

母乳婴儿源植物乳杆菌高密度培养 与冻干保护剂优化

张娜¹, 周悦¹, 朱维红¹, 何富强¹, 张保石¹, 田春豪¹, 潘宇涵¹, 田洪涛^{2*}, 苗晓燕^{1*}, 赵丽娜^{3*}, 焦玉兰^{4*}

(1. 保定学院生物化工与环境工程学院, 河北保定 071000) (2. 河北农业大学食品科技学院, 河北保定 071000)

(3. 昭通学院化学化工学院, 云南昭通 657000) (4. 瑞普(保定)生物药业有限公司, 河北保定 071000)

摘要: 为推动具有免疫调节、降胆固醇等多种益生特性且遗传背景清晰的婴儿源植物乳杆菌 BF₁₅ 产业化进程, 该研究通过单因素结合正交试验对培养基组分和培养条件进行优化, 单因素结合一定复配比对冻干保护剂优化。结果表明: MRS 培养基中的活菌数 2.30×10^9 CFU/mL, 通过单因素结合正交试验得到最优培养基组分组合: 低聚果糖 30 g/L、氮源 (大豆蛋白胨: 酵母膏 = 3:1) 30 g/L、无水乙酸钠 6 g/L、硫酸锰 75 mg/L, 活菌数提高到 6.93×10^9 CFU/mL; 在最优培养条件: 接种量体积分数 5%、培养温度 33 ℃、初始 pH 值 7.0、溶氧量 0 r/min, 活菌数提高到 8.92×10^9 CFU/mL, 是优化前的 3.88 倍。最优冻干保护剂配方: 脱脂乳 100 g/L、牛血清 10 mL/L、蔗糖 80 g/L、谷氨酸钠 20 g/L、酵母浸粉 15 g/L、吐温 80 10 mL/L, 菌株存活率为 90.57%, 活菌数达到 2.45×10^{10} CFU/mL。冻干菌粉在 4 ℃贮藏 56 d, 存活率 82.35%, 活菌数达 2.02×10^{10} CFU/mL; 经胃肠液后存活率 69.70%, 活菌数达 1.41×10^{10} CFU/mL。综上, 实现了植物乳杆菌 BF₁₅ 的高密度培养并获得高活菌制剂, 为加快产业化进程提供了坚实理论支持。

关键词: 植物乳杆菌; 高密度培养; 冻干保护剂; 高活菌制剂

文章编号: 1673-9078(2025)11-77-88

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.11.1210

Optimization of High-density Culture and Lyoprotectant for *Lactobacillus plantarum* BF₁₅ from Breast-fed Infants

ZHANG Na¹, ZHOU Yue¹, ZHU Weihong¹, HE Fuqiang¹, ZHANG Baoshi¹, TIAN Chunhao¹, PAN Yuhan¹,

TIAN Hongtao^{2*}, MIAO Xiaoyan^{1*}, ZHAO Lina^{3*}, JIAO Yulan^{4*}

(1. College of Biochemistry and Environmental Engineering, Baoding University, Baoding 071000, China)

(2. College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China)

(3. School of Chemistry and Chemical Engineering, Zhaotong University, Zhaotong 657000, China)

(4. Ringpu(baoding) Biological Pharmaceutical Co. Ltd., Baoding 071000, China)

引文格式:

张娜, 周悦, 朱维红, 等. 母乳婴儿源植物乳杆菌高密度培养与冻干保护剂优化[J]. 现代食品科技, 2025, 41(11): 77-88.

ZHANG Na, ZHOU Yue, ZHU Weihong, et al. Optimization of high-density culture and lyoprotectant for *Lactobacillus plantarum* BF₁₅ from breast-fed infants [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(11): 77-88.

收稿日期: 2024-08-16; 修回日期: 2024-11-18; 接受日期: 2024-11-22

基金项目: 河北省教育厅科学研究项目 (QN2022206); 保定学院科研培育基金项目 (2021Z02); 保定学院转型发展研究基金项目 (2022Z03); 国家自然科学基金项目 (31140065); 河北省重点研发项目 (19227134D)

作者简介: 张娜 (1983-) 女, 博士, 讲师, 研究方向: 功能性益生菌, E-mail: zhangna841017@163.com

通讯作者: 田洪涛 (1963-) 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品微生物 (益生菌) 生物技术与发酵工程, E-mail: tht631022@163.com; 共同通

讯作者: 苗晓燕 (1980-) 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 食品微生物, E-mail: 34630999@qq.com; 赵丽娜 (1988-) 女, 博士, 讲师, 研究

方向: 食品微生物与生物技术, E-mail: 191414647@qq.com; 焦玉兰 (1979-) 女, 硕士, 高级兽医师, 研究方向: 动物源微生物, E-mail:

013307600@163.com

Abstract: In order to promote the industrialization of *Lactobacillus plantarum* BF_15 with multiple probiotic properties (such as immune regulation and cholesterol reduction) from breast-fed infants with clear genetic background. In this study, the medium components and culture conditions were optimized through single-factor combined with orthogonal experiments, and the lyoprotectants were optimized through single-factor experiments combined with specific formulation ratios. The results showed that the viable cell count of BF_15 in MRS Medium was 2.30×10^9 CFU/mL. The optimal medium composition obtained through single-factor combined orthogonal experiments was: fructooligosaccharides, 30 g/L; nitrogen source (soy protein peptone:yeast extract=3:1), 30 g/L; sodium acetate anhydrous, 6 g/L; manganese sulfate, 75 mg/L. Under these conditions, the viable cell count of BF_15 reached 6.93×10^9 CFU/mL. The optimal culture conditions: inoculation volume fraction, 5%; incubation temperature, 33 °C; initial pH value 7.0; dissolved oxygen level, 0 r/min. Under such conditions, a viable cell count of 8.92×10^9 CFU/mL was achieved, which was 3.88 times that before optimization. The optimal lyoprotectant formulation was: skim milk, 100 g/L; bovine serum, 10 ml/L; sucrose, 80 g/L; sodium glutamate, 20 g/L; yeast extract powder, 15 g/L; Tween 80, 10 ml/L. Under these conditions, the survival rate of BF_15 was 90.57%, with a viable cell count of 2.45×10^{10} CFU/mL. After a storage at 4 °C for 56 days, the survival rate of the freeze-dried bacterial powder was 82.35%, with a viable cell count of 2.02×10^{10} CFU/mL. Following the gastrointestinal fluid treatment, the survival rate was 69.70%, with a viable cell count of 1.41×10^{10} CFU/mL. In summary, the high-density culture of *Lactobacillus plantarum* BF_15 was realized and highly viable bacteria preparations were obtained, which provides solid theoretical support for accelerating the industrialization process.

Key words: *Lactobacillus plantarum*; high-density culture; lyoprotectant; high-viability probiotic formulation

中国国民肠道需要中国益生菌来守护。近年来,国内学者在益生菌的资源、功效、机制等方面进行了大量研究,建立了全亚洲最大的乳酸菌菌种资源库(10 000余株),成功填补了我国自主原创菌种空白^[1]。基础研究和临床试验还远远不够,乳酸菌产业化是让乳酸菌“跳”出实验室,拥抱市场的重要一步。《2021年我国益生菌产业发展十大焦点》中,“益生菌菌种培养关键技术,益生菌菌体保护技术,益生菌高活性制备及加工生产装备”赫然在列,益生菌行业集中力量破解高活性益生菌产业发展中的瓶颈问题^[2]。

植物乳杆菌,凭借其来源广泛且具有维持肠道内菌群平衡、提高机体免疫力等突出益生特性,是目前研究和应用范围较广的乳酸菌之一^[3]。由于乳酸菌种类繁多,存在个体差异性,不同菌株的最适营养成分和生长条件存在较大差异;冷冻干燥技术的保护效果在不同菌属,甚至在同一菌属不同种之间存在巨大差异^[4]。因此,益生菌产业化前的高密度培养技术、高活性制备和高稳定性保持技术等研究工作亟待开展。

