肖烨, 李瑞丽, 别小妹. 复合植物乳杆菌冻干保护剂优化及其作用机制 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(8): 240−249. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030394

XIAO Ye, LI Ruili, BIE Xiaomei. Optimization of the Cryoprotectant for Composite *Lactiplantibacillus plantarum* and Its Protective Mechanism[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(8): 240−249. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030394

·工艺技术·

复合植物乳杆菌冻干保护剂优化及其作用机制

肖　烨, 李瑞丽, 别小妹*

（南京农业大学食品科技学院, 江苏南京 210095）

摘　要: 为有效提高植物乳杆菌在冻干过程中的细胞存活率，本研究开发了一种用于复合植物乳杆菌冻干保护剂，并采用真空冷冻干燥技术制备复合植物乳杆菌冻干菌剂。通过单因素实验与正交试验优化复合冻干保护剂的组分配比，提高冻干菌粉中植物乳杆菌的存活率。此外，通过冻干前后活力对比、细胞膜细胞壁完整性测定、菌体细胞微观结构观察、贮存稳定性测定确定复合保护剂的作用效果；通过对冻干菌粉傅里叶红外光谱分析、差示量热法测定热力学性能、细胞亚损伤测定、活死细胞荧光染色、乳酸脱氢酶活性测定进一步探究了冻干保护剂对植物乳杆菌的冻干保护作用机制。结果表明，复合冻干保护剂的最优配比为：0.15 g/mL 脱脂奶粉、0.06 g/mL 海藻糖、0.03 g/mL 吐温 80、L-谷氨酸 0.014 g/mL。添加复合冻干保护剂的植物乳杆菌冻干菌粉在−20 ℃ 条件下保存 60 d 后，菌体细胞存活率维持在 59.64%±1.74%，且活菌数仍有（4.58±0.13）×10^9 CFU/mL。扫描电镜观察结果显示，经复合冻干保护剂处理，植物乳杆菌菌体微观形态完整、细胞表面光滑。傅里叶红外光谱分析结果表明，复合冻干保护剂中各组分整合到了细胞上，增强了氢键作用。差示扫描量热分析结果表明，复合冻干保护剂增强了冻干菌粉的热稳定性。细胞壁膜损伤试验结果表明，复合冻干保护剂可显著（P<0.001）降低冻干过程对细胞壁的损伤，并维持细胞膜完整性。此外，复合冻干保护剂可显著（P<0.0001）提高菌体乳酸脱氢酶活性。同时，相关性分析结果表明复合冻干保护剂主要是通过提高植物乳杆菌菌体细胞的乳酸脱氢酶活性以及保护细胞壁膜完整性，从而有效提高其在冻干过程中的存活率。本研究制备了一种可有效用于植物乳杆菌的复合冻干保护剂，并阐明其对植物乳杆菌的保护机制，可为乳酸菌等益生菌冻干保护剂的应用提供理论依据。

关键词: 冷冻干燥, 复合冻干保护剂, 益生菌存活率, 细胞膜, 稳定性

中图分类号: TS201.3　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2026)08−0240−10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030394　　本文网刊:

Optimization of the Cryoprotectant for Composite *Lactiplantibacillus plantarum* and Its Protective Mechanism

XIAO Ye, LI Ruili, BIE Xiaomei*

（College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China）

Abstract: To improve the survival rate of *Lactiplantibacillus plantarum* during freeze-drying, this study developed a composite cryoprotectant and prepared freeze-dried bacterial powder using vacuum freeze-drying technology. The composition of the composite cryoprotectant was optimized through single-factor and orthogonal experiments to enhance bacterial viability in the freeze-dried powder. The protective effects were evaluated by comparing viability before and after freeze-drying, measuring cell membrane and cell wall integrity, observing cellular microstructure, and assessing storage stability. The protective mechanism was further investigated via Fourier-transform infrared spectroscopy analysis of the freeze-dried powder, differential scanning calorimetry to determine thermal properties, quantification of subcellular damage, live-dead cell staining, and lactate dehydrogenase activity assays. Results showed that the optimal composite

收稿日期: 2025−04−01

作者简介: 肖烨（2001−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品微生物, E-mail: 2022108053@stu.njau.edu.cn。

*** 通信作者:** 别小妹（1964−）, 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品微生物, E-mail: bxm43@njau.edu.cn。

cryoprotectant formulation consisted of 0.15 g/mL skim milk powder, 0.06 g/mL trehalose, 0.03 g/mL Tween 80, and 0.014 g/mL L-glutamic acid. After 60 days of storage at −20 ℃, the freeze-dried powder exhibited a survival rate of 59.64%±1.74% and a viable count of (4.58±0.13)×10^9 CFU/mL. Scanning electron microscopy revealed that cells treated with the composite cryoprotectant maintained intact morphology with smooth surfaces. Fourier transform infrared spectroscopy analysis indicated integration of cryoprotectant components into bacterial cells, strengthening hydrogen bonding. Differential scanning calorimetry results demonstrated enhanced thermal stability of the freeze-dried powder. Cell membrane and wall damage assays showed significant (P<0.001) reduction in structural damage, while lactate dehydrogenase activity increased significantly (P<0.0001). Correlation analysis suggested that the composite cryoprotectant improved survival primarily by preserving membrane integrity and enhancing lactate dehydrogenase activity. This study developed an effective composite cryoprotectant for *Lactiplantibacillus plantarum*. It elucidated its protective mechanisms, providing a theoretical basis for the application of cryoprotectants in probiotics, such as lactic acid bacteria.

Key words: freeze drying; cryoprotectant; probiotic survival rate; cell membrane; stability

乳酸菌（Lactic acid bacteria, LAB）属于革兰氏阳性菌家族，具有独特的生物学特性。这类细菌不产生芽孢，其显著特征是能够利用可发酵碳水化合物高效产生乳酸[1]。植物乳杆菌（*Lactiplantibacillus plantarum*）是一种兼性异型发酵乳酸菌。它是一种适应性极强的物种，通常是酸菜、泡菜、橄榄、酸面团、乳制品等食物中的主要物种之一。植物乳杆菌可以从不同的糖中获取能量，由于高耐酸性，植物乳杆菌在许多食物发酵中占据主导地位[2−3]。作为在食品领域应用广泛的一类益生菌，植物乳杆菌能够改善食品风味、增加食品营养价值[4]。植物乳杆菌进入生物体内，具有产生抑菌代谢产物、抗炎、抗氧化、降低胆固醇、调节宿主肠道菌群平衡、提高免疫功能等益生作用[5−9]。

植物乳杆菌应用于食品时，其粉末产品与液体产品相比更便于运输和加工操作[10]，且能长时间保持其生物活性，有助于延长产品的保质期[11]。目前常用的制作菌粉的技术是真空冷冻干燥技术。然而，真空冷冻干燥技术会对菌体造成不可避免的伤害[12]。为了提高益生菌冻干后活性，一般采取优化益生菌培养条件、优化益生菌预冻条件、在冻干前进行应激处理、添加冻干保护剂等[13]手段。其中添加冻干保护剂是一种最常用的提升益生菌抗冻干性的方法[13]。Cao 等[14]添加脱脂奶粉后冻干的菌粉易于储存且不易氧化。Wang 等[15]研究了海藻糖对植物乳杆菌抗冻干性的保护机制，从而发现海藻糖可以降低植物乳杆菌在冻干时的细胞膜损伤、DNA 损伤等。E 等[16]深入探究了 L-谷氨酸对于植物乳杆菌冻干保护作用的机制，由细胞膜和细胞壁损伤为切入点，通过相关蛋白的含量检测，证明了 L-谷氨酸参与的代谢通路对于植物乳杆菌冻干抗性的提升有重要作用。Xia 等[17]证明了吐温 20 和吐温 80 的添加，可以增加植物乳杆菌细胞膜上油酸含量，增加细胞膜上不饱和脂肪酸的比例，从而增加细胞膜的流动性，保护植物乳杆菌细胞，减轻冻干的损伤。然而不同种类的冻干保护剂组合在一起对于植物乳杆菌的保护作用机制尚不明确。

