

植物乳杆菌 YI-Y 2013 冻干保护剂配方优化

Optimization of freeze-drying protectant for *Lactobacillus plantarum* YI-Y 2013

樊振南¹ 佟立涛² 周素梅² 易翠平¹

FAN Zhen-nan¹ TONG Li-tao² ZHOU Su-mei² YI Cui-ping¹

(1. 长沙理工大学化学与生物工程学院, 湖南 长沙 410114; 2. 中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100193)

(1. School of Chemistry and Biological Engineering, Changsha University of Science and Technology, Changsha, Hunan 410114, China; 2. Institute of Agro-products Processing Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

摘要:为制备鲜湿米粉发酵剂,以分离自米粉自然发酵液的植物乳杆菌 YI-Y 2013 的菌体存活率为目标,在单因素试验基础上,经过 Plackett-Burman 试验筛选出有显著效果的 3 种保护剂:山梨醇、麦芽糊精和甘油,进一步通过中心组合试验设计和响应面分析得到显著性的拟合回归方程。结果表明,最佳保护剂配方为:山梨醇浓度 1.1 g/100 g,麦芽糊精浓度 24.8 g/100 g,甘油浓度 2.4 g/100 g,该条件下菌体存活率为 $(76.08 \pm 2.68)\%$,与预测值较为接近。

关键词:植物乳杆菌 YI-Y 2013; 保护剂; 存活率

Abstract: In order to prepare fresh rice noodle through starter, the survival rate of *L. plantarum* YI-Y 2013 isolated from natural fermentation liquid was used as target. 3 kinds of protective agent through single factor experiment and Plackett-Burman test were screened, i.e., sorbitol, maltodextrin and glycerin. Moreover, the response surface analysis and fit the regression equations were carried out, and the results indicated that the best protection formula was: sorbitol 1.1 g / 100 g, maltodextrin 24.8 g / 100 g, and glycerol 2.4 g / 100 g. The bacteria survival rate was found arriving to $(76.08 \pm 2.68)\%$, close to the prediction model.

Keywords: *L. plantarum* YI-Y 2013; protectant; survival rate

直投式发酵剂是一种活菌含量高、应用简单、可提升产品品质的发酵剂^[1]。直投式发酵剂的常用干燥方法有喷雾干燥^[2]、流化床干燥^[3]、空气对流干燥^[4]和真空冷冻干燥^[5]等,其中真空冷冻干燥是植物乳杆菌最常用的干燥方法。真空冷冻干燥具有适用范围广、存活率高、运输方便等特点。

但由于冻干过程中微生物体内的游离水会形成较大冰晶对微生物造成不可恢复的损伤,从而导致菌体死亡,因此通常需要添加合适的冻干保护剂来提高菌体的存活率^[6-7]。植物乳杆菌种类繁多,在肉类^[8]、奶类^[9]、泡菜^[10]及酸面团^[11]等发酵食品中均有应用。随着研究人员^[12-13]对鲜湿米粉发酵过程的不断研究,发现植物乳杆菌对鲜湿米粉的品质有重要的影响,但米粉直投式发酵剂的制备至今鲜见报道。由于植物乳杆菌来源不同,其形状和结构都有差异,因此对植物乳杆菌冻干保护剂进行优化具有十分重要的意义。

本研究拟通过对比不同保护剂在植物乳杆菌冻干过程中的作用效果,并优化复合保护剂的配比,为鲜湿米粉直投式发酵剂的制备提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*, *L. plantarum*) YI-Y 2013:由本实验室从鲜湿米粉自然发酵液中采用纯培养的方法划线分离,并对其技术特征进行分析、基因测序鉴定后保存备用^[14](原名称为 CSL 23),现已在中国典型培养物保藏中心保藏,保藏编号为 CCTCC M 2017533;

MRS 肉汤和 MRS 培养基:广东环凯微生物科技有限公司;

山梨醇、葡萄糖、麦芽糖、海藻糖和甘油:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

麦芽糊精:山东西王食品有限公司。

1.2 主要仪器与设备

双人单面净化工作台:SW-CT-2FD 型,苏州净化设备有限公司;

离心机:TG16 型,长沙东旺实验仪器有限公司;

冷冻干燥机:FFD-1A 型,北京医博康实验仪器有限公司;

基金项目:公益性行业(农业)科研专项经费(编号:201303070);国家自然科学基金(编号:31771899)

作者简介:樊振南,男,长沙理工大学在读硕士研究生。

通信作者:易翠平(1973—),女,长沙理工大学教授,博士。

E-mail: yicp963@163.com

收稿日期:2017-03-07

电热鼓风干燥箱:101-2A 型,天津市泰斯特仪器有限公司;

