

基于最适营养解析的瑞士乳杆菌 H11 高密度培养基优化

聂新, 宗晓婕, 武弘理, 刘凯龙, 于洁, 姚国强*

(内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室 农业农村部奶制品加工重点实验室 内蒙古自治区乳品生物技术与工程重点实验室 乳酸菌与发酵乳制品省部共建协同创新中心 呼和浩特 010018)

摘要 目的:解析瑞士乳杆菌 H11 的最适营养需求,探究其成本低、活菌数高的培养基配方。方法:以活菌数、菌体密度、最大比生长速率为指标,通过单因素实验,Box-Behnken 响应面设计,确定瑞士乳杆菌 H11 的最适培养条件。结果:优化后的瑞士乳杆菌 H11 最佳静态发酵培养基配方为:乳糖 29.70 g/L,酵母浸粉 FM808 41.78 g/L,酵母蛋白胨 FP102 13.93 g/L,柠檬酸钠 2.02 g/L,无水乙酸钠 5.05 g/L, K_2HPO_4 2.02 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.20 g/L, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.06 g/L, Tween-80 1.00 g/L, L-半胱氨酸盐酸盐 0.30 g/L, 维生素 B₆ 0.01 g/L。优化后高密度培养的瑞士乳杆菌 H11 发酵液活菌数为 $(9.02 \pm 0.23) \times 10^9$ CFU/mL。结论:对瑞士乳杆菌 H11 最适培养条件的解析,确定了该菌可工业化生产的最适发酵工艺。在提高其活菌数的同时,降低了生产成本,为瑞士乳杆菌 H11 的工业化生产提供了理论依据。

关键词 瑞士乳杆菌; 营养需求解析; 高密度培养; 最大比生长速率; 响应面设计

文章编号 1009-7848(2024)10-0167-13 **DOI**: 10.16429/j.1009-7848.2024.10.016

瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)是从西方奶酪中分离出来的乳杆菌,属于乳杆菌属,最低生长温度为 15 °C,最高生长温度为 50 °C,呈乳白色或微黄色圆形或椭圆形菌落,属于同型培养菌株。可利用乳糖、葡萄糖、半乳糖、果糖、甘露糖、麦芽糖和蔗糖产乳酸,且产酸速率较快,具有降血压^[1]、抗菌^[2]、抗癌^[3]等良好的益生特性,被广泛用于食品^[4]、医学用品^[5]等领域中。

乳杆菌发酵培养基中主要营养成分有碳源、氮源、缓冲盐、生长因子和微量元素等。其中碳源和氮源最为重要。培养基中碳氮比对菌株高密度培养的影响十分显著^[6]。碳氮比过高时,菌株的增殖与代谢将十分缓慢;碳氮比过低时,菌株增殖会过于旺盛,从而导致培养基中代谢产物过多,对菌株的生长产生抑制作用^[7]。另外,培养基中缓冲盐与生长因子的种类与添加量等也对菌株的生长有显著的影响^[8]。缓冲盐中某些离子的类型和浓度对乳杆菌的生长和活性影响也不相同。菌体代谢途

径中关键酶可能需要一些辅助因子,例如:某些多价阳离子,如 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Mn^{2+} 等,因此,乳杆菌高密度培养过程中,应选择适合的营养物质及恰当的添加量^[9]。

高密度培养技术(High cell density culture, HCDC)一般是将菌液接种到含有培养基的生物反应器中,通过调控 pH 值、温度、搅拌速率、氧化还原电位等因素,使高密度培养后所得菌体活菌数和生物量相较普通静态培养呈倍数增长,从而达到降低生产成本,提高产率等目的。影响高密度培养的因素有培养基、培养温度、培养 pH 值等^[10]。

瑞士乳杆菌 H11 具有较好的益生特性和生长特性,而瑞士乳杆菌制品普遍存在活菌数低,难以实现工业化生产等问题。探究瑞士乳杆菌的高密度培养营养需求以及培养条件优化十分重要,对其工业化生产具有重要意义。本研究以菌株瑞士乳杆菌 H11 为研究对象,在 MRS 培养基的基础上,对瑞士乳杆菌 H11 培养基进行优化,包括促进瑞士乳杆菌 H11 生长的各类营养素的选择及其用量的确定,确定其最适营养需求,为后续的工业化生产提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株来源 瑞士乳杆菌 H11(*Lactobacillus*

收稿日期: 2023-10-19

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目(2022QN03021); 国家重点研发计划项目(2022YFD2100700); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助项目(CARS-36)

第一作者: 聂新,男,硕士生

通信作者: 姚国强 E-mail: yaoguoqiang1985@163.com

helveticus H11)由内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室乳酸菌菌种资源库(Lactic acid bacteria collection center, LABCC)保藏。

1.1.2 试验试剂及培养基 MRS 培养基:蛋白胨 10.00 g,牛肉浸粉 8.00 g,酵母浸粉 4.00 g,葡萄糖

20.00 g, Tween-80 1.00 g, K_2HPO_4 2.00 g, 无水乙酸钠 5.00 g, 柠檬酸三铵 2.00 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.20 g, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.05 g, 蒸馏水 1.00 L。

1.1.3 仪器与设备 本试验所设计的仪器设备如表 1 所示。

表 1 仪器与设备

Table 1 Instruments and equipment

试验设备	型号	生产厂家
试验室 pH 计	FE20	梅特勒-托利多仪器(上海有限公司)
高压灭菌锅	SX-500	日本 Tomy Digital Biology 公司
送风定温干燥箱	WFO-700	上海爱朗仪器有限公司
垂直流超净工作台	ZHJH-C1112C	上海智城分析仪器制造有限公司
酶标仪	Synergy H1	美国 BioTek 公司
恒温培养箱	DHP-9297	上海皖宁精密科学仪器有限公司
台式冷冻离心机	5810R	德国 Eppendorf 公司
全自动生长曲线测定仪	Bioscreen C	芬兰 Oy Growth Curves
电子显微镜	BX50	日本 Olympus 公司
平行生物反应器	GS-MFC1203	上海顾信生物科技有限公司

1.2 试验方法

1.2.1 菌种的活化 将在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱保藏的瑞士乳杆菌 H11 脱脂乳菌种管取出,置于无菌操作台解冻后,接种于 MRS 液体培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养(24.0 ± 0.5) h。活化至 3 代后以体积分数 5%接种至培养基中发酵。

1.2.2 菌体密度的测定 测定所用仪器为酶标仪 Synergy H1,使用时波长调为 600 nm,参数设置为检测前振荡 10 s,检查速度正常,不选择 path check 选项。所用耗材为 96 孔板,在无菌环境下,每个样孔内加入 200 μL 菌悬液,每种样品设置 3 个平行,计算平均值与标准差。

1.2.3 活菌数的测定 提前准备好 9 mL 无菌生理盐水试管,将培养后所得发酵液取 1 mL 注入试管为-1 梯度,随后梯度稀释取-7 和-8 梯度的稀释液 1 mL,注入到无菌培养皿中,每个梯度采用六平行试验组进行比对,用灭菌后的 MRS 固体培养基倾注法倾注 15 mL 至培养皿中,摇匀后待冷却凝固,放入 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中,厌氧培养(48.0 ± 0.5)h。培养结束后,统计数据计算平均值和标准差,单位为 CFU/mL。

