

# 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

刘彩虹 邵玉宇 任艳 孟和毕力格 张和平\*

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 内蒙古 呼和浩特 010018)

**摘要:** 经真空冷冻干燥得到的乳酸菌发酵剂存活率和后期的低温贮藏稳定性与诸多因素相关。本文综述了制备乳酸菌发酵剂过程中高密度发酵和真空冷冻干燥工艺的不同对乳酸菌抗冷冻性的影响, 其中高密度发酵过程中的培养基组分、培养温度、发酵恒定 pH、中和剂的选择、菌体收获时期和发酵结束后处理以及真空冷冻干燥过程中保护剂的添加、预冷冻处理等是影响乳酸菌抗冷冻性的重要因素。通过对这些相关因素的综述分析, 为提高乳酸菌发酵剂的冻干存活率和后期的低温贮藏稳定性提供新的思路, 且应用抗冷冻性强、活力高的乳酸菌发酵剂对有效提高乳制品的质量和企业的经济效益意义重大。

**关键词:** 乳酸菌, 高密度发酵, 真空冷冻干燥, 抗冷冻性

## Effect of the technology of high cell density cultivation and vacuum freeze-drying on cryotolerance property of lactic acid bacteria

LIU Cai-Hong SHAO Yu-Yu REN Yan MENGHE Bilige  
ZHANG He-Ping\*

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China)

**Abstract:** The survival rate and low temperature stability of lactic acid bacterial starter ob-

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2011AA100901, 2011AA100902)

\*通讯作者: Tel: 86-471-4319940; ✉: hepingdd@vip.sina.com

收稿日期: 2012-09-24; 接受日期: 2012-12-11

tained by vacuum freeze-drying are governed by several factors. In this paper, the influence of the technology of high cell density cultivation and vacuum freeze-drying on cryotolerance of lactic acid bacteria for use as starters was analyzed. During fermentation, the following factors had a significant effect on the cryosurvival of lactic acid bacteria: culture medium, temperature control, pH stat, the neutralizer used, the harvesting stage of the cell crop, and post-fermentation handling of the concentrated cells. Factors affecting cell viability subjected to lyophilization include the following: cryoprotectants used, conditions used in initial freezing of the cell concentrate, and during vacuum freeze-drying. A good understanding of these factors will provide a reliable technology for preserving high cell density starter. The use of starter bacteria with high cryotolerance and viability can improve the quality of fermented milk products and boost economic benefits to the dairy industry.

**Keywords:** Lactic acid bacteria, High cell density cultivation, Vacuum freeze-drying, Cryotolerance

近年来, 乳酸菌的研究与相关产品的开发得到迅猛发展, 但仍有许多问题需要解决, 其中乳酸菌发酵剂在真空冷冻干燥过程中的存活率和低温贮藏稳定性极其重要, 直接影响着企业的经济效益, 而影响乳酸菌抗冷冻性的不仅仅是真空冷冻干燥工艺, 更重要的还有前期的高密度发酵工艺, 且后者往往被乳酸菌发酵剂生产者所忽视。高密度发酵是近年来发展起来的发酵技术, 它不仅是生产高质量的浓缩型菌体和代谢产物的重要环节, 也是工程菌和非工程菌能否实现规模生产的关键性因素。高密度发酵得到的菌体需要通过一些手段去除其中的水分, 以使得乳酸菌能够长期贮藏并保持较高的活力, 并能够方便地应用于乳制品的生产中, 而真空冷冻干燥可以满足上述要求, 可在真空条件下将预冻样品中的冰直接升华, 实现低温条件下去除水分的目的。目前, 最大限度地提高乳酸菌存活率及后期的低温贮藏稳定性至关重要, 因此优化乳酸菌的高密度发酵工艺及真空冷冻干燥工艺以提高乳酸菌发酵剂的冻干存活率和贮藏稳定性具有重大意义。

## 1 乳酸菌高密度发酵工艺对其抗冷冻性的影响

### 1.1 培养基的组分及含量对其抗冷冻性的影响

培养基的组分对乳酸菌的抗冷冻性影响较大, 因此在乳酸菌的培养基优化过程中, 不仅要参考以发酵液活菌数作为参考指标, 更重要的是要参考在该种培养基下培养得到的乳酸菌在后期的真空冷冻干燥过程中的存活率, 以得到一个具有实际经济效益的培养基。

