DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20260314004
引用格式: 徐云灿, 王翔, 姚珊珊, 等. 植物乳植杆菌 DPA1C 冻干保护剂筛选及其配方优化[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(16): 119–126.
Xu Yuncan, Wang Xiang, Yao Shanshan, et al. Screening and formula optimization of lyophilization protectants for *Lactiplantibacillus plantarum* DPA1C [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(16): 119–126. (in Chinese with English abstract).

植物乳植杆菌 DPA1C 冻干保护剂筛选及其配方优化

徐云灿[1], 王　翔[1], 姚珊珊[1], 李明亮[1], 陈嘉豫[1], 周　静[2], 赵　宁[1*], 刘书亮[1*]

(1. 四川农业大学食品学院, 雅安　625000; 2. 西昌新希望三牧乳业有限公司, 西昌　615000)

摘　要: 目的　筛选植物乳植杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*) DPA1C冻干保护剂并开发一种高效的复合保护剂配方。**方法**　确立基础冻干保护剂, 确保冻干菌粉的一定存活率, 在此基础上进行单因素试验, 筛选出对菌株冻干存活率影响显著的保护剂成分, 最后采用正交试验设计对单因素保护剂配比进行优化。**结果**　最优复合冻干保护剂配方为: 12%脱脂乳、9%海藻糖、3%植物乳植杆菌 DPA1C 胞外多糖和 2%谷氨酸钠。在此条件下, 植物乳植杆菌 DPA1C 的冻干存活率高达 95.26%±2.01%, 显著高于单一保护剂及对照组, 证明了该复合保护剂在缓解冻干损伤方面显著的协同增效作用。**结论**　将植物乳植杆菌 DPA1C 自产的胞外多糖作为其冻干保护剂成分之一, 经优化获得一种能显著提高该菌株抗冻干胁迫能力的复合保护剂, 为其高活性菌剂的工业化生产提供了数据参考, 也为其他乳酸菌所产胞外多糖的应用提供参考依据。

关键词: 植物乳植杆菌; 真空冷冻干燥; 冻干保护剂; 正交试验; 冻干存活率
中图分类号: TS201.3　　**文献识别码:** A　　**文章编号:** 2095–0381(2026)16–0119–08

Screening and formula optimization of lyophilization protectants for *Lactiplantibacillus plantarum* DPA1C

XU Yun-Can[1], WANG Xiang[1], YAO Shan-Shan[1], LI Ming-Liang[1], CHEN Jia-Yu[1], ZHOU Jing[2], ZHAO Ning[1*], LIU Shu-Liang[1*]

(1. *College of Food Science*, *Sichuan Agricultural University*, *Ya'an* 625000, *China*; 2. *Xichang New Hope Sanmu Dairy Co*., *Ltd*., *Xichang* 615000, *China*)

ABSTRACT: Objective　To screen lyophilization protectants for *Lactiplantibacillus plantarum* DPA1C and develop an efficient composite lyoprotectant formulation. **Methods**　A basal lyoprotectant was first established to ensure a certain survival rate of the freeze-dried bacterial powder. On this basis, single-factor experiments were conducted to identify lyoprotectant components with significant effects on the freeze-drying survival rate of the strain. Subsequently,

收稿日期: 2026-03-14
基金项目: 西昌市科技项目计划项目(2322359018); 四川农业大学科研兴趣计划项目(20251940)

第一作者: 徐云灿(2003—), 女, 主要研究方向为食品微生物。E-mail: 3568786029@qq.com
***通信作者:** 赵宁(1994—), 女, 博士, 讲师, 主要研究方向为微生物胁迫耐受性及代谢调控机理解析。E-mail: zhaoning@sicau.edu.cn
刘书亮(1968—), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为功能微生物及发酵食品。E-mail: lsliang999@163.com

orthogonal experimental design was employed to optimize the ratio of the selected single-factor protectants. **Results** The final formulation contained 12% skim milk, 9% trehalose, 3% exopolysaccharide produced by *Lactiplantibacillus plantarum* DPA1C and 2% sodium glutamate. Under these conditions, the survival rate of *Lactiplantibacillus plantarum* DPA1C reached 95.26%±2.01%, markedly higher than those with single protectants or control groups. This demonstrated a notable synergistic protective effect against lyophilization damage. **Conclusion** The exopolysaccharide produced by *Lactiplantibacillus plantarum* DPA1C is incorporated as one of the components of its own lyoprotectant, and an optimized composite protectant that significantly enhances the strain's resistance to freeze-drying stress is obtained. This work provides a data reference for the industrial production of highly active bacterial preparations, and also offers a reference for the application of exopolysaccharides produced by other lactic acid bacteria.

KEY WORDS: *Lactiplantibacillus plantarum*; vacuum freeze-drying; lyophilization protectants; orthogonal experiment; freeze-drying survival rate

0 引 言

益生菌是一类对宿主健康有益的活性微生物，能维持肠道微生态平衡，在促进消化、增强免疫防御和抑制致病菌方面发挥重要作用[1]。凭借其多样的健康调节功效，益生菌在全球功能性食品和保健品市场中占据着日益重要的地位。植物乳植杆菌作为乳酸菌类的核心菌种之一，因其良好的胃肠液耐受性、多样化的益生特性及出色的发酵能力而备受关注[2−4]。然而，益生菌高活性菌粉制剂的商业化，关键在于保证其在生产、储存和运输过程中的稳定性与最终产品中的益生活性[5]。真空冷冻干燥是制备益生菌菌粉常用的技术之一，但该过程会在一定程度上导致菌体细胞膜损伤、蛋白质变性和 DNA 损伤，造成冻干存活率下降，为了缓解冻干损伤，添加保护剂至关重要[6−7]。脱脂乳、海藻糖、麦芽糊精等已被作为保护剂广泛应用[8−9]，它们能够保护细胞蛋白质、稳定膜结构并加强对细胞的渗透保护。