1.2.4 瑞士乳杆菌 H11 的最适培养需求解析

1.2.4.1 瑞士乳杆菌 H11 的最适培养碳源需求解析 以 MRS 培养基为基础,分别采用 0.2%的可利用碳源取代 MRS 培养基中的碳源。结合最大比生长速率和活菌计数结果选取最适碳源。

1.2.4.2 瑞士乳杆菌 H11 的最适培养氮源需求解析 在上述试验筛选出碳源的基础上,用相同的方法,分别采用大豆蛋白胨、胰蛋白胨、鱼蛋白胨、牛肉膏粉、牛肝浸粉、牛肉浸粉、酪蛋白胨、脱盐乳清粉、酵母浸粉 FM802、酵母浸粉 FM902、酵母浸粉 FM986、酵母浸粉 FM803、酵母浸粉 FM808、酵母浸粉 FM502、酵母浸粉 FM985、酵母浸粉 FM888、酵母蛋白胨 FP103、酵母蛋白胨 FP102,共计 18 种氮源替代 MRS 培养基中的氮源,MRS 培养基为对照组,结合菌体密度、最大比生长速率和活菌计数结果选取最适氮源。

1.2.4.3 瑞士乳杆菌 H11 的最适培养碳氮总量及碳氮比需求解析 在以上试验结果的基础上,将不同碳氮比例和碳氮总量替换 MRS 培养基中原有的碳源和氮源,结合菌体密度、最大比生长速率和活菌计数结果选取最适碳氮比及碳氮总量。

优化梯度为 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%; 碳氮比为 1:

3,1:2,1:1,2:1,3:1。

1.2.4.4 瑞士乳杆菌 H11 的最适培养缓冲盐需求解析 根据优化得到的结果,将不同缓冲盐体系替换 MRS 培养基中的缓冲盐体系,结合菌体密度、最大比生长速率和活菌计数结果选取最适缓冲盐体系。

用于优化的缓冲盐体系为 Na_2HPO_4 /柠檬酸、柠檬酸/柠檬酸钠、 Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 / KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 / KH_2PO_4 、柠檬酸钠/乙酸钠/ K_2HPO_4 ; 浓度分别为 0.02,0.04,0.06,0.08,0.10 mol/L。

1.2.4.5 瑞士乳杆菌 H11 的最适培养微量元素需求解析 在上述优化试验的基础上,改变 MRS 培养基中的微量元素及含量,通过查询 Universal Protein 数据库 (<https://www.Uniprot.org/>) 可得瑞士乳杆菌 H11 关键酶的辅助因子。结合菌体密度、最大比生长速率和活菌计数结果,选取最适合瑞士乳杆菌 H11 生长的微量元素及浓度。

1.2.4.6 瑞士乳杆菌 H11 的最适培养生长因子需求解析 在上述优化试验的基础上,将 MRS 培养基中的生长因子替换为不同浓度维生素(维生素 B₁、维生素 B₂、维生素 B₃、维生素 B₄、维生素 B₅、维生素 B₆、维生素 B₉、维生素 C)和 β -胡萝卜素以及 L-半胱氨酸盐酸盐,结合菌体密度、最大比生长速率和活菌计数结果,选取最适合瑞士乳杆菌 H11 生长的生长因子及浓度。

1.2.4.7 瑞士乳杆菌 H11 的最适培养基主要成分响应面优化 在上述优化的培养基的基础上,用 Design-Expert.V8.0.6.1 软件中的 Box-Behnken Design 对瑞士乳杆菌 H11 培养基碳源、氮源、缓冲盐体系设计正交试验(见表 2)。

1.2.5 试验数据分析 差异性分析采用 IBM SPSS Statistics 26 进行数据处理。图形绘制采用 Microsoft Excel 2020 和 Origin 2022 软件制作。响应面设计采用 Design-Expert v8.0.6.1 软件进行设计与分析。以上试验都经过多次重复试验验证。

生长曲线拟合与生长参数估计采用 Logistic

方程 $y = \frac{a}{1 + \frac{a - y_0}{y_0} e^{-4W_{\max} x/a}}$ 进行拟合。式中: x 为

培养时间, h ; y 为菌体密度, CFU/mL; y_0 为初始菌

体密度, CFU/mL; a 为最大菌体密度值, CFU/mL; W_{\max} 为最大比生长速率, h^{-1} 。

2 结果与分析

2.1 瑞士乳杆菌 H11 培养基碳源优化

碳源是乳杆菌培养基中尤为重要的营养成分。本试验分别以半乳糖、葡萄糖、果糖、甘露糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖为碳源替换 MRS 培养基中的碳源。试验结果如表 3 所示。

表 3 反映了瑞士乳杆菌 H11 对 7 种不同碳源的利用情况。可以看出,在以乳糖为碳源时,瑞士乳杆菌 H11 的最大比生长速率最高,并显著高于其它组别 ($P < 0.05$)。其次是葡萄糖、蔗糖和半乳糖试验组,以麦芽糖、果糖、甘露醇为碳源时,瑞士乳杆菌 H11 的最大比生长速率相对较慢。为了对试验所得结果做进一步验证,后续的活菌计数结果表明,以乳糖作为碳源时,瑞士乳杆菌 H11 的活菌数显著高于其它组别 ($P < 0.05$)。Zang 等^[11]研究将乳糖添加到脱脂牛奶培养基中,从代谢相关酶活性、蛋白质组学和转录组学等方面,比较碳源

表 2 响应面试验因素与水平表

水平	因素		
	A 碳源含量/ (g/L)	B 氮源含量/ (g/L)	C 缓冲盐含 量/(g/L)
-1	23.30	46.60	7.00
0	26.65	53.30	8.50
1	30.00	60.00	10.00

表 3 不同碳源对瑞士乳杆菌 H11 的影响

Table 3 The effect of different carbon sources on *Lactobacillus helveticus* H11

编号	碳源(2.0%)	最大比生长速率/ h^{-1}	活菌数/ ($\times 10^8$ CFU/mL)
1	乳糖	0.203 \pm 0.005 ^a	5.39 \pm 0.23 ^a
2	葡萄糖	0.174 \pm 0.002 ^b	2.91 \pm 0.82 ^b
3	蔗糖	0.169 \pm 0.004 ^b	2.32 \pm 0.33 ^{bc}
4	麦芽糖	0.110 \pm 0.004 ^c	1.14 \pm 0.09 ^c
5	半乳糖	0.177 \pm 0.006 ^b	2.24 \pm 0.17 ^c
6	果糖	0.089 \pm 0.003 ^d	1.49 \pm 0.11 ^d
7	甘露糖	0.067 \pm 0.002 ^e	0.22 \pm 0.02 ^f

注:不同肩标字母表示数据间差异显著 ($P < 0.05$)。

对低糖和高糖培养基中瑞士乳杆菌生长增殖的影响,结果表明,在高乳糖浓度条件下,物质向细胞的转运速率和糖酵解途径(Embden-meyerhof-parnas,EMP)明显加快。赵宏飞^[12]通过乳糖调控优化瑞士乳杆菌的培养条件,并从相关代谢途径、关键酶活性变化以及基因转录水平、全细胞蛋白质组学、转录组学等方面,系统研究了乳糖对菌体细胞生长代谢的影响,最终将瑞士乳杆菌的细胞浓

度培养到了 3.98×10^9 CFU/mL。综上所述,最终选用乳糖作为碳源进行下一步研究。

2.2 瑞士乳杆菌 H11 培养基氮源优化

不同乳杆菌的营养需求、氨基酸需求、核苷酸合成能力以及蛋白质分解代谢能力也有着很大的差异。所以,培养基中氮源的筛选是提高菌株产量过程中的重中之重。试验结果如表4所示。

