

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.06.09

猪源嗜酸乳杆菌 La-0231 菌粉生产工艺优化

宋士良

(上海邦成生物工程有限公司, 上海 201506)

[收稿日期] 2021-11-08 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 06-0056-09 [中图分类号] S859.79

[摘要] 为了优化猪源嗜酸乳杆菌 La-0231 菌粉生产工艺。采用单因素试验、正交试验, 优化发酵温度、培养基初始 pH 值、氢氧化钠流加浓度、发酵时间、离心时的流量设定值、预冻温度、冷冻干燥中物料仓的真空度, 并对冻干菌粉进行了耐酸、耐胆盐性能测试。结果表明, 优化的 5 吨生产罐发酵控制参数为: 发酵温度 37 ℃, 培养基初始 pH 值为 6.40, 氢氧化钠的流加浓度为 25%, 发酵时间为 16 h, 发酵液最终 pH 值范围在 4.20~4.80 之间, OD_{600 nm} 值在 6.00 以上, 发酵液的活菌数为 6.80×10^9 CFU/mL。离心时的流量设定值以 216L/h 为优。确定预冻温度为 -45 ℃ ~ -50 ℃ 最佳, 冷冻干燥中物料仓的真空度设定以 50 Pa 较为适宜。优化后猪源嗜酸乳杆菌 La-0231 菌粉生产工艺, 冻干菌粉活菌数含量为 4.56×10^{11} CFU/g, 水分含量 3.19%; 经耐酸、耐胆盐性能测试, 显示其具有良好的耐酸、耐胆盐特性。

[关键词] 猪源嗜酸乳杆菌; 生产工艺优化; 冻干菌粉; 耐酸、耐胆盐特性

Optimization of Production Process of *Lactobacillus acidophilus* La-0231 Powder from Piglets

SONG Shi-liang

(Shanghai Borsun Bioengineering Co., Ltd, Shanghai 201506, China)

Abstract: In order to optimize the production process of *Lactobacillus acidophilus* La-0231 powder from piglets, we used single factor experiments and orthogonal experiment to optimize the fermentation temperature, initial pH of medium, sodium hydroxide concentration, fermentation time, flow rate setting for centrifugation, prefreezing temperature, vacuum degree of material bin in freeze-drying and also tested the acid resistance and bile salt resistance of freeze-dried powder. The test results showed that the optimized fermentation control parameters of 5-ton fermenter are fermentation temperature 37 ℃, initial pH of medium 6.40, sodium hydroxide concentration 25%, fermentation time 16 h, final pH value of fermentation broth 4.20~4.80, OD_{600 nm} value of fermentation broth above 6.00, numbers of viable bacteria 6.80×10^9 CFU/mL. The flow rate setting value of 216L/h is the best when centrifuging. The optimum prefreezing temperature is -45 ℃ ~ -50 ℃, the vacuum degree setting of

material bin in freeze - drying is 50 Pa. After optimization, the viable counts of freeze - dried powder of *Lactobacillus acidophilus* La - 0231 from piglets are 4.56×10^{11} CFU/g and its moisture content is 3.19%. The results of acid and bile salt resistance test showed that it has good acid and bile salt resistance.

Key words: *Lactobacillus acidophilus* of piglets origin; process optimization; freeze - dried powder; acid and bile salt resistance

嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*),1900 年首先从婴儿粪便中分离出来,当时被命名为嗜酸芽孢杆菌(*Bacillus acidophilus*)。1970 年经 Hanson 和 Moquot 重新鉴定、分类后,修改为现在的名称,属于乳杆菌属,革兰氏阳性杆菌。国外专家称它是 GRAS,即公认安全的食品微生物^[1]。嗜酸乳杆菌是少数可以存活并定植于人或动物肠道内的益生菌之一,其在肠道内的定植能力强于其它微生物。它能竞争性地定植于小肠上皮细胞,产生细菌素和有机酸,维持肠道内低 pH 环境,促进肠道中微生态环境的正常化^[2]。赵臣等^[3]测定了一株猪源嗜酸乳杆菌的体外生物学特性。采用试剂盒法测定了该菌株的产酸力和抗氧化性能;采用琼脂平板扩散法检测了该菌株的抑菌特性;使用猪肠上皮细胞测定了该菌株的黏附性能。Matthew 等^[4]研究发现嗜酸乳杆菌在鸡体内大量存在,能利用各种碳源生长,耐胆汁、耐酸,能在 pH3.00 的环境下,存活 5 h;代谢乳糖,产生抗菌物质,生物合成乳酸。嗜酸乳杆菌作为动物肠道中重要的益生菌,具有维护动物肠道健康、缓解不良应激、改善饲养环境、调节机体脂肪代谢和改善畜禽产品品质等功能^[5]。嗜酸乳杆菌 La - 0231 来源于猪肠道,经测定其耐酸、耐胆盐能力强。研究的目的是为了优化其菌粉生产工艺。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌种 嗜酸乳杆菌,由本公司分离自猪肠道,保藏菌株号 La - 0231。

1.1.2 培养基 固体斜面培养基(MRS):葡萄糖 20 g/L,蛋白胨 10 g/L,牛肉膏 10 g/L,酵母浸膏 5 g/L,乙酸钠 5 g/L,柠檬酸氢二铵 2 g/L, K_2HPO_4 2 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58 g/L, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$

