

酸奶弱后酸化菌株摇瓶增菌工艺及发酵罐扩培试验

赵丽娜¹, 巩俊明¹, 张娜³, 李晨^{1,5}, 田洪涛^{1,2,5*}, 王妙姝^{4,5}, 康红艳^{4,5}, 罗云波⁶

¹河北农业大学食品科技学院 河北保定 071001

²国家北方山区农业工程技术研究中心 河北保定 071001

³保定学院生物化工与环境工程学院 河北保定 071001

⁴河北新希望天香乳业有限公司 河北保定 071001

⁵河北省益生功能性乳制品技术创新中心 河北保定 071001

⁶中国农业大学食品科技与营养工程学院 北京 100083)

摘要 针对目前我国高效直投式发酵剂技术水平落后以及在实际应用中普遍存在酸奶后酸化的问题,研制开发具有自主知识产权的弱后酸化高效直投式发酵剂,势在必行。本文采用自行选育的弱后酸化保加利亚乳杆菌 Lb-s1 rp-1 为出发菌株,在优化的胡萝卜汁复合增菌培养基上增殖培养。首先研究了培养温度、培养方式、培养基起始 pH 值、接种量等单因素对弱后酸化菌株生长的影响,然后通过 L₉(3³) 正交试验优化了摇瓶分批式培养的增菌工艺条件;通过 50 L 发酵罐分批补料式扩大培养试验,并以分批式扩大培养为对照,研究了调节 pH 值、流加葡萄糖补料以及调节 pH 值且流加葡萄糖补料对弱后酸化菌株生长的影响。结果表明,弱后酸化保加利亚乳杆菌 Lb-s1 rp-1 实验室摇瓶分批式培养的最适增菌工艺条件:培养温度 37 ℃,培养基起始 pH 6.5,接种量 1.0%,静置培养,在此工艺条件下培养该菌株,6 h 到达对数生长末期,稳定期活菌数为 2.28×10¹⁰ CFU/mL。在 50 L 发酵罐中,3 种补料方式培养菌株到达对数生长末期的时间分别是 8,6,8 h,稳定期活菌数分别为 2.29×10¹⁰,2.39×10¹⁰,2.48×10¹⁰ CFU/mL,与分批式扩大培养的活菌数差异不显著(P>0.05)。因此,采用 50 L 发酵罐分批式扩大培养弱后酸化保加利亚乳杆菌 Lb-s1 rp-1 的工艺是可行的。本研究为工业化生产弱后酸化保加利亚乳杆菌高效直投式酸奶发酵剂提供了细胞廉价增殖培养技术,也为研究其它弱后酸化益生乳酸菌的细胞培养技术提供了参考借鉴。

关键词 弱后酸化保加利亚乳杆菌;摇瓶;增菌工艺;50 L 发酵罐;扩大培养

文章编号 1009-7848(2022)01-0098-10 **DOI**: 10.16429/j.1009-7848.2022.01.011

近年来,随着乳酸菌与健康关系研究的深入,发酵食品越来越多的健康功能被揭示,发酵乳制品行业快速崛起,成为全球发展最快的高附加值行业之一^[1-3]。随之,发酵乳制品的生产技术受到极大关注,而发酵剂制备是其核心技术之一。传统人工型液态发酵剂存在弊端,20 世纪初,国外开始研究高效直投式发酵剂,至 20 世纪 60 年代后逐渐商品化。而我国在高效直投式发酵剂方面研究起步较晚,长期被国外企业垄断,主要依赖进口,价格异常昂贵^[4-5]。高效直投式发酵剂在酸奶中应用时普遍存在后酸化的问题,原因是保加利亚乳

杆菌是主要的产酸菌株,在长期高温发酵、低温贮存的过程中,菌株继续发酵产酸,进而导致发酵乳制品贮藏期质量不稳定,保质期缩短^[6]。目前,国外研究出一些弱后酸化效果显著的菌株,然而均受专利保护。目前,我国主要在工艺水平上控制酸奶后酸化,不能从根本上解决问题。研制开发具有自主知识产权的弱后酸化高效直投式发酵剂,是解决酸奶后酸化问题的关键。

制备弱后酸化高效直投式发酵剂的关键技术主要包括:弱后酸化乳酸菌株的选育、廉价增菌培养基的筛选、细胞增菌培养;菌体细胞浓缩分离;高效保护剂筛选与干燥工艺;高效直投式发酵剂的贮藏稳定性等。本实验室研究人员前期对弱后酸化乳酸菌株进行选育,并对选育的菌株进行廉价增菌培养基的筛选。关于乳酸菌细胞增菌培养技术,考虑到乳酸菌生长繁殖速度较快,采用分批式培养,对培养设备要求简单,易于控制。为获得高浓度细胞培养物,采用分批补料式培养,主要有

收稿日期: 2021-01-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(31501417);河北省农业科技成果转化项目(16822807D);河北省重点研发计划项目(19227134D)

作者简介: 赵丽娜(1988—),女,博士生

通信作者: 田洪涛 E-mail: tht631022@163.com

化学中和法、缓冲盐法、膜渗析法。化学中和法可获得高密度菌体,简便易行,是目前应用最广泛的一种方法,然而,当乳酸与碱液反应产生乳酸氨或乳酸钠等盐类物质达到一定浓度时,也会抑制菌体生长繁殖^[7-8]。缓冲盐的缓冲作用有一定范围,发酵菌液不能达到很高的菌体浓度,高盐浓度会对乳酸菌菌体生长产生抑制作用^[7]。膜渗析法是目前最先进的方法,培养效果最好,然而设备投资大,多次过滤耗能大,对超滤膜材料和操作要求较严格,同时在培养过程中易感染噬菌体,工业上应用并不广泛^[4,7-9]。本实验室新选育的弱后酸化菌株生长特性是否发生改变?该菌株究竟适宜采用何种培养方法?需要用产率和转化率指标来衡量,并通过试验探明。

