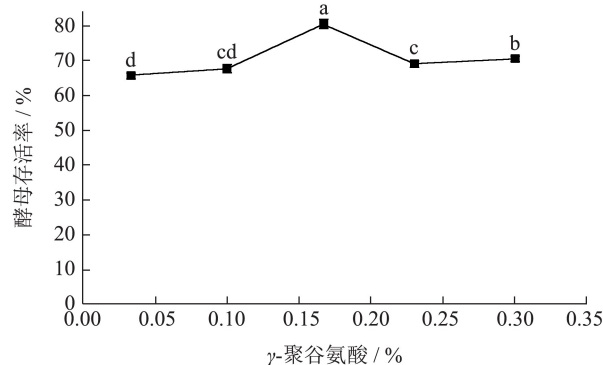


图 2 γ -聚谷氨酸添加量对酵母存活率的影响

Fig.2 Effect of γ -polyglutamic acid addition on yeast survival rate

由图 2 可知, 随着 γ -聚谷氨酸添加量的增大, 酵母细胞的冻干存活率呈现一个先上升后下降的趋势。当 γ -聚谷氨酸添加量为 0.13% 时, 酵母细胞存活率达到最大, 为 80.57%; 之后随着 γ -聚谷氨酸的添加量的升高, 酵母细胞冻干存活率呈现出一个先下降后趋于平缓的趋势。Bhat^[22]通过透射电镜观察得到 γ -聚谷氨酸作为冻干保护剂时, 可以将细胞包裹起来从而减少细胞受到冷冻干燥的损伤。

2.1.3 甘露醇对酵母冻干存活率的影响

甘露醇不仅可作为优良的骨架剂使用, 而且在一些保护剂配方中它能够兼作蛋白质的冻干保护剂^[23]。由图 3 可知, 随着甘露醇添加量的增大, 酵母细胞的冻干存活率呈现先显著上升, 后显著下降的趋势。当

甘露醇添加量为 1%时, 酵母冻干存活率达到最大, 为 87.18%, 并且随着甘露醇添加量的升高, 酵母细胞存活率呈现一个显著下降的趋势。可能是因为甘露醇对蛋白质的保护作用与其浓度、形态结构有关, 而浓度与结晶状态有时又有一定的关联性^[24]。Izutsu^[25]研究表明较低浓度(1%或更低)的甘露醇通过形成无定型结构来保护蛋白质免于聚集, 但在更高浓度下, 甘露醇通过形成晶体结构来增强蛋白质的聚集。无定型结构的甘露醇会促进蛋白质的稳定, 而高浓度的甘露醇形成的晶体结构对于蛋白质没有保护作用, 甚至还会促进水分子对细胞的破坏^[26]。因此当甘露醇浓度高于 1%时酵母细胞存活率呈现一个显著下降的趋势。

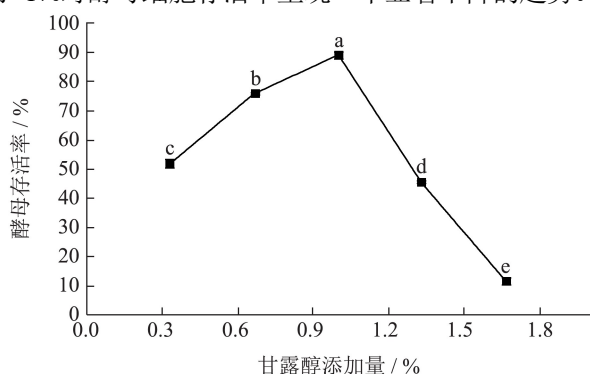


图3 甘露醇添加量对酵母存活率的影响

Fig.3 Effect of mannitol addition on yeast survival rate

2.2 酵母冷冻干燥保护剂的中心响应面优化

2.2.1 响应曲面试验设计及结果

根据单因素试验分析结果, 以燕麦 β -葡聚糖、 γ -聚谷氨酸、甘露醇添加量为因素, 由 Design-Expert 8.06 软件设计 3 因素 3 水平的 20 组响应面优化试验方案, 结果见表 2。