前文所提及的海藻糖等植物提取来源的糖类，作为冻干保护剂在食品、药品(如早期疫苗)中的应用已经非常成熟，但过去由植物提取的糖类往往面临来源受限、效率低下的问题。随着微生物发酵与酶合成工艺等的成功突破与应用，大多数海藻糖的生产已由传统的植物提取转向微生物发酵提取，突破产能与成本限制的同时，保障了极高的产品纯度和质量均一性[10]。基于此，微生物发酵来源糖类在冻干保护剂中的运用逐渐流行，并且研究前沿已从传统的、结构相对简单的糖类，逐步转向通过微生物次级代谢产生的、具有更复杂空间结构和功能活性的高级糖类[11−12]。其中，微生物源糖类如胞外多糖因其独特的流变学特性、卓越的成膜性与良好的生物相容性，且能对细胞发挥潜在的保护作用，成为了当前研究的热点[13−14]。

实验室前期筛选获得了一株可产胞外多糖的植物乳植杆菌 DPA1C，其具备良好的胃肠道耐受性，其发酵上清液对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)具有明显抑制作用，显示出潜在的抑菌能力，并具有潜在的降血糖能力与益生元效应[15]。但该菌冷冻干燥时所需的保护剂及其所产胞外多糖[16]是否具备冻干保护作用，与其他保护剂能否产生协同效应尚不明确。

本研究以 12%脱脂乳溶液作为基础配方，通过单因素试验从糖(包括菌株 DPA1C 胞外多糖)、多元醇以及氨基酸 3 类不同保护剂中，筛选出关键保护剂成分，在此基础上采用正交试验对保护剂进行复配优化，以期显著提高植物乳植杆菌 DPA1C 的冻干存活率，为高活性植物乳植杆菌菌粉的工业化制备工艺提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

植物乳植杆菌 DPA1C(菌株专利保藏编号：CGMCC No.24437)，由四川农业大学微生物发酵实验室提供；脱脂乳粉(天津伊利乳业有限公司)。

甘油(分析纯，成都金山化学试剂有限公司)；谷氨酸钠(食品级，莲花健康产业集团股份有限公司)；海藻糖(食品级，上海源叶生物科技有限公司)；山梨醇(分析纯，天津市科密欧化学试剂开发中心)；低聚木糖(食品级，山东龙力生物科技股份有限公司)；DPA1C 胞外多糖(实验室提取)；氯化钠、三氯乙酸、无水乙醇(分析纯，成都市科隆化学品有限公司)；MRS 肉汤培养基(分析纯，海博生物技术有限公司)；琼脂粉、麦芽糊精(分析纯，北京索莱宝科技有限公司)。

1.2 仪器与设备

FA-LQC30002 电子天平(精度 0.01 g，昆山安特计量设备有限公司)；LDZX-75L 高压蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂)；Thermo Scientific 1300 系列 1386 型二级 A2 型生物安全柜、Thermo BR4i 型冷冻离心机(美国赛默飞世尔科技有限公司)；SCIENTZ-12N 真空冷冻干燥机(宁波新芝生物科技股份有限公司)；Mixer 4K 漩涡仪(上海生工生物工程股份有限公司)；DHP-9162 型电热恒温培养箱(上海一恒

科技有限公司); DW-86L828J 低温保存箱(青岛海尔生物医疗股份有限公司)。

1.3　试验方法

1.3.1　基础保护剂选择

参照文献[17–18]的研究, 以 12%脱脂乳为保护剂, 对菌体细胞冻干存活率的提升有较好的效果。经试验发现, 该条件下植物乳植杆菌 DPA1C 冻干后的存活率为 55.05%±1.12%, 存活率较好。因此以 12%脱脂乳为基础保护剂, 与其他辅助保护剂逐一混合进行单因素试验。

1.3.2　DPA1C 胞外多糖制作方法

DPA1C 胞外多糖的制取方法, 参考赖鲸慧[15]中的制备方法, 省略固体培养基阶段, 直接将活化好的菌种在 ESM 培养基[19]中发酵 24 h, 进行离心(8000 r/min, 4 ℃, 20 min)。将上清液沸水浴 10 min, 冷却后加入三氯乙酸至其终浓度为 4%, 4 ℃保持 16 h 左右, 离心(8000 r/min, 4 ℃, 20 min)去除蛋白沉淀。再向上清液加入 3~4 倍体积预冷无水乙醇, 放于 4 ℃冰箱过夜储存, 离心(8000 r/min, 4 ℃, 20 min)得到多糖沉淀, 使用 80%乙醇清洗沉淀, 将沉淀用超纯水溶解后转移至透析袋(8000~14000 Da)于 4 ℃冰箱用超纯水透析 3 d, 间隔 4 h 换一次水。透析完成后进行真空冷冻干燥得到乳酸菌胞外多糖(exopolysaccharide, EPS)样品。

1.3.3　乳酸菌冻干菌粉制作方法

(1)菌种活化

将冻存的植物乳植杆菌 DPA1C 菌种接种于 MRS 液体培养基后, 于 37 ℃下厌氧培养 18 h。连续传代培养 2 次, 获得活化的菌种。

(2)菌种扩培

将活化后的菌种按 2%接种量接种至 MRS 液体培养基, 于 37 ℃下进行扩大培养 24 h, 获得 DPA1C 发酵菌液。

(3)冻干菌粉制备

参考范洪臣等[20]的菌悬液制备方法, 将 DPA1C 发酵菌液在 4 ℃, 8000 r/min 条件下离心 5 min, 收集菌体细胞, 加入原菌液体积 1/10 的保护剂重悬菌体细胞, 制成菌悬液。获得的样品用涡旋仪充分混匀后, 采用平板计数法取样测定活菌数, 记录冻干前活菌数 N_0。然后将样品于 –80 ℃下预冻 10 h, 再置于真空冷冻干燥机内冻干 24 h, 最终制得菌粉。