李娜^[5]通过优化培养基组分和培养条件使植物乳杆菌 ZJ316 活菌数达 8.01×10^9 CFU/mL,进一步优化冻干保护剂配方使菌株存活率为 88.5%;菌株在冻干后对人工胃、肠液仍有较强的耐受性,贮藏在 4、-20 °C 条件下保存效果较好。王馨钰^[6]确定了植物乳杆菌 Y2 培养基配方使其活菌数达 2.80×10^{11} CFU/mL;脱脂乳、海藻糖与菊粉等比例混合制备冻干保护剂,冻干存活率为 86.87%,但没有进一步探究冻干菌粉的贮藏稳定性及胃肠液耐受能力。目前在围绕植物乳杆

菌进行较全面系统的高密度培养与高活菌制剂研究方面有所欠缺。

本研究对象植物乳杆菌 BF_15 是从百余株婴儿源乳杆菌中筛选出,在具有普遍益生特性,耐胆盐、耐酸和对人工模拟胃肠液有较强耐受能力基础上,还具有免疫调节、缓解氧化应激、降低胆固醇等显著益生功能,具备作为微生态制剂的潜力^[7-9]。同时作为专利菌株(专利号:202010193432.4),为加快产业化进程,进一步完成了全基因组测序,获得了 BF_15 清晰遗传背景^[10]。植物乳杆菌 BF_15 要作为规模化的益生菌菌剂,高密度发酵工艺、菌剂的制备方法以及贮藏条件的研究是当前亟待解决的问题。本研究通过单因素和正交试验设计优化培养基组分以及培养条件组合,实现菌株的高密度培养;进一步通过单因素结合一定复配比得到冻干保护剂配方,获得高活力、高耐受、稳定性强的益生菌制剂,从而建立高密度培养技术并优化真空冷冻干燥技术,为植物乳杆菌在食品和医药领域的应用提供了重要的技术支持,是实现植物乳杆菌高效生产和应用的基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株

植物乳杆菌 BF_15 是本团队前期分离自母乳婴儿源,经体内外试验证实菌株兼具免疫调节、缓解氧化应激、降低胆固醇等益生特性,完成了全基因组测序,

申请了专利（专利号：202010193432.4），目前保藏于中国科学院微生物研究所。

1.1.2 试剂

酵母浸粉、牛肉膏和琼脂粉，北京双旋微生物培养基制品厂；大豆蛋白胨、胰蛋白胨、鱼蛋白胨和牛骨蛋白胨，北京鸿润宝顺科技有限公司；葡萄糖、氯化钠、磷酸氢二钾、柠檬酸铵、无水乙酸钠、水合硫酸镁、水合硫酸锰、硫酸铁、硫酸铜、硫酸锌和吐温80，天津市科密欧化学试剂有限公司；海藻糖、低聚半乳糖、棉籽糖、低聚果糖、低聚异麦芽糖、半乳糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、果糖、水苏糖、低聚木糖、菊糖和核糖，山东百龙创园生物科技股份有限公司；各种氨基酸，河北华阳生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

SW-CJ-2F 洁净工作台，苏州安泰空气技术有限公司；HZQ-F160 恒温培养箱，哈尔滨市东联电子技术开发有限公司；GR60DF 立式自动压力蒸汽灭菌器，致微（厦门）仪器有限公司；FD8-4 冷冻干燥机，美国SIM 国际有限公司；TGL-16B 高速离心机，上海安亭科学仪器厂。

1.3 人工模拟胃液和肠液

人工胃液：pH 值 3.0 的灭菌 PBS 中，加入 3 g/L 过滤除菌的胃蛋白酶；人工肠液：pH 值 8.0 的灭菌 PBS 中，加入 3 g/L 胆盐和 1 g/L 过滤除菌胰蛋白酶。

1.4 方法

1.4.1 菌株活化

植物乳杆菌 BF_15 冻干菌粉接种于 MRS 中，在 37 ℃ 活化 2~3 次，菌株培养 14~16 h 至稳定期，活菌数达到 10⁹ CFU/mL 以上进行后续试验。

1.4.2 培养基组分优化

1.4.2.1 碳源

分别加入质量浓度为 20 g/L 的蔗糖、乳糖、麦芽糖等 16 种糖代替 MRS 中的葡萄糖配制培养基，不加碳源培养基为空白对照组，MRS 为阴性对照组。BF_15 按体积分数 2% 的接种量接种于培养基中，每组 3 个平行。于 37 ℃ 培养至稳定期，以菌体密度（OD₆₀₀）为指标筛选出 BF_15 的最适碳源。

分别加入质量浓度为 15、20、25、30、35 g/L 的最适碳源，其他组分与 MRS 一致，按体积分数为 2% 的接种量接种于培养基中，每组 3 个平行。于 37 ℃ 培养至稳定期，以 OD₆₀₀ 和活菌数为指标筛选碳源最适添加量。植物乳杆菌活菌数的测定方法按 GB 4789.35-

2016^[11]进行，按梯度稀释后进行倾注倒板并于 37 ℃ 培养 24 h 进行活菌计数。

1.4.2.2 氮源

分别加入 25 g/L 添加量的酵母浸粉、酵母浸膏、鱼蛋白胨等 8 种取代 MRS 中的氮源配制培养基，不加氮源的培养基为空白对照组，MRS 为阴性对照组。BF_15 按体积分数为 2% 的接种量接种于培养基中，每组 3 个平行。于 37 ℃ 培养至稳定期，以 OD₆₀₀ 为指标筛选出最适氮源及最优氮源的复配比。

分别加入 15、20、25、30、35 g/L 添加量的复配氮源，其他组分与 MRS 一致，按体积分数为 2% 的接种量接种于培养基中，每组 3 个平行。于 37 ℃ 培养至稳定期，以 OD₆₀₀ 和活菌数为指标筛选出最适复配氮源质量浓度。

1.4.2.3 微量元素

将不同微量元素（MgSO₄·7H₂O、MnSO₄·5H₂O）单一加入培养基中，硫酸镁的添加量分别为 100、200、300、400、500 mg/L，硫酸锰的添加量分别为 50、75、100、125、150 mg/L。BF_15 按体积分数为 2% 的接种量接种于培养基中，于 37 ℃ 培养至稳定期，以活菌数为指标筛选出最适微量元素及其最适质量浓度，每组 3 个平行。

1.4.2.4 缓冲盐

将不同质量浓度的缓冲盐 2 g/L 磷酸氢二钠、2 g/L 磷酸氢二钾、2 g/L 柠檬酸铵、5 g/L 无水乙酸钠、2 g/L 柠檬酸二胺单一加入培养基中，不加缓冲盐的培养基为空白对照组。BF_15 按体积分数为 2% 的接种量接种于培养基中，每组 3 个平行。于 37 ℃ 培养至稳定期，以活菌数为试验指标，筛选出最适缓冲盐。

在筛选出的最适缓冲盐基础上，分别加入质量浓度为 3、4、5、6、7 g/L 的最适缓冲盐，其他组分与 MRS 一致，按体积分数为 2% 的接种量接种于培养基中，于 37 ℃ 培养至稳定期，以活菌数为指标筛选出缓冲盐最适添加量，每组 3 个平行。

1.4.2.5 培养基正交优化

表 1 培养基成分正交试验因素与水平设计
Table 1 Orthogonal test factors and level design of medium components

水平	因素			
	A(低聚果糖)/(g/L)	B(复配氮源)/(g/L)	C(无水乙酸钠)/(g/L)	D(硫酸锰)/(mg/L)
1	20	20	5	50
2	25	25	6	75
3	30	30	7	100

对影响菌体生物量的主要因素碳源、氮源、缓冲盐和微量元素作为影响因素进行四因素三水平 $L_9(3^4)$ 正交试验（表 1），以活菌数为指标，确定最佳培养基组分。

1.4.3 培养条件优化

1.4.3.1 培养条件单因素优化

在正交试验所得最优组合培养基基础上，对接种量体积分数为：2%、3%、4%、5% 和 6%，初始 pH 值：6.0、6.5、7.0、7.5，培养温度：33、35、37、39、42 ℃，溶氧量根据培养箱转速：0、40、80、120、160 r/min，进行单因素试验，控制单一变量，每组 3 个平行。于 37 ℃ 培养至稳定期，以活菌数为试验指标，筛选出最适接种量、最适的初始 pH 值、最适培养温度和最适溶氧量。