**1.1.1 培养基中的碳源、氮源对其抗冷冻性的影响:** 培养基的组分对乳酸菌抗冷冻性影响较大, 其中碳氮源是主要的影响因素, 培养基中的糖类一方面可作为细胞生长的碳源, 另一方面也可作为生长培养基中渗透性应激诱导物。Wang 等<sup>[1]</sup>对嗜酸乳杆菌 RD758 在乳糖缺少的情况下培养并研究其抗冷冻性的变化。在乳糖缺少的情况下嗜酸乳杆菌 RD758 表现出较高的抗冷冻性和活力, 通过气相色谱对乳糖缺少的培养条件下嗜酸乳杆菌 RD758 细胞膜脂肪酸的种类及含量的测定发现, 其细胞膜不饱和脂肪酸含量增加, 饱和脂肪酸含量减少即细胞膜的流动性增强; 通过双向

电泳研究发现乳糖缺少的情况下,有11种与代谢有关的新蛋白质合成,且另有一种应激蛋白质的合成量是乳糖充足时合成量的3倍。包维臣等<sup>[2]</sup>研究表明保加利亚乳杆菌ND02在不同培养基中发酵时其存活率不同,当培养基的氮源由酵母浸粉变为动物蛋白胨时,其冻干菌粉活菌数由 $1 \times 10^9$  CFU/mL变为 $6 \times 10^9$  CFU/mL,且真空冷冻干燥过程的存活率明显升高。

**1.1.2 培养基中的金属离子对其抗冷冻性的影响:**培养基中的金属离子对乳酸菌的抗冷冻性影响较大。嗜酸乳杆菌NCFM和RL8K<sup>+</sup>、RL8K<sup>s</sup>在培养基中添加钙离子时,其存活率可提高到80%和89%,显微镜观察发现添加钙离子后其细胞形态由长细丝状变为短杆状,而相关研究表明细胞为短杆状时抗冷冻性较强<sup>[3]</sup>。

Wright、Bèal等研究发现培养保加利亚乳杆菌1243-F和嗜热链球菌CFS2时,钙离子添加量最适浓度范围是 $3.4 \times 10^{-3}$ – $6.7 \times 10^{-3}$  mol/L,且其抗冷冻能力并不随培养基中钙离子的浓度增高而增强。钙离子所带有的阴离子不仅可有效中和其在培养过程中产生的乳酸,防止其对收获和浓缩前的菌体细胞造成过酸损伤,同时钙离子的添加还可以提高促进因子如油酸和吐温-80的效力,这是由于冷冻期间细胞内液体状态变为液体冰晶状态降低细胞膜的流动性,改变饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸之间的比例,而不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比例越高其抗冷冻能力越强<sup>[4-5]</sup>。相关研究表明,当镁离子与钙离子复合使用时,其抗冷冻能力相对减弱;而与钙离子相反,若在培养基中加入磷酸盐,虽可起缓冲和抗噬菌体作用,但它可使球菌和杆菌的形态发生改变,从而降低了乳酸菌冷冻干燥中的存活率<sup>[5]</sup>。Carvalho等<sup>[6]</sup>研究发现粪肠球菌EF1和耐久肠球菌ED1在锰离子缺失的情况下,大部分乳酸菌对氧自由基的敏感度增加,因为锰离子对存在于细胞内的含锰

金属辅基的超氧化物歧化酶(Mn-SOD)的结构至关重要,可以保障含锰金属辅基的超氧化物歧化酶发挥其作用。这类含锰金属辅基的超氧化物歧化酶在乳酸菌不同的种属中均有发现,对保护乳酸菌抵抗氧自由基有着重要作用,从而对低温条件下乳酸菌稳定性的提高起着积极作用。

**1.1.3 培养基中的其它成分对其抗冷冻性的影响:**一些培养基的组分直接影响着乳酸菌细胞膜结构的变化,可以使不饱和脂肪酸含量相对增加。吐温-80的添加可提高乳酸菌的抗冷冻性,Fonanda等<sup>[7]</sup>研究表明,在培养基中添加吐温-80可以改善乳球菌和乳杆菌的活性,增加细胞膜中不饱和脂肪酸的组成,从而改变细胞膜的流动性,进而影响其存活率。钙离子与吐温-80复合使用对其存活率的提高更有效。

