

构巢曲霉冻干菌粉的制备及优化

常晓彤, 李素艳*, 孙向阳, 郝丹, 李雅琳

北京林业大学林学院 森林培育与保护教育部重点实验室, 北京 100083

常晓彤, 李素艳, 孙向阳, 郝丹, 李雅琳. 构巢曲霉冻干菌粉的制备及优化[J]. 微生物学通报, 2022, 49(11): 4674-4685

Chang Xiaotong, Li Suyan, Sun Xiangyang, Hao Dan, Li Yalin. Preparation and optimization of lyophilized powder of *Aspergillus nidulans*[J]. Microbiology China, 2022, 49(11): 4674-4685

摘要: 【背景】目前, 用以降解园林绿化废弃物中木质素的菌剂多为液体菌剂或固体菌剂, 鲜有对粉状菌剂的研究。【目的】研制高活性冻干菌粉, 提高其冻干存活率并优化其工艺, 以解决液体菌剂或固体菌剂在运输、储藏及使用上存在的问题。【方法】以一株木质素降解菌构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 为研究对象, 利用真空冷冻干燥法制备冻干菌粉。以菌株的冻干存活率为评价指标, 通过单因素试验筛选适于菌株冻干过程的保护剂种类及浓度梯度, 再通过正交试验优化冻干菌粉复合保护剂配方。获得配方后, 进一步探究冻干菌粉的复水条件和储藏条件。【结果】保护效果较优的 4 种保护剂成分经复配后对冻干存活率的影响顺序为蔗糖>葡萄糖>脱脂乳粉> α -乳糖。经优化后的保护剂配方以蔗糖 15%、葡萄糖 1%、 α -乳糖 10%、脱脂乳粉 1% 为最佳; 复水条件以生理盐水为溶剂, 复水 30 min 为最优。在此条件下制备和使用冻干菌粉, 菌株的冻干存活率可达 83.33%, 有效活菌数可达 1.2×10^{10} CFU/g。最佳储藏温度为 -20°C , 在此温度下保存 28 d 后, 菌粉活性无明显下降。【结论】该研究获得的制备和储藏构巢曲霉冻干菌粉条件, 具有菌株损失率低、可长时间保存的特点, 对推进木质素降解菌在实际生产中应用具有积极作用。

关键词: 木质素降解菌; 构巢曲霉; 冻干菌粉; 冻干存活率

基金项目: 北京市自然科学基金(6202021)

Supported by: Beijing Natural Science Foundation (6202021)

*Corresponding author: E-mail: lisuyan@bjfu.edu.cn

Received: 2022-03-21; Accepted: 2022-04-21; Published online: 2022-05-17

Preparation and optimization of lyophilized powder of *Aspergillus nidulans*

CHANG Xiaotong, LI Suyan*, SUN Xiangyang, HAO Dan, LI Yalin

Key Laboratory for Silviculture and Conservation of Ministry of Education, College of Forestry, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: [Background] At present, the bacterial agents used to degrade lignin in landscaping waste are mostly liquid or solid bacterial agents, and there is few research on powdered bacterial agents. [Objective] To develop the lyophilized powder with high activity and high lyophilized survival rate and optimize the process, thus solving the existing problems in transportation, storage, and application of the liquid or solid bacterial agents. [Methods] *Aspergillus nidulans*, a lignin-degrading strain, was taken as the research object, and the lyophilized powder was prepared by vacuum lyophilization. The lyophilized survival rate of the strain was used as the evaluation index. The types and concentration gradients of protective agents suitable for the lyophilizing process of the strain were screened out through the single factor test, and the compound formula of protective agents of lyophilized bacterial powder was optimized through the orthogonal test. The rehydration and storage conditions of lyophilized powder were further explored after obtaining the formula. [Results] The influencing order of the four protective agents with a superior protective effect on the lyophilized survival rate after compounding was sucrose>glucose>skimmed milk powder> α -lactose. The optimum formula for protective agents was 15% sucrose, 1% glucose, 10% α -lactose, and 1% skimmed milk powder. The optimum rehydration condition was 30 min rehydration with normal saline as the solvent. The lyophilized survival rate of the strain of lyophilized powder prepared and applied under the above conditions reached 83.33% with 1.2×10^{10} CFU/g effective live bacteria. There was no significant decrease of the activity of lyophilized powder storing at the optimum temperature ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) for 28 days. [Conclusion] The preparation and storage conditions of the lyophilized powder of *A. nidulans* obtained in this study have low strain loss rate and can be stored for a long term time, which plays a positive role in promoting the application of lignin-degrading bacteria in practical production.

Keywords: lignin-degrading bacteria; *Aspergillus nidulans*; lyophilized powder; lyophilized survival rate

我国城市绿化面积逐步增大, 导致园林绿化废弃物产量急剧增加, 给城市环境和垃圾处理带来极大负担^[1]。堆肥是目前被广泛应用且能实现园林绿化废弃物资源化再利用的重要方式之一^[2]。但是园林绿化废弃物的主要组成成分木质素具有难降解的特性, 会严重影响堆肥进程^[3-4]。因此, 向园林绿化废弃物中添加能够降解木质素的微生物菌剂是提高堆肥效率和质量的关键步骤^[5]。

目前, 降解木质素的菌剂多为液体菌剂或固体菌剂。液体菌剂是将菌株接种于液体培养基中, 利用发酵培养技术制得的一种液态菌剂^[6]。在制备过程中需严格控制无菌条件, 且对储存条件的要求较高^[7]。固体菌剂在生产 and 储存方面可以弥补液体菌剂的不足^[8], 但仍需要以麸皮、生物炭等材料作为载体进行发酵, 发酵后产物体积相对较大, 不宜运输。因此, 需要探寻新的菌剂制备方法, 进一步优化

菌剂产品。真空冷冻干燥简称冻干,是利用升华原理使物料脱水变为粉状的一种干燥技术^[9]。利用该技术制得的冻干菌粉能长期保持微生物原有的性状,具有高浓缩、体积小、保存时间长、便于携带等优点^[10]。可以弥补液体菌剂及固体菌剂在制作、存储和运输上的不足,降低菌剂的生产运输成本,对降解木质素菌剂的推广和应用具有十分重要的意义。