1.4.3.2 培养条件正交优化

以接种量、初始 pH 值、培养温度和溶氧量作为培养条件的影响因素进行四因素三水平 $L_9(3^4)$ 正交试验（表 2），以活菌数为指标，确定最佳培养条件。

表 2 培养条件正交试验因素与水平设计
Table 2 Orthogonal test factors and level design of culture conditions

水平	因素			
	A(接种量)/%	B(培养温度)/℃	C(初始 pH 值)	D(溶氧量)/(r/min)
1	3	35	6.5	0
2	4	35	7.0	40
3	5	37	7.5	80

1.4.4 冻干保护剂优化

1.4.4.1 保护剂单因素筛选

以 100 g/L 的脱脂乳，10 ml/L 的牛血清作为基础冻干保护剂，分别添加碳源、氮源、脂类和维生素等保护因子进行单因素试验，种类及添加量：50 g/L 乳糖、50 g/L 蔗糖、50 g/L 葡萄糖、50 g/L 木糖醇、10 g/L 酵母浸粉、20 g/L 谷氨酸钠、10 ml/L 甘油、10 ml/L 吐温 80、1 g/L 抗坏血酸、1 ml/L 维生素 E，向离心后的菌体中加入其 3 倍体积的保护剂混合均匀，取 1.5 mL 分别装到灭菌的冻干瓶中，放 -80 ℃ 预冻 24 h，再冻干 14 h，计算存活率。公式如下：

$$X = \frac{A}{B} \times 100\%$$

式中：
X——存活率，%；
A——真空冷冻干燥后活菌数，CFU；
B——真空冷冻干燥前活菌数，CFU。

1.4.4.2 复合保护剂的复配

在单因素试验中将影响菌体冻干存活率的主要 4 种保护成分，以活菌数为指标，按照以下比例进行复配，确定最佳保护剂成分（表 3）。

表 3 冻干保护剂复配
Table 3 Lyoprotectant composition

编号	复配			
	A(蔗糖)/(g/L)	B(谷氨酸钠)/(g/L)	C(酵母浸粉)/(g/L)	D(吐温 80)/(ml/L)
1	20	20	5	5
2	20	50	10	10
3	20	80	15	15
4	50	20	10	15
5	50	50	15	5
6	50	80	5	10
7	80	20	15	10
8	80	50	5	15
9	80	80	10	5

1.4.5 冷冻干燥菌粉贮藏稳定性及胃肠道耐受性测定

1.4.5.1 冻干菌粉贮藏稳定性分析

将冷冻干燥后的高活菌制剂，分别置于 4、25、37 ℃ 恒温箱避光贮藏，为期 8 周（约 2 个月），每隔两周取样，平板倾注法测定活菌数，以存活率为指标，分析贮藏稳定性。

$$Y = \frac{B}{C} \times 100\%$$

式中：
Y——贮藏存活率，%；
B——真空冷冻干燥前活菌数，CFU；
C——贮藏过程中的活菌数，CFU。

1.4.5.2 冻干菌粉胃肠液耐受性评价

贮藏结束，用 PBS 将不同处理组的菌粉等体积复水。取 1 mL 的菌悬液转接至 9 mL 的 pH 值 3.0 人工胃液中，37 ℃ 3 h；将作用 3 h 的人工胃液 1 mL 转接至 9 mL 的 pH 值 8.0 人工肠液，37 ℃ 4 h。分别对处理 0、3、7 h 平板倾注法测定活菌数，以存活率为指标，分析冻干菌粉的肠胃液耐受性。

$$\alpha = \frac{N_1}{N_0} \times 100\%$$

式中：
α——胃液中存活率，%；
N₀——处理 0 h 的活菌数，CFU；
N₁——处理 3 h 的活菌数，CFU。

$$\beta = \frac{N_2}{N_0} \times 100\%$$

(4)

式中:

β ——肠液中存活率, %;

N_0 ——处理 0 h 的活菌数, CFU;

N_2 ——处理 7 h 的活菌数, CFU。

1.4.6 数据处理

采用 SPSS 25.0 进行差异性分析, 采用 GraphPad Prism 8.3.0 进行图形绘制。

2 结果与分析

2.1 培养基组分对植物乳杆菌高密度培养的影响

2.1.1 碳源对植物乳杆菌高密度培养的影响

碳源是微生物所需的主要营养物质之一, 对微生物碳骨架的合成及生长代谢有着重要作用^[12]。图 1 反映了植物乳杆菌对不同碳源及碳源不同浓度的利用情况: 如图 1a 所示, 当选择质量浓度为 20 g/L 海藻糖时 OD 值达到最大值 2.21, 其次是低聚半乳糖为 2.20, 棉籽糖为 2.15、低聚果糖为 2.13、低聚异麦芽糖为 2.07, 与 MRS 的 2.02 相比均显著提高了发酵液的菌体密度 ($P<0.05$)。进一步对筛选出的五种糖分别进行最适浓度探究。

由图 1b 可知, 植物乳杆菌的菌体密度在棉籽糖质量浓度 25 g/L 时为 2.20、低聚果糖质量浓度 25 g/L 时为 2.33、低聚半乳糖质量浓度 25 g/L 时为 2.23、海藻糖质量浓度 30 g/L 时为 2.24, 葡萄糖质量浓度 25 g/L 时为 2.34。进一步结合活菌数 (表 4), 发现: 低聚果糖质量浓度 25 g/L 时为 5.20×10^9 CFU/mL, 显著高于其他四种糖, 确定最适碳源为质量浓度 25 g/L 的低聚果糖 ($P<0.05$)。衡利冰等^[13]研究发现在以麦芽糖为碳源时, 植物乳杆菌 AR307 生长最快, 培养至 12 h 时 OD 值达 1.6。周宁萍等^[14]同样发现麦芽糖对植物乳杆菌 NCU001929 的促生长作用最明显, 当质量浓度为 30 g/L 时, 活菌数达到 3.27×10^9 CFU/mL。Sharma 等^[15]证实植物乳杆菌对低聚果糖具有选择偏好性。以上表明: 不同植物乳杆菌对碳源具有选择偏好性, 并且低聚果糖对 BF_15 促增殖能力高于麦芽糖对 NCU001929 的促增殖效果。研究证实功能性低聚糖可提高益生菌的肠道定殖能力, 因而益生元利用能力已成为益生菌筛选的一项重要指标^[16]。目前有关母乳/婴儿源乳酸菌利用低聚糖能力的研究较少, 因此系统探讨不同低聚糖对母乳/婴儿源乳酸菌生长特性的影响, 构建合理的益生菌-低聚糖组合具有广阔的应用前景。

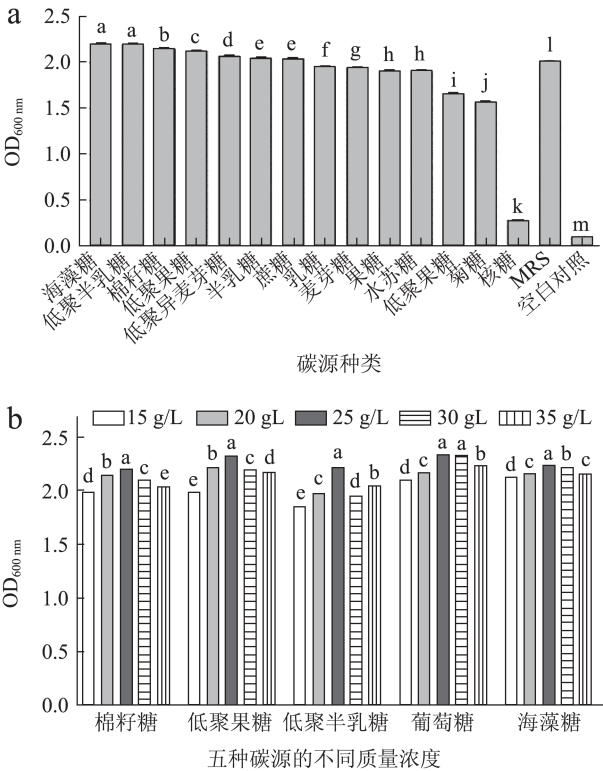


图 1 不同碳源对植物乳杆菌密度的影响

Fig.1 Effects of different carbon sources on the density of *Lactobacillus plantarum*