高压蒸汽灭菌锅:YXQ-LS-18SI 型,上海博实业有限公司医疗设备厂;

恒温水浴锅:DJK-2000-L 型,天津市泰斯特仪器有限公司;

恒温振荡培养箱:THTZ-C 型,苏州培英实验设备责任有限公司;

电热恒温培养箱:DHH5000II 型,天津市泰斯特仪器有限公司;

超低温冰箱:MDF-382E 型,日本三洋电器生物医药公司。

1.3 试验方法

1.3.1 工艺流程

活化菌种→纯培养→液体培养→离心过滤收集菌泥→加入保护剂→分装→预冻→真空冷冻干燥→冻干菌粉→活菌计数

1.3.2 操作要点

(1) 纯培养:将活化好的菌种经过 2 次划线培养,挑选出单个菌落作为液体培养菌种。

(2) 液体培养及收集菌泥:将菌种接种至含有 MRS 肉汤的三角瓶中,在 37 ℃条件下,培养 18 h 后收集菌体;将菌液移入 250 mL 无菌带盖离心杯中,4 500 r/min 离心 25 min,弃上清液,用 0.85 g/100 mL 无菌生理盐水洗涤沉淀菌体,4 500 r/min 离心 25 min,弃上清液即得菌泥。

(3) 保护剂处理及添加:将葡萄糖、麦芽糖、山梨醇、麦芽糊精、海藻糖、甘油等保护剂配制所需浓度后,进行灭菌处理(121 ℃,15 min);混合保护剂以同样的方式灭菌。将取 1.0 g 菌泥与 5 mL 0.85 g/100 mL 无菌生理盐水混合制备成菌液(20 g/100 mL),以菌悬液:保护剂=1:3 比例混合均匀,制成细胞悬液。

(4) 冷冻干燥条件:在-68 ℃条件下冷冻 3 h,取出后放入真空冷冻干燥机中,在压力<25 Pa,-52 ℃的条件下干燥 16 h,然后放置于 4 ℃冰箱中保存备用。

(5) 活菌计数:将冻干粉从冰箱中取出,加入 1 mL 0.85 g/100 mL 无菌生理盐水混匀,使其与冻干前菌悬液的体积相等,放置于 30 ℃水浴锅中水浴 10 min,备用。

1.3.3 菌体存活率的测定 参考 GB 4789.2—2016 方法稍作修改:采用 MRS 培养基进行平板计数,37 ℃条件下培养(48±2) h,测定冻干前后活菌总数,并按式(1)计算存活率。

$$c = \frac{A}{B} \times 100\%, \tag{1}$$

式中:

c ——菌体存活率,%;

A ——1 mL 菌悬液冻干后菌落总数,CFU;

B ——1 mL 菌悬液冻干前菌落总数,CFU。

1.4 试验设计

1.4.1 单因素设计 以菌体存活率为评价指标,选取了葡萄糖、麦芽糖、山梨醇、麦芽糊精、海藻糖、甘油作为保护

剂^[15-18],并比较它们对植物乳杆菌 YI-Y 2013 在真空冷冻干燥过程中的保护效果。

(1) 甘油保护效果:甘油添加量为 1,2,3,4,5 g/100 g,不添加其他保护剂,测定甘油对植物乳杆菌 YI-Y 2013 的保护效果。

(2) 麦芽糖保护效果:麦芽糖添加量为 2,4,6,8,10 g/100 g,不添加其他保护剂,测定麦芽糖对植物乳杆菌 YI-Y 2013 的保护效果。

(3) 葡萄糖保护效果:葡萄糖添加量为 2,4,6,8,10 g/100 g,不添加其他保护剂,测定葡萄糖对植物乳杆菌 YI-Y 2013 的保护效果。

(4) 海藻糖保护效果:海藻糖添加量为 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 g/100 g,不添加其他保护剂,测定海藻糖对植物乳杆菌 YI-Y 2013 的保护效果。

(5) 山梨醇保护效果:山梨醇添加量为 1,2,3,4,5 g/100 g,不添加其他保护剂,测定山梨醇对植物乳杆菌 YI-Y 2013 的保护效果。

(6) 麦芽糊精保护效果:麦芽糊精添加量为 10,15,20,25,30 g/100 g,不添加其他保护剂,测定麦芽糊精对植物乳杆菌 YI-Y 2013 的保护效果。

1.4.2 优化设计 以菌体存活率为评价指标,选定葡萄糖、麦芽糖、山梨醇、麦芽糊精、海藻糖、甘油作为保护剂进行 Plackett-Burman 试验设计和分析,从中筛选出 3 种保护效果较好的山梨醇、甘油和麦芽糊精为因素,并以菌体存活率为响应变量进行中心组合试验及响应面分析。