针对以上问题,选用选育并优化组合的优良弱后酸化乳酸菌菌株及廉价胡萝卜汁复合增菌培养基,通过 300 mL 三角瓶水平的摇瓶分批式培养,采用单因素和正交优化试验研究培养温度、培养方式、培养基起始 pH 值、接种量对弱后酸化菌株生长的影响。通过 50 L 发酵罐分批补料式扩大培养试验研究调节 pH 值、流加葡萄糖补料以及既调节 pH 值又流加葡萄糖补料对弱后酸化菌株生长的影响。通过优化后酸化乳酸菌的增殖培养条件,为高效直投式发酵剂产业化提供技术依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 试验菌种 弱后酸化保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus bulgaricus*) Lb-s1 rp-1: 本实验室(河北农业大学食品科技学院发酵工程试验室)前期自行选育。

1.1.2 原料 胡萝卜,购自本市大型超市,用于制作胡萝卜汁复合增菌培养基。

1.1.3 培养基

1) MRS 培养基^[10] 液体用于菌种的活化,固体用于活菌计数;

2) 胡萝卜汁复合增菌培养基 挑选新鲜、完好、大小适中的胡萝卜→洗净→切片(厚度 2 mm)→煮沸(料:水=1:1,100℃,10 min)→打浆(10 min)→过滤(100 目滤布,2 遍)→磨浆(胶体磨,10 min)→添加促生长物质(0.3%大豆蛋白胨、1.0%蛋

白胨、0.5%酵母膏、0.5%碳酸钙)→调糖度(2~3 Brix°)→调 pH 值→灭菌(115℃,20 min)→冷却至 37℃备用,用于摇瓶分批式培养试验和发酵罐分批补料式扩大培养试验。

1.1.4 主要仪器设备 YXQ-LS-18SI/22L 手提式湿热灭菌锅,上海东亚压力容器公司;SHP-250 型生化培养箱,上海精宏实验设备有限公司;JM-80F 型胶体磨,江苏丹徒县纪中电器五金厂;FOM-Z150-2 打浆机,镇江市丹徒区纪中电器厂;STARTER 2100 实验室 pH 计,奥豪斯(OHAUS)仪器(上海)有限公司;50 L 全自动发酵罐,上海迪比尔生物工程有限公司;阿贝折光仪,上海欢奥科技有限公司;78-1 磁力加热搅拌器,金坛市杰瑞尔电器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 实验室摇瓶分批式培养试验 首先通过单因素实验研究培养温度、培养方式、培养基起始 pH 值、接种量对实验室摇瓶分批式培养菌种增菌的影响,然后对有交互作用的因素条件进行正交优化,最后在正交优化试验得到的最佳工艺条件下培养菌种进行验证试验。

1) 培养温度对菌种增菌的影响 弱后酸化保加利亚乳杆菌 Lb-s1 rp-1 经 MRS 液体培养基活化后,以体积分数 0.6%(约 3×10^6 CFU/mL)接入灭菌的 300 mL 三角瓶(装液量 200 mL)、pH 值为 6.5~7.0 的胡萝卜汁复合增菌培养基中,分别置于 32,37,42℃恒温、静置培养 12 h,定时取样检测活菌数,绘制生长曲线。

2) 培养方式对菌种增菌的影响 菌株活化后,以体积分数 0.6%(约 3×10^6 CFU/mL)接种量分别接入灭菌的 300 mL 三角瓶(装液量 200 mL)和灭菌的 250 mL 厌氧瓶(即输液瓶,装液量 200 mL,装液过程中通过 Hungate 厌氧系统充氮除氧)、pH 值为 6.5~7.0 的胡萝卜汁复合增菌培养基中,于 37℃分别进行转速 80 r/min 摇床培养(三角瓶)、静置培养(三角瓶)、厌氧培养(厌氧瓶)8 h,检测活菌数。

3) 培养基起始 pH 值对菌种增菌的影响 用 2 mol/L Na_2CO_3 溶液经磁力搅拌器将胡萝卜汁复合增菌培养基 pH 值分别调至 5.5,6.0,6.5,7.0,7.5 梯度系列,分装 300 mL 三角瓶(装液量均为

200 mL), 115 °C 灭菌 20 min 冷却备用。菌株活化后, 每株菌以体积分数 0.6% (约 3×10^6 CFU/mL) 接种量分别接入不同 pH 值的三角瓶胡萝卜汁复合增菌培养基中, 37 °C 静置培养 8 h, 检测活菌数。

4) 接种量对菌种增菌的影响 菌株活化后, 分别以体积分数 0.4%, 0.6%, 0.8%, 1.0%, 1.2% 接入灭菌的 300 mL 三角瓶 (装液量 200 mL)、pH 值为 6.5 的胡萝卜汁复合增菌培养基中, 37 °C 静置培养 12 h, 定时取样检测活菌数, 绘制生长曲线。

5) 菌株摇瓶增菌工艺正交优化试验 考虑增菌因素之间存在交互协同作用, 在单因素实验中选择培养温度、培养基起始 pH 值、接种量为主要因素, 利用 $L_9(3^3)$ 正交试验优化弱后酸化保加利亚乳杆菌 Lb-s1 rp-1 菌株的摇瓶增菌工艺条件, 因素水平见表 1。