1.3.4　冻干存活率计算

冻干后, 将样品复溶至冻干前的体积, 采用平板计数法测定活菌数 N_1。冻干存活率计算公式如(1)所示。

$$\text{冻干存活率}/\% = \frac{N_1}{N_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中: N_1 为冻干后活菌数, CFU/mL; N_0 为冻干前活菌数, CFU/mL。

1.3.5　辅助保护剂单因素选择

针对糖类、多元醇类以及氨基酸类 3 种不同类型保护剂, 本研究选择麦芽糊精、甘油、谷氨酸钠、海藻糖、山梨醇、低聚木糖与 DPA1C 胞外多糖, 通过单因素试验优化其添加浓度。在基础保护剂配方下(12%脱脂乳), 加入不同浓度辅助保护剂, 各辅助保护剂添加浓度如下: 海藻糖浓度为 3%、6%、9%、12%、15%; DPA1C 胞外多糖浓度为 1%、3%、5%、7%、10%; 谷氨酸钠浓度为 1%、2%、3%、4%、5%; 低聚木糖浓度为 1%、2%、4%、6%、8%; 山梨醇浓度为 1%、2%、4%、6%、8%; 麦芽糊精浓度为 1%、2%、4%、6%、8%; 甘油浓度为 1%、2%、3%、4%、5%。

1.3.6　正交试验

根据单因素的试验结果, 选择对菌株保护效果最好的 3 种成分, 以海藻糖(*A*)、DPA1C 胞外多糖(*B*)、谷氨酸钠(*C*)为正交设计的自变量, 以植物乳植杆菌 DPA1C 冻干菌粉存活率为因变量, 各因素设置 3 个水平且分别以 1、2、3 编码, 进行 3 因素 3 水平正交试验, 按 1.3.3 中的冻干流程进行冻干, 比较不同试验组的冻干存活率。正交试验因素与水平设计如表 1 所示。

表 1　正交试验因素与水平设计表

Table 1　Table of orthogonal test factors and horizontal design

水平	因素		
	A (海藻糖)/%	*B* (DPA1C 胞外多糖)/%	*C*(谷氨酸钠)/%
1	9	3	2
2	12	5	3
3	15	7	4

1.4　数据处理

以上试验均独立重复 3 次, 结果采用平均值±标准偏差表示。数据使用 Microsoft Excel 2019 进行计算, 软件 IBM SPSS Statistics 20 进行显著性分析, $P<0.05$ 为差异显著, 部分数据采用 Origin lab 8.6 进行绘图拟合。

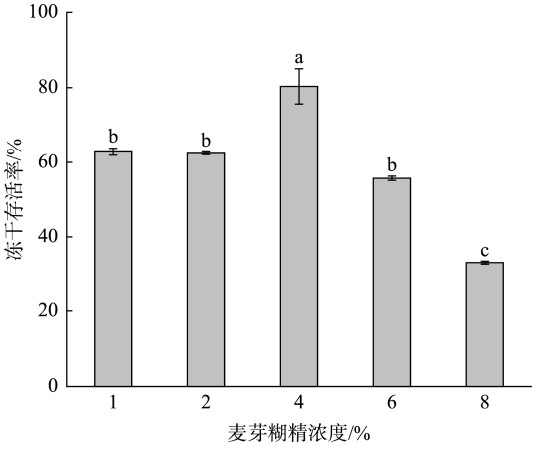
2　结果与分析

2.1　植物乳植杆菌 DPA1C 冻干保护剂筛选单因素试验结果

2.1.1　麦芽糊精浓度对植物乳植杆菌 DPA1C 冻干存活率的影响

麦芽糊精浓度对植物乳植杆菌 DPA1C 冻干存活率的影响结果见图 1。冻干存活率随麦芽糊精浓度的增加呈先上升后下降的趋势。当其浓度为 4%时, 冻干存活率达到峰值 80.32%, 显著高于其他浓度时的存活率(33.08%~62.86%) ($P<0.05$)。麦芽糊精是一种小分子多糖, 其保护作用主要依赖于在冻干过程中形成无定形玻璃态基质, 将细胞包裹于其中, 从而提供物理隔离保护[21]。该机制虽能提供物理屏障, 但由于麦芽糊精的分子结构特性, 其与细胞膜的直接相互作用较弱, 因此保护效果通常不如一些能与膜直接作用的低分子量保护剂[22]。即便在最高存

活率的添加条件下，麦芽糊精的冻干保护效果仍不及其余多数单因素保护剂，故不将其纳入后续正交优化试验。



注：不同小写字母表示样品间存在显著性差异(P<0.05)，图 2~7 同。

图 1 麦芽糊精浓度对植物乳植杆菌 DPA1C 冻干存活率的影响

Fig.1 Effects of maltodextrin concentration on the freeze-drying survival rate of *Lactiplantibacillus plantarum* DPA1C

