

免疫初乳与双歧杆菌复合微胶囊保护剂的筛选

杨 柳, 尤丽新, 张英楠, 陈海燕, 马井喜
(吉林农业大学发展学院, 吉林 长春 130600)

摘 要: 以双歧杆菌发酵免疫初乳, 然后采用真空冷冻干燥技术研制成冻干粉, 并以冻干粉为芯材、以肠溶材料欧巴代为壁材, 采用空气悬浮微胶囊化的方法制成免疫与微生态双活性肠溶制剂。加工过程中加入菌体保护剂, 通过单因素试验和正交试验确定微胶囊的保护剂的最佳配方为: 海藻糖添加量为 6%, 水解酪蛋白添加量为 6%, 乳化剂 Span80 添加量为 3%。得到的微胶囊中活菌数为 6.0×10^8 CFU/mL, 存活率可达 18.2%, 比未添加保护剂的对照组活菌存活率提高了 16.8%。

关键词: 双歧杆菌; 微胶囊; 保护剂

Screening for Optimal Protectant for Compound Microcapsule of Immune Colostrum and Bifidobacteria

YANG Liu, YOU Li-xin, ZHANG Ying-nan, CHEN Hai-yan, MA Jing-xi
(Development College, Jilin Agricultural University, Changchun 130600, China)

Abstract: Immune colostrum was fermented by *Bifidobacterium adolescentis* and then subjected to vacuum freeze-drying to obtain freeze-dried powder. The prepared freeze-dried powder was used as the core material and CAP Opadry was used as the wall material to prepare an enteric-coated preparation with both immune and microbial activity by an air suspension microencapsulation method with the addition of protectant. The optimal protectant composition for improved viable *Bifidobacterium adolescentis* count was determined by single factor and orthogonal array design to be trehalose of 6%, hydrolyzed casein of 6%, and emulsifier Span80 of 3%. The viable bifidobacteria count in the obtained microcapsules was 6.0×10^8 CFU/mL and the survival rate of bifidobacteria was 18.2%, which exhibited an increase of 16.8% when compared to the control with the addition of protectant.

Key words: *Bifidobacterium*; microcapsule; protectant

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)13-0179-05

初乳是指雌性哺乳动物分娩后 7d 内所分泌的乳汁的统称。初乳与普通乳汁比较, 其特殊性首先体现在化学组成上: 初乳的蛋白质含量更高, 脂肪和糖含量较低, 铁含量为普通乳汁的 10~17 倍, VD 和 VA 的含量分别为普通乳汁的 3 倍和 10 倍^[1-2]。初乳最引人注目之处在于它具有独特生理功能, 初乳的蛋白质大多数为具有抗体活性的免疫球蛋白, 它能够与病原微生物及毒素等抗原结合, 在哺乳动物新生幼仔自身免疫系统发育成熟、正常运作之前, 可以保护其免受病原微生物侵袭。

牛初乳引人注目之处在于: 它含有大量不同生理活性的天然功能性组分, 是自然界免疫因子最为富集的食品资源之一。由于牛初乳成分非常复杂, 它的功能活性组分大致可分为免疫因子和生长因子两大类, 分别对机体免疫和生长具有调节功能, 使牛初乳具有改善胃肠道、免疫调节、延缓衰老、促进生长发育、抗疲劳、

抑制肿瘤等一系列的生物功能^[3-5]。

免疫乳是指对哺乳动物(主要是牛、羊等)选择性地免疫接种一些能够引起人或动物疫病的细菌或病毒或其他一些外来的抗原, 进而刺激机体产生特异性免疫应答反应, 以分泌特异性抗体进入乳中, 这种乳称为免疫乳^[6]。人服用免疫乳, 小肠无需吸收抗体即可起到被动免疫保护作用, 只要乳中的免疫球蛋白到达肠道后活性不丧失, 就可特异性地中和并清除肠道中的病原菌, 从而对疾病有一定地预防和治疗作用。