表 1 Lb-s1 rp-1 摇瓶增菌工艺正交优化试验中各因素水平表

Table 1 Factor level table of Lb-s1 rp-1 in orthogonal optimization experiment of shake flask enrichment process

水平	因素		
	A(培养温度/°C)	B(起始 pH 值)	C(接种量/%)
1	35	6.2	0.8
2	37	6.5	0.9
3	39	6.8	1.0

6) 验证试验 根据菌株摇瓶增菌工艺正交优化试验得到的最佳增菌工艺条件培养弱后酸化保加利亚乳杆菌 Lb-s1 rp-1, 对正交试验结果进行验证。

1.2.2 50 L 发酵罐分批补料式扩大培养试验 根据实验室摇瓶分批式培养试验得到的最佳增菌工艺, 利用胡萝卜汁复合增菌培养基对弱后酸化保加利亚乳杆菌 Lb-s1 rp-1 进行 50 L (30 L 培养基) 全自动发酵罐扩大培养试验, 以分批式扩大培养为对照, 设置 3 种补料方式: ①用 2 mol/L 的 Na_2CO_3 溶液调节培养基恒定 pH 值为 5.5; ②在对数生长末期 6 h 时补加 1.5 mol/L 葡萄糖溶液使发酵罐中葡萄糖质量浓度保持 20 g/L; ③既用 2 mol/L 的 Na_2CO_3 溶液调节培养基恒定 pH 值为

5.5, 又在对数生长末期 6 h 时补加 1.5 mol/L 葡萄糖溶液。定时取样检测活菌数, 绘制生长曲线。

1.3 检测方法

1.3.1 乳酸菌活菌计数 参照 GB 4789.35-2016 平板计数法^[11], 每个试验均重复 3 次。

1.3.2 pH 值的测定 采用 OHAUS Starter 2100 pH 计直接测定, 每个试验均重复 3 次。

1.4 试验数据统计分析方法

试验数据采用 SPSS Statistics 17.0 进行方差分析及多重比较。

2 结果与分析

2.1 实验室摇瓶分批式培养试验

2.1.1 培养温度对菌种增菌的影响 温度是影响微生物生长繁殖的重要因素之一, 通过影响蛋白质、核酸等生物大分子的结构和功能以及细胞结构来影响微生物的生长、繁殖和新陈代谢, 不同微生物最适生长温度随着培养基成分、培养条件和菌体生长阶段变化而改变^[9,12]。根据 1.2.1(1) 节的试验方法, 探究不同培养温度对弱后酸化保加利亚乳杆菌 Lb-s1 rp-1 生长的影响, 结果见图 1。

图 1 可知, 菌株在胡萝卜汁复合增菌培养基中, 分别于 32, 37, 42 °C 恒温静置培养, 到达对数生长末期或稳定初期的培养时间分别为 9, 7, 5 h, 稳定期活菌数分别为 1.33×10^9 , 9.98×10^9 , 4.89×10^9 CFU/mL, 37 °C 培养的活菌数显著高于 32 °C 和 42 °C 培养 ($P < 0.05$)。原因是在一定范围内, 当温度

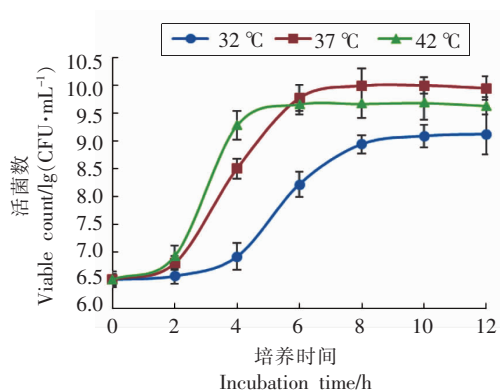


图 1 Lb-s1 rp-1 在胡萝卜汁复合增菌培养基中不同温度培养生长曲线

Fig.1 Growth curve of Lb-s1 rp-1 in carrot juice complex enrichment medium at different temperatures

升高时,细胞内的酶催化和化学反应速率都会加快,菌体生长也会加快,同时营养物和代谢物的溶解度提高,细胞膜流动性增大,有利于营养物质的吸收和代谢产物的排除。然而,当超过一定温度后继续升温,会使蛋白质和核酸等受到不可逆的损害,从而抑制菌体生长代谢,甚至导致死亡^[13]。确定培养温度 37℃作为下一步正交优化试验的主要因素与基准水平。

2.1.2 培养方式对菌种增菌的影响 供氧情况影响培养基的氧化还原电位值,可使乳酸菌的代谢途径发生改变,这对菌种的生长尤为重要^[12]。因此,根据 1.2.1(2)节的试验方法,采用不同的培养方式研究对弱后酸化保加利亚乳杆菌 Lb-s1 rp-1 生长的影响,结果见图 2。

图 2 可知,菌株在胡萝卜汁复合增菌培养基中,37℃分别进行摇床培养(转速为 80 r/min)、静置培养、厌氧培养 8 h 后,活菌数分别为 2.02×10^{10} , 1.93×10^{10} , 3.23×10^7 CFU/mL,静置培养和厌氧培养的活菌数极显著高于摇床培养 ($P < 0.01$),而且静置培养和厌氧培养的活菌数差异不显著 ($P > 0.05$)。结果表明,培养方式对弱后酸化保加利亚乳杆菌 Lb-s1 rp-1 的生长影响很大,静置培养和厌氧培养优于摇床好氧培养。

