DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20260319004
**引用格式**: 张仔瑶, 郝宇, 陈玲, 等. 乳酸片球菌 TC-4 的培养基优化及冻干保护剂筛选[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(10): 231–243.
ZHANG ZY, HAO Y, CHEN L, *et al*. Optimization of the culture medium and screening of freeze-drying protectants for *Pediococcus acidilactici* TC-4 [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(10): 231–243. (in Chinese with English abstract).

# 乳酸片球菌 TC-4 的培养基优化及冻干保护剂筛选

张仔瑶[1,2], 郝　宇[1,2], 陈　玲[2,3], 李　滢[2,3], 谢新强[2], 梁婷婷[2], 满朝新[1*], 吴清平[1,2*]

[1. 东北农业大学食品学院, 哈尔滨　150030; 2. 广东省科学院微生物研究所, 华南应用微生物国家重点实验室, 广东省微生物安全与健康重点实验室, 国家卫健委微生物食品营养与安全科技创新平台, 国家市场监督管理总局重点实验室(食品微生物安全大数据技术), 广州　510070; 3. 广东省微生物分析检测中心, 广州　510070]

**摘　要: 目的**　对乳酸片球菌 TC-4 培养基组分及冻干保护剂配方进行优化。**方法**　采用单因素实验、Plackett-Burman 实验与响应面法相结合, 对乳酸片球菌 TC-4 培养基的成分、质量浓度以及冻干保护剂的配方展开筛选。**结果**　最优培养基成分组合: 葡萄糖 26 g/L、酵母浸粉 30 g/L, 乙酸钠 8 g/L、柠檬酸氢二铵 2 g/L、磷酸氢二钾 2 g/L、硫酸镁 0.4 g/L、硫酸锰 0.075 g/L、吐温 80 1.0 g/L, 活菌数由 $3.50\times10^9$ CFU/mL 提高至 $1.09\times10^{10}$ CFU/mL, 是优化前的 3.11 倍。最优冻干保护剂配方: *L*-谷氨酸钠 8%, 麦芽糖醇 14%, 脱脂乳粉 18%, 存活率达到 90.77%。**结论**　完成乳酸片球菌 TC-4 的培养基优化, 成功制备高活菌制剂, 为该菌株的产业化推进奠定坚实理论基础。

**关键词:** 乳酸片球菌; 高尿酸血症; 培养基; 冻干保护剂

## Optimization of the culture medium and screening of freeze-drying protectants for *Pediococcus acidilactici* TC-4

ZHANG Zi-Yao[1,2], HAO Yu[1,2], CHEN Ling[2,3], LI Ying[2,3], XIE Xin-Qiang[2], LIANG Ting-Ting[2], MAN Chao-Xin[1*], WU Qing-Ping[1,2*]

(1. *College of Food Science*, *Northeast Agricultural University*, *Harbin* 150030, *China*; 2. *State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China*, *Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health*, *National Health Commission Science and Technology Innovation Platform for Nutrition and Safety of Microbial Food*, *Key Laboratory of Big Data Technologies for Food Microbiological Safety*, *State Administration for Market Regulation*, *Institute of Microbiology*, *Guangdong Academy of Sciences*, *Guangzhou* 510070, *China*; 3. *Guangdong Microbial Analysis and Detection Center*, *Guangzhou* 510070, *China*)

**ABSTRACT: Objective**　To optimize the composition of the culture medium for *Pediococcus acidilactici* TC-4 and the formula of freeze-drying protectants. **Methods**　The composition and mass concentration of the culture medium for *Pediococcus acidilactici* TC-4 and the formula of the freeze-drying protectant were screened by combining

**收稿日期:** 2026-03-19
**基金项目:** 国家重点研发计划项目(2023YFF1104100); 广东省重点研发专项(2022B111070006); 广东省科学院项目(2022GDASZH-2022010101)
**第一作者:** 张仔瑶(2000—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为功能性益生菌发酵与制剂开发。E-mail: 2783855987@qq.com
***通信作者:** 满朝新(1978—), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为食品科学。E-mail: mcxwh2006@qq.com
吴清平(1962—), 男, 博士, 研究员, 中国工程院院士, 主要研究方向为微生物食品安全与健康。E-mail: wuqp203@163.com

single-factor experiments, Plackett-Burman experiments and response surface methodology. **Results** The optimal composition of the culture medium was: Glucose 26 g/L, yeast extract 30 g/L, sodium acetate 8 g/L, diammonium hydrogen citrate 2 g/L, dipotassium phosphate 2 g/L, magnesium sulfate 0.4 g/L, manganese sulfate 0.075 g/L and Tween 80 1 g/L. The viable count increased from $3.50\times10^9$ CFU/mL to $1.09\times10^{10}$ CFU/mL, which was 3.11 times that before optimization. The optimal formula of the freeze-drying protectant was: Sodium *L*-glutamate 8%, maltitol 14%, skim milk powder 18%, and the survival rate reached 90.77%. **Conclusion** The optimization of the culture medium for *Pediococcus acidilactici* TC-4 is completed, and a high-viable probiotic preparation is successfully prepared, lays a solid theoretical foundation for the industrialization of this strain.

**KEY WORDS:** *Pediococcus acidilactici*; hyperuricemia; culture medium; freeze-drying protectant

## 0 引 言

高尿酸血症(hyperuricemia, HUA)是由嘌呤代谢异常导致的病症, 临床诊断有明确标准: 在保持常规嘌呤饮食的基础上, 需在不同日期进行两次空腹血清尿酸检测, 若男性检测结果高于 420 μmol/L、女性高于 360 μmol/L, 即可判定为 HUA[1]。持续性的 HUA 会导致痛风的产生[2], 研究发现 30 岁以下人群 HUA 患病率近 10 年一直在稳步增长[3], 患病人群越来越年轻化。目前治疗 HUA 的一线药物有别嘌呤醇、非布司他等, 但使用过程中可能会增加心血管不良事件[4]、皮肤问题[5]、肾脏损伤[6]的风险, 长期临床应用存在一定局限性。鉴于此, 亟需探寻更为安全、可长期应用的干预手段[7]。近年来, 很多研究都证实了益生菌降低体内尿酸水平的有效性, 并且具有绿色、安全等优点。其中, 蚁硕钊[8]研究发现发酵乳杆菌 SM1312 和短乳杆菌 SR52-2 通过降解嘌呤核苷、调节肠道菌群, 可安全降低尿酸水平。发酵乳杆菌 GR-3 可通过降解尿酸、促进其经粪便和尿液排泄, 且调节肠道菌群、抗炎护肠肾, 改善 HUA[9]。本研究室前期成功筛选出一株具有降低尿酸水平能力的益生菌: 乳酸片球菌 TC-4 (*Pediococcus acidilactici* TC-4), 旨在为高尿酸人群提供新的防治方案。

然而, 实现大规模工业化生产, 产品中足量的活菌数是前提。培养基优化能够显著提升菌株在发酵过程中的细胞密度, 同时有效延缓菌体衰老进程[10]。CHOI 等[11]利用响应面优化法对乳酸菌的培养基成分进行优化, 比未优化培养基(2.429 g/L)提高 1.58 倍, 刘辉等[12]采用单因素法结合响应面法与主成分分析法优化副干酪乳杆菌 ZLP019 发酵培养基, 发酵液乳酸菌数达 $5.34\times10^9$ CFU/mL, 较优化前提升 2.5 倍。此外, 真空冷冻干燥技术制成固体菌粉, 通过筛选有效的冻干保护剂, 能够最大限度地减少干燥过程对菌体的损伤。研究发现, 单一保护剂的防护效果具有局限性, 其保护作用难以达到理想状态[13], LI 等[14]通过响应面分析法将 10.7%脱脂乳粉、3.0% *L*-谷氨酸钠、10.0% *D*-海藻糖进行复配后, 菌株存活率高达 91.69%, 韩德权等[15]以脱脂乳质量浓度为 13.68 g/100 mL、甘油质量浓度为 1.97 g/100 mL、维生素 C 质量浓度为 0.20 g/100 mL 时, 得到最大细胞存活率 85.01%, 因此, 研发复合型保护剂是提升菌体存活率的关键方法[16]。乳酸菌工业化生产中培养基成本高、环保性不足, 以及冻干保护剂适配性差、菌株存活率低的问题, 开发适配于特定菌株的培养基、冻干保护剂配方亟待解决。

本研究针对降尿酸益生菌乳酸片球菌 TC-4, 优化发酵过程中的培养基成分, 目标在于显著提升发酵终点活菌数, 为实现规模化生产奠定菌量基础。同时, 筛选高效的冻干保护剂, 最大限度地提高冻干过程的菌体存活率, 从而获得高稳定性的冻干菌粉, 为开发降尿酸益生菌制剂提供坚实的数据基础与工艺支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌 株

乳酸片球菌 TC-4 保藏于广东省微生物菌种保藏中心(GDMCC), 保藏编号为 GDMCC 67936。

### 1.2 试 剂

葡萄糖、蔗糖、乳糖、海藻糖、异麦芽糖、酵母浸粉、乙酸钠、磷酸氢二钾、硫酸镁、硫酸锰、菊粉、吐温 80、乳清蛋白粉、大豆蛋白胨(食品级)、MRS 肉汤培养基(生物试剂级)、磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.2~7.4)(广东环凯微生物科技有限公司); 柠檬酸氢二铵(分析纯, 广州化学试剂厂); *L*-谷氨酸钠、*L*-谷氨酰胺(分析纯, 上海麦克林生化科技股份有限公司); 麦芽糖醇(分析纯, 上海笛柏生物科技有限公司); 低聚木糖、低聚果糖、抗性糊精、麦芽糊精、低聚异麦芽糖(分析纯, 上海源叶生物科技有限公司); 花生饼粉、棉籽饼粉、玉米浆、壳寡糖(分析纯, 北京鸿润宝顺科技有限公司); *L*-谷氨酸(上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 甘露醇(分析纯, 广东六山化工厂); *L*-色氨酸[分析纯, 生工生物工程(上海)股份有限公司]; *L*-赖氨酸[分析纯, 华中海威(北京)基因科技有限公司]; 脱脂乳粉(食品级, 北大荒完达山乳业股份有限公司)。

