

Lactobacillus helveticus ND-01 培养条件的优化 及冻干发酵剂的制备

崔利敏¹, 周琦¹, 艾日登才次克¹, 杜晓华¹, 乌兰¹,
刘小鸣², 陈卫², 张和平¹

(1. 内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室, 呼和浩特 010018;
2. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 瑞士乳杆菌 *Lactobacillus helveticus* ND-01 是一株分离、筛选自新疆酸马奶中的乳酸菌, 并且在发酵牛乳的过程中能产生较高的 ACE-I 抑制活性和 γ -氨基丁酸。实验通过对 *L. helveticus* ND-01 培养基的组分进行优化, 从而得出 *L. helveticus* ND-01 优化培养基配方为: 乳糖 25 g/L, 大豆蛋白胨 14.1 g/L, 酵母粉 14.1 g/L, 醋酸钠 15.3 g/L, 柠檬酸钠 6.5 g/L, K_2HPO_4 2.2 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 g/L, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 25 mg/L, 吐温-80 1 g/L, L-半胱氨酸盐酸盐 750 mg/L, 维生素 B₉ (VB₉) 20 mg/L。 *L. helveticus* ND-01 在此培养基中经 42℃, 18 h 培养, 其活菌数可达到 4.2×10^8 cfu/mL, 比 MRS 中 (8.2×10^7 cfu/mL) 提高近 5 倍。将此优化培养基作为基础培养基, 在 5 L 发酵罐中, 经优化发酵条件, 其活菌数可达到 3.1×10^9 cfu/mL, 发酵液离心收集菌体, 加入保护剂, 冷冻干燥后活菌数可达到 2.5×10^{10} cfu/g。冻干菌粉经 90 d 的低温贮藏, 其存活率为 81.20%。

关键词: 瑞士乳杆菌; 培养基; 发酵; 冻干

中图分类号: TQ920

文献标识码: A

文章编号: 1008-0864(2008)06-0074-09

Optimization of Fermentation Conditions for *Lactobacillus helveticus* ND-01 and Preparation for Freeze-dried Starter

CUI Li-min¹, ZHOU Qi¹, Airidengcaিকে¹, DU Xiao-hua¹, WU Lan¹,
LIU Xiao-ming², CHEN Wei², ZHANG He-ping¹

(1. Key Lab of Dairy Biotechnology and Bioengineer, Ministry of Education, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018; 2. College of Food Science and Technology, Jiangnan University, Jiangsu Wuxi 214122, China)

Abstract: *Lactobacillus helveticus* ND-01 is a lactic acid bacteria isolated from Koumiss in Xinjiang. It can produce higher inhibitory activity against ACE-I and γ -aminobutyric acid during the fermentation process. The medium components for *L. helveticus* ND-01 were optimized by response surface methodology, which contained lactose (25 g/L), soy peptone (14.1 g/L), yeast extract (14.1 g/L), sodium acetate (15.3 g/L), sodium citrate (6.5 g/L), K_2HPO_4 (2.2 g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (2 g/L), $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ (25 mg/L), tween-80 (1 g/L), L-cysteine (750 mg/L), Vitamin B₉ (VB₉) 20 mg/L. After cultivation in optimization medium for 18h at 42℃, the viable count of *L. helveticus* ND-01 was 4.2×10^8 cfu/mL, which was about 5 times higher than that in MRS (8.2×10^7 cfu/mL). Fermentation conditions were optimized using this enrichment medium as the basal medium culture in the 5L fermentor, the viable count of *L. helveticus* ND-01 reached 3.1×10^9 cfu/mL. After centrifugal separation of the cell from fermentation broth and freeze drying, a viable count of 2.5×10^{10} cfu/g was obtained. After 90 days storage, survival rate of the freeze drying starter reached 81.20%.

Key words: *Lactobacillus helveticus* ND-01; medium; fermentation; freeze drying

Lactobacillus helveticus 是一类具有较强蛋白分解和自溶特性的乳酸菌^[1], 通常被用作生产瑞

士干酪和意大利干酪的发酵剂或发酵乳制品的辅助发酵剂^[2,3], 从 *L. helveticus* 发酵脱脂乳中还可

收稿日期: 2008-08-18; 修回日期: 2008-11-24

基金项目: 国家 863 计划项目 (2006AA10Z345, 2007AA10Z353) 资助。

作者简介: 崔利敏, 硕士研究生, 从事乳品生物技术方面的研究。通讯作者: 张和平, 教授, 博士生导师, 主要从事乳品加工和乳品生物技术研究。E-mail: hepingdd@vip.sina.com

分离出具有降血压功能的短肽 VPP 与 IPP^[4-6]。许多研究证实了在干酪中添加高度自溶的 *L. helveticus* 能够改善干酪的风味并加速干酪的成熟^[7-9]。然而,也有一些研究表明有些 *L. helveticus* 不适于冷冻干燥制作直投式发酵剂,这可能与 *L. helveticus* 在发酵过程中极易发生自溶^[10], 以及其菌体的细胞膜面积较大, 不耐受冷冻干燥等原因有关^[11]。

L. helveticus ND-01 是一株分离自新疆酸马奶的乳酸菌, 经 16S rDNA 同源性分析, 与 Gen Bank 中标准菌株 *L. helveticus* NCDO 2712 T (X61141) 的同源性达 99%^[12]。研究表明 *L. helveticus* ND-01 具有很强的蛋白水解能力和高度自溶特性, 用它来发酵牛乳, 具有较高的 ACE-I 抑制活性, 并产生 γ -氨基丁酸^[13]。