1.5 数据处理

试验设计、数据分析以及模型建立分别采用 Excel 2003、Minitab 16 和 Design-Expert.V8.0.6 软件进行方差分析和模型分析。

2 结果与讨论

2.1 单因素分析

2.1.1 甘油浓度的选择 由图 1 可知,在一定范围内,随着甘油浓度的增加,菌体存活率呈现上升趋势,当甘油浓度为 3 g/100 g 时,存活率达到(29.21±2.64)% ,之后菌体存活率无显著变化(P<0.05)。因此,选择甘油浓度为 3 g/100 g 进行后续试验。这与许多研究结果基本一致,许女等^[17]添加含 0.5%甘油的复合保护剂,使得冻干后植物乳杆菌 MA2 的存活率达到 61%;方义川等^[1]添加含 1%甘油、2.5%脱脂奶粉、2.5%葡萄糖、1%蔗糖和 2.5% V_C的混合保护剂,使得嗜酸乳杆菌的存活数达到 1.27×10¹² CFU/g。甘油在乳酸菌冻干保护剂中较为常用,研究发现,甘油可以渗透到菌体内部,增强菌体与水的结合能力^[19],减少游离水含量,并增加溶液粘性,从而减缓晶核的生长,使形成的冰晶较细小,以达到保护菌体的目的^[18]。但甘油浓度过高,会延长冻干时间,浪费能源^[20]。

2.1.2 葡萄糖和麦芽糖浓度的选择 由图 2 可知,当麦芽糖的浓度低于 6 g/100 g 时,随着浓度的增大菌体存活率呈上升趋势,但高于 6 g/100 g 时,随着浓度的继续增大,菌体存

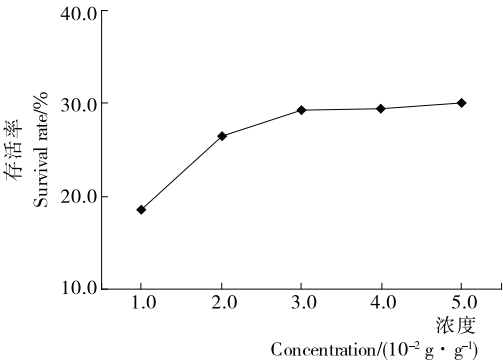


图 1 甘油浓度对菌体存活率的影响

Figure 1 Effect of glycerol concentration on the survival rate of *L. plantarum* YI-Y 2013

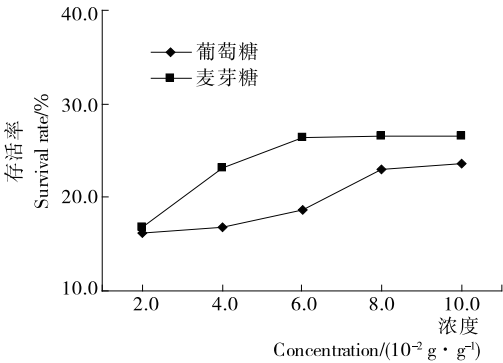


图 2 葡萄糖和麦芽糖浓度对菌体存活率的影响

Figure 2 Effect of glycerol and maltose concentration on the survival rate of *L. plantarum* YI-Y 2013

活率无显著变化 ($P < 0.05$)。因此,选择麦芽糖浓度为 6 g/100 g 进行后续试验。随着葡萄糖浓度不断地增大菌体存活率呈上升趋势,浓度高于 8 g/100 g 以后,存活率无显著变化 ($P < 0.05$),因而选择葡萄糖浓度为 8 g/100 g 进行后续试验。韩德权等^[15]发现,葡萄糖添加量为 10% 时,植物乳杆菌冻干后存活率可以达到 30% 以上;Chen 等^[21]发现,麦芽糖添加量为 3% 时,嗜酸乳杆菌冻干后存活率为 2.47%,而空白对照组约为 0.8%。这些研究表明,葡萄糖和麦芽糖在菌种冻干过程中均有较好的保护效果。而麦芽糖保护效果优于葡萄糖,可能与冻干样品玻璃化温度有关^[22]。