### 1.3 仪器与设备

BSA224S-CW 电子天平(精度 1 mg, 北京赛多利斯科

学仪器有限公司); BSC-1360IIA2 生物洁净安全柜、SHP-250 生化培养箱(广东环凯微生物科技有限公司); DG-250 厌氧工作站(英国 DonWhitleyScientific 公司); MQD-B3R 振荡培养箱(上海旻泉仪器有限公司); HVE/HVA 蒸汽灭菌锅(日本 HIRAYAMA 公司); 3-30KS 高速冷冻离心机(西格玛奥德里奇贸易有限公司); GI54TW 立式高压灭菌锅(上海庆开实验设备有限公司)。

## 1.4 方　法

### 1.4.1 菌株的活化及种子液的制备

甘油管保存的菌种, 先在 MRS 固体培养基平板上进行划线接种分离, 37 ℃恒温培养 24 h 后挑取单菌落, 接种至液体 MRS 培养基并于同温度下静置培养 24 h; 经 2 次液体活化后, 按 2%接种量转接至优化培养基, 继续 37 ℃静置培养 24 h, 此为后续实验的种子液。

### 1.4.2 培养基配制

液体培养基: 葡萄糖 20 g/L、酵母浸粉 18 g/L、磷酸氢二钾 2 g/L、乙酸钠 5 g/L、柠檬酸氢二铵 2 g/L、硫酸锰 0.05 g/L、硫酸镁 0.2 g/L、吐温 80 1 g/L, 作为乳酸片球菌 TC-4 的基础培养基进行优化。装液量为 5 mL, 2% (*V*:*V*)的接种量。

### 1.4.3 乳酸片球菌 TC-4 培养基成分优化

(1)碳源及其质量浓度的优化

将葡萄糖、蔗糖、异麦芽糖、海藻糖、乳糖(各 20 g/L)及无碳源对照作为单一碳源配制培养基, 接种 2%乳酸片球菌 TC-4 菌液于 5 mL 培养基中, 37 ℃厌氧培养 24 h, 测定活菌数, 筛选最适碳源。

以上述最适碳源设置 10、15、20、30、35 g/L 5 个质量浓度梯度, 接种 2%菌液于 5 mL 培养基中, 37 ℃厌氧培养 24 h 后检测活菌数, 确定最佳添加质量浓度。

(2)氮源及其质量浓度的优化

在确定的最佳碳源基础上, 将 MRS 培养基的氮源分别替换为等量的玉米浆干粉、酵母浸粉、大豆蛋白胨、花生饼粉、棉籽饼粉, 并设无氮源对照。将筛选出的最适氮源设置为 18、22、26、30、34 g/L 5 个质量浓度梯度, 培养方法同 1.4.1, 确定其最佳添加质量浓度。

(3)缓冲盐添加量的优化

针对培养基中柠檬酸氢二铵、磷酸氢二钾质量浓度变量, 均设置为 5 个水平, 依次为 0、1、2、3、4 g/L, 对培养基中无水乙酸钠的质量浓度设置 5 个不同梯度水平, 分别为 0、2.5、5.0、7.5、10.0 g/L, 每次实验仅改变一种缓冲盐质量浓度, 其余成分固定, 培养方法同 1.4.1。

(4)微量元素及吐温 80 的优化

分别考察硫酸镁(0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 g/L)和硫酸锰(0、0.025、0.050、0.075、0.100 g/L)及吐温 80 (0、0.5、1.0、1.5、2.0 g/L)的质量浓度影响。每次只改变一种, 其他培养基成分及培养条件均保持一致, 培养方法同 1.4.1。通过平板计数法对活菌数量进行测定, 以确定最适质量浓度。

(5) Plackett-Burman 实验设计

采用 Plackett-Burman 实验方法, 对葡萄糖、酵母浸粉、硫酸镁、硫酸锰、乙酸钠、柠檬酸氢二铵、磷酸氢二钾、吐温 80 共 8 个因素进行评价。根据单因素的实验结果确定各因素的高、低水平。通过方差分析筛选显著因素进行后续实验。

(6)最陡爬坡实验设计

根据 Plackett-Burman 实验结果, 确定显著因素, 设计最陡爬坡实验, 确定响应面中心点因素。

(7)响应面法优化

基于最陡爬坡实验的中心点, 以葡萄糖、乙酸钠、磷酸氢二钾 3 因素设置合适添加量作为变量。运用 Design-Expert 13.0 软件, 通过 Box-Behnken 法建立三因素三水平数学模型, 进一步优化乳酸片球菌 TC-4 培养基配方。

### 1.4.4 冻干保护剂筛选

(1)菌体培养

两次活化后按 2%的接种量转接至优化后的培养基, 在 37 ℃厌氧环境(10% $H_2$+ 10% $CO_2$+ 80% $N_2$)中静置培养 12 h。

(2)冷冻干燥

取 1 mL 的发酵液 6000 x*g*/min 离心 5 min 后去掉上清液, 将菌体与冻干保护剂进行混合后涡旋混匀, 放入–80 ℃冰箱冷冻 8 h 后进行冷冻干燥。采用程序控温冷冻干燥机进行冻干: 预冻阶段(–40 ℃, 4 h)—一次干燥(–20 ℃, 真空度 10 Pa, 24 h)二次干燥(25 ℃, 真空度 5 Pa, 6 h)。将得到的菌粉放入–80 ℃冰箱冷藏备用。

(3)活菌计数

对发酵液用 PBS 缓冲液进行稀释, 选择合适的梯度进行涂布、厌氧培养 24 h 后菌落计数为冻干前的活菌数。将冻干后的菌粉复水, 采用与冻干前活菌计数相同的方法进行处理计数, 进行存活率的计算, 计算见公式(1)。

$$D/\% = \frac{m_1}{m_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中: $D$ 为冻干菌粉存活率, %; $M_0$ 为冻干前活菌数, CFU/mL; $M_1$ 为冻干后活菌数, CFU/mL。

(4)冻干保护剂种类筛选

选择多种真空冷冻干燥过程中对乳酸片球菌有保护作用的保护剂, 包括 *L*-谷氨酸钠、壳寡糖、*L*-谷氨酸、甘露醇、麦芽糖醇、抗坏血酸、低聚异麦芽糖、低聚果糖、麦芽糊精、抗性糊精、海藻糖、乳清蛋白、菊粉、*L*-谷氨酰胺、*L*-色氨酸、脱脂乳粉、*L*-赖氨酸, PBS 缓冲液为对照组。首先使用 10% (*m*:*V*)质量浓度保护剂、菌泥与各类冻干保护剂的质量比为 1:4 进行初步筛选, 根据初筛结果, 选用 5 种保护剂作为单一保护剂进行筛选。

(5)单一冻干保护剂质量浓度筛选

根据冻干保护剂种类筛选结果, 采用单因素试验, 分别设置不同质量浓度梯度 *L*-谷氨酸钠(4%、6%、8%、10%、

12%、14%)、麦芽糖醇(8%、10%、12%、14%、16%、18%)、麦芽糊精(8%、10%、12%、14%、16%、18%)抗性糊精(8%、10%、12%、14%、16%、18%)、脱脂乳粉(10%、12%、14%、16%、18%、20%)对乳酸片球菌 TC-4 菌体冻干的保护效果。

(6)冻干保护剂 Plackett-Burman 实验设计

采用 Plackett-Burman 实验, 对 *L*-谷氨酸钠、麦芽糖醇、麦芽糊精、抗性糊精、脱脂乳粉 5 种因素展开考察, 根据单因素实验选取存活率最高点附近的添加量设高、低两水平。通过方差分析筛选显著因素进行后续实验。

(7)冻干保护剂最陡爬坡实验设计

根据 Plackett-Burman 实验结果, 确定了 *L*-谷氨酸钠、麦芽糖醇、脱脂乳粉 3 个显著因素, 设计最陡爬坡实验, 确定响应面中心点因素。

(8)冻干保护剂响应面优化实验设计

基于最陡爬坡实验的中心点, 以 *L*-谷氨酸钠、麦芽糖醇、脱脂乳粉 3 因素设置合适添加量作为变量。运用 Design-Expert 13.0 软件, 通过 Box-Behnken 法建立 3 因素 3 水平数学模型, 进一步优化乳酸片球菌 TC-4 冻干保护剂配方。

### 1.5 数据处理

实验中所有数据均设置 3 组平行测定, 结果均是平均数±标准偏差的形式, 采用 Excel 2019 进行统计分析。$P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著。GraphPad Prism version 10.0 分析软件进行绘图。