冻干保护剂、复水条件和储藏温度是影响冻干菌粉制作、使用和储藏的主要因素。通过添加由不同分子量化合物混合制得的冻干保护剂,可以使冻干菌粉在制作过程中维持生物样品原有的生理生化特性,避免菌体细胞因受到低温应力、冻结应力、干燥应力等应力的作用而受损甚至死亡,从而提高菌粉冻干存活率^[11-12]。复水则是使用冻干菌粉的必需环节,适宜的复水条件有利于菌粉中的菌株细胞快速恢复活性,减少有效活菌数的损失^[13]。此外,储藏温度对冻干菌粉的活性也有重要影响,决定了冻干菌粉的有效期^[14]。因此,筛选与优化保护剂配方,选择适宜的复水条件和储存条件是制作优质冻干菌粉的关键。

本实验以高效木质素降解真菌——构巢曲霉^[15]为研究对象,通过筛选保护剂种类和优化保护剂配方来获得制备构巢曲霉冻干菌粉的最佳条件;通过对复水溶剂种类、时间和储藏温度的确定,明确冻干菌粉的使用方式及储存条件,以期在粉状菌剂在园林绿化废弃物降解方面的应用与推广提供理论依据和实践基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌 种

构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*),由北京林

业大学土壤生物学实验室分离并保藏。

1.1.2 培 养 基

基础发酵培养基:马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA 培养基)^[16]、马铃薯葡萄糖肉汤培养基(PDB 培养基)^[4]。

最优液体发酵培养基(g/L):淀粉 5.00,蛋白胨 5.00,酵母粉 1.00,豆饼粉 20.00,五水合硫酸铜 0.98,氯化钠 1.64, pH 自然(由实验室前期实验得出)。

以上培养基均于 1×10^5 Pa 高压蒸汽灭菌锅灭菌 30 min。

1.1.3 主要试剂和仪器

蔗糖、葡萄糖、 α -乳糖,西珑科学股份有限公司;脱脂乳粉, BD Difco 公司。真空冷冻干燥机,四环福瑞科仪科技发展(北京)有限公司。

氯化钠用于配制生理盐水,其余物质用于制备保护剂。生理盐水于 1×10^5 Pa 灭菌 30 min,氨基酸类物质用微孔滤膜(0.22 μm)过滤除菌,其余物质均在 0.6×10^5 Pa 下灭菌 15 min。

1.2 方 法

1.2.1 制备菌悬液

菌种活化:挑取少许保存于斜面试管培养基上的构巢曲霉划线接种至 PDA 平板,于 28 °C 恒温箱中培养 48 h,此过程重复 3 次。

制备菌液:挑取少取活化后的纯菌株接至 100 mL PDB 液体培养基中,在 IS-RDD3 台式恒温振荡器中以 28 °C、200 r/min 条件培养 48 h,制得种子液。再将种子液接入 100 mL 最优液体发酵培养基中,接种量 4% (体积分数),在同等条件下培养 96 h,制得菌液。

制取菌悬液:取 1 mL 目的菌液于离心管中,在 4 °C 条件下,5 000 r/min 离心 8 min,弃掉上清液后添加生理盐水补充至离心前体积^[17],重复 3 次获得澄清上清液,最终将菌泥悬浮于生理盐水中,经漩涡振荡使之充分混匀。本实验中菌悬液浓度均大于 1.0×10^8 CFU/mL。

1.2.2 筛选冻干保护剂种类

将蔗糖、葡萄糖、 α -乳糖、海藻糖、L-谷氨酸、L-甲硫氨酸、L-精氨酸、L-谷氨酸钠、甘露醇、环糊精、柠檬酸钠、可溶性淀粉、脱脂乳粉 13 种不同类别的物质用于筛选冻干保护剂。

称取一定量上述物质, 分别溶于蒸馏水中, 配制浓度为 8% (质量分数) 的保护剂溶液, 灭菌后与菌悬液混合, 在相同条件下进行冻干后, 选择冻干存活率较高的 4 种物质作为冻干保护剂。

1.2.3 优化冻干保护剂配方

根据 1.2.2 实验结果, 选择蔗糖、葡萄糖、 α -乳糖和脱脂乳粉作为冻干保护剂。将单种保护剂配制为质量分数为 1%、5%、10%、15%、20% 的保护剂溶液, 灭菌后与菌悬液混合, 通过测定在相同条件下冻干后的冻干存活率来确定每种保护剂的适宜浓度梯度。然后根据上述试验结果, 将 4 种保护剂按四因素三水平 $L_9(3^4)$ 的正交试验设计进行复合, 以冻干存活率为评价指标, 确定出最优的复合保护剂配方。正交试验设计见表 1。

1.2.4 真空冷冻干燥

将前期配制好的保护剂按 1:1 (体积比) 加入菌悬液中, 于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 预冻 4 h。将预冻样品取出后迅速放入物料瓶内, 用真空冷冻干燥机对样品进行冻干, 待其完全变为粉末状后进行真空包装, 置于干燥处保存备用。

表 1 冻干保护剂正交试验因素水平表

Table 1 Factor level of orthogonal test for lyophilized protective agents

| 水平 Levels | 因素 Factors | | | |
|--------------|----------------------|-----------------------|--|------------------------------------|
| | 蔗糖 Sucrose (%) | 葡萄糖 Glucose (%) | α -乳糖 α -lactose (%) | 脱脂乳粉 Skimmed milk powder (%) |
| 1 | 10 | 1 | 5 | 1 |
| 2 | 15 | 5 | 10 | 5 |
| 3 | 20 | 10 | 15 | 10 |

1.2.5 冻干菌粉复水溶剂及复水时间的确定

复水溶剂选择原保护剂、无菌水和生理盐水, 复水时间为 0、30 和 60 min。将冻干菌粉用复水溶剂恢复至冻干前体积, 经漩涡振荡充分混匀后, 于室温下分别复水 0、30 和 60 min。采用稀释涂布平板法计算活菌数及冻干存活率, 确定最佳复水溶剂及复水时间。

1.2.6 冻干菌粉储藏稳定性

将最优条件下制得的菌粉分别置于室温 ($25\text{ }^\circ\text{C}$)、 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 储藏, 每 7 d 进行取样测定活菌数计算冻干存活率, 共测 28 d。研究不同储藏温度对菌粉存活率的影响。