## 1.2 乳酸菌的生长温度对其抗冷冻性的影响

乳酸菌适宜的生长温度对其抗冷冻性具有重要的影响,很多研究发现细胞的生长温度通过改变其细胞膜内脂肪酸的组成而影响其存活率。嗜酸乳杆菌RD758、嗜酸乳杆菌CRL640、棒状乳杆菌Si3及保加利亚乳杆菌L2在30℃、35℃、37℃分别发酵培养时,通过比较冷冻前后酸化活力的差值可知,在30℃培养时其抗冷冻能力最强,冻干存活率高达67%,此时细胞膜内不饱和脂肪酸C18:2组成明显增加;此外低温培养还会影响菌体多糖合成,乳酸菌在27℃培养比在37℃产生的不溶性多糖高3-5倍,而这种多糖物质可以提高冷冻干燥存活率<sup>[8-11]</sup>。通过以上综述得知,当乳酸菌在其最适生长温度低2℃下培养生长时,能达到较高的抗冷冻性,当生长温度高于或低于最适生长温度10℃时,其抗冷冻性会有所下降。

## 1.3 高密度发酵过程中恒定pH对乳酸菌抗冷冻性的影响

乳酸菌生长的pH对其抗冷冻能力具有重要

的影响。在优化高密度发酵过程中的恒定 pH 时, 选择较低的酸性环境更有利于提高乳酸菌的抗冷冻性, 但这个过程可能会影响到乳酸菌发酵液的活菌数进而影响到最终的产量, 因此在综合诸多因素的情况下, 选择较合适的恒定 pH 十分重要。

球菌更适合在 pH 值较高(6.0)的 41 °C 条件下生长; 杆菌更适合在 pH 值较低(5.0)的 41 °C 条件下生长。罗伊氏乳杆菌 ATCC55730、嗜酸乳杆菌 RD758 和酒酒球菌 SD-2a 在恒定 pH 为 5.0 的培养基中生长时其抗冷冻能力强, 而在 pH 为 6.0–6.8 时抗冷冻能力较差; 当 pH 为 5.0 条件下培养时细胞膜内不饱和脂肪酸 C19:0 比例较高, 其抗冷冻性增强<sup>[8,12–13]</sup>。Zavaglia 等<sup>[14]</sup>研究表明不饱和脂肪酸含量的增加有助于嗜酸乳杆菌抗冷冻特性的提高, 而细胞膜内 C19:0 脂肪酸含量的增加有助于保加利亚乳杆菌抗冷冻特性的提高<sup>[15]</sup>。干酪乳杆菌 Zhang 和嗜酸乳杆菌 CFS2 在 pH 为 5.8 发酵时, 其抗冷冻性较好, 通过不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比例分析发现, 此 pH 可以引起细胞膜内不饱和脂肪酸的积累, 过酸和过碱都对其生长速率和存活产生一定抑制。但在添加油酸之后, pH 的影响将会失去, 因为油酸可使细胞膜流动性增强, 有利于细胞的跨膜转运<sup>[13,16]</sup>。包维臣<sup>[2]</sup>研究发现保加利亚乳杆菌 ND02 在普通 MRS 培养基中生长 12 h 后, 不同恒定 pH 对其细胞形态学影响很大, 当 pH 为 5.7 时细胞形态为细长形, 而当 pH 为 5.0 时细胞呈现短粗状。

#### 1.4 高密度发酵过程中中和剂对乳酸菌抗冷冻性的影响

乳酸菌在生长的过程中会产生大量酸, 这些酸会抑制其生长, 因此必须选择适当的中和剂使其维持恒定的 pH, 利于乳酸菌的生长, 进而提高其抗冷冻能力。Fonseca 等<sup>[7]</sup>研究表明, 嗜热链球菌 CFS2、保加利亚乳杆菌 CFL1 及乳脂链球

菌 ML1 培养时调整 pH 所用的中和剂由 20% 氨水变为 20% NaOH 时, 其发酵液活菌数由  $1.1 \times 10^{10}$  CFU/mL 变为  $6.7 \times 10^9$  CFU/mL, 其真空冷冻干燥存活率明显降低; 李妍等也研究表明不同的中和剂对干酪乳杆菌 Zhang 的生长影响不一, 其中 25% 的氨水效果最好<sup>[16]</sup>。弱碱氨水更适合作为中和剂是由于氨水中游离的  $\text{NH}_4^+$  更容易透过细胞壁刺激其生长, 且可以通过降低蛋白水解酶活性而限制糖酵解的速度。张兴昌<sup>[17]</sup>研究表明不同的中和剂对嗜热链球菌 ND03 高密度发酵中耗碱量和存活率的影响差异显著, 当中和剂为 30%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液时, 比氨水少消耗约 20 mL, 但用 25% 氨水作中和剂时存活率较 30%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  作中和剂存活率高, 因此选择合适的中和剂对乳酸菌的存活率有重要影响。