本研究根据 *L. helveticus* ND-01 的生物学特性和营养需求, 对菌体的增菌培养基成分和含量进行筛选和优化, 确定出适宜的增殖培养基, 并将其用于菌体的高密度培养中。通过对发酵条件的初步优化, 为下一步制备高浓缩益生菌制剂创造良好的基础。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

L. helveticus ND-01 分离自新疆传统发酵酸马奶中, 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保藏。

1.2 活化与接种发酵

L. helveticus ND-01 菌株于灭菌脱脂乳中 -40℃ 保存, 使用前, 将其按 2% 比例接种于脱脂乳培养基中, 第二代接种于 MRS 培养基^[14] 中, 42℃ 静态培养 18 h。

1.3 培养基营养成分的筛选

以 MRS 培养基为基础, 采用各种不同的碳源、氮源、碳氮比、缓冲盐、微量元素与生长因子分别取代 MRS 中的各营养成分配制培养基, 将活化两代的 *L. helveticus* ND-01 以 1×10^6 cfu/mL 接种量接种, 42℃ 静态培养 18 h, 根据菌体生长情况选择适宜的营养成分。

1.4 培养基组分的优化

以 1.3 确定的主要影响因素 (包括碳源、氮

源和缓冲盐), 设计三因素正交旋转回归实验, 以菌体密度为响应值作响应面设计, 对营养成分进行优化。

1.5 *L. helveticus* ND-01 发酵罐培养条件的研究

在 5 L 发酵罐 (上海保兴 BIO-5) 中, 以优化培养基为基础发酵液, 对影响菌体密度较大的因素如乳糖添加量、发酵温度、起始 pH 等进行优化, 筛选出较适培养条件。

1.6 *L. helveticus* ND-01 冻干发酵剂的制备

取发酵结束的菌液在无菌条件下于 4℃, 经 6 000 g, 10 min 离心。离心处理后的菌体沉淀中逐次加入保护剂成分, 混合均匀后将菌液放入 -40℃ 条件下预冻 3 h, 然后将其放入真空冷冻干燥机中冻干。冻干后的菌饼在无菌条件下研磨成粉。

1.7 菌体生长情况测定

1.7.1 菌体密度 发酵培养液稀释至一定浓度 ($OD_{600} = 0.5 \sim 1.5$), 用紫外可见分光光度计 (HI-TACHI U-2000) 在波长 600 nm 下测定光密度 (OD_{600}), 结果再乘以相应稀释倍数得到菌体密度值^[15]。

1.7.2 活菌计数 菌液经倍比稀释到适宜梯度, TPY 琼脂培养基^[16] 平板倾注, 37℃ 培养 72 h 后计菌落总数。

1.7.3 细菌总数的测定 将发酵液稀释 10 倍, 在显微镜下直接用霍泽 (Petrof Hausser) 细菌计数板进行计数。

1.8 实验设计及数据分析

采用 Design Expert 7.0 设计软件进行响应面设计与分析; 采用 Origin 7.5 绘图软件绘图, 采用 SAS 9.0 统计软件进行数据处理。

2 结果与讨论

2.1 培养基优化试验

2.1.1 碳源与氮源的筛选 不同的碳源和氮源对于 *L. helveticus* ND-01 的生长影响极显著 ($P < 0.01$), 结果见表 1。通过比较各培养基成分对 *L. helveticus* ND-01 的增殖效果, 实验选定乳糖作为最佳碳源, 大豆蛋白胨与酵母粉复配作为氮源, 复配比例为 1:1, 其配合比例及对菌体生长情况的影响见表 2。

表1 *L. helveticus* ND-01 在不同碳氮源培养基中的菌体密度 ($\bar{x} \pm SD, N=3$)Table 1 The cell density of *L. helveticus* ND-01 in different carbon and nitrogen source medium ($\bar{x} \pm SD, N=3$).

碳源 2% (w/v) Carbon source 2% (w/v)	菌体密度 (OD ₆₀₀) Cell density (OD ₆₀₀)	氮源 2% (w/v) Nitrogen source 2% (w/v)	菌体密度 (OD ₆₀₀) Cell density (OD ₆₀₀)
葡萄糖 Glucose	5.355 ± 0.0212B	大豆蛋白胨 Soya peptone	5.340 ± 0.035A
麦芽糖 Maltose	0.304 ± 0.000G	酵母粉 Yeast powder	5.251 ± 0.006B
乳糖 Lactose	5.625 ± 0.170A	胰蛋白胨 Tryptone	1.461 ± 0.018C
麦芽低聚糖 Oliosacharde	0.236 ± 0.004H	牛肉蛋白胨 Beef peptone	1.083 ± 0.002E
低聚异麦芽糖 Somaltodigosachride	0.931 ± 0.004E	牛肉膏 Beef extract	1.181 ± 0.000D
糊精 Dextrin	0.176 ± 0.001I	大豆分离蛋白 Soy protein isolate	0.248 ± 0.010G
淀粉 Starch	0.692 ± 0.014F	乳清蛋白 Whey protein	0.806 ± 0.011F
蔗糖 Sucrose	0.216 ± 0.002H	尿素 Urea	0.112 ± 0.008H
甘露糖 Mannose	1.905 ± 0.014D	硝酸铵 NH ₄ NO ₃	0.0715 ± 0.003I
半乳糖 Galactose	4.144 ± 0.004C		

注:同列中不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)

Note: Each means with different capital letters in column showed extremely significant difference ($P < 0.01$).