表4 不同氮源对瑞士乳杆菌 H11 的影响

Table 4 The effect of different nitrogen sources on *Lactobacillus helveticus* H11

编号	氮源	最大比生长速率/h ⁻¹	活菌数/($\times 10^9$ CFU/mL)	编号	氮源	最大比生长速率/h ⁻¹	活菌数/($\times 10^9$ CFU/mL)
1	酵母蛋白胨 FP103	0.164 \pm 0.007 ^e	1.20 \pm 0.05 ^c	10	酵母浸粉 FM808	0.223 \pm 0.005 ^a	1.80 \pm 0.16 ^a
2	酵母蛋白胨 FP102	0.210 \pm 0.008 ^b	1.73 \pm 0.13 ^a	11	大豆蛋白胨	0.172 \pm 0.005 ^{de}	0.74 \pm 0.12 ^s
3	酵母浸粉 FM802	0.182 \pm 0.005 ^d	1.05 \pm 0.06 ^c	12	牛肉膏	0.095 \pm 0.003 ^{hi}	0.20 \pm 0.05 ^b
4	酵母浸粉 FM502	0.198 \pm 0.008 ^c	1.30 \pm 0.05 ^c	13	牛肝浸粉	0.086 \pm 0.002 ⁱ	0.24 \pm 0.02 ^b
5	酵母浸粉 FM503	0.201 \pm 0.001 ^{bc}	1.20 \pm 0.05 ^{de}	14	牛肉浸粉	0.166 \pm 0.004 ^c	1.10 \pm 0.09 ^{de}
6	酵母浸粉 FM986	0.181 \pm 0.006 ^d	0.94 \pm 0.07 ^f	15	胰蛋白胨	0.103 \pm 0.004 ^{gh}	0.07 \pm 0.01 ⁱ
7	酵母浸粉 FM888	0.164 \pm 0.004 ^e	1.21 \pm 0.10 ^{cd}	16	鱼蛋白胨	0.107 \pm 0.003 ^g	0.07 \pm 0.01 ⁱ
8	酵母浸粉 FM902	0.198 \pm 0.005 ^c	1.48 \pm 0.09 ^b	17	酪蛋白胨	0.103 \pm 0.004 ^{gh}	0.02 \pm 0.01 ⁱ
9	酵母浸粉 FM985	0.202 \pm 0.006 ^{bc}	1.39 \pm 0.14 ^b	18	复合氮源(MRS)	0.149 \pm 0.002 ^f	0.29 \pm 0.08 ^b

注:不同肩标字母表示数据间差异显著($P < 0.05$)。

表4反映了瑞士乳杆菌 H11 对 17 种不同氮源的利用情况。其中瑞士乳杆菌 H11 对酵母浸粉 FM808、酵母蛋白胨 FP102 的利用能力最强;其次为大豆蛋白胨、牛肉浸粉、酵母浸粉 FM985、酵母蛋白胨 FP103、酵母浸粉 FM802、酵母浸粉 FM502、酵母浸粉 FM503、酵母浸粉 FM986、酵母浸粉 FM888 和酵母浸粉 FM902;牛肉膏、牛肝浸

粉、酪蛋白胨、胰蛋白胨、鱼蛋白胨的利用能力显著低于 MRS 培养基中的复合氮源($P < 0.05$);综合考虑,最终选择酵母浸粉 FM808 和酵母蛋白胨 FP102 作为瑞士乳杆菌 H11 的最优单一氮源。由于两者的差异并不显著($P > 0.05$),故选择酵母浸粉 FM808 和酵母蛋白胨 FP102 进行复配,结果如表5所示。

表5 不同氮源复配比对瑞士乳杆菌 H11 的影响

Table 5 The effect of different proportions of mixed nitrogen sources on *Lactobacillus helveticus* H11

编号	氮源类别	最大比生长速率/h ⁻¹	活菌数/($\times 10^9$ CFU/mL)
1	酵母浸粉 FM808:酵母蛋白胨 FP102=1:1	0.224 \pm 0.007 ^c	1.75 \pm 0.13 ^b
2	酵母浸粉 FM808:酵母蛋白胨 FP102=1:2	0.208 \pm 0.008 ^{bc}	1.35 \pm 0.09 ^d
3	酵母浸粉 FM808:酵母蛋白胨 FP102=1:3	0.204 \pm 0.009 ^c	1.43 \pm 0.15 ^{cd}
4	酵母浸粉 FM808:酵母蛋白胨 FP102=2:1	0.222 \pm 0.010 ^b	1.50 \pm 0.07 ^c
5	酵母浸粉 FM808:酵母蛋白胨 FP102=3:1	0.239 \pm 0.008 ^a	1.96 \pm 0.16 ^a
6	酵母浸粉 FM808	0.223 \pm 0.005 ^{ab}	1.80 \pm 0.16 ^{ab}
7	酵母蛋白胨 FP102	0.210 \pm 0.008 ^{bc}	1.73 \pm 0.13 ^b
8	复合氮源(MRS)	0.149 \pm 0.002 ^d	0.29 \pm 0.08 ^c

注:不同肩标字母表示数据间差异显著($P < 0.05$)。

由表 5 可知,当以酵母浸粉 FM808 和酵母蛋白胨 FP102 以 1:1 和 3:1 比例复配替换掉 MRS 培养基中 2.2% 的氮源时,瑞士乳杆菌 H11 发酵液的活菌数以及最大比生长速率均显著高于单一氮源时的活菌数和最大比生长速率($P < 0.05$);当使用复配比为 3:1 的酵母浸粉 FM808 和酵母蛋白胨 FP102 作为氮源时,瑞士乳杆菌 H11 的活菌数为 $(1.96 \pm 0.16) \times 10^9$ CFU/mL,比优化前 MRS 培养基的活菌数提高了 6.75 倍,因此判断出酵母浸粉 FM808 和酵母蛋白胨 FP102 以 3:1 的复配方法为瑞士乳杆菌 H11 培养基的最适氮源。

2.3 瑞士乳杆菌 H11 培养基碳氮总量及比例优化

碳源和氮源在发酵培养基中十分重要,二者的添加量不同对培养结果的影响显著^[13]。本研究选取的碳氮总量范围为 1%~12%,碳氮比例分别为 1:1,1:2,1:3,2:1,3:1,试验结果如图 1 所示。

如图 1 所示,碳源、氮源的添加量比值对菌体的生长影响十分显著($P < 0.05$)。可以看出,碳源的添加量小于或等于氮源添加量时,培养基的菌体密度显著优于碳源的添加量大于氮源添加量的培养基,碳氮比在 1:2 时,菌体密度最高;当碳氮总量到达 7%,其菌体密度在碳氮比为 1:2 时,出现最高点,故以菌体密度为筛选指标,选择 7%,1:2;7%,1:3;9%,1:2;9%,1:3 这 4 个组别进行下一步活菌计数试验,结果见图 2。

由活菌计数结果可知,碳氮总量和碳氮比分别为 7% 和 1:2 时,瑞士乳杆菌 H11 活菌数为 $(2.46 \pm 0.23) \times 10^9$ CFU/mL,碳氮总量和碳氮比分别为 9% 和 1:2 时,瑞士乳杆菌 H11 活菌数为 $(2.50 \pm 0.14) \times 10^9$ CFU/mL,两者的差异并不显著,考虑到工业化生产中成本的问题,最终选取碳氮添加量比例为 1:2,碳氮添加量总量为 7% 进行下一步试验。