0.25 g/L,1 mL/L 吐温 80,琼脂 18 g/L(液体 MRS 培养基不加琼脂),pH6.20 ~ 6.40。种子培养基:葡萄糖 20 g/L,蛋白胨 15 g/L,牛肉浸粉 10 g/L,酵母浸膏 5 g/L,乙酸钠 5 g/L,柠檬酸氢二铵 2 g/L, K_2HPO_4 2 g/L, $CaCl_2$ 1 g/L,L - 半胱氨酸盐酸盐 1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.25 g/L,1 mL/L 吐温 80。发酵培养基:葡萄糖 20 g/L,蛋白胨 10 g/L,牛肉浸粉 10 g/L,酵母浸膏 5 g/L,乙酸钠 5 g/L,柠檬酸氢二铵 2 g/L, K_2HPO_4 2 g/L, $CaCl_2$ 1 g/L,L - 半胱氨酸盐酸盐 0.5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.25 g/L,1 mL/L 吐温 80;豆粕水解物 6.00 g/L;复合氨基酸 0.25 g/L(异亮氨酸 0.05 g/L、半胱氨酸 0.05 g/L、天门冬氨酸 0.05 g/L、丙氨酸 0.05 g/L、赖氨酸 0.05 g/L)。以上培养基均经 118 °C 灭菌 20 min 处理。复合氨基酸装玻璃三角瓶,115 °C 灭菌 15 min,单独灭菌处理。

1.2 试验方法

1.2.1 一级摇瓶种子培养方法

1.2.1.1 菌种活化培养 将培养好的斜面菌种接种于活化管种子培养基中,37 °C 恒温静止培养 11 h ~ 15 h。

1.2.1.2 一级摇瓶种子培养 按 2% 接种量将活化种子液转接至装液量为 200 mL/250 mL 三角瓶的种子培养基中,37 °C 恒温静止培养 8 h ~ 12 h。

1.2.2 优化培养试验方法

1.2.2.1 培养温度的优化 试验选取 33 °C、35 °C、37 °C、39 °C 四个温度,采用种子培养基,一级摇瓶培养方法,培养 18 h 后,取发酵菌液,测定菌液的 pH、 $OD_{600\text{nm}}$ 和 CFU/mL 值。

1.2.2.2 培养时间的优化 试验选取 10 h、14 h、18 h、22 h 和 26 h 五个培养时间,采用种子培养基,

一级摇瓶培养方法,培养不同时间,取发酵菌液,测定菌液的 pH、OD_{600 nm} 和 CFU/mL 值。

1.2.2.3 培养基起始 pH 的优化 将种子培养基起始 pH 值分别调整至 5.40、5.80、6.20 和 6.80,一级摇瓶培养方法,培养 18 h,取发酵菌液,测定菌液的 pH、OD_{600 nm} 和 CFU/mL 值。

1.2.2.4 培养温度、培养时间和培养基起始 pH 值的优化组合 采用发酵培养基,一级摇瓶培养方法, L₉(3⁴) 正交试验,测定各试验号发酵菌液的 CFU/mL 值。

1.2.3 5 吨生产罐发酵试验方法

1.2.3.1 二级摇瓶种子培养 按 2% 接种量将一级摇瓶种子液转接至装液量为 2000 mL/3000 mL 三角瓶的种子培养基中,37 °C 恒温静止培养 10 h ~ 14 h。

1.2.3.2 种子罐培养 50 L 培养基配制及灭菌:将种子培养基原料准确称量后置于约 30 L 配料桶中,加入约 20 L 净化水,搅拌溶解后过 200 目滤布添加到种子罐中,将冲洗配料桶的净化水过 200 目滤布倒入种子罐中,并补水至罐体适宜容量(95% ± 5%),80 r/min 搅拌 5 min,进行灭菌处理。50 L 种子罐培养条件:接种量 4%,接种后维持罐压 0.02Mpa ~ 0.04 MPa,搅拌转速 80 min,培养时间 8 h ~ 10 h。

1.2.3.3 发酵罐发酵 5 吨发酵培养基配制及灭菌:①首先向配料罐中通入约 4 吨净化水,打开蒸汽阀,使配料罐中的水温维持在 40 °C ~ 60 °C,打开搅拌机进行搅拌溶解;将发酵培养基原料准确称量后添加到配料罐中进行溶解,时间约为 10 min;待物料完全溶解后,打开输送泵,将料液经 200 目过滤器输送至发酵罐中。然后在配料罐中加入适量净化水清洗配料罐,将清洗后的水经 200 目过滤器输送至发酵罐中(水量保证灭菌后加入复合氨基酸溶液和接种种子液后的终体积在 4500L ± 100L)。②复合氨基酸配制及灭菌:向备用 100 升种子罐中注入净化水至罐体容量的 90% (保证复合氨基酸溶液灭菌后体积在 100L ± 10L),先对净化水进行 121 °C 20 min 灭菌处理,灭菌后降温至 60 °C 以下,

将复合氨基酸准确称量后投入灭过菌的净化水中,搅拌均匀充分溶解后,对复合氨基酸溶液进行 115 °C 10 min 灭菌处理,灭菌结束后降温至室温备用。③氢氧化钠溶液配制及灭菌:先打开进净化水水阀,向 350 升补碱罐中注入适量净化水,称取适量氢氧化钠,缓慢倒入 350L 补碱罐中,充分溶解。配制结束后,向罐内通入蒸汽,灭菌压力控制在 0.05 Mpa ~ 0.10Mpa,时间 15 min,然后关闭蒸汽进气阀,夹层通入冷却水,降温至 40 ± 1 °C,自然冷却待发酵培养基调初始 pH。5 吨发酵罐培养条件:接种量 2%,接种后维持罐压 0.02Mpa ~ 0.04 MPa,搅拌转速 80 min。

1.2.3.4 流加氢氧化钠溶液发酵试验方法 试验选取流加 15%、25%、35% 三个浓度的氢氧化钠溶液进行发酵试验,同时测定不同发酵时间发酵液的 pH、OD_{600 nm} 和 CFU/mL 值,以确定最佳的氢氧化钠溶液流加浓度和停罐发酵时间。