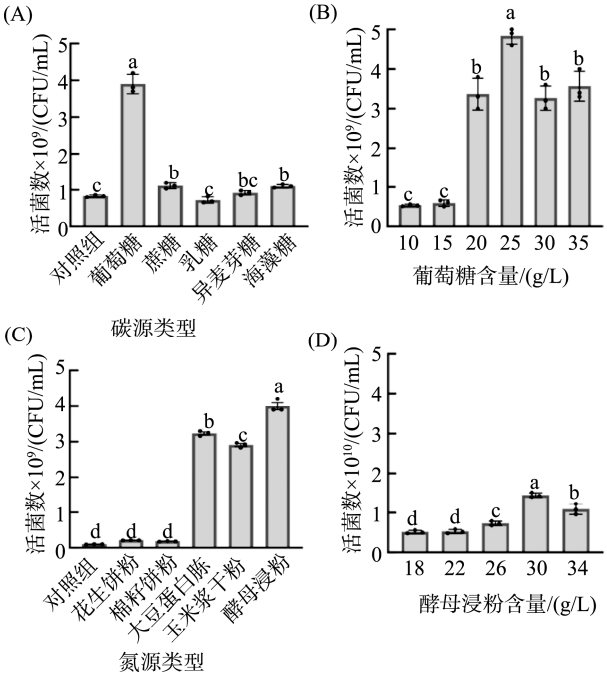
## 2 结果与分析

### 2.1 培养基成分优化

#### 2.1.1 碳氮源及其含量的筛选

碳源为乳酸菌提供主要能量, 对菌株的生长速率有着直接作用。由图 1(A)可知葡萄糖是乳酸片球菌 TC-4 的最适碳源, 作为单糖, 它可直接参与糖酵解过程, 能迅速释放能量, 更易被微生物快速利用, 进而促进益生菌快速增殖[17], 由图 1(B)可以看出活菌数随葡萄糖质量浓度的变化呈先上升后下降的态势, 且在质量浓度为 25 g/L 时达到最大值。当质量浓度低于此水平(10 g/L、15 g/L)时, 碳源不足成为限制菌体生长与繁殖的关键因素; 而当质量浓度过高(30 g/L、35 g/L)时, 过高的渗透压可能对细胞造成胁迫[18], 不利于菌体的生长。因此, 25 g/L 被确定为该菌株在最适培养基中的最佳葡萄糖添加质量浓度。

由图 1(C)可知, 当酵母浸粉为氮源活菌数最高, 相比于其他氮源, 是由于其富含多肽、氨基酸、维生素等全面营养物质, 易于被微生物吸收[19]。由图 1(D)可知, 酵母浸粉质量浓度对活菌数产生显著影响, 18~26 g/L 等低质量浓度导致营养供给不足, 不能对 TC-4 的生长有很好的促进作用; 当质量浓度为 30 g/L 时, 活菌数达到峰值, 这一发现与范佳硕等[20]在优化植物乳植杆菌 BCO0171 的发酵培养基时, 同样确定酵母浸粉的最佳质量浓度为 30 g/L 一致。在质量浓度为 34 g/L 时活菌数降低, 过量的氮源会打破最佳的碳氮平衡, 因碳源被快速耗尽而限制菌体后续生长, 从而导致生物量降低[21]。故选用 30 g/L 的酵母浸粉进行后续研究。




注: 不同的小写字母表示组间存在显著性差异($P<0.05$), 图 2~3、5~6 同。

图 1 不同碳氮源及含量对乳酸片球菌 TC-4 生长的影响

Fig.1 Effects of different carbon and nitrogen sources and their content on the growth of *Pediococcus acidilactici* TC-4

#### 2.1.2 缓冲盐含量的筛选

在乳酸菌培养基中, 缓冲盐是维持适宜 pH 环境的关键成分[22]。由图 2(A)、2(B)可知, 柠檬酸氢二铵与磷酸氢二钾均在质量浓度为 2 g/L 时活菌数最高, 其在提供必需矿物元素与参与能量代谢的同时, 质量浓度过高会因渗透压抑制生长。这与章帅文等[23]在发酵乳杆菌高密度培养中的研究结论一致; 由图 2(C)所示, 确定 7.5 g/L 乙酸钠为最佳质量浓度, 与对德氏乳杆菌保加利亚亚种培养基优化中乙酸钠质量浓度的结果相似[24], 表明该质量浓度在提高最终活菌数方面的普适性与有效性。

#### 2.1.3 微量元素及吐温 80 含量的筛选

微量元素在乳酸菌培养基中虽然需求量极少, 但对菌体的生长、代谢活性及产物合成具有不可忽视的调控作用。图 3(A)可以看出硫酸锰质量浓度为 0.075 g/L 为最适质量浓度, 与对植物乳杆菌 BF125 中硫酸锰质量浓度筛选的研究结果高度吻合[25]。偏离此最佳质量浓度(如 0.05 g/L 或 0.10 g/L)均会导致活菌数显著下降。图 3(B)显示, 硫酸镁的最适添加质量浓度为 0.4 g/L, 这和植物乳植杆菌 P6 发酵过程中 0.4 g/L 的 $Mg^{2+}$能够最有效地充当酶辅因子, 从而显著提升菌体活菌数一致[26]。

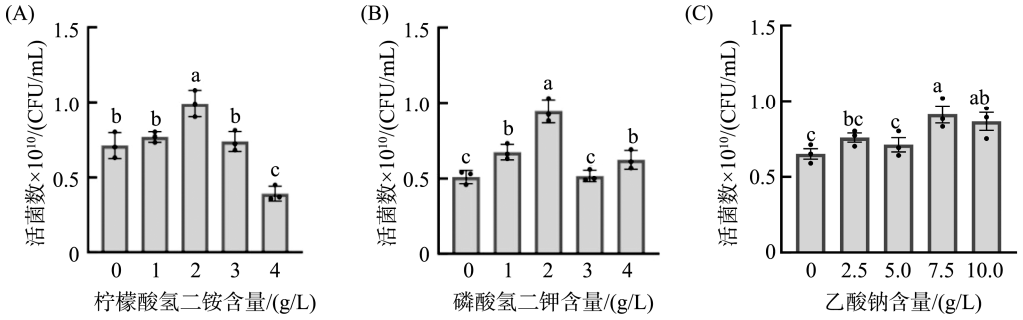



图 2　不同缓冲盐对乳酸片球菌 TC-4 生长的影响

Fig.2　Effects of different buffer salts on the growth of *Pediococcus acidilactici* TC-4

吐温 80 作为非离子表面活性剂, 可降低表面张力、增强膜通透性, 从而促进乳酸菌摄取营养并提高生物量[27]。由图 3(C)可知, 当其添加量为 1.0 g/L 时, 菌体生物量达到最大, 活菌数达到了(1.01±0.04)×10$^{10}$ CFU/mL, 质量浓度不足时, 其增加膜通透性、促进营养物质摄取的效果不充分。继续增加质量浓度未进一步地促进生长, 表明不需要过高质量浓度就可达到促进菌体生长的作用[28]。

2.1.4　Plackett-Burman 实验结果

选择葡萄糖、酵母浸粉、硫酸镁、硫酸锰、乙酸钠、柠檬酸氢二铵、磷酸氢二钾、吐温 80 等 8 个因素进行考察。Plackett-Burman 实验结果如表 1, 方差分析结果表明(表 2), 模型 $P$<0.05, $R^2$=0.9726 表明模型显著, 相关性较好。其中葡萄糖、磷酸氢二钾、乙酸钠对 TC-4 的生长影响最显著($P$<0.05), 因此选择这 3 个因素进行最陡爬坡实验。其余因素为非显著因素, 不作为后续实验的研究对象。

2.1.5　最陡爬坡实验结果

由表 2 中 $E$ 可知, 葡萄糖、乙酸钠这两个因素对 TC-4 活菌数的影响均为正效应, 设计最陡爬坡实验时应增加因素的水平; 磷酸氢二钾为负效应, 应减少因素水平。第 3 组的活菌数最高(表 3), 因此选择该组作为实验中心点进行后续实验。

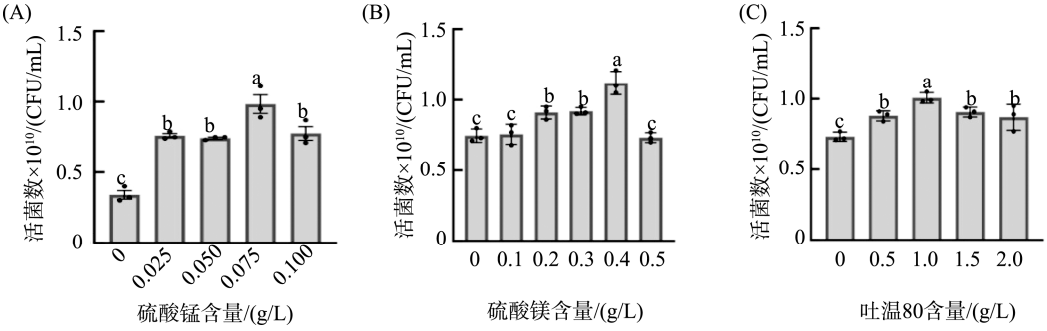



图 3　不同微量元素及吐温 80 对乳酸片球菌 TC-4 生长的影响

Fig.3　Effects of different trace elements and tween 80 on the growth of *Pediococcus acidilactici* TC-4

