

发酵乳杆菌 BLHN3 的高密度培养优化

Optimization of high density culture of *Lactobacillus fermentum* BLHN3

左梦楠¹ 刘伟^{1,2,3} 张菊华^{1,2,3} 全琦¹

ZUO Meng-nan¹ LIU Wei^{1,2,3} ZHANG Ju-hua^{1,2,3} QUAN Qi¹

(1. 湖南大学研究生院隆平分院, 湖南长沙 410000; 2. 湖南省农业科学院农产品加工研究所, 湖南长沙 410000; 3. 果蔬贮藏加工与质量安全湖南省重点实验室, 湖南长沙 410000)

(1. Long Ping Branch, Graduate School of Hunan University, Changsha, Hunan 410000, China; 2. Hunan Agricultural Product Processing Institute, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha, Hunan 410000, China; 3. Hunan Key Laboratory of Fruits & Vegetables Storage, Processing, Quality and Safety, Changsha, Hunan 410000, China)

摘要:目的: 研发低成本、高密度的乳酸菌发酵剂。方法: 以从剁辣椒分离的发酵乳杆菌 BLHN3 为材料, 在 MRS 培养基的基础上优化高密度发酵培养基及其培养条件。结果: 发酵乳杆菌 BLHN3 的最佳碳源、氮源、缓冲盐、增菌因子分别是海藻糖 30.0 g/L、大豆蛋白胨 34.0 g/L、柠檬酸铵 2.0 g/L、乙酸钠 5.0 g/L、磷酸氢二钾 2.0 g/L、胡萝卜汁 10%, 优化培养基的发酵乳杆菌活菌数可达 6.05×10^9 CFU/mL。该培养基优化发酵工艺为初始培养 pH 为 6、培养温度 37 °C、接种量 3%、装液量 30 mL。半连续高密度培养表明, 离心培养 3 次最佳。结论: 优化培养基及培养条件后, 发酵乳杆菌 BLHN3 的菌体密度显著高于 MRS 培养基, 提高了发酵乳杆菌 BLHN3 的生长活性。

关键词: 发酵乳杆菌 BLHN3; 高密度培养; 培养基; 培养条件

Abstract: Objective: This study aimed to develop a low cost and high density lactobacillus starter. **Methods:** The *Lactobacillus fermentum* BLHN3 isolated from chopped pepper was used as material, on the basis of MRS medium, the high density fermentation medium and culture conditions were optimized. **Results:** The optimal carbon source, nitrogen source, buffer salt, growth-promoting factor of *L. fermentum* BLHN3 were as

follows: 30.0 g/L Trehalose, 34.0 g/L Soybean peptone, 2.0 g/L Ammonium citrate, 5.0 g/L Sodium acetate, 2.0 g/L Dipotassium hydrogen phosphate, 10% Carrot juice. The viable count of *L. fermentum* BLHN3 using the optimized medium was 6.05×10^9 CFU/mL. We determined the optimal fermentation process using this medium as follows: Initial culture pH was 6, and culture temperature was 37 °C, inoculum was 3%, and loading liquid was 30 mL. Based on these results, a study of semi-continuous high-density culture was carried out, preferably three centrifugation cultures. **Conclusion:** The optimization of medium and culture conditions can significantly improve the growth activity of *L. fermentum* BLHN3, which was significantly higher than that of MRS medium.

Keywords: *Lactobacillus fermentum* BLHN3; high density culture; medium; culture conditions

发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) 不仅可以改善食品风味^[1], 增加营养^[2], 还具有降胆固醇^[3]、抗病毒^[4]、提高免疫、促进肠道健康等益生特性^[5]。发酵乳杆菌代谢产物如胞外多糖 (EPS)、抗菌肽, 可以作为食品添加剂^[6]、食品防腐剂或抗生素的替代品等^[7], 在食品保鲜方面也有重要应用^[8]。

高密度培养是制备高效型发酵剂的前提, 培养基作为菌体的营养物质来源, 优化培养基是获得乳酸菌高密度培养的关键。胡渊等^[9]优化了干酪乳杆菌高密度培养的营养成分, 活菌数达到 2.81×10^{12} CFU/mL, 较在 MRS 培养基中培养提高了 8.21 倍。郑柳青^[10]对鼠李糖乳杆菌 LR-ZB1107-01 的生长条件进行了响应面优化, 其活菌数为 9.08×10^8 CFU/mL。Zhang 等^[11]通过 Box-Behnken 设计优化了培养基组分 9.5 g/L 葡萄糖、15.5 g/L 水解酪

基金项目: 湖南省农业科技创新资金项目 (编号: 2021CX30, 2022CX45); 湖南省重点领域研发计划 (编号: 2020NK2027)

作者简介: 左梦楠, 女, 湖南大学在读硕士研究生。

通信作者: 张菊华 (1971—), 女, 湖南大学研究生院隆平分院研究员, 硕士。E-mail: 498282528@qq.com
刘伟 (1983—), 男, 湖南大学研究生院隆平分院副研究员, 博士。E-mail: 175244822@qq.com

收稿日期: 2022-07-25 **改回日期:** 2022-11-10

蛋白和 7.0 mg/L 谷氨酸,保加利亚乳杆菌活菌数达 $(2.95 \pm 0.07) \times 10^9$ CFU/mL。Gutierrez-Sarmiento 等^[12]对植物乳杆菌 BAL-03-ITTG 的培养条件进行了响应面优化,活菌数为 7.10×10^9 CFU/mL。Wang 等^[13]对鼠李糖乳杆菌 LS-8 的培养基和发酵条件进行了优化,活菌数提高到 4.5×10^9 CFU/mL。综上,优化培养基成分和培养条件对提高发酵乳杆菌的密度具有重要意义。

发酵乳杆菌 BLHN3 是从自然发酵的剁辣椒中分离筛选出的抗氧化能力较强、产香性能优良的菌株,将其制备成直投式发酵剂应用于剁辣椒加工,有望提升产品发酵品质和生产效率^[14]。研究拟采用单因素和响应面优化试验,以 MRS 培养基为对照,探究发酵乳杆菌 BLHN3 菌株的最适培养基组分及生长条件,以为发酵乳杆菌 BLHN3 发酵剂的制备提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

发酵乳杆菌 BLHN3 (*Lactobacillus fermentum* BLHN3): -80 °C 甘油保藏;

MRS 肉汤培养基、MRS 琼脂培养基、大豆蛋白胨、细菌学蛋白胨、酵母提取粉、牛肉浸粉:生物试剂,广东环凯微生物科技有限公司;

乳清蛋白粉 WPC90:食品级,浙江一诺生物科技有限公司;

菊粉、结晶海藻糖:食品级,郑州明欣化工产品有限公司;

无水葡萄糖:食品级,西王药业有限公司;

蔗糖、乳糖:食品级,美国 Leprino Foods 公司;

可溶性淀粉、D-半乳糖:食品级,安徽山河药用辅料股份有限公司;

胡萝卜、平菇、土豆、包菜、西红柿、黄浆水:市售。

1.1.2 主要仪器设备

电子天平:AS 220.R2 型,苏州培科实验室仪器科技有限公司;

紫外可见分光光度计:T6 新世纪,北京普析通用仪器有限责任公司;

pH 计:雷磁 PHS-3E 型,上海仪电科学仪器股份有限公司;

超净工作台:SW-CJ-1C 型,苏州市金净净化设备科技有限公司;

灭菌锅:LDZM-80L-III 型,上海申安医疗器械厂;

冷冻离心机:Avant J-26XP 型,美国贝克曼库尔特有限公司;

生化培养箱:SPX-150 型,中仪国科(北京)科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株活化培养 将甘油管保藏的菌种按体积分数 3%接种于 10 mL 的 MRS 肉汤培养基中,37 °C 培养 24 h 作为第一代菌种,再培养 14 h 进行传代培养 2 次。

1.2.2 活菌数测定 参照 GB 4789.35—2016。

1.2.3 菌株生长曲线 将活化菌株以体积分数 3%接种量接种至 MRS 肉汤培养基中,37 °C 发酵静置培养 1 d,每隔 2 h 取样,测定 pH、OD_{600 nm} 值和活菌数。

1.2.4 发酵培养基单因素试验

(1) MRS 培养基组成:细菌学蛋白胨 10 g,牛肉浸粉 10 g,酵母提取粉 4 g,葡萄糖 20 g,柠檬酸铵 2 g,乙酸钠 5 g,磷酸氢二钾 2 g,硫酸镁 0.2 g,硫酸锰 0.05 g,吐温-80 1 mL,蒸馏水 1 000 mL。

(2) 增菌因子制备方法:胡萝卜、包菜、土豆、平菇、西红柿经预处理后加 5 倍水榨汁,与黄浆水分别经双层纱布过滤,冷藏备用。

(3) 发酵培养基碳源、氮源、缓冲盐及增菌因子营养成分的筛选:以 MRS 培养基为基础,分别以 20 g/L 海藻糖、蔗糖、乳糖、D-半乳糖、淀粉、菊粉代替 MRS 培养基中的碳源;在碳源优化的基础上,分别添加 24 g/L 的牛肉浸粉、细菌学蛋白胨、乳清蛋白粉、酵母提取粉、大豆蛋白胨代替 MRS 培养基中的氮源;在碳、氮源优化的基础上,分别添加 9 g/L 的柠檬酸铵/乙酸钠/磷酸氢二钾、乙酸钠、柠檬酸钠/磷酸氢二钾、磷酸氢二钾/乙酸钠/柠檬酸钠、磷酸二氢钾/磷酸二氢钠、磷酸氢二钾/磷酸二氢钾代替 MRS 培养基中的缓冲盐。静置培养 14 h 测定活菌数;在前期优化基础上,研究增菌因子(体积分数 10%)黄浆水、胡萝卜汁、包菜汁、土豆汁、平菇汁、西红柿汁对菌株生长的影响,保持其他组分不变,静置培养 14 h 后测定活菌数。

(4) 发酵培养基成分单因素优化:确定最佳碳源、氮源、缓冲盐及增菌因子后,分别调整不同组分的添加量,以 3%接种量静置培养 14 h,以活菌数为考核指标确定最佳添加量。

1.2.5 发酵培养基响应面优化试验 在单因素试验基础上,根据 Box-Behnken 试验设计原理,选择对发酵乳杆菌 BLHN3 活菌数影响显著的海藻糖、大豆蛋白胨、胡萝卜汁添加量为自变量,活菌数为响应值,优化发酵乳杆菌 BLHN3 的培养基。

1.2.6 培养条件优化

(1) 初始 pH:将活化菌株以 3%接种量接种至初始 pH 为 4.0,6.0,8.0,10.0,12.0 的优化培养基中,37 °C 静置培养 1 d,测定活菌数。

(2) 培养温度:将活化菌株以 3%接种量接种至优化培养基中,分别于 21,25,29,33,37,41,45,49 °C 静置培养 1 d,测定活菌数。

(3) 接种量:将活化菌株以 1%, 2%, 3%, 4%, 5% 接种量接种至优化培养基中, 37 °C 静置培养 1 d, 测定活菌数。

(4) 装液量:将活化菌株以最佳接种量分别接种至装有 15, 30, 45, 60, 75, 90 mL 培养基的三角瓶中, 37 °C 静置培养 1 d, 测定活菌数。

1.2.7 半连续高密度培养 将活化菌株以 3% 接种量接种至优化培养基中, 37 °C 静置培养 14 h, 3 800 r/min 离心 10 min^[15], 再用等量新鲜培养基替换原发酵液, 继续培养 2.5~3.0 h, 测定活菌数, 按式(1)计算比生长速率。

$$\mu = (\ln y_2 - \ln y_1) / (t_2 - t_1), \quad (1)$$

式中:

μ ——比生长速率, h^{-1} ;

y_1, y_2 —— t_1, t_2 时的乳酸菌量, CFU;

t_1, t_2 ——时间, h。

1.3 数据处理

每组试验平行 3 次, 采用 Origin 软件作图。利用 IBM SPSS Statistics 25 软件进行单因素方差分析, Duncan 法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 发酵乳杆菌生长曲线

由图 1 可知, 发酵乳杆菌的生长曲线和 $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ 值曲线变化基本一致。0~2 h 为发酵乳杆菌 BLHN3 生长停滞期, 此时期活菌数变化相对较小; 2~14 h 为发酵乳杆菌 BLHN3 对数生长期, 此时期营养物质丰富、细胞生长旺盛; 14~18 h 为发酵乳杆菌 BLHN3 生长稳定期, 此时期活菌数基本稳定, 细胞死亡数与增殖数趋于平衡; 18 h 后为生长衰亡期, 增殖速率变慢, 死亡菌数增多, 活菌数呈下降趋势。从 pH 变化曲线可知, pH 在 2~8 h 下降迅速, 8 h 后基本稳定, 是因为乳酸菌发酵过程不断产生乳酸, 但过多的乳酸会抑制乳酸菌生长, 导致产酸减少。

2.2 发酵培养基单因素试验

2.2.1 最佳碳源 由图 2(a)可知, 相同添加量下, 不同种

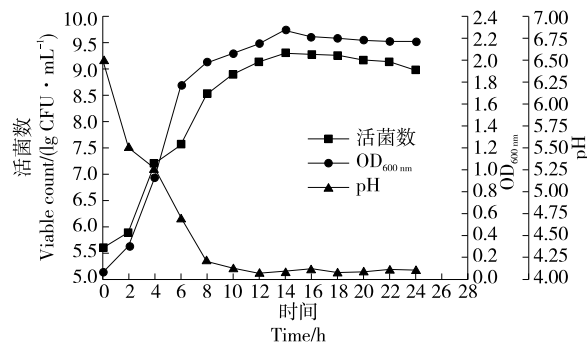


图 1 发酵乳杆菌 BLHN3 生长曲线

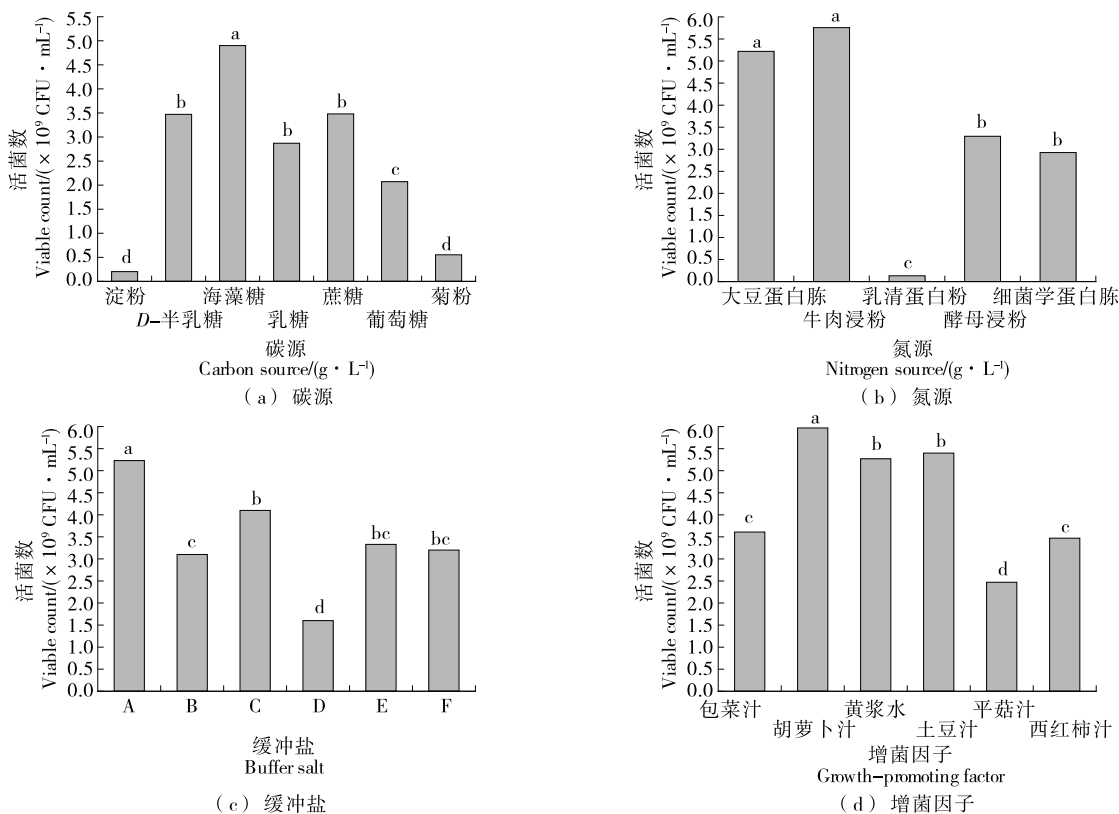
Figure 1 Growth curve of *L. fermentum* BLHN3

类糖源对发酵乳杆菌生长的影响不同。海藻糖对发酵乳杆菌 BLHN3 的促生长作用最佳, 活菌数为 4.90×10^9 CFU/mL; 乳糖、D-半乳糖、蔗糖的促生长效果差异不显著, 活菌数为 3×10^9 CFU/mL 左右; 葡萄糖中的活菌数为 2.07×10^9 CFU/mL; 淀粉和菊粉的促生长效果较差, 活菌数分别为 2.00×10^8 , 5.50×10^8 CFU/mL。不同乳酸菌代谢糖类及代谢途径有差别, 葡萄糖是异型发酵乳杆菌的最佳碳源^[16], 唾液乳杆菌 BBE 09-18 在麦芽糖中生长效果最好, 活菌数可达 1.88×10^9 CFU/mL^[17]; 黄秀敏等^[18]研究发现乳杆菌对单糖利用率较高, 可能是乳杆菌对单糖的代谢能力比较强。综上, 不同乳酸菌对糖类的偏好性不一样, 因此选择海藻糖作为发酵乳杆菌 BLHN3 最佳碳源。

2.2.2 最佳氮源 由图 2(b)可知, 牛肉浸粉和大豆蛋白胨对发酵乳杆菌的促生长效果最好, 二者无显著差异, 细菌学蛋白胨和酵母浸粉次之, 乳清蛋白粉的效果最差。孙媛媛等^[19]研究表明, 酵母粉复合大分子肽的蛋白胨是发酵乳杆菌的最适氮源。氮源是乳酸菌生长中的关键成分, 且在乳酸菌规模化应用中的成本高, 考虑到以牛肉浸粉作氮源的成本较高, 因此选择价格低廉、促生长效果好的大豆蛋白胨作为发酵乳杆菌 BLHN3 的氮源, 活菌数可达 5.23×10^9 CFU/mL。

2.2.3 最佳缓冲盐 由图 2(c)可知, 当缓冲液为柠檬酸铵/乙酸钠/磷酸氢二钾时, 发酵液活菌数最高, 效果最显著, 其次是柠檬酸钠/磷酸氢二钾, 乙酸钠、磷酸二氢钾/磷酸氢二钠、磷酸氢二钾/磷酸二氢钾三者无显著性差异, 而磷酸氢二钾/乙酸钠/柠檬酸钠促生长效果最差。常用的缓冲盐体系有柠檬酸盐、磷酸盐和乙酸盐等, 多种缓冲盐组分效果更佳, 与 Chen 等^[20]的结论一致。柠檬酸盐可以增强乳酸菌细胞 EMP 途径中碳通量和 ATP 的产生, 柠檬酸铵还可作为乳酸菌生长的无机氮源^[21-22]。因此, 选择柠檬酸铵/乙酸钠/磷酸氢二钾为发酵乳杆菌 BLHN3 最佳缓冲盐。

2.2.4 最佳增菌因子 由图 2(d)可知, 相同体积分数下, 胡萝卜汁的促生长效果最显著, 其次是黄浆水和土豆汁。胡萝卜汁营养丰富, 含有大量多糖、蛋白质、 β -胡萝卜素, 可作为促生长因子提高乳酸菌菌群丰度^[23]。Kun 等^[24]研究发现双歧杆菌在纯胡萝卜汁上生长效果良好。大豆黄浆水是豆腐生产过程中的副产物, 富含蛋白质、糖、大豆异黄酮、皂苷等多种成分, 是适宜微生物生长的优良基质^[25]。土豆中含有淀粉、膳食纤维、钙、磷、铁等, 程方方^[26]研究表明肠膜明串珠菌 C27 最适增菌因子为土豆汁。在以相同体积分数的平菇汁、西红柿汁和包菜汁为增菌因子的试验中, 发酵乳杆菌生长效果较差, 可能是因为平菇汁成分不适合发酵乳杆菌的生长, 包菜汁中营养物质较单一、西红柿汁 pH 较低等阻碍其生长。尤倩倩^[27]



A~F 分别为柠檬酸铵/乙酸钠/磷酸氢二钾、乙酸钠、柠檬酸钠/磷酸氢二钾、磷酸氢二钾/乙酸钠/柠檬酸钠、磷酸二氢钾/磷酸氢二钠、磷酸氢二钾/磷酸二氢钾;字母不同表示差异显著($P < 0.05$)

图 2 菌株在不同碳源、氮源、缓冲盐、增菌因子下的活菌数

Figure 2 Viable counts in different carbon source, nitrogen source, buffer salt, and growth-promoting factor

发现平菇汁、西红柿汁对于酪乳杆菌的促生长效果不显著。吴祖芳等^[28]研究表明植物乳杆菌 H17 在西红柿汁和 Na_2CO_3 溶液共同培养下菌体量有显著提升。因此,选择胡萝卜汁作为发酵乳杆菌 BLHN3 的最佳增菌因子。

2.2.5 营养成分添加量 由图 3(a)可知,发酵乳杆菌 BLHN3 活菌数随海藻糖添加量的增加呈先上升后下降的趋势,当海藻糖添加量为 30 g/L 时,发酵液活菌数达最大值;当海藻糖添加量 > 30 g/L 时,活菌数下降,可能是初始底物糖浓度过高抑制了乳酸菌快速生长^[29]。由图 3(b)可知,发酵乳杆菌 BLHN3 活菌数随大豆蛋白胨添加量的增加逐渐增加,当大豆蛋白胨含量 > 34 g/L 时,活菌数保持稳定,表明乳酸菌可通过分解利用外源蛋白质高效增殖^[30]。由图 3(c)可知,发酵乳杆菌 BLHN3 活菌数随缓冲盐添加量的增加先上升后下降,当缓冲盐添加量为 9 g/L 时活菌数达最大值,与王建等^[31]的结论一致。由图 3(d)可知,发酵乳杆菌 BLHN3 活菌数随胡萝卜汁添加量的增加先上升后趋于平缓,当胡萝卜汁添加量为 10% 时活菌数最高。

2.3 发酵培养基响应面优化试验

2.3.1 响应面试验设计与结果 基于单因素试验结果,

选择对发酵乳杆菌 BLHN3 影响显著的碳源海藻糖添加量、氮源大豆蛋白胨添加量以及胡萝卜汁添加量为自变量,以活菌数为响应值,设计三因素三水平响应面试验,试验因素与水平设计见表 1,试验方案及结果见表 2。

采用 Design-Expert 8.0.6 软件对试验数据进行二次响应面回归分析,得到发酵乳杆菌活菌数与各因变量的模拟方程:

$$Y = + 5.75 - 0.14A + 1.61B - 0.32C + 0.53AB - 0.060AC + 0.37BC - 0.99A^2 - 0.72B^2 - 0.68C^2 \quad (2)$$

2.3.2 方差分析结果 由表 3 可知,模型 $P < 0.01$,极显著;决定系数 $R^2 = 0.9910$,模型调整系数 (R^2_{adj}) 为 0.9794,表明该回归模型的拟合较好,实际值与预测值接近;失拟项 P 值为 0.4858,不显著,表明该方程对试验拟合度好、误差小,可用该回归方程代替真实点对试验结果进行分析和预测,因此该模型适于发酵乳杆菌 BLHN3 高密度培养的培养基优化。由 F 值可知,各因素对发酵乳杆菌 BLHN3 高密度培养活菌数的影响程度依次为大豆蛋白胨添加量(B) $>$ 胡萝卜汁添加量(C) $>$ 海藻糖添加量(A)。其中一次项 B,二次项 A^2 、 B^2 和 C^2 对活菌数影响极显著 ($P < 0.01$),一次项 C,交互项 AB 和 BC 对活菌数影

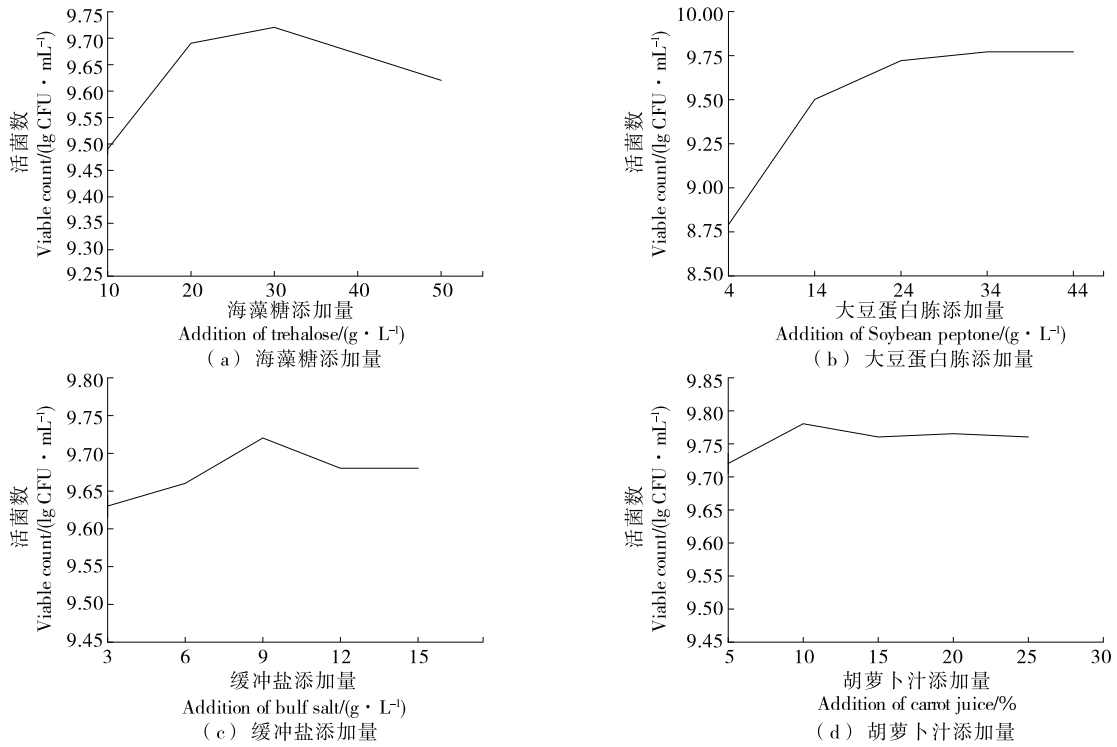


图3 菌株在不同培养基成分添加量下的活菌数

Figure 3 Viable counts in different added medium content

表1 响应面因素水平

Table 1 Factors and levels of response surface

水平	A 海藻糖添加量/ (g · L ⁻¹)	B 大豆蛋白胨添加量/ (g · L ⁻¹)	C 胡萝卜汁 添加量/%
-1	10	14	5
0	20	24	10
1	30	34	15

响显著($P < 0.05$)。

2.3.3 响应面分析 由图4可知,当胡萝卜汁添加量和大豆蛋白胨添加量不变时,随着海藻糖添加量的升高,发酵液活菌数先升高后下降。当胡萝卜汁添加量和海藻糖添加量不变时,随着大豆蛋白胨添加量的增加,发酵液活菌数逐渐升高。当海藻糖添加量和大豆蛋白胨添加量不变时,随着胡萝卜汁添加量的增加,发酵液活菌数先升高后趋于平缓。根据等高线图可知,AB、BC的等高线呈椭圆形,说明AB、BC的交互作用显著;AC的等高线接近圆形,说明AC的交互作用不显著。

通过回归模型预测高密度培养的培养基最优组成为海藻糖 30.0 g/L、大豆蛋白胨 34.0 g/L、胡萝卜汁 9.96%,活菌数预测值为 6.05×10^9 CFU/mL。为便于操作,将胡萝卜汁修正为 10%,并进行验证实验,发酵乳杆菌高密度培养的活菌数可达 $(6.05 \pm 0.05) \times 10^9$ CFU/mL,比 MRS 培养基的活菌数提高了 2.91 倍,证明所建模型的适用性。

表2 响应面试验设计及结果

Table 2 Response surface experiment design and results

试验号	A	B	C	Y 活菌数/ ($\times 10^9$ CFU · mL ⁻¹)
1	1	-1	0	1.93
2	0	0	0	5.90
3	0	1	-1	6.04
4	0	0	0	5.77
5	0	0	0	5.60
6	-1	1	0	5.10
7	1	1	0	6.05
8	0	0	0	5.50
9	1	0	1	3.53
10	1	0	-1	4.20
11	0	-1	-1	3.40
12	-1	0	1	4.10
13	0	0	0	6.00
14	-1	-1	0	3.10
15	-1	0	-1	4.53
16	0	1	1	6.05
17	0	-1	1	1.93

表 3 二次响应面回归模型方差分析[†]

Table 3 Variance analysis of quadratic response surface regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	32.55	9	3.62	85.68	<0.000 1	**
A	0.16	1	0.16	3.71	0.095 3	
B	20.74	1	20.74	491.19	<0.000 1	**
C	0.82	1	0.82	19.40	0.003 1	*
AB	1.12	1	1.12	26.61	0.001 3	*
AC	0.01	1	0.01	0.34	0.577 5	
BC	0.55	1	0.55	12.97	0.008 7	*
A ²	4.10	1	4.10	97.16	<0.000 1	**
B ²	2.19	1	2.19	51.99	0.000 2	**
C ²	1.93	1	1.93	45.71	0.000 3	**
残差	0.30	7	0.04			
失拟	0.13	3	0.04	0.98	0.485 8	
误差	0.17	4	0.04			
总和	32.85	16				

[†] ** 差异极显著 ($P < 0.01$), * 差异显著 ($P < 0.05$); $R^2 = 0.991 0, R_{adj}^2 = 0.979 4$.

2.4 培养条件优化

2.4.1 初始 pH 由图 5(a)可知,当 pH 为 6 时,发酵乳杆菌活菌数最高,表明此时发酵乳杆菌的生长效果最好,与发酵乳杆菌 LF-8001 最适初始 pH 一致^[32]。当 pH > 6 时,发酵乳杆菌活菌数开始下降;当 pH > 8 时,活菌数急

速下降;当 pH 为 12 时,活菌数仅 7.33 lg(CFU/mL)。不同微生物对 pH 有一定的耐受性,过酸或过碱的环境均不利于乳酸菌生长^[33]。因此,选择 pH 6 作为菌体生长最佳初始 pH。

2.4.2 培养温度 由图 5(b)可知,当培养温度 < 37 °C 时,随着培养温度的升高,活菌数逐渐增加,表明发酵乳杆菌随培养温度的升高,生长得越快,可能是因为随培养温度的升高,细胞流动性在一定范围内得到提升,物质运输能力进一步加强,有利于乳酸菌细胞生长代谢等^[34];当培养温度 > 37 °C 时,随培养温度的升高,活菌数快速降低,49 °C 时活菌数降至 7.22 lg(CFU/mL)。培养温度过高导致乳酸菌的细胞膜流动性、蛋白质活力和酶活性受损^[35],发酵乳杆菌因失活而生长受到抑制,活菌数降低;培养温度为 37 °C 时活菌数最高,表明此温度是发酵乳杆菌较适宜的培养温度,与对鼠李糖乳杆菌 grx10^[36]、发酵乳杆菌 IMAU 10129^[37] 的研究结果一致。因此,选择 37 °C 作为菌体最佳生长温度。

2.4.3 接种量 由图 5(c)可知,当接种量 < 3% 时,随着接种量的增加,发酵液活菌数上升;当接种量 > 3% 时,随着接种量的增加,发酵液活菌数不再增加,反而越来越低。因此,选择 3% 作为菌体最佳接种量。

2.4.4 装液量 由图 5(d)可知,当装液量为 30 mL 时,发酵乳杆菌活菌数最高,是因为发酵乳杆菌在适量氧气存在下进行有氧呼吸,加快了能量代谢水平,促进自身生长繁殖^[38]。当装液量为 15 mL 时,发酵液活菌数最低,与 Siciliano 等^[39] 研究一致,表明过高的溶氧量对细胞存

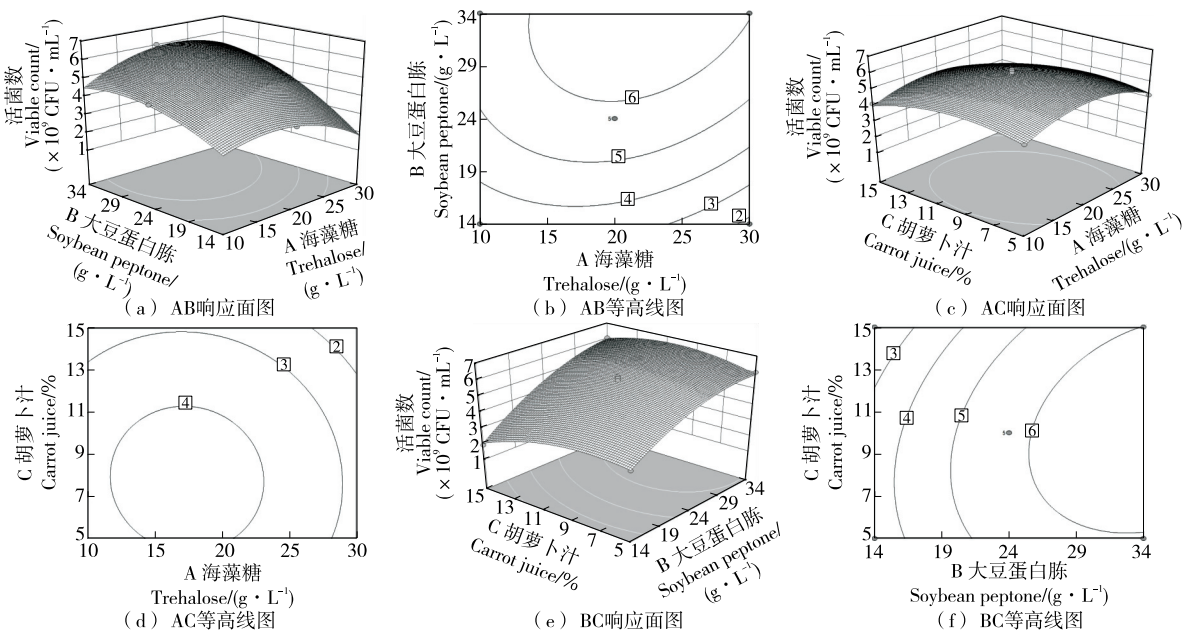
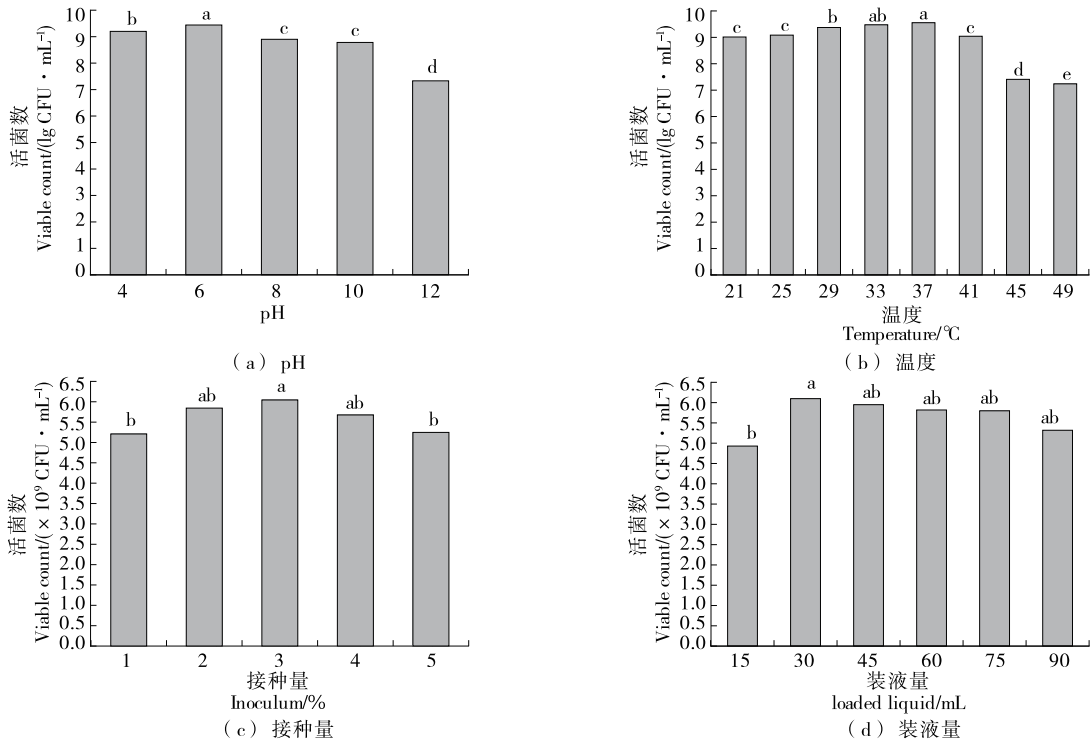


图 4 各因素交互作用对活菌数的影响

Figure 4 Effects of the interaction of each factor on the number of viable bacteria



字母不同表示差异显著($P < 0.05$)

图 5 不同培养条件下的活菌数

Figure 5 Viable counts in different culture conditions

活和生长具有负面作用。当装液量 > 30 mL 时,随着装液量的增加,溶氧量越少,发酵液活菌数逐渐下降,但变化不显著。因此,选择 30 mL 作为菌体最佳装液量,即培养体积分数约为 1/5。

2.5 半连续高密度培养

由图 6 可知,在优化培养基的基础上进行半连续高密度培养工艺的探索,将培养至对数后期的发酵液离心,补充等量新鲜培养基换液培养后可明显提高发酵液活菌数,离心前活菌数为 $9.77 \text{ lg}(\text{CFU}/\text{mL})$,选择 14 h 进行离心更换新鲜培养基后培养 2.5~3.0 h,相同条件下重复培

养多次,发酵液活菌数持续增加,最高可达 $10.08 \text{ lg}(\text{CFU}/\text{mL})$ 。乳酸菌多次离心换液后比生长速率变化一致,均呈下降趋势,表明随着菌体浓度的增加,抑制了菌体的迅速生长。发酵液活菌数在第 4 次离心培养后开始下降,说明随着培养时间的延长,大部分菌体已进入衰亡期,半连续高密度培养重复进行 2~3 次为最佳,与于修鑑^[40]的结果一致。此时细胞仍保持增殖活力,乳酸菌活菌数仍可继续上升,之后活菌数开始下降,细胞活力显著降低。因此,离心培养 2~3 次可作为半连续培养收获菌体最佳批次,活菌数可达 $10 \text{ lg}(\text{CFU}/\text{mL})$,较离心前提高一个数量级。

3 结论

试验表明,以 MRS 培养基为基础,发酵乳杆菌 BLHN3 在海藻糖 30.0 g/L、大豆蛋白胨 34.0 g/L、胡萝卜汁体积分数 10%、柠檬酸铵/乙酸钠/磷酸氢二钾缓冲盐类物质下的活菌数最高,为 $6.05 \times 10^9 \text{ CFU}/\text{mL}$,是 MRS 培养基的 2.91 倍;发酵乳杆菌 BLHN3 的最佳培养初始 pH 为 6、培养温度为 37 °C、接种量为 3% (体积分数)、装液量为 30 mL (即培养体积分数 1/5);并对发酵乳杆菌进行半连续高密度培养,较离心前培养活菌数显著提高($P < 0.05$),表明发酵乳杆菌 BLHN3 经高密度培养,有望成为具有应用潜力的发酵剂。后续将深入探究其冷冻干燥特性,制备直投式发酵剂,以便其应用于剁辣椒的

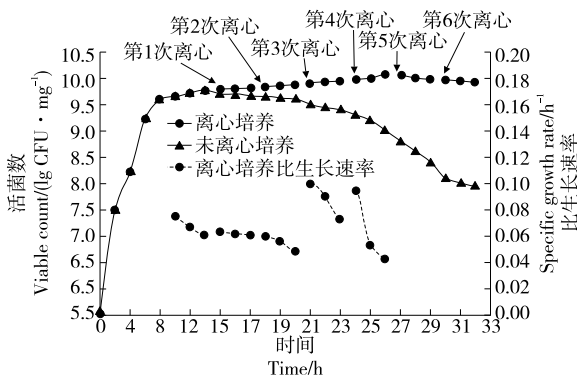


图 6 发酵乳杆菌 BLHN3 半连续高密度培养

Figure 6 Semi-continuous high density culture of *L. fermentum* BLHN3

工业化生产。

参考文献

- [1] FALASCONI I, FONTANA A, PATRONE V, et al. Genome-assisted characterization of *Lactobacillus fermentum*, *Weissella cibaria*, and *Weissella confusa* strains isolated from sorghum as starters for sourdough fermentation[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(9): E1 388.
- [2] YANG X, ZHOU X Y, ZHANG M J, et al. Metabolism analysis for enhanced nutritional profile of chestnuts subjected to anerobic solid-state fermentation by probiotic lactic acid bacteria[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2020, 44(3): 1-11.
- [3] YANG D T, LYU W T, HU Z Y, et al. Probiotic effects of *Lactobacillus fermentum* ZJUIDS06 and *Lactobacillus plantarum* ZYo8 on hypercholesteremic golden hamsters [J]. *Frontiers in Nutrition*, 2021, 8: 705763.
- [4] ROMANENS E, PEDAN V, MEILE L, et al. Influence of two anti-fungal *Lactobacillus fermentum*-*Saccharomyces cerevisiae* co-cultures on cocoa bean fermentation and final bean quality[J]. *PLoS One*, 2020, 15(10): e0239365.
- [5] PARK M R, SHIN M, MUN D, et al. Probiotic *Lactobacillus fermentum* strain JDFM216 improves cognitive behavior and modulates immune response with gut microbiota [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 21701.
- [6] WANG K, NIU M M, SONG D W, et al. Preparation, partial characterization and biological activity of exopolysaccharides produced from *Lactobacillus fermentum* S1 [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2020, 129(2): 206-214.
- [7] RASHEED H A, TUOHETI T, ZHANG Y Z, et al. Purification and partial characterization of a novel bacteriocin produced by bacteriocinogenic *Lactobacillus fermentum* BZ532 isolated from Chinese fermented cereal beverage (Bozai)[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2020, 124: 109113.
- [8] NAGHMOUCHI K, BELGUESMIA Y, BENDALI F, et al. *Lactobacillus fermentum*: A bacterial species with potential for food preservation and biomedical applications[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 60(20): 3 387-3 399.
- [9] 胡渊, 刘成国, 黄茜, 等. 干酪乳杆菌增殖培养基的优化研究[J]. *食品与机械*, 2014, 30(2): 20-24, 31.
- HU Y, LIU C G, HUANG X, et al. Study on optimization of proliferation medium for *Lactobacillus casei*[J]. *Food & Machinery*, 2014, 30(2): 20-24, 31.
- [10] 郑柳青. 鼠李糖乳杆菌 LR-ZB1107-01 的益生特性及其高密度培养的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2020: 62.
- ZHENG L Q. Study on properties of *Lactobacillus Rhamnosus* LR-ZB1107-01 and its high density culture[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2020: 62.
- [11] ZHANG B, SHU G, BAO C, et al. Optimization of culture medium for *Lactobacillus bulgaricus* using Box-Behnken design[J]. *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology*, 2017, 21(1): 3-10.
- [12] GUTIERREZ-SARMIENTO L W, VENTURA-GANSECO L, GUTIERREZ-MICELI F A, et al. Optimization of biomass production, lactic acid, and gastrointestinal simulation survival of *Lactobacillus plantarum* BAL-03-ITTG cultured in stirred tank bioreactor[J]. *Agrociencia*, 2020, 54(2): 147-162.
- [13] WANG T, LU Y Y, YAN H, et al. Fermentation optimization and kinetic model for high cell density culture of a probiotic microorganism: *Lactobacillus rhamnosus* LS-8[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2020, 43(3): 515-528.
- [14] KWON Y W, BAE J H, KIM S A, et al. Development of freeze-thaw tolerant *Lactobacillus rhamnosus* GG by adaptive laboratory evolution[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2 781.
- [15] TENG D, KAWAI K, MIKAJIRI S, et al. Stabilization of freeze-dried *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* JCM 8130T with the addition of disaccharides, polymers, and their mixtures [J]. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2017, 81 (4): 768-773.
- [16] 孙媛媛. 异型发酵乳杆菌高密度培养及提高其冻干存活率的方法[D]. 无锡: 江南大学, 2021: 16.
- SUN Y Y. High-density cultivation of heterofermentive *Lactobacillus* and methods to improve the freeze-drying survival rate[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021: 16.
- [17] DONG Z X, GU L, ZHANG J, et al. Optimisation for high cell density cultivation of *Lactobacillus salivarius* BBE 09-18 with response surface methodology [J]. *International Dairy Journal*, 2014, 34(2): 230-236.
- [18] 黄秀敏, 鲍志宁, 邓钧尹, 等. 鼠李糖乳杆菌 LR-D 中试高密度培养中碳源及工艺优化[C]// “健康中国 2030 · 健康食品的安全与创新”学术研讨会暨 2018 年广东省食品学会年会论文集. 广州: 广东省食品学会, 2018: 60-64.
- HUANG X M, BAO Z N, DENG J Y, et al. Optimization of carbon source and process in high cell density culture of *Lactobacillus Rhamnosus* LR-D[C]// Health China 2030 academic Symposium on safety and Innovation of Healthy Food & 2018 Guangdong Food Association Annual Conference Proceedings. Guangzhou: Guangdong Food Association, 2018: 60-64.
- [19] 孙媛媛, 崔树茂, 唐鑫, 等. 发酵乳杆菌的生长限制性因素分析及高密度培养工艺优化[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(6): 1-10.
- SUN Y Y, CUI S M, TANG X, et al. Growth limiting factors of *Lactobacillus fermentum* and optimization of its high-density cultivation[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(6): 1-10.
- [20] CHEN L, GU Q, ZHOU T. Statistical optimization of novel medium to maximize the yield of exopolysaccharide from *Lactocaseibacillus rhamnosus* ZFM216 and its immunomodulatory activity[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 924495.
- [21] GE X Y, QIAN H, ZHANG W G. Enhancement of L-lactic acid production in *Lactobacillus casei* from Jerusalem Artichoke tubers

- by kinetic optimization and citrate metabolism [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 20(1): 101-109.
- [22] GIVRYVY S, DUCHIRON F. Optimization of culture medium and growth conditions for production of L-arabinose isomerase and D-xylose isomerase by *Lactobacillus bifementans* [J]. *Microbiology*, 2008, 77(3): 281-287.
- [23] SHARMA V, MISHRA H N, et al. Unstructured kinetic modeling of growth and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* NCDC 414 during fermentation of vegetable juices[J]. *LWT-Food Science & Technology*, 2014, 59(2): 1 123-1 128.
- [24] KUN S, REZESSY-SZABÓ J M, NGUYEN Q D, et al. Changes of microbial population and some components in carrot juice during fermentation with selected *Bifidobacterium* strains [J]. *Process Biochemistry*, 2008, 43(8): 816-821.
- [25] 刘力. 豆腐酸浆中乳酸菌的分离鉴定, 代谢研究及高密度培养[D]. 广州: 华南理工大学, 2015: 25.
- LIU L. Research on isolation, identification, metabolism and high cell density cultivation of *Lactobacillus* bacterias from tofu acid whey[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2015: 25.
- [26] 程方方. 基于乳酸菌高密度培养发酵辣椒酱的研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2019: 45.
- CHENG F F. Study on fermented chili sauce based on high density culture of lactic acid bacteria[D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2019: 45.
- [27] 尤倩倩. 利用甘蔗糖蜜高密度培养干酪乳杆菌 LT-L614 及其制剂的研究[D]. 南宁: 广西大学, 2017: 21.
- YOU Q Q. *Lactobacillus casei* LT-L614 was cultured at a high-density using cane molasses and its preparation research [D]. Nanning: Guangxi University, 2017: 21.
- [28] 吴祖芳, 翁佩芳, 楼佳瑜. 乳酸菌的高密度培养及发酵剂保藏技术的初步研究[J]. *食品与发酵工业*, 2009, 35(10): 5-9.
- WU Z F, WENG P F, LOU J Y. Study on high cell density culture of lactic acid bacteria and preservation technology of fermented starter[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2009, 35(10): 5-9.
- [29] 孙研. 凝结芽孢杆菌恒化培养及其在混合碳源中的代谢特性研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2020: 52.
- SUN Y. Study on metabolic characteristics of bacillus coagulans in chemostat culture and mixed carbon sources [D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2020: 52.
- [30] HEBERT E M, MAMONE G, PICARIELLO G, et al. Characterization of the pattern of α_{s1} - and β -casein breakdown and release of a bioactive peptide by a cell envelope proteinase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581 [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2008, 74(12): 3 682-3 689.
- [31] 王建, 于佳弘, 罗红霞, 等. 复合乳酸菌最佳培养基成分的优化[J]. *北京农业职业学院学报*, 2016, 30(1): 26-30.
- WANG J, YU J H, LUO H X, et al. Optimization of optimal medium composition for compound lactic acid bacteria[J]. *Journal of Beijing Vocational College of Agriculture*, 2016, 30(1): 26-30.
- [32] 聂黔丽, 王修俊, 张二康, 等. 发酵乳杆菌 LF-8001 高密度细胞培养的研究[J]. *食品与发酵科技*, 2021, 57(2): 73-76, 90.
- NIE Q L, WANG X J, ZHANG E K, et al. High cell density culture of *Lactobacillus fermentum* LF-8001 [J]. *Food and Fermentation Science & Technology*, 2021, 57(2): 73-76, 90.
- [33] HERNANDEZ A, LARSSON C U, SAWICKI R, et al. Impact of the fermentation parameters pH and temperature on stress resilience of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 [J]. *Amb Express*, 2019, 9(1): 66.
- [34] CEBRIÁN G, CONDÓN S, MAÑAS P. Heat resistance, membrane fluidity and sublethal damage in *Staphylococcus aureus* cells grown at different temperatures [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2019, 289: 49-56.
- [35] 徐礼云. 高温驯化瑞士乳杆菌代谢补偿的变化研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2021: 43.
- XU L Y. Study on the effect of high temperature stress on metabolism compensation of *Lactobacillus helveticus* [D]. Nanchang: Nanchang University, 2021: 43.
- [36] 刘小琳. 具有降血脂功能鼠李糖乳杆菌 grx10 的发酵性能及代谢特征[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2021: 23.
- LIU X L. Fermentation and metabolic characteristics of *Lactobacillus Rhamnosus* grx10 with hypolipidemic property [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2021: 23.
- [37] 高志敏. *Lactobacillus fermentum* IMAU 10129 高密度发酵工艺研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2017: 30.
- GAO Z M. Study on high cell density culture of *Lactobacillus fermentum* IMAU 10129 [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2017: 30.
- [38] RICCIARDI A, ZOTTA T, IANNIELLO R G, et al. Effect of Respiratory growth on the metabolite production and stress robustness of *Lactobacillus casei* N87 cultivated in cheese whey permeate medium [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 851.
- [39] SICILIANO R A, PANNENA G, LIPPOLIS R, et al. Impact of aerobic and respirative life-style on *Lactobacillus casei* N87 proteome [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2019, 298: 51-62.
- [40] 于修鑑. 乳酸菌高密度培养及浓缩型发酵剂研究[D]. 南京: 南京工业大学, 2004: 32.
- YU X J. Study on high-density cultivation and concentrated ctarters of lactic acid bacteria [D]. Nanjing: Nanjing University of Technology, 2004: 32.