双歧杆菌是 1899 年在法国巴斯德研究所由帝赛博士首次从健康的母乳哺育婴儿的粪便中发现并分离出来的^[7], 是人体肠道内 100 多种细菌中典型的对人体有益无害细菌, 它与人的一生始终保持着和谐的共生关系, 是健康个体肠道中的优势菌, 其促进人体健康的有益作用远远超过其他乳酸菌^[8-11]。目前, 尽管对双歧杆菌促

收稿日期: 2010-09-20

作者简介: 杨柳(1981—), 女, 讲师, 硕士, 研究方向为功能性乳制品。E-mail: yangliu_2006@163.com

进人体健康的功能性及其微生态调节机制尚不完全了解, 但该菌的生物化学屏障、抑制致病菌和腐败菌、提供营养、提高免疫力、抗肿瘤功能及其某些临床功效已被充分肯定^[12]。

然而, 双歧杆菌和免疫球蛋白在人体内胃酸、胆汁酸、蛋白酶的作用下活性大大降低, 限制了 IgG 及双歧杆菌在食品加工中的应用。为使双歧杆菌和 IgG 能顺利通过肠道, 避免胃酸、胆汁酸对二者活性的影响, 采用流化床悬浮微胶囊化肠溶包埋技术, 制备免疫牛初乳与双歧杆菌双活性复合微胶囊制剂。然而, 双歧杆菌不耐热, 活菌数在加工过程中会大幅度下降, 从而限制了双歧杆菌功能性食品的开发。为使双歧杆菌在加工过程中保持较高的活性, 微胶囊在加工过程中加入菌体保护剂。本实验通过单因素试验和正交试验确定了菌体保护剂的最佳配比, 从而使微胶囊中保存较高的活菌数。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

脱脂乳 黑龙江省完达山乳业股份有限公司; 青春双歧杆菌(*Bifidobacterium adolescentis*) 吉林农业大学食品科学与工程学院乳品研究室。福氏志贺氏菌冻干粉 吉林大学第一临床医院微生物研究室。

改良牛乳培养基、TPYG 固体培养基、G-N 培养基 吉林农业大学食品科学与工程学院乳品研究室; 肠溶型欧巴代 上海卡乐康公司; 海藻糖、葡萄糖、蔗糖 南宁中诺生物工程有限责任公司; Span80 北京益利化学有限公司; 蛋白胨、胰蛋白胨、牛肉浸膏、酵母粉 北京奥博星生物技术有限责任公司; 半胱氨酸盐酸 北京鼎国生物技术有限责任公司。

1.2 仪器与设备

空气悬浮造粒机 Heizmedium Elektr 公司; BGB-10C 高效包衣机 中国温州市制药设备厂; 母芯造粒机 北京天民高科技开发公司; 崩解时限检测仪 天津市拓普仪器有限公司; HPX-9162MBE 数显式电热恒温干燥箱 上海博讯实业有限公司; JJ-1 精密增力电动搅拌器 金坛市江南仪器厂; TU-1810 紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司。

1.3 主要溶液的配制

水解酪蛋白: 牛乳离心去除脂肪, 加入 0.02% 的凝乳酶, 凝乳后切割除去乳清, 添加胰蛋白酶进行水解, 水解条件为 pH7.5, 温度 60℃, 底物质量浓度为 5g/100mL, 胰酶添加量为 62.44U/g, 水解时间为 140min。

欧巴代肠溶包衣液的配制: 1) 在合适的配液容器中加入计算好的 88% 的酒精溶液, 配成的包衣液的液面高度最好与容器的直径基本相同。2) 将螺旋桨式搅拌器深入液面下 2/3 处。理想的搅拌器的直径约为容器直径的 1/3。3) 启动搅拌器, 使整个液面刚刚形成漩涡, 但不能卷入太多的空气, 搅拌速度应足以使容器中的液体完全被搅动。4) 使用合适的勺子将欧巴代以平稳的速度不断加入漩涡中, 不能使粉末漂浮在液面上, 加料过程应在数分钟内完成。随着包衣液的黏度不断增大, 可能需要提高搅拌速度, 以保持原有的漩涡。5) 加料完毕后, 将搅拌速度放慢使漩涡刚刚消失, 继续搅拌 45min, 即可完成包衣液的配制。