2.1.2 甘油浓度对植物乳植杆菌 DPA1C 冻干存活率的影响

甘油是一种强渗透性保护剂，能自由进出细胞膜，其在冷冻阶段可通过降低细胞内冰点、抑制过大冰晶的形成，从而减轻冰晶对细胞结构的机械损伤[23]；在干燥阶段，甘油能部分替代水分子，与蛋白质等生物大分子形成氢键，维持其天然构象，防止因脱水造成的变性失活[24]。然而，甘油浓度过高可能导致细胞过度渗透膨胀或干扰正常代谢，因此其保护效果存在一个最佳浓度范围。由图 2 可知，随甘油浓度的增加，DPA1C 细胞冻干存活率呈现先增后减的趋势。当甘油浓度为 4%时，冻干存活率达到最高值 79.26%；而当浓度超过此最优值后，存活率出现下降，这可能是由于高浓度甘油导致与细胞表面羟基联结度降低，菌体暴露在介质中，引起冻干后的细胞代谢紊乱所致。4%为该试验条件下甘油的最适添加水平，但其对应的菌株冻干存活率在全部单因素保护剂中处于最低水平，整体保护能力有限，因此甘油不纳入后续正交优化试验。

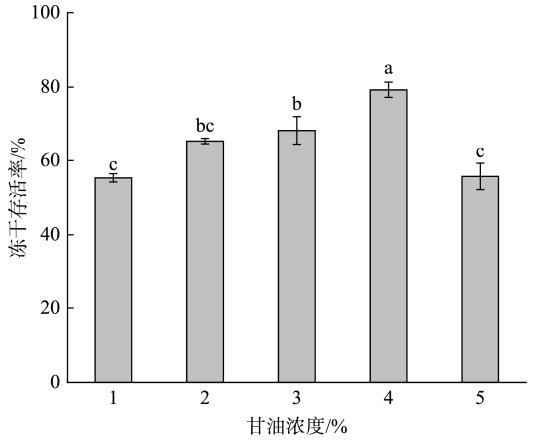


图 2 甘油浓度对植物乳植杆菌 DPA1C 冻干存活率的影响

Fig.2 Effects of glycerol concentration on the freeze-drying survival rate of *Lactiplantibacillus plantarum* DPA1C

2.1.3 谷氨酸钠浓度对植物乳植杆菌 DPA1C 冻干存活率的影响

谷氨酸钠作为一种半渗透性保护剂，其小分子特性使其能够穿透细胞膜进入胞内。在冻干过程中，它通过平衡细胞内外渗透压，减少细胞因严重脱水而造成的皱缩和损伤[25]；此外，它还可作为代谢前体物，参与菌体的三羧酸循环和能量代谢，帮助菌体在冻干应激条件下维持膜电位和细胞膜稳定性[26]。由图 3 可知，当谷氨酸钠浓度为 3%时，菌体冻干存活率最高，达到 89.45%，而继续增加谷氨酸钠浓度时，存活率显著降低(P<0.05)，原因可能是过高浓度的谷氨酸钠导致菌体细胞内过度失水，结合水含量减少、蛋白质稳定性降低[25]。因此，以 3%谷氨酸钠为中心水平，选取 2%和 4%分别作为低水平和高水平浓度，以进行后续复配优化。

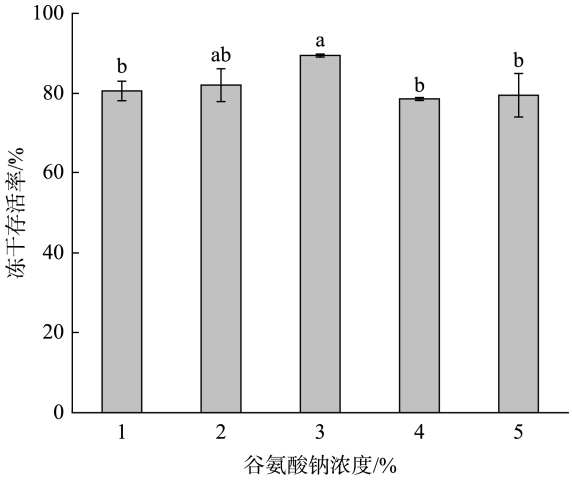


图 3 谷氨酸钠浓度对植物乳植杆菌 DPA1C 冻干存活率的影响

Fig.3 Effects of monosodium glutamate concentration on the freeze-drying survival rate of *Lactiplantibacillus plantarum* DPA1C

2.1.4 海藻糖浓度对植物乳植杆菌 DPA1C 冻干存活率的影响

海藻糖浓度对植物乳植杆菌 DPA1C 冻干存活率的影响见图 4，随着海藻糖浓度的增加，DPA1C 的冻干存活率达到最大值后开始回落。当海藻糖浓度为 12%时，冻干存活率最高，达到 91.04%。海藻糖作为一种非渗透性保护剂，可通过氢键与细胞膜磷脂极性头部结合，维持膜结构完整性，防止膜脂氧化与相变，其保护作用主要源于其高玻璃化转变温度和非特异性氢键结合能力[27]。在冻干过程中，海藻糖能替代水分子与细胞膜磷脂和蛋白质的极性基团形成氢键，稳定膜结构和蛋白质构象，防止因脱水引起的变性[28]；同时，其形成的玻璃态结构能够有效固定生物大分子，抑制冰晶的再结晶和生长[27]。综上所述，可确定 12%为海藻糖的最佳单因素保护浓度。为在后续复配试验中进

一步考察海藻糖与其他保护剂的交互作用, 以其最佳浓度为中心, 前后各取一个浓度水平, 即设定海藻糖的 3 个水平为 9%、12%、15%, 用于后续 3 因素 3 水平正交试验。