本研究结果与古元懿^[8]、蔡毅等^[14]研究结果相符,这主要是由于保加利亚乳杆菌基因组中缺少超氧化物歧化酶,导致其在有氧条件下的生长较差,只有在发酵培养基中的氧含量较低的情况下,才能快速生长^[15]。根据本试验结果,为简化工艺操作,节省能源,降低生产成本,减少设备投资,确定弱后酸化保加利亚乳杆菌 Lb-s1 rp-1 采用静置培养方式。

2.1.3 培养基起始 pH 值对菌种增菌的影响 培养基起始 pH 值也是影响菌株活菌数量的关键因素之一,合适的起始 pH 值能缩短菌株生长的延滞期,较快的进入对数生长期,不同菌株的最适生长 pH 值范围也不同^[16]。因此,根据 1.2.1(3)节的试验方法,研究培养基不同起始 pH 值对弱后酸化保加利亚乳杆菌 Lb-s1 rp-1 生长的影响,结果见图 3。

图 3 可知,菌株在起始 pH 值为 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 的胡萝卜汁复合增菌培养基中,37℃摇床

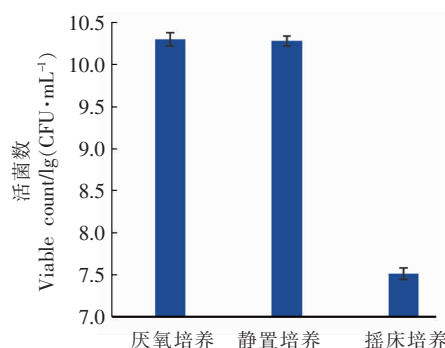


图 2 Lb-s1 rp-1 在不同培养方式下稳定期的活菌数
Fig.2 Number of Lb-s1 rp-1 viable bacteria in the stationary phase of different culture methods

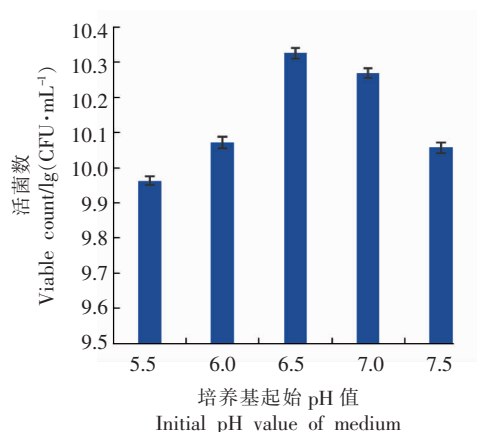


图 3 Lb-s1 rp-1 在不同起始 pH 值培养基中稳定期的活菌数
Fig.3 Number of Lb-s1 rp-1 viable bacteria in stationary phase at different initial pH media

培养 8 h 后,活菌数分别为 9.17×10^9 , 1.18×10^{10} , 2.12×10^{10} , 1.86×10^{10} , 1.14×10^{10} CFU/mL,在起始 pH 值为 5.5~7.5 的范围内,活菌数随着 pH 值的增大先升高后降低,pH 值为 6.5 时,活菌数最高,显著高于其它起始 pH 值 ($P < 0.05$)。可能由于 pH 值从多方面影响着微生物的生命活动,不仅影响胞内、外酶的生物活性,还影响微生物对营养物质的吸收,以及改变培养基中化合物离子化程度,从而促进或抑制菌株的生长繁殖。因此,确定培养基起始 pH 值为 6.5 作为下一步正交优化试验的主要因素与基准水平。

2.1.4 接种量对菌种增菌的影响 不同的接种量对菌体活性影响不同,从而影响菌体适应能力和

生长速率^[13]。因此,根据 1.2.1(4)节的试验方法,研究不同接种量对弱后酸化保加利亚乳杆菌 Lb-s1 rp-1 生长的影响,结果见图 4。

由图 4 可知,菌株分别以 0.4%,0.6%,0.8%,1.0%,1.2%的接种量在胡萝卜汁复合增菌培养基中 37 °C 静置培养,通过检测活菌数,到达对数生长末期的培养时间分别为 10,9,7,6,5 h;稳定期活菌数分别达到 2.09×10^{10} , 2.13×10^{10} , 2.18×10^{10} , 2.28×10^{10} , 2.20×10^{10} CFU/mL。结果表明,接种量对菌种到达对数生长末期的时间有显著影响 ($P < 0.05$),对稳定期的活菌数无显著影响 ($P > 0.05$)。接种量较低会延长菌体的延滞期,接种量较高菌体会较快进入对数生长期,进而较快进入菌体稳定期,在稳定期菌体容易发生自溶现象^[16]。因此,选择 1.0%的接种量作为下一步正交优化试验的主要因素与基准水平。

2.1.5 菌株摇瓶增菌工艺正交优化试验 根据 1.2.1(5)节的试验方法进行弱后酸化保加利亚乳杆

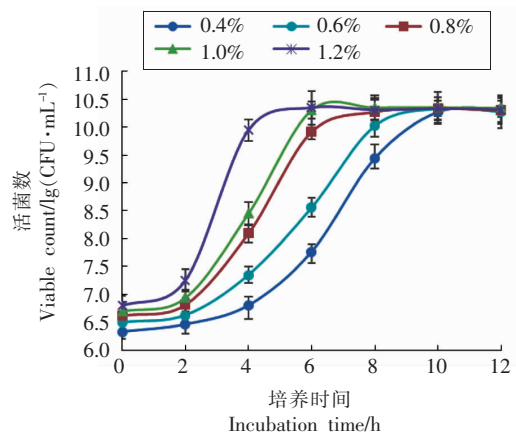


图 4 Lb-s1 rp-1 在胡萝卜汁复合增菌培养基中不同接种量培养生长曲线

Fig.4 Growth curve of Lb-s1 rp-1 in carrot juice complex enriched medium with different inoculation amount