#### 1.5 菌体细胞的收获时期对其抗冷冻性的影响

乳酸菌在生产的过程中为了得到更高的活菌数, 必须把菌体从培养基中离心收集从而使菌体与代谢中产生的毒物(如乳酸盐等)分开, 从生理状态上讲对提高冷冻干燥后存活率有益, 而收获过程中直接影响生存能力的则是菌体的菌龄。

酒酒球菌 SD-2a 在生长的过程中随着葡萄糖代谢产物等一系列有机酸的产生, 其生长 pH 从对数期中期的 4.8 下降到稳定期初期的 3.6, 细胞在此生长过程中细胞膜内不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸比率由 30.5% 降低到 26.6%。研究发现在对数期中期收获的菌体较稳定期初期收获的菌体经冻干后的存活率高 8 倍, 存活率高达 85%<sup>[13,18]</sup>。Lee 等<sup>[19]</sup>研究表明, 乳乳球菌 DRC-2 和 DRC-2C 在 10 °C 预冷处理 4 h 后, 对数期存活率较低, 分别为 28.5% 和 34.7%, 而稳定期存活率为 60% 和 61.2%。

#### 1.6 高密度发酵结束后处理对其抗冷冻性的影响

细胞培养结束后的后处理对其抗冷冻性有极

其重要的影响, 研究发现保加利亚乳杆菌 ND02 和嗜热链球菌 ND03 在培养结束后, 将发酵终点的发酵液 pH 分别调至 6.5 和 6.6, 温度降低到 30 °C 以下离心时, 离心后两个菌的产酸活力均高于未调 pH 所得菌体, 且其冻干后存活率大大提升<sup>[2,17]</sup>。张中青等<sup>[26]</sup>研究发现在对数期末期保加利亚乳杆菌 ATCC11842 菌液中添加 2% (W/V) NaCl 短暂刺激 2 h 后, 收集菌体其冻干存活率达到 65%, 且存活率是对照组即直接预冻并进行真空冷冻干燥细胞的 1.43 倍, 因而选择合适的刺激持续时间才能达到良好的效果。同时通过反相高效液相色谱法测得, 菌体胞内磷酸果糖激酶 (PFK) 在冻干前活性为 1.409 5 U/mg, NaCl 刺激后活性提高 37.4%; 冻干后活性降低为 0.968 5 U/mg, NaCl 刺激使 PFK 活性增加 31.4%。冷冻干燥过程影响了保加利亚乳杆菌正常生理代谢所需关键酶 PKF 的活性, NaCl 刺激能有效地减少冷冻干燥过程对 PKF 酶活的影响是由于 NaCl 改变了细胞内辅因子水平, 进而起到保护细胞的作用。因此高密度发酵结束后处理对乳酸菌存活率有很大的影响。张兴昌<sup>[17]</sup>研究发现离心前将嗜热链球菌 ND03 的发酵液 pH 调到 6.6, 离心后菌种产酸活力高于没调 pH, 其冻干存活率明显升高。

## 2 乳酸菌的冻干工艺对其抗冷冻性的影响

### 2.1 保护剂的添加对乳酸菌抗冷冻性的影响

冻干保护剂是影响冻干发酵剂活力最重要的外部因素, 因此乳酸菌在冻干前加入适当的保护剂, 可以提高细胞的存活率, 并且可以改善保藏期间乳酸菌的稳定性。国内外很多学者对冻干保护剂已有大量的研究, 其中甘油和二甲基亚砷的研究揭开了现代冻干保护剂研究的序幕。2010 年 Li 等<sup>[20]</sup>研究发现保护剂中蔗糖以 8% 添加后对经