人工胃液^[13]: 盐酸 16.4mL、胃蛋白酶 10g, 加水搅匀后定容至 1000mL, pH1.2。

人工肠液: 磷酸二氢钾 6.8g、加水 500mL 溶解, 用 0.4% 的氢氧化钠溶液调节 pH 值至 6.8; 另取胰酶 10g 加水适量使其溶解, 将两液混合后, 加水定容至 1000mL。

1.4 方法

1.4.1 免疫程序的设计

1.4.1.1 抗原的选择

选择我国发病率较高的肠道致病菌福氏志贺氏菌作为抗原。新购进福氏志贺氏菌冻干粉, 选用 G-N 培养基将冻干菌粉进行活化、传代, 直到菌的活力恢复。

1.4.1.2 疫苗的制备

为保证获得高密度的福氏志贺氏菌, 选用 G-N 液体培养基进行增菌培养, 摇床 37℃, 200r/min 培养 18~20h。并分别于第 10、13 小时向培养基中添加 1%~5% 的灭菌蔗糖溶液, 同时用 1mol/L 的 NaOH 调节 pH 值至 8.0~8.2。收集培养液, 添加 0.4% 甲醛, 37℃ 灭活 24h, 杂检。如无活菌存在, 用麦氏比浊管测定菌体浓度。用无菌生理盐水调整菌体浓度为 1.0×10^{11} CFU/mL 和 3.0×10^{10} CFU/mL。菌体浓度为 1.0×10^{11} CFU/mL 的菌液作为水剂苗; 菌体浓度为 3.0×10^{10} CFU/mL 的菌液作为检测抗体活性的抗原。水剂苗及抗原均 4℃ 保存备用。在水剂苗中加入等体积的 10 号白油, 搅拌乳化, 制成佐剂苗, 4℃ 保存备用^[14-16]。

1.4.1.3 免疫方案

自农大奶牛场随机选择 10 头健康距离预产期 6~8 周的奶牛, 随机分两组, 每组 5 头。第一组以福氏志贺氏菌做免疫原。第二组为对照组。免疫组分娩前 6~8 周肌注射水剂苗, 两周后皮下注射佐剂苗, 以后每隔

一周交替注射水剂苗和佐剂苗，直至奶牛分娩。

1.4.2 初乳的收集

收集乳牛分娩后 7d 内的乳即为初乳。

1.4.3 双歧杆菌发酵免疫初乳冻干粉的制备

1.4.3.1 菌种活化

将双歧杆菌冻干粉接入灭菌的 11% 脱脂乳中，37℃ 恒温培养，待脱脂乳凝固后，连续传代 2~3 次，使其充分活化。

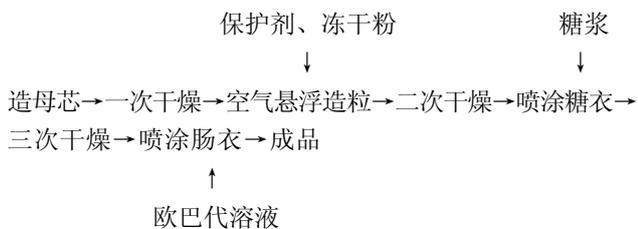
1.4.3.2 镜检

待菌种充分活化后，按照革兰氏染色法染色后镜检，确定是否是纯菌种。

1.4.3.3 冻干粉的制备

免疫初乳以 5% 量接种双歧杆菌，4h 凝乳，加入保护剂后进行冻干制粉。

1.4.4 复合微胶囊制备的工艺流程



1.4.4.1 母芯的制作

母芯为蔗糖粉和可溶性淀粉的混合物，且蔗糖粉与可溶性淀粉质量比为 7:3，采用空气悬浮法将蔗糖粉和可溶性淀粉制成母芯。母芯造粒机的参数为：主机调速：80r/min，喷浆调速：110r/min，鼓风温度：27.1℃。