菌 Lb-s1 rp-1 摇瓶增菌工艺正交优化试验,结果见表 2。

表 2 Lb-s1 rp-1 摇瓶增菌工艺正交优化试验结果

Table 2 Orthogonal optimization test results of Lb-s1 rp-1 in shake flask enrichment process

试验号	A(培养温度)	B(起始 pH 值)	C(接种量)	活菌数/CFU·mL ⁻¹
1	1	1	1	$1.34 \times 10^{10} \pm 4.0 \times 10^{8Aa}$
2	1	2	2	$1.66 \times 10^{10} \pm 3.0 \times 10^{8Bb}$
3	1	3	3	$1.79 \times 10^{10} \pm 1.0 \times 10^{8Cc}$
4	2	1	2	$2.05 \times 10^{10} \pm 4.0 \times 10^{8Fg}$
5	2	2	3	$2.28 \times 10^{10} \pm 3.0 \times 10^{8Gh}$
6	2	3	1	$1.94 \times 10^{10} \pm 4.0 \times 10^{8DEde}$
7	3	1	3	$1.90 \times 10^{10} \pm 2.0 \times 10^{8DI}$
8	3	2	1	$2.01 \times 10^{10} \pm 1.0 \times 10^{8EFG}$
9	3	3	2	$1.97 \times 10^{10} \pm 4.0 \times 10^{8DEdf}$
活菌数极差分析	k_1	1.60×10^{10}	1.76×10^{10}	1.76×10^{10}
	k_2	2.08×10^{10}	1.97×10^{10}	1.89×10^{10}
	k_3	1.96×10^{10}	1.90×10^{10}	1.98×10^{10}
	r	4.83×10^9	2.10×10^9	2.17×10^9
	较优水平	A_2	B_2	C_3
	主次因素	$A > C > B$		

表 2 表明,三因素对菌株的影响顺序为:培养温度(A)>接种量(C)>起始 pH 值(B),通过对活菌数极差分析得到菌株的最佳增菌培养条件为: $A_2B_2C_3$,即培养温度 37 °C、起始 pH 值 6.5、接种量 1.0%。

2.1.6 验证试验 根据 1.2.1(6)节的试验方法对

弱后酸化保加利亚乳杆菌 Lb-s1 rp-1 摇瓶增菌工艺条件正交优化试验结果进行验证试验,结果见图 5。

本实验室前期研究结果^[17]: 未经过弱后酸化选育的保加利亚乳杆菌 Lb-s1 在番茄复合汁增菌培养基中,37 °C 恒温培养 18 h,活菌数达到 $2.25 \times$

10^{10} CFU/mL。与本研究结果图 5 所示:保加利亚乳杆菌 Lb-s1 rp-1 在最佳增菌培养条件下,6 h 到达对数生长末期,稳定期活菌数为 2.28×10^{10} CFU/mL。对比表明:经过弱后酸化选育后,稳定期活菌数无显著性差异($P > 0.05$),到达对数末期的时间极显著缩短($P < 0.01$)。

进一步证明保加利亚乳杆菌 Lb-s1 经过弱后酸化选育之后,其细胞生长特性大大提高,细胞生长量未发生显著改变。因此,优化的摇瓶分批式培养工艺是可行的,可为下一步研究 50 L 全自动发酵罐分批补料式扩大培养工艺奠定基础。

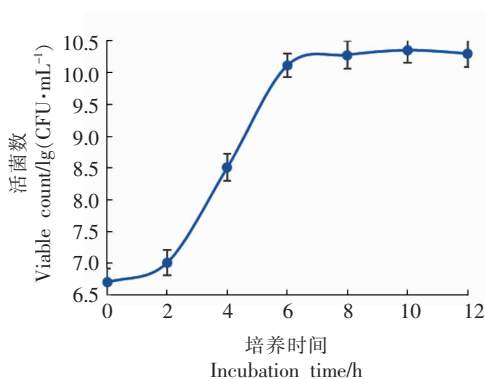


图 5 Lb-s1 rp-1 在最佳增菌培养条件下生长曲线
Fig.5 Growth curve of Lb-s1 rp-1 under optimal culture conditions

图 6 可知,按照摇瓶分批式培养试验得到的最佳增菌工艺将弱后酸化保加利亚乳杆菌 Lb-s1 rp-1 在 50 L 发酵罐中分批式扩大培养,6 h 到达对数生长末期,活菌数为 2.35×10^{10} CFU/mL。通过 3 种补料方式,即调节 pH 值、补料、调节 pH 值与补料,到达对数生长末期的时间分别是 8,6,8 h,稳定期活菌数分别是 2.29×10^{10} , 2.39×10^{10} , 2.48×10^{10} CFU/mL。表明:调节 pH 值可以显著延长该菌株对数生长期($P < 0.05$),补料对该菌略有增菌作用,然而,经过生物统计分析,3 种补料方式对菌株稳定期活菌数均无显著影响($P > 0.05$)。原因可能是该菌株 6 h 即可到达对数生长末期,属于生长较快的微生物,培养基的营养物质也快速被消耗掉,单纯补充葡萄糖单一碳源,无法满足菌株继续快速生长的营养需求。因此,综合考虑菌株培养成本、设备要求、操作简便程度以及产率,采用 50

综上所述,弱后酸化保加利亚乳杆菌 Lb-s1 rp-1 实验室摇瓶分批式培养最佳增菌工艺条件为:培养温度 37 °C、培养基起始 pH 值 6.5、接菌量 1.0%、静置培养,在此工艺条件下培养该菌株,6 h 到达对数生长末期,稳定期活菌数为 2.28×10^{10} CFU/mL。