表2 *L. helveticus* ND-01 在大豆蛋白胨与酵母粉
不同复配比例培养基中的菌体密度
($\bar{x} \pm SD, N=3$)

Table 2 The cell density of *L. helveticus* ND-01 in
nitrogen source medium of different soy peptone and
yeast extract proportion ($\bar{x} \pm SD, N=3$).

处理 Treatment	大豆蛋白胨: 酵母粉 Soy peptone : yeast extract	菌体密度 (OD ₆₀₀) Cell density (OD ₆₀₀)
1	3 : 1	6.203 ± 0.067b
2	2 : 1	6.145 ± 0.021b
3	1 : 1	6.325 ± 0.028a
4	1 : 2	6.168 ± 0.032b
5	1 : 3	6.028 ± 0.004c

注:大豆蛋白胨和酵母粉总添加量为2%;不同字母的数据之间差异显著 ($P < 0.05$)

Note: The total addition of soy peptone and yeast extract is 2%; Data with different small letters in same column showed significant difference ($P < 0.05$).

2.1.2 缓冲盐优化 由表3可见,培养基中补充适合的缓冲盐对菌体的增殖效果明显高于空白组,不同的缓冲体系和同一缓冲体系不同浓度对菌体的增殖效果之间差异极显著 ($P < 0.01$),以柠檬酸钠/乙酸钠/K₂HPO₄缓冲体系对菌体促生长效果最好。因此选定此缓冲体系进一步通过三因素四水平正交试验对缓冲体系各成分比例进行优化(实验数据略),得到最佳水平为:14 g/L 乙

酸钠、6 g/L 柠檬酸钠和 2 g/L K₂HPO₄,即最佳比例为 7 : 3 : 1。

2.1.3 微量元素的选择 微生物在生长繁殖及合成目的产物的过程中,需要某些微量元素作为其生理活性物质的组成成分或生理活性作用的调节物。Fe²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺、Mn²⁺、Mg²⁺等微量元素作为酶的激活剂或生物活性物质的组成成分也是微生物在生长繁殖过程中不可缺少的,虽然在培养基原料中可能含有一定量,但不同菌株对微量元素的需要程度是不同的^[17]。图1显示了在分别添加不同浓度的 FeSO₄·7H₂O、CuSO₄·5H₂O、ZnSO₄·7H₂O、MnSO₄·5H₂O、MgSO₄·7H₂O 的培养基中 *L. helveticus* ND-01 的生长情况。

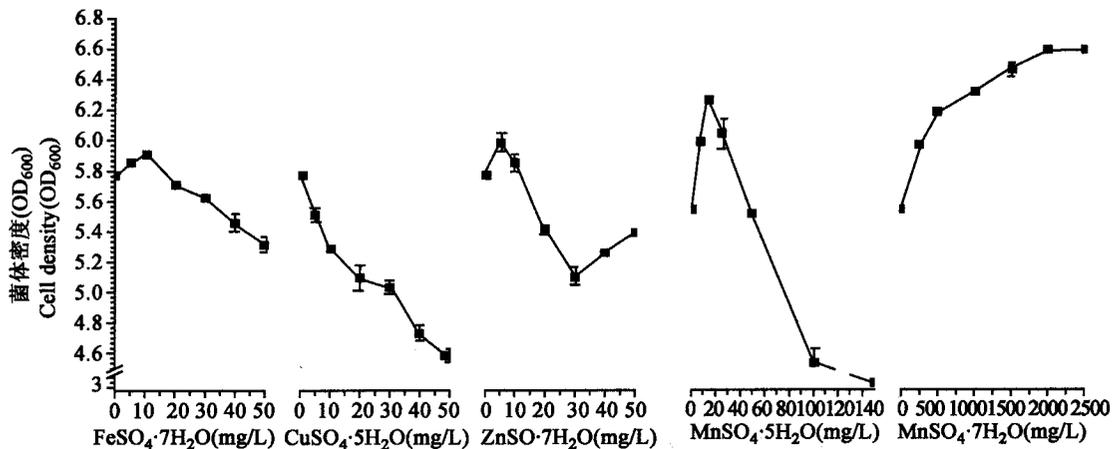
由图1可知,添加 CuSO₄·5H₂O 对 *L. helveticus* ND-01 的生长并没有起到促进作用,反而抑制了菌体的生长。添加 FeSO₄·7H₂O、MnSO₄·7H₂O、ZnSO₄·7H₂O 组在低浓度下能促进菌体生长,当浓度增加到一定程度就反过来抑制菌体生长了。Mg²⁺ 是许多重要酶(如己糖磷酸化酶、柠檬酸脱氢酶、羧化酶等)的激活剂^[18],对 *L. helveticus* ND-01 生长具有重要作用。在当培养基中 MgSO₄·7H₂O 的浓度在 0 ~ 2 000 mg/L 范围内,随着 MgSO₄·7H₂O 添加量的增加,*L. helveticus* ND-01 菌体密度呈显著的增长效应,这与 Rogosa 等^[19]的研究结论相一致。

表 3 不同缓冲盐体系培养基中的 *L. helveticus* ND-01 菌体密度 ($\bar{x} \pm SD, N=3$)Table 3 The cell density of *L. helveticus* ND-01 in medium with different buffer salts ($\bar{x} \pm SD, N=3$).