1.4.4.2 空气悬浮造粒

采用空气悬浮法将双歧杆菌免疫初乳复合冻干粉附在母芯上，同时通入菌体保护剂。空气悬浮造粒机控制参数为：进风量 200m³/h、进气温度 45℃、排气温度 36℃、物料温度 37℃、喷浆速度 6r/min。

1.4.4.3 干燥

采用流化床进行连续干燥，干燥条件为：母粒堆积厚度 3~4 粒，干燥室湿度 20%~40%，37~40℃ 干燥 1~2h。

1.4.4.4 包糖衣

糖衣液为蔗糖溶液，且蔗糖溶液质量浓度 50g/100mL。

1.4.4.5 包肠溶衣

肠溶衣溶液为醇溶性欧巴代溶液，溶剂乙醇体积分数为 88%，欧巴代质量浓度为 15g/100mL，片心质量增加 15%。

1.5 复合微胶囊保护剂的筛选

1.5.1 复合保护剂的筛选

分别选用海藻糖、脱脂奶粉(1:1)、蔗糖、水解酪蛋白为单一保护剂，海藻糖+脱脂奶粉、海藻糖+水解酪蛋白(1:1)、蔗糖+水解酪蛋白(1:1)为复合保护剂，以生理盐水为对照，对风干后微胶囊中双歧杆菌的活菌数进行测定，以双歧杆菌存活率为指标，确定最佳保护剂。保护液的质量浓度均为 10g/100mL。且添加量均为冻干粉的 2%。

1.5.2 海藻糖添加量的选择

将 2%、4%、6%、8% 的海藻糖分别加入到冻干粉中作为菌体保护剂，以微胶囊中双歧杆菌的存活率作为指标，考察海藻糖添加量对双歧杆菌存活率的影响，确定最佳海藻糖添加量。

1.5.3 水解酪蛋白添加量的确定

将 2%、4%、6%、8% 的水解酪蛋白分别加入到冻干粉中作为菌体保护剂，以微胶囊中双歧杆菌存活率作为指标，考察水解酪蛋白添加量对其的影响，确定最佳水解酪蛋白的添加量。

1.5.4 Span80 添加量的确定

将 1%、3%、5%、7% 的 Span80 分别加入到冻干粉中作为乳化剂，以微胶囊中双歧杆菌的存活率作为指标，考察 Span80 添加量对活菌存活率的影响，确定最佳 Span80 添加量。

1.5.5 肠溶性复合微胶囊保护剂最佳配方的确定

以经初步筛选得到的海藻糖的添加量、水解酪蛋白添加量、Span80 的添加量 3 个参数，按 L₉(3⁴) 正交试验设计，对海藻糖添加量、水解酪蛋白添加量、Span80 添加量进行优化设计，得到牛初乳 IgG 与双歧杆菌复合微胶囊的最佳保护剂工艺组合，正交试验因素水平设计如表 1 所示。

表 1 L₉(3⁴) 正交试验因素水平表
Table 1 Factors and levels in the orthogonal array design

水平	A 海藻糖添加量/%	B 水解酪蛋白添加量/%	C Span80 添加量/%
1	2	2	1
2	4	4	3
3	6	6	5

1.6 复合微胶囊中双歧杆菌活菌数的测定^[17]

取适量(相当 0.1g 冻干粉)微胶囊，放入 100mL 人工肠液中崩解，再取 1mL 崩解后的溶液放到 9mL 灭菌的生理盐水中，依次做 10 倍系列稀释，选取 3 个适当的稀释倍数，吸取 0.1mL 稀释液注入无菌培养皿中，倾注法加入 25mL 左右的计数培养基混合，每个稀释度做 3 个平行培养皿。待培养基凝固后，倒置放入 37℃ 厌氧培养箱中，培养 48h。选取菌落数在 30~300 之间的培养皿计菌落数。