2.2 50 L 发酵罐分批补料式扩大培养试验

根据 1.2.2 节的试验方法对弱后酸化保加利亚乳杆菌 Lb-s1 rp-1 进行 50 L 发酵罐分批补料式扩大培养优选试验,结果如图 6 所示。

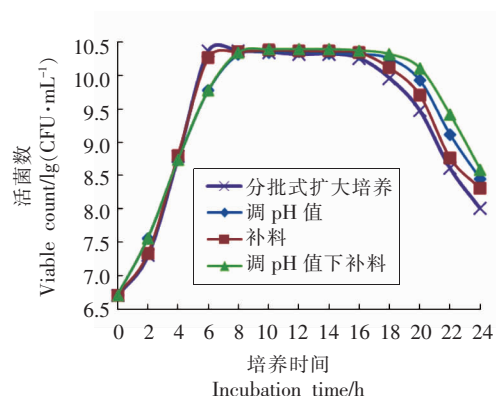


图 6 Lb-s1 rp-1 在 50 L 发酵罐中不同方式下生长曲线
Fig.6 Growth curve of Lb-s1 rp-1 under different methods in 50 L fermenter

L 发酵罐分批式扩大培养弱后酸化保加利亚乳杆菌 Lb-s1 rp-1 的工艺是可行的,同时也为下一步产业化菌体培养工艺提供了依据。

3 讨论与结论

目前国内外弱后酸化保加利亚乳杆菌的选育技术主要有诱变育种、原生质体融合、基因工程技术。传统的诱变育种虽然存在工作量大、耗时长等问题,然而选育的弱后酸化菌株安全性有保证,而且没有原生质体融合技术的弊端^[18]。本实验室前期通过硫酸新霉素诱变育种法筛选得到弱后酸化保加利亚乳杆菌 Lb-s1 rp-1,该菌株传至第 8 代仍具有弱后酸化性能,具有遗传稳定性。培养基为乳酸菌提供菌体生长、繁殖、代谢所需要的碳源、氮源、无机盐和生长因子,试验室所用的 MRS 培养基成本较高,成分较多,配制繁琐,并不适用于

工业生产,筛选廉价增殖培养基是降低成本的关键环节。本实验室从2000年初就开始了乳酸菌廉价增殖培养基的研究,已经针对不同菌株研制出菊芋汁^[19]、番茄汁^[17]、麦芽汁^[20]、冬瓜汁^[21]等复合增菌培养基,目前,本实验室的这项技术已非常成熟。然而,国内还没有关于弱后酸化保加利亚乳杆菌廉价增殖培养基的研究报道,本实验室对弱后酸化保加利亚乳杆菌 Lb-s1 rp-1 进行了的廉价增菌培养基的筛选工作,得出胡萝卜汁复合增菌培养基为最佳增殖培养基。

庞启亮等^[22]研究的可以延缓后酸化的保加利亚乳杆菌 H⁺-ATPase 缺陷型菌株在筛选的最适宜增殖培养基上,活菌数为 1.44×10⁹ CFU/mL;姜庆玲等^[23]对德氏乳杆菌保加利亚亚种的培养基及培养条件进行了优化,经优化后活菌数达 6.07×10⁹ CFU/mL;程艳宇等^[24]研究得出保加利亚乳杆菌 LB 在增殖培养基中,活菌数可达 1.09×10⁹ CFU/mL。本研究得出弱后酸化保加利亚乳杆菌 Lb-s1 rp-1 实验室摇瓶分批式培养,最高活菌数达 2.28×10¹⁰ CFU/mL,远高于现有报道结果。与弱后酸化选育前相比,菌株稳定期活菌数无显著差异($P>0.05$),说明保加利亚乳杆菌 Lb-s1 经过弱后酸化选育之后,细胞生长量未发生显著改变,因此,本文优化的摇瓶分批式培养工艺是可行的,可为下一步研究 50 L 全自动发酵罐分批补料式扩大培养工艺奠定基础。

由于摇瓶培养与发酵罐培养的环境条件有很大不同,因此不能直接使用摇瓶培养工艺进行发酵罐培养,需要在摇瓶培养工艺的基础上进一步考察适宜发酵罐培养的条件。康婕等^[25]研究得出保加利亚乳杆菌在 5 L 发酵罐中扩大培养的活菌数最大达到 5.5×10⁸ CFU/mL;刘洋^[26]对保加利亚乳杆菌进行 1 L 的放大培养试验,结果显示,活菌数最高可达 1.8×10⁹ CFU/mL;李佳^[27]在 5 L 全自动发酵罐中对保加利亚乳杆菌 LB5 的高密度培养条件进行了优化,优化后活菌数达到 2.7×10⁹ CFU/mL;本研究对弱后酸化保加利亚乳杆菌 Lb-s1 rp-1 在 50 L 发酵罐分批补料式扩大培养试验中,得到的活菌数达 10¹⁰ CFU/mL,远高于已报道的研究结果。综合考虑菌株培养成本、设备要求、操作简便程度以及产率,采用 50 L 发酵罐分批式扩大培养

弱后酸化保加利亚乳杆菌 Lb-s1 rp-1 的工艺是可行的,可为弱后酸化保加利亚乳杆菌高效直投式发酵剂产业化提供菌体增殖培养技术。

综上所述,本文对自行选育的弱后酸化保加利亚乳杆菌 Lb-s1 rp-1 在优化的胡萝卜汁复合增菌培养基上,进行实验室摇瓶分批式培养优选试验、50 L 发酵罐分批补料式扩大培养优选试验,在最佳的培养方式下得到较高的活菌数,为工业化生产弱后酸化保加利亚乳杆菌高效直投式酸奶发酵剂中提供细胞廉价增殖培养技术,也为研究其它弱后酸化益生乳酸菌的细胞培养技术提供参考借鉴。

参 考 文 献

- [1] ASTRUP A, GEIKER N, FAIDON M. Effects of full-fat and fermented dairy products on cardiometabolic disease: Food is more than the sum of its parts[J]. Food Science and Biotechnology, 2019, 10(5): 924S-930S.
- [2] KOK C R, HUTKINS R. Yogurt and other fermented foods as sources of health-promoting bacteria[J]. Nutrition Reviews, 2018, 76(S1): 4-15.
- [3] USUI Y, KIMURA Y, SATOH T, et al. Effects of long-term intake of a yogurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* 2038 and *Streptococcus thermophilus* 1131 on mice[J]. International Immunology, 2018, 30(7): 319-331.
- [4] 华晓曼, 贾冬梅, 王雨珊, 等. 发酵乳制品直投式发酵剂生产现状与研究进展[J]. 中国乳品工业, 2016, 44(7): 23-27.
HUA X M, JIA D M, WANG Y S, et al. Current production and research development of direct vat set (DVS) for fermented dairy products[J]. China Dairy Industry, 2016, 44(7): 23-27.
- [5] MA C J, WU Z J, CHEN Z J, et al. Differentiation of *Streptococcus thermophilus* strains in commercial direct vat set yoghurt starter[J]. Food Science and Biotechnology, 2013, 22(4): 987-991.
- [6] XU Z P, LI S, GONG G Y. Influence of different acidifying strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* on the quality of yoghurt[J]. Food Science and Technology Research, 2015, 21(2): 263-269.
- [7] 刘辉, 季海峰, 王四新, 等. 饲用乳酸菌高密度培

- 养的研究进展[J]. 中国饲料, 2016(4): 11-14.
- LIU H, JI H F, WANG S X, et al. Research progress in high density culture of Lactic acid bacteria for feeding[J]. China Feed, 2016(4): 11-14.
- [8] 古元懿. 乳酸菌高密度培养及冻干工艺的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2008.
- GU Y Y. Study on the high-density cultivation and freeze-drying processing of lactic acid bacteria[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2008.
- [9] 董安利. 乳酸乳球菌乳酸亚种 BL19 的高密度培养研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019.
- DONG A L. Study on high cell density culture of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BL19[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2019.
- [10] 郭兴华, 凌代文. 乳酸细菌现代研究实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2013: 497.
- GUO X H, LING D W. Modern research and experimental technology of lactic acid bacteria[M]. Beijing: Science Press, 2013: 497.
- [11] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验: GB 4789.35-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- Ministry of Health of the People's Republic of China. National food safety standards. Food microbiological examination. lactic acid bacteria test: GB 4789.35-2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.
- [12] 朱承亮. 乳酸菌高密度发酵技术的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2011.
- ZHU C L. Study on high density fermentation technology of lactic acid bacteria[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2011.
- [13] 刘元东, 袁乐, 余润兰. 微生物高密度培养的研究概况[J]. 有色金属科学与工程, 2015, 6(4): 76-80.
- LIU Y D, YUAN L, YU R L. Research overview of microorganism high density culture[J]. Nonferrous Metal Science and Engineering, 2015, 6(4): 76-80.
- [14] 蔡毅, 谷新晰, 田晶晶, 等. 乳酸菌摇瓶增殖培养工艺研究[J]. 中国食品学报, 2012, 12(4): 107-113.
- CAI Y, GU X X, TIAN J J, et al. Research of shake flask proliferation cultivation technology of *Lactobacillus*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012, 12(4): 107-113.
- [15] 包维臣. 德氏乳杆菌保加利亚亚种 ND02 高密度培养及冷冻保护的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2012.
- BAO W C. The study on high cell density culture and freeze-drying protection of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ND02[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2012.
- [16] 王英, 周剑忠, 施亚萍, 等. 副干酪乳杆菌 FM-LP-4 菌株的高密度培养条件优化[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(19): 211-215.
- WANG Y, ZHOU J Z, SHI Y P, et al. Optimization of high density culture conditions of *Lactobacillus paracasei* FM-LP-4[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2018, 46(19): 211-215.
- [17] 万红兵, 田洪涛, 马乐辉, 等. 保加利亚乳杆菌番茄复合汁增菌培养基的优选研究[J]. 中国乳品工业, 2006, 34(8): 14-17.
- WAN H B, TIAN H T, MA L H, et al. Screening and optimizing of *Lactobacillus bulgaricus* tomato juice compound enrichment medium[J]. China Dairy Industry, 2006, 34(8): 14-17.
- [18] 刘艳玲, 张媛, 赵丽娜, 等. 抗酸乳后酸化的研究进展[J]. 食品科技, 2018, 43(9): 104-108.
- LIU Y L, ZHANG Y, ZHAO L N, et al. Research progress on postacidification of yogurt[J]. Food Science and Technology, 2018, 43(9): 104-108.
- [19] 山丽杰. 利用真空冷冻干燥技术制备高效浓缩型酸奶发酵剂的研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2004.
- SHAN L J. The study on preparing high of effect concentrated yogurt starter by the technology of lyophilization[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2004.
- [20] 种克, 田洪涛, 桑亚新, 等. 双歧杆菌麦芽复合汁增菌培养基优选的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(3): 178-182.
- ZHONG K, TIAN H T, SANG Y X, et al. Optimization of reproducible wort medium for *Bifidobacteria*[J]. Food Science, 2007, 28(3): 178-182.
- [21] 卢海强, 谷新晰, 李晨, 等. 响应面法优化棒状乳杆菌 HS4 廉价增殖培养基研究[J]. 河北农业大学学报, 2017, 40(2): 51-55.
- LU H Q, GU X X, LI C, et al. Optimization of a low-cost medium for *Lactobacillus coryniformis* HS4 using response surface method[J]. Journal of Hebei Agricultural University, 2017, 40(2): 51-55.
- [22] 庞启亮, 霍贵成. 保加利亚乳杆菌 H⁺-ATPase 缺陷型菌株延缓后酸化及发酵性质的研究[J]. 东北农业大学学报, 2011, 42(2): 5-9.
- PANG Q L, HUO G C. Study on H⁺-ATPase deficient mutant of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bul-*