2.1.3 海藻糖和山梨醇浓度的选择 由图 3 可知,山梨醇质量浓度低于 1.5 g/100 g 时,菌体存活率不断增加,当其浓度高于 1.5 g/100 g 时,菌体存活无显著变化 ($P < 0.05$)。因此,山梨醇的浓度应取 1.5 g/100 g 最为合适。海藻糖的浓度低于 2 g/100 g 时,菌体存活率随海藻糖浓度的增大而增大,高于 2 g/100 g 时,菌体存活率无显著变化 ($P < 0.05$)。当海藻糖和山梨醇浓度均为在 0.75 g/100 g 时,菌体存活率一致。Nahr 等^[23]添加含 20.5% 海藻糖的复合保护剂,使得冻干后植物乳杆菌菌种存活量为 1.93×10^9 CFU/mL;Lee 等^[24]添加 10% 山梨醇和 10% 脱脂乳粉,使得植物乳杆菌 JH 287 冻干存活率达到 86.37%。表明海藻糖和山梨醇作为植物乳杆菌的冻干保护剂有显著的效果。研究表明,海藻糖具有多个羟基,能与菌体表面的自由基结合,避免菌体暴露在介质中,

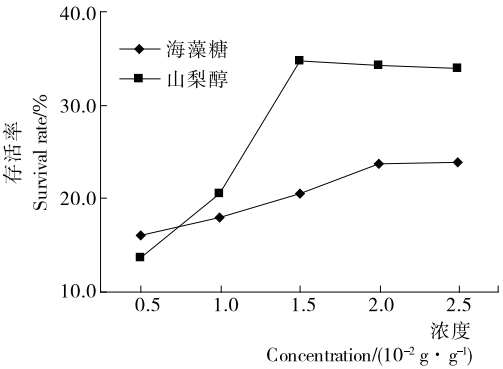


图 3 海藻糖和山梨醇浓度对菌体存活率的影响

Figure 3 Effect of trehalose and sorbitol concentration on the survival rate of *L. plantarum* YI-Y 2013

同时可与蛋白质形成氢键取代水^[25],稳定细胞膜和蛋白质结构^[26];山梨醇具有多个羟基,在冻干过程中可与菌体蛋白质极性基团结合形成氢键^[17],稳定蛋白质的结构和功能。海藻糖与山梨醇的结构相似,但对此菌种的冻干保护效果有显著差异 ($P < 0.05$),可能与菌种自身的特点有关。

2.1.4 麦芽糊精质量浓度的选择 由图 4 可知,当麦芽糊精浓度低于 25 g/100 g 时,随着浓度的增加菌体存活率呈上升趋势,当浓度 > 25 g/100 g 时,菌体存活率无显著变化 ($P < 0.05$)。赵静等^[18]研究显示,添加脱脂乳粉 15.0 g/L,蔗糖 20.0 g/L,麦芽糊精 25.0 g/L 和甘油 3.0 mL/L 可以使高产 γ -氨基丁酸植物乳杆菌存活率达到 75.3%。麦芽糊精是大分子保护剂^[17],通过“包裹”的形式避免菌体暴露在介质中,维持菌体的稳定性^[18]。

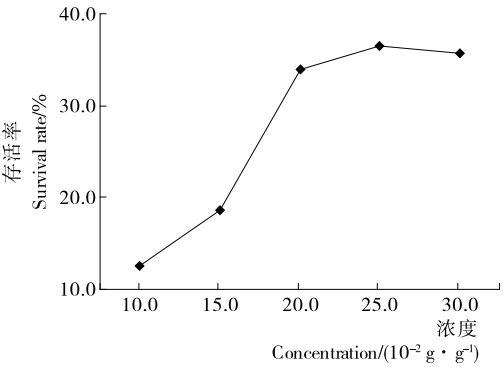


图 4 麦芽糊精浓度对菌体存活率的影响

Figure 4 Effect of maltodextrin concentration on the survival rate of *L. plantarum* YI-Y 2013

2.2 Plackett-Burman 设计及结果分析

选用 $N=12$ 的 Plackett-Burman 试验设计,试验设计和结果见表 1、2,试验结果分析见表 3。由表 3 可知,山梨醇、甘油、麦芽糊精和葡萄糖对菌体保护有促进作用,海藻糖和麦芽糖有抑制作用。根据回归方程系数可知,与其他 3 种保护剂相比,葡萄糖的促进效果不显著 ($P < 0.05$)。有研究^[27]表明,在保护剂的选择过程中大分子和小分子保护剂的配合使用可增强保护效果。因此,选择山梨醇、麦芽糊精和甘油作为中心组合试验的研究对象。

表 1 Plackett-Burman 试验设计因素及水平

Table 1 Factors and levels of Plackett-Burman test design

水平	海藻糖	山梨醇	甘油	麦芽糊精	葡萄糖	麦芽糖
−1	1.5	1.0	2.0	20	6.0	4.0
1	2.5	2.0	4.0	30	10.0	8.0

表 2 Plackett-Burman 试验设计及结果

Table 2 Plackett-Burman test design and results

海藻糖	山梨醇	甘油	麦芽糊精	葡萄糖	麦芽糖	存活率/%
−1	−1	1	1	1	−1	64.11
1	1	−1	1	−1	−1	60.57
−1	−1	−1	1	1	1	56.83
−1	1	1	1	−1	1	65.43
1	1	−1	1	1	−1	61.49
−1	1	1	−1	1	−1	64.17
1	−1	1	1	−1	1	51.57
−1	1	−1	−1	−1	1	48.43
1	−1	−1	−1	1	1	43.29
1	−1	1	−1	−1	−1	57.74
−1	−1	−1	−1	−1	−1	48.18
1	1	1	−1	1	1	52.20