**表 1　Plackett-Burman 实验设计结果**

**Table 1　Results of the Plackett-Burman experimental design**

| 组别/因素 | 水平/(g/L) | | | | | | | | 活菌数×10$^{10}$ /(CFU/mL) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *A*(葡萄糖) | *B*(酵母浸粉) | *C*(硫酸镁) | *D*(硫酸锰) | *E*(乙酸钠) | *F*(柠檬酸氢二铵) | *G*(磷酸氢二钾) | *H*(吐温 80) | |
| 1 | 20 | 34 | 0.5 | 0.025 | 10 | 3 | 3 | 1 | 0.50±0.03$^{bcde}$ |
| 2 | 30 | 34 | 0.3 | 0.025 | 5 | 3 | 1 | 2 | 0.55±0.10$^{bc}$ |
| 3 | 20 | 34 | 0.5 | 0.125 | 5 | 1 | 1 | 2 | 0.45±0.05$^{cde}$ |
| 4 | 20 | 26 | 0.3 | 0.025 | 5 | 1 | 1 | 1 | 0.39±0.05$^{e}$ |
| 5 | 30 | 26 | 0.3 | 0.025 | 10 | 1 | 3 | 2 | 0.57±0.01$^{b}$ |
| 6 | 30 | 26 | 0.5 | 0.125 | 5 | 3 | 3 | 2 | 0.47±0.05$^{bcde}$ |
| 7 | 20 | 34 | 0.3 | 0.125 | 10 | 1 | 3 | 2 | 0.53±0.06$^{bcd}$ |
| 8 | 20 | 26 | 0.5 | 0.025 | 10 | 3 | 1 | 2 | 0.49±0.08$^{bcde}$ |
| 9 | 30 | 26 | 0.5 | 0.125 | 10 | 1 | 1 | 1 | 0.72±0.02$^{a}$ |
| 10 | 20 | 26 | 0.3 | 0.125 | 5 | 3 | 3 | 1 | 0.40±0.04$^{e}$ |
| 11 | 30 | 34 | 0.5 | 0.025 | 5 | 1 | 3 | 1 | 0.43±0.06$^{de}$ |
| 12 | 30 | 34 | 0.3 | 0.125 | 10 | 3 | 1 | 1 | 0.71±0.12$^{a}$ |

注: 不同的小写字母表示组间存在显著性差异($P$<0.05)。表 3~4、6、8~9 同。

表 2 Plackett-Burman 实验回归分析结果

Table 2 Regression analysis results of the Plackett-Burman experimental

| 来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | *F* | *P* | *E* | 显著性 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 模型 | 0.1241 | 8 | 0.0155 | 13.3300 | 0.0283 | | * |
| *A*(葡萄糖) | 0.0397 | 1 | 0.0397 | 34.0900 | 0.0100 | 0.0575 | * |
| *B*(酵母浸粉) | 0.0014 | 1 | 0.0014 | 1.2100 | 0.3517 | 0.0108 | |
| *C*(硫酸镁) | 0.0007 | 1 | 0.0007 | 0.5800 | 0.5017 | –0.0075 | |
| *D*(硫酸锰) | 0.0102 | 1 | 0.0102 | 8.7700 | 0.0595 | 0.0292 | |
| *E*(乙酸钠) | 0.0574 | 1 | 0.0574 | 49.3200 | 0.0059 | 0.0692 | ** |
| *F*(柠檬酸氢二铵) | 0.0001 | 1 | 0.0001 | 0.0644 | 0.8160 | 0.0025 | |
| *G*(磷酸氢二钾) | 0.0140 | 1 | 0.0140 | 12.0400 | 0.0404 | –0.0342 | * |
| *H*(吐温 80) | 0.0007 | 1 | 0.0007 | 0.5800 | 0.5017 | –0.0075 | |
| 残差 | 0.0035 | 3 | 0.0012 | | | | |
| 总变异 | 0.1276 | 11 | | | | | |

注: *表示差异显著, $P<0.05$; **表示差异极显著, $P<0.01$。表 7 同。

表 3 最陡爬坡实验设计及结果

Table 3 Experimental design and results of the steepest climb

| 组别/因素 | 水平/(g/L) | | | 活菌数×$10^{10}$/(CFU/mL) |
|---|---|---|---|---|
| | *A*(葡萄糖) | *E*(乙酸钠) | *G*(磷酸氢二钾) | |
| 1 | 20.0 | 5.5 | 3.0 | 0.62±0.06$^{cd}$ |
| 2 | 22.5 | 6.5 | 2.5 | 0.81±0.02$^{b}$ |
| 3 | 25.0 | 7.5 | 2.0 | 1.03±0.09$^{a}$ |
| 4 | 27.5 | 8.5 | 1.5 | 0.84±0.11$^{b}$ |
| 5 | 30.0 | 9.5 | 1.0 | 0.76±0.05$^{bc}$ |
| 6 | 32.5 | 10.5 | 0.5 | 0.58±0.13$^{d}$ |

2.1.6 Box-Behnken 实验结果

基于最陡爬坡实验结果, 选取葡萄糖、乙酸钠、磷酸氢二钾 3 因素 3 水平进行响应面优化, 探究其对乳酸片球菌 TC-4 活菌数的影响(表 4)。经 Design-Expert 13.0 分析, 得到多元二次回归方程 $Y=1.05+0.0487A+0.0863B-0.0375C-0.005AE-0.0675AG+0.0175EG-0.1095A^2-0.1495E^2-0.1670G^2$, 方差分析显示模型 $F$ 为 22.8500 ($P=0.0002$)、失拟项 $F$ 为 2.3600 ($P=0.2121$), 决定系数 $R^2=0.9671$、变异系数 5.17%<10%, 表明模型极显著、拟合度高且可用(表 5)。其中, 葡萄糖与磷酸氢二钾的交互作用(*AG*)及各因素二次项($A^2$、$E^2$、$G^2$)显著($P<0.05$), 响应面图(图 4)呈开口向下的钟罩型, 存在最优条件。模型预测最佳添加量为葡萄糖 26.313 g/L、乙酸钠 8.052 g/L、磷酸氢二钾 1.849 g/L, 对应活菌数 $1.075\times10^{10}$ CFU/mL; 简化为实际应用条件葡萄糖 26 g/L、乙酸钠 8 g/L、磷酸氢二钾 2 g/L 后, 验证活菌数达 $1.09\times10^{10}$ CFU/mL, 与预测值接近。与优化前的 $3.50\times10^{9}$ CFU/mL 相比提升了 3.11 倍。

## 2.2 冻干保护剂筛选结果

2.2.1 冻干保护剂种类的筛选

本研究评估了不同种类的质量浓度为 10%的保护剂对乳酸片球菌 TC-4 冻干存活率的影响。结果如图 5 所示, *L*-谷氨酸钠、麦芽糖醇保护效果最好, 存活率分别达到了 84.62%和 82.56%, 之后是脱脂乳粉、抗性糊精、麦芽糊精对 TC-4 的保护效果较好, 存活率分别达到了 73.33%、68.20%和 63.08%, 选取这 5 种保护剂进行后续含量筛选。

表 4 Box-Behnken 实验设计及结果

Table 4 Design and results of the Box-Behnken experiment

| 组别/因素 | 水平/(g/L) | | | 活菌数×$10^{10}$/(CFU/mL) |
|---|---|---|---|---|
| | *A*(葡萄糖) | *E*(乙酸钠) | *G*(磷酸氢二钾) | |
| 1 | 25 | 5.5 | 1 | 0.69±0.04$^{hi}$ |
| 2 | 30 | 9.5 | 2 | 0.88±0.04$^{cd}$ |
| 3 | 25 | 7.5 | 2 | 1.07±0.13$^{ab}$ |
| 4 | 30 | 7.5 | 1 | 0.96±0.06$^{bc}$ |
| 5 | 20 | 7.5 | 1 | 0.67±0.02$^{hi}$ |
| 6 | 30 | 7.5 | 3 | 0.75±0.11$^{efg}$ |
| 7 | 25 | 7.5 | 2 | 1.03±0.05$^{ab}$ |
| 8 | 25 | 9.5 | 1 | 0.86±0.12$^{cde}$ |
| 9 | 30 | 5.5 | 2 | 0.75±0.05$^{efg}$ |
| 10 | 25 | 9.5 | 3 | 0.82±0.08$^{def}$ |
| 11 | 20 | 9.5 | 2 | 0.85±0.06$^{de}$ |
| 12 | 25 | 7.5 | 2 | 1.10±0.05$^{a}$ |
| 13 | 20 | 7.5 | 3 | 0.73±0.06$^{fg}$ |
| 14 | 25 | 5.5 | 3 | 0.58±0.07$^{j}$ |
| 15 | 20 | 5.5 | 2 | 0.70±0.05$^{h}$ |
| 16 | 25 | 7.5 | 2 | 1.06±0.09$^{ab}$ |
| 17 | 25 | 7.5 | 2 | 1.01±0.07$^{ab}$ |

表 5 Box-Behnken 实验回归方程方差分析

Table 5 Analysis of variance for the regression equation of the Box-Behnken experiment

| 来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | *F* | *P* | 显著性 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 模型 | 0.4009 | 9 | 0.0445 | 22.8500 | 0.0002 | 显著 |
| *A* | 0.0190 | 1 | 0.0190 | 9.7500 | 0.0168 | |
| *E* | 0.0595 | 1 | 0.0595 | 30.5300 | 0.0009 | |
| *G* | 0.0112 | 1 | 0.0112 | 5.7700 | 0.0473 | |
| *AE* | 0.0001 | 1 | 0.0001 | 0.0513 | 0.8273 | |
| *AG* | 0.0182 | 1 | 0.0182 | 9.3500 | 0.0184 | |
| *EG* | 0.0012 | 1 | 0.0012 | 0.6284 | 0.4540 | |
| $A^2$ | 0.0505 | 1 | 0.0505 | 25.9000 | 0.0014 | |
| $E^2$ | 0.0941 | 1 | 0.0941 | 48.2800 | 0.0002 | |
| $G^2$ | 0.1174 | 1 | 0.1174 | 60.2400 | 0.0001 | |
| 残差 | 0.0136 | 7 | 0.0019 | | | |
| 失拟项 | 0.0087 | 3 | 0.0029 | 2.3600 | 0.2121 | 不显著 |
| 纯误差 | 0.0049 | 4 | 0.0012 | | | |
| 总变异 | 0.4146 | 16 | | | | |