2.4 瑞士乳杆菌 H11 培养基缓冲盐的优化

缓冲盐体系在乳杆菌发酵中主要可以起到调节细胞渗透压的作用,还可以缓解低 pH 值环境造成的菌体抑制现象。有研究证明,当游离酸质量浓度超过 0.45~0.60 g/L 时,瑞士乳杆菌的生长将受到限制^[14]。不同缓冲盐对瑞士乳杆菌 H11 的影响如表 6 所示。

如表 6 所示,不同缓冲盐体系和质量浓度下,

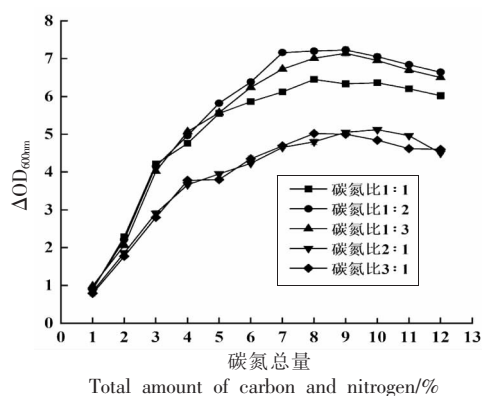
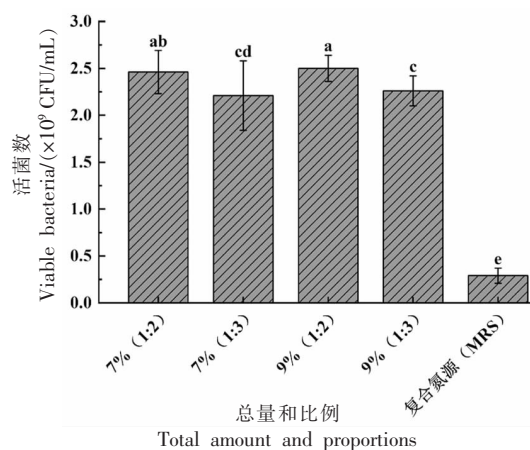


图 1 不同碳氮总量及碳氮比对瑞士乳杆菌 H11 的影响

Fig.1 The effect of different total amount of carbon and nitrogen and proportions on *Lactobacillus helveticus* H11



注:不同肩标字母表示数据间差异显著($P < 0.05$)。

图 2 不同碳氮总量及碳氮比对瑞士乳杆菌 H11 活菌数的影响

Fig.2 The effect of different total amount of carbon and nitrogen and proportions on the viable bacteria count of *Lactobacillus helveticus* H11

瑞士乳杆菌 H11 的菌体密度也不同。与空白对照相比,不同的缓冲盐体系对瑞士乳杆菌 H11 的增殖效果显著,选取每个缓冲盐体系的最优浓度进行活菌计数,结果如图 3 所示。

最终选取 0.08 mol/L 柠檬酸钠/乙酸钠/ K_2HPO_4 作为缓冲盐体系进行下一步试验。

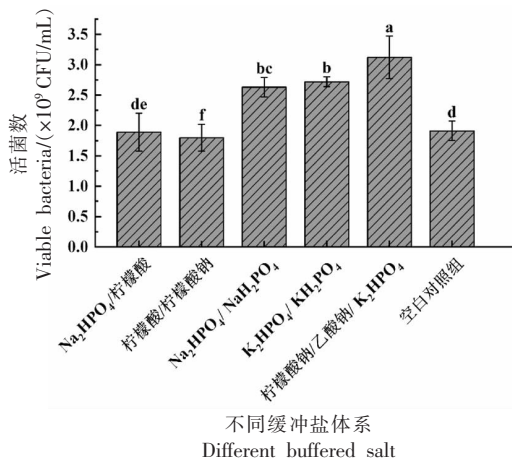
2.5 瑞士乳杆菌 H11 培养基微量元素的优化

在培养基中添加微量元素可以作为菌株代谢过程中关键酶的辅助因子,对微生物的繁殖至关重要。有研究报道,许多乳杆菌的代谢过程中的关键酶均对 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 敏感^[15]。瑞士乳杆菌的代谢途

表6 不同缓冲盐体系对瑞士乳杆菌 H11 菌体密度的影响 (ΔOD_{600nm})

Table 6 The effect of different buffered salt on optical density of *Lactobacillus helveticus* H11 (ΔOD_{600nm})

缓冲盐体系	缓冲盐浓度/(mol/L)				
	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10
Na ₂ HPO ₄ /柠檬酸	5.96 ± 0.03	5.86 ± 0.09	5.83 ± 0.07	5.72 ± 0.02	5.65 ± 0.04
柠檬酸/柠檬酸钠	5.95 ± 0.06	5.80 ± 0.08	5.82 ± 0.07	5.79 ± 0.05	5.89 ± 0.11
Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄	6.37 ± 0.07	6.42 ± 0.05	6.31 ± 0.04	6.34 ± 0.012	6.37 ± 0.37
Na ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄	6.32 ± 0.05	6.31 ± 0.07	6.29 ± 0.02	6.25 ± 0.03	6.23 ± 0.04
K ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄	6.19 ± 0.03	6.24 ± 0.04	6.13 ± 0.04	6.16 ± 0.02	6.21 ± 0.06
柠檬酸钠/乙酸钠/ K ₂ HPO ₄	7.01 ± 0.03	7.12 ± 0.05	7.13 ± 0.06	7.24 ± 0.04	7.20 ± 0.05
空白对照			6.04 ± 0.05		
MRS 对照组			3.53 ± 0.19		



注:不同肩标字母表示数据间差异显著 ($P < 0.05$)。

图3 不同缓冲盐体系对瑞士乳杆菌 H11 活菌数的影响
Fig.3 The effect of different buffered salt on the viable bacteria count of *Lactobacillus helveticus* H11

径及关键酶活如图4所示。

通过查询 Universal Protein 数据库 (<https://www.Uniprot.org/>) 可得关键酶的辅助因子。由表7可知,β-半乳糖苷酶的辅助因子可以是 Mg²⁺、Mn²⁺或 Fe²⁺[16], Mn²⁺、Fe²⁺两者可相互替代并优先于 Mg²⁺; 己糖激酶的主要辅助因子是 Mg²⁺, 其次是 Zn²⁺、Fe²⁺和 Mn²⁺[17]; 磷酸葡萄糖异构酶、磷酸果糖激酶、3-磷酸甘油酸激酶、磷酸甘油激酶、烯醇化酶、丙酮酸激酶的辅助因子是 Mg²⁺; 醛缩酶的辅助因子是 Zn²⁺; 3-磷酸甘油脱氢酶的辅助因子是 NAD; 乳酸脱氢酶的辅助因子是 FAD。