注: 不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。下同。

表 4 碳源对植物乳杆菌活菌数的影响
Table 4 Effect of different carbon sources on the viable counts of *Lactobacillus plantarum*

碳源种类	活菌数/($\times 10^9$ CFU/mL)
低聚果糖	5.20 ± 0.02^a
海藻糖	4.80 ± 0.10^a
低聚半乳糖	4.00 ± 0.22^b
棉籽糖	3.70 ± 0.26^b
葡萄糖	3.60 ± 0.35^b
MRS	2.30 ± 0.07^c

注: 不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。下表 5~7、9、11、12 同。

2.1.2 氮源对植物乳杆菌高密度培养的影响

氮源能为细菌提供丰富的氨基酸、矿物质、维生素等, 对菌体的生长具有促进作用^[14]。图 2 的数据反映了植物乳杆菌对不同氮源的利用情况, 当选择质量浓度为 25 g/L 的酵母膏时 OD 值达到最大值 2.74, 其次是大豆蛋白胨为 2.69, 均显著高于 MRS 培养基的 OD 值 2.58; 其他氮源 OD 值均显著低于 MRS 培养基 ($P<0.05$)。

进一步对筛选的大豆蛋白胨和酵母膏进行复配,

结果如表 5。当固定氮源总质量浓度为 25 g/L，随着大豆蛋白胨比例的升高，其菌体密度升高，当大豆蛋白胨：酵母膏质量复配比为 3:1 时对菌体生长的促进效果最佳，菌体密度可达 2.87，但因与单一酵母膏差异不大。

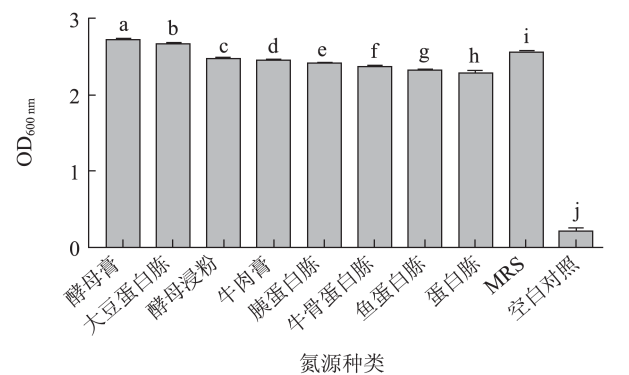


图 2 不同氮源对植物乳杆菌密度的影响
Fig.2 Effect of different nitrogen sources on the density of *Lactobacillus plantarum*

表 5 大豆蛋白胨与酵母膏的不同质量复配对植物乳杆菌密度的影响
Table 5 Effect of different mass ratio of soybean peptone and yeast extract on the density of *Lactobacillus plantarum*

序号	氮源类别 /(25 g/L)	ΔOD _{600 nm}
1	大豆蛋白胨:酵母膏=1:3	2.13 ± 0.03 ^c
2	大豆蛋白胨:酵母膏=1:2	2.36 ± 0.02 ^d
3	大豆蛋白胨:酵母膏=1:1	2.43 ± 0.01 ^d
4	大豆蛋白胨:酵母膏=2:1	2.62 ± 0.03 ^c
5	大豆蛋白胨:酵母膏=3:1	2.87 ± 0.07 ^a
6	大豆蛋白胨	2.69 ± 0.04 ^{bc}
7	酵母膏	2.74 ± 0.03 ^{bc}

分别对两者进行最佳浓度探究，结果如图 3。当大豆蛋白胨：酵母膏质量复配比为 3:1 时，在质量浓度 25 g/L 时达到最高值 2.87。相比于单一酵母膏在质量浓度 25 g/L 的最大值为 2.65，复合氮源更能满足乳酸菌的生长与代谢对营养的需求。此外，当大豆蛋白胨：酵母膏质量复配比为 3:1 的质量浓度为 20 或 25 g/L 时，菌体密度最高且差异不大，因此对不同浓度进行活菌计数验证（表 6），发现质量浓度为 20 g/L 时，活菌数达到最大值 5.43×10^9 CFU/mL，因此选定质量浓度为 20 g/L 的复合氮源（大豆蛋白胨：酵母膏质量复配比为 3:1）为最适氮源。周宁萍等^[13]发现添加量为 15 g/L 酵母提取粉、10 g/L 细菌学蛋白胨和 15 g/L 牛肉浸粉，

植物乳杆菌 NCU001929 活菌数为 4.63×10^9 CFU/mL。郑亚平等^[17]研究表明：质量浓度 10 g/L 牛肉膏与酵母粉质量复配比为 1:1 相结合为氮源使植物乳杆菌 J26 活菌数最高，达 2.67×10^9 CFU/mL。相比较之下，在优化氮源条件下，BF_15 活菌数达 5.43×10^9 CFU/mL，显著高于二者。以上表明：不同植物乳杆菌对于氮源利用情况也不同，优化植物乳杆菌 BF_15 氮源是必要的，为进一步优化高密度发酵工艺提供前期基础。

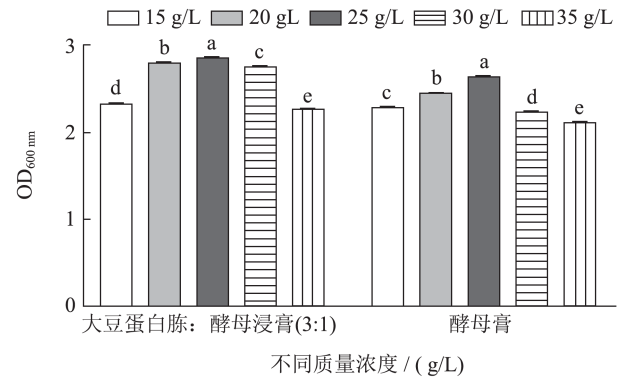


图 3 大豆蛋白胨：酵母膏（质量复配比 3:1）下不同质量浓度对植物乳杆菌密度的影响
Fig.3 Effect of different mass concentrations of soybean peptone: yeast extract (mass ratio 3:1) on the density of *Lactobacillus plantarum*

表 6 大豆蛋白胨:酵母膏（质量复配比3:1）下不同质量浓度对植物乳杆菌活菌数的影响
Table 6 Effect of different mass concentrations of soybean peptone: yeast extract (mass ratio 3:1) on the viable counts of *Lactobacillus plantarum*

氮源质量浓度/(g/L)	活菌数/($\times 10^9$ CFU/mL)
15	2.43 ± 0.06 ^d
20	5.43 ± 0.06 ^a
25	4.60 ± 0.26 ^b
30	4.37 ± 0.06 ^b
35	3.63 ± 0.35 ^c
MRS	2.33 ± 0.06 ^d

2.1.3 微量元素对植物乳杆菌高密度培养的影响
微量元素既能够作为酶的辅因子促进酶的催化，也能够为菌体提供有效的生物活性物质^[18]。如图 4a 所示，MgSO₄·7H₂O 在质量浓度为 200 mg/L 时，植物乳杆菌活菌数最大为 2.30×10^9 CFU/mL，且与 MRS 培养基中的添加量相等，表明 MgSO₄·7H₂O 对 BF_15 的

促进效果不明显。如图 4b 所示, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 在质量浓度 75 mg/L 时, BF_15 活菌数达到最大值为 3.90×10^9 CFU/mL, 显著高于其他浓度菌体密度 ($P < 0.05$)。周宁萍等^[13]在对微量元素研究中发现: $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 质量浓度为 0.06 mg/L 时, 植物乳杆菌 NCU001929 活菌数最高为 4.85×10^9 CFU/mL。在本研究中, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 没有起到显著的促菌增殖作用。结合相关研究, Mg^{2+} 是很多酶的激活剂, 对产生某种特定的代谢产物起一定的作用; Mn^{2+} 通过调节一些关键酶进一步调控丙酮酸到乳酸的代谢途径, 从而对细胞的生长、产酸、代谢方面发挥着重要作用^[18]。因此, 选择质量浓度 200 mg/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 75 mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 为植物乳杆菌生长的最适浓度。