缓冲盐成分 Composition of buffer salts	不同缓冲盐浓度下的菌体密度 (OD ₆₀₀) Cell density in medium with different buffer salts (OD ₆₀₀)					
	0%	0.6%	0.9%	1.2%	1.5%	1.8%
柠檬酸钠/乙酸钠/K ₂ HPO ₄ Sodium citrate/sodium acetate/K ₂ HPO ₄		6.12 ± 0.004C	6.21 ± 0.035C	6.40 ± 0.014B	6.56 ± 0.057A	6.36 ± 0.014B
Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ /NaCl	4.20I	5.07 ± 0.014G	4.84 ± 0.011IH	4.74 ± 0.035JI	4.64 ± 0.039J	4.34 ± 0.011K
柠檬酸/Na ₂ PO ₄ Citric/Na ₂ PO ₄		5.21 ± 0.088F	5.38 ± 0.007E	5.40 ± 0.099E	5.57 ± 0.035D	4.90 ± 0.025H
甘氨酸/NaOH Glycine/NaOH		3.87 ± 0.021M	3.47 ± 0.107N	3.14 ± 0.018O	2.76 ± 0.071P	2.64 ± 0.140Q

注: 培养基初始 pH 均为 6.5; 不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)

Note: The initial pH of medium is 6.5; Different capital letters mean extremely significant difference ($P < 0.01$).

图 1 *L. helveticus* ND-01 在不同微量元素含量的培养基中的菌体密度Fig. 1 The cell density of *L. helveticus* ND-01 in medium with different trace elements content.

由于实验中使用的发酵罐为铁制不锈钢发酵罐, 这种发酵罐内的溶液即使不加任何铁化合物, 其 Fe^{2+} 浓度也可以达到 30 mg/L, 所以 Fe^{2+} 就不必在培养基中添加^[20]。实验最终确定 $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 的添加量分别为 25 mg/L 和 2 000 mg/L。

2.1.4 生长因子的选择 生长因子是微生物正常代谢必不可少且不能用简单的碳源或氮源自行合成的有机物。维生素是第一类生长因子, 大多数维生素是辅酶的组成成分。有些氨基酸也是多种微生物的生长因子。因此实验对补充维生素和氨基酸的效果进行了研究。

在上述确定的培养基各组分基础上分别补充

了 10 mg/L 的 B 族维生素 (包括 VB_1 、 VB_2 、 VB_5 、 VB_6 、 VB_9 、 VB_{12}) 与维生素 C, 补充了 100 mg/L 的氨基酸 (包括苯丙氨酸、精氨酸)、L-半胱氨酸盐酸盐和肝脏粉^[21], 接种发酵测定菌体生长情况, 结果见表 4。

由表 4 可知, 添加不同种类的生长因子对 *L. helveticus* ND-01 菌体密度的影响显著。实验选取对 *L. helveticus* ND-01 菌体增殖效果较好的 VB_9 与 L-半胱氨酸盐酸盐, 进一步对这两种生长因子的浓度进行了确定。结果见图 2。

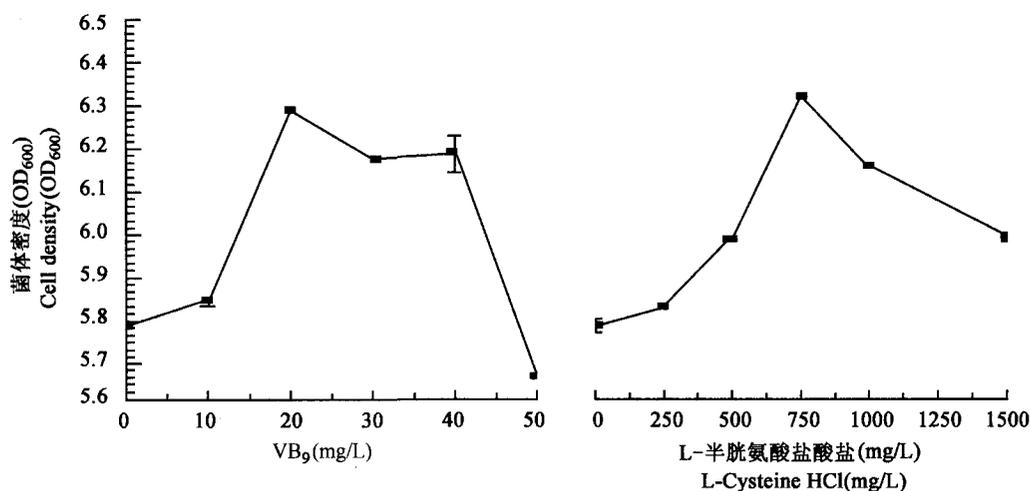
由图 2 可知, VB_9 与 L-半胱氨酸的添加量分别为 20 mg/L 和 750 mg/L 浓度时菌体密度最大。

表 4 添加不同种类的维生素与氨基酸对 *L. helveticus* ND-01 菌体密度的影响Table 4 The cell density of *L. helveticus* ND-01 in medium of adding different kinds vitamin and amino acid.

生长因子 Growth factor	菌体密度 (OD ₆₀₀) Cell density (OD ₆₀₀)	生长因子 Growth factor	菌体密度 (OD ₆₀₀) Cell density (OD ₆₀₀)
VB ₁	5.783 ± 0.06fg	V _c	6.235 ± 0.035c
VB ₂	6.433 ± 0.11b	苯丙氨酸 Phenylalanine	6.198 ± 0.053c
VB ₃	6.225 ± 0.039c	精氨酸 Arginine	6.033 ± 0.011de
VB ₆	6.082 ± 0.025dc	L-半胱氨酸盐酸盐 L-Cysteine HCl	6.868 ± 0.025a
VB ₉	6.48 ± 0.013b	肝脏粉 Liver powder	5.918 ± 0.074fe
VB ₁₂	5.713 ± 0.028g	对照 Control	5.44 ± 0.085h

注:生长因子的添加量为 20 mg/L; 同列中不同的小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Note: The content of growth factors are 20 mg/L; Different small letters in same column mean significant difference ($P < 0.05$).

图 2 添加不同浓度的 VB₉ 与 L-半胱氨酸盐酸盐对 *L. helveticus* ND-01 菌体密度 (OD₆₀₀) 的影响fig. 2 The cell density (OD₆₀₀) of *L. helveticus* ND-01 in medium with different concentration of VB₉ and L-Cysteine HCl.

2.1.6 培养基组分的优化 采用 Design Expert 软件进行三因素二次正交旋转设计对上述选定的培养基主要营养成分碳源、氮源和缓冲盐含量进行优化,以菌体密度为响应值。具体因素水平情况和试验结果见表 5。

通过 Design Expert 软件对表 5 数据进行多项回归分析,获得 *L. helveticus* ND-01 菌体密度对碳源 X_1 , 氮源 X_2 , 缓冲盐 X_3 的多项回归方程为:

$$Y = 8.59 + 0.78X_1 + 0.28X_2 + 0.74X_3 + 0.02X_1X_2 + 0.57X_1X_3 - 0.13X_2X_3 - 0.26X_{12} - 0.21X_{22} + 0.14X_{32} - 0.4X_{12}X_2 - 0.24X_{12}X_3 + 0.13X_1X_{22}$$

式中: Y 为菌体密度预测值, X_1 、 X_2 、 X_3 分别为碳源、氮源和缓冲盐对应的编码值。

方差分析表明该模型极显著 ($P = 0.0008$),

失拟项不显著 ($P = 0.0518$)。模型确定系数 $R^2 = 0.9765$, 校正系数 $adjR^2 = 0.9256$ 。

求解方程极值得到预测最优培养基配方为: 碳源 $X_1 = 25$ g/L, 氮源 $X_2 = 28.2$ g/L, 缓冲盐 $X_3 = 24$ g/L, 预测最大菌体密度为 10.363。将 *L. helveticus* ND-01 接种于模型预测最优化培养基中,经 42℃ 18 h 培养后实际测得菌体密度为 10.289,与模型预测值拟合率达 99.2%。活菌数 4.2×10^8 cfu/mL, 比在 MRS 培养基中培养活菌数 (8.2×10^7 cfu/mL) 提高了近 5 倍。

2.2 高密度发酵培养条件的优化

以上述优化培养基为基础培养基分别对 *L. helveticus* ND-01 的高密度发酵过程中影响较大的条件(乳糖添加量、发酵温度、初始 pH)进行了优化。因为在高密度发酵过程中,菌体迅速繁殖需

表 5 三因素二次正交旋转回归设计及试验结果

Table 5 Three factors twice rotation perpendicular regressive design and result.

试验号 Expenimen no.	因素和水平 (Factors and levels)			菌体密度 (OD ₆₀₀) Cell density (OD ₆₀₀)	
	X ₁	X ₂	X ₃	实际值 Actual value	预测值 Predictive value
1	-1(15)	-1(22.5)	-1(12)	7.56	7.43
2	1(25)	-1(22.5)	-1(12)	8.19	8.07
3	-1(15)	1(37.5)	-1(12)	7.52	7.41
4	1(25)	1(37.5)	-1(12)	8.23	8.13
5	-1(15)	-1(22.5)	1(24)	7.69	7.55
6	1(25)	-1(22.5)	1(24)	10.61	10.47
7	-1(15)	1(37.5)	1(24)	7.15	7.01
8	1(25)	1(37.5)	1(24)	10.12	10.01
9	-1.682(11.59)	0(30)	0(18)	6.39	6.54
10	1.684(28.41)	0(30)	0(18)	9.01	9.17
11	0(20)	-1.682(17.39)	0(18)	7.37	7.53
12	0(20)	1.682(42.61)	0(18)	8.3	8.47
13	0(20)	0(30)	-1.682(7.91)	7.57	7.74
14	0(20)	0(30)	1.682(28.09)	10.07	10.23
15	0(20)	0(30)	0(18)	9.01	8.59
16	0(20)	0(30)	1.682(18)	8.35	8.59
17	0(20)	0(30)	0(18)	8.44	8.59
18	0(20)	0(30)	0(18)	8.57	8.59
19	0(20)	0(30)	0(18)	8.49	8.59
20	0(20)	0(30)	0(18)	8.58	8.59

注: X₁ 代表碳源 (g/L), 碳源为乳糖; X₂ 代表氮源 (g/L), 大豆蛋白胨和氮源为酵母粉 1:1 比例混合; X₃ 代表缓冲盐 (g/L), 缓冲盐为醋酸钠、柠檬酸钠和磷酸二氢钾以 14:6:2 比例混合。

Note: X₁ represents carbon source (g/L), carbon source is lactose; X₂ represents nitrogen source (g/L), nitrogen source is mixture of soy peptone and yeast extract (1:1); X₃ represents buffer salt (g/L), buffer salt is mixture of sodium acetate, citrate sodium, and potassium dihydrogen phosphate (14:6:2).

要大量的碳源作为其能量物质, 而除碳源外的其它培养基成分在发酵过程中基本上是足量的, 因

此实验对培养基中乳糖含量也进行了优化, 实验结果见表 6。

表 6 不同发酵条件对 *L. helveticus* ND-01 菌体密度的影响 ($\bar{x} \pm SD, N=3$)Table 6 The cell density of *L. helveticus* ND-01 in different fermentation conditions ($\bar{x} \pm SD, N=3$)

乳糖含量 (g/L) Lactose content (g/L)	菌体密度 (OD ₆₀₀) Cell density (OD ₆₀₀)	培养温度 (°C) Culture temperature (°C)	菌体密度 (OD ₆₀₀) Cell density (OD ₆₀₀)	初始 pH Initial pH	菌体密度 (OD ₆₀₀) Cell density (OD ₆₀₀)
25	12.35 ± 0.11i	37	16.06 ± 0.15f	6.8	17.30 ± 0.16d
65	14.34 ± 0.06h	40	16.45 ± 0.12e	6.4	17.98 ± 0.17b
85	16.36 ± 0.10e	42	17.60 ± 0.11c	5.8	18.48 ± 0.20a
105	16.46 ± 0.20g	45	16.40 ± 0.20e	5.4	17.54 ± 0.32cd

注: 角标中含有相同字母的数据之间差异不显著 ($P < 0.05$)

Note: The content of growth factors are 20 mg/L; Different small letters in same column mean significant difference ($P < 0.05$).

由表6可知,不同发酵条件对 *L. helveticus* ND-01 菌体密度影响差异显著 ($P < 0.05$),综合考虑发酵成本与效果,最终确定了 *L. helveticus* ND-01 的优化培养条件为乳糖含量为 85 g/L,发酵温度为 42℃,初始 pH5.8。在初始通入氮气,

溶氧率为 0%,搅拌速度 300 rpm 的条件下发酵 16 h,活菌数可达到 3.1×10^9 cfu/mL。发酵过程中活菌数、细菌总数、菌体密度与耗碱速率的变化情况见图3。

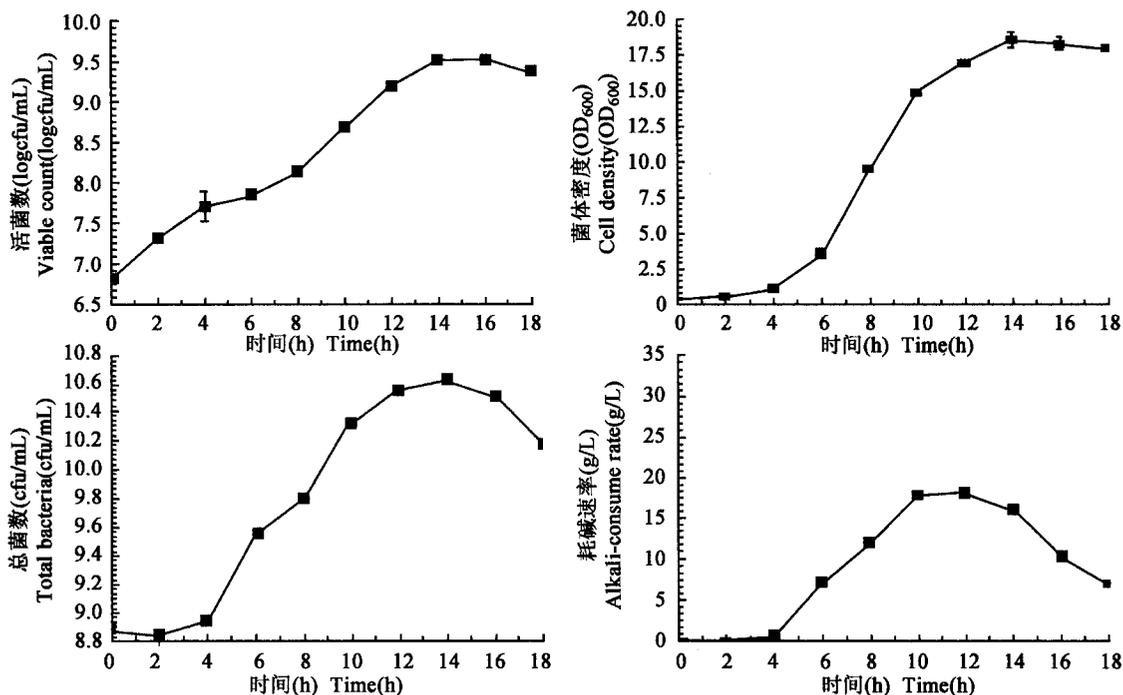


图3 *L. helveticus* ND-01 在高密度发酵过程中各指标的变化情况

Fig.3 Changes of viable count, total bacteria, cell density and alkali-consume rate during the high density fermentation of *L. helveticus* ND-01.

L. helveticus ND-01 在发酵 18 h 后停止耗碱,因此实验只对其发酵过程的前 18 h 进行监控。通过对比发酵过程中活菌数与细菌总数的变化情况可知,菌体在发酵过程中大量死亡,这可能是由于 *L. helveticus* ND-01 在发酵过程中产生的蛋白酶活力太强,将自身细胞结构破坏,从而导致菌体死亡^[22]。在发酵后期,发酵液中的细菌总数与菌体密度都有下降的趋势,这可能是由于 *L. helveticus* ND-01 在发酵后期菌体发生了自溶现象^[23]。

2.3 冻干发酵剂的制备

冷冻干燥是一种相对有效的长期保存高密度乳酸菌菌种的方法^[24]。然而,在实际操作过程中,有许多因素影响着菌体在冻干和贮藏过程中的存活率,其中包括菌体的初始浓度^[25]、生长条件^[26]、干燥保护剂^[27]等。实验就冷冻干燥保护剂进行了筛选。

以脱脂乳加 L-谷氨酸钠作为基础保护剂,在此基础上,添加不同种类的保护剂进行复配,以菌体存活率为评价指标,最终得出效果相对较好的保护剂组合,实验还对保护剂与菌泥的比例进行了筛选(数据略)。从而得出了 *L. helveticus* ND-01 保护剂配方为:10% 脱脂乳,8% 乳糖,1% L-谷氨酸钠,1% VC,1% 甘油,保护剂(V):菌泥(w) = 10:1,菌体与保护剂的混合液在 -40℃ 条件下预冻 3 h,放入真空冷冻干燥机中冻干。得到菌粉各项指标见表 7。

3 结论

经培养基优化试验确定 *L. helveticus* ND-01 最适培养基为:25 g/L 乳糖,14.1 g/L 大豆蛋白胨,酵母粉 14.1 g/L,15.3 g/L 醋酸钠,6.5 g/L

表 7 *L. helveticus* ND-01 冻干菌粉的各项指标Table 7 The indexes of *L. helveticus* ND-01 freeze-drying starter powder.

活菌数(10^{10} cfu/g) Viable count (10^{10} cfu/g)	存活率(%) Survival rate(%)	水分含量(%) Moisture content(%)	杂菌 Other bacteria	贮藏(-40℃)90 d 的存活率(%) Survival rate after 90 days storage at -40℃ (%)
2.5 ± 0.46	52.08 ± 3.12	4.82 ± 0.01	未检出 not detected	81.20 ± 2.62

柠檬酸钠, 2.2 g/L K_2HPO_4 , 2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 25 mg/L $MnSO_4 \cdot 5H_2O$, 1 g/L 吐温 80, 0.75 g/L L-半胱氨酸, 20 mg/L VB_9 , 20 mg/L VB_{12} 。 *L. helveticus* ND-01 在此培养基中经 42℃, 培养 18 h, 其活菌数可达到 4.2×10^8 cfu/mL, 比 MRS 中(8.1×10^7 cfu/mL) 提高近 5 倍。

经发酵罐发酵条件优化实验可以确定 *L. helveticus* ND-01 的发酵条件为: 乳糖含量为 85 g/L (其他成分不变), 温度 42℃, 初始 pH 5.8。在初始通入氮气, 溶氧率为 0%, 搅拌速度 300 rpm 条件下, 发酵 16 h, 发酵液的活菌数可达到 3.1×10^9 cfu/mL。

经保护剂选择实验可以确定从而得出了 *L. helveticus* ND-01 保护剂配方为: 10% 脱脂乳, 8% 乳糖, 1% L-谷氨酸钠, 1% VC, 1% 甘油。保护剂(V): 菌泥(w) = 10:1, 菌体与保护剂的混合液在 -40℃ 条件下预冻 3 h, 随后将其冻干, 活菌数可达到 2.5×10^{10} cfu/g。冻干发酵剂在低温(-40℃) 贮藏 90 d 后, 其存活率可达到 81.20%。