1.2.7 分析方法

冻干前后的活菌计数均采用稀释涂布平板法, 以 10 的倍数逐次递增稀释, 取 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 这 3 个稀释度, 吸取 100 μL 的菌液于 PDA 固体培养基均匀涂布, $28\text{ }^\circ\text{C}$ 培养 48 h, 计数。

$$\text{冻干存活率}(\%) = \frac{\text{冻干菌粉复水后活菌数}}{\text{冻干前原菌液活菌数}} \times 100$$

每组处理均重复 3 次。数据统计与分析采用 Excel 2007 和 SPSS 22.0 进行处理。冻干保护剂的确定采用正交试验法, 复水条件优化采用单因素方差分析法, 利用 Duncan 法 ($P < 0.05$) 进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 冻干保护剂初筛结果

不同物质作为冻干保护剂的结果如表 2 所示。在添加量(8%, 质量分数)相同的条件下, 蔗糖、葡萄糖、 α -乳糖及脱脂乳粉作为冻干保护剂时, 冻干存活率较高, 对构巢曲霉菌体的保护效果较好, 因此选用这 4 种物质进行后续实验。

2.2 冻干保护剂单因素试验结果

2.2.1 蔗糖浓度对冻干存活率的影响

蔗糖添加量对冻干存活率的影响如图 1 所

表 2 不同冻干保护剂对冻干存活率的影响

Table 2 Effects of different lyophilized protective agents on lyophilized survival rate

| 保护剂 Protective agent | 冻干前活菌数 Living bacteria count before lyophilizing ($\times 10^7$ CFU/mL) | 冻干后活菌数 Living bacteria count after lyophilizing ($\times 10^7$ CFU/mL) | 冻干存活率 Lyophilized survival rate (%) |
|-----------------------------------|---|--|--|
| L-精氨酸 L-arginine | 71.61 \pm 5.30 | 5.20 \pm 0.28 | 7.29 |
| L-谷氨酸 L-glutamic acid | 69.78 \pm 6.20 | 5.23 \pm 0.22 | 7.56 |
| L-谷氨酸钠 L-glutamine sodium | 72.88 \pm 1.84 | 5.93 \pm 0.75 | 8.12 |
| L-甲硫氨酸 L-methionine | 75.28 \pm 4.82 | 5.00 \pm 0.38 | 6.68 |
| 环糊精 Cyclodextrin | 61.44 \pm 2.22 | 6.20 \pm 0.48 | 10.12 |
| 脱脂乳粉 Skimmed milk powder | 78.39 \pm 2.62 | 44.12 \pm 1.67 | 56.36 |
| 蔗糖 Sucrose | 69.33 \pm 0.88 | 19.02 \pm 1.72 | 27.43 |
| 葡萄糖 Glucose | 68.83 \pm 4.44 | 20.00 \pm 0.84 | 29.15 |
| 海藻糖 Trehalose | 71.56 \pm 0.84 | 7.62 \pm 0.11 | 10.65 |
| 可溶性淀粉 Soluble starch | 75.33 \pm 2.33 | 5.76 \pm 0.53 | 7.66 |
| α -乳糖 α -lactose | 69.17 \pm 1.30 | 36.85 \pm 1.75 | 53.28 |
| 甘露醇 Mannitol | 65.67 \pm 1.76 | 12.96 \pm 0.35 | 19.75 |
| 对照 CK | 71.44 \pm 1.51 | 4.82 \pm 0.15 | 6.75 |

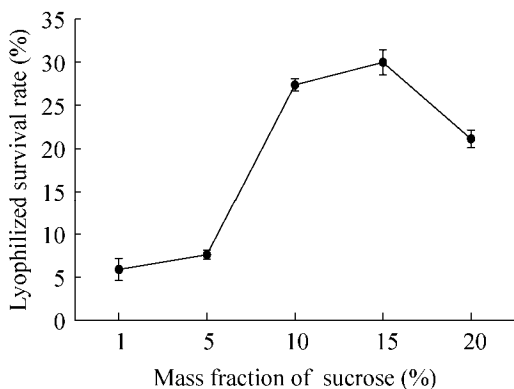


图 1 蔗糖添加量对冻干存活率的影响

Figure 1 Effect of sucrose addition on the lyophilized survival rate.

示。随蔗糖浓度的增加，菌粉的冻干存活率变化幅度较大。当浓度在 1%–15% 时，冻干存活率与蔗糖添加量呈正相关，但随蔗糖含量继续增加，冻干存活率开始逐渐下降。因此，根据实验结果选用保护效果较优的 3 种浓度(10%、15%、20%)进行后续试验。

2.2.2 葡萄糖浓度对冻干存活率的影响

葡萄糖浓度对冻干存活率的影响如图 2 所示。当葡萄糖添加量在 1%–10% 时，保护效果较好，冻干存活率均在 20% 以上。但是，当浓度继续增加时，不利于菌体的存活，冻干存活

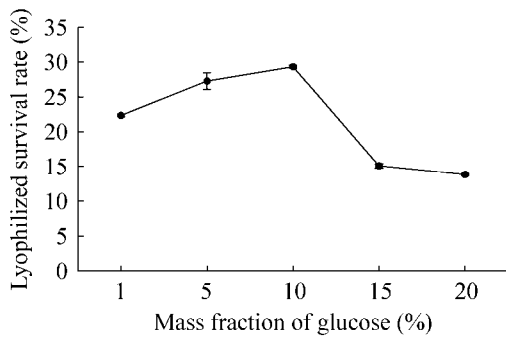


图2 葡萄糖添加量对冻干存活率的影响
Figure 2 Effect of glucose addition on the lyophilized survival rate.