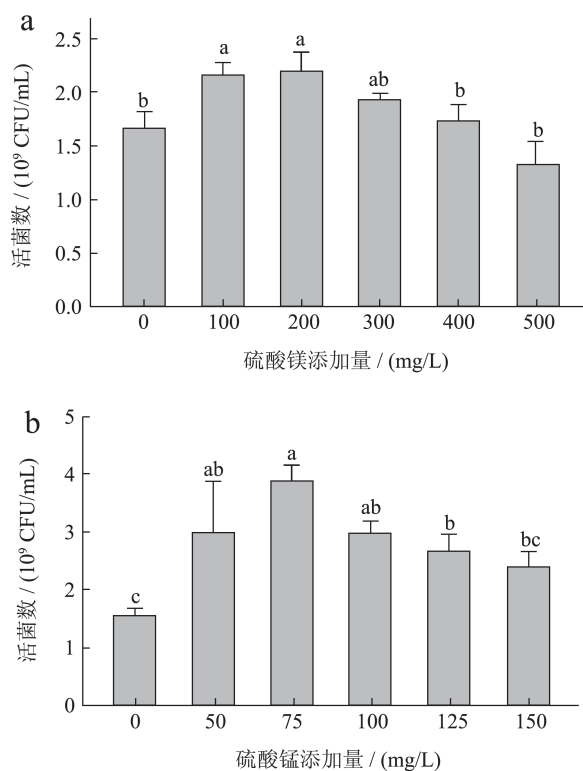


图 4 微量元素对植物乳杆菌活菌数的影响

Fig.4 Effect of micronutrients on the viable counts of *Lactobacillus plantarum*

2.1.4 缓冲盐对植物乳杆菌高密度培养的影响

培养基中加入缓冲盐调节 pH 值, 维持渗透压, 从而使乳杆菌更好地生长^[19]。如图 5a 所示, 无水乙酸钠对植物乳杆菌的生长状况影响最大, 使得活菌数达到 3.47×10^9 CFU/mL, 显著高于其他 ($P < 0.05$)。进

一步对无水乙酸钠的浓度进行筛选 (图 5b), 确定在质量浓度 6 g/L 时达到最高为 3.57×10^9 CFU/mL。李娜^[5]在对植物乳杆菌 ZJ316 最适缓冲盐选择时发现: Na_2HPO_4 浓度为 0.1 mol/L 时, 活菌数高达 4.1×10^9 CFU/mL。相比较下, 无水乙酸钠对 BF_15 的促增殖作用略低于 Na_2HPO_4 对植物乳杆菌 ZJ316 的促增殖效果。以上表明: 缓冲盐在一定程度上促进植物乳杆菌增殖, 但不同植物乳杆菌对缓冲盐利用情况也不同。

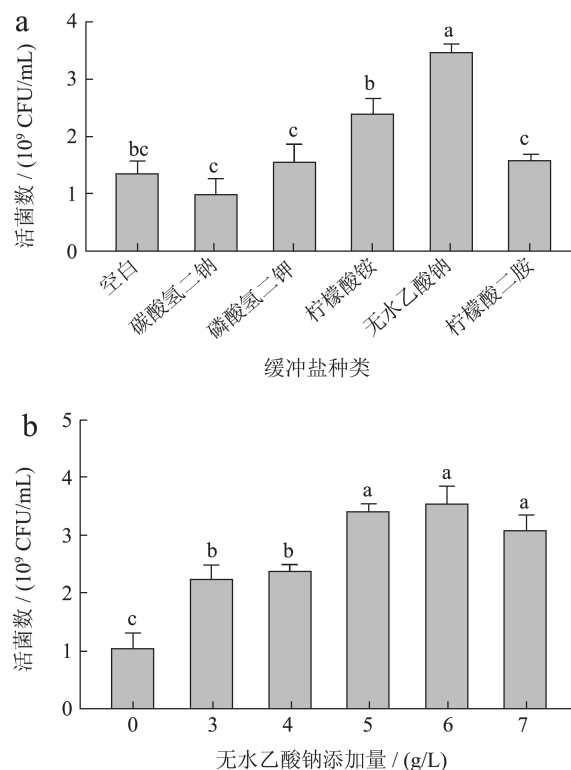


图 5 缓冲盐对植物乳杆菌活菌数的影响

Fig.5 Effect of buffer salts on the viable counts of *Lactobacillus plantarum*

2.1.5 培养基组分正交试验优化

正交试验进行培养基配方优化, 表 7 分析结果, 由极差 R 可知, 对植物乳杆菌生长状况的影响因素主次为 B (大豆蛋白胨: 酵母膏质量比 3:1) > A (低聚果糖) > C (无水乙酸钠) > D (硫酸锰); 由表 8 方差分析可知, 低聚果糖、复配氮源、无水乙酸钠和硫酸锰对植物乳杆菌 BF_15 生长促进的影响极显著 ($P < 0.01$)。BF_15 优化培养基成分为 A3B3C2D2, 即低聚果糖 30 g/L、氮源 (大豆蛋白胨: 酵母膏质量比 3:1) 30 g/L、无水乙酸钠 6 g/L、硫酸锰 75 mg/L。在此优化条件下, 植物乳杆菌活菌数为 6.93×10^9 CFU/mL。

表 7 培养基组分正交试验结果					
Table 7 Orthogonal experiments results of medium components					
编号	A(低聚果糖)	B(复配氮源)	C(无水乙酸钠)	D(硫酸锰)	活菌数/($\times 10^9$ CFU/mL)
1	1	1	1	1	4.20 ± 0.00^b
2	1	2	3	2	5.60 ± 0.17^a
3	1	3	2	3	6.20 ± 0.20^a
4	2	1	3	3	5.60 ± 0.30^a
5	2	2	2	1	6.10 ± 0.26^a
6	2	3	1	2	6.50 ± 0.10^a
7	3	1	2	2	6.53 ± 0.35^a
8	3	2	1	3	5.77 ± 0.15^a
9	3	3	3	1	6.40 ± 0.26^a
K1	16.00	16.00	16.50	16.70	
K2	18.20	17.50	18.50	18.30	
K3	18.40	19.10	17.60	17.60	
k1	5.33	5.33	5.50	5.57	
k2	6.07	5.83	6.17	6.10	
k3	6.13	6.37	5.87	5.87	
R	0.80	1.03	0.67	0.53	
主次因素	B>A>C>D				
最优组合	A ₃ B ₃ C ₂ D ₂				

表 8 正交试验结果方差分析					
Table 8 Variance analysis for orthogonal experiment tests					
因素	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	3.490	2	1.745	37.094	**
B	4.810	2	2.405	51.126	**
C	2.076	2	1.038	22.071	**
D	1.283	2	0.641	13.638	**
误差	0.847	18	0.047		

注：“*”表示显著水平 ($P<0.05$)；“**”表示极显著水平 ($P<0.01$)。表 10 同。

2.2 培养条件对植物乳杆菌高密度培养的影响

2.2.1 培养条件单因素对植物乳杆菌高密度培养的影响

培养条件单因素试验结果如图 6 所示：接种量体积分数为 4% 时，活菌数为 7.80×10^9 CFU/mL（图 6a）；初始 pH 值为 7.0 时，活菌数为 8.03×10^9 CFU/mL（图 6b）；培养温度 35℃ 下活菌数为 7.53×10^9 CFU/mL（图 6c）；转速为 80 r/min 时，活菌数为 7.37×10^9 CFU/mL（图 6d）。