1.2.4 离心参数的确定试验方法 试验采用管式离心机离心收集菌泥,试验选 144、180、216、252 和 288L/h 五个流量值进行离心,在菌泥收得率和菌体存活率之间找到一个平衡点,以最大限度地收得到高活菌存活率的菌泥。

1.2.5 冻干参数的确定试验方法

1.2.5.1 菌泥乳化方法 在 300L 乳化罐中加入适量净化水,准确称取冻干保护剂各组分(按 1 kg 菌泥添加脱脂奶粉 195 g、海藻糖 75 g、蔗糖 57 g、甘露醇 40 g、甘油 30 g 配制固体保护剂),按各组分先后程序分别称取并倒入乳化罐中,开启搅拌,搅拌转速 80 min,待固体保护剂成分充分溶解后,补足水量,在乳化罐夹套中通入蒸汽进行加温灭菌,灭菌料温维持在 115 °C ~ 118 °C,时间 15 min。灭菌后通冷凝水进行降温,维持罐内料温 4 °C ~ 8 °C,加入离心收集的菌泥,菌泥:液体保护剂(固体保护剂 + 水) = 1:2,乳化时间 5 min ~ 10 min。

1.2.5.2 预冻温度的确定试验方法 将乳化后的料液装入托盘,控制物料厚度在 8 mm ~ 12 mm 之间,放入冻干仓,进行冷冻干燥。预冻对菌体在冻干过程中的存活率有重要影响,试验设预冻温度为

-30 ℃、-35 ℃、-40 ℃、-45 ℃和-50 ℃五个温度值,预冻 1 h,冻干过程物料仓的真空度 40 Pa,测定冻干菌粉的 CFU/g 值和水分含量。

1.2.5.3 真空度的确定试验方法 在冻干过程中,物料仓的真空度是个重要的参数,试验设真空度为 30 Pa、40 Pa、50 Pa 和 60 Pa 四个值,测定其对冻干菌粉的 CFU/g 值和水分含量的影响。

1.2.6 冻干菌粉耐受性测定方法

1.2.6.1 酸耐受性测试方法 称取 4 g 待测冻干菌粉溶解于 36 mL 无菌生理盐水中,充分混匀制成菌悬液。吸取 0.5 mL 菌悬液至装有 4.5 mL 无菌生理盐水试管中,充分混匀,制成 10^{-2} 稀释度菌悬液,以此方法制备 $10^{-3} \sim 10^{-10}$ 稀释度菌悬液,用平板倾注法进行菌落计数。吸取 0.5 mL 菌悬液至 4.5 mL 已经灭菌处理的 MRS 液体培养基(用盐酸调节 pH3.00)试管中,充分混匀,制备 10^{-2} 稀释度菌悬液,以此方法制备 3 支 10^{-3} 稀释度菌悬液,置于 37 ℃水浴中;分别在 1 h、2 h 和 4 h 时取出,用生理盐水稀释后,平板倾注法进行菌落计数。以用无菌生理盐水稀释的菌悬液活菌数计数结果作为空白对照(0 h)。统计经 MRS 液体培养基(pH3.00)处理 1 h、2 h 和 4 h 后的菌悬液活菌数计数结果,以处理时间作为横坐标,活菌数计数结果作为纵坐标绘制曲线。

1.2.6.2 胆盐耐受性测试方法 称取 4 g 待测冻干菌粉溶解于 36 mL 无菌生理盐水中,充分混匀制成菌悬液。吸取 0.5 mL 菌悬液至装有 4.5 mL 无菌生理盐水试管中,充分混匀,制成 10^{-2} 稀释度菌悬液,以此方法制备 $10^{-3} \sim 10^{-10}$ 稀释度菌悬液,用

平板倾注法进行菌落计数。分别称取 4 g 待测冻干菌粉溶解于 36 mL 浓度为 0.20% 和 0.30% 的猪胆盐试剂瓶中,充分混匀,置于 37 ℃水浴中;分别在 1 h、2 h 和 4 h 时取出,用生理盐水稀释后,平板倾注法进行菌落计数。以用无菌生理盐水稀释的菌悬液活菌数计数结果作为空白对照(0 h)。统计经不同猪胆盐浓度处理 1 h、2 h 和 4 h 后的菌悬液活菌数计数结果,以处理时间作为横坐标,活菌数计数结果作为纵坐标绘制曲线。

1.3 测定方法

1.3.1 $OD_{600\text{ nm}}$ 值的测定方法 用 752 N 紫外可见分光光度计测定,用蒸馏水作空白。

1.3.2 pH 值的测定方法 按照 GB/T 6920 规定的方法测定。

1.3.3 活菌数的测定方法 按照 GB/T 20191 规定的方法测定。

1.3.4 水分的测定方法 按照 GB/T 6435 规定的方法测定。

1.4 数据处理与分析 数据利用 SPSS 21.0 统计软件进行方差分析,差异显著时采用 Duncan's 法进行多重比较,显著性水平为 0.05。

2 结果与分析

2.1 优化培养试验

2.1.1 培养温度的优化 嗜酸乳杆菌 La-0231 在 37 ℃下培养,菌液中的活菌数最高达到 $(8.62 \pm 0.14) \times 10^8$ CFU/mL,显著高于其它培养温度($P < 0.05$);此时 $OD_{600\text{ nm}}$ 值也最高为 (2.91 ± 0.13) , pH 值为 (4.51 ± 0.13) (表 1)。