因此，本研究以 3 株不同的植物乳杆菌为研究对象，探究复合植物乳杆菌的最佳冻干保护剂配方，并进一步探究复合冻干保护剂对植物乳杆菌的保护作用机制，旨在开发出一种高效保护植物乳杆菌的复合冻干制剂。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

3 株乳酸菌　来源于传统发酵食品，由南京农业大学酶工程实验室提供；植物乳杆菌（*Lactiplantibacillus plantarum*）L31，从屠宰场鸡肠中筛选得到；植物乳杆菌（*Lactiplantibacillus plantarum*）C174　分离自黑龙江哈尔滨市郊区农家自制酸菜；植物乳杆菌（*Lactiplantibacillus plantarum*）CY9　来源于乳制品；脱脂奶粉、D-二水海藻糖、L-谷氨酸、甘油　麦克林生物公司；吐温 80、无水乙醇　上海国药集团；过绿色荧光核酸染料（STYO）、红色荧光核酸染料碘化丙啶（PI）、总乳酸脱氢酶试剂盒　上海碧云天生物技术公司；结晶紫　上海麦克林生化科技公司。

LYOQUEST-85 冷冻干燥机　泰事达机电设备（上海）有限公司；HH3400 多功能酶标仪　美国珀金埃尔默公司；DM4B 显微镜　德国徕卡（Leica）仪器有限公司；Merlin Compact SU8100 扫描电子显微镜　德国卡尔蔡司股份公司；Nicolet Summit X 傅里叶红外光谱仪　赛默飞世尔科技（中国）有限公司；STA449F5 差示扫描量热仪　德国耐驰仪器制造有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　冻干菌粉制备过程　冻干菌粉制备过程参考李佳佳[18]的方法。具体方法如下，将复合发酵菌液（L31∶C174∶CY9=1∶1∶1）在 4 ℃，8000 r/min 离心 5 min 洗涤 3 次后，获取菌体细胞，将其与 0.9% 无菌生理盐水（w/v）以 1∶2 的比例重悬制成菌悬液。将冻干保护剂∶菌悬液（v/v）=2.5∶1 添加到无菌平板中制成待冻干样品。获得的样品以平板计数法计算冻干前活菌数 N_0。待冻干样品在−20 ℃ 预冻 12 h 后在−80 ℃ 下预冻 12 h，再放入真空冷冻干燥机内冻干 24 h，冻干后，样品复溶至冻干前的体积测定活菌数 N_1。

以公式(1)计算冻干存活率:

$$存活率(\%)=\frac{N_1}{N_0}\times 100 \qquad 式(1)$$

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

1.2.2 保护剂筛选

1.2.2.1 基础保护剂浓度的筛选 按 1.2.1 中的方法, 菌悬液与不同浓度的脱脂奶粉以 1∶2.5(v/v)的比例混合, 以浓度为 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 g/mL 的脱脂奶粉为实验组, 未处理组为对照组, 六组样品于−20 ℃ 预冻 24 h 后测定冻干前后活菌数, 计算冻干存活率。

1.2.2.2 辅助保护剂单因素实验 按 1.2.1 中的方法, 参考吴静怡[19]的方法以辅助保护剂浓度为 0.006、0.008、0.010、0.012、0.014 g/mL 的 L-谷氨酸, 0.03、0.06、0.09、0.12、0.15 g/mL 的海藻糖, 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 mL/mL 的吐温 80, 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 g/mL 的甘油, 与 1.2.2.1 筛选后的基础保护剂做对比, 将其与脱脂奶粉以 1∶1(v/v)混合, 并于−20 ℃ 预冻 24 h, 计算冻干后的存活率。

1.2.2.3 辅助保护剂正交优化试验 根据辅助保护剂的单因素实验结果, 依据保护剂的不同功能, 选择几种保护效果较好的辅助保护剂, 设计正交试验。按 1.2.1 的流程进行冻干, 比较存活率。辅助保护剂正交试验因素水平表见表 1。

表 1 辅助保护剂优化正交试验因素水平表

Table 1 Orthogonal experimental factors and levels for optimization of auxiliary cryoprotectant

水平	因素		
	A海藻糖浓度 (g/mL)	B吐温80浓度 (mL/mL)	C L-谷氨酸浓度 (g/mL)
1	0.03	0.02	0.010
2	0.06	0.03	0.012
3	0.09	0.04	0.014

1.2.3 冻干保护剂对植物乳杆菌的保护效果

1.2.3.1 冻干前后活力对比及保护剂验证试验 采用稀释平板法分别对添加复合冻干保护剂的冻干菌粉、添加 PBS 的冻干菌粉以及添加单一保护剂的冻干菌粉(0.06 g/mL 的海藻糖、0.03 g/mL 的吐温 80、0.014 g/mL 的 L-谷氨酸、0.15 g/mL 的脱脂奶粉)复水之后的样品进行涂板计数, 结果以 CFU/mL 表示。对比冻干前后复合植物乳杆菌的存活率, 探究添加冻干保护剂对复合植物乳杆菌活力的保护效果。

1.2.3.2 冻干后植物乳杆菌外部微观形态 添加复合冻干保护剂的冻干菌粉分为两组, 一组直接观察, 一组复水洗涤去除复合冻干保护剂后脱水处理进一步观察。添加 PBS 的冻干菌粉作为对照组作同样的处理。

参考 Chen 等[20]的方法并稍作修改, 将冻干样品复水后通过离心收集, 于 2.5%(w/v)戊二醛溶液中 4 ℃ 固定过夜。样品使用乙醇梯度脱水: 30%、50%、70%、80% 和 90% 各脱水 10 min, 100% 脱水两次 10 min。

扫描电子显微镜(Scanning electron microscopy, SEM)观察使用导电碳带将冻干样品和乙醇脱水后的样品装入样品架中, 然后用铂金进行溅射涂层。冻干菌粉的 SEM 图像在电镜下记录[20]。

1.2.3.3 冻干菌粉的稳定性 参考 Li 等[21]的方法并修改, 分别将优化后的冻干菌粉储存在−20 ℃、4 ℃ 以及室温条件下贮藏 60 d, 每隔 15 d 对其活菌数进行计数, 比较不同温度下储存不同时间菌粉冻干存活率与活菌数的变化。

1.2.4 冻干保护剂对植物乳杆菌的保护机制

1.2.4.1 傅里叶红外光谱的测定 参考 Umar 等[22]的方法使用傅里叶变换红外光谱仪(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)测定添加不同冻干保护剂菌粉的 FITR 光谱。将 2 mg 样品与 KBr 以 1∶100 比例混合后放置在样品槽上, 检测波长 400~4000 cm^{-1}, 每种样品扫描重复两次。

1.2.4.2 热力学性能的测定 参考徐远志等[23]的方法, 使用差示扫描量热仪(Differential scanning calorimetry, DSC)测定冻干菌粉的热力学性能。将每种样品的 2 mg 称重放入铝胶囊中并密封。使用空盘作为参比。去除每个样品的热历史, 然后将样品从−20 ℃ 加热到 80 ℃, 加热速率为 10 ℃/min, 氮气气氛, 测量重复两次。

1.2.4.3 细胞壁损伤的测定 参考 Yao 等[24]的方法并稍作修改, 使用 0.9% 无菌生理盐水分别对含单一保护剂(脱脂奶粉、L-谷氨酸、海藻糖、吐温 80)的冻干菌粉、含复合保护剂的冻干菌粉进行复水并连续稀释, 然后在 MRS 琼脂培养基和含有 80 μg/L 溶菌酶的 MRS 琼脂培养基中在 37 ℃ 下培养 48 h 后菌落计数。以添加 PBS 的冻干菌粉作为对照组, 做同样的处理, 进行 3 次独立重复。

$$细胞死亡率(\%)=\left(1-\frac{N_2}{N_3}\right)\times 100 \qquad 式(2)$$

式中: N_2 为含溶菌酶或 NaCl 的 MRS 琼脂培养基中活细胞数, CFU/mL; N_3 为 MRS 琼脂培养基中活细胞数, CFU/mL。

1.2.4.4 细胞膜损伤的测定 参考 Yao 等[24]的方法并稍作修改, 分别将含单一保护剂(脱脂奶粉、L-谷氨酸、海藻糖、吐温 80)的冻干菌粉、含复合保护剂的冻干菌粉复溶于生理盐水中, 稀释后, 分别在含 NaCl 的培养基和不含 NaCl 的固体培养基平板上培养 48 h 后菌落计数, 以添加 PBS 的冻干菌粉作为对照组, 计算细胞死亡率。