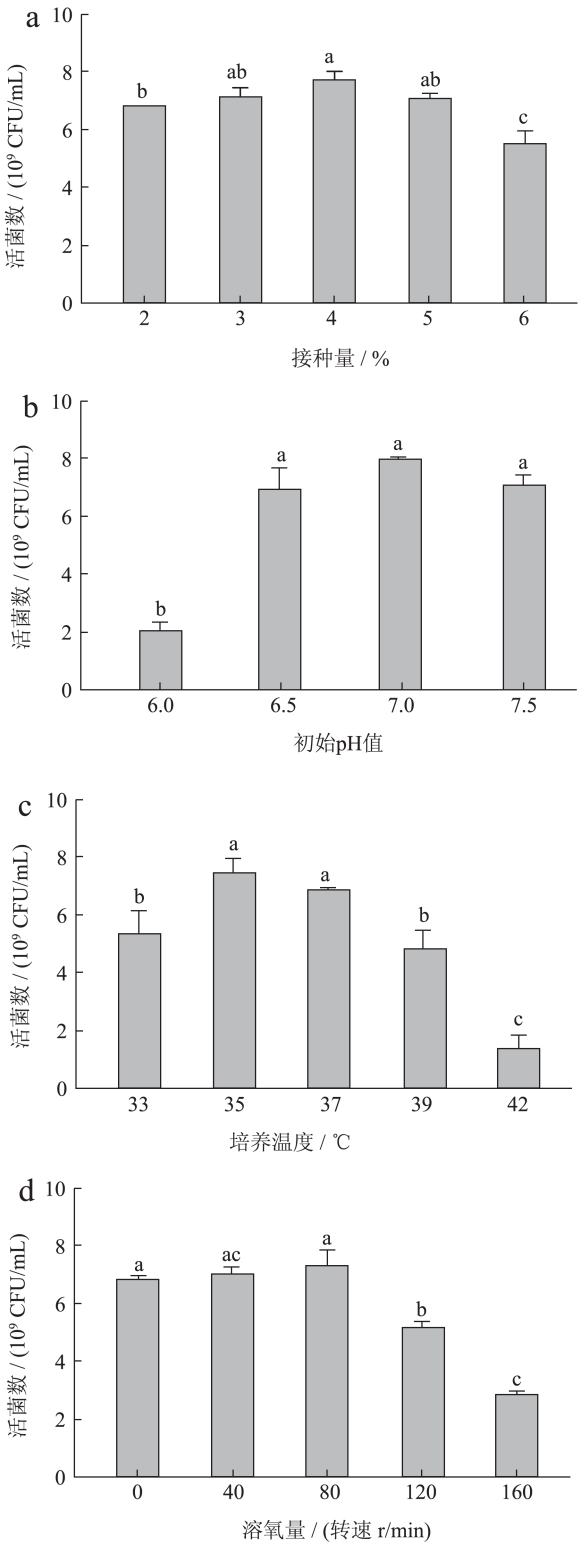


图 6 培养条件对植物乳杆菌活菌数的影响

Fig.6 Effect of cultivation conditions on high-density culture of *Lactobacillus plantarum*

2.2.2 正交试验最适培养条件对植物乳杆菌高密度培养的影响

正交试验进行培养条件优化，表 9 所示，由极差 R 可知对 BF_15 生长状况影响因素主次为 B（培养温

度) $>C$ (初始 pH 值) $>D$ (溶氧量) $>A$ (接种量); 由表 10 方差分析可知, 接种量、培养温度、初始 pH 值和溶氧量对植物乳杆菌 BF_15 生长促进的影响极显著 ($P<0.01$)。BF_15 优化培养条件为 $A_3B_1C_2D_1$, 即接种量体积分数为 5%、培养温度为 33 $^{\circ}C$ 、初始 pH 值为 7.0、溶氧量为 0 r/min, 活菌数为 8.92×10^9 CFU/mL。

表 9 培养条件正交试验结果

Table 9 Orthogonal experiments results of culture conditions					
编号	A(接种量)	B(培养温度)	C(初始 pH 值)	D(溶氧量)	活菌数/ ($\times10^9$ CFU/mL)
1	1	1	1	1	8.00 ± 0.35^a
2	1	2	3	2	4.90 ± 0.10^d
3	1	3	2	3	6.70 ± 0.20^c
4	2	1	3	3	6.80 ± 0.08^{bc}
5	2	2	2	1	7.40 ± 0.25^b
6	2	3	15	2	5.00 ± 0.26^d
7	3	1	2	2	8.50 ± 0.17^{ab}
8	3	2	1	3	6.80 ± 0.13^{bc}
9	3	3	3	1	6.40 ± 0.24^c
K1	19.6	23.3	19.8	21.8	
K2	19.2	19.1	22.6	18.4	
K3	21.7	18.1	18.1	20.3	
k1	6.53	7.77	6.60	7.27	
k2	6.40	6.37	7.53	6.13	
k3	7.23	6.03	6.03	6.77	
R	0.83	1.73	1.50	1.13	
主次因素	B>C>D>A				
最优组合	$A_3B_1C_2D_1$				

表 10 正交试验结果方差分析

Table 10 Variance analysis for orthogonal experiment tests					
因素	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	2.067	1	2.067	43.894	**
B	8.542	1	8.542	181.378	**
C	10.109	2	5.054	107.321	**
D	1.125	1	1.125	23.887	**
误差	0.848	18	0.047		

研究表明: 通过对培养基组分中所含碳源、氮源、缓冲盐等以及培养条件进行优化, 可获得较高细胞密度, 大多在 $10^9\sim10^{10}$ CFU/mL^[20,21]。李娜^[5]通过系统优化植物乳杆菌 ZJ316 的培养基成分和培养条件, 得到优化培养基组分: 蔗糖 43.405 g/L、玉米浆干粉 59.464 g/L、 Na_2HPO_4 /柠檬酸 0.124 mol/L、 $MgSO_4\cdot7H_2O$ 0.2 g/L、 $MnSO_4\cdot H_2O$ 0.1 g/L、吐温 80 1 mL/L; 最优培养条件:

培养基初始 pH 值 6.5、培养温度 30 $^{\circ}C$ 、接种量体积分数为 4%、转速为 50 r/min, 活菌数达 8.01×10^9 CFU/mL。孙雨佳等^[22]针对植物乳杆菌 NCU137, 得到最佳培养基成分: 麦芽糖 26.73 g/L, 酵母浸粉 21.8 g/L, 大豆蛋白胨 16.59 g/L, $MgSO_4\cdot7H_2O$ 0.15 g/L, $MnSO_4\cdot H_2O$ 0.06 g/L, 腺嘌呤 0.13 g/L, 苯丙氨酸 0.051 g/L, 柠檬酸三铵 2.0 g/L, 磷酸氢二钾 2.0 g/L, 无水乙酸钠 3.0 g/L, 吐温 80 1 mL/L; 最优培养条件: 初始 pH 值 7.0, 接种量质量分数 3%, 培养温度 30 $^{\circ}C$, 活菌数达到 9.2×10^9 CFU/mL。本研究通过优化培养基和培养条件, 使 BF_15 活菌数达 8.92×10^9 CFU/mL, 高于植物乳杆菌 ZJ316 活菌数, 略低于植物乳杆菌 NCU137 活菌数, 是优化前的 3.88 倍, 实现了 BF_15 的高密度培养。不同植物乳杆菌菌种之间在营养物质的利用和培养条件上存在显著差异, 这些差异可能源于植物乳杆菌的代谢特性、基因组差异或其他未知因素^[23]。在进行培养基成分和条件优化时, 就需要通过探究各自的生理和代谢特征, 确保优化后得到的培养基可满足不同植物乳杆菌菌株特定的生长需求, 提高生长速率和产量。这对于植物乳杆菌的大规模工业生产研究有着重要意义。