活菌数/(CFU/mL)=10×平板菌落数×稀释倍数。

1.7 复合微胶囊中双歧杆菌存活率的测定

取微胶囊 200 粒(相当 0.1g 冻干粉),置于肠溶液中,于 37℃ 恒温水浴中搅拌,45min 后进行活菌计数,活菌计数分别为 B_1 ,取 0.1g 冻干粉测其活菌数(B_2)。

活菌存活率/%=(B_1/B_2)×100

2 结果与分析

2.1 复合微胶囊中保护剂的筛选结果

2.1.1 复合保护剂的确定

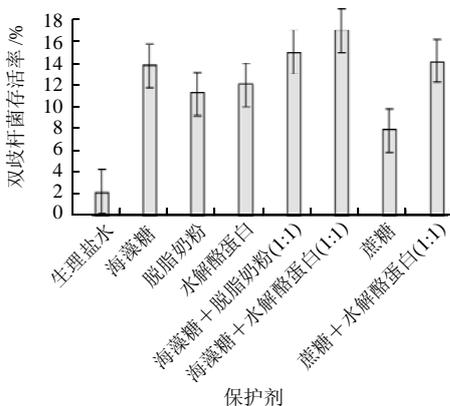


图1 不同保护剂对微胶囊中双歧杆菌存活率的影响

Fig.1 Effects of different protectants in microcapsule on survival rate of bifidobacteria

由图1可知,海藻糖具有稳定生物膜和蛋白质结构、抗逆保鲜的作用,并且该作用优于其他糖类,实验所用的单一保护剂中海藻糖的作用最显著。然而,单一保护剂不能满足菌体抵抗外界恶劣环境的条件,复合保护剂的效果比单一保护剂的效果要好,以海藻糖和水解酪蛋白复配的保护剂效果最佳,微胶囊中活菌存活率可达17%,比未加保护剂的微胶囊中活菌存活率(2.1%)提高了14.9%。这是由于二者具有协同作用:海藻糖能够渗透到细胞内部,并填充在蛋白质等活性大分子周围,当干燥失水后,海藻糖的羟基可与生物分子的极性基团形成氢键,代替极性基团周围失去的水分子,从而维持蛋白质结构的稳定性^[18]。

2.1.2 海藻糖添加量对双歧杆菌存活率的影响

由图2可知,当海藻糖添加量大于2%时,随着海藻糖添加量的增加,微胶囊中双歧杆菌的存活率也随之增加;当海藻糖添加量为6%时,微胶囊中活菌数达到 4.65×10^8 CFU/mL,存活率达到最高为14.1%。以后随着海藻糖添加量的增加,存活率略有下降。其原因在于:海藻糖使微生物有机体在高温、干燥、冷冻、高渗透压及有毒试剂等环境中仍然能保持生命活力。在上述异常条件下,海藻糖的积累是生物抵御不良环境条件

的重要现象。海藻糖具有保护细胞内湿润、防止细胞失水而避免细胞内养分损失作用,从而使生物体可处于低湿休眠状态。

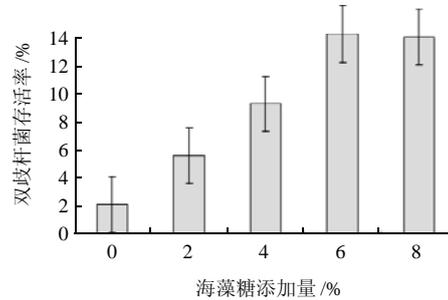


图2 海藻糖添加量对双歧杆菌存活率的影响

Fig.2 Effect of trehalose amount on survival rate of bifidobacteria

2.1.3 水解酪蛋白添加量对双歧杆菌存活率的影响

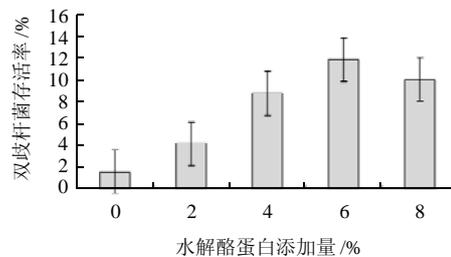


图3 水解酪蛋白添加量对双歧杆菌存活率的影响

Fig.3 Effect of casein amount on survival rate of bifidobacteria

由图3可知,当水解酪蛋白添加量大于2%时,随着水解酪蛋白添加量的增加微胶囊中双歧杆菌存活率不断增加;但当水解酪蛋白的添加量为6%时,存活率达到最高,在11.8%左右。以后随着水解酪蛋白添加量的增加存活率开始下降。水解酪蛋白的主要产物是酪蛋白磷酸肽(casein phosphopeptides, CPP)是以牛乳酪蛋白为原料,通过生物技术制得的具有生物活性的多肽。CPP分子由20~30个氨基酸残基组成,其中包括4~7个成簇存在的磷酸丝酰基。大量实验证明,酪蛋白磷酸肽具有很好的耐热性,对菌体具有一定的保护作用。

2.1.4 Span80添加量对双歧杆菌存活率的影响

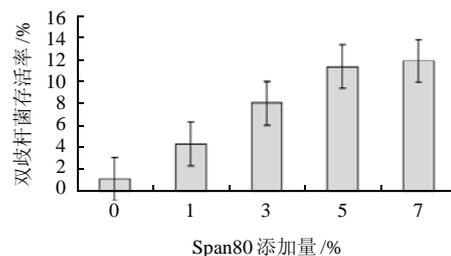


图4 Span80添加量对双歧杆菌存活率的影响

Fig.4 Effect Span80 amount on survival rate of bifidobacteria

由图4可知,当Span80添加量大于1%时,随着Span80添加量的增加,微胶囊中双歧杆菌存活率逐渐增加;当Span80添加量为5%时,微胶囊中的双歧杆菌存活率达到11.4%左右。以后随着Span80添加量的增加,双歧杆菌存活率增加非常缓慢。

Span80是一种重要的乳化剂,化学名为山梨糖醇酐油酸酯。最主要的作用就是乳化作用,由于食品中通常含有不同性质的成分,乳化剂有利于它们的分散,可防止油水分离,防止糖、油脂起霜,防止蛋白质凝集和沉淀,提高食品尤其是菌体的耐盐性、耐酸及耐热能力,并且乳化后的成分更易为人体吸收利用。而且甘油具有3个羟基,可与菌体表面的自由基相联结,起到保护作用,从而避免菌体直接暴露在介质中。故对厌氧的双歧杆菌的保护更加有利。

2.1.5 肠溶性复合微胶囊保护剂配方优化

在微胶囊化的过程中加入合适的保护剂可以保护微胶囊中的双歧杆菌的活菌数,防止高温、热蒸汽、及机械摩擦对二者活力的影响。为确定出较合理的保护剂配方,在单因素的基础上做一组正交试验,以海藻糖添加量、水解酪蛋白添加量及Span80添加量为3个因素,每个因素取3个水平,设计正交试验 $L_9(3^4)$,共做9个试验,并以微胶囊中双歧杆菌的存活率作为评价指标,从而选出较佳保护剂配比。正交试验结果和分析见表2。

表2 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Table 2 Orthogonal array design and corresponding results

试验号	A	B	C	D	微胶囊中双歧杆菌存活率/%
对照	0	0	0	0	1.4
1	1	1	1	1	8.1
2	1	2	2	2	9.8
3	1	3	3	3	14
4	2	1	2	3	13.8
5	2	2	3	1	15.2
6	2	3	1	2	10.4
7	3	1	3	2	11.2
8	3	2	1	3	17.3
9	3	3	2	1	18.2
K_1	31.9	33.1	35.8		
K_2	39.4	42.3	41.8		
K_3	46.7	42.6	40.4		
k_1	10.6	11	11.9		
k_2	13.1	14.1	13.9		
k_3	15.6	14.2	13.5		
R	5	3.2	2		
较好水平	A_3	B_3	C_2		
最佳组合	$A_3B_3C_2$				