根据 E 等[25]的方法, 通过绿色荧光核酸染料 SYTO 和红色荧光核酸染料碘化丙啶(PI)评估细菌

细胞的细胞膜完整性。分别将含单一保护剂(脱脂奶粉、L-谷氨酸、海藻糖、吐温 80)的冻干菌粉、含复合保护剂的冻干菌粉复水，离心，洗涤后重悬。在悬浮液中加入 STYO 和 PI，避光 37 ℃ 孵育 30 min。以添加 PBS 的冻干菌粉作为对照组，做同样的处理。孵育后的样品采用荧光显微镜在激发和检测波长分别为 485 nm 和 530 nm 下观察细胞膜的完整性。

1.2.4.5　乳酸脱氢酶活力测定　乳酸脱氢酶活性测定参考 Zhang 等[26] 的方法采用乳酸脱氢酶检测试剂盒测定。用 PBS 缓冲液重悬添加复合冻干保护剂与添加其他单一冻干保护剂(0.06 g/mL 的海藻糖、0.03 g/mL 的吐温 80、0.014 g/mL 的 L-谷氨酸、0.15 g/mL 的脱脂奶粉)的冻干菌粉，洗涤 3 次后，重悬于 5 mL PBS 溶液中。按照试剂盒的要求测定乳酸脱氢酶的酶活力。添加 PBS 的冻干菌粉作为对照组，做同样的处理。

1.3　数据处理

用 Graphpad 8 软件做图，Origin 2025 软件做图及 Pearson 相关性统计分析，IBM SPSS Statistics 26 进行差异显著性分析，所有实验数据结果重复 3 次，实验结果表示为平均值±标准差，$P<0.05$ 表示差异显著。

2　结果与分析

2.1　冻干保护剂的优化

2.1.1　基础保护剂浓度的筛选　脱脂奶粉含大分子蛋白质，可以通过包裹菌体细胞提高细胞稳定性从而减小冻干过程中的细胞损伤，此外，脱脂奶粉中的乳糖等成分也能提高乳酸菌冻干存活率[27]。因此选择脱脂奶粉作为冻干样品的基础保护剂，有利于大幅提高乳酸菌的冻干存活率。由图 1 可知，与不添加脱脂奶粉的对照组相比，添加 0.15 g/mL 脱脂奶粉及 0.20 g/mL 脱脂奶粉后，冻干存活率显著($P<0.05$)提高，且两组间无显著差异，因此选择浓度为 0.15 g/mL 的脱脂奶粉作为最优的基础保护剂浓度进行后续实验。

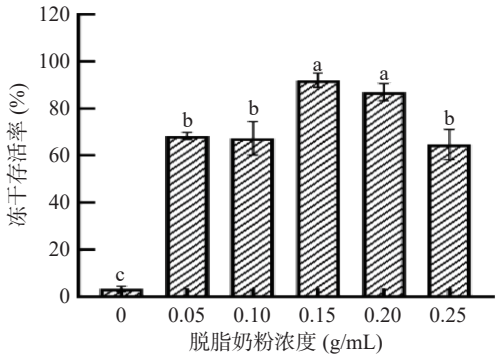


图 1　基础保护剂的浓度的确定

Fig.1　Determination of the concentration of the basic protective agent

注：不同字母表示组间有显著差异($P<0.05$)，图 2~图 3、图 5、图 8、图 10 同。

2.1.2　辅助冻干保护剂单因素实验　实验以浓度为 0.15 g/mL 的脱脂奶粉作为基础保护剂，对辅助保护剂进行单因素实验。

在本研究中，选择了几种具有代表性的冻干保护剂作为复合保护剂中辅助保护剂的成分，包括氨基酸(L-谷氨酸)、碳水化合物(海藻糖)、表面活性剂(吐温 80)和多元醇(甘油)。如图 2 所示，以 0.014 g/mL L-谷氨酸作为辅助保护剂，植物乳杆菌细胞冻干存活率达到 80.37%±3.70%，显著($P<0.05$)高于其他浓度组(图 2A)。以 0.06 g/mL 的海藻糖作为辅助保

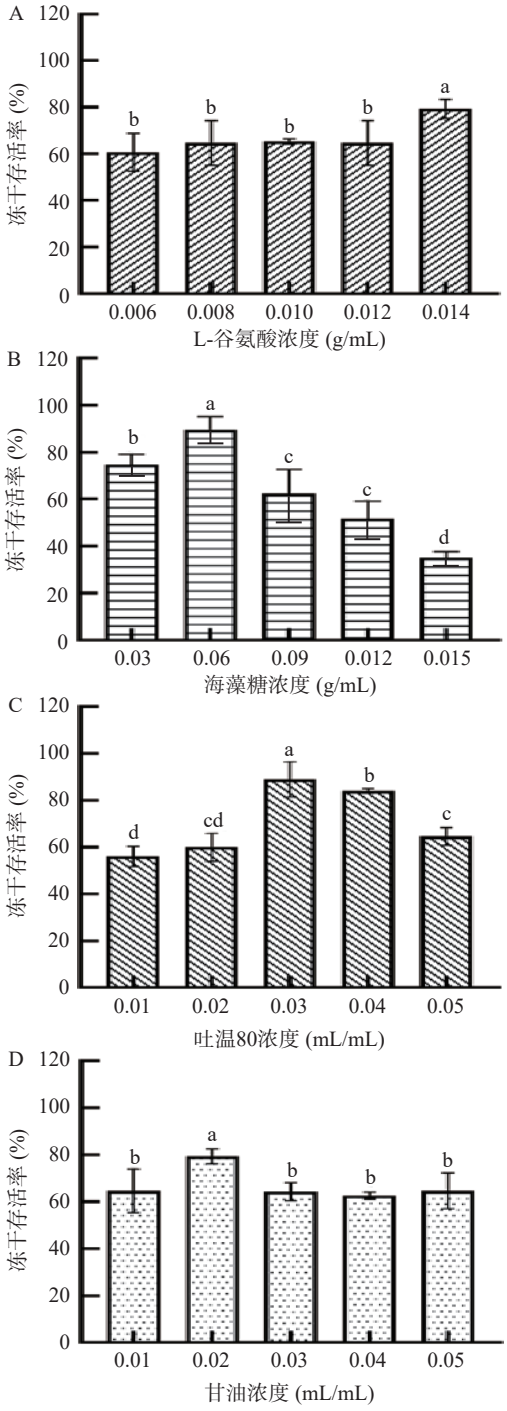


图 2　辅助保护剂优化单因素实验

Fig.2　Single-factor experiment for the optimization of auxiliary cryoprotectant

护剂，植物乳杆菌冻干存活率达到较高水平 89.56%±5.74%(图 2B)，随着保护剂浓度提高，冻干存活率先升高后降低，这是由于海藻糖浓度小幅度提高时，分子与细胞表面极性位点对应，有效替代水分子稳定与细胞膜的氢键网络，而浓度过高时，由于渗透效应，使细胞过度脱水导致死亡[28]。以 0.03 mL/mL 的吐温 80 作为辅助保护剂的植物乳杆菌冻干存活率达到 91.67%±3.79%，显著(P<0.05)高于其他浓度处理组(图 2C)，随着保护剂浓度提高，冻干存活率先升高后降低，这是由于低浓度吐温 80 通过界面保护提升存活率，过高浓度则因膜损伤、黏度增加和毒性效应导致失活[29]。以浓度为 0.02 mL/mL 的甘油作为辅助保护剂的植物乳杆菌冻干存活率达到 79.33%±3.21%(图 2D)。基于单因素实验结果，选择 3 种辅助保护剂(吐温 80、海藻糖、L-谷氨酸)开展后续正交试验。选择浓度为 0.010、0.012、0.014 g/mL 的 L-谷氨酸、浓度为 0.03、0.06、0.09 g/mL 的海藻糖、浓度为 0.02、0.03、0.04 mL/mL 的吐温 80 进行后续的正交优化试验。