2.3 冻干保护剂对植物乳杆菌冷冻干燥的保护

每一菌种进行冷冻干燥时都应对合适的保护剂进行筛选, 以显著提高在冷冻干燥后的活性^[24]。研究表明: 脱脂奶通过在细胞表面形成粘性层保护并稳定细胞膜, 提高冷冻干燥过程中细胞活力; 牛血清蛋白可以从乳酸菌细胞外部进行全方位保护, 防止冷冻过程的冰晶损害^[25-27]。冻干保护剂单因素试验结果见表 11, 在 100 g/L 脱脂乳和 10 mL/L 牛血清基础保护成分上, 加入的 50 g/L 蔗糖、10 mL/L 吐温 80、10 g/L 酵母浸粉、20 g/L 谷氨酸钠成分后均对 BF_15 保护效果较好。进一步选择蔗糖、吐温 80、酵母浸粉、谷氨酸钠在 100 g/L 脱脂乳和 10 mL/L 牛血清基础保护成分上按照一定比例复配, 结果见表 12, 在 100 g/L 脱脂乳和 10 mL/L 牛血清的基础上添加蔗糖、吐温 80、酵母浸粉、谷氨酸钠的最优添加量为: 脱脂乳 100 g/L、牛血清 10 mL/L、蔗糖 80 g/L、谷氨酸钠 20 g/L、酵母浸粉 15 g/L、吐温 80 10 mL/L, 使植物乳杆菌 BF_15 的存活率为 90.57%, 冻干后发酵剂活菌数达到 2.45×10^{10} CFU/mL。相比只添加 50 g/L 蔗糖的存活率 80.43%, 高出 10.14%。李娜^[5]进一步优化冻干保护剂配方 (质量分数): 海藻糖 12%、麦芽糊精 10%、蔗糖 12%、脱脂奶粉 3%, 植物乳杆菌 ZJ316 冻干菌剂存活率为 88.5%。以质量分数 10% 山梨糖醇和 10% 脱脂牛奶为最佳保护剂, 使植物乳杆

菌 JH287 冻干存活率为 86.37%^[28]。通过冻干保护剂组分优化,对 BF_15 的冻干保护达到 90.57%,高于植物乳杆菌 ZJ316 和 JH287 在最优冻干保护剂下的存活率,实现了对 BF_15 在冷冻干燥过程中的高保护。研究表明:在脱脂乳粉和牛血清基础保护剂成分基础上,添加的谷氨酸钠在进入细胞后,会通过自身携带的氨基与细菌蛋白质的羧基发生缩合反应,提高蛋白质空间结构的稳定性,从而提高了菌体适应外界极端环境的能力^[29];半渗透类保护剂:海藻糖、山梨糖醇^[30]、蔗糖^[31]等含有的游离羟基能够与蛋白质极性基团和细胞膜上磷脂结合形成氢键,为细胞提供机械保护。

表 11 冻干保护成分的筛选
Table 11 Screening of protectants

保护剂种类 及添加量	冻干前活菌数/ ($\times 10^{10}$ CFU/mL)	冻干后活菌数/ ($\times 10^{10}$ CFU/mL)	存活率/%
乳糖 50 g/L	2.71	1.97	72.70 $\pm$ 1.48 ^b
蔗糖 50 g/L	2.71	2.18	80.43 $\pm$ 1.11 ^a
葡萄糖 50 g/L	2.71	2.00	73.96 $\pm$ 0.74 ^b
木糖醇 50 g/L	2.71	1.77	65.28 $\pm$ 1.85 ^c
酵母浸粉 10 g/L	2.71	2.16	79.84 $\pm$ 1.11 ^a
谷氨酸钠 20 g/L	2.71	2.12	78.4 $\pm$ 2.22 ^{ab}
甘油 10 mL/L	2.71	1.58	58.46 $\pm$ 2.95 ^d
吐温 80 10 mL/L	2.71	2.17	80.16 $\pm$ 2.21 ^a
抗坏血酸 1 g/L	2.71	1.90	70.27 $\pm$ 0.71 ^{bc}
维生素 E 1 mL/L	2.71	1.71	62.95 $\pm$ 2.95 ^{cd}

表 12 最优冻干保护剂配方

Table 12 The optimal lyoprotectant formula

试验 号	A (蔗 糖)	B (谷氨 酸钠)	C (酵母 浸粉)	D (吐温 80)	活菌数/ ($\times 10^{10}$ CFU/mL)
1	1	1	1	1	2.36 $\pm$ 0.07 ^a
2	1	2	2	2	2.35 $\pm$ 0.05 ^a
3	1	3	3	3	2.39 $\pm$ 0.03 ^a
4	2	1	2	3	2.34 $\pm$ 0.05 ^a
5	2	2	3	1	2.31 $\pm$ 0.06 ^a
6	2	3	1	2	2.34 $\pm$ 0.03 ^a
7	3	1	3	2	2.45 $\pm$ 0.04 ^a
8	3	2	1	3	2.40 $\pm$ 0.07 ^a
9	3	3	2	1	2.34 $\pm$ 0.03 ^a

2.4 冷冻干燥菌粉的贮藏稳定性及胃肠系统耐受性

保持较高的存活率是乳酸菌发挥益生功能的重要保障,在低温和干燥双重胁迫下,细胞壁损伤、细胞膜损伤及相关蛋白质发生变性等,会造成菌株的生理损伤,在后期贮藏以及胃肠系统降低细胞活

力和功能活性^[15]。由图 7 可得,菌粉贮藏前活菌数为 2.45×10^{10} CFU/mL,在 4 ℃ 下贮藏 56 d 后活菌数为 2.02×10^{10} CFU/mL,存活率最终达到 82.35%;在 25 ℃ 贮藏 56 d 贮藏后活菌数基本为 0;在 37 ℃ 贮藏 56 d 贮藏后活菌数基本为 0。综上,冻干菌剂在 4 ℃ 条件下贮藏稳定性强。李娜^[5]植物乳杆菌 ZJ316 的冻干菌粉进行了贮藏稳定性测定,4 ℃ 下保存 30 d,存活率为 92.39%,活菌数为 1.07×10^{10} CFU/mL。杨正楠^[32]通过正交设计确定植物乳杆菌 NCU116 在复配保护剂组分为(质量分数)谷氨酸钠 7.5%、海藻糖 10%、甘氨酸 2.5% 条件下,-20 ℃ 贮藏 60 d,活菌数保持在 5.8×10^{11} CFU/mL。虽然贮藏条件不同,冻干保护剂对菌株在贮藏过程中起到了不同程度的保护作用。以上表明:益生菌的稳定性随着储存温度的增加而按比例地下降,低温有助于菌粉的储存稳定性。

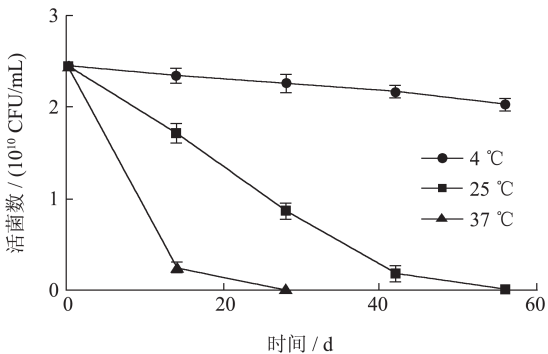


图 7 不同温度下贮藏植物乳杆菌的活菌数

Fig.7 The viable counts of *Lactobacillus plantarum* in storage at different temperatures

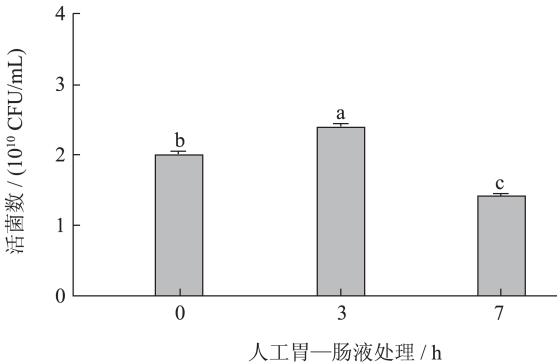


图 8 胃肠系统耐受性

Fig.8 Gastrointestinal system tolerance

乳酸菌的数量必须在肠道内的活菌数达到 1×10^8 CFU/mL,才能在肠道内发挥作用^[33]。最后,对 4 ℃ 贮藏后的菌株进行模拟胃肠道环境耐受性分析,如图 8 所示:对照组人工胃肠液处理前活菌数为 2.02×10^{10} CFU/mL,处理后活菌数为 1.41×10^{10} CFU/mL,存活率为 69.70%。当冻干保护剂的质量分数为脱脂乳 17.846%、海藻糖 2% 和甘油 1.645% 时,经过 4 h