2.3 中心组合试验及响应面分析

根据 Plackett-Burman 试验结果选择 3 种效果较好的保护剂进行中心组合试验,因素水平及结果见表 4、5。

以存活率(Y)为因变量,因素 A、B、C 为自变量的回归方程为:

$$Y=7\ 832.5.14-2.83A+0.99B-1.05C-1.32AB+4.34BC-6.25A^2-10.46B^2-9.81C^2。$$
 (2)

表 3 Plackett-Burman 试验结果分析

Table 3 Plackett-Burman test results analysis

因素	回归方程系数	t 值	Pr>F	重要性顺序
海藻糖	−0.018	−1.88	0.118	5
山梨醇	0.026	2.78	0.039	3
甘油	0.031	3.32	0.021	2
麦芽糊精	0.038	4.04	0.010	1
葡萄糖	0.009	0.99	0.369	4
麦芽糖	−0.032	−3.50	0.017	6

表 4 中心组合试验因素及水平

Table 4 Factors and levels of central composite experiment

水平	A 山梨醇	B 麦芽糊精	C 甘油
−1	0.8	22	2.4
0	1.2	24	2.6
1	1.6	26	2.8

用 F 值检验评估方程,得到的概率水平在 95%的条件下回归方程有显著性(P<0.05)。方程(2)的确定系数 $R^2=0.964\ 7$,说明 96.47%的试验数据可以用于方程解释。图 5 是响应面三维图,证实了拟合面含有真实的最大值。通过软件计算得到最优方案为:山梨醇浓度 1.13 g/100 g、麦芽糊精浓度 24.8 g/100 g、甘油浓度 2.45 g/100 g,此时菌体存活率 76.68%。为了检验预测值,取山梨醇浓度 1.1 g/100 g、麦芽糊精浓度 24.8 g/100 g、甘油浓度 2.4 g/100 g,进行 3 次重复实验,得到的平均菌体存活率(76.08±2.68)% ,此时干粉中

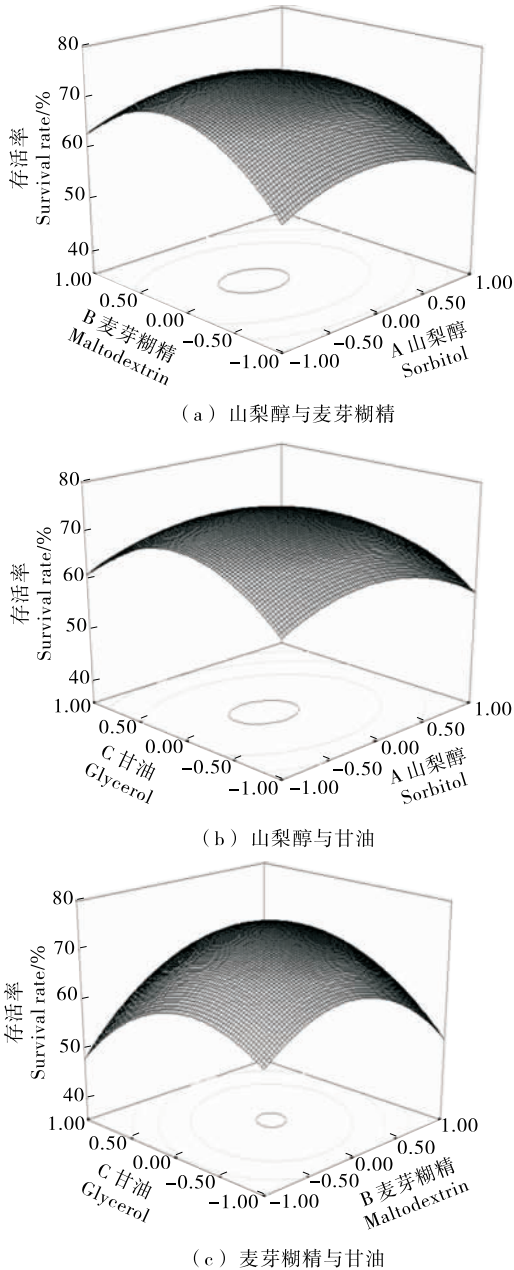


图 5 山梨醇、麦芽糊精和甘油之间交互作用对菌体存活率影响的响应面图

Figure 5 Response surface plots of the effect of sorbitor, maltodextrin and glycerol on the survival rate of *L. plantarum* YI-Y 2013