表 1 培养温度的优化试验结果

Tab 1 Optimized results of culture temperature

指标 温度(℃)	33	35	37	39
pH	4.90 ± 0.21 ^a	4.81 ± 0.21 ^a	4.51 ± 0.13 ^{ab}	4.22 ± 0.21 ^b
$OD_{600\text{ nm}}$	1.38 ± 0.13 ^a	2.31 ± 0.14 ^b	2.91 ± 0.13 ^c	2.58 ± 0.03 ^b
活菌数($\times 10^8$ CFU/mL)	1.98 ± 0.37 ^a	2.98 ± 0.08 ^b	8.62 ± 0.14 ^c	3.21 ± 0.14 ^b

2.1.2 培养时间的优化 培养时间为 18 h 时,菌液中的活菌数最高达到 $(8.11 \pm 0.47) \times 10^8$ CFU/mL,显著高于其它培养时间 ($P < 0.05$); 此时 $OD_{600\text{ nm}}$ 值也最高为 (3.07 ± 0.16) , pH 值为 (4.49 ± 0.31) (表 2)。

2.1.3 培养基起始 pH 的优化 培养基起始 pH 值为 6.20 时,菌液中的活菌数最高达到 $(16.00 \pm 0.14) \times 10^8$ CFU/mL,显著高于其它培养基起始 pH

值 ($P < 0.05$); 此时 $OD_{600\text{ nm}}$ 值也最高为 (3.22 ± 0.18) , pH 值为 (4.35 ± 0.25) (表 3)。

2.1.4 培养温度、培养时间和培养基起始 pH 值的优化组合 $L_9(3^4)$ 正交试验结果,实际最佳组合和理论最佳组合一致,均为正交表的试验号 5 ($A_2 B_2 C_3$), 结果值为 4.42×10^9 CFU/mL (表 4)。

表 2 培养时间的优化试验结果

Tab 2 Optimized results of culture time

指标 时间(h)	10	14	18	22	26
pH	5.35 ± 0.23^a	5.04 ± 0.28^{ab}	4.49 ± 0.31^{bc}	4.11 ± 0.11^c	4.08 ± 0.28^c
$OD_{600\text{ nm}}$	0.98 ± 0.06^a	2.12 ± 0.02^b	3.07 ± 0.16^d	2.64 ± 0.07^c	2.21 ± 0.08^b
活菌数($\times 10^8$ CFU/mL)	0.23 ± 0.03^a	0.98 ± 0.07^b	8.11 ± 0.47^d	5.27 ± 0.23^c	4.98 ± 0.25^c

表 3 培养基起始 pH 的优化试验结果

Tab 3 Optimized results of initial pH of culture medium

指标 pH	5.40	5.80	6.20	6.80
pH	4.98 ± 0.28^a	4.85 ± 0.21^{ab}	4.35 ± 0.25^{ab}	4.29 ± 0.21^{bc}
$OD_{600\text{ nm}}$	1.23 ± 0.08^a	1.52 ± 0.08^a	3.22 ± 0.18^c	2.68 ± 0.20^b
活菌数($\times 10^8$ CFU/mL)	0.67 ± 0.04^a	1.21 ± 0.07^a	16.00 ± 0.14^c	6.91 ± 0.34^b

表 4 $L_9(3^4)$ 正交试验结果Tab 4 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal experiment

因素 试验号	A	B	C	重复($\times 10^9$ CFU/mL)			活菌数平均值 ($\times 10^9$ CFU/mL)
	培养温度($^{\circ}\text{C}$)	培养时间(h)	培养基起始 pH	1	2	3	
1	1(36)	1(16)	1(6.00)	0.89	0.67	0.91	0.82
2	1	2(18)	2(6.20)	2.12	2.38	1.21	1.90
3	1	3(20)	3(6.40)	2.05	2.41	2.48	2.31
4	2(37)	1	2	1.91	1.89	2.56	2.12
5	2	2	3	4.61	3.91	4.74	4.42
6	2	3	1	3.22	3.58	4.86	3.89
7	3(38)	1	3	3.41	3.32	3.23	3.32
8	3	2	1	1.81	1.92	1.68	1.80
9	3	3	2	0.71	0.58	0.50	0.60
均值 k1	1.68	2.09	2.17				
均值 k2	3.48	2.71	1.54				
均值 k3	1.91	2.27	3.35				
极差 R	1.80	0.62	1.81				

实际最佳组合是 $A_2 B_2 C_3$
理论最佳组合是 $A_2 B_2 C_3$

因此,嗜酸乳杆菌 La-0231 发酵培养条件为:培养温度 37 °C、培养基初始 pH 值 6.40、培养时间 18 h,并为下一步 5 吨生产罐发酵参数的确定提供了试验依据。

2.2 5 吨生产罐发酵参数的确定 嗜酸乳杆菌 La-0231 在发酵的过程中会不断的产生乳酸,乳酸的不断积累会使 pH 值持续下降,这对于高密度发酵菌体的积累很不利。因此,5 吨生产罐发酵参数中 pH 控制和发酵终点(发酵时间)判定极为重要。图 1 为 37 °C、pH 自然条件下发酵过程 OD_{600 nm} 和 pH 值测定曲线。

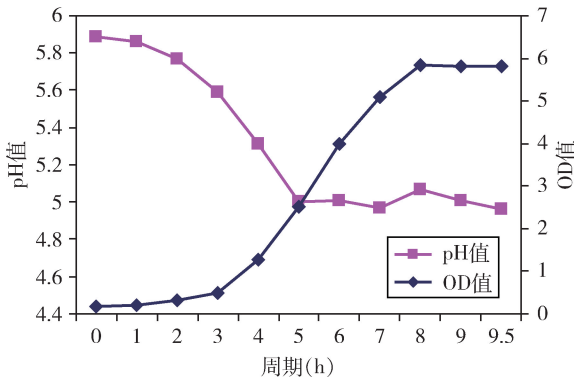


图 1 37 °C、pH 自然条件下发酵过程 OD_{600 nm} 和 pH 值测定曲线

Fig 1 Fermentation process OD_{600 nm} and pH determination curve at 37 °C and pH under natural conditions

