发酵乳杆菌 SS-31 培养基及发酵条件的优化

秦雅莉[1]，于福田[1]，赵笑颍[1]，沈圆圆[1]，董诗瑜[1]，刘小玲[*1,2]
（1. 广西大学 轻工与食品工程学院，广西 南宁 530004；2. 广西水牛乳工程技术研究中心，广西 南宁 530004）

摘要：对分离自广西柳州酸笋发酵液中具有优良益生特性的发酵乳杆菌 SS-31 进行增殖培养基优化，并对其高密度发酵条件进行探索。通过单因素实验、响应面优化等方法，以发酵乳杆菌 SS-31 的活菌数为主要参考指标，对其发酵增殖培养基成分和培养条件进行了优化探索。最终确定发酵乳杆菌 SS-31 最优培养基构成为：麦芽糖 16.20 g/L、酵母浸粉 20.16 g/L、磷酸氢二钾 9.33 g/L、硫酸锰 0.50 g/L、硫酸镁 1.00 g/L、吐温 80 1.00 g/L；最佳发酵条件为：SS-31 接种体积分数为 3%、初始 pH 为 6.8，期间添加氨水保持发酵液 pH 稳定，在 37 ℃下培养 24 h 后，活菌数可达到 1.19×10^{10} CFU/mL，为其工业化生产奠定基础。

关键词：发酵乳杆菌 SS-31；增殖培养基；发酵条件
中图分类号：Q 815　**文章编号：**1673-1689(2022)12-0048-10　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.12.006

Optimization of *Lactobacillus fermentum* SS-31 Culture Medium and Fermentation Conditions

QIN Yali[1]，*YU Futian*[1]，*ZHAO Xiaoying*[1]，*SHEN Yuanyuan*[1]，*DONG Shiyu*[1]，*LIU Xiaoling*[*1,2]
(1. College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China; 2. Guangxi Buffalo Milk Engineering and Technology Center, Nanning 530004, China)

Abstract: The proliferation culture medium of *Lactobacillus fermentum* SS-31 which was isolated from the fermentation broth of sour bamboo shoots in Liuzhou, Guangxi, with excellent probiotic properties, was optimized and its high-density fermentation conditions were explored. The composition of fermentation and proliferation medium as well as the culture conditions were optimized using the viable bacteria number of *Lactobacillus fermentum* SS-31 as the main reference index through single factor experiment, response surface optimization and other experimental methods. The final composition of *Lactobacillus fermentum* SS-31 medium was optimized with maltose of 16.20 g/L, yeast extract of 20.16 g/L, dipotassium hydrogen phosphate of 9.33 g/L, manganese sulfate of 0.50 g/L, magnesium sulfate of 1.00 g/L, and Tween of 1.00 g/L. The optimal fermentation conditions were set as 3% of inoculum size of SS-31, pH 6.8 of initial pH value with ammonia added to maintain the pH of fermentation broth, under which the viable count of *Lactobacillus fermentum* SS-31 reached 1.19×10^{10} CFU/mL cultured at 37 ℃ for 24 h, laying a foundation for its industrial production.

Keywords: *Lactobacillus fermentum* SS-31, proliferation culture medium, fermentation conditions

收稿日期：2022-06-23
基金项目：广西科技重大专项(桂科 AA20302019-7)；巴马县人才科技专项(巴人科 20210047)。
* **通信作者：**刘小玲(1972—)，女，博士，教授，博士研究生导师，主要从事食品生物技术方面的研究。E-mail：1106133912@qq.com

发酵乳杆菌（*Lactobacillus fermentum*）是常见的乳酸菌之一，广泛存在于各类发酵制品中，是异型发酵乳酸菌[1]。美国食品和药物管理局和欧洲食品安全局均将发酵乳杆菌评估为食品用微生物菌种，并且我国也将其列为《可用于食品的菌种名单》。近年来，随着研究深入，发酵乳杆菌的功能和益生特性不断被人们所证实。众多研究结果表明，发酵乳杆菌在胃肠道中具有高存活率[2]、对病原体的抗菌活性[3]、调节肠道菌群[4]以及抗氧化能力[5]，此外还具有免疫调节能力[6]。

乳酸菌广泛存在于自然界，例如食品、植物、动物或人体肠道等多种生活环境中，是潜在的益生菌。作者所在课题组致力于挖掘柳州酸笋中乳酸菌资源，从酸笋中筛选得到一株具有较强降低 RAW264.7 细胞分泌 NO 能力的发酵乳杆菌 SS-31[7]。该菌株具有较强耐酸能力、耐 1 g/L 牛胆盐、耐人工胃肠液以及高黏附性等特性；此外还可以显著下调 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中炎症因子 IL-1β、IL-6 的含量。综上，该菌株具有优良生理特性和抗炎活性。而乳酸菌要在体内达到一定数量时，才能产生一定的益生效果。世界卫生组织规定，益生菌食品的益生菌活菌总数须超过 1×10^7 CFU/g 才可以有益生作用。但目前乳酸菌的较低发酵水平限制了其扩大应用。实现菌株低成本、高效率培养的核心是优化发酵培养基。乳酸菌的生长繁殖需要碳源、氮源、无机盐、营养因子等营养物质，并且生长过程中需要不断与外界进行物质、能量交换，受到外界环境（温度、pH 等）影响。与普通培养相比，低成本、高效率的培养既可以更快速提高菌体密度，缩短生产周期，又能降低生产成本[8-9]。吕秀明等通过单因素结合响应面实验和流加补料培养优化长双歧杆菌 L80 培养基，得到活菌数为 1.21×10^{10} CFU/mL[10]。Magdalena 等通过响应面法优化鼠李糖乳杆菌培养基，优化后菌体密度达到 5 g/L，是相同条件下 MRS 培养基中菌体密度（1.9 g/L）的 2.63 倍[11]。

以发酵乳杆菌 SS-31 为研究对象，以活菌数为指标，通过单因素、响应面实验确定最佳培养基成分和含量。然后对其发酵培养条件（温度、接种体积分数、pH）进行优化，最后将优化得到的最佳条件应用于 15 L 发酵罐，筛选中和剂以进行扩大培养，实现发酵乳杆菌低成本、高效率的发酵培养方式，并为开发以乳酸菌作为主要成分的功能性食品，以及使饲料中益生菌达到相应数量的工业化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

发酵乳杆菌 SS-31（*L. fermentum* SS-31）：分离自酸笋发酵液，保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心，保藏编号为 CGMCC NO.24925。

MRS 基础培养基：每 1 L 含葡萄糖 20 g、胰蛋白胨 20 g、磷酸氢二钾 0.9 g、硫酸锰 0.50 g、硫酸镁 1.00 g、吐温 80 1.00 g，调节 pH 至 6.5，115 ℃高压灭菌 20 min。

1.2 主要试剂

葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、蛋白胨、牛肉浸粉、牛肉胨、胰蛋白胨（均为生物试剂）：上海麦克林生化科技有限公司产品；氯化钾、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、柠檬酸铵、醋酸钠、氯化钠、硫酸镁、碳酸铵、氨水、碳酸钠（均为分析纯）：北京索莱宝科技有限公司产品。

1.3 主要仪器

15 L 发酵罐：上海宝兴生物设备工程有限公司产品；GI80TW 立式自动压力蒸汽灭菌器：致微仪器有限公司产品；DZKW-D-1 电热恒温水浴锅：北京市光明医疗仪器有限公司产品；SW-CJ-2F 洁净工作台：苏州安泰空气技术有限公司产品；SQP 电子天平：赛多利斯科学仪器有限公司产品；Sherlock 微生物计数仪：美国 MIDI 公司产品；DW25-560 恒温恒湿培养箱：上海知楚仪器有限公司产品；SUNRISE 酶标仪：帝肯（上海）贸易有限公司产品。

1.4 实验方法

1.4.1 发酵乳杆菌增殖培养基成分的优化 以平板涂布法测定的活菌数为评价指标，在 MRS 基础培养基上，替换培养基中碳源，添加量为 20 g/L，探究不同种类碳源（葡萄糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖）对发酵乳杆菌 SS-31 生长的影响，筛选出最佳碳源。以蛋白胨、牛肉浸粉、牛肉胨、胰蛋白胨为氮源，替换上述已优化培养基中的氮源，以 20 g/L 为添加量，筛选得到最优氮源。同样以磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、柠檬酸铵、醋酸钠为无机盐，添加量为 9 g/L，筛选出最优无机盐，以确定最佳增殖培养基成分。

1.4.2 发酵乳杆菌增殖培养基成分质量浓度的优化 以平板涂布法测定的活菌数为评价指标，在上述最

佳增殖培养基的基础上，选择碳源的添加量为5、10、15、20、25、30 g/L,探究其最适添加量。选取上述最适碳源添加量，设置氮源添加量为5、10、15、20、25、30 g/L,确定其最适添加量。选取最佳碳源和氮源添加量,设置无机盐添加量为3、5、7、9、11、13 g/L,确定其最适添加量。

1.4.3 响应面法优化发酵乳杆菌增殖培养基　选择上述最佳碳源、氮源、无机盐进行响应面实验。碳源质量浓度为10、15、20 g/L；氮源质量浓度为15、20、25 g/L,无机盐质量浓度为7、9、11 g/L,采用三因素三水平（见表1），应用Design-Expert V 8.0.6进行Box-Behnken实验设计,优化出增殖培养基最佳配方。

表1　Box-Behnken实验设计因素及水平

Table 1　Box-Behnken design test factors and levels

水平	因素		
	麦芽糖质量浓度/(g/L)	酵母浸粉质量浓度/(g/L)	磷酸氢二钾质量浓度/(g/L)
-1	10	15	7
0	15	20	9
1	20	25	11

1.4.4 发酵乳杆菌SS-31高密度培养条件的优化

1)接种体积分数的选择　将已活化3代后的发酵乳杆菌SS-31 37 ℃恒温培养24 h后，按接种体积分数1%、2%、3%、4%、5%，分别接种于增殖培养基中,调节初始pH为6.8,置于37 ℃恒温箱内培养24 h,测定其活菌数,确定菌体最佳接种体积分数。

2)初始pH的选择　调节增殖培养基初始pH为5.8、6.3、6.8、7.3、7.8，按最佳接种体积分数接种于增殖培养基中,置于37 ℃恒温培养24 h,测定其活菌数,确定增殖培养基最佳初始pH。

3)温度的选择　调节增殖培养基初始pH至最佳，按最佳接种体积分数接种于增殖培养基中,分别置于31、34、37、40、43 ℃恒温箱内培养24 h,测定其活菌数,确定最佳培养温度。

4)中和剂的选择　为了更快测定菌体浓度,选用OD_{600}为指标反映菌体浓度。选择常用的Na_2CO_3溶液和氨水为中和剂,质量浓度均为20 g/L,通过流加中和剂维持培养基pH为6.8±0.02，以不流加中和剂作空白对照,每隔3 h测定OD_{600},并利用平板记数法测定24 h活菌数。利用15 L全自动发酵罐,按最终确定的培养条件进行发酵并比较两种中和剂对发酵乳杆菌SS-31高密度培养的影响。

1.5　数据处理与统计分析

数据采用SPSS 22.0软件进行统计分析，实验结果以平均值±标准差表示,实验重复3次。显著性($P<0.05$)分析使用Duncan检验。使用Origin 9.0软件绘图。

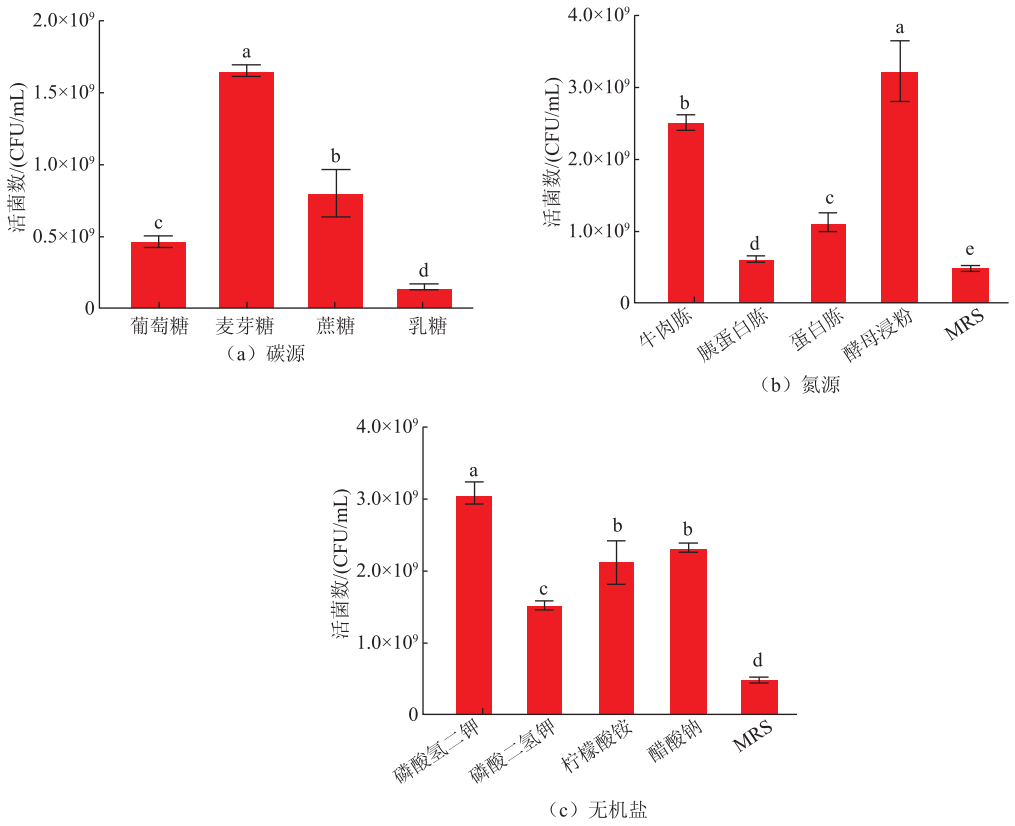
2　结果与分析

2.1　培养基成分的确定

为了筛选出最佳碳源、氮源、无机盐,以MRS为基础培养基,采用平板涂布法测定活菌数,以确定最佳碳源、氮源、无机盐,结果见图1。在葡萄糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖4种碳源中,麦芽糖是*L. fermentum* SS-31生长繁殖的最佳碳源，此时活菌数达到最大值1.64×10^9 CFU/mL,而碳源为葡萄糖的MRS基础培养基中活菌数仅为4.67×10^8 CFU/mL。孙媛媛分析了7种碳源对异型发酵乳杆菌FXJCJ6-1生长的影响,发现其对单糖(葡萄糖)利用率最高[12]。张兴昌等发现以双糖（蔗糖）作为碳源时,*Lactobacillus fermentum* F6菌体密度显著高于其他碳源[13]。但在该实验中,*L. fermentum* SS-31对麦芽糖的利用程度显著高于其他碳源,说明不同菌株对碳源的利用有差异。

由图1(b)可知,在胰蛋白胨、牛肉胨、蛋白胨和酵母浸粉4种氮源中,酵母浸粉是菌体生长繁殖的最佳氮源,此时活菌数达到最大值3.21×10^9 CFU/mL。洪梅等对发酵乳杆菌BLF01研究发现当酵母粉作为氮源时,获得的活菌数更高[14]。Gao等发现酵母粉作为发酵乳杆菌的氮源时,对其菌体生长具有显著促进作用[15],这也与该实验研究结果相同。由于酵母浸粉中富含多种氨基酸，还含有较高的尼克酸、叶酸、钴胺酸,且它们在中、酸性环境中对热稳定[16],所以酵母浸粉对*L. fermentum* SS-31生长有显著促进作用。

由图1(c)可知,在磷酸氢二钾、柠檬酸铵、醋酸钠、磷酸二氢钾4种无机盐中,磷酸氢二钾是最适无机盐,此时活菌数达到最大值3.05×10^9 CFU/mL。无机盐在一定范围内可中和菌体在生长过程中产生的酸性物质,并且参与细胞的合成代谢,调节渗透压稳定[17]。吕佳璐等研究4种无机盐对干酪乳杆菌YQ336生长的影响时,发现磷酸氢二钾最适宜该菌株的增殖培养[18],这与该实验结果相同。



不同小写字母表示活菌数差异显著(P<0.05)。

图 1　不同碳源、氮源、无机盐对发酵乳杆菌 SS-31 生长的影响

Fig. 1　Effects of different carbon sources, nitrogen sources and inorganic salts on the growth of *L. fermentum* SS-31

2.2　碳源、氮源、无机盐质量浓度的确定

探究了不同质量浓度麦芽糖、酵母浸粉、磷酸氢二钾对发酵乳杆菌 SS-31 活菌数的影响，结果见图 2。碳源质量浓度对乳酸菌生长起到关键作用，随着麦芽糖由 5 g/L 提高到 25 g/L，*L. fermentum* SS-31 活菌数呈现先上升后下降的趋势，并在 15 g/L 时，活菌数达到最大值 4.92×10⁹ CFU/mL。糖质量浓度过高时，菌株前期大量增殖生长，发酵产生大量酸，导致培养基环境偏酸性化，抑制菌株的生长代谢。因此选择 15 g/L 作为麦芽糖的最适添加量。

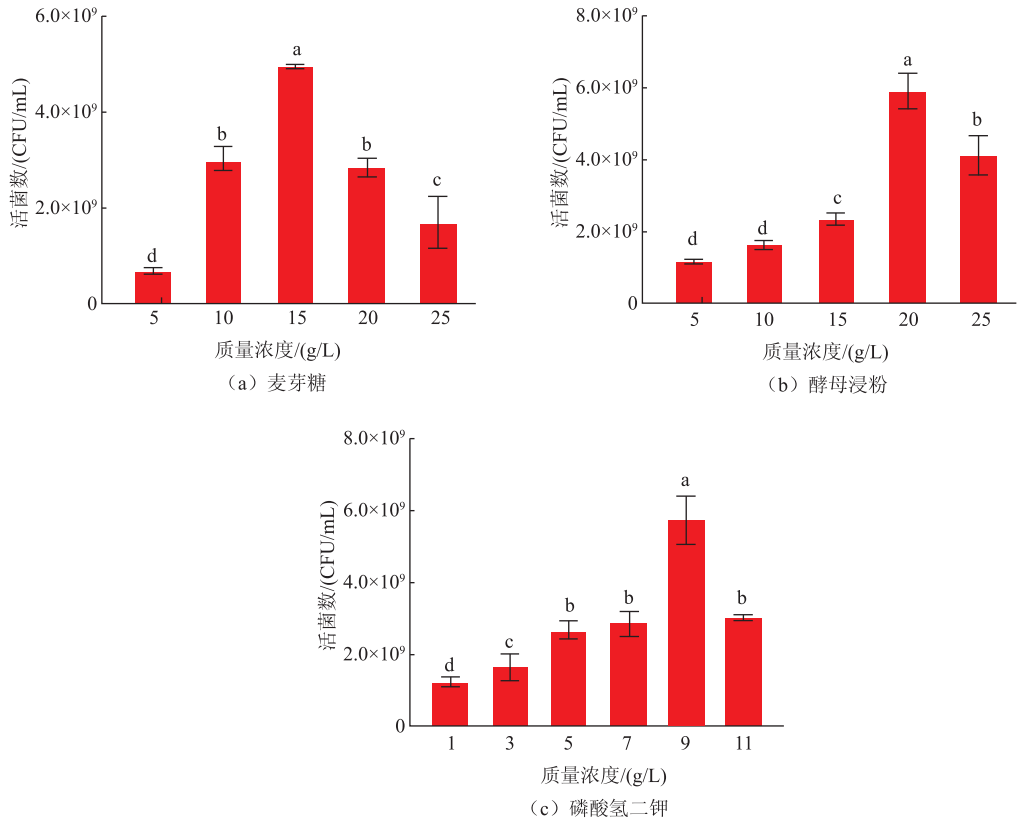
氮源为菌体生长代谢提供必要元素，富含氨基酸、无机盐和维生素。从图 2(b)可知，随着酵母浸粉由 5 g/L 提高到 25 g/L，*L. fermentum* SS-31 活菌数呈现先上升后下降的趋势，并在添加量为 20 g/L 时，活菌数达到最大值 5.87×10⁹ CFU/mL。前人研究认为[19]氮源质量浓度过低时，培养基内营养物质不足，导致菌体生长缓慢；氮源质量浓度过高时，菌体生长过快，导致菌体老化、自溶[20]。因此选择 20 g/L 作为酵母浸粉的最适添加量。

无机盐也是菌体生长代谢的重要因素，能够构成细胞物质以及调节渗透压。从图 2(c)可知，随着磷酸氢二钾由 1 g/L 提高到 11 g/L，活菌数呈现先上升后下降的趋势，并在 9 g/L 时，*L. fermentum* SS-31 活菌数达到最大值 5.47×10⁹ CFU/mL。由于乳酸菌在生长代谢过程中分解糖类产生大量乳酸，随着时间延长，乳酸大量堆积导致培养基内 pH 下降，乳酸菌生长受到抑制。无机盐可以调节培养基的 pH，中和过量的酸，促进菌体的生长，并为其生长补充微量元素。因此选择 9 g/L 作为磷酸氢二钾的最适添加量。

2.3　响应面实验结果

利用 Design-Expert 10.0 软件对麦芽糖质量浓度(A)、酵母浸粉质量浓度(B)、磷酸氢二钾质量浓度(C)设计三因素三水平的Box-Behnken 实验。实验设计及结果见表 2。

通过对表 2 的实验结果进行二次项拟合，以 *L. fermentum* SS-31 活菌数作为响应值，对结果进行多元回归分析，得到回归方程：活菌数(×10⁹ CFU/mL)=



不同小写字母表示活菌数差异显著(P<0.05)。

图 2　不同质量浓度麦芽糖、酵母浸粉、磷酸氢二钾对发酵乳杆菌 SS-31 生长的影响

Fig. 2　Effects of different concentrations of maltose, yeast extract powder and potassium hydrogen phosphate on the growth of *L. fermentum* SS-31

表 2　Box-Behnken 实验设计及结果

Table 2　Box-Behnken design and its experimental results

试验号	*A*	*B*	*C*	活菌数/(CFU/mL)
1	1	0	1	5.533×10^9
2	−1	0	−1	2.643×10^9
3	−1	1	0	2.520×10^9
4	0	1	1	3.333×10^9
5	0	0	0	7.000×10^9
6	0	1	−1	3.700×10^9
7	0	0	0	7.300×10^9
8	1	0	−1	2.700×10^9
9	1	−1	0	3.800×10^9
10	0	0	0	6.500×10^9
11	−1	−1	0	4.465×10^9
12	0	−1	−1	2.450×10^9
13	−1	0	1	2.933×10^9
14	1	1	0	5.000×10^9
15	0	0	0	7.000×10^9
16	0	−1	1	3.950×10^9
17	0	0	0	6.800×10^9

$6.920+0.559A-0.014B+0.532C+0.786AB+0.636AC-0.467BC-1.440A^2-1.534B^2-2.028C^2$。

由表 3 可知模型 $P<0.000\ 1$，表明该模型建立成功；失拟项为 0.148 6，大于 0.05，说明失拟项不显著；模型的 $R^2=0.977\ 0$，$R_{adj}^2=0.947\ 5$，说明预测值和实验值的相关性高，可以解释 94.75%的响应值变化。该模型变异系数(0.73%)小，具有较高精确度。综上，该回归模型可对 *L. fermentum* SS-31 在培养基的生长情况进行有效分析和预测。3 个因素交互作用的响应曲面及等高线见图 3。

表 3　RSM 回归方程方差分析

Table 3　Variance analysis of RSM regression model

来源	平方和	自由度	均方	*F*	*P*	显著性
模型	4 976.32	9	552.92	33.11	<0.000 1	***
A	249.95	1	249.95	14.97	0.006 1	**
B	0.16	1	0.16	0.01	0.925 7	
C	226.49	1	226.49	13.56	0.007 8	**
AB	247.28	1	247.28	14.81	0.006 3	**
AC	161.71	1	161.71	9.68	0.017 0	*
BC	87.11	1	87.11	5.22	0.056 3	
A^2	872.84	1	872.84	52.26	0.000 2	***
B^2	990.75	1	990.75	59.32	0.000 1	***
C^2	1 731.20	1	1 731.20	103.66	< 0.000 1	***
残差	116.90	7	16.70			
失拟项	82.10	3	27.37	3.15	0.148 6	不显著
误差	34.80	4	8.70			
总和	5 093.23	16				

注：*** 表示差异高度显著($P<0.001$)；** 表示差异极显著($P<0.01$)；* 表示差异显著($P<0.05$)。

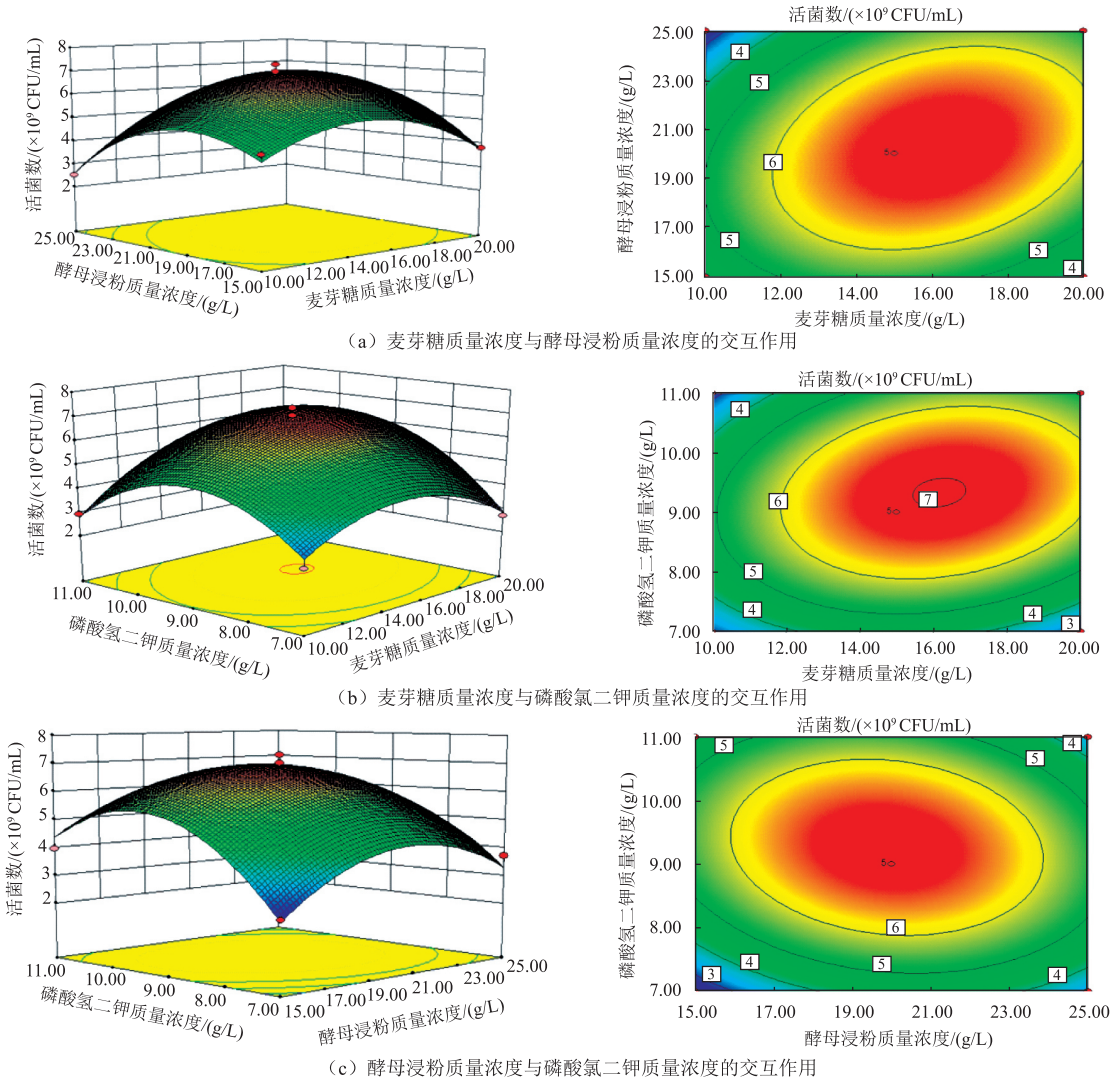
2.4　响应面实验结果的验证

回归模型得出 Box-Behnken 实验设计的最优结果见表 4。在麦芽糖 16.20 g/L、酵母浸粉 20.16 g/L、磷酸氢二钾 9.33 g/L 时，在此优化条件下的活菌数预测值为 7.03×10^9 CFU/mL。为了验证模型所得优化结果的准确性，依照优化结果进行培养基的配制及发酵实验，测定 24 h 时 *L. fermentum* SS-31 的活菌数，3 次实验结果的平均值为 6.51×10^9 CFU/mL，和模型预测值接近，验证了此模型的准确性。

杨瑞冬等对 *Lactobacillus buchneri* IMAU80233 培养基中碳源、氮源、无机盐体系进行 Box-Behnken 实验，后经发酵培养条件优化后，菌体活菌数仅有 3.81×10^9 CFU/mL，约为优化前的 1.59 倍[21]；李纳对鼠李糖乳杆菌 RG2 培养基成分及培养条件优化后，活菌数达到 7.1×10^9 CFU/mL，是未优化前活菌数的 7 倍[22]；高志敏采用正交法结合响应面法优化 *Lactobacillus fermentum* IMAU 10129 的培养基，优化后活菌数为4.21×10^9 CFU/mL，为优化前活菌数的 6 倍[23]。而在该实验中，优化后 *L. fermentum* SS-31 活菌数为 6.51×10^9 CFU/mL，是优化前 MRS 基础培养基活菌数(4.67×10^8 CFU/mL)的 13.94 倍，活菌数提升了一个数量级，高于目前文献已报道的活菌数水平，说明效果较好。

2.5　高密度培养条件的优化

2.5.1　接种体积分数的选择　菌体接种体积分数的多少通常影响其生长到稳定期的时间以及浓度[24]。作者探究了不同接种体积分数对 *L. fermentum* SS-31 活菌数的影响，结果见图 4。在接种体积分数为 1%~5%时，*L. fermentum* SS-31 的活菌数随接种体积分数升高呈现先上升后下降的趋势，在接种体积分数为 3%时，活菌数达到最大值 6.83×10^9 CFU/mL。这可能是初始接种体积分数过大，菌体大量繁殖消耗更多营养物质，导致后期培养基内营养物质不足，从而呈现下降趋势。综上，选择 3%为 *L. fermentum*



（a）麦芽糖质量浓度与酵母浸粉质量浓度的交互作用

（b）麦芽糖质量浓度与磷酸氢二钾质量浓度的交互作用

（c）酵母浸粉质量浓度与磷酸氢二钾质量浓度的交互作用

图 3　因素间交互作用对活菌数影响的响应面及等高线图

Fig. 3　Response surface and contour lines of the interaction among various factors on the yield of viable cells

表 4　Box-Benhnken 验证实验与结果

Table 4　Box-Benhnken verification experiments and results

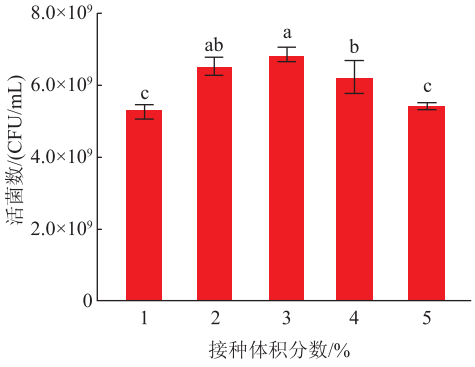
麦芽糖质量浓度/(g/L)	酵母浸粉质量浓度/(g/L)	磷酸氢二钾质量浓度/(g/L)	活菌数预测值/(CFU/mL)	活菌数实际值/(CFU/mL)
16.20	20.16	9.33	7.03×10^9	6.51×10^9

SS-31 的接种体积分数。

2.5.2　初始 pH 的选择　乳酸菌的最适生长 pH 一般为 5.0~7.0，不同种类乳酸菌有不同的最适生长 pH。作者探究了不同初始 pH 对 *L. fermentum* SS-31 活菌数的影响，结果见图 5。随着初始 pH 的增加，*L. fermentum* SS-31 的活菌数呈现先增加后降低的趋势，在 pH 为 6.8 时，活菌数达到最大值 7.30×10^9 CFU/mL。在过酸的环境下，会破坏细胞膜渗透压平衡和干扰细胞内外酶的活性，限制乳酸菌的生长；当 pH 过高时，也不利于其生长[25-26]。综上，选择 pH 6.8 为初始 pH。

2.5.3　温度的选择　温度的变化对乳酸菌的影响较大，温度过高或过低均不利于其生长繁殖。作者探究了不同温度对 *L. fermentum* SS-31 活菌数的影响，结果见图 6。随着温度升高，*L. fermentum* SS-31 的活菌数呈现显著增加后降低的趋势，在温度为

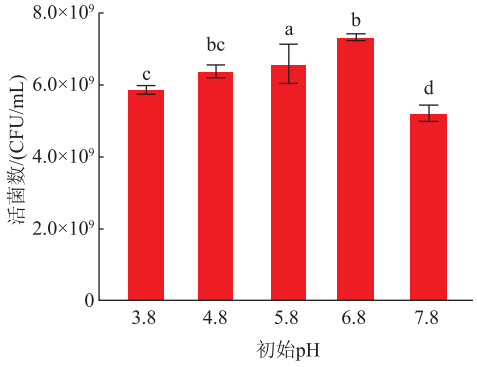
37 ℃时,活菌数达到最大值 8.15×10⁹ CFU/mL。这可能因为在低温条件下菌体失活,高温使其酶失活,从而影响其生长速度。综上,选择 37 ℃为发酵乳杆菌 SS-31 的最佳培养温度。



不同小写字母表示活菌数差异显著(P<0.05)。

图 4 接种体积分数对发酵乳杆菌 SS-31 生长的影响

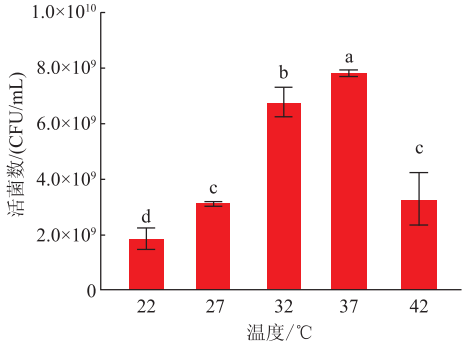
Fig. 4 Effects of inoculum on the growth of *L. fermentum* SS-31



不同小写字母表示活菌数差异显著(P<0.05)。

图 5 初始 pH 对发酵乳杆菌 SS-31 生长的影响

Fig. 5 Effects of initial pH on the growth of *L. fermentum* SS-31

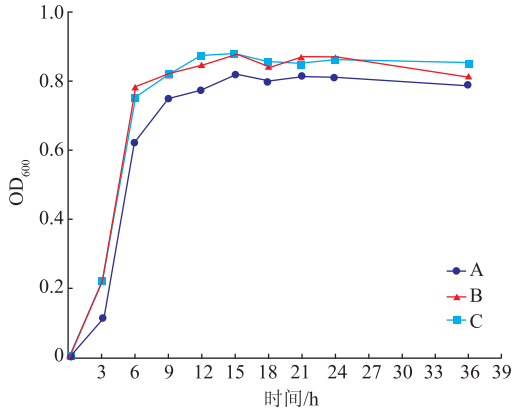


不同小写字母表示活菌数差异显著(P<0.05)。

图 6 温度对发酵乳杆菌 SS-31 生长的影响

Fig. 6 Effects of temperature on the growth of *L. fermentum* SS-31

2.5.4 中和剂的选择 分批培养菌体时,抑制菌体生长的主要原因是菌体自身代谢会产生较多的有机酸,大量有机酸的累积会形成酸抑制,从而使菌体生长较为缓慢。但是通过在发酵过程中加入中和剂调节 pH,保持恒定 pH 则可以解除酸抑制[27-28]。作者利用 15 L 发酵罐探究了不同中和剂对 *L. fermentum* SS-31 活菌数的影响,结果见图 7。



图中 A 表示未流加中和剂;B 表示流加体积分数 20%氨水;C 表示流加 20 g/L 碳酸钠。

图 7 中和剂对发酵乳杆菌 SS-31 生长的影响

Fig. 7 Effects of neutralizer type on the growth of *L. fermentum* SS-31

如图 7 所示,与未添加中和剂组相比,当添加碳酸钠和氨水,使发酵液 pH 恒定为 6.8 后,*L. fermentum* SS-31 菌液 OD_{600} 显著增加(P<0.05);但氨水和碳酸钠作为中和剂时,二者对 *L. fermentum* SS-31 生长的影响无显著性差异(P>0.05)。氨水作为中和剂时,既可以调节培养基内的 pH,又可以为菌体生长提供氮源,用量比碳酸钠少,且氨水较为廉价,经济实惠。因此,选用氨水作为 *L. fermentum* SS-31 高密度培养的中和剂,此时 37 ℃培养 24 h 后活菌数达到 1.19×10¹⁰ CFU/mL。

另外,孙媛媛对发酵乳杆菌 FXJCJ6-1 最适生长 pH 进行研究,结果显示在 pH 恒定为 6.0 并分批培养时,活菌数达到 9.5×10⁹ CFU/mL,较初始 MRS 培养基中活菌数(1.7×10⁹ CFU/mL)提高了 4.6 倍[27];李江等对发酵乳杆菌 L1 高密度培养条件进行优化,结果显示通过流加中和剂 NaOH,维持恒定 pH,较分批培养时的活菌数(1.55×10¹⁰ CFU/mL)显著提高18.52 倍[29];聂黔丽等采用单因素实验和正交实验对发酵乳杆菌 LF-8001 进行高密度培养优化后,活菌数达到了 1.08×10¹⁰ CFU/mL,提高了 5.32 倍[24]。作

者对 *L. fermentum* SS-31 进行培养基和培养条件优化后,活菌数达到 1.19×10^{10} CFU/mL,相比优化前活菌数(4.67×10^{8} CFU/mL)提高了 25.48 倍,活菌数提升了两个数量级,高于目前大部分已报道的活菌数水平,说明效果良好。

3 结 语

实现乳酸菌高密度培养的核心是发酵培养基的优化,作者以活菌数为指标,通过对 *L. fermentium* SS-31 发酵培养基组成和发酵条件进行系统优化,最终确定最佳发酵培养基成分为:麦芽糖 16.20 g/L、酵母浸粉 20.16 g/L、磷酸氢二钾 9.33 g/L、硫酸锰 0.50 g/L、硫酸镁 1.00 g/L、吐温 80 1.00 g/L;最佳发酵条件为:接种体积分数 3%、初始 pH 6.8,期间添加氨水保持发酵液 pH 稳定,在 37 ℃下培养 24 h 后,活菌数可达到 1.19×10^{10} CFU/mL,是优化前 4.67×10^{8} CFU/mL 的 25.48 倍。发酵乳杆菌 SS-31 菌体浓度显著提高,为今后大规模短期快速生产提供了技术支持。

参考文献:

[1] 敖晓琳,蒲彪,蔡义民,等. 发酵乳杆菌及其益生特性研究进展[J]. 食品与生物技术学报,2015,34(2):121-127.

[2] ZHANG L,MA H,KULYAR M F,et al. Complete genome analysis of *Lactobacillus fermentum* YLF016 and its probiotic characteristics[J]. **Microbial Pathogenesis**,2022,162:1-11.

[3] 高兆建,张艳秋,宋玉林,等. 筛选自泡菜的发酵乳杆菌细菌素纯化及抑菌特性分析[J]. 食品工业科技,2021,42(3):201-207.