瑞士乳杆菌在代谢乳糖途径中主要辅助因子为 Mg²⁺、Mn²⁺、Zn²⁺、Fe²⁺, 故后续不对其余微量元素进行研究。

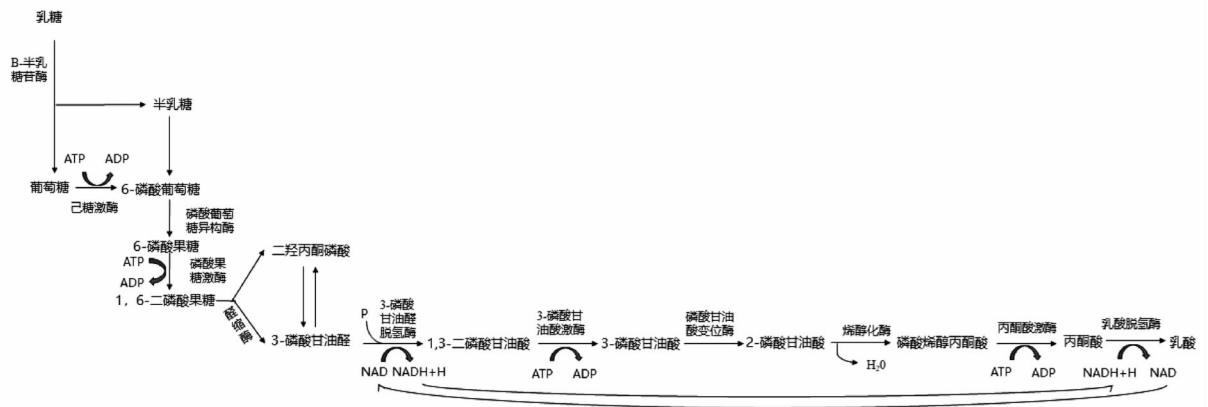


图4 瑞士乳杆菌 H11 的代谢途径

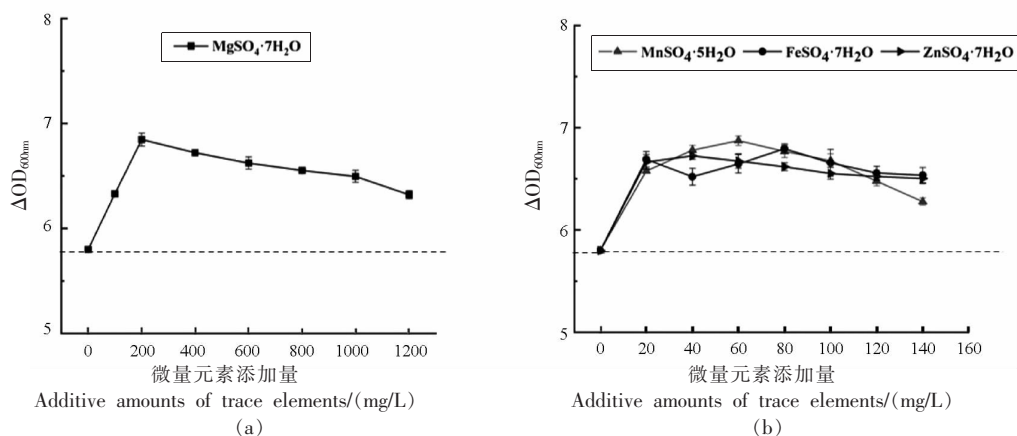
Fig.4 Metabolic pathway of *Lactobacillus helveticus* H11

表 7 瑞士乳杆菌乳糖代谢途径中的关键酶及其辅助因子

Table 7 The key enzymes and cofactors in the glucose metabolism pathway of *Lactobacillus helveticus*

编号	关键酶	辅助因子	编号	关键酶	辅助因子
1	β -半乳糖苷酶	$Mn^{2+}, Fe^{2+} > Mg^{2+}$	7	3-磷酸甘油酸激酶	Mg^{2+}
2	己糖激酶	$Co^{2+}, Mg^{2+} > Zn^{2+}, Fe^{2+}, Mg^{2+}$	8	磷酸甘油激酶	Mg^{2+}
3	磷酸葡萄糖异构酶	Mg^{2+}	9	烯醇化酶	Mg^{2+}
4	磷酸果糖激酶	Mg^{2+}	10	丙酮酸激酶	Mg^{2+}, K
5	醛缩酶	Zn^{2+}	11	乳酸脱氢酶	FAD
6	3-磷酸甘油脱氢酶	NAD			

注: $Mg^{2+} > Mn^{2+}$ 表示该酶与 Mg^{2+} 结合具有更高效率。



注: 图中虚线为瑞士乳杆菌 H11 在空白对照组中的菌体密度。

图 5 不同微量元素添加量对瑞士乳杆菌 H11 的影响

Fig.5 The effect of different additive amounts of trace elements on *Lactobacillus helveticus* H11

由图 5 可知, 添加 0.20 g/L 的 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 0.06 g/L 的 $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 时, 瑞士乳杆菌 H11 的菌体密度显著高于其它组别 ($P < 0.05$)。选取 0.20 g/L 的 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 0.06 g/L 的 $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 及两者复配进行活菌计数试验, 结果如图 6 所示。

由图 6 可知, 当培养基中添加 0.20 g/L 的 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 时, 瑞士乳杆菌 H11 的活菌数为 $(2.64 \pm 0.13) \times 10^9$ CFU/mL; 加入 0.06 g/L 的 $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 活菌数为 $(2.42 \pm 0.19) \times 10^9$ CFU/mL; 同时加入 0.20 g/L 的 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 0.06 g/L 的 $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 活菌数为 $(3.31 \pm 0.15) \times 10^9$ CFU/mL, 显著高于单独加 0.20 g/L 的 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 0.06 g/L 的 $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 的组别 ($P < 0.05$)。刘乔^[18]在对瑞士乳杆菌 IMAU60208 的培养基微量元素的研究中, 也选择 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 $MnSO_4 \cdot 5H_2O$, 与本研究结果一致, 所以本研究最终选用 0.20 g/L 的 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 0.06 g/L 的 $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 复配作为培养基

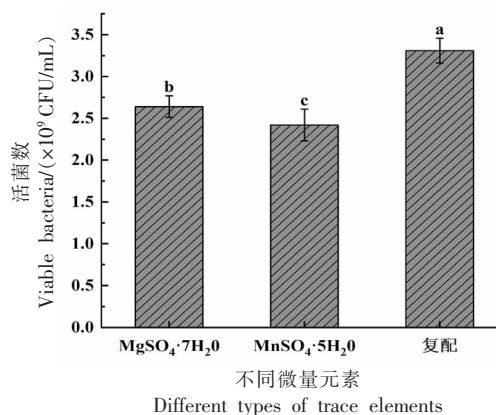


图 6 不同种类微量元素对瑞士乳杆菌 H11 活菌数的影响
Fig.6 The effect of different types of trace elements on the viable bacteria count of *Lactobacillus helveticus* H11

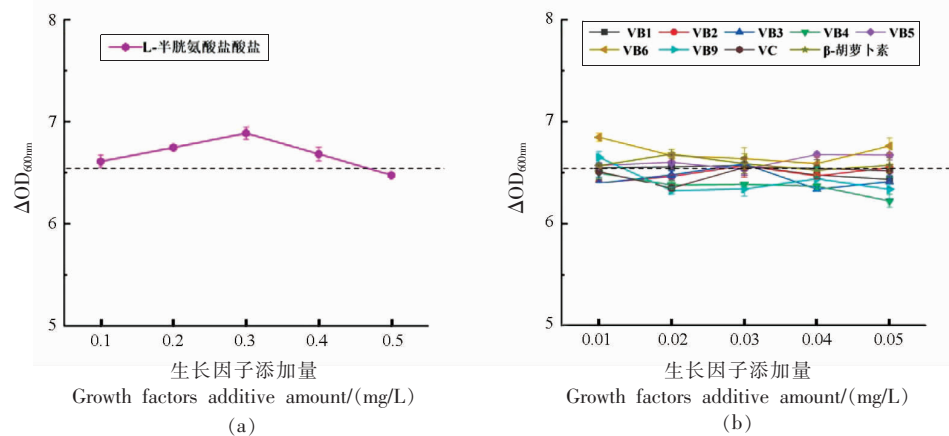
微量元素。

2.6 瑞士乳杆菌 H11 培养基生长因子的优化

乳杆菌的增殖还需要一些小分子的生长因子

类物质。生长因子又称生长物质、增殖因子,是一类能促进乳杆菌生长繁殖且在结构和性质方面不完全相同的物质^[19]。瑞士乳杆菌是一种氨基酸营养缺陷型菌株,本研究选用的酵母浸粉 FM986 和 FP103 富含多肽、氨基酸、维生素和核苷酸等物