当发酵液的 pH 值第一次达到 4.90 时,流加一定量的氢氧化钠溶液,使 pH 值回升到 5.20,停止流加,如此反复两次,菌体在不受低酸度抑制的情况下实现大量累积。发酵温度 37 °C,流加 15% 浓度氢氧化钠溶液发酵 17 h,发酵液的活菌数达到最高为 $(18.62 \pm 1.05) \times 10^8$ CFU/mL,显著高于发酵 16 h、18 h ($P < 0.05$);流加 25% 浓度氢氧化钠溶液发酵 16 ~ 17 h,发酵液的活菌数达到最高为 $(63.11 \pm 2.23) \times 10^8 \sim (68.01 \pm 3.08) \times 10^8$ CFU/mL,显著高于发酵 15 h、18 h ($P < 0.05$),发酵 16 h ~ 17 h 之间无显著性差异 ($P > 0.05$);流加 35% 浓度氢氧化钠溶液发酵 16 h,发酵液的活菌数达到最高为 $(20.12 \pm 1.13) \times 10^8$ CFU/mL,显著高于发酵 15 h、17 h ($P < 0.05$) (表 5)。

表 5 中,流加 15%、25%、35% 浓度氢氧化钠溶液发酵液活菌数最高值比较,流加 25% 浓度氢氧化钠溶液发酵液的活菌数为最高,达到 $(68.01 \pm 3.08) \times 10^8$ CFU/mL,显著高于流加 15%、35% 浓度氢氧化钠溶液 ($P < 0.05$)。

所以,嗜酸乳杆菌 La-0231 菌株 5 吨生产罐最佳发酵控制参数为:发酵温度 37 °C,培养基初始 pH 值为 6.40,氢氧化钠的流加浓度为 25%,发酵时间为 16 h,发酵液最终 pH 值范围在 4.20 ~ 4.80 之间,OD_{600 nm} 值在 6.00 以上,活菌数为 6.80×10^9 CFU/mL。

表 5 流加不同浓度氢氧化钠溶液发酵试验结果

Tab 5 Results of fed-batch fermentation with different concentrations of sodium hydroxide

NaOH 浓度 (%)	15			25			35		
	pH	OD _{600 nm}	活菌数 ($\times 10^8$ CFU/mL)	pH	OD _{600 nm}	活菌数 ($\times 10^8$ CFU/mL)	pH	OD _{600 nm}	活菌数 ($\times 10^8$ CFU/mL)
13	4.87 ± 0.27 ^a	4.90 ± 0.17 ^a	2.98 ± 0.10 ^a	4.95 ± 0.28 ^a	5.52 ± 0.25 ^a	12.02 ± 0.45 ^a	5.02 ± 0.23 ^a	5.11 ± 0.21 ^a	5.02 ± 0.16 ^a
14	4.68 ± 0.33 ^{ab}	5.32 ± 0.24 ^{ab}	4.58 ± 0.25 ^b	4.73 ± 0.27 ^{ab}	5.97 ± 0.20 ^{ab}	24.91 ± 0.85 ^b	4.84 ± 0.10 ^{ab}	5.39 ± 0.35 ^{ab}	8.75 ± 0.40 ^b
15	4.54 ± 0.23 ^{ab}	5.54 ± 0.16 ^{bc}	8.43 ± 0.48 ^c	4.59 ± 0.46 ^{ab}	6.50 ± 0.20 ^b	44.10 ± 1.24 ^c	4.67 ± 0.21 ^{ab}	5.99 ± 0.30 ^{bc}	12.08 ± 0.55 ^c
16	4.36 ± 0.31 ^{ab}	5.88 ± 0.25 ^{bc}	15.91 ± 0.66 ^d	4.31 ± 0.13 ^{ab}	6.17 ± 0.21 ^{ab}	68.01 ± 3.08 ^e	4.55 ± 0.18 ^{bc}	5.85 ± 0.35 ^{bc}	20.12 ± 1.13 ^d
17	4.24 ± 0.18 ^{bc}	5.90 ± 0.34 ^{bc}	18.62 ± 1.05 ^e	4.22 ± 0.30 ^b	7.21 ± 0.41 ^c	63.11 ± 2.23 ^{de}	4.50 ± 0.13 ^{bc}	6.21 ± 0.13 ^c	18.01 ± 0.57 ^e
18	4.18 ± 0.11 ^{bc}	6.20 ± 0.17 ^c	17.01 ± 0.48 ^d	4.20 ± 0.16 ^b	7.30 ± 0.21 ^c	61.98 ± 2.19 ^d	4.46 ± 0.17 ^{bc}	6.12 ± 0.17 ^c	17.93 ± 0.71 ^e
19	4.17 ± 0.18 ^{bc}	6.07 ± 0.42 ^c	15.72 ± 0.45 ^d	4.18 ± 0.18 ^b	7.29 ± 0.31 ^c	58.32 ± 3.55 ^d	4.30 ± 0.14 ^c	6.12 ± 0.34 ^c	16.14 ± 0.51 ^d

2.3 离心参数的确定 发酵液在离心过程中,流量的大小决定离心所用的时间和菌泥的收得率,同时离心过程由于离心力的作用,会对菌体有一定的损伤。离心时的流量为 216 L/h 时,在每升发酵液

获得(10.32 ± 0.67) g 较高菌泥收率的情况下,菌泥活菌数含量最高为(7.02 ± 0.23) × 10¹¹ CFU/g,显著高于其它流量指标(P < 0.05),计算总活菌数为 7.24 × 10¹² CFU/g(表 6)。

表 6 流量对菌泥收率和活菌数含量的影响

Tab 6 Effects of flow rate on the yield and the number of viable bacteria

流量(L/h)	144	180	216	252	288
菌泥收得率(g/L)	11.85 ± 0.51 ^a	11.11 ± 0.40 ^b	10.32 ± 0.67 ^c	9.50 ± 0.42 ^d	9.12 ± 0.41 ^e
活菌数(×10 ¹¹ CFU/g)	2.11 ± 0.07 ^a	3.55 ± 0.13 ^b	7.02 ± 0.23 ^d	5.30 ± 0.18 ^e	5.12 ± 0.18 ^e
总活菌数(×10 ¹² CFU)	2.50	3.94	7.24	5.04	4.67

2.4 冻干参数的确定 预冻温度在 -45 °C ~ -50 °C 的条件下,冻干菌粉的活菌数含量最高达到(3.61 ± 0.13) × 10¹¹ ~ (3.97 ± 0.08) × 10¹¹ CFU/g,显著高于其它预冻温度(P < 0.05),预冻温度 -45 °C ~ -50 °C 之间无显著性差异(P > 0.05);此时水分含量为(3.10 ± 0.31)% ~ (3.22 ± 0.14)% (表 7)。

2.5 冻干菌粉耐受性测定

表 7 预冻温度对冻干菌粉的活菌数和水分含量的影响

Tab 7 Effects of prefreezing temperature on viable bacteria count and moisture content of freeze-dried powder

预冻温度(°C)	活菌数(×10 ¹¹ CFU/g)	水分(%)
-30	1.45 ± 0.04 ^a	5.34 ± 0.11 ^a
-35	2.12 ± 0.07 ^b	4.16 ± 0.17 ^b
-40	3.25 ± 0.27 ^c	3.51 ± 0.11 ^c
-45	3.97 ± 0.08 ^d	3.22 ± 0.14 ^{cd}
-50	3.61 ± 0.13 ^{cd}	3.10 ± 0.31 ^d

2.5.1 对酸的耐受性测试 嗜酸乳杆菌 La-0231 在 pH3.00 的 MRS 液体培养基中处理 0 ~ 1 h,活菌数从(2.31 ± 0.06) × 10¹¹ CFU/g 降至(1.91 ± 0.06) × 10¹¹ CFU/g(P < 0.05),存活率为 82.68%;处理 0 ~ 2 h,活菌数从(2.31 ± 0.06) × 10¹¹ CFU/g 降为(1.82 ± 0.07) × 10¹¹ CFU/g(P < 0.05),存活率为 78.79%;处理 0 h ~ 4 h,活菌数从(2.31 ± 0.06) × 10¹¹ CFU/g 降为(1.31 ± 0.04) × 10¹¹ CFU/g(P < 0.05),存活率为 56.71% (图 2)。

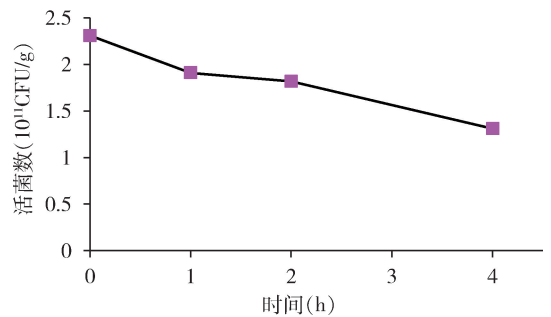


图 2 活菌数随处理时间的变化趋势

Fig 2 The changing trend of viable bacterial count with treatment time

50 Pa 的真空度对冻干菌粉活菌数含量的影响最小,冻干菌粉活菌数含量最高为(4.56 ± 0.14) × 10¹¹ CFU/g,显著高于其它真空度(P < 0.05);冻干菌粉水分含量为(3.19 ± 0.14)% (表 8)。

2.5.2 对胆盐耐受性的测试 嗜酸乳杆菌 La-0231 在 0.20% 浓度的猪胆盐溶液中处理 0 h ~ 1 h,活菌数从(1.23 ± 0.06) × 10¹¹ CFU/g 降至(1.08 ± 0.06) × 10¹⁰ CFU/g(P > 0.05),存活率为 87.80%;处理 0 h ~ 2 h,活菌数从(1.23 ± 0.06) × 10¹¹ CFU/g 降为(1.08 ± 0.06) × 10¹⁰ CFU/g(P > 0.05),存活率为 87.80%;处理 0 h ~ 4 h,活菌数从(1.23 ±

表 8 真空度对冻干菌粉的活菌数和水分含量的影响

Tab 8 Effects of vacuum degree on viable bacteria count and moisture content of freeze-dried powder

真空度(Pa)	活菌数(×10 ¹¹ CFU/g)	水分(%)
30	2.78 ± 0.11 ^a	4.12 ± 0.14 ^a
40	3.12 ± 0.11 ^b	3.74 ± 0.10 ^b
50	4.56 ± 0.14 ^c	3.19 ± 0.14 ^c
60	2.44 ± 0.11 ^d	2.85 ± 0.11 ^c

0.06) $\times 10^{11}$ CFU/g 降为 $(1.01 \pm 0.06) \times 10^{10}$ CFU/g ($P > 0.05$), 存活率为 82.11%。在 0.30% 浓度的猪胆盐溶液中处理 0 h ~ 1 h, 活菌数从 $(1.23 \pm 0.06) \times 10^{11}$ CFU/g 降至为 $(0.74 \pm 0.03) \times 10^{10}$ CFU/g ($P < 0.05$), 存活率为 60.16%; 处理 0 h ~ 2 h, 活菌数从 $(1.23 \pm 0.06) \times 10^{11}$ CFU/g 降为 $(0.70 \pm 0.04) \times 10^{10}$ CFU/g ($P < 0.05$), 存活率为 56.91%; 处理 0 h ~ 4 h, 活菌数从 $(1.23 \pm 0.06) \times 10^{11}$ CFU/g 降为 $(0.70 \pm 0.04) \times 10^{10}$ CFU/g ($P < 0.05$), 存活率为 56.91% (图 3)。