2.2.2 响应曲面二次回归模型的建立及显著性检验

采用中心响应面法 (CCD) 研究了燕麦 β -葡聚糖、 γ -聚谷氨酸、甘露醇水平对冷冻干燥后酵母细胞存活率的影响。这三个自变量的水平见表 1。根据表 2 可知, 共进行了 20 次不同组合试验。对试验数据进行多元回归分析, 用二次多项式方程表示冻干后酵母细胞的存活率:

$$Y = +85.01715 + 7.80538A - 3.23242B + 10.87749C + 0.98684AB + 0.45000AC + 1.34474BC - 7.02647A^2 - 6.78084B^2 - 12.29069C^2$$

式中:

Y——冻干酵母细胞存活率, %;

A——燕麦 β -葡聚糖;

B—— γ -聚谷氨酸;

C——甘露醇。

为了评估拟合的二次多项式模型的显著性和充分性, 由表 3 可知, $P_{model} > F$ 并小于 0.0001, 说明该模型非常显著, 表明建立的模型与试验数据相符。失拟项可以反应所建模型与试验的拟合程度, $p = 0.4584 > 0.05$, 不显著, 说明试验点均能用模型进行描述, 且上述拟合的二次回归方程能够很好地预测酵母冻干后的存活率。多项式模型的拟合优度可以通过决定系数 R^2 和相关系数 R 来检验。在这种情况下, 得到的 $R^2 = 0.9827$ 意味着只有 1.73% 的响应的可变性不能被模型解释。相关系数 $R = 0.9672$, 表明试验结果与预测结果吻合较好, 模型具有较高的意义。

表 2 Central Composite Design 响应曲面试验设计方案及结果

Table 2 Central Composite Design response surface test design

scheme and results				
序号	A/g	B/g	D/g	酵母存活率/%
1	5.00	0.10	0.67	44.57
2	7.00	0.10	0.67	56.07
3	5.00	0.23	0.67	33.89
4	7.00	0.23	0.67	50.26
5	5.00	0.10	1.33	65.23
6	7.00	0.10	1.33	79.45
7	5.00	0.23	1.33	60.85
8	7.00	0.23	1.33	78.11
9	4.32	0.17	1.00	51.61
10	7.68	0.17	1.00	79.71
11	6.00	0.06	1.00	72.87
12	6.00	0.27	1.00	59.83
13	6.00	0.17	0.45	35.99
14	6.00	0.17	1.55	65.55
15	6.00	0.17	1.00	85.78
16	6.00	0.17	1.00	83.61
17	6.00	0.17	1.00	87.05
18	6.00	0.17	1.00	86.96
19	6.00	0.17	1.00	87.18
20	6.00	0.17	1.00	79.35

2.3 响应面图及等高线图分析

响应面分析法不但能够分析各反应因素对目标值的影响, 还能对最佳反应条件进行预测优化。由图 4、图 5、图 6 显示了方程的三维响应面, 证实了拟合面有真实的最大值。当其中一种物质的浓度一定时, 酵母冻干存活率随着其他两种物质浓度的增加呈现先上升后降低的趋势, 说明响应曲面中存在极大值点, 即存在保护剂最佳浓度。通过软件计算得到方程的极值

点, 燕麦 β -葡聚糖添加量为 6.56%、 γ -聚谷氨酸添加量为 0.15%、甘露醇添加量为 1.15%, 此时通过响应

面优化模型预测得到平均存活率为 89.86%, 最大时可达 90.69%。

表 3 酵母存活率响应曲面二次回归模型方差分析结果

Table 3 Results of analysis of variance for yeast survival rate response surface quadratic regression model

来源	均方和	自由度	均方	F 值	P 值 Prob>F	显著性
Model	5102.99	9	567	63.18	<0.0001	**
A- β -葡聚糖	750.91	1	750.91	83.67	<0.0001	**
B- γ -聚谷氨酸	128.78	1	128.78	14.35	0.0036	**
C-甘露醇	1458.33	1	1458.33	162.49	<0.0001	**
AB	7.03	1	7.03	0.78	0.3969	
AC	1.46	1	1.46	0.16	0.695	
BC	13.06	1	13.06	1.45	0.2555	
A ²	642.13	1	642.13	71.55	<0.0001	**
B ²	598.02	1	598.02	66.63	<0.0001	**
C ²	1964.73	1	1964.73	218.92	<0.0001	**
Residual	89.75	10	8.97			
Lack of Fit	47.07	5	9.41	1.1	0.4584	not significant
Pure Error	42.67	5	8.53			
Cor Total	5192.73	19				
R-Squared	0.9827					
Adj R-Squared	0.9672					
Pred R-Squared	0.9192					
C.V%	4.69					

注: *表示显著 ($p < 0.05$); **表示极显著 ($p < 0.01$)。

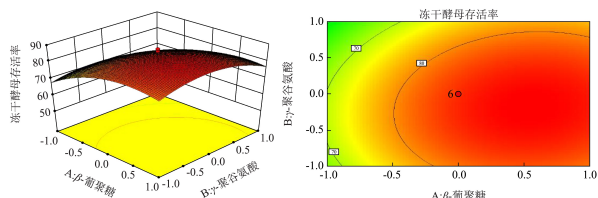


图 4 燕麦 β -葡聚糖和 γ -聚谷氨酸对酵母存活率影响的响应面图

Fig.4 Response surface plot of oat β -glucan and γ -polyglutamic acid on yeast survival

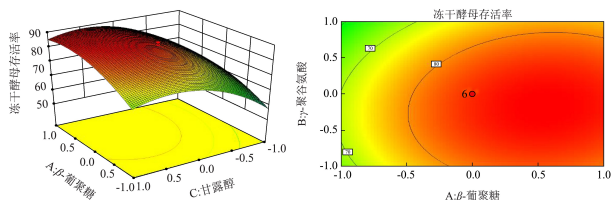


图 5 燕麦 β -葡聚糖和甘露醇对酵母存活率影响的响应面图

Fig.5 Response surface plot of the effect of oat β -glucan and mannitol on yeast survival

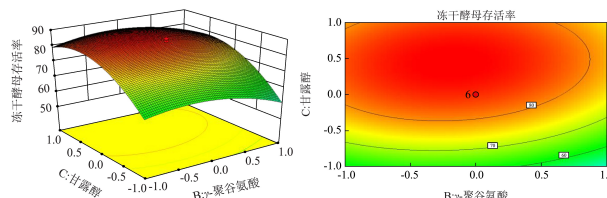


图 6 γ -聚谷氨酸和甘露醇对酵母存活率影响的响应面图

Fig.6 Response surface plot of the effects of γ -polyglutamic acid and mannitol on yeast survival

2.4 燕麦 β -葡聚糖复合保护剂对菌体形态的影响

利用扫描电镜对冷冻干燥后酵母细胞形态进行研究, 由图 7a 可知, 未添加燕麦 β -葡聚糖复合保护剂部分酵母细胞出现较多的褶皱、破裂现象, 说明在冷冻和冷冻干燥过程中会损伤酵母细胞。由图 7b, 在添加燕麦 β -葡聚糖复合保护剂后, 未发现酵母细胞出现

褶皱、破裂的现象,说明燕麦 β -葡聚糖复合保护剂的添加可以维持酵母细胞结构不被冷冻和冷冻干燥破坏,并且维持复水过程中酵母细胞结构的稳定性。

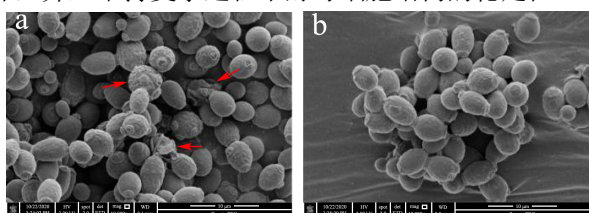


图7 酵母菌冻干后菌细胞形态

Fig.7 Yeast cell morphology after freeze-drying

注: a: CK; b: 酵母细胞添加燕麦 β -葡聚糖复合保护剂后冻干。

3 结论

本研究通过中心优化响应面法优化了以燕麦 β -葡聚糖为主的酿酒酵母细胞冷冻干燥保护剂配方,首先通过单因素试验逼近最大响应区域,最后通过中心响应面优化试验拟合出一个三元二次多项式方程,得到最佳配方:燕麦 β -葡聚糖 6.56%、 γ -聚谷氨酸 0.15%、甘露醇 1.15%,酵母冻干存活率达到最高,为 90.69%,与理论预测值酵母存活率 89.86%接近。通过对酿酒酵母的冻干保护剂配方的优化,可以为酿酒酵母冻干保护研究提供理论参考,该配方酵母细胞存活率可达 90.69%,具有较高的市场应用价值。

参考文献

- [1] 赵欠,王巧碧,周才琼.酿酒酵母相关营养成分的研究及应用进展[J].中国酿造,2015,34(6):15-18
ZHAO Qian, WANG Qiaobi, ZHOU Caiqiong. Application research status on the nutritional and functional compositions in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. China Brewing, 2015, 34(6): 15-18
- [2] 魏春雨,朱道洋,上官修蕾,等.不同酿酒酵母对黑果腺肋花楸酒成分的影响[J].食品与发酵工业,2021,47(12):182-188
WEI Chunyu, ZHU Daoyang, SHANGGUAN Xiulei, et al. Effect of different *Saccharomyces cerevisiae* strains on the composition of *Aronia melanocarpa* wine [J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(12): 182-188
- [3] Kumar M, Kumar C V, Deepak A, et al. Life cycle assessment (LCA) of dairy processing industry: a case study of north India [J]. Journal of Cleaner Production, 2021, 326: 129331
- [4] Reese A T, Madden A A, Joossens M, et al. Influences of ingredients and bakers on the bacteria and fungi in sourdough starters and bread [J]. mSphere, 2020, 5(1): e00950-19
- [5] Hittinger C T, Steele J L, Ryder D S. Diverse yeasts for diverse fermented beverages and foods - Science Direct [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2018, 49: 199-206
- [6] Jouki M, Khazaei N, Rezaei F, et al. Production of synbiotic freeze-dried yoghurt powder using microencapsulation and cryopreservation of *L. plantarum* in alginate-skim milk microcapsules [J]. International Dairy Journal, 2021, 122: 105133
- [7] 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 Jiahao, LEI Wenping, LIU Chengguo, et al. Preparation of *Lactobacillus casei* LZ183E lyoprotectant with high viable cell count [J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(24): 138-143
- [8] Holm T P, Meng-Lund H, Rantanen J, et al. Screening of novel excipients for freeze-dried protein formulations [J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2021, 160(5): 55-64
- [9] 宋志远.果蔬生防酵母菌株的筛选与应用初步研究[D].天津:天津科技大学,2016
SONG Zhiyuan. Preliminary study on screening and application of yeast strain for fruit and vegetable [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2016
- [10] 周秋阳,杨慧慧,王玲,等.一株桃褐腐病生防酵母菌活性冻干粉制备及保鲜应用[J].食品工业科技,2019,40(21):96-103
ZHOU Qiuyang, YANG Huihui, WANG Ling, et al. Preparation and preservation application of a yeast active freeze-dried powder for biocontrol of peach brown rot [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(21): 96-103
- [11] 王华,贺金梅.中心组合设计优化热带假丝酵母菌冷冻干燥保护剂[J].食品科学.2013,1:244-247
WANG Hua, HE Jinmei. Optimization of cryoprotectant formulation for *Candida tropicalis* by central composite design [J]. Food Science, 2013, 1: 244-247
- [12] Han P, Ni L, Wei Y, et al. Optimization of the freeze-drying of marine yeast *Sporidiobolus parosaeus* ZMY-1 for its application in biocontrol of fungal infections [J]. Biological Control, 2021, 3: 104707
- [13] H Zhang, Deng L, Yao S, et al. Optimization of a vacuum-drying protectants for the biocontrol agent *Pichia membranifaciens* and its influence on viability and efficacy [J]. Biological Control, 2019, 142(3): 104155
- [14] 蔡孟轩,邓丽莉,姚世响,等.真空冷冻干燥橄榄假丝酵母的制备及其对苹果青霉病的防治[J].食品科学,2018,39(22):153-158