由表2分析可知,因素的主次顺序为海藻糖添加量

(A)>水解酪蛋白添加量(B)>Span80添加量(C)。其最优组合为 $A_3B_3C_2$ 。即海藻糖添加量为6%,水解酪蛋白添加量为6%,Span80添加量为3%。从表中直观看微胶囊中双歧杆菌最高的存活率为18.2%,比未添加保护剂的对照组活菌存活率提高16.8%。由此可以看出优选出的保护剂可以明显提高微胶囊化过程中双歧杆菌的存活率。

3 结论

通过单因素试验确定复合保护剂对菌体的保护效果优于单一保护剂。且通过正交试验确定了微胶囊的保护剂的最佳配比为:海藻糖添加量为6%,水解酪蛋白添加量为6%,乳化剂Span80添加量为3%。得到的微胶囊中活菌数为 6.0×10^8 CFU/mL,双歧杆菌存活率为18.2%,比未添加保护剂的对照组提高了16.8%。保护剂可以明显提高微胶囊化过程中双歧杆菌的活菌数,为双歧杆菌功能性食品的开发创造了良好的条件。

参考文献:

- [1] 李国强. 抗哮喘病免疫乳的研究[D]. 天津: 天津商学院, 2003: 5.
- [2] 杨汉春. 动物免疫学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1996: 2.
- [3] 张和平, 郭军. 免疫乳: 科学与技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2002: 1.
- [4] 郭本恒. 功能性乳制品[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001: 1.
- [5] 陆东林. 我国牛初乳开发利用的现状、问题与对策[J]. 新疆农业科学, 2004, 41(2): 190-195.
- [6] 江青东, 王艳玲, 杨国宇, 等. 免疫乳研究概述和最新研究进展[J]. 动物科学和动物医学, 2004, 21(10): 1-3.
- [7] 郭本恒. 酸奶[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 193-195.
- [8] RASIC J L. Bifidobacteria and their role[M]. Basel, Switzerland: Birkauer Verlag, 1983.
- [9] 杜敏, 李庆贤, 龚海岩, 等. 双歧杆菌及其保健机理[J]. 食品与发酵工业, 1995, 21(2): 81-83.
- [10] 王占武, 张麓. 双歧杆菌与人体健康[J]. 中国乳品工业, 1996, 24(1): 24-27.
- [11] HILL M T, GROWTHER S, DRASAR B S, et al. Bacteria and etiology of cancer of large bowel[J]. Lancet, 1971, 14: 95-100.
- [12] 田洪涛, 张柏林, 贾英民. 双歧杆菌与人体胃肠道微生态[J]. 河北农业大学学报, 2000, 23(4): 84-86.
- [13] 李武明, 张铃华, 杨汝德. 双歧杆菌的微囊化研究[J]. 广东药学院学报, 1997, 13(4): 222-225.
- [14] 张和平, 孙天竹, 郭军, 等. 免疫乳中乳抗体对大肠杆菌和沙门氏菌所致小鼠腹泻的被动免疫保护[J]. 中国乳品工业, 2004, 32(6): 3-7.
- [15] 张和平, 孙天竹, 郭军, 等. 免疫乳对肠道菌群的调节作用[J]. 中国乳品工业, 2004, 32(5): 9-12.
- [16] 郭军, 张和平, 李立民, 等. 株肠出血性大肠杆菌O157H7免疫奶牛实验即抗EHEC O157H7免疫乳的试制[J]. 食品科学, 2002, 23(8): 254-258.
- [17] 唐宝英, 朱晓慧, 刘佳. 双歧杆菌高燥型微囊技术的研究[J]. 食品与发酵工业, 2003(4): 94-98.
- [18] LOPEZ-DIEZA E C, BONEB B. The interaction of trypsin with trehalose: an investigation of protein preservation mechanisms[J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1673(6): 139-148.