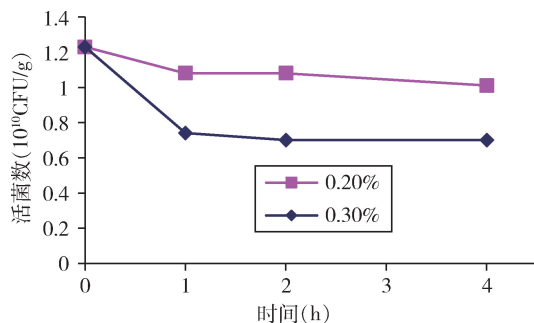


图 3 活菌数随处理时间的变化趋势

Fig 3 The changing trend of viable bacterial count with treatment time

3 讨论与结论

陈齐等采用分离自人体肠道的一株嗜酸乳杆菌 LA - G80, 通过单因素试验优化获得其最佳基础培养基为葡萄糖 41.5 g/L、麦芽糖 20 g/L、牛肉浸粉 18.64 g/L、蛋白胨 15 g/L、胰蛋白胨 10 g/L、大豆低聚糖 10 g/L、乙酸钠 5 g/L、柠檬酸三铵 2 g/L、 K_2HPO_4 2 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25 g/L、 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.05 g/L、1 mL/L 吐温 - 80; 添加豆饼粉 7.43 g/L、花生蛋白粉 5.43 g/L、天门冬氨酸 0.16 g/L、丙氨酸 0.16 g/L、丝氨酸 0.16 g/L 作增殖因子。最佳发酵条件为接种量 2%、恒温 37 °C、培养基初始 pH6.00、恒定 pH5.50 厌氧发酵, 发酵液最高活菌数 4.22×10^9 CFU/mL; 相比较 MRS 发酵培养基活菌数提高约 9 倍^[6]。赵燕霞等采用分离自新疆传统酸马奶中的一株嗜酸乳杆菌 IMAU30067, 通过单因素试验、正交试验以及响应面法优化得到其最佳基础培养基为葡萄糖

30.00 g/L、麦芽糖 30.00 g/L、鱼蛋白胨 30.00 g/L、海藻糖 20.00 g/L、大豆蛋白胨 10.00 g/L、乙酸钠 5.74 g/L、柠檬酸钠 2.29 g/L、 K_2HPO_4 2.29 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.80 g/L; 添加马铃薯提取物 6.00 g/L、组氨酸 0.10 g/L 作增殖因子。最佳发酵条件为接种量 1×10^6 CFU/mL、初始 pH 值 6.50, 于 37 °C 恒 pH5.00 厌氧发酵, 发酵液最高活菌数 3.72×10^9 CFU/mL; 相比较 MRS 发酵培养基活菌数提高约 8 倍^[7]。张超凤等采用中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC) 购买的嗜酸乳杆菌菌种, 通过单因素试验、正交试验优化获得其最佳基础培养基为 4°Bx 碎米水解液、豆粕 (豆粕加水煮沸 20 min, 过滤) 20 g/L、葡萄糖 15 g/L、乙酸钠 5 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L、 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.25 g/L; 添加白萝卜汁 70 g/L、麦芽汁 60 g/L、乳糖 9 g/L 作增殖因子。最佳发酵条件为接种量 5%、恒温 37 °C、培养基初始 pH5.50 ~ 6.00、通 5% CO_2 厌氧发酵, 发酵液最高活菌数 6.20×10^9 CFU/mL。相比较其最佳基础培养基活菌数提高约 12 倍^[8]。

研究以猪源嗜酸乳杆菌 La - 0231 为供试菌株。以葡萄糖 20 g/L、蛋白胨 10 g/L、牛肉浸粉 10 g/L、酵母浸膏 5 g/L、乙酸钠 5 g/L、柠檬酸氢二铵 2 g/L、 K_2HPO_4 2 g/L、 $CaCl_2$ 1 g/L、L - 半胱氨酸盐酸盐 0.5 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L、 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.25 g/L、1 mL/L 吐温 80 为基础培养基 (改良 MRS 培养基); 添加豆粕水解物 6.00 g/L、复合氨基酸 0.25 g/L (异亮氨酸 0.05 g/L、半胱氨酸 0.05 g/L、天门冬氨酸 0.05 g/L、丙氨酸 0.05 g/L、赖氨酸 0.05 g/L) 作增殖因子。与上述陈齐、赵燕霞等采用的基础培养基相比较, 原料用量少, 成本低; 与张超凤等采用的基础培养基和增殖因子相比较, 原料处理简单, 更符合工业化生产要求。本研究经单因素试验、正交试验优化的 5 吨生产罐发酵最佳控制参数为接种量 2%、发酵温度 37 °C、培养基初始 pH 值为 6.40、流加氢氧化钠浓度为 25% 控制发酵液 pH4.90 ~ 5.20、发酵时间为 16 h、发酵液最终 pH 值范围在 4.20 ~ 4.80 之间、 $OD_{600\text{nm}}$ 值在 6.00 以上, 发酵液最高活菌数 6.80×10^9 CFU/mL,