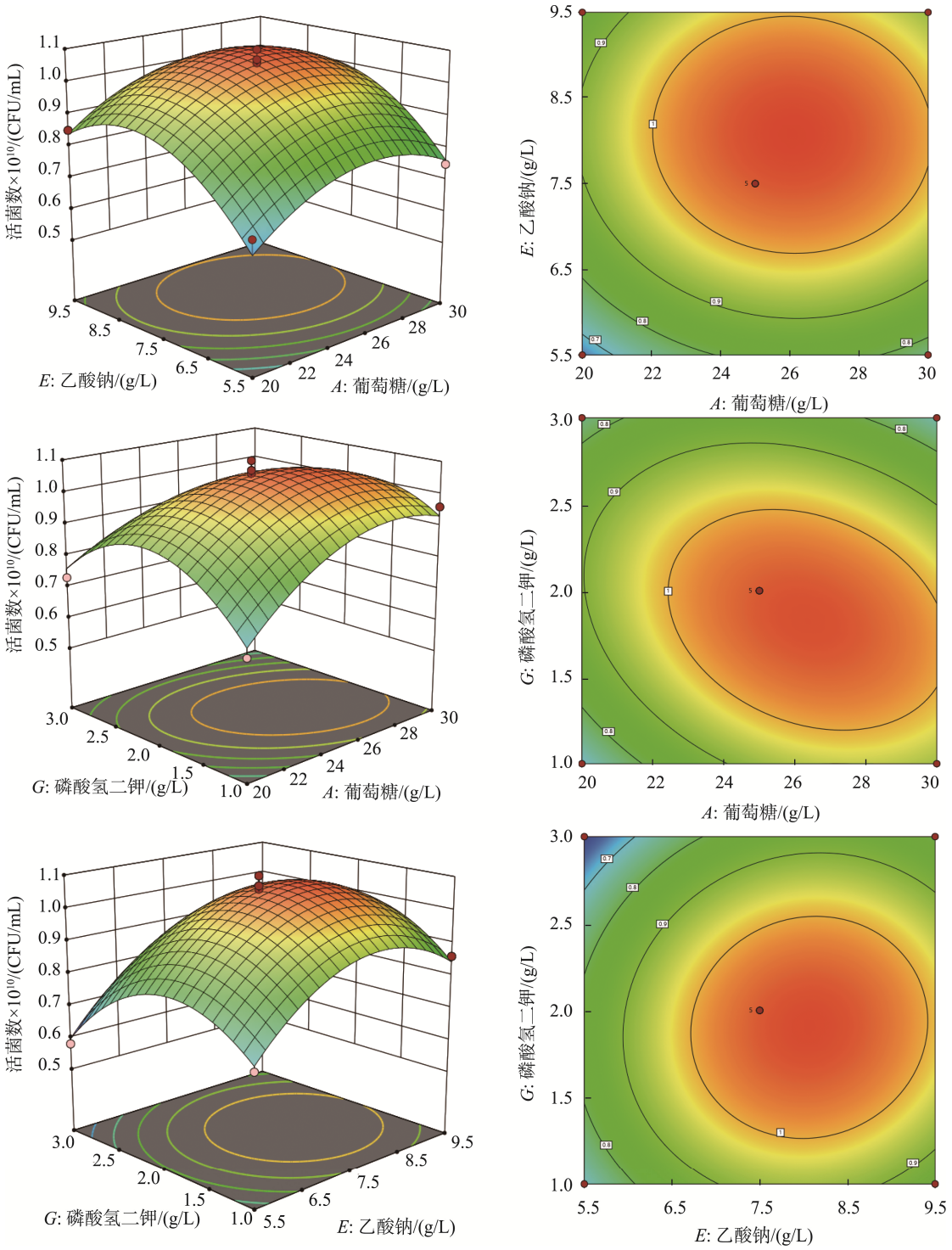



图 4　乳酸片球菌 TC-4 生长密度响应面图以及等高线图

Fig.4　Growth density response map and contour plot of *Pediococcus acidilactici* TC-4

2.2.2　单一保护剂质量浓度的筛选

*L*-谷氨酸钠作为一种小分子氨基酸，可通过其氨基与蛋白质羧基反应以稳定结构，并通过强效持水能力减轻脱水损伤，从而保护细胞[29]。如图 6(A)可知，本研究确定 *L*-谷氨酸钠的最佳浓度为 8%，此时存活率为 83.59%。该数值虽低于 ZHOU 等[30]在相同浓度下对植物乳杆菌 L5 报道的 95.65%，但仍处于较高水平，充分验证了 *L*-谷氨酸钠的有效性，差异主要源于菌株间遗传背景与生理特性的不同。

麦芽糖醇可通过形成玻璃态基质及以氢键替代水分

子，稳定细胞结构与生理活性[31]。由图 6(B)可知，麦芽糖醇质量浓度为 14%时，存活率达到峰值 81.03%。这可能是由于低浓度时保护剂不足，无法完全保护菌体；而高浓度则因渗透压胁迫对细胞造成损伤所致[32]。因此，后续实验确定采用 14%的麦芽糖醇作为最优浓度。

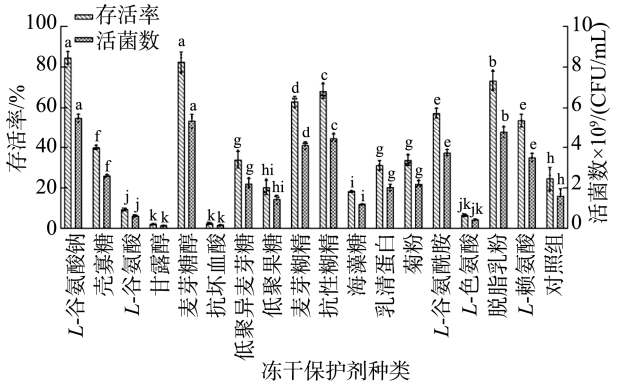



图 5 不同类型的冻干保护剂对乳酸片球菌 TC-4 存活率的影响

Fig.5 Effects of different types of freeze-drying protectants on the survival rate of *Pediococcus acidilactici* TC-4

麦芽糊精和抗性糊精均为糖类保护剂，在益生菌冻干过程中起着显著的保护作用。如图 6(C)、6(D)所示在麦芽糊精和抗性糊精浓度的筛选中，随着保护剂浓度的增加均呈先增长后下降的趋势，分别在 10%及 14%时最高，存活率分别为：64.62%、84.10%可能是由于低于最佳浓度难以在细胞周围形成充分的保护性基质，过高则会形成过厚过密的玻璃态结构，阻碍复水时水分与细胞的接触，从而降低存活率[33]。所以后续用 10%的麦芽糊精和 14%的抗性糊精为最佳中心点进行后续实验。

脱脂乳粉可在冻干过程中形成保护性基质，以稳定细胞膜、减少冰晶损伤并缓解氧化应激[34]。其浓度对存活率影响显著。如图 6E 所示，当脱脂乳粉浓度为 18%时，存活率达到最高值 80.72%，而当浓度降至 16%或增至 20%时，存活率显著下降($P$<0.05)；进一步降低浓度至 10%~14%时，存活率降至最低水平。浓度不足无法有效形成保护性基质，当过高的脱脂乳粉浓度会引发强烈的渗透压胁迫，致使菌体细胞因脱水而形态受损，导致存活率降低[35]。

2.2.3 冻干保护剂 Plackett-Burman 实验结果

选择 *L*-谷氨酸钠、麦芽糖醇、麦芽糊精、抗性糊精、脱脂乳粉等 5 个因素进行考察。Plackett-Burman 实验结果如表 6，方差分析结果(表 7)，该模型 $P$<0.001，$R^2$=0.9583 表明模型显著，相关性较好。其中 *L*-谷氨酸钠、麦芽糖醇、脱脂乳粉对 TC-4 的存活率影响最为显著，因此选择这 3 个因素进行最陡爬坡实验。

2.2.4 冻干保护剂最陡爬坡实验结果

由表 7 中的 $E$ 可知，*L*-谷氨酸钠对 TC-4 存活率的影响为正效应，因此设计最陡爬坡实验时应增加因素的水平。麦芽糖醇、脱脂乳粉对菌体生长的影响为负效应，具体设计及结果如表 8 所示，与其他组相比，第 2 组的细胞存活率最高，因此选择该组作为实验中心点进行后续实验。