L. helveticus ND-01 在发酵过程中菌体出现大量死亡和自溶现象, 将这种特性应用在干酪及其他发酵乳制品的生产是十分有利的, 但对于微生物生态制剂的生产是极为不利的。这也成为我们下一步研究中亟待解决的问题。

参 考 文 献

- [1] Kilpi E E R, Kahala M M, Steeleb J L, et al. . Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in milk fermented by wild-type and peptidase-deletion derivatives of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32[J]. Inter. Dairy J., 2007, 17: 976-984.
- [2] Deutsch S M, Neveu A, Gueaenec S, et al. . Early lysis of *Lactobacillus helveticus* CNRZ 303 in Swiss cheese is not prophage-related[J]. Inter. J. Food Microbiol. 2003, 81: 147-157.
- [3] Fox P F, Law J, McSweeney P L H, et al. . Cheese: Chemistry, physics and microbiology[J]. J. Biochem. Cheese Ripening, 1993, 1: 389-438.
- [4] Nakamura Y, Yamamoto N, Sakai K, et al. . Purification and characterization of angiotensin ACE-converting enzyme inhibitors from sour milk [J]. J. Dairy Sci., 1995, 78: 777-783.
- [5] Nakamura Y, Yamamoto N, Sakai K, et al. . Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme [J]. J. Dairy Sci., 1995, 78: 1253-1257.
- [6] Masuda O, Nakamura Y, Takano T. Antihypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides to spontaneously hypertensive rats [J]. J. Nutri., 1996, 126(12): 3063-3068.
- [7] Kenya B O, Fitz Gerald R J, O'Cuinn G, et al. . Autolysis of selected *Lactobacillus helveticus* adjunct strains during cheddar cheese ripening [J]. Inter. Dairy J., 2006, 16: 797-804.
- [8] Hannona J A, Wilkinson M G, Delahunty C M, et al. . Use of autolytic starter systems to accelerate the ripening of Cheddar cheese [J]. Inter. Dairy J., 2003, 13: 313-323.
- [9] Baky A A, El-Neshawy A, Rabie A, et al. . Heat-shocked *Lactobacilli* for accelerating flavor development of Ras cheese [J]. Food Chem., 1986, 21: 301-313.
- [10] Carvalho A S, Silva J, Hob P, et al. . Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria [J]. Inter. Dairy J., 2004, 14: 835-847.
- [11] 郭本恒. 干酪[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004, 31-32.
- [12] Wang J G, Chen X, Zhang H P, et al. . Identification of *Lactobacillus* from koumiss by conventional and molecular methods [J]. Euro. Food Res. Technol., 2008, 4: 318-324.
- [13] Sun T S, Zhao S P, Zhang H P, et al. . ACE-inhibitory activity and γ -aminobutyric acid (GABA) content of naturally fermented milk from Tibet in China [J]. Milchwissenschaft (Milk Sci. Inter.), 2008, DOI10.1007/s00217-008-0969-9.
- [14] DeMan J C, Rogosa M, Sharpe M E. A medium for the cultivation of *Lactobacilli* [J]. Appl. Bacteriol., 1960, 23: 130-135.
- [15] Lee Y L, Chang H N. High cell density culture of a recombinant *Escherichia coli* producing penicillin acylase in a membrane cell recycle fermentor [J]. Biotechnol. Bioengin., 1990, 36: 330-337.
- [16] Tamime A Y, Marshall V E, Robinson R K. Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria [J]. J. Dairy Res., 1995, 62: 151-187.
- [17] 高鹏飞, 李妍, 张和平, 等. 益生菌 *Lactobacillus casei* Zhang 增殖培养基的优化 [J]. 微生物通报, 2008, 35: 623-628.

- [18] 肖冬光. 微生物工程原理[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2004, 75-78.
- [19] Rogosa M, Mitchell J A. The indispensability of magnesium for *Lactobacillus helveticus* and its unavailability in a magnesium-azide complex[J]. Bact. Proc., 1950, 130.
- [20] 李寅, 高海军, 陈坚. 高密度发酵技术[M]. 北京:化学工业出版社, 2006, 10, 44-50.
- [21] Hebert E M, Raya R R, De Gior G S. Nutritional requirements and nitrogen-dependent regulation of proteinase activity of *Lactobacillus helveticus* CRL 1062[J]. Appl. Environ. Microbiol., 2000, 66: 5316-5321.
- [22] Gasson M J. Lytic systems in lactic acid bacteria and their bacteriophages[J]. Antonievan Leeuwenhoek, 1996, 70: 147-159.
- [23] Fernández Murga M L, Pscse de Ruiz Holgado A, de Valdez G F. Influence of the incubation temperature on the autolytic activity of *Lactobacillus acidophilus* [J]. J. App. Microiol., 1995, 78: 426-429.
- [24] Santivarangkna C, Wenning M, Foerst P, et al.. Damage of cell envelope of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying[J]. J. Appl. Microbiol., 2007, 102: 748-756.
- [25] Costa E, Usall J, Teixid O N, et al.. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying[J]. J. Appl. Microbiol., 2000, 89: 793-800.
- [26] Pichereau V, Hartke A, Auffray Y. Starvation and osmotic stress induced multiresistances; influence of extracellular compounds[J]. Inter. J. Food Microbiol., 2000, 55: 19-25.
- [27] de Valdez F G, de Giori G S, de Ruiz Holgado A P, et al.. Effect of drying medium on residual moisture content and viability of freeze-dried lactic acid bacteria[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1985, 49: 413-415.

【863 课题介绍】

课题名称:高活性益生乳酸菌发酵剂制造核心技术研究

课题编号:N0. 2006AA10Z345

所属专题/项目:现代食品生物工程技术

课题内容、目标:

1. 建立快速高效筛选模型,从我国传统发酵乳制品中分离筛选具有降血脂、降血压、免疫调节、抗过敏、抗氧化、抗幽门螺杆菌、转化共轭亚油酸益生作用的优良益生菌菌种。

2. 对筛选的益生菌遗传稳定性和安全性进行研究。

3. 利用遗传组学和代谢工程手段研究改善益生菌菌种的功能性状。采用安全的基因组重组融合技术,进行多次递推式多次融合,筛选出具有多重优良性状的益生菌菌种;通过代谢分析建立益生菌的生长代谢模型,寻找高效的益生菌发酵生产工艺。

4. 以微滤技术、分子膜技术、透析培养、耦

合发酵为主要技术手段,通过耦合、互生、预培养、解除反馈抑制等方案来实现益生菌的高密度发酵。

5. 建立体外冷冻保护模型,高效筛选具有冷冻保护功能的保护剂;从细胞和分子水平研究保护剂对细胞干燥的保护机制,优化设计高效的保护剂,实现高效益生菌发酵剂保护和干燥工艺技术。

课题进展:

选育具有自主知识产权的益生菌6~8株;研制益生菌高活性发酵剂3~4种;实现超浓缩发酵剂菌体浓度达到1 012个/mL;取得发明专利4~5项。目前已经完成70%的研究内容。