率随葡萄糖含量的增加而出现明显下降。因此, 根据实验结果, 选用质量分数为 1%、5%、10% 的葡萄糖进行后续实验。

2.2.3 α -乳糖浓度对冻干存活率的影响

α -乳糖添加量对冻干存活率的影响如图 3 所示。随 α -乳糖浓度的增加, 冻干存活率呈先上升后下降的趋势。除添加量为 1% 外, 添加其余 4 种不同浓度的 α -乳糖均能表现出较优的保护效果, 冻干存活率均在 39% 以上。因此, 选用能够获得较高冻干存活率的 3 种 α -乳糖浓度 (5%、10% 和 15%) 进行后续实验。

2.2.4 脱脂乳粉浓度对冻干存活率的影响

脱脂乳粉添加量对冻干存活率的影响如图 4 所示。当添加量在 1%–10% 时, 随浓度增

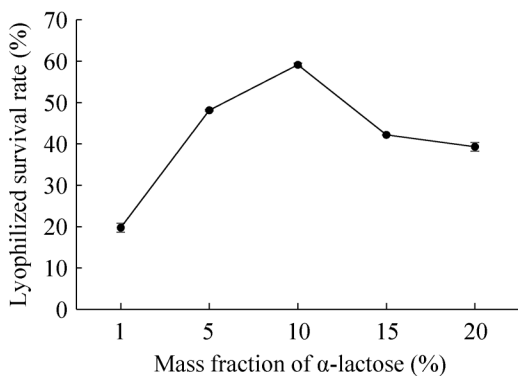


图3 α -乳糖添加量对冻干存活率的影响
Figure 3 Effect of α -lactose addition on the lyophilized survival rate.

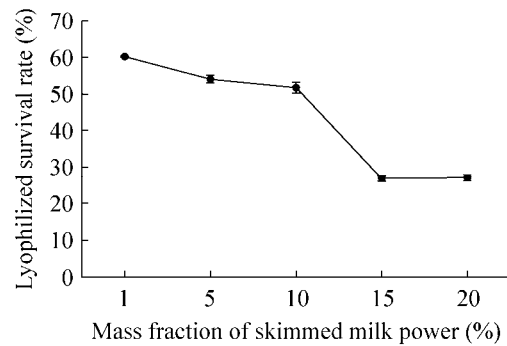


图4 脱脂乳粉添加量对冻干存活率的影响
Figure 4 Effect of skim milk powder addition on the lyophilized survival rate.

加, 冻干存活率下降不明显, 均在 50% 以上, 保护效果较优。之后随脱脂乳粉浓度继续增加, 冻干存活率开始出现明显下降。因此, 根据试验结果, 选用质量分数为 1%、5% 和 10% 的脱脂乳粉进行后续实验。

2.3 正交试验结果

通过单因素试验确定每种保护剂适宜的浓度梯度, 利用正交试验设计进一步对冻干保护剂配方进行复合、优化, 考察各组合对冻干存活率的影响, 正交试验结果及极差分析见表 3。

由表 3 可知, 复合保护剂保护效果均优于单一保护剂。不同物质溶液对冻干存活率的影响顺序为: $A > B > D > C$, 即 4 种物质中, 蔗糖的质量分数对冻干存活率影响最大, 其次分别为葡萄糖、脱脂乳粉和 α -乳糖。经优化后构巢曲霉菌的最佳冻干保护剂复配组合为 $A_2B_1C_2D_1$, 即蔗糖 15%、葡萄糖 1%、 α -乳糖 10%、脱脂乳粉 1%。经查验, 该表格设计中并无该组合, 以冻干存活率较高的 2 种组合 $A_1B_1C_1D_1$ 、 $A_2B_1C_2D_3$ 作为参考, 对最优冻干保护剂组合进行验证。

如表 4 所示, 通过验证试验可知 $A_2B_1C_2D_1$ 组合冻干存活率最高, 为 81.85%, 比单一保护剂 (1% 脱脂乳粉, 图 4) 处理时的最高冻干存活率 (60.25%) 提高了 21.60%。该组合效果优于其

余任何组合, 因此确定构巢曲霉菌冻干保护剂的最优配方为 $A_2B_1C_2D_1$ 。

2.4 最佳复水条件的确定

不同复水时间对冻干存活率有较大影响, 复水时间过长或过短都不利于恢复菌种活力。如图 5 所示, 在复水溶剂相同的情况下, 复水时间在 30 min 左右时, 菌体活力恢复的效果最好, 冻干存活率显著高于 0 和 60 min。

表 3 正交试验方案结果表

| 处理 Treatment | A | B | C | D | 冻干存活率 Lyophilized survival rate (%) |
|-------------------|----------------|-------|-------|-------|--|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 79.98 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 69.79 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 72.73 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 80.12 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 73.22 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 69.44 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 63.64 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 59.94 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 66.33 |
| K_1 | 74.17 | 74.58 | 69.79 | 73.18 | |
| K_2 | 74.26 | 67.65 | 72.08 | 67.62 | |
| K_3 | 63.30 | 69.50 | 69.70 | 70.93 | |
| R | 10.96 | 6.93 | 2.38 | 5.55 | |
| 因素主次 | $A>B>D>C$ | | | | |
| Secondary factors | | | | | |
| 最优方案 | $A_2B_1C_2D_1$ | | | | |
| Optimal scheme | | | | | |

表 4 验证试验结果

| 试验号 No. | A | B | C | D | 冻干存活率 Lyophilized survival rate (%) |
|------------|----|---|----|----|---|
| 1 | 10 | 1 | 5 | 1 | 77.69 |
| 2 | 15 | 1 | 10 | 10 | 80.03 |
| 3 | 15 | 1 | 10 | 1 | 81.85 |

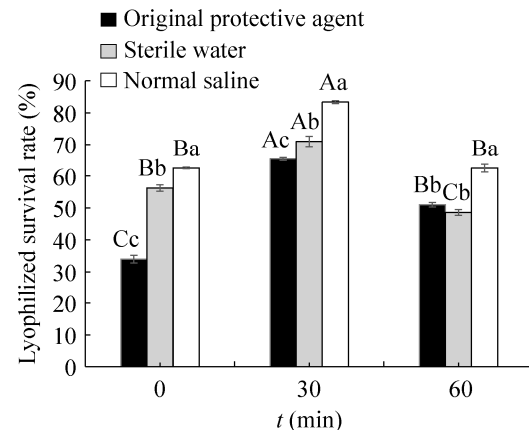


图 5 复水溶剂及时间对菌粉冻干存活率的影响。不同大写字母表示同一复水溶剂在不同时间下的处理存在显著性差异 ($P<0.05$); 不同小写字母表示同一时间下采用不同复水溶剂的处理存在显著性差异 ($P<0.05$)。

Figure 5 Effects of rehydration solvent and time on the lyophilized survival rate of bacterial powder. Different capital letters indicate that there are significant differences in the treatment of the same rehydration solvent at different times ($P<0.05$); Different lowercase letters indicate that there are significant differences in the treatment with different rehydration solvents at the same time ($P<0.05$).