2.2.5 冻干保护剂 Box-Behnken 实验

基于最陡爬坡实验结果，选取 *L*-谷氨酸钠、麦芽糖醇、脱脂乳粉 3 因素 3 水平进行响应面优化，探究其对乳

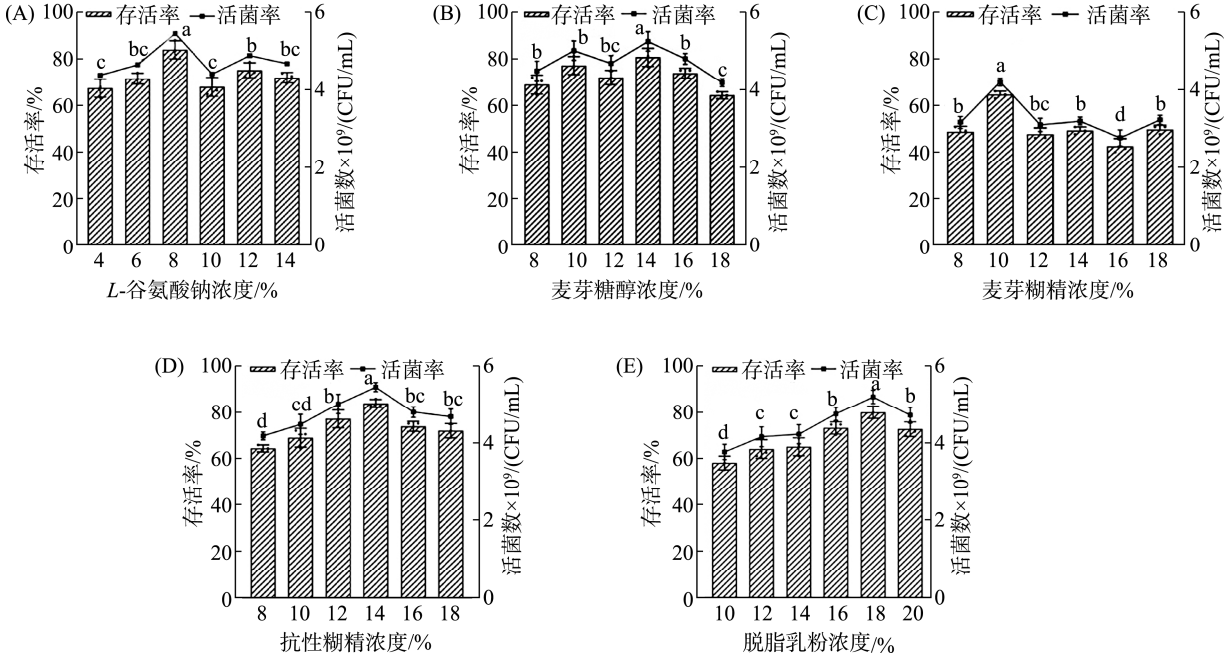



图 6 单一冻干保护剂对乳酸片球菌 TC-4 存活率的影响

Fig.6 Effects of a single freeze-drying protectants on the survival rate of *Pediococcus acidilactici* TC-4

**表 6　冻干保护剂 Plackett-Burman 实验设计结果**
**Table 6　Results of Plackett-Burman experimental design for freeze-drying protectants**

| 组别/因素 | 浓度/% | | | | | 存活率/% |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *I* (*L*-谷氨酸钠) | *J*(麦芽糖醇) | *K*(麦芽糊精) | *L*(抗性糊精) | *M*(脱脂乳粉) | |
| 1 | 6 | 16 | 12 | 12 | 20 | 41.03±3.20$^{g}$ |
| 2 | 6 | 12 | 12 | 12 | 20 | 46.67±2.35$^{ef}$ |
| 3 | 10 | 16 | 8 | 12 | 16 | 55.38±1.54$^{bc}$ |
| 4 | 10 | 16 | 12 | 12 | 16 | 54.87±1.78$^{bcd}$ |
| 5 | 6 | 16 | 12 | 16 | 16 | 49.74±2.35$^{de}$ |
| 6 | 6 | 12 | 8 | 12 | 16 | 53.85±3.08$^{cd}$ |
| 7 | 6 | 12 | 8 | 16 | 16 | 53.33±4.70$^{cd}$ |
| 8 | 10 | 12 | 12 | 16 | 16 | 70.26±5.40$^{a}$ |
| 9 | 10 | 16 | 8 | 16 | 20 | 51.28±3.87$^{cde}$ |
| 10 | 10 | 12 | 12 | 16 | 20 | 60.00±4.07$^{b}$ |
| 11 | 6 | 16 | 8 | 16 | 20 | 42.05±3.55$^{fg}$ |
| 12 | 10 | 12 | 8 | 12 | 20 | 52.31±1.54$^{cd}$ |

**表 7　冻干保护剂 Plackett-Burman 实验回归分析结果**
**Table 7　Regression analysis results of Plackett-Burman test for freeze-drying protectants**

| 来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | *F* | *P* | *E* | 显著性 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 模型 | 643.92 | 5 | 128.78 | 27.58 | 0.0005 | | ** |
| *I* (*L*-谷氨酸钠) | 274.85 | 1 | 274.85 | 58.86 | 0.0003 | 4.79 | ** |
| *J*(麦芽糖醇) | 147.49 | 1 | 147.49 | 31.59 | 0.0014 | –3.51 | * |
| *K*(麦芽糊精) | 17.21 | 1 | 17.21 | 3.69 | 0.1033 | 1.20 | |
| *L*(抗性糊精) | 42.38 | 1 | 42.38 | 9.07 | 0.0236 | 1.88 | * |
| *M*(脱脂乳粉) | 161.99 | 1 | 161.99 | 34.69 | 0.0011 | –3.67 | * |
| 残差 | 28.02 | 6 | 4.67 | | | | |
| 总变异 | 671.94 | 11 | | | | | |

**表 8　冻干保护剂最陡爬坡实验设计及结果**
**Table 8　Design and results of the steepest ascent experiment for freeze-drying protectants**

| 组别/因素 | 水平/% | | | 存活率/% |
|---|---|---|---|---|
| | *I* (*L*-谷氨酸钠) | *J*(麦芽糖醇) | *M*(脱脂乳粉) | |
| 1 | 7 | 13 | 17 | 82.77±3.95$^{b}$ |
| 2 | 8 | 14 | 18 | 90.26±1.72$^{a}$ |
| 3 | 9 | 15 | 19 | 85.39±4.05$^{ab}$ |
| 4 | 10 | 16 | 20 | 85.02±3.43$^{ab}$ |
| 5 | 11 | 17 | 21 | 81.27±2.34$^{b}$ |
| 6 | 12 | 18 | 22 | 80.52±2.83$^{b}$ |

酸片球菌 TC-4 存活率的影响(表 9)。经 Design-Expert13.0 分析，得到多元二次回归方程 $Y$=87.59–2.18$I$+2.12$J$–2.12$M$–3.08$IJ$–2.82$IM$–1.15$JM$–3.60$I^2$–9.11$J^2$–3.99$M^2$，方差分析显示模型 $F$ 为 19.95 ($P$<0.001)、失拟项 $F$ 为 0.2950 ($P$=0.8282)，决定系数 $R^2$=0.9625、变异系数 2.47%<10.00%，表明模型极显著、拟合度高且可用(表 10)。其中，*L*-谷氨酸钠与麦芽糖醇(*IJ*)、*L*-谷氨酸钠与脱脂乳粉(*IM*)的交互作用及各因素二次项($I^2$、$J^2$、$M^2$)显著($P$<0.05)，响应面图(图 7)呈开口向下的钟罩型，存在最优条件。

**表 9　冻干保护剂 Box-Behnken 实验设计及结果**
**Table 9　Design and results of freeze-drying protectants Box-Behnken experimental**

| 组别/因素 | 水平/% | | | 存活率/% |
|---|---|---|---|---|
| | *I* (*L*-谷氨酸钠) | *J*(麦芽糖醇) | *M*(脱脂乳粉) | |
| 1 | 8 | 13 | 17 | 74.36±4.44$^{d}$ |
| 2 | 8 | 13 | 19 | 71.79±5.40$^{d}$ |
| 3 | 8 | 14 | 18 | 84.10±2.35$^{bc}$ |
| 4 | 8 | 14 | 18 | 89.74±3.87$^{a}$ |
| 5 | 7 | 15 | 18 | 83.08±4.07$^{bc}$ |
| 6 | 7 | 14 | 12 | 81.03±3.20$^{c}$ |
| 7 | 9 | 15 | 18 | 72.31±1.54$^{d}$ |
| 8 | 9 | 14 | 17 | 82.56±0.89$^{bc}$ |
| 9 | 9 | 13 | 18 | 72.82±1.78$^{d}$ |
| 10 | 7 | 13 | 18 | 71.28±4.70$^{d}$ |
| 11 | 8 | 15 | 19 | 72.31±2.66$^{d}$ |
| 12 | 8 | 14 | 18 | 87.69±5.33$^{ab}$ |
| 13 | 8 | 14 | 18 | 86.67±2.35$^{ab}$ |
| 14 | 8 | 15 | 17 | 79.49±4.95$^{c}$ |
| 15 | 9 | 14 | 19 | 73.33±3.20$^{d}$ |
| 16 | 7 | 14 | 19 | 83.08±3.08$^{bc}$ |
| 17 | 8 | 14 | 18 | 89.74±0.89$^{a}$ |

**表 10　冻干保护剂 Box-Behnken 实验回归方程方差分析**
**Table 10　Regression equation and variance analysis of Box-Behnken experiment for freeze-drying protectants**

| 来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | *F* | *P* | 显著性 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 模型 | 698.12 | 9 | 77.57 | 19.95 | 0.0003 | 显著 |
| *I* | 38.06 | 1 | 38.06 | 9.79 | 0.0166 | |
| *J* | 35.87 | 1 | 35.87 | 9.23 | 0.0189 | |
| *M* | 35.83 | 1 | 35.83 | 9.22 | 0.0190 | |
| *IJ* | 37.88 | 1 | 37.88 | 9.75 | 0.0168 | |
| *IM* | 31.81 | 1 | 31.81 | 8.18 | 0.0243 | |
| *JM* | 5.31 | 1 | 5.31 | 1.37 | 0.2806 | |
| $I^2$ | 54.61 | 1 | 54.61 | 14.05 | 0.0072 | |
| $J^2$ | 349.75 | 1 | 349.75 | 89.97 | <0.0001 | |
| $M^2$ | 66.91 | 1 | 66.91 | 17.21 | 0.0043 | |
| 残差 | 27.21 | 7 | 3.89 | | | |
| 失拟项 | 4.93 | 3 | 1.64 | 0.2950 | 0.8282 | 不显著 |
| 纯误差 | 22.28 | 4 | 5.57 | | | |
| 总变异 | 725.33 | 16 | | | | |

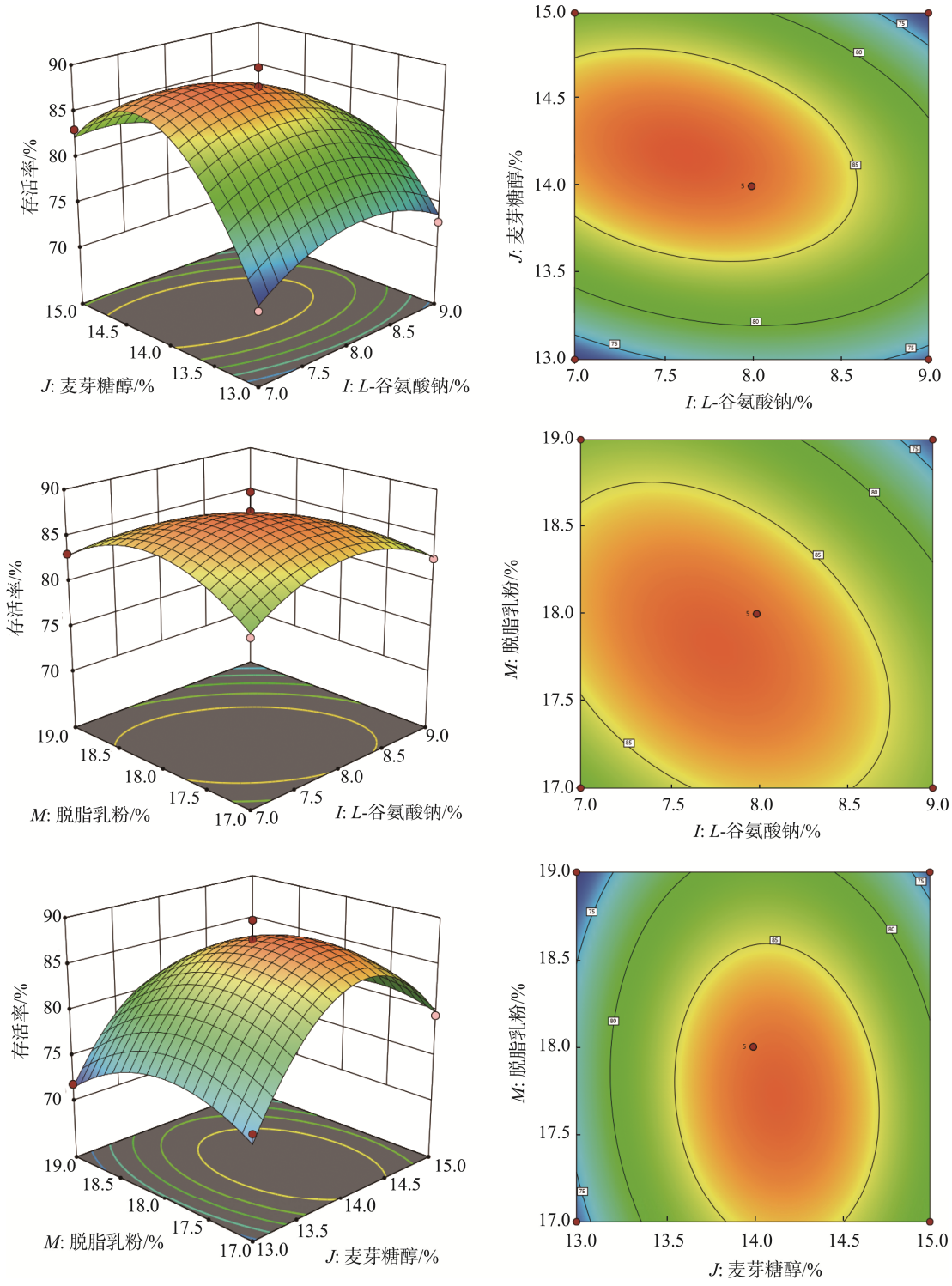



图 7 乳酸片球菌 TC-4 冻干存活率响应面图以及等高线图

Fig.7 Response surface plot and contour plot of the freeze-dried survival rate of *Pediococcus acidilactici* TC-4

模型预测最佳添加量为 *L*-谷氨酸钠 7.692%、麦芽糖醇 14.179%、脱脂乳粉 17.818%，对应存活率 88.307%；简化为实际应用条件(*L*-谷氨酸钠 8%、麦芽糖醇 14%、脱脂乳粉 18%)后，验证存活率达 90.77%，与预测值接近。最终确定该配方为乳酸片球菌 TC-4 的最佳冻干保护剂。

冻干保护剂的保护作用存在菌株特异性，不同保护剂对菌体的保护效果不同[36]。相比于 *L*-谷氨酸钠作为保护剂时复配保护剂比单一保护剂的保护效果更好，存活率达

到 90.77%, 增长了 4.61%。复配保护剂具有协同作用, 可以增强菌株抵抗不良环境的能力。

## 3　讨论与结论

乳酸片球菌 TC-4 培养基配方为: 葡萄糖 26 g/L、酵母浸粉 30 g/L, 乙酸钠 8 g/L、柠檬酸氢二铵 2 g/L、磷酸氢二钾 2 g/L、硫酸镁 0.4 g/L、硫酸锰 0.075 g/L、吐温 80 1 g/L, 其中采用的碳源葡萄糖易于被微生物快速吸收; 乙酸钠与磷酸氢二钾作为缓冲体系的关键组分为菌体营造稳定的生长微环境以保障其正常的代谢与生长增殖[37], 活菌数成功达到 $10^{10}$ CFU/mL, 显著高于同种属乳酸片球菌的 IMAU95219 的 $6.93\times10^{9}$ CFU/mL[38], 高于嗜酸乳杆菌 IMAU81186 的 $2.14\times10^{9}$ CFU/mL[39]、罗伊氏乳杆菌 IMAU10240 的 $7.57\times10^{9}$ CFU/mL 等不同种属菌株的优化效果[40], 这一成果为菌株工业化大规模生产奠定了坚实的菌量基础。冻干保护剂方面筛选得到最优复合配方为 *L*-谷氨酸钠 8%、麦芽糖醇 14%、脱脂乳粉 18%, 其中, *L*-谷氨酸钠维持胞内渗透压平衡, 减轻脱水损伤[29]; 麦芽糖醇通过水替代机制稳定细胞膜磷脂, 抑制冰晶生长[31]; 脱脂乳粉在菌体表面形成物理包覆层, 阻隔冰晶与氧化损伤[34], 三者协同作用, 冻干存活率达 90.77%。周小兵等[41]研究的乳酸片球菌最优冻干保护剂配方为海藻糖 73.64 g/L、甘露醇 43.76 g/L、硫酸锰 1.91 g/L, 存活率达 98.10%±1.03%, 其配方以糖类和矿物质为主, 而本研究选用 *L*-谷氨酸钠、麦芽糖醇与脱脂乳粉复配, 未添加矿物质仍获得较高存活率, 体现了 TC-4 菌株对保护剂的特异性适配性; 罗伊氏粘液乳杆菌 LR-20 最佳冻干保护剂配方为: 海藻糖 10.33%、肌醇 12.18%、脱脂乳粉 10.29%、谷胱甘肽 1.45%, 存活率为 85.29%, 显著低于本研究配方[42]。HERAVI 等[43]发现鼠李糖乳杆菌 GG 以乳清 0.5%、脱脂乳粉 12%、蔗糖 27%为优化后的最佳保护剂, 存活率为 78.60%, 亦低于本研究配方。综上所述, 本研究成功制备出高活菌密度、高冻干存活率的 TC-4 制剂, 也为其他乳酸菌的高密度发酵与冻干保护剂筛选提供了重要的技术参考。本研究仍存在一定局限, 仅完成摇瓶水平优化, 未开展发酵罐放大实验, 没有经过体内验证。后续将围绕发酵工艺放大, 以及开展动物体内实验, 验证优化后菌粉的降尿酸活性及生物利用度, 为临床应用提供数据支撑。持续推动该功能性菌株的产业化转化与临床应用。

## 参考文献


[1] 王菱, 彭艾. 中国高尿酸血症及痛风诊疗指南(2019)解读[J]. 西部医学, 2021, 33(9): 1254–1257.
WANG L, PENG A. Interpretation of the Chinese guidelines for the diagnosis and treatment of hyperuricemia and gout (2019) [J]. Western Medicine, 2021, 33(9): 1254–1257.

[2] LIU N, LIU Y, WANG J, *et al*. A novel spider-toxin-derived anti-gout peptide nctx14 alleviated nlrp3-mediated pyroptosis in hyperuricemia [J]. Process Biochemistry, 2025(157): 10–20.

[3] LI Y, SHEN Z, ZHU B, *et al*. Demographic, regional and temporal trends of hyperuricemia epidemics in mainland China from 2000 to 2019: A systematic review and meta-analysis [J]. Global Health Action, 2021, 14(1): 1874652.

[4] DENG J, LAI P, XIE L, *et al*. Cardiovascular safety of febuxostat versus allopurinol among the Asian patients with or without gout: A systematic review and meta-analysis [J]. Clinical and Translational Science, 2024, 17(3): e13757.

[5] MINJI H. Risk of severe cutaneous adverse reactions associated with different urate lowering therapies: A population-based cohort study [D]. Seoul: Seoul National University Graduate School, 2025.

[6] REY A, BATTEUX B, LAVILLE SM, *et al*. Acute kidney injury associated with febuxostat and allopurinol: A post-marketing study [J]. Arthritis Research & Therapy, 2019, 21(1): 229.