表 5 中心组合试验设计及结果

Table 5 Central composite experimental design and result of the survival rate of *L. plantarum* YI-Y 2013

序号	A	B	C	存活率/%
1	−1	−1	0	61.58±4.54
2	1	−1	0	54.21±3.88
3	−1	1	0	65.26±2.87
4	1	1	0	52.63±4.74
5	−1	0	−1	60.00±4.50
6	1	0	−1	61.05±4.49
7	−1	0	1	59.47±3.35
8	1	0	1	55.79±5.02
9	0	−1	−1	58.42±4.26
10	0	1	−1	52.63±3.74
11	0	−1	1	48.42±4.36
12	0	1	1	60.76±3.41
13	0	0	0	75.89±5.83
14	0	0	0	74.58±4.71
15	0	0	0	73.12±5.58
16	0	0	0	76.68±6.09
17	0	0	0	75.42±3.79

的菌体含量为 8.6×10^{11} CFU/g。基本上与数学模型得到的最大菌体存活率符合,说明响应面法优化得到的数学模型与试验数据拟合较好。

3 结论

在单因素试验确定各因素最适浓度的基础上,经过 Plackett-Burman 试验筛选出有显著效果的 3 种保护剂:山梨醇、麦芽糊精和甘油,通过中心组合试验设计和响应面分析拟合出一个三元二次方程,并得到最佳值。最佳保护剂配方为:山梨醇浓度 1.1 g/100 g,麦芽糊精浓度 24.8 g/100 g,甘油浓度 2.4 g/100 g,此时菌体存活率为 $(76.08\pm2.68)\%$,干粉中菌体含量为 8.6×10^{11} CFU/g。虽然植物乳杆菌 YI-Y 2013 在该法中菌体存活率仍然低于报道^[28]中植物乳杆菌 NCU 116 的 $(91.76\pm1.82)\%$,但相比不加保护剂时 YI-Y 2013 菌体存活率的 9.48%已有极显著提高($P<0.01$),可能除菌种之间的差异外,配方的优化还有进一步提升的空间。可为植物乳杆菌 YI-Y 2013 制备直投式发酵剂应用于鲜湿米粉的控制发酵提供理论依据。

参考文献

[1] 方义川,杨虹坤,何谦,等.直投式乳酸菌发酵剂的研制[J].现代食品科技,2012(8):990-994.

[2] GOLOWCZYC M A, SILVA J, ABRAHAM A G, et al. Preservation of probiotic strains isolated from kefir by spray drying. [J]. Letters in Applied Microbiology, 2010, 50(1): 7-12.

[3] STRASSER S, NEUREITER M, GEPL M, et al. Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria[J]. Journal of Ap-

plied Microbiology, 2009, 107(1): 167-177.

[4] DIMITRELLOU D, TSAOUSI K, KOURKOUTAS Y, et al. Fermentation efficiency of thermally dried immobilized kefir on casein as starter culture [J]. Process Biochemistry, 2008, 43 (12): 1 323-1 329.

[5] 贺金梅,刘俊轩,孙颖,等.固态微生物菌剂干燥和菌体保存的研究进展[J].食品工业科技,2012,33(15):423-427.

[6] MIYAMOTO-SHINOHARA Y, SUKENOBE J, IMAIZUMI T, et al. Survival of freeze-dried bacteria[J]. Journal of General & Applied Microbiology, 2008, 54(1): 9-24.

[7] 乔晓玲,闫祝伟,张原飞,等.食品真空冷冻干燥技术研究进展 [J]. 食品科学,2008,29(5):469-474.

[8] GEET A, AJIT S Yadav. Antioxidant and antimicrobial profile of chicken sausages prepared after fermentation of minced chicken meat with Lactobacillus plantarum, and with additional dextrose and starch [J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 77: 249-258.

[9] MISHRA S, MISHRA H N. Effect of Synbiotic Interaction of Fructooligosaccharide and Probiotics on the Acidification Profile, Textural and Rheological Characteristics of Fermented Soy Milk [J]. Food & Bioprocess Technology, 2013, 6(11): 3 166-3 176.

[10] SMITAHASINI P, SATARUPA P, SETHURAMAN S P, et al. Anthocyanin-rich sweet potato lacto-pickle: production, nutritional and proximate composition[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2010, 44(3): 445-455.