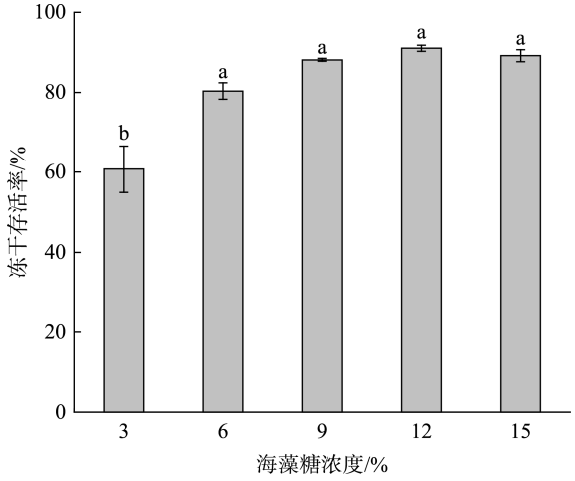


图 4　海藻糖浓度对植物乳植杆菌 DPA1C 冻干存活率的影响
Fig.4　Effects of trehalose concentration on the freeze-drying survival rate of *Lactiplantibacillus plantarum* DPA1C

2.1.5　山梨醇浓度对植物乳植杆菌 DPA1C 冻干存活率的影响

山梨醇浓度对植物乳植杆菌 DPA1C 冻干存活率的影响见图 5。菌体的冻干存活率随山梨醇浓度的增加呈先缓慢上升后下降的趋势。山梨醇属于多元醇类保护剂, 其分子中含有多个羟基, 能够通过氢键与细胞膜蛋白及磷脂的极性头部相互作用, 在冻干过程中部分替代水分子, 从而稳定细胞膜结构, 防止蛋白质变性[29]。当山梨醇浓度为 6% 时, 冻干存活率达到最高值(84.16%); 而当其浓度超过 6% 后, 存活率显著下降(P<0.05), 这可能是由于高浓度山梨醇导致体系渗透压过高, 引起细胞脱水甚至膜结构损伤所致。尽管 6%是山梨醇在该试验体系下的最适添加水平, 但其对应的菌株冻干保护效果明显弱于其他几组试验保护剂的最优水平, 故不再将山梨醇纳入后续正交优化试验。

2.1.6　低聚木糖浓度对植物乳植杆菌 DPA1C 冻干存活率的影响

低聚木糖作为一种益生元, 其保护机制主要与其良好的持水性有关, 能在细胞周围形成水合层, 缓解脱水损伤; 同时其益生元大分子特性可在细胞外围形成微环境, 起到一定的物理屏障作用。然而, 与海藻糖等能够通过形成玻璃态及直接与膜相互作用的小分子糖类相比, 低聚木糖与细胞膜的亲和力较弱, 保护效率相对有限[30]。由图 6 可知, 冻干存活率随低聚木糖浓度的增加迅速升至峰值, 即在 2%浓度时达到最高值 84.61%, 然后逐渐下降; 而继续增加低聚木糖浓度至4%及以上时, 存活率明显降低, 这可能是由于高浓度低聚木糖导致体系黏度增大, 影响了冻干过程中水分的升华效率, 同时也与其羟基部分替代水分子、与菌体细胞膜磷酸基团(或者与菌体蛋白质极性基团)形成有效氢键个数的降低有关, 导致菌体中的大分子物质在缺水状态下无法保持原有的功能结构。低聚木糖最优添加浓度(2%)条件下获得的菌株冻干存活率低于本研究同期筛选出的 3 种优势保护剂, 因此低聚木糖不纳入后续正交试验研究。

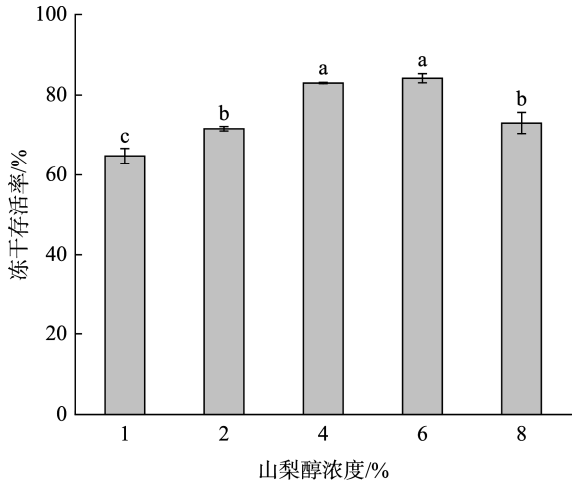


图 5　山梨醇浓度对植物乳植杆菌 DPA1C 冻干存活率的影响
Fig.5　Effects of sorbitol concentration on the freeze-drying survival rate of *Lactiplantibacillus plantarum* DPA1C

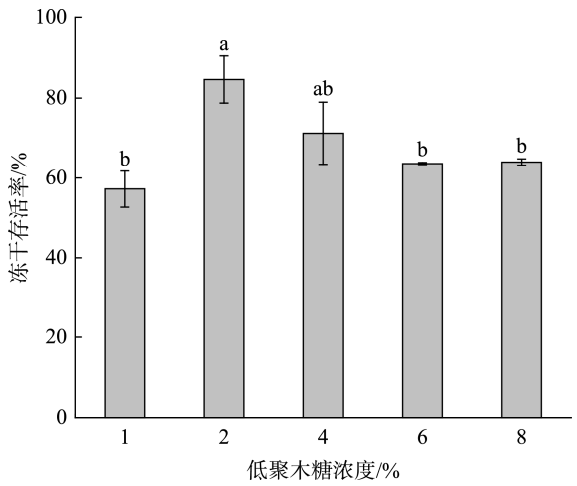


图 6　低聚木糖浓度对植物乳植杆菌 DPA1C 冻干存活率的影响
Fig.6　Effects of xylo-oligosaccharides concentration on the freeze-drying survival rate of *Lactiplantibacillus plantarum* DPA1C