2.1.3 辅助保护剂正交试验设计优化 针对辅助保护剂单因素实验结果进行分析，复合乳酸菌在吐温 80、海藻糖、L-谷氨酸 3 种辅助保护剂的作用下具有较高的冻干存活率，对这 3 种保护剂进行正交试验设计优化，得到更好的复合冻干保护剂。

由表 2、表 3 可知，3 种辅助保护剂的单因素实验结果经过正交试验设计九组正交试验，得到正交试验设计结果和方差分析表。根据试验结果分析，3 个因素中影响显著性次序为 A(海藻糖)>C(L-谷氨酸)>B(吐温 80)，最优水平组合为 $A_2B_2C_3$，即辅助保护剂各因素添加最佳浓度为添加 0.06 g/mL 的海藻糖、0.03 mL/mL 的吐温 80、0.014 g/mL 的 L-谷氨酸。按照正交试验结果，最优保护剂组合为：0.15 g/mL 脱脂奶粉、0.06 g/mL 的海藻糖、0.03 mL/mL 的吐温 80、0.014 g/mL 的 L-谷氨酸，相应冻干存活率可达 93.29%±3.05%。

表 2 辅助保护剂优化正交试验设计结果

Table 2 Results of the orthogonal experimental design for optimization of auxiliary cryoprotectant

实验号	A(海藻糖)	B(吐温80)	C(L-谷氨酸)	冻干存活率(%)
1	1	1	1	70.43
2	1	2	2	80.37
3	1	3	3	78.29
4	2	1	2	81.08
5	2	2	3	93.29
6	2	3	1	92.15
7	3	1	3	69.91
8	3	2	1	58.87
9	3	3	2	70.43
K1	6.873	6.642	6.643	
K2	7.996	6.976	6.218	
K3	5.238	6.488	7.245	
R	0.306	0.054	0.114	

表 3 辅助保护剂正交试验优化方差分析表

Table 3 Analysis of variance for optimization of orthogonal test of auxiliary cryoprotectant

方差来源	离差平方和	自由度	F值	P值	显著性
A(海藻糖)	0.427216178	2	48.93675195	0.00000005	*
B(吐温-80)	0.013805833	2	1.581430387	0.23296097	
C(L-谷氨酸)	0.059155062	2	6.776093131	0.00640011	*
误差	0.037561003	20			

注：*表示具有显著性差异，P<0.05。

2.2 冻干保护剂对植物乳杆菌的保护效果

2.2.1 冻干保护剂对植物乳杆菌冻干后活力的影响

添加冻干保护剂，能保护细胞减轻冻干机械损伤，提高益生菌的冻干存活率和储存稳定性[30]。本节探究了复合保护剂对冻干菌粉活力的影响。由图 3 可知，与不添加保护剂的对照组相比，添加保护剂后，植物乳杆菌的冻干存活率显著提高(P<0.05)。其中，单一冻干保护剂中，脱脂奶粉组的冻干菌粉活力最高，冻干后菌体细胞存活率达到 87.90%±0.77%，而添加复合保护剂后，植物乳杆菌存活率达到 94.22%±2.36%，极显著高于对照组(P<0.0001)，但与添加单一脱脂奶粉为保护剂组间差异不显著(P>0.05)。复合保护剂中，在几种不同的保护剂协同作用下，可有效降低冻干过程对菌体细胞的损伤，其中主要发挥作用的成分是脱脂奶粉。表明，添加复合冻干保护剂后可显著提高冻干菌粉中植物乳杆菌活力，且比添加单一保护剂呈现出更好的细胞保护效果。

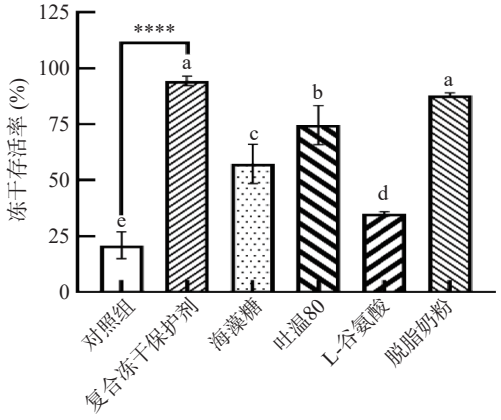


图 3 冻干菌粉的活力对比验证

Fig.3 Comparative verification of the viability of freeze-dried bacterial powder

注：****表示组间差异显著(P<0.0001)；不同字母表示组间有显著差异(P<0.05)。

2.2.2 冻干保护剂对植物乳杆菌微观结构的影响

利用 SEM 进一步观察复合冻干保护剂对植物乳杆菌细胞表面微观形态的影响。由图 4A 可知，复合冻干保护剂覆盖在菌体细胞表面，使植物乳杆菌菌体细胞表面光滑，菌体细胞完整。对照组菌体细胞表面呈现皱缩现象，部分菌体细胞破损(图 4B)。由图 4C 可知，除去菌体表面复合冻干保护剂后，菌体细胞仍

完整。图 4D 中，对照组菌体细胞皱缩并出现部分孔洞。结果表明复合冻干保护剂能更好地保护植物乳杆菌免受冻干过程的机械损伤。

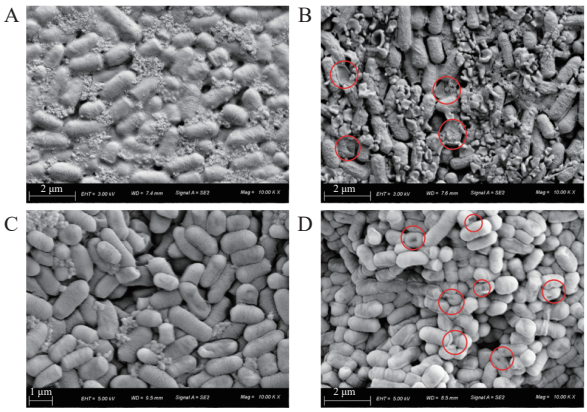


图 4　冻干菌粉扫描电镜图(10000×)

Fig.4　Scanning electron microscopy images of freeze-dried bacterial powder (10000×)

注：A. 复合冻干保护剂；B. 对照组；C. 去除复合冻干保护剂；D. 对照组(去除复合冻干保护剂)。

2.2.3　冻干保护剂对植物乳杆菌稳定性的影响　添加复合冻干保护剂的冻干菌粉，在室温(RT)、4 ℃、−20 ℃ 条件下贮存存活率随时间变化的情况可以作为冻干菌粉稳定性的判断依据。由图 5 可知，添加复合冻干保护剂后的冻干菌粉在−20 ℃、4 ℃ 均能在 60 d 内保持较高的活力。在室温保存效果差，贮存 60 d 后冻干存活率降至 4.88%±0.88%，活菌数为(4.84±0.88)×10^8 CFU/mL。在 4 ℃ 保存 60 d 后，存活率维持在 46.91%±3.88%，活菌数为(3.60±0.30)×10^9 CFU/mL。冻干菌粉的最佳保存温度为−20 ℃。添加复合冻干保护剂的冻干菌粉在−20 ℃ 储存 60 d 后，存活率仍维持在 59.64%±1.74%，且活菌数仍有(4.58±0.13)×10^9 CFU/mL，活菌数显著高于室温保存的样品(P<0.05)，显示出更好的贮存稳定性。