[11] GOBBETTI M, SIMONETTI M S, CORSETTI A, et al. Volatile compound and organic acid productions by mixed wheat sour dough starters; influence of fermentation parameters and dynamics during baking[J]. Food Microbiology, 1995, 12(95): 497-507.

[12] 易翠平,任梦影,周素梅,等.纯种发酵对鲜湿米粉品质的影响 [J]. 食品科学,2017,38(4):20-25.

[13] 易翠平,周慧,佟立涛.鲜米粉加工过程中的发酵工艺研究进展[J].食品与机械,2013,29(5):223-225.

[14] 杨有望.鲜湿米粉自然发酵的研究[D].长沙:长沙理工大学,2016:40-63.

[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.

[16] 李家鹏,张学刚,乔晓玲,等.响应面法优化植物乳杆菌冷冻干燥保护剂配方的研究[J].食品科学,2008,29(6):146-150.

[17] 许女,习傲登,张玢.真空冷冻干燥工艺参数对植物乳杆菌 MA2 活性的影响[J].中国酿造,2011,30(11):34-38.

[18] 赵静,梁金钟.直投式产 γ -氨基丁酸植物乳杆菌冻干保护剂生产工艺的优化[J].食品工业科技,2015,36(9):140-143.

[19] 蒲丽丽,刘宁,张英华,等.乳酸菌冻干保护剂及保护机理的研究进展[J].现代食品科技,2005(1):50-52.

[20] 张炎,张卫兵,宋雪梅,等.冻干保护剂对复合低温乳酸菌发酵剂的影响[J].食品工业科技,2015(7):144-147.

[21] CHEN He, MA Zhen-xing, SHU Guo-wei, et al. Effect of Sucrose, lactose, glucose, maltose on survival of lactobacillus acidophilus during freeze-drying [J]. Advanced Materials Research, 2012, 382: 396-399.

[22] 周新丽,刘建峰,张绍志,等.生物材料冻干保护剂的热分析 [J]. 制冷学报,2008,29(5):54-57.

牛肉的营养成分、风味成分等有待进一步研究。

参考文献

[1] ELLIS D I, GOODACRE R. Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of muscle foods: Current status and future trends[J]. Trends in Food Science Technology, 2001, 12(11): 414-424.

[2] 卢秀花, 宋海燕, 南京熙, 等. 两种天然防腐剂对延边黄牛肉保鲜效果的影响[J]. 食品科技, 2010, 35(11): 268-271.

[3] 金海莉, 王海丽, 梁成云, 等. 葡萄柚籽提取物对延边黄牛肉保鲜效果的影响[J]. 肉类研究, 2013, 27(6): 29-32.

[4] 林墨, 申佳洁, 王增凯, 等. 富硒锗酵母添加量对延边黄牛肉风味特性的影响[J]. 食品与机械, 2017, 33(6): 21-24.

[5] 冯雪风, 金卫根. 锗化合物饲料添加剂开发与利用[J]. 中兽医学杂志, 2007(1): 36-40.

[6] 范秀英, 郭雪娜. 高生物量富硒酵母的选育及培养条件初步优化[J]. 生物工程学报, 2003, 19(6): 720-724.

[7] 温萍, 董野, 赵希彦. 锗在肉仔鸡体内的富集[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2008(3): 44-46.

[8] 高先娟. 紫外分光光度法检测硒酵母片中硒的含量[J]. 微量元素与健康研究, 2014, 31(6): 75-77.

[9] 杜燕. 宰前因素对牛肉品质影响的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2009: 14.

[10] 金海莉, 王海丽, 梁成云, 等. 葡萄柚籽提取物对延边黄牛肉保鲜效果的影响[J]. 肉类研究, 2013, 27(6): 29-32.

[11] 于福清. 日粮硒水平对熟化过程中牛肉氧化稳定性和抗氧化酶活力的影响[J]. 中国农业科学, 2003, 36(2): 208-213.

[12] 谷英, 孙海洲, 桑丹, 等. 肉品质评定指标及影响因素的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(7): 100-106.

(上接第 125 页)

[27] 王梅, 徐俐, 王美芬, 等. 复合保鲜剂对鲜切山药保鲜效果的影响[J]. 食品与机械, 2017, 33(5): 134-140.

[28] 方海田, 刘慧燕, 张光弟. 不同贮藏温度下辣椒中丙二醛含量的变化[J]. 农产品加工: 创新版, 2010(5): 29-31.

[29] 王赵改, 杨慧, 陈丽娟, 等. 红油香椿嫩芽不同部位理化指标及其体外抗氧化活性[J]. 食品与生物技术学报, 2015(6): 646-652.

[30] 刘帅, 邓洁红, 敬小波, 等. 冰温贮藏对雪莲果品质影响的研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(21): 346-350.