[4] MOLINA-TIJERAS J A,DIEZ-ECHAVE P,VEZZA T,et al. *Lactobacillus fermentum* CECT5716 ameliorates high fat diet-induced obesity in mice through modulation of gut microbiota dysbiosis[J]. **Pharmacological Research**,2021,167:1-16.

[5] ZHANG H,KONG B,LIU H,et al. Physiology and antioxidant activity of *Pediococcus pentosaceus* R1 and *Lactobacillus fermentum* R6 in response to lactic acid stress[J]. **LWT-Food Science and Technology**,2021,149:1-8.

[6] AHLAWAT S,SHANKAR A,VANDN A,et al. *Yersinia enterocolitica* and *Lactobacillus fermentum* induces differential cellular and behavioral responses during diclofenac biotransformation in rat gut[J]. **Toxicology and Applied Pharmacology**,2021,431:1-10.

[7] 秦雅莉,赵笑颖,沈圆圆,等. 酸笋中具有抗炎活性乳酸菌的筛选及鉴定[J]. 食品科学,2022,43(8):121-127.

[8] 熊晓辉,于修,熊强,等. 乳酸菌发酵剂高密度培养的研究[J]. 中国调味品,2004(5):17-21.

[9] 郑苗,邓泽元,任志青,等. 东方伊萨酵母高密度培养的研究[J]. 中国食品学报,2016,16(4):96-103.

[10] 吕秀明,梁金钟. 长双歧杆菌耐氧菌株选育及其高密度发酵条件的研究[J]. 食品工业科技,2016,37(7):159-163.

[11] MAGDALENA P,WASKO A,KORDOWSKA-WIATER M,et al. Optimization of medium composition for enhancing growth of *Lactobacillus rhamnosus* PEN using response surface methodology[J]. **Polish Journal of Microbiology**,2010,59(2):113-118.

[12] 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.

[13] 张兴昌,陈霞,周琦,等. *Lactobacillus fermentum* F6 的增殖培养基优化及高密度发酵的研究[J]. 乳业科学与技术,2010,33(3):101-107.

[14] 洪梅,刁其玉,闫贵龙,等. 一株发酵乳杆菌培养条件的优化[J]. 饲料工业,2010,31(19):26-29.

[15] GAO X,QIAO S Y,LU W Q. Determination of an economical medium for growth of *Lactobacillus fermentum* using response surface methodology[J]. **Letters in Applied Microbiology**,2009,49(5):556-561.

[16] 李志成,张连斌,段旭昌,等. 嗜酸乳杆菌生长促进物质研究[J]. 中国食品学报,2006(5):40-44.

[17] WU J,YAN X,WENG P,et al. Homology-and cross-resistance of *Lactobacillus plantarum* to acid and osmotic stress and the influence of induction conditions on its proliferation by RNA-Seq[J]. **Journal of Basic Microbiology**,2021,61(6):576-590.

[18] 吕佳璐,于冰,张妍,等. 干酪乳杆菌 YQ336 高密度培养条件优化[J]. 饲料研究,2021,44(12):76-80.

[19] HUJANEN M,LINKO Y Y. Effect of temperature and various nitrogen sources on *L* (+)-lactic acid production by *Lactobacillus casei*[J]. **Applied Microbiolied Microbiology and Biotechnology**,1996,3(45):307-313.

[20] 金玉洁. 乳酸菌高密度培养及其对人参皂苷的发酵转化[D]. 杭州：浙江大学，2020.
[21] 杨瑞冬，李伯海，王元弛，等. *Lactobacillus buchneri* IMAU80233 高密度发酵工艺优化[J]. 食品科学，2019，40(22)：147-154.
[22] 李纳. 两株益生乳酸菌培养优化及其肠道功能评价[D]. 泰安：山东农业大学，2018.
[23] 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.
[24] 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.
[25] CARPENTER C E，BROADBENT J R. External concentration of organic acid anions and pH：key independent variables for studying how organic acids inhibit growth of bacteria in mildly acidic foods[J]. **Journal of Food Science**，2010，1(74)：12-15.
[26] WANG S，TIAN R，LIU B，et al. Effects of carbon concentration，oxygen，and controlled pH on the engineering strain *Lactiplantibacillus casei* E_1 in the production of bioethanol from sugarcane molasses[J]. **AMB Express**，2021，11(1)：1-13.
[27] 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.
[28] STEIBER R W，GERHARDT P. Production of *Lactobacillus* cells by dialysis continuous fermentation of deproteinized whey[J]. **Journal of Dairy Science**，1980，63(5)：722-730.
[29] 李江，李玉，曹月婷，等. 一株发酵乳杆菌的筛选鉴定及其高密度培养的研究[J]. 食品工业科技，2012，33(8)：211-214.

科　技　信　息

美国修订单核细胞增生李斯特菌法规和基于风险的采样计划验证程序

2022 年 11 月 2 日，美国食品安全检验局(FSIS)发布 10240.5 号指令，修订单核细胞增生李斯特菌法规和基于风险的采样计划验证程序。主要修订内容：1)将执法、调查和分析官员(EIAO)公共卫生风险评估方法(PHRE)纳入 FSIS 指令 5100.4；2)用风险因素取代四年周期的使用，执行单核细胞增生李斯特菌采样计划将基于本指令中描述的风险因素，而不是自上次食品安全评估(FSA)以来的时间；3)删除附件 5 的产品采样优先级列表；4)更新示例收集说明；5)将单核细胞增生李斯特菌最小样品量减少 75%。该指令自发布之日起实施。

[信息来源]海关总署.美国修订单核细胞增生李斯特菌法规和基于风险的采样计划验证程序[EB/OL]. (2022-11-7). http://www.tbt.org.cn/warningDetail.html?id=aB97f9prrVyzqxLs9KnlGQgQC0SkRMkwqhgb8x3.