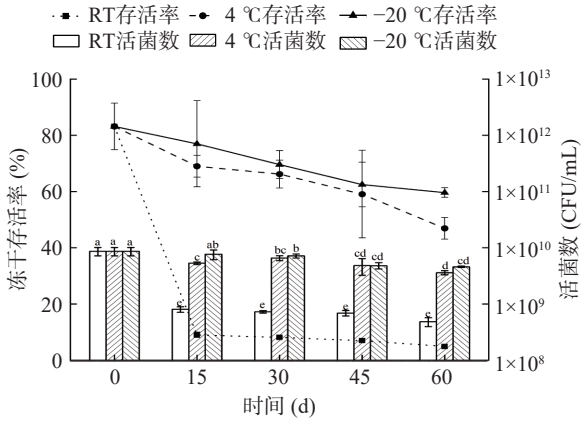


图 5　冻干菌粉贮存稳定性曲线

Fig.5　Freeze-dried bacterial powder storage stability curve

2.3　冻干保护剂对植物乳杆菌的保护机制

2.3.1　冻干保护剂对植物乳杆菌傅里叶红外光谱(FITR)的影响　FITR 通过识别样品溶液中化学键和官能团种类，可用于分析未知的单个或混合化合物结构。该光谱技术基于分子振动，可以深入了解体系中发生的分子相互作用。如图 6 所示，与不添加保护剂组相比，添加复合保护剂后样品在 3600~2990 cm^{-1} 处的-OH、-NH 伸缩振动峰发生位移，表明这些吸收峰对分子间和分子内的氢键敏感[31]。除此之外，添加单一保护剂组均发生不同程度的位移，分子间氢键导致该宽吸收带发生移动，这表明在所有检测的样品中都存在离子-亲水/疏水相互作用。在 4 种冻干保护剂中，海藻糖组 3600~2990 cm^{-1} 处的吸收峰变化最明显，是影响氢键的主要因素。2990~2800 cm^{-1} 处的吸收峰归因于-CH_2反对称和对称拉伸，与样品中的脂肪酸含量有关[32]。与不添加保护剂相比，复合冻干保护剂组和吐温 80 组在这一段的吸收峰增宽，说明吐温 80 影响了脂肪酸组分。氨基酸中，都存在一种独特的脂肪族羧基-COOH 的伸缩振动带位于 1630~1650 cm^{-1} 区域，L-谷氨酸组与复合冻干保护剂组的吸收峰偏移证明氨基酸组分整合到了细胞中[32]。1080~1020 cm^{-1} 处，复合冻干保护剂组、海藻糖组、脱脂奶粉组出现了峰的偏移，这一段光谱与碳水化合物相关，证明海藻糖和脱脂奶粉影响了糖类组分[33]。添加复合冻干保护剂后，样品的红外光谱中整体吸收峰带增宽和强度下降与四种保护剂均相关，没有新的吸收带，表明在制备过程中四种保护剂没有发生化学键合，且均与细胞发生了相互作用，其中氢键的作用明显。

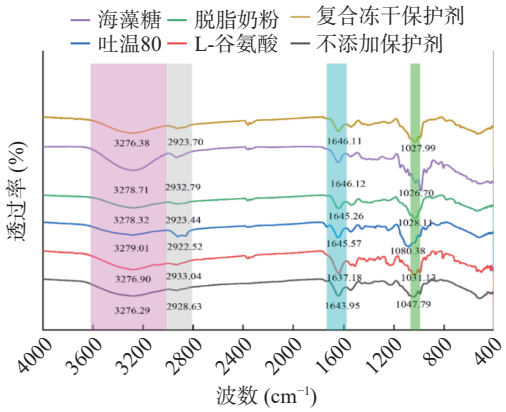


图 6　五种冻干保护剂对植物乳杆菌 FTIR 的影响

Fig.6　Effect of five cryoprotectants on the FTIR of *Lactiplantibacillus plantarum*

2.3.2　冻干保护剂对植物乳杆菌热力学性能的影响　采用 DSC 法对冻干菌粉的冻融热稳定性进行了评价。当样品发生熔融、分解等吸热反应时，DSC 曲线表现为向下的吸热峰[34]。由图 7 所示，与不添加保护剂组相比，添加复合冻干保护剂后吸热峰值 T_p 由 64.46 ℃ 升高至 83.41 ℃，峰型更尖锐，证明保护剂的添加增强了不同组分之间的相互作用，如氢键相互作用、疏水相互作用等，这与傅里叶红外光谱分析结果一致，因此，复合冻干保护剂提升了冻干菌粉的热稳定性。

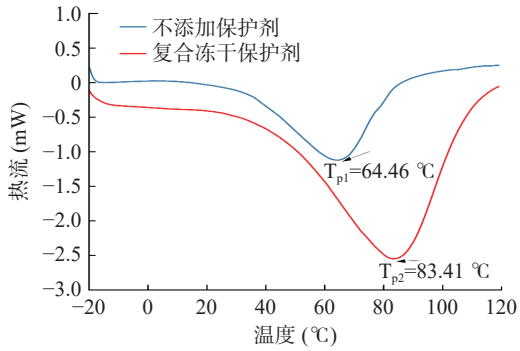


图 7 冻干保护剂对植物乳杆菌热力学性能的影响

Fig.7 Effect of freeze-drying cryoprotectants on the thermodynamic properties of *Lactiplantibacillus plantarum*

2.3.3 冻干保护剂对植物乳杆菌亚细胞损伤的影响

细菌细胞对溶菌酶非常敏感，当细菌细胞壁受损时，细菌不能在含有溶菌酶的选择性培养基上生长[26]。Na^+和 Cl^-均可穿过受损细胞膜进入细胞内，破坏细胞内环境的稳态，从而引起细菌细胞死亡[35]。因此，本研究利用菌株细胞对溶菌酶、NaCl 的敏感性分别评估细菌细胞壁、细胞膜的损伤程度。由图 8A、图 8B 可知，与不添加保护剂对比，添加复合冻干保护剂后，植物乳杆菌在含亚致死浓度溶菌酶、NaCl的培养基中生长，细胞死亡率均显著降低（P<0.05），在含溶菌酶的培养基中细胞死亡率为 1.96%±0.98%，在含 NaCl 的培养基中细胞死亡率为 5.81%±3.67%。而添加单一保护剂的样品中，细胞壁损伤实验 L-谷氨酸与复合保护剂组的细胞死亡率无显著差异（P>0.05），细胞膜损伤实验吐温 80 与复合冻干保护剂组无显著差异（P>0.05），其余组与复合冻干保护剂组均有组间显著差异（P<0.05）。这是由于复合保护剂中几种不同的保护剂成分协同作用，其中 L-谷氨酸主要发挥对细胞壁的保护作用，吐温 80 则是保护细胞膜的重要成分。海藻糖能稳定细胞膜上的氢键网络[15]，L-谷氨酸能调节肽聚糖的代谢[16]，吐温 80 能补充细胞膜上的油酸[17]，脱脂奶粉能覆盖在菌体细胞表面抵抗冰晶损伤[14]，添加复合冻干保护剂的冻干菌粉细胞膜、细胞壁亚损伤降低，细胞死亡率显著下降（P<0.0001）。因此，复合保护剂对于细胞膜、细胞壁的完整性保护效果更好。

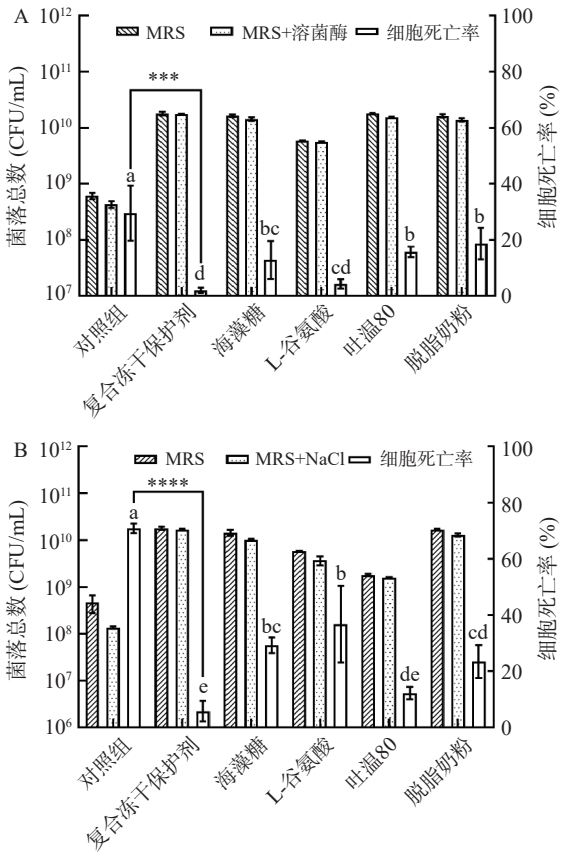


图 8 复合保护剂对冻干植物乳杆菌亚细胞结构的影响

Fig.8 Effect of cryoprotectant on the subcellular structure of freeze-dried *Lactiplantibacillus plantarum*