质,额外添加氨基酸对瑞士乳杆菌 H11 的生长并没有起到明显的作用,所以后续不再研究氨基酸类的生长因子。不同生长因子对瑞士乳杆菌 H11 菌体密度的影响见图 7。



注:图中虚线为瑞士乳杆菌 H11 在空白对照组中的菌体密度。

图 7 不同生长因子对瑞士乳杆菌 H11 菌体密度的影响

Fig.7 The effect of different growth factors on the optical density of *Lactobacillus helveticus* H11

从图 7 可以看出,不同的生长因子以及不同的添加量都对瑞士乳杆菌 H11 有一定的影响,不同组别的影响差异显著($P < 0.05$)。如图所示,*L*-半胱氨酸盐酸盐以及部分的维生素对瑞士乳杆菌 H11 的生长具有促进作用,其中作用最显著的为 0.30 g/L 的 *L*-半胱氨酸盐酸盐,以及 0.01 g/L 的维生素 B₆,根据上述试验结果,对添加 0.30 g/L 的 *L*-半胱氨酸盐酸盐为生长因子的培养基和添加 0.01 g/L 的维生素 B₆ 为生长因子的培养基,以及同时添加二者的培养基进行活菌计数试验,结果见图 8。

如图 8 所示,单独加入 0.30 g/L 的 *L*-半胱氨酸盐酸盐活菌数为 $(3.35 \pm 0.20) \times 10^9$ CFU/mL;单独添加 0.01 g/L 的维生素 B₆ 活菌数为 $(3.20 \pm 0.29) \times 10^9$ CFU/mL。同时添加二者的活菌数为 $(3.65 \pm 0.15) \times 10^9$ CFU/mL,显著高于单独加入其一时的活菌数($P < 0.05$)。综合考虑活菌数和菌体密度,最终选择 0.30 g/L 的 *L*-半胱氨酸盐酸盐和 0.01 g/L 的维生素 B₆ 为生长因子进行后续研究。

2.7 培养基主成分的响应面分析

如今响应面法已经广泛的运用到了各种培养领域中^[20-21]。本研究采用 Design Expert V8.0.6.1

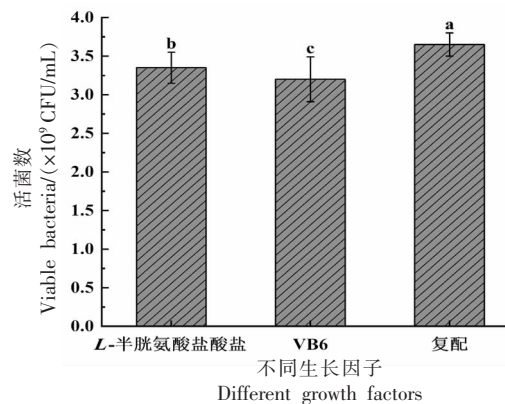


图 8 不同生长因子对瑞士乳杆菌 H11 活菌数的影响

Fig.8 The effect of different growth factors on the viable bacteria count of *Lactobacillus helveticus* H11

软件中的 BOX-Behnken 以菌体密度(ΔOD_{600nm})为评价指标,对培养基主要成分碳源(A)、氮源(B)、缓冲盐体系(C)含量进行优化,具体设计及结果见表 8。

碳源(A)、氮源(B)、缓冲盐体系(C)与菌体密度(ΔOD_{600nm})的二次多项式回归模型方程如下:

$$\Delta OD_{600nm} = 9.11 + 1.29A + 0.85B + 0.30C + 0.68AB + 0.068AC + 0.31BC - 2.39A^2 - 2.21B^2 - 0.60C^2.$$

各项方差分析结果如表 9 所示。

表 8 瑞士乳杆菌 H11 的中心组合设计结果

Table 8 Central composite design results of *Lactobacillus helveticus* H11

试验号	A 碳源添 加量/(g/L)	B 氮源添 加量/(g/L)	C 缓冲盐 添加量/ (g/L)	菌体密度 (ΔOD_{600nm})	试验号	A 碳源添 加量/(g/L)	B 氮源添 加量/(g/L)	C 缓冲盐 添加量/ (g/L)	菌体密度 (ΔOD_{600nm})
1	0	0	0	8.976	10	0	0	0	9.463
2	1	-1	0	4.026	11	1	0	-1	7.29
3	-1	-0	-1	4.333	12	0	0	0	8.684
4	-1	-1	0	3.312	13	0	1	-1	6.565
5	0	-1	-1	5.445	14	1	0	1	8.034
6	-1	1	0	3.625	15	0	-1	1	5.421
7	1	1	0	7.051	16	0	0	0	8.597
8	-1	0	1	4.807	17	0	1	1	7.778
9	0	0	0	9.814					

表 9 二次多项式模型的系数及其方差分析

Table 9 Coefficients and ANOVA for the developed quadratic polynomial model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	72.32	9	8.04	34.99	<0.0001
A	13.32	1	13.32	58.02	0.0001
B	5.81	1	5.81	25.28	0.0015
C	0.72	1	0.72	3.15	0.1190
AB	1.84	1	1.84	8.01	0.0254
AC	0.018	1	0.018	0.079	0.7863
BC	0.38	1	0.38	1.67	0.2378
A ²	24.15	1	24.15	105.15	<0.0001
B ²	20.54	1	20.54	89.43	<0.0001
C ²	1.50	1	1.50	6.51	0.0380
残差项	1.61	7	0.23		
失拟项	0.52	3	0.17	0.65	0.6251
误差	1.08	4	0.27		
总和	73.93	16			

$R^2=0.9783$ $R_{adj}^2=0.9503$

注: $P < 0.05$ 差异显著, $P < 0.01$ 差异极显著。

结果表明,一次项 A,二次项 A²、B² 对瑞士乳杆菌 H11 菌体密度有极显著影响 ($P < 0.01$),一次项 B、交叉项 AB 和二次项 C² 对瑞士乳杆菌 H11 菌体密度有显著影响 ($P < 0.05$)。整体模型极显著 ($P < 0.01$); $R^2=0.9783$, $R_{adj}^2=0.9503$, 说明方程与试验的拟合度良好。采用 Design-Expert 软件分析培养基中碳源(A)、氮源(B)、缓冲盐体系(C)的变化对瑞士乳杆菌 H11 的影响,做等高线图及响应面图,结果如图 9 所示。

从 Box-Behnken 设计最终得出 Contour 图和

3D Surface 图中可以看出,培养基中的碳源、氮源含量初步开始增大时,菌体密度随之增大,然而增大到一定程度后,菌体密度反而开始下降,说明碳源、氮源之间的关系对菌体的生长有显著影响 ($P < 0.05$)。而碳源与缓冲盐、氮源与缓冲盐之间的关系对菌体密度影响不显著 ($P > 0.05$)。