冷冻干燥的干酪乳杆菌 Zhang 具有一定保护作用, 冻干后细胞活菌数为 3.20 LogCFU/mL。Giulio 等<sup>[21]</sup>研究发现德氏乳杆菌 DSM20081 冷冻干燥前保护剂有海藻糖的添加其保护效果更好, 通过冷冻干燥前后活菌计数结果比较可知冻干存活率显著增加。添加适宜的保护剂可以大大提高乳酸菌的抗冷冻性, 因此研究不同种类的保护剂对乳酸菌保护的作用机理, 并对添加的保护剂种类和含量进行优化具有重要意义。

### 2.2 菌体细胞冻干前的预冷处理对其抗冷冻性的影响

细胞经预冷处理后其细胞膜脂肪酸的组成和含量发生变化, 且诱导了一些冷激蛋白的合成, 用以调节自身对外界的冷刺激。因此, 细胞在较低的温度下进行预冷处理可以提高其对于冷冻和低温保藏的耐受能力。

乳酸菌经过预冷处理, 在较低的温度下发生冷激反应, 可以产生冷激蛋白 (CSPs), 饱和脂肪酸转化成不饱和脂肪酸, 这些变化对乳酸菌后期的冷冻干燥有极其重要的保护作用<sup>[22]</sup>。Capozzi 等<sup>[23]</sup>研究了一个热应激基因失活对植物乳杆菌 WCFS1 细胞形态和细胞膜流动性的影响, 通过扫描电镜观察基因 *hsp18.55* 缺失的突变体发现其细胞成簇且表面粗糙。因此, 热应激基因对于乳酸菌细胞膜流动性有着重要的影响。植物乳杆菌 NC8、唾液乳杆菌 CFR-2158 和嗜热链球菌 SFi39 及棒状乳杆菌 Si3 分别在 8 °C、20 °C、26 °C 预冷处理 4 h 后较 50 °C 处理 30 min 后细胞抗冷冻性高, 预冷处理后冷激蛋白 CspP 明显增加<sup>[10,24-25,27]</sup>, 乳杆菌、短乳杆菌和酒酒球菌 H-2 经 -65 °C 冷刺激 5 h 后, 冻干后的存活率为 83%<sup>[28-29]</sup>。低温条件下 CspB 和 CspE 的增加可以提高乳酸乳球菌的存活率, 而 CspP 的增多可以提高植物乳杆菌存活的能力<sup>[26]</sup>。因此, 经过预冷处理的乳酸菌, 细胞膜中脂肪酸的比例影响其抗冷冻能力。

### 2.3 预冷冻速率对其抗冷冻性的影响

细胞在冻结过程中影响菌体存活率的主要因素是冷冻速率, 其中缓慢冷冻过程可以增加细胞的抗冷冻性及保护其生理学特性。Bâati 等<sup>[30]</sup>研究表明, 缓慢冷冻可提高细胞的抗冷冻性, 嗜酸乳杆菌 ATCC4356 在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下冻结 24 h 活性大大降低, 存活率为 42.6%, 而当其分间断梯度( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ )冷冻时其存活率高达 74%。乳酸菌在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下每 20 min 下降  $1\text{ }^{\circ}\text{C}$  要比 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下每分钟下降  $1\text{ }^{\circ}\text{C}$  可获得较高的存活率。相关研究表明液氮预冻比在普通缓慢预冷冻条件下保加利亚乳杆菌的存活率高<sup>[2]</sup>。另外, 也有研究报道, 冷冻速率在  $5\text{--}180\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  之间时, 冷冻过程中胞内水分会完全渗出细胞, 胞内不会出现结晶, 细胞存活率较高。但 Dumont 等<sup>[31]</sup>真核生物菌种适宜慢速冻结, 而原核微生物菌种经慢速冻结和快速冻结后, 细胞存活率差异并不显著。

### 2.4 冷冻干燥过程对乳酸菌存活率的影响

冷冻干燥结束后, 在干燥物质的毛细管和极性集团上还吸附着一部分水分, 这些是未被冻结的, 当它们达到一定含量就为微生物的生长繁殖提供条件。但是, 水分含量过高, 残留的自由水与蛋白质相互作用, 造成蛋白质特定构象的改变, 同时冰晶体也会形成, 这些都会影响其冻干存活率, 降低储存过程中的稳定性。同时降低样品厚度, 增大干燥表面积可改善干燥效果, 此外采用适度真空度和较高搁板温度(不能使样品融化)时冰晶升华速度快, 能减轻样品过干程度。

细胞在冻干的过程中由于真空干燥胁迫细胞失去“结合水”, 由代谢过程向休眠状态转化造成部分菌体死亡。研究表明, 嗜热链球菌 ND03 在升华干燥的过程中, 其水分含量由 88.3% 变为 6%, 同时活菌数降低了 20%, 当水分含量由 89.1% 降至 3% 时, 活菌数仅降低了 10%。冻干发

酵剂在  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  时  $A_w$  值为 0.050–0.200 或水分含量为 1.5%–3.0% 时, 发酵剂的贮藏稳定性较高, 当水分含量大于 3.0% 或小于 0.5%, 发酵剂的冻干死亡率提高, 贮藏稳定性降低, 因此水分含量是产品质量的重要指标之一。因此在冷冻干燥的过程中必须选择适当的干燥温度和时间, 确定一个合理的冻干工艺使得冻干后的含水量在一个比较合适的范围, 可以提高冻干存活率, 同时可以提高发酵剂贮藏过程中的稳定性。

近几年国内外很多研究表明在制备乳酸菌发酵剂的过程中, 高密度发酵和真空冷冻干燥工艺对乳酸菌发酵剂的存活率及后期的低温贮藏稳定性有重要影响, 因此在研究乳酸菌发酵剂的抗冷冻性时不仅要进行保护剂的筛选, 更重要的是把握制备发酵剂高密度发酵和真空冷冻干燥过程中各项工艺条件对乳酸菌抗冷冻性的重要影响, 全面有效地提高乳酸菌发酵剂和发酵产品的质量, 进而提高生产效益。

## 参 考 文 献

- [1] Wang Y, Delettre J, Corrieu G, et al. Starvation induces physiological changes that act on the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758[J]. Biotechnology Progress, 2011, 27(2): 342–350.
- [2] 包维臣. 保加利亚乳杆菌高密度培养及冷冻保护的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2012.
- [3] Wright CT, Klaenhammer TR. Calcium-induced alteration of cellular morphology affecting the resistance of *Lactobacillus acidophilus* to freezing[J]. Microbiology, 1981, 41(3): 807–815.
- [4] Wright CT, Klaenhammer TR. Survival of *Lactobacillus bulgaricus* during freezing and freeze-drying after growth in the presence of Calcium[J]. Journal of Food Science, 1983, 48(3): 773–777.
- [5] Bèal C, Fonseca F, Corrieu G. Resistance to freezing and frozen storage of *Streptococcus*

- thermophilus* is related to membrane fatty acid composition[J]. Journal of Dairy Science, 2001, 84(11): 2347–2356.
- [6] Carvalho AS, Silva J, Ho P, et al. Effect of various growth media upon survival during storage of freeze-dried *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus durans*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 94(6): 947–952.
- [7] Fonseca F, Béal C, Corrieu G. Operating conditions that affect the resistance of lactic acid bacteria to freezing and frozen storage[J]. Cryobiology, 2001, 43(3): 189–198.
- [8] Wang Y, Corrieu G, Béal C. Fermentation pH and temperature influence the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758[J]. Journal of Science, 2005, 88(1): 21–29.
- [9] Murga ML, Cabrera GM, De Valdez GF, et al. Influence of growth temperature on cryotolerance and lipid composition of *Lactobacillus acidophilus*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2000, 88(2): 342–348.
- [10] Schoug Å, Fischer R, Heipieper HJ, et al. Impact of fermentation pH and temperature on freeze-drying survival and membrane lipid composition of *Lactobacillus coryniformis* Si3[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2008, 35(2): 175–181.
- [11] Li C, Zhao JL, Wang YT, et al. Synthesis of cyclopropane fatty acid and its effect on freeze-drying survival of *Lactobacillus bulgaricus* L2 at different growth conditions[J]. World Journal Microbiology Biotechnology, 2009, 25(9): 1659–1665.
- [12] Palmfeldt J, Hahn-Hägerdal B. Influence of culture pH on survival of *Lactobacillus reuteri* subjected to freeze-drying[J]. International Journal of Food Microbiology, 2000, 55(1/3): 235–238.
- [13] Li H, Zhao WY, Wang H, et al. Influence of culture pH on freeze-drying viability of *Oenococcus oeni* and its relationship with fatty acid composition[J]. Food and Bioprocesses, 2009, 87(1): 56–61.
- [14] Gomez Zavaglia A, Disalvo EA, De Antoni GL. Fatty acid composition and freeze-thaw resistance in lactobacilli[J]. Journal of Dairy Research, 2000, 67(2): 241–247.
- [15] Derzelle S, Hallet B, Ferain T, et al. Improved adaptation to cold-shock, stationary-phase, and freezing stresses in *Lactobacillus plantarum* overproducing cold-shock proteins[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(7): 4285–4290.
- [16] 李妍, 赵文静, 高鹏飞, 等. 优化益生菌 *Lactobacillus casei* Zhang 高密度培养条件[J]. 微生物学通报, 2009, 36(2): 181–186.
- [17] 张兴昌. 嗜热链球菌高密度培养及冷冻保护的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2011.
- [18] Zhang GQ, Fan MT, Li YH, et al. Effect of growth phase, protective agents, rehydration media and stress pretreatments on viability of *Oenococcus oeni* subjected to freeze-drying[J]. African Journal of Microbiology Research, 2012, 6(7): 1478–1484.
- [19] Lee K. Cold shock response in *Lactococcus lactis* ssp. diacetylactis: a comparison of the protection generated by brief pre-treatment at less severe temperatures[J]. Process Biochemistry, 2004, 39(12): 2233–2239.
- [20] Li H, Lu M, Guo H, et al. Protective effect of sucrose on the membrane properties of *Lactobacillus casei* Zhang subjected to freeze-drying[J]. Journal of Food Protection, 2010, 73(4): 715–719.
- [21] Giulio BD, Orlando P, Barba G, et al. Use of alginate and cryo-protective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005, 21(5): 739–746.
- [22] 邵玉宇, 陈霞, 杨梅, 等. 乳酸菌的抗冷冻性及耐受机理[J]. 微生物学通报, 2010, 37(2): 274–279.
- [23] Capozzi V, Weidmann S, Fiocco D, et al. Inactivation of a small heat shock protein affects cell morphology and membrane fluidity in *Lactobacillus plantarum* WCFS1[J]. Research in Microbiology, 2011, 162(4): 419–425.
- [24] Derzelle S, Hallet B, Ferain T, et al. Improved

- adaptation to cold-shock, stationary-phase, and freezing stresses in *Lactobacillus plantarum* overproducing cold-shock proteins[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(7): 4285–4290.
- [25] Varcamonti M, Arsenijevic S, Martirani L, et al. Expression of the heat shock gene *clpL* of *Streptococcus thermophilus* is induced by both heat and cold shock[R]. Microbial cell factories, 2006(5): 1–6.
- [26] 张中青, 李春, 刘宁. NaCl 刺激对乳杆菌冻干存活率及胞内磷酸果糖激酶的影响[J]. 微生物学通报, 2011, 38(10): 1554–1560.
- [27] Reddy K, Awasthi SP, Madhu A, et al. Role of cryoprotectants on the viability and functional properties of probiotic lactic acid bacteria during freeze drying[J]. Food Biotechnology, 2009, 23(3): 243–265.
- [28] Zhao G, Zhang G. Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying[J]. Journal of Applied Microbiology, 2005, 99(2): 333–338.
- [29] Kim WS, Khunajakr N, Dunn NW. Effect of cold shock on protein synthesis and on cryotolerance of cells frozen for long periods in *Lactococcus lactis*[J]. Cryobiology, 1998, 37(1): 86–91.
- [30] Bâati L, Fabre-Gea C, Auriol D, et al. Study of the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus*: effect of culture and freezing conditions on the viability and cellular protein levels[J]. International Journal of Food Microbiology, 2000, 59(3): 241–247.
- [31] Dumont F, Marechal PA, Gervais P. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(1): 268–272.

## 征订启事

### 欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于1974年,是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办,国内外公开发行人,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:基础微生物学研究,农业微生物学研究,工业微生物学研究,医学微生物学研究,食品微生物学研究,环境微生物学研究,微生物功能基因组研究,微生物蛋白组学研究,微生物模式菌株研究,微生物工程与药物研究,微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国自然科学核心期刊。曾获国家级优秀科技期刊三等奖,中国科学院优秀科技期刊三等奖,北京优秀科技期刊奖,被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自2008年本刊已经全新改版,由双月刊改为月刊,发表周期缩短,内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买,2013年每册定价58元,全年696元,我们将免邮费寄刊。

邮购地址: (100101)北京朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: BM413