注：A. 冻干保护剂对冻干植物乳杆菌细胞壁完整性的影响；B. 冻干保护剂对冻干植物乳杆菌细胞膜完整性的影响；***表示组间差异显著（P<0.001）；****表示组间差异显著（P<0.0001）；不同字母表示组间有显著差异（P<0.05）。

2.3.4 冻干保护剂对植物乳杆菌细胞膜完整性的影响 采用荧光显微镜观察 SYTO/PI 标记后的冻干样品进行观察。图 9 为细菌细胞的荧光观察图像。PBS 溶液中的菌株在冷冻干燥后表现出明显的红色

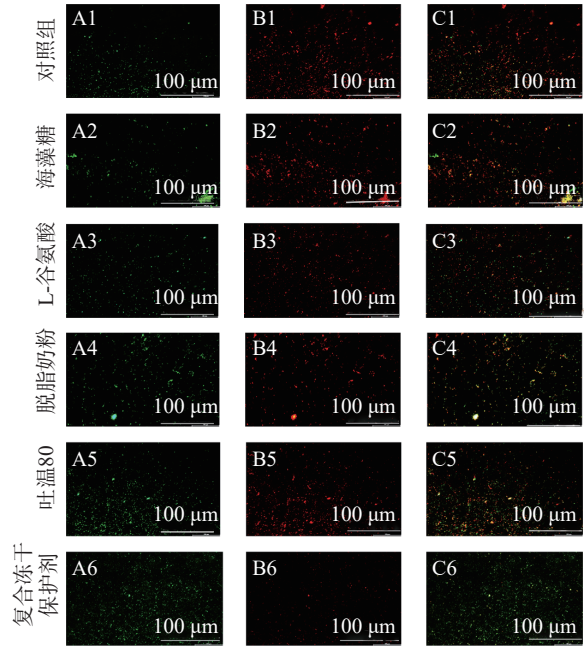


图 9 添加复合冻干保护剂对冷冻干燥后植物乳杆菌细胞膜完整性的影响

Fig.9 Effect of adding compound cryoprotectant on the integrity of the cell membrane of freeze-dried *Lactiplantibacillus plantarum*

注：A1~A6：SYTO 染色发出绿色荧光的细胞膜完整的细胞；B1~B6：PI 染色的细胞膜破损的细胞；C1~C6：两种荧光染色照片合并图像。1~6 号代表不同的六组，1 组为在 PBS 中冻干的细菌细胞对照组，2 组为添加单一海藻糖为保护剂的细菌细胞实验组，3 组为添加 L-谷氨酸的实验组，4 组为添加脱脂奶粉的实验组，5 组为添加吐温 80 的实验组，6 组为添加复合保护剂的实验组。

荧光（图 9B1）和少量的绿色荧光（图 9A1），表明未经冻干保护剂处理的细菌细胞膜在冷冻干燥过程中被破坏的程度较为严重。图 9C6 中绿色荧光（活细菌细胞）的面积大于红色荧光（死细菌细胞）的面积，表明复合冻干保护剂能有效维持植物乳杆菌细胞膜的完整性，这与细胞膜损伤的结果较为一致。图 9C1~图 9C6 显示，添加不同冻干保护剂的样品中，添加复合冻干保护剂的样品绿色荧光强度最强，表明复合冻干保护剂比单一冻干保护剂对细胞膜完整性的保护效果更好。实验结果表明，添加复合冻干保护剂可以维持植物乳杆菌细胞膜的完整性和植物乳杆菌菌体细胞的正常形态，对于提高植物乳杆菌的冻干存活率至关重要。

2.3.5　冻干保护剂对植物乳杆菌乳酸脱氢酶活性的影响　乳酸脱氢酶（Lactate dehydrogenase，LDH）是糖酵解中催化乳酸转化为丙酮酸以产生能量的关键酶。图 10 显示了加入不同冻干保护剂的冻干菌粉的 LDH 活性，加入复合冻干保护剂的样品中 LDH 活性极显著高于对照组（P<0.0001），达到 9.08±0.62 mU/mL，且显著高于单一保护剂组（P<0.05）。结果表明，复合冻干保护剂对 LDH 酶活性具有保护作用，且比单一冻干保护剂保护效果更好。

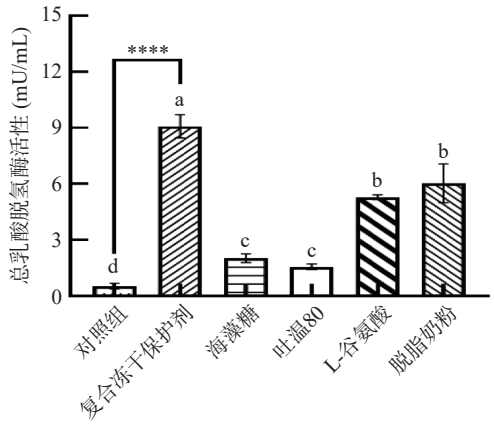


图 10　添加复合冻干保护剂对冻干植物乳杆菌乳酸脱氢酶活性的影响

Fig.10　Effect of adding compound cryoprotectants on the lactate dehydrogenase activity of freeze-dried *Lactiplantibacillus plantarum*

注：****表示组间差异显著（P<0.0001）；不同字母表示组间有显著差异（P<0.05）。

2.3.6　相关性分析　使用 Origin 2025 进行相关性分析，探究添加冻干保护剂后植物乳杆菌冻干存活率、LDH 活性、细胞膜损伤程度与活死细胞荧光染色强度之间的相关性关系（图 11）。添加复合冻干保护剂后，植物乳杆菌的冻干存活率与 LDH 活性、活细胞荧光染色强度呈显著的正相关（P<0.01），结果表明复合冻干保护剂对植物乳杆菌的保护作用主要是通过提高植物乳杆菌 LDH 活性、保护植物乳杆菌细胞膜的完整性，从而使植物乳杆菌活细胞数上升、死细胞数下降，进一步提高了植物乳杆菌的冻干存活率。

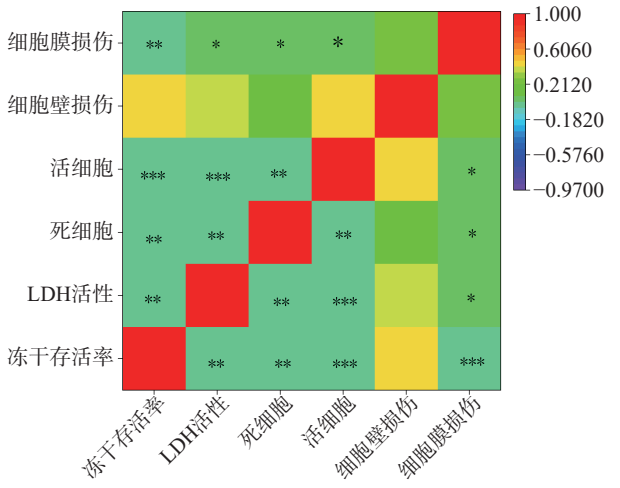


图 11　相关性分析结果

Fig.11　Results of correlation analysis

注：*表示组间有显著差异（P<0.05），*的数量表示组间差异显著性水平的程度：**表示 P<0.01，***表示 P<0.001，****表示 P<0.0001。