相比较采用 MRS 发酵培养基活菌数提高约 10 倍; 优于上述陈齐、赵燕霞、张超凤等试验所获结果。同时, 与上述陈齐、赵燕霞、张超凤等试验所获最佳发酵条件相比较, 培养基初始 pH 值、控制发酵过程发酵液 pH 范围等参数值有所不同。上述试验结果比较说明, 进一步开发不同猪源嗜酸乳杆菌发酵生产工艺, 菌株不同, 基础培养基、添加增殖因子以及最佳发酵条件也略有不同, 本试验结果仅供参考借鉴。但发酵过程 37 °C 培养、流加 25% 浓度氢氧化钠控制发酵液 pH 应具有普适性。

本研究发酵液离心时的流量设定值以 216 L/h 为优。确定预冻温度为 -45 °C ~ -50 °C 最佳, 冷冻干燥中物料仓的真空度设定以 50 Pa 较为适宜。离心、冻干工艺优化后, 冻干菌粉活菌数含量为 4.56×10^{11} CFU/g, 水分含量 3.19%。与优化前冻干菌粉活菌数含量相比提高约 3 ~ 5 倍。此结果为进一步开发不同猪源嗜酸乳杆菌离心、冻干工艺, 为进一步扩大猪源嗜酸乳杆菌 La-0231 菌粉产业化规模生产, 提供了指导意义。

袁林等采用 Plackett - Burman 试验设计优化其增殖培养基及其发酵条件, 获得发酵液的最高活菌数为 4.32×10^{10} CFU/mL^[9]。王晓萌等通过单因素和响应面试验, 对冷冻干燥前的嗜酸乳杆菌进行休克处理条件优化, 再结合复合冻干保护剂, 使其冷冻干燥后的存活率提高至 96.94%; 比未冷休克, 添加保护剂冷冻干燥 (78.99%) 高出 17.65%; 比未冷休克, 未添加保护剂冷冻干燥 (21.42%) 高出 75.22%^[10]。参比上述试验研究方法, 为进一步提高猪源嗜酸乳杆菌 La-0231 发酵液活菌数及冻干菌粉活菌含量, 采用一些更新的思路、更新的手段优化菌粉生产工艺值得借鉴。

经耐酸、耐胆盐性能测试, 显示猪源嗜酸乳杆菌 La-0231 具有良好的耐酸、耐胆盐特性。

参考文献:

- [1] Widyastuti Y, Rohmatussolihat, Febrisiantosa A. The Role of Lactic Acid Bacteria in Milk Fermentation[J]. Food & Nutrition Science, 2014, 5(4): 435 - 442.
- [2] Scapin D, Grando W F, Rossi E M, et al. Antagonistic Activity

of *Lactobacillus acidophilus* LA10 against *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis SE86 in Mice[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2013, 41(1): 57 - 61.

- [3] 赵臣, 王四新, 张董燕, 等. 一株猪源嗜酸乳杆菌的体外生长、产酸、抑菌、粘附及抗氧化能力的研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2018, 53(2): 6 - 12.
Zhao C, Wang S X, Zang D Y, et al. Growth, Acidogenicity, Bacteriostasis, Adhesion and Antioxidation Capacity of *Lactobacillus acidophilus* from Porcine *in vitro*[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2018, 53(2): 6 - 12.
- [4] Mathew B, Sue P, Julian M, et al. The Life History of *Lactobacillus acidophilus* as a Probiotic: A Tale of Revisionary Taxonomy, Misidentification and Commercial Success[J]. FEMS Microbiology Letters, 2013, 349: 77 - 87.
- [5] 胡国才, 黄静, 吴晓玉. 猪源肠道嗜酸乳杆菌的分离、鉴定及其驯化[J]. 动物营养学报, 2015, 27(4): 1316 - 1325.
Hu G C, Huang J, Wu X Y. Isolation, Identification and Acclimation of *Lactobacillus acidophilus* from Intestinal Tracts of Piglets [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2015, 27(4): 1316 - 1325.
- [6] 陈齐, 马章献, 郑建丰, 等. 嗜酸乳杆菌 LA-G80 发酵培养基的优化[J]. 乳业科学与技术, 2019, 42(5): 9 - 15.
Chen Q, Ma Z X, Zheng J F, et al. Optimization of Medium Composition and Conditions for Growth of *Lactobacillus acidophilus* LA-G80 [J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2019, 42(5): 9 - 15.
- [7] 赵燕霞, 王元弛, 姚国强, 等. 嗜酸乳杆菌 IMAU30067 增殖培养基的研究[J]. 中国乳品工业, 2019, 47(2): 15 - 21.
Zhao Y X, Wang Y C, Yao G Q, et al. Study on the Optimization of Enrichment Medium of *Lactobacillus acidophilus* IMAU30067 [J]. China Dairy Industry, 2019, 47(2): 15 - 21.
- [8] 张超凤, 李情敏, 严美婷, 等. 增殖因子对嗜酸乳杆菌液态培养的影响[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(14): 178 - 182.
Zhang C F, Li Q M, Yan M T, et al. Effect of Proliferation Factor on the Liquid Culture of *Lactobacillus acidophilus* [J]. Food Research and Development, 2017, 38(14): 178 - 182.
- [9] 袁林, 张明华, 涂坤坤, 等. 响应面法优化包被发酵嗜酸乳杆菌的高密度培养[J]. 中国酿造, 2019, 38(2): 104 - 110.
Yuan L, Zhang M H, Tu Y K, et al. Optimization of High Density Fermentation *Lactobacillus acidophilus* by Response Surface Method [J]. China Brewing, 2019, 38(2): 104 - 110.
- [10] 王晓萌, 甄妮, 田启远, 等. 冷休克处理提高嗜酸乳杆菌的冻干存活率[J]. 中国食品学报, 2021, 21(3): 203 - 209.
Wang X M, Zhen N, Tian Q Y, et al. Improvement of Freeze-drying Survival Rate of *Lactobacillus acidophilus* by Cold Shock Treatment [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(3): 203 - 209.