2.1.7　DPA1C 胞外多糖浓度对植物乳植杆菌 DPA1C 冻干存活率的影响

DPA1C-EPS 具有良好的生物相容性与成膜性, 可在菌体表面形成物理屏障, 阻隔冰晶直接损伤, 同时调节胞

外基质微环境，能有效减轻细胞壁和膜损伤，稳定膜流动性[31]。DPA1C-EPS 浓度对冻干存活率的影响如图 7 所示。当 EPS 浓度为 5%时，冻干存活率最高(90.01%)，且在邻近浓度范围内，存活率均维持在 80%以上，表明 EPS 的保护效果在此区间内对浓度变化不敏感。然而，当 EPS 浓度超过 7%时，相同冻干时间下样品冻干程度低于其他组，可能由于体系黏度增大阻碍了水分升华。因此，综合冻干效率与保护效果，选择 5%为 EPS 最佳添加浓度。当 EPS 浓度超过 5%后，冻干存活率显著下降；然而，当浓度增至 10%时，存活率有所回升。这种非单调性变化可能与高浓度 EPS 改变了保护剂体系的玻璃化转变温度有关[32]。故以 5%为 DPA1C 胞外多糖的中心水平，并取其前后相邻浓度 3%和 7%作低、高水平，从而确定胞外多糖的 3 个试验水平，以用于后续正交试验复配优化。

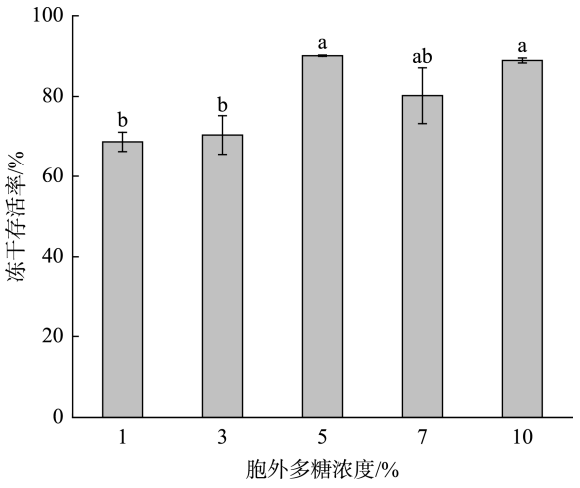


图 7 胞外多糖浓度对植物乳植杆菌 DPA1C 冻干存活率的影响
Fig.7 Effects of exopolysaccharide concentration on the freeze-drying survival rate of *Lactiplantibacillus plantarum* DPA1C

2.2 正交试验结果

根据单因素试验结果，冻干存活率较高的 3 项保护剂分别为：12%的海藻糖(存活率为 91.04%)、5%的 DPA1C 胞外多糖(存活率为 90.01%)以及 3%的谷氨酸钠(存活率为 89.45%)。选择以上冻干效果较好的 DPA1C 胞外多糖、海藻糖和谷氨酸钠进行 3 因素 3 水平的正交试验，正交试验结果与极差分析结果如表 2 所示。根据试验结果可得，3 个因素中的影响显著性次序为 *B* (DPA1C 胞外多糖)>*A*(海藻糖)>*C*(谷氨酸钠)，最优水平组合为 $A_1B_1C_1$，即最优复合保护剂配方为：12%脱脂乳、9%海藻糖、3%胞外多糖和 2%谷氨酸钠。在此配方下，其对植物乳植杆菌 DPA1C 冻干过程的保护效果最佳，冻干存活率可达到 95.26%±2.01%。

表 2 正交试验结果与极差分析结果
Table 2 Results of the orthogonal experiment and range analysis

实验号	*A*(海藻糖)/%	*B* (DPA1C 胞外多糖)/%	*C*(谷氨酸钠)/%	冻干存活率/%
1	9	3	2	95.26±2.01
2	9	5	3	85.55±2.14
3	9	7	4	87.32±3.55
4	12	3	3	92.10±2.72
5	12	5	4	92.67±2.10
6	12	7	2	71.36±2.06
7	15	3	4	84.74±3.34
8	15	5	2	72.24±3.34
9	15	7	3	63.70±3.90
K_1	268.13	272.10	238.86	
K_2	256.13	250.46	241.35	
K_3	220.68	222.38	264.73	
k_1	89.38	90.70	79.62	
k_2	85.38	83.49	80.45	
k_3	73.56	74.13	88.24	
R	15.82	16.57	8.62	

3 结论与讨论

真空冷冻干燥是制备高活性益生菌菌粉的关键工艺，然而该过程中冰晶形成、渗透压变化及膜脂相变等胁迫因素常导致菌体冻干存活率显著下降。本研究以 12%脱脂乳为基础保护剂，通过单因素试验初步筛选出对植物乳植杆菌 DPA1C 冻干存活率影响较大的保护剂成分，包括海藻糖、DPA1C 胞外多糖和谷氨酸钠。进一步采用正交试验设计优化其余辅助保护剂的配比，正交试验极差分析表明，3 种辅助保护剂对冻干存活率的影响顺序为：胞外多糖>海藻糖>谷氨酸钠，说明胞外多糖在复合体系中起主导作用，其独特的空间结构与成膜特性可能是提升菌体冻干耐受性的关键。从作用机制来看，3 种保护剂呈现出明显的功能互补特征：海藻糖侧重于通过玻璃态基质形成与膜界面稳定发挥作用，胞外多糖侧重于在菌体表面构建物理屏障以隔绝冰晶机械损伤，谷氨酸钠则侧重于胞内渗透压平衡的维持。3 者分别从胞外物理屏障(胞外多糖)、膜界面稳定(海藻糖)及胞内渗透调节(谷氨酸钠)3 个层面形成多层次保护网络，这种空间上的分工协同可能是复合保护剂产生显著协同增效的结构基础。