的人工模拟胃肠液处理后,植物乳杆菌 ZDY2013 的存活率仍可达到 71.67%^[34]。相比较下,经过胃肠道处理后,BF_15 冻干菌粉的存活率略低于植物乳杆菌 ZDY2013,但活菌数远高于在肠道中发挥作用要求的活菌数 1×10^8 CFU/mL^[33]。这可能是由于保护剂可以影响质子膜的渗透性,有助于调节细胞内的 pH 值,可以直接关系到微生物的酸应激反应^[35]。在完成高密度培养基础上,本研究又更加全面系统地完成了对植物乳杆菌 BF_15 高活菌制剂的贮藏稳定性及胃肠道耐受能力的评价。

3 结论

通过单因素结合正交试验完成了植物乳杆菌 BF_15 的培养基组分和培养条件的优化。在最优培养基组分组合:低聚果糖 30g/L、氮源(大豆蛋白胨:酵母膏=3:1) 30 g/L、无水乙酸钠 6 g/L、硫酸锰 75 mg/L 和最优培养条件:接种量体积分数 5%、培养温度 33 °C、初始 pH 值 7.0、溶氧量 0 r/min 下,活菌数高达 8.92×10^9 CFU/mL,是优化前的 3.88 倍。进一步通过单因素结合一定复配比下得到最优冻干保护剂配方:脱脂乳 100 g/L、牛血清 10 ml/L、蔗糖 80 g/L、谷氨酸钠 20 g/L、酵母浸粉 15 g/L、吐温 80 10 ml/L,菌株存活率为 90.57%,活菌数达 2.45×10^{10} CFU/mL。冻干菌粉在 4 °C 贮藏 56 d,存活率 82.35%,活菌数达 2.02×10^{10} CFU/mL;经胃肠液后存活率 69.70%,活菌数达 1.41×10^{10} CFU/mL,实现了植物乳杆菌 BF_15 的高密度培养并获得高活菌制剂。

本研究全面系统地完成了对植物乳杆菌 BF_15 高密度培养和冻干保护研究,最终获得高活力、高耐受、稳定性强的微生态制剂,解决了益生菌要作为规模化商品首要解决的问题:高密度发酵工艺、菌剂的制备方法以及贮藏条件的研究,保证了我国益生菌的本土化健康发展,兼具理论和现实意义。

参考文献

- [1] 赵洁,陈永福.科教融合、产教协同赋能科研机构高质量发展的新探索——基于内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室20年发展的考察[J].内蒙古农业大学学报(社会科学版),2022,24(5):32-37.
- [2] 中国食品科学技术学会益生菌分会.2021年我国益生菌产业发展十大焦点[J].中国食品学报,2021,21(5):383-388.
- [3] 于小青.植物乳杆菌在冷冻干燥过程中生理损伤及保护策略的研究[D].上海:上海理工大学,2021.
- [4] 刘开文,马雯,金刚.真空冷冻干燥提高乳酸菌存活率及延长贮藏期的研究进展[J].食品科学,2024,45(2):325-333.
- [5] 李娜.植物乳杆菌ZJ316的高密度发酵及高活性菌制剂的初步研究[D].南宁:广西大学,2021.
- [6] 王馨钰.植物乳杆菌高密度发酵、冻干保护剂筛选及微胶囊化工艺研究[D].长春:吉林农业大学,2024.
- [7] 张娜,张波,赵丽娜,等.母乳婴儿源乳杆菌的筛选及其免疫调节能力研究[J].中国食品学报,2020,20(5):29-35.
- [8] ZHANG N, LI C, NIU Z H, et al. Colonization and immunoregulation of *Lactobacillus plantarum* BF_15, a novel probiotic strain from the feces of breast-fed infants [J]. Food & Function, 2020, 11(4): 3156-3166.
- [9] 张娜,赵丽娜,李晨,等.母乳婴儿源植物乳杆菌BF_15体外抗氧化活性及缓解DSS诱导小鼠结肠氧化损伤的研究[J].中国食品学报,2022,22(1):67-77.
- [10] WANG X Y, ZHANG N, LI D Y, et al. Mechanism of gastrointestinal adaptability and antioxidant function of infant-derived *Lactobacillus plantarum* BF_15 through genomics [J]. Food Science and Biotechnology, 2022, 31(11): 1451-1462.
- [11] 食品安全国家标准.食品微生物学检验.乳酸菌检验: GB4789.35-2016[S].中华人民共和国国家标准,2016.
- [12] YIN H M, ZHONG Y D, XIA S K, et al. Effects of fermentation with *Lactobacillus plantarum* NCU137 on nutritional, sensory and stability properties of Coix (*Coix lachryma -jobi* L.) seed [J]. Food Chemistry, 2019, 314: 126037.
- [13] 衡利冰,夏永军,艾连中,等.植物乳杆菌AR307发酵培养基优化研究[J].工业微生物,2024,54(1):81-86.
- [14] 周宁萍,蒋雪,裴琪,等.红酸汤源植物乳杆菌NCU001929的高密度培养条件研究[J].食品与发酵工业,2024,50(21):36-44.
- [15] SHARMA V, MISHRA H N. Unstructured kinetic modeling of growth and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* NCDC414 during fermentation of vegetable juices [J]. LWT-Food Science and Technology, 2014, 59(2): 1123-1128.
- [16] CHANDAN R, JOSHI A K, SUBHASH R, et al. Human milk oligosaccharides: the journey ahead [J]. International Journal of Pediatrics, 2019, 1: 2390240.
- [17] 郑亚平,王均豪,王晨晨,等.植物乳植杆菌J26高密度发酵工艺优化及其发酵豆乳的应用[J].现代食品科技,2024,40(10):154-164.
- [18] CHENG X, DONG Y, SU P, et al. Improvement of the fermentative activity of lactic acid bacteria starter culture by the addition of Mn^{2+} [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 174(5): 1752-1760.
- [19] CUI S M, ZHAO J X, ZHANG H, et al. High-density culture of *Lactobacillus plantarum* coupled with a lactic acid removal system with anion-exchange resins [J] Biochemical Engineering Journal, 2016, 115: 80-84.
- [20] KATARZYNA Ś, AGNIESZKA C. Growth kinetics of probiotic *Lactobacillus* strains in the alternative, cost-efficient semi-solid fermentation medium [J]. Biology, 2020, 9(12): E423.
- [21] PAPIZADEH M, ROHANI M, NAHREVANIAN H, et al. Using various approaches of design of experiments for high cell density production of the functionally probiotic *Lactobacillus plantarum* strain RPR42 in a cane molasses-based medium [J]. Current Microbiology, 2020, 77(8): 1756-1766.
- [22] 孙雨佳,黄辉,刘长根,等.植物乳杆菌NCU137培养基成分与培养条件的优化[J].中国食品学报,2022,22(8):223-233.

- [23] 谢佳琪.嗜酸乳杆菌LA-06培养基优化及高密度发酵工艺研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2023.
- [24] NGUYEN T, NGUYEN P, NGUYEN T, et al. Efficacy of the incorporation between self-encapsulation and cryoprotectants on improving the freeze-dried survival of probiotic bacteria [J]. Journal of Applied Microbiology, 2022, 132(4): 3217-3225.
- [25] MARCIAL-COBA M S, CIEPLAK T, CAHÚ T B, et al. Viability of microencapsulated *Akkermansia muciniphila* and *Lactobacillus plantarum* during freeze-drying, storage and *in vitro* simulated upper gastrointestinal tract passage [J]. Food & Function, 2018, 9(11): 5868-5879.
- [26] SUN H, ZHANG M, LIU Y, et al. Improved viability of *Lactobacillus plantarum* embedded in whey protein concentrate/pullulan/ trehalose hydrogel during freeze drying [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 260(2): 117843.
- [27] AHMED M. H, EBRAHIM E, MOSTAFA S M, et al. Amino acids, solubility, bulk density and water holding capacity of novel freeze-dried cow's skimmed milk fermented with potential probiotic *Lactobacillus plantarum* Bu-Eg5 and *Lactobacillus rhamnosus* Bu-Eg6—ScienceDirect [J]. Arabian Journal of Chemistry, 2021, 14(8): 103291.
- [28] LEE S B, KIM D H, PARK H D. