

热休克处理对直投式乳酸菌发酵剂在不同 贮存温度下存活率的影响

甄妮^{1,2}, 王晓萌^{1,2}, 叶聪艳^{1,2}, 孔令尉^{1,2}, 曾小群^{1,2*}, 潘道东^{1,2}, 廉立伟³

(1. 宁波大学 食品与药学学院, 浙江 宁波 315832;

2. 浙江省动物蛋白食品精深加工技术重点实验室, 浙江 宁波 315832; 3. 宁波牛奶集团有限公司, 浙江 宁波 315033)

摘要: 以嗜酸乳杆菌为代表菌种, 利用快速保质期试验法, 研究热休克处理结合冻干保护剂对直投式乳酸菌发酵剂在不同贮存温度下存活率的影响, 以筛选出存活率最高的冻干保护剂, 并确定冻干后菌粉半致死时间最长的贮存温度。结果表明: 乳酸菌在冷冻干燥前进行热休克预处理, 冻存期间存活率显著高于未进行热休克处理的对照组; 冻干保护剂效果由高到低依次为: 10%脱脂乳>10%葡萄糖>水; 贮存温度降低, 乳酸菌半致死时间延长。最后获得直投式发酵剂贮存期间存活率最高的实验条件为: 嗜酸乳杆菌经 46℃处理 30 min 后, 加入 10%葡萄糖、2.5%甘油、1.5%山梨糖醇以及 10%脱脂乳为冻干保护剂。冻干后菌粉于-20℃冻存 121 d 后存活率达 88.48%, 与以水为冻干保护剂, 且未加热休克处理的对照组相比, 冻干存活率提高了 30.69%。

关键词: 热休克; 嗜酸乳杆菌; 冻干保护剂; 存活率; 快速保质期试验法; 半致死时间

中图分类号: TS252.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2019) 06-0049-07

嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*, LA)是乳酸菌发酵剂的重要菌种之一, 被广泛用于食品和药品行业, 具有良好的发酵性能和维持宿主肠道微生态平衡、增强消化能力、增强免疫力、防癌抗癌等益生特性^[1-2]。制备乳酸菌发酵剂是生产发酵制品的核心技术, 发酵剂质量直接关系到产品的质量^[3]。发酵剂可分为天然发酵剂、普通发酵剂、冷冻浓缩发酵剂和直投式发酵剂^[4]。直投式发酵剂因易于保藏、生产周期短、菌种活性高、操作简便等优点被广泛应用于企业生产中^[5]。

直投式发酵剂干粉常采用真空冷冻干燥法对浓缩后的菌液进行处理, 从而制备菌粉。将乳酸菌细胞悬浮液冻结后, 提高真空度使冰晶在低温条件下升华变成冻干粉状态^[6-7]。发酵剂菌体能较好地保持活力和原来性状, 延长发酵剂保存时间。但冷冻干燥会对菌体细胞造成不同程度的损伤, 主要表现在: (1)菌体细胞内形成冰晶, 造成机械刺伤

和溶质^[8-9]; (2)细胞膜完整性及流动性改变^[10]; (3)细胞中关键蛋白变性; (4)代谢反应过程中酶活性影响^[11]。冻干后发酵剂的存活率对其发酵性能至关重要。

为提高菌株冻干存活率, 常在冻干前加入冻干保护剂。主要有: 脱脂乳、无机盐类(如乙酸钠)、醇类(如山梨醇)、氨基酸类(如 L-半胱氨酸)和糖类(如海藻糖、蔗糖)等^[12-13]。王燕等^[14]研究发现, 添加成分为 14%脱脂乳粉、6%海藻糖、4%甘油的保护剂对瑞士乳杆菌及鼠李糖乳杆菌的冻干保护效果显著。任香芸等^[15]研究发现, 添加 2.5%甘油、1.0%谷氨酸钠、2.2%苹果酸钠、1.0%海藻糖、1.0%山梨醇组成的混合配方对植物乳杆菌 R23 的冻干具有良好的保护效果, 细胞存活率达 95.3%。前期研究还表明, 在冻干前进行热休克处理具有一定的冻干保护效果, 如王慧君等^[16]将嗜酸乳杆菌在冷冻干燥处理前于 46℃热休克处理 30 min, 在未

收稿日期: 2019-04-14.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家自然科学基金(41406165, 41641052); 浙江省公益技术研究计划(LGN19C200011); 浙江省教育厅科研项目(Y201941438)。

第一作者: 甄妮(1995-), 女, 河北新乐人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 食品微生物。E-mail: zhenni1167@163.com

*通信作者: 曾小群(1982-), 女, 四川仁寿人, 博士/副教授, 主要研究方向: 发酵食品加工。E-mail: zxqun3447@126.com

加冻干保护剂情况下,发现处理组存活率较对照组提高了 50.66%。热休克处理可引起微生物产生应激反应,提高微生物对低温、干燥等恶劣环境的抵御能力,增强细胞对自身环境的适应性^[17-18]。

加速货架期试验法(Accelerated Shelf-Life Testing, ASLT)常用于对商业化商品保质期的预测,也可用于对冻干贮存期间存活率及稳定性的研究。但制备的直投式菌粉的冻干保护剂配方及其保护效果的适宜温度未知^[19-22]。

本文以嗜酸乳杆菌 ATCC 4356 (*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356)作为实验菌株,制备直投式发酵剂。冻干保护剂添加参照实验室前人优化冻干保护剂配方,利用 ASLT 法结合热休克处理手段对嗜酸乳杆菌粉在不同温度贮存下半致死时间进行研究,进一步确定嗜酸乳杆菌保存的最佳条件,以期制备高活性商业式发酵剂提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

嗜酸乳杆菌 ATCC 4356,保存于宁波大学食品与药学院畜产品加工实验室;MRS 肉汤培养基、MRS 琼脂培养基购于杭州微生物试剂有限公司;伊利脱脂乳粉购于内蒙古伊利实业集团股份有限公司;葡萄糖、海藻糖、山梨糖醇购于索来宝生物科技有限公司;甘油购于国药集团化学试剂有限公司;以上试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

DKS-26 电热恒温水浴锅(宁波江南仪器厂);PL403 电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);LDZX-50 KB 立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂);H2050R-2 离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);JB090312-02 净化工作台(苏州华科净化设备有限公司);SPX-150 恒温培养箱(常州华冠仪器制造有限公司);LGJ-10 普通实验型真空冷冻干燥机(北京松源华兴科技发展有限公司);DW-86L828J -80℃超低温保存箱、DW-40L188 -40℃低温保存箱、HYC-360 2~8℃医用冷藏箱(杭州诺丁科学器材有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 技术流程

嗜酸乳杆菌活化与培养→计活菌数→热休克

处理(46℃, 30 min)→离心→加入不同冻干保护剂→预冻→冷冻干燥→不同条件贮存(37、25、4、-20℃)→复水涂布→计活菌数。

1.3.2 菌种活化与扩大

将冻存于-80℃甘油管中嗜酸乳杆菌菌液,以2%接种量接入MRS液体肉汤培养基中,37℃过夜活化培养,得到新一代的种子液。将活化后的种子液按2%接种量接种到灭菌后的MRS液体肉汤培养基中,37℃培养18h,得到扩大后菌液。

1.3.3 不同预处理及冻干保护剂条件下冷冻干燥制备菌粉

将发酵液按照是否经热休克及添加不同的冻干保护剂进行处理,处理条件见表1。表1中A₁、B₁、C₁为添加不同冻干保护剂进行热休克处理的实验组;A₀、B₀、C₀为相同冻干保护剂下,未进行热休克处理的对照组。

表1 不同处理条件下制备菌粉

组别	有无热休克处理	冻干保护剂
A ₁	+	水
A ₀	-	水
B ₁	+	10%葡萄糖
B ₀	-	10%葡萄糖
C ₁	+	10%葡萄糖、2.5%甘油、 1.5%山梨糖醇和 10%脱脂乳
C ₀	-	10%葡萄糖、2.5%甘油、 1.5%山梨糖醇和 10%脱脂乳

注:以上操作在超净工作台进行,保证整个过程没有其他菌污染。

将实验组 A₁、B₁、C₁ 扩大后的菌液取同等体积置于离心管中,46℃恒温水浴锅中热休克处理30 min;对照组 A₀、B₀、C₀ 置于4℃暂存30 min。再于4℃,5 000 r·min⁻¹离心10 min,弃上清。沉淀用无菌生理盐水洗涤,并离心收集菌体。A₁、A₀离心管中加水为冻干保护剂,B₁、B₀离心管中加10%葡萄糖为冻干保护剂,C₁、C₀离心管中加复合保护剂(10%葡萄糖、2.5%甘油、1.5%山梨糖醇、10%脱脂乳)。将不同处理的各组放入-80℃冰箱中,过夜预冻。将预冻好的样品,置于冷冻干燥机中冷冻干燥24 h(真空度9 Pa,冷凝温度-49℃),制备菌粉,并计算菌粉在不同处理条件下的冻干存活率。

1.3.4 菌粉冻干存活率的计算

将冷冻干燥前后的各菌粉样品在0.9%NaCl溶

液中复水,逐级稀释后,取3个稀释梯度菌液涂MRS琼脂平板.于37℃恒温培养48h后,采取平板计数法计算活菌数^[19].根据冻干前后的活菌数量,按以下公式计算菌粉的冻干存活率.

$$R=S_1/S_2\times 100\%, \quad (1)$$

式中: R 为冻干存活率,%; S_1 为冻干后单位体积样品活菌数,CFU·mL⁻¹; S_2 为冻干前单位体积样品活菌数,CFU·mL⁻¹.

1.3.5 ASLT 法测试菌粉的最佳贮存温度

采用ASLT法研究不同温度条件下商品品质的变化,计算乳酸菌菌粉在不同贮存温度下的半致死率,从而预测其活性与实际贮存环境之间的关系.

将获得的冻干存活率最高的菌粉样品分别贮存于37、25、4、-20℃,采用菌粉冻干存活率的计算方法,测定菌粉贮存期间的存活率.37℃每隔3d测定1次乳酸菌的数量,25℃每隔7d测定1次乳酸菌的数量,4℃每隔15d测定1次乳酸菌的数量,-20℃每隔20d测定1次乳酸菌的数量.活菌致死率计算公式为:

$$V=dA/dt=KA^n, \quad (2)$$

式中: V 为活菌致死率; A 为致死标准浓度; t 为贮存时间; K 为致死速率常数; n 为致死反应顺序.

1.4 数据分析

每个试验重复3次,所得实验数据采用SPSS 21 软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),使用Duncan's Multiple Range Test 进行多组样本间显著性差异分析,使用独立样本 T 检验,进行2组样本间显著性分析.差异显著水平设置为 $P<0.05$.

2 结果与分析

2.1 热休克处理对菌粉存活率的影响

通过对测定结果的分析,选取2组数据进行对比,阐述热休克处理对菌粉存活率的影响.由于贮存条件不同,所以选择不同温度下首次测定值计算嗜酸乳杆菌的存活率.经热休克处理后试验组菌株的存活率在不同温度下贮存均高于未经热休克处理的对照组(图1).从图1(a)可知,添加水作为冻干保护剂,经热休克处理的试验组,在25、-20℃条件下贮存时间分别为7、20d时,菌粉复水后的存活率分别为74.34%和86.57%,显著高于未经热休克处理的对照组($P<0.05$).从图1(b)可知,

4℃条件下贮存15d时,热休克+复合配方试验组,存活率可达86.57%,与对照组之间存在极显著差异($P<0.01$),存活率高于对照组7.19%.-20℃条件下贮存20d,热休克+复合配方试验组存活率可达97.12%,高于对照组6.47%,表明冷冻干燥时热休克预处理对菌株具有一定的保护作用.而在37℃条件下贮存,试验组与对照组之间无显著性差异($P<0.05$),其原因可能为37℃条件下贮存温度较高,菌株生长代谢旺盛,导致其自身营养消耗殆尽而死亡,故差异性不大.

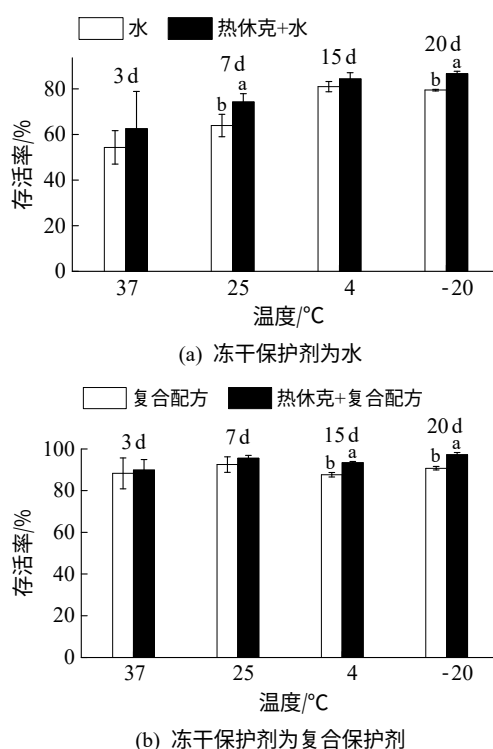
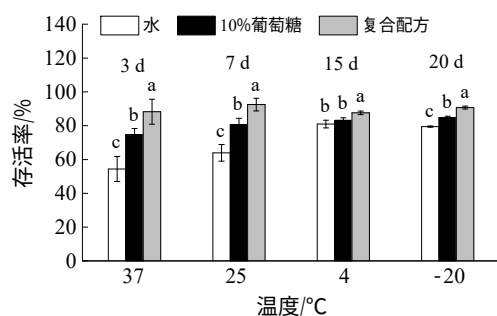


图1 菌粉在不同温度下贮存不同时间的存活率

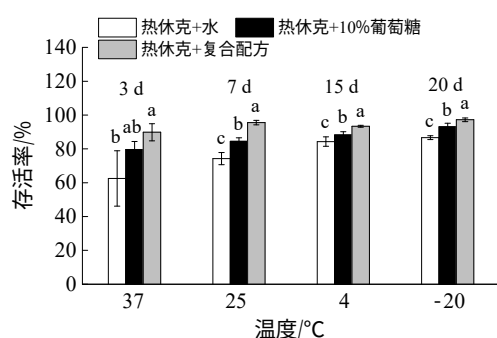
2.2 不同冻干保护剂对菌粉存活率的影响

不同温度下3种冻干保护剂对菌粉存活率的影响如图2所示.冻干前,添加不同冻干保护剂,以确定最佳的冻干保护条件.由图2可知,3种不同冻干保护剂对嗜酸乳杆菌冻干保护效果依次为:以1.5%山梨糖醇、10%葡萄糖、2.5%甘油、10%脱脂乳组成的复合配方>10%葡萄糖>水.经相同条件处理后以复合配方的冻干保护剂保护效果最佳,且在不同的温度下,不同冻干保护剂与菌粉存活率之间均存在显著性差异($P<0.05$).对照组中添加复合配方的冻干保护剂,贮存条件为37℃(3d)、25℃(7d)、4℃(15d)、-20℃(20d),存活率依次为

88.25%、92.57%、87.53%、90.65%。试验组中添加复合配方的冻干保护剂, 贮存条件为 37℃(3 d)、25℃(7 d)、4℃(15 d)、-20℃(20 d), 存活率依次为 89.69%、95.44%、93.29%、97.12%。



(a) 未经热休克处理



(b) 热休克处理

图2 不同温度下3种冻干保护剂对菌粉存活率的影响

2.3 不同条件处理的嗜酸乳杆菌在不同贮存温度下的存活率

不同条件处理的嗜酸乳杆菌在不同贮存温度下的存活情况如图3所示。不同条件处理后, 菌株存活率在 37、25、4、-20℃贮存条件下变化趋势一致。按菌体的冻干存活率大小排列次序为热休克处理+复合配方>复合配方>热休克处理+10%葡萄糖>10%葡萄糖>热休克处理+水>水。在 37℃条件下贮存 24 d 时, 菌株基本无活性存在。25℃条件下贮存, 计算半致死由长到短依次为热休克处理+复合配方(50 d)、复合配方(43 d)、热休克处理+10%葡萄糖(40 d)、10%葡萄糖(30 d)、热休克处理+水(22 d)、水(15 d)。当贮存 50 d 时, 热休克处理+复合配方的试验组存活率最高, 可达 51.32%。4℃条件下贮存, 计算半致死由长到短依次为热休克处理+复合配方(115 d)、复合配方(103 d)、热休克处理+10%葡萄糖(85 d)、10%葡萄糖(73 d)、热休克处理+水(69 d)、水(58 d)。-20℃条件下贮存 121 d 时, 热

休克处理+复合配方的试验组的菌株存活率高达 88.48%, 比对照组存活率提高了 30.69%。随着贮存温度的降低, 菌株死亡率逐渐下降。低温环境对菌株的生长有一定的抑制作用, 减缓菌株代谢进程, 能够更好地保存菌株活力。计算嗜酸乳杆菌菌粉在不同温度下贮存的半致死时间可以得到, 以水为冻干保护剂的菌粉冻干后于 37℃下贮存, 菌体半致死时间最短。经热休克处理, 添加以 1.5% 山梨糖醇、10%葡萄糖、2.5%甘油、10%脱脂乳为复合配方的菌粉冻干后于-20℃贮存, 半致死时间最长。

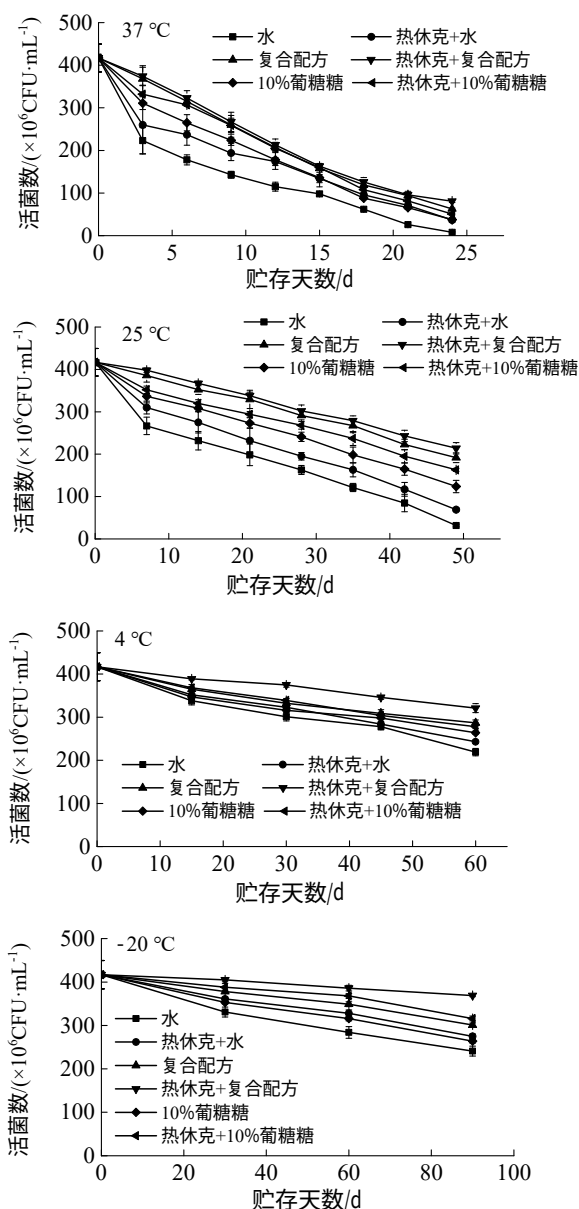


图3 不同贮存温度及不同处理的乳酸菌存活情况

2.4 不同贮存温度下反应速率常数确定

通过计算不同贮存温度下贮存时间与 $\ln(N/N_0)$ 的比值, 确定反应速率常数 K , 从 K 值可以确定半致死时间(对应半数初始种群死亡所需的时间($N/N_0=0.5$)). 不同贮存温度下 K 值确定见表 2.

表 2 不同贮存温度下反应速率常数确定

温度/°C	反应条件					
	A ₀	A ₁	B ₀	B ₁	C ₀	C ₁
37	0.869 2	0.931 0	0.977 6	0.990 7	0.966 2	0.969 2
25	0.869 2	0.931 0	0.977 6	0.990 7	0.966 2	0.969 2
4	0.943 9	0.984 2	0.995 5	0.977 8	0.983 1	0.997 3
-20	0.999 6	0.971 7	0.971 0	0.999 7	0.981 5	0.927 5

注: A₀ 为水; A₁ 为热休克+水; B₀ 为复合配方; B₁ 为热休克+复合配方; C₀ 为 10%葡萄糖; C₁ 为热休克+10%葡萄糖.

激活能量可根据表 2 反应速率常数确定. 激活能量的大小表明储存温度对储存期间菌株存活率损失的指数影响. 激活能量越高, 菌株存活率对温度变化越敏感. 半致死率可代入式(1)计算初始种群半致死所需时间, 以此确定嗜酸乳杆菌贮存的最佳条件.

2.5 不同温度下不同处理的乳酸菌半致死时间

在不同温度条件下, 通过对乳酸菌贮存情况分析, 确定了以水作为冻干保护剂未经过热休克处理、以水为冻干保护剂并且经过热休克处理、以复合配方为冻干保护剂未经过热休克处理、以复合配方为冻干保护剂并且经过热休克处理、以 10%葡萄糖作为冻干保护剂未经过热休克处理、以 10%葡萄糖作为冻干保护剂并且经过热休克处理这 6 种不同处理方法, 在 4 种不同温度下, 计算乳酸菌的半致死时间, 结果如图 4 所示.

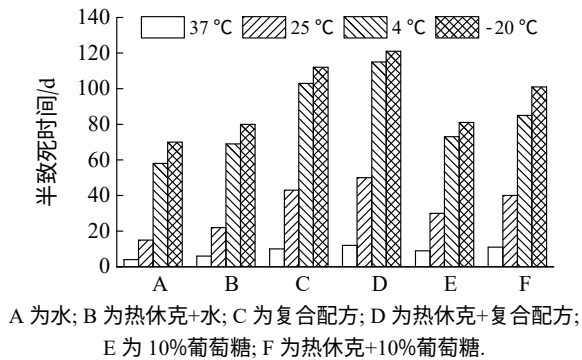


图 4 不同温度下不同处理的乳酸菌半致死时间
从图 4 可知, 经不同条件处理的结果趋势相同.

随着贮存温度降低, 乳酸菌的半致死时间延长. 半致死时间由长到短依次为在 -20、4、25、37 °C 时. 冻干前, 经热休克处理的实验组在不同温度下贮存的半致死时间大于未经热休克处理的对照组.

通过对比在相同温度下, 分别以水、10%葡萄糖、复合配方为冻干保护剂, 未经过热休克处理的乳酸菌贮存的半致死时间, 得到复合配方的保存效果好于 10%葡萄糖好于水. 通过对比相同温度下热休克处理+水、热休克处理+复合配方、热休克处理+10%葡萄糖这 3 种经过热休克处理的乳酸菌保存的半致死时间, 得到热休克处理+复合配方的保存效果好于热休克处理+10%葡萄糖好于热休克处理+水.

3 讨论与结论

试验组嗜酸乳杆菌经热休克处理与未进行热休克处理的对照组相比, 嗜酸乳杆菌的冻干存活率均有不同程度的提高. 表明经热休克处理后, 乳酸菌抗冷冻干燥胁迫能力增强, 这与 DnaK、GroEL、ClpX 这 3 种应激蛋白的上调有关^[23], 也与热休克蛋白(Heat Shock Protein, HSP)合成有关^[24]. HSP 具有稳定大分子和增强疏水性的作用, 可增加菌株对环境突变的抵御能力^[25]. 此外, 在热冲击或冲击之后, 热休克处理对乳酸菌细胞壁脂肪组成也有一定的影响. 热休克处理后, 脂肪酸膜的不饱和脂肪酸含量增加, 具有保护细胞的功能^[26].

对比添加的 3 种不同保护剂的抗冻干效果, 以 10%脱脂乳、1.5%山梨糖醇、10%葡萄糖、2.5%甘油组成的复合冻干保护剂最好, 大于其余 2 种单一保护剂, 这与袁亚宏等^[27]结论一致. 冻干保护剂可分 2 类: 一类以渗透保护剂和半渗透保护剂为主的小分子物质, 另一类以脱脂乳粉、明胶、淀粉、乳清蛋白等大分子物质. 由于不同的保护剂对细胞作用部位不同, 所以冻干保护剂一般都是按一定配方混合使用效果较好^[25]. 同时, 保护剂发挥保护作用与其结构密不可分, 如低分子糖、醇, 结构具有多个羟基, 可与细胞表面的自由基联结, 使得细胞表面形成一层保护层, 避免其直接暴露于外界^[26]. 保护剂表面的羟基还可以与细胞表面的蛋白质形成氢键以取代水, 增强细胞蛋白质的稳定性. 另外还可作为支持物和受体在复水过程中为

干物质提供一定的骨架结构,起到保护活细胞的作用。

温度是影响冻干菌粉活力的重要因素,对细菌的存活具有显著的影响。Ziadi 等^[28]在对乳球菌 SLT6T 贮藏稳定性研究中也证实,随着贮藏温度的升高,培养物的死亡率在贮藏期间也会增加。Achour 等^[22]使用 ASLT 法评估 2 种冻干菌株(乳酸乳球菌变种二乙酰乳酸菌和乳酸乳球菌)在 4℃下半致死时间约 43 d,而在 25℃的菌株平均半致死时间约 7 d。随着贮存温度的不断降低,微生物生理代谢活动降低,生长速度减缓,或进入休眠状态,从而延缓了细菌的死亡过程。因此随着贮存温度的降低,菌体半致死时间延长。据此推测,低于 -20℃进行贮存时,贮存效果更好,但是考虑到生产实际及成本,本文采用 37、25、4、-20℃4 种温度进行研究^[29]。

本实验通过比较嗜酸乳杆菌在不同冻干保护剂和有热休克处理的条件下,在 37、25、4、-20℃贮存后对其存活率的影响,得到嗜酸乳杆菌最佳保存条件是以 10%脱脂乳、1.5%山梨糖醇、10%葡萄糖、2.5%甘油为配方的复合冻干保护剂,冻干后活菌数可达 4.17×10^8 CFU·mL⁻¹,于 -20℃贮存 121 d 后活菌数为 3.69×10^8 CFU·mL⁻¹,存活率达 88.48%,比对照组存活率提高了 30.69%。使用 ASLT 法确定了嗜酸乳杆菌菌粉贮存的最佳条件,为制备高活性直投式发酵剂提供了新思路,同时为工业化益生菌冻干菌粉制备提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 程艳薇,刘春梅,谭书明,等.嗜酸乳杆菌菌粉的加工技术研究[J].食品科技,2010(9):46-50.
- [2] 钟志宏,李启星,唐小异,等.甘油保存菌种方法的改良[J].实用预防医学,2005,12(3):670-671.
- [3] 何亚婷,曾小群,彭刘杨,等.热休克预处理结合保护剂对嗜酸乳杆菌的冻干保护作用[J].中国食品学报,2018,18(7):122-128.
- [4] 刘继业.直投式乳酸菌发酵剂制备技术的研究及其应用[D].泰安:山东农业大学,2017.
- [5] 杨洋,高航.国内直投式乳酸菌发酵剂研究进展[J].中国奶牛,2016,314(6):44-47.
- [6] 刘彩虹,邵玉宇,任艳,等.高密度发酵和真空冷冻干燥工艺对乳酸菌抗冷冻性的影响[J].微生物学通报,2013,40(3):492-499.
- [7] Sadikoglu H, Liapis A I. Mathematical modelling of the primary and secondary drying stages of bulk solution freeze-drying in trays: Parameter estimation and model discrimination by comparison of theoretical results with experimental data[J]. Drying Technology, 1997, 15(3/4): 791-810.
- [8] 蒲丽丽,刘宁,张英华,等.乳酸菌冻干保护剂及保护机理的研究进展[J].中国乳业,2005(6):50-52.
- [9] 曾小群,潘道东,包红燕,等.干酪乳杆菌冻干保护剂研究[J].中国食品学报,2013,13(1):44-50.
- [10] Cui S, Hang F, Liu X, et al. Effect of acids produced from carbohydrate metabolism in cryoprotectants on the viability of freeze-dried *Lactobacillus* and prediction of optimal initial cell concentration[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2018, 125(5):513-518.
- [11] 华晓曼,贾冬梅,王雨珊,等.发酵乳制品直投式发酵剂生产现状与研究进展[J].中国乳品工业,2016,44(7): 23-27.
- [12] Pyar H, Peh K K. Effect of cryoprotective agents on survival and stability of *Lactobacillus acidophilus* cultured in food-grade medium[J]. International Journal of Dairy Technology, 2011, 64(4):578-584.
- [13] 徐丽萍.嗜酸乳杆菌冻干菌粉保护剂选择的研究[J].食品工业科技,2007(5):119-122.
- [14] 王燕,王发美,张秀苑,等.瑞士乳杆菌和鼠李糖乳杆菌混合培养条件优化及冻干菌粉的制备[J].中国乳品工业,2019,47(1):19-22.
- [15] 任香芸,何志刚,李维新,等.植物乳杆菌 R23 冻干保护剂的优选[J].中国食品学报,2016,16(5):115-121.
- [16] 王慧君,曾小群,潘道东,等.热休克法提高嗜酸乳杆菌的抗冻胁迫作用[J].中国食品学报,2016,16(1): 147-153.
- [17] Spano G, Beneduce L, Perrotta C, et al. Cloning and characterization of the hsp 18.55 gene, a new member of the small heat shock gene family isolated from wine *Lactobacillus plantarum*[J]. Research in Microbiology, 2005, 156(2):219-224.
- [18] Vabulas R M, Raychaudhuri S, Hayer-Hartl M, et al. Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response[EB/OL]. [2019-03-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2982175/>.
- [19] Mizrahi S, Kilcast D, Subramaniam P. Accelerated shelf life testing of foods[EB/OL]. [2019-03-02]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781845697013500153>.
- [20] 任亚妮,车振明,靳学敏,等.应用 ASLT 法预测软面包的货架期[J].食品研究与开发,2011,32(2):156-158.
- [21] 张伟,张焕新.糯小麦面包的研制及货架期预测[J].

- 食品研究与开发, 2015(2):60-64.
- [22] Achour M M, Mtimet N, Cornelius C, et al. Application of the accelerated shelf life testing method (ASLT) to study the survival rates of freeze-dried *Lactococcus* starter cultures[J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2010, 76(6):624-628.
- [23] Chen M J, Tang H Y, Chiang M L. Effects of heat, cold, acid and bile salt adaptations on the stress tolerance and protein expression of kefir-isolated probiotic *Lactobacillus kefiranoferiens* M1[J]. Food Microbiology, 2017, 66:20-27.
- [24] Kozłowski T T, Pallardy S G. Acclimation and adaptive responses of woody plants to environmental stresses[J]. Botanical Review, 2002, 68(2):270-334.
- [25] Hartke A, Bouche S, Gansel X, et al. Starvation-induced stress resistance in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1994, 60(9):3474-3478.
- [26] Broadbent J R, Lin C. Effect of heat shock or cold shock treatment on the resistance of *Lactococcus lactis* to freezing and lyophilization[J]. Cryobiology, 1999, 39(1): 88-102.
- [27] 袁亚宏, 岳田利, 高振鹏, 等. 冻干高活力乳酸菌粉保护剂的研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2003, 31(S):82-84.
- [28] Ziadi M, Touhami Y, Achour M, et al. The effect of heat stress on freeze-drying and conservation of *Lactococcus* [J]. Biochemical Engineering Journal, 2005, 24(2):141-145.
- [29] 曹宁, 侯喜林, 谭君, 等. 重组干酪乳杆菌贮存期内质粒稳定性及活菌数的检测[J]. 中国生物制品学杂志, 2013, 26(2):222-224.

Effect of heat shock treatment on survival rate of direct vat set *Lactobacillus acidophilus* starter at different storage temperatures

ZHEN Ni^{1,2}, WANG Xiaomeng^{1,2}, YE Congyan^{1,2}, KONG Lingwei^{1,2}, ZENG Xiaoqun^{1,2*},
PAN Daodong^{1,2}, LIAN Liwei³

(1.College of Food and Pharmaceutical Sciences, Ningbo University, Ningbo 315832, China;

2.Key Laboratory of Animal Protein Food Processing Technology of Zhejiang Province, Ningbo 315832, China;

3.Ningbo Dairy Group Co. Ltd., Ningbo 315033, China)

Abstract: In the current study, *Lactobacillus acidophilus* was used as the representative strain. ASLT was used to investigate the effect of heat shock treatment combined with lyoprotectant on the survival rate of direct vat set lactic acid bacteria starter at different storage temperatures. The lyophilized protective agent with the highest survival rate and the storage temperature of the longest lethal time of the powder after lyophilization was determined. The results showed that the lactic acid bacteria were subjected to heat shock pre-treatment before freeze-drying. The survival rate during cryopreservation was significantly higher than that in the control group without heat shock treatment. The order of lyophilization protection effect was from high to low: 10% skim milk>10% glucose>water. The decreased storage temperature increased the semi-lethal time of the lactic acid bacteria. Finally, the experimental conditions for obtaining the highest survival rate during the storage of the direct-injection starter include treatment with *Lactobacillus acidophilus* for 30 min at 46 °C, followed by adding 10% glucose, 2.5% glycerol, 1.5% sorbose and 10% skim milk for lyophilization. The granules were frozen at -20 °C after lyophilization, and the survival rate reached 88.48% after 121 days, and the freeze-drying survival rate was increased by 30.69% compared with the control group treated with water as a lyoprotectant and without heat shock.

Key words: heat shock; *Lactobacillus acidophilus*; lyoprotectant; survival rate; ASLT method; semi-lethal time

(责任编辑 史小丽)