Box-Behnken 设计最终得出最优添加量:碳源为 29.70 g/L,氮源为 55.71 g/L,缓冲盐为 9.10 g/L,预测最大值 (ΔOD_{600nm}) 为 8.63,后期实测为 8.59,与预测值差异不显著 ($P > 0.05$)。故认为响应

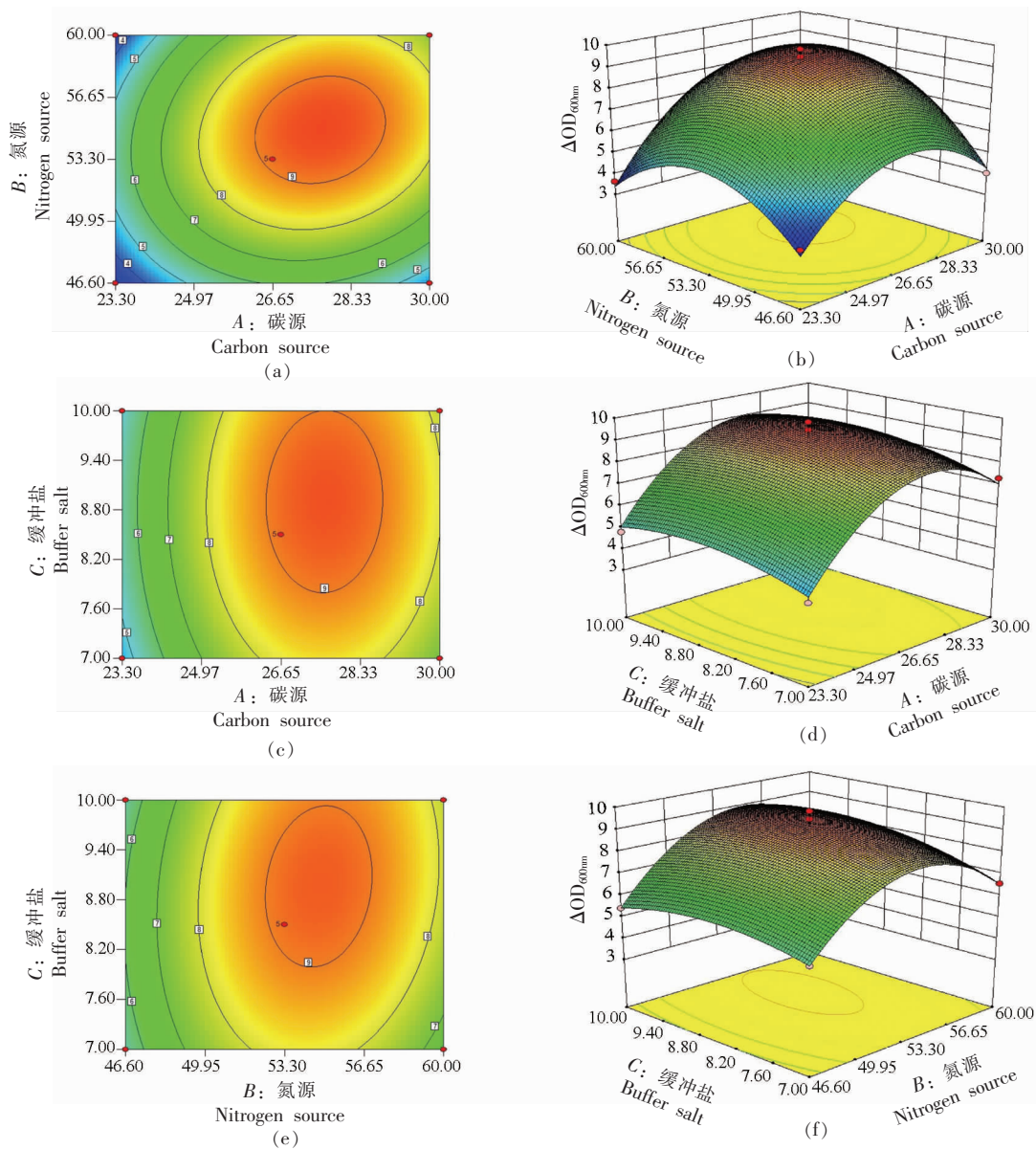


图9 因素交互作用响应面图及相应的等高线图

Fig.9 Response surface plot and contour map of interactive effects of various factors

面优化得到的数据准确度较高。

2.8 静态培养验证

确定瑞士乳杆菌 H11 的静态培养条件为培养温度 37 ℃, 接种量 2%, 培养基最适 pH 6.50。采用优化培养基配方及最佳静态培养条件, 对该菌进行厌氧培养, 静态培养活菌数为 $(3.62 \pm 0.15) \times 10^9$ CFU/mL, 较 MRS 培养基 $(2.9 \pm 0.08) \times 10^8$ CFU/mL 提升了 11.24 倍。

2.9 高密度培养验证

瑞士乳杆菌 H11 的高密度培养工艺为: 培养

温度 37 ℃, 初始 pH 6.50, 恒定 pH 5.90, 中和剂为 25% 的氨水, 保压气体为氮气, 搅拌速度为 200 r/min, 在平行生物反应器 (2 L) 中进行高密度培养, 最终瑞士乳杆菌 H11 发酵液活菌数为 $(9.02 \pm 0.23) \times 10^9$ CFU/mL, 较高密度培养之前 $(3.62 \pm 0.15) \times 10^9$ CFU/mL 提高了 2.5 倍。

3 结论

本研究通过对瑞士乳杆菌 H11 的最适营养需求解析得到培养基: 乳糖 29.70 g/L, 酵母浸粉

FM808 41.78 g/L, 酵母蛋白胨 FP102 13.93 g/L, 柠檬酸钠 2.02 g/L, 乙酸钠 5.05 g/L, K_2HPO_4 2.02 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.20 g/L, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.06 g/L, Tween-80 1.00 g/L, L-半胱氨酸盐酸盐 0.30 g/L, 维生素 B₆ 0.01 g/L。在静态培养条件为培养温度 37 ℃, 接种量 2%, 培养基最适 pH 6.50 时, 活菌数为 $(3.62 \pm 0.15) \times 10^9$ CFU/mL, 较 MRS 培养基 $(2.9 \pm 0.08) \times 10^8$ CFU/mL 提升了 11.24 倍。以培养温度 37 ℃, 初始 pH 6.50, 恒定 pH 5.90, 中和剂为 25% 的氨水, 保压气体为氮气, 搅拌速度为 200 r/min 为培养条件, 在 2 L 发酵罐中培养活菌数为 $(9.02 \pm 0.23) \times 10^9$ CFU/mL, 较高密度培养之前 $(3.62 \pm 0.15) \times 10^9$ CFU/mL 提高了 2.5 倍。

【致谢】

感谢内蒙古农业大学高层次/优秀博士人才引进科研启动项目(NDYB2021-17); 内蒙古农业大学食品科学与工程学院科技计划项目(SPKJ 202206)的支持。