复水溶剂种类对菌株活力恢复也具有重要影响。如图 5 所示, 在同一复水时间下, 用不同溶剂复水后的冻干存活率存在显著差异。其中, 原保护剂溶液复水效果最差, 细胞难以恢复至正常水平; 无菌水在复水时间较长时, 冻干存活率明显降低, 复水效果较差; 生理盐水在 3 种复水时间下, 其冻干存活率均显著高于其余 2 种复水溶剂。因此, 以生理盐水作为冻干菌粉复水溶剂的效果最佳。

综上所述, 构巢曲霉菌冻干菌粉的最佳复水条件为在生理盐水中复水 30 min, 在此条件下可获得最大存活率为 83.33%, 活菌数为 1.2×10^{10} CFU/g, 高于 GB 20287—2006《农用微生物菌剂》标准 [$>2.0 \times 10^8$ CFU/(g·mL)]^[18]。

2.5 冻干菌剂储藏稳定性的研究

各种微生物菌剂都需要在不同温度下保存, 选择合适的储藏温度对冻干菌粉的保存尤为重要。本研究综合考虑实际应用情况及保存成本, 将在最优保护剂配方及复水条件下制得的构巢曲霉冻干菌粉分别置于 25、4、-20 °C 这 3 种不同温度下, 探究不同储藏温度对冻干存活率产生的影响。

如表 5 所示, 随着时间的延长, 不同储藏温度下的冻干菌粉存活率均有所下降, 但保持在 60% 以上, 活菌数仍能达到 GB 20287—2006 《农用微生物菌剂》标准^[18]。其中, 保存在常温条件下的菌粉细胞, 活力下降最快, 保存效果最差; 在 -20 °C 低温条件下保存的冻干菌粉其储藏稳定性最好, 保存 4 周后活性无明显损失。因此, 根据该试验结果, 构巢曲霉冻干菌粉在 -20 °C 条件下保存效果最好, 有较强稳定性, 储藏 28 d 后其活性无明显下降。

3 讨论与结论

在真空冷冻干燥过程中, 不同保护剂种类会对细胞产生不同的保护效果。目前常用的保护剂主要为糖类、氨基酸类和复合物等^[19]。其中, 糖类物质通过与菌体细胞中的蛋白质等成分发生作用从而对细胞结构进行保护。已有研究发现适宜浓度范围内的蔗糖、乳糖溶液在冻

干过程中能够阻止蛋白质二级结构的改变, 对多肽链的伸展和聚集起显著作用, 从而对细胞膜结构进行较好地保护^[20-21]。但当浓度继续增加, 细胞渗透压升高, 反而不利于细胞存活, 导致冻干存活率下降。葡萄糖溶液在冻干处理过程中可保持无定型状态, 能够保护菌体细胞中的某些蛋白质成分不受破坏, 也可减少生物膜融合现象的发生^[22]。但在单独使用时无法充分发挥其效果, 因此常与其他保护剂混合使用^[23]。陆志刚等^[22]通过研究冻干后红细胞内 ATP 水平发现, 以葡萄糖作为保护剂获得的冻干细胞中 ATP 水平均高于 1.5 $\mu\text{mol/g-Hb}$, 能较好地维持细胞代谢。张玲等^[24]通过响应面法分析得到制备羊源解淀粉芽孢杆菌的最优保护剂配方为丙三醇 3.102 g/100 mL、蔗糖 2.926 g/100 mL 和葡萄糖 7.096 g/100 mL, 在此条件下获得的菌粉冻干存活率可达 96.47%。而氨基酸类物质则是通过提高蛋白质在冻干过程中的稳定性, 增加水分子表面张力, 从而对冷冻状态下的细胞起到保护作用^[25]。李冰等^[25]研究发现添加氨基酸共混物的蛋白活性在冻干后提升到 77%, 显著高于未添加氨基酸保护剂组(38%)。此外, 以脱脂乳粉为代表的复合保护剂也是目前应用较广泛、保护效果较好的一类物质。研究发现脱脂乳粉能在低温条件下为细胞提供保护性外膜从而提高细胞稳定性; 同时还能够创造多孔环境,

表 5 不同储藏温度对冻干存活率的影响

Figure 5 Effects of different storage temperature on the lyophilized survival rate

| 时间 Time (days) | -20 °C 活菌数 Living bacteria count at -20 °C ($\times 10^8$ CFU/mL) | -20 °C 存活率 Survival rate at -20 °C (%) | 4 °C 活菌数 Living bacteria count at 4 °C ($\times 10^8$ CFU/mL) | 4 °C 存活率 Survival rate at 4 °C (%) | 25 °C 活菌数 Living bacteria count at 25 °C ($\times 10^8$ CFU/mL) | 25 °C 存活率 Survival rate at 25 °C (%) |
|----------------------|---|--|---|--|---|--|
| 0 | 6.33 \pm 0.35 | 100.00 | 6.33 \pm 0.12 | 100.00 | 6.33 \pm 0.15 | 100.00 |
| 7 | 6.33 \pm 0.15 | 99.99 | 6.11 \pm 0.20 | 96.45 | 6.19 \pm 0.30 | 97.74 |
| 14 | 6.01 \pm 0.27 | 94.95 | 5.40 \pm 0.28 | 85.33 | 5.14 \pm 0.05 | 81.21 |
| 21 | 5.70 \pm 0.10 | 90.00 | 5.15 \pm 0.58 | 80.00 | 4.61 \pm 0.29 | 72.89 |
| 28 | 5.50 \pm 0.67 | 86.89 | 4.97 \pm 0.29 | 77.97 | 4.3 \pm 0.28 | 67.89 |

使冻干菌粉更易复水^[26]。宋玉萍等^[27]以长岐杆菌为实验菌株,结果表明以 10%脱脂乳粉和 1.5%聚谷氨酸作为保护剂时,其冻干存活率为 79.8%,但当脱脂乳粉的含量超过 10%时,随着其浓度的增加冻干存活率反而下降。这是由于菌体表面已被脱脂乳粉完全覆盖,导致保护作用已发挥完全,因此无法继续增强^[28]。本研究经单因素试验从 12 种不同种类的保护剂成分中筛选得到蔗糖、葡萄糖、 α -乳糖、脱脂乳粉为保护效果较优的 4 种冻干保护剂。但已有研究表明,单一保护剂的保护效果往往不佳,将不同分子量的化合物混用可以对菌体进行更好地保护^[29]。因此,为提高冻干存活率,充分发挥保护剂作用,获得更优的保护效果,本研究将 4 种保护剂通过正交试验进行复配,得到最佳冻干保护剂配方为蔗糖 15%、葡萄糖 1%、 α -乳糖 10%、脱脂乳粉 1%,在该保护剂组合条件下制备的菌粉冻干存活率有明显提高,保护效果优于单一保护剂。证明不同保护剂复配后既能发挥自身作用,同时各保护剂间又具有相互协同作用,更有利于对细胞的保护^[30-31]。

对于真空冷冻干燥后得到的菌粉,复水条件及储藏温度也会对其细胞结构及菌粉活性造成影响。本研究发现,最佳复溶时间为 30 min,在该条件下菌株能恢复最大活力。复水时间过短细胞无法完全吸水恢复活力,时间过长可能会使菌体长期暴露在空气及不适宜的生长条件下,且随时间流逝营养物质缺乏从而导致部分细胞衰亡^[14]。而试验得出的最佳复水溶剂为生理盐水,这一结果与 Lee 等^[32]发现的植物乳杆菌的最佳复水溶剂为原保护介质的结果不同。这可能是由于在本研究中复合保护剂浓度偏高,不利于维持细胞液渗透压所致,但生理盐水浓度和细胞液渗透压基本相同,在菌体细胞复水时,可以使细胞恢复至正常大小,因此在

本研究中以生理盐水作为冻干菌粉复水溶剂的效果最佳。此外,储藏温度对菌粉的保存也有重要影响,对菌粉储藏稳定性进行研究发现,常温条件下冻干菌粉的保存效果最差, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存效果最好。这是由于常温条件下保存的菌粉细胞含有较多水分,易发生迁移从而导致其生存能力下降^[13],当储藏温度过高,菌体内蛋白质、细胞壁、细胞膜及酶活力等会因热力作用发生变性或凝固,导致活性消失。而在低温条件下,菌体代谢活动减弱,能较长时间维持生命,保持细胞活力^[33-34]。本研究结果表明在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存 4 周后,菌粉能保持较高活性,活菌数仍能达到 GB 20287—2006《农用微生物菌剂》标准^[18]。

真空冷冻干燥法因其可以最大程度保留物料原有的色、香、味、成分等性质,使冻干后的产品仍能保留原有性状而被广泛应用于食品、医疗、美容等领域^[35]。该方法适用于热稳定性较差的生物制品^[36]且制得的产品便于长期储存和长途运输,因此用真空冷冻干燥法将微生物制成菌粉,具有较高的可行性。前期由于该技术需要一定的设备支撑及对物料的特殊处理,成本较高,因此在一定程度上限制了其在农林业领域的发展,而目前随着科技及技术的进步,成本降低^[37-38],且对不宜污染和便于运输的菌粉的需求逐步增加,该技术用于制备微生物菌粉的研究也已成为可能。因此本研究利用真空冷冻干燥法将构巢曲霉制备为粉状菌剂,以期弥补这方面的空白,同时解决固液体菌剂在制作、储存及运输上的不便。经试验证明,制得的菌粉具有较高活性,最高冻干存活率为 83.33%,保护效果较对照组(6.75%)提高 11 倍左右,活菌数可达 1.2×10^{10} CFU/g。这一发现对推进木质素降解菌用于园林绿化废弃物堆肥具有积极作用,并为其他农用微生物制备