- garicus* to post-pone postacidification of yogurt and property of fermentation[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2011, 42(2): 5-9.
- [23] 姜庆玲, 丛美楠, 陈海生, 等. 德氏乳杆菌保加利亚亚种培养基及培养条件的优化[J]. 集美大学学报, 2016, 21(6): 401-409.
- JAIGN Q L, CONG M N, CHEN H S, et al. Optimization of medium constituents and fermentation conditions for *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*[J]. Journal of Jimei University, 2016, 21(6): 401-409.
- [24] 程艳宇, 李妍, 刘晓辉, 等. 优良保加利亚乳杆菌菌株的筛选及增殖培养[J]. 中国乳品工业, 2010, 38(7): 11-14.
- CHENG Y Y, LI Y, LIU X H, et al. Screening and multiplication culture of excellent *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* strains[J]. China Dairy Industry, 2010, 38(7): 11-14.
- [25] 康婕, 吕嘉桢, 刘洋. 不同蔬菜对保加利亚乳杆菌生长的影响[J]. 食品工业科技, 2013, 34(11): 156-159.
- KANG J, LÜ J L, LIU Y. Effects of different vegetables on the growth of *Lactobacillus bulgaricus*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(11): 156-159.
- [26] 刘洋. 影响益生菌活性因素的研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2013.
- LIU Y. The study of factors impact on probiotic activity[D]. Xi'an: Shaanxi University of Science & Technology, 2013.
- [27] 李佳. 一株保加利亚乳杆菌 LB5 高密度发酵及冻干工艺的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2013.
- LI J. Studies on high cell density culture and Freeze-drying processing of *Lactobacillus bulgaricus* LB5[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2013.

Shake Bottle Bacteria Enhancement Technology and Expansion Culture Experiment in Fermenter of Yogurt Weak Post-acidification Strain

Zhao Lina¹, Gong Junming¹, Zhang Na³, Li Chen^{1,5}, Tian Hongtao^{1,2,5*},
Wang Miaoshu^{4,5}, Kang Hongyan^{4,5}, Luo Yunbo⁶

¹College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, Hebei

²National Northern Mountain Areas Agricultural Engineering and Technology Research Center, Baoding 071001, Hebei

³College of Biochemical and Environmental Engineering, Baoding University, Baoding 071001, Hebei

⁴Hebei New Hope Tianxiang Dairy Co. Ltd, Baoding 071001, Hebei

⁵Hebei Technology Innovation Center of Probiotic Functional Dairy Product, Baoding 071001, Hebei

⁶College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083)

Abstract In view of the current backward technical level of high-efficiency direct-injection starter in China and the widespread problem of yoghurt post-acidification in applications, it is imperative to develop a weak post-acidification high-efficiency direct-injection starter with independent intellectual property rights. In this paper, the self-selected weak post-acidification *Lactobacillus bulgaricus* Lb-s1 rp-1 was used as the starting strain, and the proliferation culture was carried out on an optimized carrot juice complex bacteria culture medium. Firstly, the effects of single factors such as culture temperature, culture method, initial pH value of medium and inoculation amount on the growth of weak post-acidification strains were studied, and then the fermentation conditions of batch culture in shake flasks were optimized by L_9 (3^3) orthogonal experiment. The effects of pH adjustment, glucose feed supplementation, both pH adjustment and glucose feed supplementation on the growth of weak post-acidification strains were studied through expansion culture experiment in 50 L fermenter with batch expansion culture as a control. The results showed that the optimal bacterial growth conditions for the weak post-acidification *Lactobacillus bulgaricus* Lb-s1 rp-1 in laboratory shake flask batch culture were: the culture temperature was 37 °C, the initial pH of the medium was 6.5, and the amount of inoculation was 1.0%, static culture, under which process condition the strain was cultured, the time to reach the end of logarithmic growth was 6 h, and the number of live bacteria in the stationary phase was 2.28×10^{10} CFU/mL. The strains were

cultured in three different feeding methods in 50 L fermenter. The time to reach the end of logarithmic growth was 8, 6 h, and 8 h, respectively and the number of live bacteria in the stationary phase was 2.29×10^{10} , 2.39×10^{10} , 2.48×10^{10} CFU/mL, which was not significantly different from the number of live bacteria in batch expansion culture ($P > 0.05$). Therefore, it is feasible to expand the cultivation of weak post-acidification *Lactobacillus bulgaricus* Lb-s1 rp-1 by batch fermentation in 50 L fermenter. This study provides a low-cost cell proliferation culture technology for industrialized production of weak post-acidification *Lactobacillus bulgaricus* direct-injection yogurt starter, and also provided a reference for the study of other cell culture techniques of weakly acidified probiotic bacteria.

Keywords weak post-acidification *Lactobacillus bulgaricus*; shake bottle; bacterial enrichment process; 50 L fermenter; expanded culture