- CAI Mengxuan, DENG Lili, YAO Shixiang. Formulation optimization of a cryoprotectant for freeze-dried *Candida oleophila* and its application to control blue mold in apple [J]. Food Science, 2018, 39(22): 153-158
- [15] 邵明倩. 畜禽微生态制剂布拉氏酵母菌的制备研究[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2014
- SHAO Mingqian. Study on probiotics of *Saccharomyces boulardii* in the aspect of livestock [D]. Jinan: Qilu University of Technology, 2014
- [16] Smart K A, Chambers K M, Lambert I, et al. Use of methylene violet staining procedures to determine yeast viability and vitality [J]. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 1999, 57(1): 18-23
- [17] 张嗣萍, 贾楠楠, 王红兵, 等. 一株新型鱼腥藻溶藻细菌的分离鉴定及其溶藻特性[J]. 湖泊科学, 2018, 30(5): 1343-1350
- ZHANG Siping, JIA Nannan, WANG Hongbing, et al. Isolation and algicidal characteristics of one novel algicidal bacterium on *Anabaena eucompacta* [J]. Journal of Lake Sciences, 2018, 30(5): 1343-1350
- [18] 苏萍. 菊粉复合保护剂对乳酸菌的冻干保护及其作用机制研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2014
- SU Ping. Study on mechanisms and protective effect of inulin complex protectant on freeze-dried lactic acid bacterium [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2014
- [19] 谭欢, 周传云. 制备浓缩型乳酸菌发酵剂的研究进展[J]. 现代食品科技, 2005, 21(4): 112-114
- TAN Huan, ZHOU Chuanyun. Review of producing concentrated lactic acid starter [J]. Modern Food Science and Technology, 2005, 21(4): 112-114
- [20] Crowe J H, Carpenter J F, Crowe L M. The role of vitrification in anhydrobiosis [J]. Annual Review of Physiology, 2003, 60(1): 73-103
- [21] Desmond C, Corcoran B M, Coakley M, et al. Development of dairy-based functional foods containing probiotics and prebiotics [J]. Aust J Dairy Technol, 2005, 60(2): 121-126
- [22] Bhat A R, Irerere V U, Bartlett T, et al. *Bacillus subtilis natto*: a non-toxic source of poly- γ -glutamic acid that could be used as a cryoprotectant for probiotic bacteria [J]. Amb Express, 2013, 3(1): 36
- [23] Souillac P O, Middaugh C R, Rytting J H. Investigation of protein/carbohydrate interactions in the dried state. 2. Diffuse reflectance FTIR studies [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2002, 235(1-2): 207
- [24] 张菊, 张志焱, 李金敏, 等. 乳酸链球菌冻干保护剂的筛选和优化[J]. 中国酿造, 2012, 31(6): 147-150
- ZHANG Ju, ZHANG Zhiyan, LI Jinmin, et al. Selection and optimization of the cryoprotectants for *Streptococcus lactis* [J]. China Brewing, 2012, 31(6): 147-150
- [25] Izutsu K I, Yoshioka S, Terao T. Decreased protein-stabilizing effects of cryoprotectants due to crystallization [J]. Pharmaceutical Research, 1993, 10(8): 1232-1237
- [26] Wu S L, Leung D M, Tretyakov L, et al. The formation and mechanism of multimerization in a freeze-dried peptide [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2000, 200(1): 1-16
-
- (上接第 54 页)
- [23] 杨小慧. 白酒窖池中益生性乳酸菌的分离筛选及其胞外多糖生物活性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2018
- YANG Xiaohui. Isolation and screening of probiotic lactic acid bacteria in liquor pit and study on the exopolysaccharides biological activity [D]. Huhehot: Inner Mongolia University, 2018
- [24] 王欢. 植物乳杆菌降胆固醇作用的研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2010
- WANG Huan. Study on cholesterol lowering effect of *Lactobacillus plantarum* [D]. Harbin: Heilongjiang University, 2010
- [25] 王今雨, 满朝新, 杨相宜, 等. 植物乳杆菌 NDC 75017 的降胆固醇作用[J]. 食品科学, 2013, 34(3): 243-247
- WANG Jinyu, MAN Chaoxin, YANG Xiangyi, et al. Effects of *Lactobacillus plantarum* NDC 75017 on cholesterol lowering [J]. Food Science, 2013, 34(3): 243-247
- [26] 卢海鹏. 传统酸马奶乳酸菌的鉴定及降胆固醇作用[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018
- LU Haipeng. Identification and cholesterol-lowering effect of lactic acid bacteria in traditional sour horse milk [D]. Huhehot: Inner Mongolia Agricultural University, 2018