菌剂产品的研究与推广提供了理论依据和实践基础。

REFERENCES

- [1] 龚小强, 李素艳, 李燕, 孙向阳. 绿化废弃物好氧堆肥和蚯蚓堆肥作为蔬菜育苗基质研究[J]. 浙江农林大学学报, 2016, 33(2): 280-287
Gong XQ, Li SY, Li Y, Sun XY. Compost and vermicompost from green wastes as substrates for vegetable seedlings cultivation[J]. Journal of Zhejiang A & F University, 2016, 33(2): 280-287 (in Chinese)
- [2] 孟童瑶, 李素艳, 邹荣松, 余克非, 付冰妍, 揭阳. 固定化木质素降解菌对园林废弃物堆肥的影响[J]. 浙江农林大学学报, 2021, 38(1): 38-46
Meng TY, Li SY, Zou RS, Yu KF, Fu BY, Jie Y. Effect of immobilized lignin-degrading bacteria on green waste composting[J]. Journal of Zhejiang A & F University, 2021, 38(1): 38-46 (in Chinese)
- [3] 梁丛颖, 林璐. 环境微生物介导的木质素代谢及其资源化利用研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(10): 3380-3392
Liang CY, Lin L. Environmental microorganisms driven lignin biodegradation and their roles in lignin utilization[J]. Microbiology China, 2020, 47(10): 3380-3392 (in Chinese)
- [4] 李雅琳, 李素艳, 孙向阳, 郝丹, 蔡琳琳, 常晓彤. 1株木质素降解菌的筛选、鉴定及液态发酵条件优化[J]. 浙江农林大学学报, 2021, 38(6): 1297-1304
Li YL, Li SY, Sun XY, Hao D, Cai LL, Chang XT. Screening and identification of a lignin degrading strain and its optimized liquid fermentation conditions[J]. Journal of Zhejiang A & F University, 2021, 38(6): 1297-1304 (in Chinese)
- [5] Yu KF, Li SY, Sun XY, Cai LL, Zhang PF, Kang Y, Yu ZH, Tong J, Wang L. Application of seasonal freeze-thaw to pretreat raw material for accelerating green waste composting[J]. Journal of Environmental Management, 2019, 239: 96-102
- [6] 王新, 柳文睿, 侯佳文, 葛玲, 张亚楠. 菌剂制备及其修复农药污染土壤的研究进展[J]. 化工环保, 2022, 42(1): 10-15
Wang X, Liu WR, Hou JW, Ge L, Zhang YN. Research progresses on preparation of microbial agent and remediation of pesticides-contaminated soil[J]. Environmental Protection of Chemical Industry, 2022, 42(1): 10-15 (in Chinese)
- [7] 付冰妍, 孙向阳, 余克非, 邹荣松, 孟童瑶, 揭阳. 芽孢杆菌 B01 固态发酵及其对园林废弃物堆肥的影响[J]. 环境科学研究, 2021, 34(2): 450-457
Fu BY, Sun XY, Yu KF, Zou RS, Meng TY, Jie Y. Solid state fermentation of *Bacillus* sp. B01 and its effect on green waste composting[J]. Research of Environmental Sciences, 2021, 34(2): 450-457 (in Chinese)
- [8] 李雅琳, 李素艳, 孙向阳, 郝丹, 蔡琳琳, 常晓彤. 基于人工神经网络算法的 2 株木质素降解菌固体菌剂的制备[J]. 浙江农林大学学报, 2022, 39(2): 364-371
Li YL, Li SY, Sun XY, Hao D, Cai LL, Chang XT. Preparation of two strains of lignin-degrading bacteria solid inoculum[J]. Journal of Zhejiang A & F University, 2022, 39(2): 364-371 (in Chinese)
- [9] 肖宏伟, 黄传伟, 冯雁峰, 李如华. 真空冷冻干燥技术的研究现状和发展[J]. 医疗卫生装备, 2010, 31(7): 30-32
Xiao HW, Huang CW, Feng YF, Li RH. Research situation and development of vacuum freeze-drying technology[J]. Chinese Medical Equipment Journal, 2010, 31(7): 30-32 (in Chinese)
- [10] 李华, 骆艳娥, 刘延琳. 真空冷冻干燥微生物的研究进展[J]. 微生物学通报, 2002, 29(3): 78-82
Li H, Luo YE, Liu YL. The research progress of vacuum freeze-drying microorganisms[J]. Microbiology China, 2002, 29(3): 78-82 (in Chinese)
- [11] 薛菲, 王凤山. 蛋白质的冻干保护剂及其保护机制研究进展[J]. 中国药学杂志, 2018, 53(10): 765-770
Xue F, Wang FS. The research progress in lyoprotectants of protein and its protection mechanism[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2018, 53(10): 765-770 (in Chinese)
- [12] 卢行安, 陈明生, 袁杰利, 康白. 乳酸菌冷冻干燥工艺的研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2001, 13(1): 58-59, 61
Lu (H/X)A, Chen MS, Yuan JL, Kang B. The research progress of freeze-drying technology of *Lactobacillus*[J]. Chinese Journal of Microecology, 2001, 13(1): 58-59, 61 (in Chinese)
- [13] Shu GW, Wang Z, Chen L, Wan HC, Chen H. Characterization of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* in goat milk powder and tablet: optimization of the composite cryoprotectants and evaluation of storage stability at different temperature[J]. LWT, 2018, 90: 70-76
- [14] 于平, 胡淳玉, 黄星星, 刘航, 杨柳贞, 贺敏, 马健. 产肌醇的植物乳杆菌 ZJ2868 菌粉制备工艺[J]. 中国食品学报, 2021, 21(9): 142-149
Yu P, Hu CY, Huang XX, Liu H, Yang LZ, He M, Ma J.

- Preparation process of inositol-producing *Lactobacillus plantarum* ZJ2868 powder[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(9): 142-149 (in Chinese)
- [15] 康跃, 李素艳, 孙向阳, 龚小强, 余克非, 蔡琳琳, 王琳. 园林废弃物木质素降解真菌的筛选、鉴别及其能力研究[J]. 林业科学研究, 2019, 32(3): 80-87
Kang Y, Li SY, Sun XY, Gong XQ, Yu KF, Cai LL, Wang L. Study on screening, identification and capability of lignin-degrading fungi for landscaping waste[J]. Forest Research, 2019, 32(3): 80-87 (in Chinese)
- [16] 朱红梅, 徐红, 温海. 医学真菌常用培养基的制备和应用[J]. 中国真菌学杂志, 2010, 5(5): 296-306
Zhu HM, Xu H, Wen H. Preparation and application of common culture medium for medical fungi[J]. Chinese Journal of Mycology, 2010, 5(5): 296-306 (in Chinese)
- [17] 刘敏敏, 席茂盛, 李中媛, 宋亚团, 张同存, 罗学刚. 植物乳杆菌 CGMCC8198 冻干菌粉的制备工艺优化[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(21): 9-14
Liu MM, Xi MS, Li ZY, Song YJ, Zhang TC, Luo XG. Preparation process optimization of *Lactobacillus plantarum* CGMCC8198 lyophilized powder[J]. Food Research and Development, 2020, 41(21): 9-14 (in Chinese)
- [18] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 农用微生物菌剂: GB 20287—2006[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Microbial Inoculants in Agriculture: GB 20287—2006[S]. Beijing: Standards Press of China, 2006 (in Chinese)
- [19] 周莉, 平洋, 谭静, 罗蓓蓓, 王法云. 益生菌冻干保护剂及工艺优化研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(15): 6208-6212
Zhou L, Ping Y, Tan J, Luo BB, Wang FY. Freeze-drying protective agent and its process optimization of probiotics[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(15): 6208-6212 (in Chinese)
- [20] Crowe JH, Crowe LM, Carpenter JF, Rudolph AS, Wistrom CA, Spargo BJ, Anchordoguy TJ. Interactions of sugars with membranes[J]. Biochimica et Biophysica Acta: BBA-Reviews on Biomembranes, 1988, 947(2): 367-384
- [21] 杜磊, 乔发东. 乳酸菌冷冻保护剂选择的研究[J]. 乳业科学与技术, 2010, 33(3): 119-121
Du L, Qiao FD. Choose the freeze protective agent of lactic acid bacteria[J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2010, 33(3): 119-121 (in Chinese)
- [22] 陆志刚, 陈燕. 海藻糖、蔗糖、葡萄糖负载红细胞对冻干红细胞影响的比较[J]. 中国输血杂志, 2006, 19(6): 457-459
Lu ZG, Chen Y. Comparison of effects of trehalose, sucrose and glucose loaded erythrocytes on freeze-dried erythrocytes[J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2006, 19(6): 457-459 (in Chinese)
- [23] 朱敖兰, 杨洁. 生物制品冻干保护剂及其保护机理的研究进展[J]. 喀什师范学院学报, 2007, 28(6): 46-50
Zhu AL, Yang J. The development of cryoprotector of biologic products and its protective mechanism[J]. Journal of Kashgar Teachers College, 2007, 28(6): 46-50 (in Chinese)
- [24] 张玲, 张楠驰, 魏勇, 许锋, 张林, 王利, 俄木曲者. 响应面法优化羊源解淀粉芽孢杆菌冻干保护剂配方[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2022, 48(1): 22-28
Zhang L, Zhang NC, Wei Y, Xu F, Zhang L, Wang L, E MQZ. Optimization of cryoprotectant formulation for *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from goat by response surface methodology[J]. Journal of Southwest Minzu University: Natural Science Edition, 2022, 48(1): 22-28 (in Chinese)
- [25] 李冰, 丛自豪, 肖希勉, 武月铭, 刘润辉. 氨基酸聚合物用于提高冻干过程中蛋白稳定性的研究[J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2020, 46(4): 526-532
Li B, Cong ZH, Xiao XM, Wu YM, Liu RH. Improving protein stability with amino acid polymers during lyophilization[J]. Journal of East China University of Science and Technology, 2020, 46(4): 526-532 (in Chinese)
- [26] 陈莹, 赵瑞峰, 陶志强, 王丽, 黄欣媛, 陆震, 印伯星, 顾瑞霞, 关成冉. 嗜热链球菌 grx90 冻干保护剂的制备[J]. 中国乳品工业, 2020, 48(3): 10-14, 30
Chen X, Zhao RF, Tao ZQ, Wang L, Huang XY, Lu Z, Yin BX, Gu RX, Guan CR. Preparation of *Streptococcus thermophilus* grx90 lyoprotectant[J]. China Dairy Industry, 2020, 48(3): 10-14, 30 (in Chinese)
- [27] 宋玉萍, 梁金钟, 王凤青, 梅剑秋. 高分子聚合物 γ -PGA 对长双歧杆菌的冻干保护作用[J]. 食品工业科技, 2016, 37(9): 185-189
Song YP, Liang JZ, Wang FQ, Mei JQ. Effect of polymer γ -PGA on freeze-dried protection of *Bifidobacterium longum*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(9): 185-189 (in Chinese)
- [28] 纪振杰, 郭德军. 利用响应面法优化双歧杆菌冻干保