正交试验中同样以脱脂乳为基础保护剂, 最终确定最优复合保护剂配方为: 12%脱脂乳、9%海藻糖、3%胞外多糖和 2%谷氨酸钠。在此条件下, 植物乳植杆菌 DPA1C 的冻干存活率达 95.26%±2.01%, 优于单一保护剂及未优化组, 且最优组合中胞外多糖、海藻糖和谷氨酸钠的浓度(3%、9%和 2%)均低于其各自单因素最优水平(5%、12%和 3%)。这一结果表明, 在复合体系中各组分并非简单叠加, 或许是通过适当降低个别组分浓度, 来优化体系整体的玻璃化转变温度、渗透压平衡及成膜完整性等因素, 从而达到协同增效作用。

综上所述, 本研究通过系统优化成功获得了一种适用于植物乳植杆菌 DPA1C 的高效复合冻干保护剂体系, 显著提升了其抗冻干胁迫能力, 为该菌株高活性菌粉的工业化生产奠定了技术基础; 也可为其他乳酸菌高活性冻干菌剂的开发及乳酸菌所产胞外多糖的应用提供参考。从实际应用角度推断, 在冻干阶段存活率越高的菌群, 因其细胞膜完整性及代谢活性恢复程度通常越好, 该高存活率菌粉(>95%)在长期储存过程中应具备更优的活性保持能力。然而, 冻干菌剂在储存过程中的活性衰减速率还受储存温度、包装阻氧率及水分活度等因素影响, 后续研究可进一步探讨不同环境条件下的冻干菌剂在长期储存过程中的稳定性及冻干保护剂在复杂食品基质中对菌体的保护效果。

参考文献

[1] 刘玉凤. 益生菌类保健食品研究进展[J]. 中国食品工业, 2024(9): 162–164.
Liu Yufeng. Research progress of probiotic health food [J]. China Food Industry, 2024(9): 162–164.

[2] 信珊珊, 李艳. 植物乳植杆菌的益生特性及其在发酵食品中的应用进展[J]. 食品安全导刊, 2025(21): 173–175, 179.
Xin Shanshan, Li Yan. Probiotic characteristics of lactiplantibacillus plantarum and its applications in fermented foods [J]. Journal of Food Safety Guide, 2025(21): 173–175, 179.

[3] Li Changcheng, Guo Shujun, Feng Yuting, et al. Microbiological, physicochemical, textural, and rheological properties of fermented soymilk produced with *Enterococcus faecium* and *Lactiplantibacillus plantarum* [J]. Food Chemistry, 2025, 467: 142232.

[4] Tian Huaixiang, Hang Shuyang, Huang Ningwei, et al. Strain-level variation in diacetyl production by *Lactiplantibacillus plantarum* reveals genetic drivers of flavor in fermented dairy [J]. Journal of Dairy Science, 2025, 108(10): 10689–10699.

[5] 吴文茹, 汪政煜, 范梦茹, 等. 乳酸菌的抗冷冻性及冻干保护[J]. 食品工业, 2017, 38(5): 246–249.
Wu Wenru, Wang Zhengyu, Fan Mengru, et al. Anti-freezing property and lyophilization protection of lactic acid bacteria [J]. The Food Industry, 2017, 38(5): 246–249.

[6] Han B, Bischof J C. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing [J]. Cryobiology, 2004, 48(1): 8–21.

[7] Wang Junyan, Wu Peng, Dhital S, et al. Impact of freezing and freeze drying on *Lactobacillus rhamnosus* GG survival: mechanisms of cell damage and the role of pre-freezing conditions and cryoprotectants [J]. Foods, 2025, 14(10): 1817.

[8] Dai Lijun, Zhai Qixiao, Song Xin, et al. Effect of carbohydrate protectant on survival rate of *Lactiplantibacillus plantarum* during freeze-drying [J]. Food Bioscience, 2025, 73: 107699.

[9] Zeng Yaoying, Zhao Ye, Xiong Yubo, et al. Preparation of nitrite-reducing *Lactiplantibacillus plantarum* SYS-4 starter culture and its impact on the quality and flavor of fermented mustard [J]. LWT, 2025, 224: 117849.

[10] 张玉华, 凌沛学, 籍保平. 海藻糖的研究现状及其应用前景[J]. 食品与药品, 2005, 7(3): 8–13.
Zhang Yuhua, Ling Peixue, Ji Baoping. Current status of research for trehalose and its prospective applications [J]. Food and Drug, 2005, 7(3): 8–13.

[11] 王继锋, 石侃, 安玮, 等. 酒酒球菌(*Oenococcus oeni*)产胞外聚合物培养基的优化及其抗冷冻干燥性能评价[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(15): 157–163.
Wang Jifeng, Shi Kan, An Wei, et al. Culture medium optimization for *Oenococcus oeni* producing extracellular polymeric substances and their cryoprotective ability [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(15): 157–163.

[12] 李江, 何培青, 陈靠山, 等. 南极适冷菌 Pseudoaltermonas sp. S-15-13 胞外多糖低温保护作用的研究[J]. 海洋科学进展, 2007, 25(2): 215–219.
Li Jiang, He Peiqing, Chen Kaoshan, et al. Study on cryoprotection of exopolysaccharides from Antarctic psychrotroph pseudoaltermonas sp. S-15-13 [J]. Advances in Marine Science, 2007, 25(2): 215–219.

[13] Shi Kan, An Wei, Meng Qiang, et al. Partial characterization and lyoprotective activity of exopolysaccharide from *Oenococcus* oeni 28A-1 [J]. Process Biochemistry, 2021, 101: 128–136.

[14] Zhang Min, Che Yulan, Wu Chongde. A novel exopolysaccharide produced by *Zygosaccharomyces rouxii* with cryoprotective and freeze-drying protective activities [J]. Food Chemistry, 2022, 392: 133304.

[15] 赖鲸慧. 不同乳酸菌胞外多糖特性比较及在凝固型酸奶中的应用研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2022: 38–46, 12.
Lai Jinghui. Comparison of exopolysaccharide properties from different lactic acid bacteria and the application in set yoghurt [D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2022: 38–46, 12.

[16] Meng Fanqiang, Lyu Yunbin, Zhao Hongyuan, et al. LsrR-like protein responds to stress tolerance by regulating polysaccharide biosynthesis in *Lactiplantibacillus plantarum* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 225: 1193–1203.

[17] 张英华, 霍贵成, 郭鸽. 乳酸菌冷冻干燥保护剂的筛选及加速储存稳定性试验[J]. 中国乳品工业, 2007, 35(2): 8–10, 26.
Zhang Yinghua, Huo Guicheng, Guo Ling. Selection of the cryoprotectants for lactic acid bacteria and the accelerated storage test [J]. China Dairy Industry, 2007, 35(2): 8–10, 26.

[18] 陈胜杰, 高翔, 袁戎宇. 真空冷冻干燥法制备益生菌粉的冻干保护剂配方优化[J]. 食品工业科技, 2021, 42(1): 182–187, 196.
Chen Shengjie, Gao Xiang, Yuan Rongyu. Formulation optimization of freeze-drying protectant for probiotics powder by vacuum freeze-drying [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(1): 182–187, 196.

[19] van den Berg D J C, Smits A, Pot B, et al. Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food fermentation processes and culture collections [J]. Food Biotechnology, 1993, 7(3): 189–205.

[20] 范洪臣, 柴利平, 韩雪, 等. 动物双歧杆菌冻干保护剂配方优化及酸对菌粉存活率的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(7): 95–103.
Fan Hongchen, Chai Liping, Han Xue, et al. Formulation optimization of lyophilized protective agent for Bifidobacterium animalis and its effect on the survival rate of bacterial powder [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2023, 14(7): 95–103.

[21] Ambros S, Hofer F, Kulozik U. Protective effect of sugars on storage stability of microwave freeze-dried and freeze-dried *Lactobacillus paracasei* F19 [J]. Journal of Applied Microbiology, 2018, 125(4): 1128–1136.

[22] Oluwatosin S O, Tai S L, Fagan-Endres M A. Sucrose, maltodextrin and inulin efficacy as cryoprotectant, preservative and prebiotic-towards a freeze dried *Lactobacillus plantarum* topical probiotic [J]. Biotechnology Reports, 2022, 33: e00696.

[23] Bodzen A, Jossier A, Dupont S, et al. Design of a new lyoprotectant increasing freeze-dried *Lactobacillus* strain survival to long-term storage [J]. BMC Biotechnology, 2021, 21(1): 66.

[24] 赵静, 梁金钟. 直投式产 γ-氨基丁酸植物乳杆菌冻干保护剂生产工艺的优化[J]. 食品工业科技, 2015, 36(9): 140–143.
Zhao Jing, Liang Jinzhong. Optimization of cryoprotectants production process for direct vat set *Lactobacillus plantarum* with high-yield of γ-amino butyric acid [J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(9): 140–143.

[25] 吴家琳, 李滢, 刘振杰, 等. 益生菌冷冻干燥高活性保护机制研究进展[J]. 微生物学报, 2024, 64(5): 1402–1416.
Wu Jialin, Li Ying, Liu Zhenjie, et al. Research progress in the mechanism of freeze-drying in protecting the high vitality of probiotics [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(5): 1402–1416.

[26] Di Lijun, Ma Wenlong, Kang Wenli, et al. Synergistic combination of cryoprotectants for high freeze-dried survival rate and viable cell counts of *Streptococcus thermophilus* [J]. Drying Technology, 2023, 41(9): 1444–1453.

[27] Ma Wenlong, Li Yinghua, Kang Wenli, et al. Synergistic combination of cryoprotectants improved freeze-dried survival rate and viable counts of *Lactiplantibacillus plantarum* [J]. International Journal of Dairy Technology, 2024, 77(2): 348–357.

[28] Oldenhof H, Wolkers W F, Fonseca F, et al. Effect of sucrose and maltodextrin on the physical properties and survival of air-dried *Lactobacillus* bulgaricus: an *in situ* Fourier transform infrared spectroscopy study [J]. Biotechnology Progress, 2005, 21(3): 885–892.

[29] 樊振南, 佟立涛, 周素梅, 等. 植物乳杆菌 YI-Y2013 冻干保护剂配方优化[J]. 食品与机械, 2017, 33(9): 126–130, 140.
Fan Zhennan, Tong Litao, Zhou Sumei, et al. Optimization of freeze-drying protectantfor Lactobacillus plantarum YI-Y 2013 [J]. Food & Machinery, 2017, 33(9): 126–130, 140.

[30] 郑飏衣. 清酒乳杆菌的高密度培养及冻干保护剂的筛选[D]. 郑州: 河南农业大学, 2025: 64–79.
Zheng Yangyi. High-density cultivation of latilactobacillus sakei and screening of protective agents for freeze-drying [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2025: 64–79.

[31] Jin Zhou, Jin Guoguo, Wu Yating, et al. Different concentrations of exopolysaccharides enhance the freeze resistance of *Lactobacillus plantarum*: transcriptomics and metabolomics [J]. Journal of Dairy Science, 2025, 108(11): 11996–12013.

[32] 周新丽, 刘建峰, 张绍志, 等. 生物材料冻干保护剂的热分析[J]. 制冷学报, 2008, 29(5): 54–57.
Zhou Xinli, Liu Jianfeng, Zhang Shaozhi, et al. Thermal analysis on lyoprotectants for biomaterials [J]. Journal of Refrigeration, 2008, 29(5): 54–57.

(责任编辑: 蔡世佳 韩晓红)