3　讨论与结论

植物乳杆菌在冻干过程中，菌体细胞会受到一定程度的损伤，导致活菌数减少，而冻干保护剂能提高植物乳杆菌的冻干存活率。研究表明 L-半胱氨酸可以提高植物乳杆菌冻干存活率至 80.21%[36]。天冬氨酸作为冻干保护剂，能使植物乳杆菌冻干存活率提高至 85.89%±1.09%。而单一保护剂对植物乳杆菌的保护作用有限，开发复合冻干保护剂可有效提升菌体细胞存活率。Tian 等[37] 研究发现，以 10% 脱脂奶粉、3% 谷氨酸钠和 15% 海藻糖作为植物乳杆菌 LB12 的复合冻干保护剂，菌体细胞冻干存活率可提高至 83.65%±1.22%。本研究开发了一种复合冻干保护剂，添加复合冻干保护剂的植物乳杆菌冻干菌粉在−20 ℃ 条件下保存 60 d 后，菌体细胞存活率维持在 59.64%±1.74%，且活菌数仍有（4.58±0.13）×10^9 CFU/mL。

不同种类的冻干保护剂在冻干过程中保护细胞的机理有一定的差异。海藻糖是一种非渗透的冻干保护剂，可以与细胞膜的极性基团形成氢键保护细胞膜，但对于胞内冰晶损伤没有保护效果[38]。L-谷氨酸作为氨基酸的一种，可以穿透细胞膜，减小胞内脱水损伤，同时它还可通过调节细胞代谢，增加菌体细胞膜和细胞壁的稳定性[39]。有研究表明，吐温 80 可以诱导细菌生长过程中更高的 *cfa* 基因表达，并使细胞膜具有更好的膜流动性[40]，从而在冻干过程中调控细胞膜，保证细胞膜的完整性。脱脂奶粉是一种非渗透型的冻干保护剂，覆盖在细胞表面能阻止细胞与胞外冰晶接触，防止细胞膜上不饱和脂肪酸氧化，从而减少植物乳杆菌细胞损伤[41]。有研究表明，吐温 80 可以通过补充油酸调节细胞膜不饱和脂肪酸的比例[17]，进一步提升冻干存活率。复合冻干保护剂中的成分具有协同保护作用，与添加单一冻干保护剂相比，复

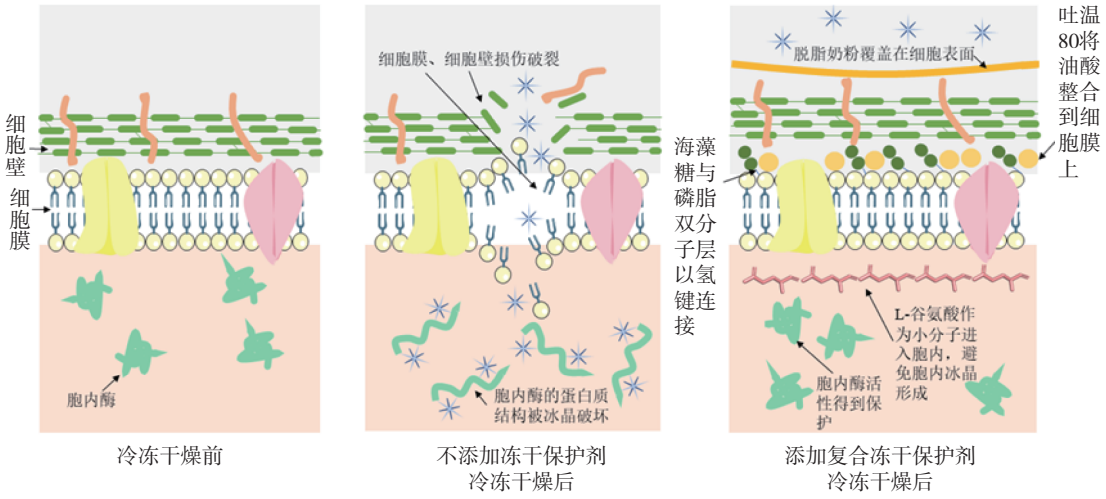


图 12　植物乳杆菌冻干保护剂的作用机制示意图

Fig.12　Mechanism schematic of cryoprotection for *Lactiplantibacillus plantarum* during freeze-drying

合冻干保护剂可通过降低细胞膜损伤，提高植物乳杆菌酶活性，进而提高植物乳杆菌冻干存活率，其中相应成分对细胞的保护作用机理如图 12。本研究中制备的复合冻干保护剂配方，主要是通过减少细胞膜及细胞壁损伤、维持胞内酶活性，从而提高植物乳杆菌的冻干存活率。Majidzadeh 等[42] 在研究中使用 0.5% 的蛋白胨、12% 的脱脂奶粉、1% 的麦芽糊精作为复合冻干保护剂保护植物乳杆菌，在 4 ℃ 条件下储藏 30 d 后植物乳杆菌冻干存活率为 49.53%。本研究复合冻干保护剂配方贮存稳定性更好，对于植物乳杆菌活性的保持效果更佳。

本研究通过单因素实验和正交试验确定复合植物乳杆菌冻干制剂保护效果最佳的复合冻干保护剂配方为添加 0.15 g/mL 脱脂奶粉、0.06 g/mL 的海藻糖、0.03 mL/mL 的吐温 80、0.014 g/mL 的 L-谷氨酸。在此复配比例下，植物乳杆菌冻干存活率由对照组的 20.96%±5.89% 提升到 94.22%±2.36%，且在−20 ℃ 贮存 60 d 后活菌数保持在 $(4.58\pm0.13)\times10^9$ CFU/mL。进一步阐明该保护剂配方的作用机理，为复合植物乳杆菌活菌制剂的应用研究提供了理论依据。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] 任大勇, 李昌, 秦艳青, 等. 乳酸菌益生功能及作用机制研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2011, 45(2): 47−50. [REN Dayong, LI Chang, QIN Yanqing, et al. Development review on healthy function and potential mechanisms of lactic acid bacteria[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2011, 45(2): 47−50.]

[2] EVANOVICH E, de SOUZA M M P J, GUERREIRO J F. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus plantarum*: An overview[J]. International Journal of Genomics, 2019, 2019(1): 4973214.

[3] SIEZEN R J, VAN HYLCKAMA V J E. Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer[J]. Microbial Cell Factories, 2011, 10(1): S3.

[4] 汤宁宁, 宋娜, 张艳丽. 传统发酵食品中的微生物群落及其对产品风味的影响研究[J]. 现代食品, 2024, 30(16): 92−95. [TANG Ningning, SONG Na, ZHANG Yanli. Research on the microbial community in traditional fermented foods and its impact on product flavor[J]. Modern Food, 2024, 30(16): 92−95.]

[5] KANG E A, CHOI H I, HONG S W, et al. Extracellular vesicles derived from kefir grain *Lactobacillus ameliorate* intestinal inflammation *via* regulation of proinflammatory pathway and tight junction integrity[J]. Biomedicines, 2020, 8(11): 522.

[6] 段昊, 吕燕妮, 闫文杰. 益生菌在我国保健食品中的应用进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(3): 384−394. [DUAN Hao, LÜ Yanni, YAN Wenjie. Application progress of probiotics in functional food in China[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(3): 384−394.]

[7] 李海新, 寇秀颖, 谢新强, 等. 高抗菌活性乳酸菌拮抗食源性致病菌的研究进展[J]. 微生物学报, 2022, 62(10): 3732−3740. [LI Haixin, KOU Xiuying, XIE Xinqiang, et al. High antibacterial activity of lactic acid bacteria against food-borne pathogens[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(10): 3732−3740.]

[8] JEONG Y, KIM H, LEE J Y, et al. The antioxidant, anti-diabetic, and anti-adipogenesis potential and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from human and fermented foods[J]. Fermentation, 2021, 7(3): 123.

[9] 苏帅, 孙会, 于航宇, 等. 鼠李糖乳杆菌的生物学功能[J]. 动物营养学报, 2019, 31(1): 97−101. [SU Shuai, SUN Hui, YU Hangyu, et al. Biological function of *Lactobacillus rhamnosus*[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2019, 31(1): 97−101.]

[10] FU Nan, HUANG Song, XIAO Jie, et al. Producing powders containing active dry probiotics with the aid of spray drying[J]. Advances in Food and Nutrition Research, 2018, 85: 211−262.

[11] RABAIOLI R G, KUHN D, BEUX S, et al. Cheese whey and ricotta whey for the growth and encapsulation of endogenous lactic acid bacteria[J]. Food and Bioprocess Technology, 2020, 13(2): 308−322.

[12] 毕金峰, 冯舒涵, 金鑫, 等. 真空冷冻干燥技术与产业的发展及趋势[J]. 核农学报, 2022, 36(2): 414−421. [BI Jinfeng, FENG Shuhan, JIN Xin, et al. Current status and development trend of freeze drying technology and industry[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2022, 36(2): 414−421.]

[13] GE Sitong, HAN Jiarun, SUN Qiaoyu, et al. Research progress on improving the freeze-drying resistance of probiotics: A review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2024, 147: 104425.

［14］ CAO Lin, XU Qinglian, XING Yage, et al. Effect of skimmed milk powder concentrations on the biological characteristics of microencapsulated *Saccharomyces cerevisiae* by vacuum-spray-freeze-drying[J]. Drying Technology, 2020, 38(4): 476−494.
［15］ WANG Ruixue, E Jingjing, YANG Ying, et al. Trehalose enhances the resistance of *Lactiplantibacillus plantarum* LIP-1 to spray- and freeze-drying treatments by regulating amino acid metabolism[J]. Food Bioscience, 2024, 60: 104256.
［16］ E Jingjing, ZHANG Jingya, MA Rongze, et al. Study of the internal mechanism of L-glutamate for improving the survival rate of *Lactiplantibacillus plantarum* LIP-1 after freeze-drying[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2023, 84: 103253.
［17］ XIA Yongjun, WANG Yizhen, PU Jing, et al. The protective effect of oleic acid on *Lactiplantibacillus plantarum* during freeze-drying[J]. Food Science and Human Wellness, 2023, 12(6): 2355−2361.
［18］ 李佳佳. 发酵乳杆菌 CECT5716 高密度培养及其发酵剂制备研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2022. ［LI Jiajia. High density culture of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 and preparation of its starter[D]. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology, 2022.］
［19］ 吴静怡. 乳酸菌高密度培养及冻干保护的研究[D]. 宁波: 宁波大学, 2021. ［WU Jingyi. Study on high-density cultivation and freeze-drying protection of lactic acid bacteria[D]. Ningbo: Ningbo University, 2021.］
［20］ CHEN Baiyan, WANG Xiaoying, LI Pengzhen, et al. Exploring the protective effects of freeze-dried *Lactobacillus rhamnosus* under optimized cryoprotectants formulation[J]. LWT, 2023, 173: 114295.
［21］ LI Xiaomin, CHE Liehua, WU Ying, et al. An effective strategy for improving the freeze-drying survival rate of *Lactobacillus curvatus* and its potential protective mechanism[J]. Food Bioscience, 2024, 58: 103794.
［22］ UMAR M, RUKTANONCHAI U R, MAKARARPONG D, et al. Compositional and functional analysis of freeze-dried bovine skim colostrum powders[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2023, 17(5): 4294−4304.
［23］ 徐远志, 孙宏骁, 张晏维, 等. 嗜黏蛋白阿克曼菌活菌制剂生产的冻干保护技术及机理[J]. 食品工业科技, 2025, 46(24): 201−210. ［XU Yuanzhi, SUN Hongxiao, ZHANG Yanwei, et al. Development and mechanistic insights into lyoprotective technology for *Akkermansia muciniphila* live biotherapeutic products[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(24): 201−210.］
［24］ YAO Caiqing, HE Zongbai, LI Jing, et al. Effect of glutathione on *Lactiplantibacillus plantarum* stability during room temperature storage and the underlying mechanism of action[J]. Food Bioscience, 2022, 48: 101792.
［25］ E Jingjing, CHEN Jing, CHEN Zichao, et al. Effects of different initial pH values on freeze-drying resistance of *Lactiplantibacillus plantarum* LIP-1 based on transcriptomics and proteomics [J]. Food Research International, 2021, 149: 110694.
［26］ ZHANG Qiaoling, MA Rongze, CAO Jinqi, et al. Mechanism study on the effect of adenine on the viability of *Lactiplantibacillus plantarum* LIP-1 powder *via* freeze-drying[J]. Food Science of Animal Products, 2023, 1(4): 9240042.
［27］ RODRIGUES R B, UCZAY M, BRITO V B, 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.
［28］ MURRAY A, KILBRIDE P, GBISON M. Trehalose in cryopreservation. Applications, mechanisms and intracellular delivery opportunities. RSC Med Chem. 2024 Jul 19;15(9):2980-2995.
［29］ XIA Yongjun, WANG Yizhen, PU Jing, et al.The protective effect of oleic acid on Lactiplantibacillus plantarum during freeze-drying.Food Science and Human Wellness,2023,Volume 12, Issue 6, 2355−2361.
［30］ 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.
［31］ PRADHAN R K, SINGH S. Studies on interactions of L-glutamic acid with L-arabinose/D-xylose in aqueous medium: Ultrasonic velocity and acoustic parameter studies supported by FTIR spectroscopic investigation[J]. Journal of Molecular Liquids, 2024, 412: 125790.
［32］ OHJA A, B G S, PUSHPADASS H A, et al. Encapsulation of *Lactiplantibacillus plantarum* CRD7 in sub-micron pullulan fibres by spray drying: Maximizing viability with prebiotic and thermal protectants[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 269: 132068.
［33］ MUHOZA B, XIA S Q, WANG X J, et al. The protection effect of trehalose on the multinuclear microcapsules based on gelatin and high methyl pectin coacervate during freeze-drying[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 105: 105807.
［34］ 陈珈玉, 张文华, 肖宇, 等. 鸭胸肉冻干粉末凝胶制备及其冻融稳定性[J]. 食品研究与开发, 2025, 46(11): 53−58,91. ［CHEN Jiayu, ZHANG Wenhua, XIAO Yu, et al. Gel prepared by freeze-dried powder of duck breast and its freeze-thaw stability[J]. Food Research and Development, 2025, 46(11): 53−58,91.］
［35］ ZHANG Qiaoling, MA Lili, CAO Jinqi, et al. Effects of the repair treatment on improving the heat resistance of *Lactiplantibacillus plantarum* LIP-1[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2023, 84: 103251.
［36］ E Jingjing, WANG Peixi, ZHANG Yue, et al. Harnessing L-Cysteine to enhance lyophilization tolerance in *Lactiplantibacillus plantarum*: Insights into cellular protection mechanisms[J]. LWT, 2024, 208: 116690.
［37］ TIAN Yue, HE Zuyan, HE Laping, et al. Effect of freeze-dried protectants on the survival rate and fermentation performance of fermented milk's directed vat set starters[J]. Cryobiology, 2024, 114: 104811.
［38］ ABADIAS M, BENABARRE A, TEIXIDÓ N, et al. Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 65(3): 173−182.
［39］ YANG Youxin, WANG Ruixue, CHEN Zichao, et al. Effects of exogenous amino acids on the freeze-drying survival rate of *Lactiplantibacillus plantarum* LIP-1[J]. Drying Technology, 2024, 42(4): 650−660.
［40］ MONTANARI C, SADO K S L, SERRAZANETTI D I, et al. Synthesis of cyclopropane fatty acids in *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus sanfranciscensis* and their cellular fatty acids changes following short term acid and cold stresses[J]. Food Microbiology, 2010, 27(4): 493−502.
［41］ SILVA S F A, ACOSTA-HERNÁNDEZ B, RADUÁN J J, et al. Preservation of *Malassezia pachydermatis* using skimmed milk as cryoprotective agent[J]. Journal of Microbiological Methods, 2017, 132: 166−167.
［42］ MAJIDZADEH H R, 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(4): 505−512.