- 护剂的配比[J]. 中国生物制品学杂志, 2008, 21(9): 813-816
- Ji ZJ, Guo DJ. Optimization of formula of protective additive of *Bifidobacterium* by response surface method[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2008, 21(9): 813-816 (in Chinese)
- [29] 刘仁杰, 李哲, 毛思凝, 梁珊, 赵悦, 王玉华. 乳酸菌微胶囊包埋技术与常用壁材的研究进展[J]. 食品与机械, 2019, 35(9): 211-215
- Liu RJ, Li Z, Mao SN, Liang S, Zhao Y, Wang YH. Research progress of lactic acid bacteria microcapsule encapsulation technology and common wall materials[J]. Food & Machinery, 2019, 35(9): 211-215 (in Chinese)
- [30] 牛爱华, 段开红, 吴妮尔, 刘和仁, 张伟, 李泽乐, 田瑞华. 低温产甲烷菌群冻干菌粉制备过程中保护剂的研究[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2013, 34(6): 93-96
- Niu AH, Duan KH, Wu NE, Liu HR, Zhang W, Li ZL, Tian RH. Research on the protective agents in the preparation process of methanogenus freeze-dried powder at low temperatures[J]. Journal of Inner Mongolia Agricultural University: Natural Science Edition, 2013, 34(6): 93-96 (in Chinese)
- [31] 胥振国, 蔡玉华, 向敏, 胡翰林, 黄鹤春. 冻干高活力纳豆芽胞杆菌菌粉保护剂的筛选和优化[J]. 微生物学通报, 2013, 40(5): 822-828
- Xu ZG, Cai YH, Xiang M, Hu HL, Huang HC. Screening and optimization of the cryoprotectants for high active *Bacillus natto* powder[J]. Microbiology China, 2013, 40(5): 822-828 (in Chinese)
- [32] Lee SB, Kim DH, Park HD. Effects of protectant and rehydration conditions on the survival rate and malolactic fermentation efficiency of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* JH287[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(18): 7853-7863
- [33] Amine KM, Champagne CP, Salmieri S, Britten M, St-Gelais D, Fustier P, Lacroix M. Effect of palmitoylated alginate microencapsulation on viability of *Bifidobacterium longum* during freeze-drying[J]. LWT-Food Science and Technology, 2014, 56(1): 111-117
- [34] Capela P, Hay TKC, Shah NP. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt[J]. Food Research International, 2006, 39(2): 203-211
- [35] 汪喜波. 不同操作条件对食品真空冷冻干燥过程的影响[D]. 北京: 中国农业大学硕士学位论文, 2000
- Wang XB. Effects of different operating condition on vacuum freeze-drying of foodstuffs[D]. Beijing: Master's Thesis of China Agricultural University, 2000 (in Chinese)
- [36] 于永翔. 海水养殖中常见病原菌冻干保护剂配方与冻干工艺研究[D]. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2014
- Yu YX. Study on freeze-drying protectant selection and freeze-drying technics construction of important pathogenic bacteria in mariculture[D]. Qingdao: Master's Thesis of Ocean University of China, 2014 (in Chinese)
- [37] 初英尧. 简析生物制药方面冻干技术的应用[J]. 中国西部科技, 2015, 14(4): 44, 46
- Chu YY. Application of freeze drying technology in biopharmaceutical[J]. Science and Technology of West China, 2015, 14(4): 44, 46 (in Chinese)
- [38] 徐成海, 邹惠芬, 张世伟. 真空冷冻干燥技术的现状及发展趋势[J]. 真空与低温, 2000, 6(2): 9-12
- Xu CH, Zou HF, Zhang SW. The present situation and developing tendency of vacuum freeze drying technology[J]. Vacuum and Cryogenics, 2000, 6(2): 9-12 (in Chinese)