(上接第 130 页)

[23] FATEMEH Keivani Nahr, REZA Rezaei Mokarram, MOHAMMAD Amin Hejazi, et al. Optimization of the nanocellulose based cryoprotective medium to enhance the viability of freeze dried *Lactobacillus plantarum*, using response surface methodology[J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 64(1): 326-332.

[24] LEE S B, KIM D H, PARK H D. Effects of protectant and rehydration conditions on the survival rate and malolactic fermentation efficiency of freeze-dried *Lactobacillus plantarum*, JH287[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2016, 100(18): 7 853-7 863.

[25] 蒲丽丽, 刘宁. 保加利亚乳杆菌冻干保护剂保护作用的研究

[13] 吴文锦, 汪兰, 丁安子, 等. 包装材料和包装方式对贮藏过程中鸭肉品质的影响[J]. 食品与机械, 2016, 32(6): 139-143.

[14] 王薇, 罗瑞明, 李俊丽, 等. 不同贮藏温度下滩羊肉的保水性与色泽变化特性[J]. 食品与机械, 2015, 31(3): 140-144.

[15] 华晶忠, 刘笑笑, 李树锦, 等. 不同部位延边黄牛冷却肉在贮藏期间新鲜度变化的比较研究[J]. 食品科技, 2010, 35(11): 142-145.

[16] 陈松, 冯月荣, 曹淑萍. pH 值对屠宰肉品质的影响[J]. 肉类工业, 2009(6): 21-23.

[17] 申小云, 杨培林, 陈灼, 等. 锗硒对高原牦牛抗氧化功能系统的影响[J]. 甘肃农业大学学报, 2002(4): 437-441.

[18] 张丽, 王莉, 周玉春, 等. 宜宰后成熟时间提高牦牛肉品质[J]. 农业工程学报, 2014, 30(15): 325-331.

[19] 李思宁, 唐善虎, 王柳. 冻藏物流过程中制冷故障对生鲜牦牛肉品质的影响[J]. 食品科学, 2016, 37(10): 246-251.

[20] 刘佳东, 余群力, 李永鹏. 宰后冷却牦牛肉排酸过程中肉用品质的变化[J]. 甘肃农业大学学报, 2011(2): 111-114.

[21] LAVIERI N, WILLIAMS S K. Effects of packaging systems and fat concentrations on microbiology, sensory and physical properties of ground beef stored at (4±1) °C for 25 days[J]. Meat Science, 2014, 97: 534-541.

[22] 何宏超, 李彪. 酵母硒对猪机体硒含量、抗氧化能力和肉质的影响[J]. 饲料研究, 2011(4): 50-51.

[23] 王志琴, 孙磊, 彭斌, 等. 不同气调包装牛肉贮藏过程中肉质变化规律研究[J]. 动物医学进展, 2011, 32(8): 49-52.

[24] 石志标, 佟月英, 陈东辉, 等. 牛肉新鲜度的电子鼻检测技术[J]. 农业机械学报, 2009(11): 184-188.

[25] 刘雯雯. 饲料添加有机硒和 V_E 对育肥猪生产性能、肉质和抗氧化力的影响[D]. 成都: 四川农业大学, 2008: 34-35.

[31] 杨颖, 邢志恩, 王军, 等. 贮藏期香椿中多酚类物质含量与相关酶活变化的关系[J]. 食品科技, 2010(2): 24-28.

[32] 王翠红. 贮藏温度与包装方式对蓝莓采后贮藏品质和生理的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2012: 36-46.

[33] 冯悦悦, 李喜宏, 邵重晓. 新疆红提葡萄贮藏期冰点研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(8): 356-358, 373.

[34] 阎瑞香, 贾凝, 宋茂树, 等. 蒜薹冰点温度、可溶性固形物含量与含水量相关性的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(10): 554-557.

[35] 乔勇进, 孙蕾, 吴兴梅, 等. 不同成熟度沾化冬枣冰点测定及适宜贮藏温度的研究[J]. 经济林研究, 2005, 23(1): 10-12.

[J]. 中国酿造, 2010, 29(5): 46-48.

[26] FUCHIGAMI M, OGAWA N, AI T. Trehalose and hydrostatic pressure effects on the structure and sensory properties of frozen tofu (soybean curd)[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2002, 3(2): 139-147.

[27] MANALIS N, MAGKANARI F. Production of traditional Greek yoghurt using *Lactobacillus* strains with probiotic potential as starter adjuncts[J]. International Dairy Journal, 2006, 16(1): 52-60.

[28] 熊涛, 黄锦卿, 宋苏华, 等. 植物乳杆菌真空冷冻干燥保护剂配方优化[J]. 南昌大学学报: 理科版, 2010, 34(6): 561-565.