参 考 文 献

- [1] 薛建岗. 甘肃地区传统发酵乳中具有 ACE 抑制活性瑞士乳杆菌的筛选及其发酵特性的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2013.
XUE J G. Screening of *Lactobacillus helveticus* with ACE inhibitory activity from traditional fermented milk in Gansu and its fermentation characteristics[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2013.
- [2] 董雨馨, 谢远红, 张策, 等. 瑞士乳杆菌 M14-1 所产细菌素的分离纯化及抑菌特性分析[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(8): 1437-1443.
DONG Y X, XIE Y H, ZHANG C, et al. Isolation and purification of bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* M14-1 and analysis of its antibacterial characteristics[J]. Natural Product Research and Development, 2018, 30(8): 1437-1443.
- [3] 尤秀. 藏灵菇源瑞士乳杆菌 LZ-R-5 和戊糖乳杆菌 LZ-R-17 免疫调节、抗肿瘤及肠道益生功能研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2020.
YOU X. Study on immunomodulation, antitumor and intestinal prebiotics of *Lactobacillus helveticus* LZ-R-5 and *Lactobacillus pentosus* LZ-R-17 from Tibetan mushroom [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2020.
- [4] AI J, LI A L, SU B X, et al. Multi-cereal beverage fermented by *Lactobacillus helveticus* and *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Food Science, 2015, 80(6): 1259-1265.
- [5] AUTHIER H, SALON M, RAHABI M, et al. Oral administration of *Lactobacillus helveticus* LA401 and *Lactobacillus gasseri* LA806 combination attenuates oesophageal and gastrointestinal candidiasis and consequent gut inflammation in mice[J]. Journal of Fungi (Basel, Switzerland), 2021, 7(1): 69-72
- [6] 李娜, 杨江华, 韦宇拓. 植物乳杆菌 ZJ316 高密度发酵条件优化[J]. 中国酿造, 2021, 40(5): 43-48.
LI N, YANG J H, WEI Y T. Optimization of high-density fermentation conditions for *Lactobacillus plantarum* ZJ316[J]. China Brewing, 2021, 40(5): 43-48.
- [7] ZHAO Y, XU Y F, YU F, et al. Identification of a novel phospholipase D gene and effects of carbon sources on its expression in *Bacillus cereus* ZY12[J]. Journal of Microbiology (Seoul, Korea), 2018, 56(4): 264-271.
- [8] DUPORT C, MADEIRA J P, FARJAD M, et al. Methionine sulfoxide reductases contribute to anaerobic fermentative metabolism in *Bacillus cereus* [J]. Antioxidants (Basel, Switzerland), 2021, 10(5): 154-159.
- [9] 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.
- [10] MAKINO T, YAMASHITA M, TAKEUCHI N, et al. *Lactobacillus helveticus* SBT2171 alleviates allergic symptoms in a murine model for pollen allergy [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2019, 83(12): 2298-2306.
- [11] ZANG J Y, WANG T, PIOTR D, et al. Increasing lactose concentration is a strategy to improve the proliferation of *Lactobacillus helveticus* in milk [J]. Food Science & Nutrition, 2021, 9(2): 1050-1060.
- [12] 赵宏飞. 乳糖对瑞士乳杆菌生长代谢影响及高密度培养研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2014.

- ZHAO H F. Effects of lactose on growth and metabolism of *Lactobacillus helveticus* and high density culture[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2014.
- [13] 姚国强, 张雪梅, 高志敏, 等. *Lactobacillus reuteri* IMAU10240 增殖培养基及高密度培养工艺优化[J]. 食品科学, 2017, 38(14): 97-105.
- YAO G Q, ZHANG X M, GAO Z M, et al. Optimization of *Lactobacillus reuteri* IMAU10240 proliferation medium and high-density culture process[J]. Food Science, 2017, 38(14): 97-105.
- [14] GÄTJE G, GOTTSCHALK G. Limitation of growth and lactic acid production in batch and continuous cultures of *Lactobacillus helveticus* [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 1991, 34(4): 446-449.
- [15] GARFINKEL L, GARFINKEL D. Magnesium regulation of the glycolytic pathway and the enzymes involved[J]. Magnesium, 1985, 4(2/3): 60-72.
- [16] BANERJEE G, RAY A, HASAN K N. Is divalent magnesium cation the best cofactor for bacterial β -galactosidase? [J]. Journal of Biosciences, 2018, 43(5): 941-945.
- [17] CHENAULT H K, MANDES R F, HORNBERGER K R. Synthetic utility of yeast hexokinase. Substrate specificity, cofactor regeneration, and product isolation[J]. The Journal of Organic Chemistry, 1997, 62(2): 331-336.
- [18] 刘乔. *Lactobacillus helveticus* IMAU60208 高密度发酵工艺研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2016.
- LIU Q. Research on high-density fermentation process of *Lactobacillus helveticus* IMAU60208[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2016.
- [19] 欧阳佳, 王钰, 吴广, 等. 乳酸菌促生长因子的研究[J]. 激光生物学报, 2021, 30(2): 110-116.
- OUYANG J, WANG Y, WU G, et al. Study on growth promoting factors of lactic acid bacteria [J]. Acta Laser Biology Sinica, 2021, 30(2): 110-116.
- [20] 胡楠, 杨强强, 雷鸣, 等. 响应面法优化蓝莓生料乳酸菌发酵工艺[J]. 食品科技, 2021, 46(6): 20-28.
- HU N, YANG Q Q, LEI M, et al. Optimization of lactic acid bacteria fermentation process for blueberry raw material using response surface methodology [J]. Food Technology, 2021, 46(6): 20-28.
- [21] 刘依盟, 鲍正好, 马倩, 等. 响应面法优化乳酸菌抽提物的制备工艺研究[J]. 中国酿造, 2022, 41(9): 144-149.
- LIU Y M, BAO Z H, MA Q, et al. Optimization of the preparation process of lactic acid bacteria extract using response surface methodology [J]. China Brewing, 2022, 41(9): 144-149.

Optimization of *Lactobacillus swissensis* H11 High-Density Medium Based on Optimal Nutritional Analysis

Nie Xin, Zong Xiaojie, Wu Hongli, Liu Kailong, Yu Jie, Yao Guoqiang*

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Key Laboratory of Dairy Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Inner Mongolia Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Collaborative Innovative Center of Ministry of Education for Lactic Acid Bacteria and Fermented Dairy Products, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018)

Abstract Objective: To analyze the optimal nutritional requirements of *Lactobacillus helveticus* H11, so as to explore its low cost and high viable count medium formulation. Methods: The optimal nutritional requirements of *Lactobacillus helveticus* H11 were determined by single-factor experiment with Box-Behnken response surface test design using viable bacterial count, bacterial density and maximum specific growth rate as indicators. Results: The optimized optimal static fermentation medium formulation of *Lactobacillus helveticus* H11 was obtained as follows: lactose 29.70 g/L, yeast extract FM808 41.78 g/L, yeast peptone FP102 13.93 g/L, Sodium citrate 2.02 g/L, sodium acetate 5.05 g/L, K_2HPO_4 2.02 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.20 g/L, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.06 g/L, Tween-80 1.00 g/L, L-cysteine hydrochloride 0.30 g/L, vitamin B₆ 0.01 g/L. The viable bacteria count of *Lactobacillus helveticus* H11 fermentation broth after optimized high-density culture was $(9.02 \pm 0.23) \times 10^9$ CFU. Conclusion: By analyzing the optimal nutritional requirements of *Lactobacillus helveticus* H11,

the optimal fermentation process for the industrial production of *Lactobacillus helveticus* H11 was determined, and the production cost was reduced while increasing the viable bacterial count, which provides a theoretical basis for the industrial production of *Lactobacillus helveticus* H11.

Keywords *Lactobacillus helveticus*; nutrient requirement analysis; high-density culture; maximum specific growth rate; response surface test