[7] ROBINSON PC, STAMP LK. The management of gout: Much has changed [J]. Australian Family Physician, 2016, 45(5): 299–302.

[8] 蚁硕钊. 高尿酸血症患者肠道菌群的分析与乳酸菌对高尿酸血症大鼠的影响[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2022.
YI SZ. Analysis of intestinal flora in patients with hyperuricemia and the effect of lactic acid bacteria on hyperuricemic rats [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2022.

[9] ZHAO S, FENG P, HU X, *et al*. Probiotic *Limosilactobacillus fermentum* GR-3 ameliorates human hyperuricemia via degrading and promoting excretion of uric acid [J]. Iscience, 2022, 25(10): 105198.

[10] SUBRAMANIAM R, THIRUMAL V, CHISTOSERDOV A, *et al*. High-density cultivation in the production of microbial products [J]. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, 2018, 32(4): 451–464.

[11] CHOI GH, LEE NK, PAIK HD. Optimization of medium composition for biomass production of *Lactobacillus plantarum* 200655 using response surface methodology [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2021, 31(5): 717.

[12] 刘辉, 季海峰, 王四新, 等. 响应面-主成分分析法优化副干酪乳杆菌发酵培养基[J]. 中国饲料, 2023(13): 36–42.
LIU H, JI HF, WANG SX, *et al*. Optimization of fermentation medium for *Lactobacillus paracasei* by response surface and principal component analysis [J]. China Feed, 2023(13): 36–42.

[13] MA W, LI Y, KANG W, *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.

[14] LI X, WANG M, DING M, *et al*. Effects of complex cryoprotectant on the freeze-drying survival of *Lactobacillus acidophilus* FMNS-10 and its protective mechanisms [J]. Journal of Stored Products Research, 2025(112): 102646.

[15] 韩德权, 杨丽娟, 孙庆申, 等. 响应面法优化植物乳杆菌冻干保护剂[J]. 食品科学, 2010, 31(5): 219–224.
HAN DQ, YANG LJ, SUN QS, *et al*. Optimization of freeze-drying protectant for *Lactobacillus plantarum* by response surface methodology [J]. Food Science, 2010, 31(5): 219–224.

[16] GUERRERO-SANCHEZ M, PASSOT S, CAMPOY S, *et al*. Effect of protective agents on the storage stability of freeze-dried *Ligilactobacillus salivarius* CECT5713 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106(21): 7235–7249.

[17] KAREENA A, SIRIPONGVUTIKORN S, USAWAKESMANEE W, *et al*. *In vitro* evaluation of probiotic bacteria and yeast growth, pH changes and metabolites produced in a pure culture system using protein base products with various added carbon sources [J]. Food Science and Technology, 2021(42): e18321.

[18] PAPADIMITRIOU K, ALEGRÍA Á, BRON PA, *et al*. Stress physiology of lactic acid bacteria [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2016, 80(3): 837–890.

[19] TAO Z, YUAN H, LIU M, *et al*. Yeast extract: Characteristics, production, applications and future perspectives [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2022, 33(2): 151–166.

[20] 范佳硕, 杨鑫, 陈博, 等. 植物乳杆菌发酵培养基优化及工艺开发[J]. 发酵科技通讯, 2020, 49(1): 21–26.
FAN JS, YANG X, CHEN B, *et al*. Optimization of fermentation medium and process development for *Lactobacillusplantarum* [J]. Journal of Fermentation Technology, 2020, 49(1): 21–26.

[21] ABBASILIASI S, TAN JS, IBRAHIM TAT, *et al*. Fermentation factors influencing the production of bacteriocins by lactic acid bacteria: A review [J]. Rsc Advances, 2017, 7(47): 29395–29420.

[22] CHEN C, GUO T, WU D, *et al*. Study on *Lacticaseibacillus casei* TCS fermentation kinetic models and high-density culture strategy [J]. Microbiology Spectrum, 2025, 13(7): e02590-24.

[23] 章帅文, 曾子涵, 张勇, 等. 发酵乳杆菌 JN-2 的分离鉴定及其发酵培养基优化[J]. 江西农业大学学报, 2019, 41(5): 993–999.
ZHANG SW, ZENG ZH, ZHANG Y, *et al*. Isolation and identification of *Lactobacillus fermentum* JN-2 and optimization of its fermentation medium [J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2019, 41(5): 993–999.

[24] 包维臣. 德氏乳杆菌保加利亚亚种 ND02 高密度培养及冷冻保护的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2012.
BAO WC. Study on high-density culture and cryoprotection of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus ND02 [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2012.

[25] 张娜, 周悦, 朱维红, 等. 母乳婴儿源植物乳杆菌高密度培养与冻干保护剂优化[J]. 现代食品科技, 2025, 41(11): 77–88.
ZHANG N, ZHOU Y, ZHU WH, *et al*. High-density culture and optimization of freeze-drying protectant for *Lactobacillus plantarum i*solated from breast milk of infants [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(11): 77–88.

[26] SUN F, LIU S, CHE X, *et al*. High-density fermentation of *Lactobacillus plantarum* P6: Enhancing cell viability via sodium alginate enrichment [J]. Foods, 2024, 13(21): 3407.

[27] LI Q, LEI Y, HU G, *et al*. Effects of Tween 80 on the liquid fermentation of *Lentinus edodes* [J]. Food Science and Biotechnology, 2018, 27(4): 1103–1109.

[28] YAN SQ, SHI YY, YANG R, *et al*. Boosting probiotic biomass of *Lactobacillus acidophilus* CCFM137 through pH-stat morphological control and medium optimization [J]. Fermentation, 2025, 11(10): 564.

[29] LU Y, HUANG L, YANG T, *et al*. Optimization of a cryoprotective medium to increase the viability of freeze-dried *Streptococcus thermophilus* by response surface methodology [J]. LWT-Food Science and Technology, 2017(80): 92–97.

[30] ZHOU R, WU Y, LI Y, *et al*. Sodium *L*-glutamate improves the lyophilization survival rate of *Lactiplantibacillus plantarum* L5 by regulating cellular pyruvate [J]. Food Bioscience, 2024(59): 104189.

[31] HUBALEK Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms [J]. Cryobiology, 2003, 46(3): 205–229.

[32] 袁荣鑫. 鼠李糖乳杆菌新型保护剂的性能研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2023.
YUAN RX. Study on the performance of a new protectant for *Lactobacillus rhamnosus* [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2023.

[33] TENG D, KAWAI K, MIKAJIRI S, *et al*. Stabilization of freeze-dried *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* JCM 8130$^{T}$ with the addition of disaccharides, polymers, and their mixtures [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2017, 81(4): 768–773.

[34] RODRIGUES RB, UCZAY M, BRITO VB, *et al*. Skim milk powder used as a non-permeable cryoprotectant reduces oxidative and DNA damage in cryopreserved zebrafish sperm [J]. Cryobiology, 2020(97): 76–84.

[35] 李大鹏, 高玉荣. 益生菌植物乳杆菌 G1-28 复合冻干发酵剂制备及保

藏条件研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(10): 100–104.
LI DP, GAO YR. Preparation of compound freeze-dried starter of probiotic *Lactobacillus plantarum* G1-28 and study on its preservation conditions [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(10): 100–104.

[36] 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 JL, LI Y, LIU ZJ, *et al*. Research progress on high-activity protection mechanism of probiotics during freeze-drying [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(5): 1402–1416.

[37] YANG E, FAN L, YAN J, *et al*. Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria [J]. AMB Express, 2018, 8(1): 10.

[38] 冯志伟. *Pediococcus acidilactici* IMAU95219 增殖培养基及高密度培养工艺优化[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2020.
FENG ZW. Optimization of proliferation medium and high-density culture process for *Pediococcus acidilactici* IMAU95219 [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2020.

[39] SU X, MENGHE B, ZHANG H, *et al*. *In vitro* evaluation of intestinal transport and high-density fermentation of *Lactobacillus acidophilus* [J]. Metabolites, 2023, 13(10): 1077.

[40] 姚国强, 张雪梅, 高志敏, 等. *Lactobacillus reuteri* IMAU10240 增殖培养基及高密度培养工艺优化[J]. 食品科学, 2017, 38(14): 97–105.
YAO GQ, ZHANG XM, GAO ZM, *et al*. Optimization of proliferation medium and high-density culture process for *Lactobacillus reuteri* IMAU10240 [J]. Food Science, 2017, 38(14): 97–105.

[41] 周小兵, 林路英, 彭灿, 等. 响应面法优化乳酸片球菌冻干保护剂配方[J]. 食品工业科技, 2018, 39(10): 105–109.
ZHOU XB, LIN LY, PENG C, *et al*. Optimization of freeze-drying protectant formula for *Pediococcus acidilactici* by response surface methodology [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(10): 105–109.

[42] 张宏, 刘凯龙, 葛鹏磊, 等. 罗伊氏粘液乳杆菌 LR-20 冻干保护剂的高通量筛选[J]. 中国食品学报, 2025, 25(10): 174-188.
ZHANG H, LIU KL, GE PL, *et al*. High-throughput screening of lyophilized protective agent for *Limosilactobacillus reuteri* LR-20 [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2025, 25(10): 174-188.

[43] HERAVI RM, GHIASVAND M, REZAEI E, *et al*. Assessing the viability of three *Lactobacillus Bacterial* species protected in the cryoprotectants containing whey and maltodextrin during freeze-drying process [J]. Letters in Applied Microbiology, 2022(74): 505-513.

(责任编辑: 蔡世佳　安香玉)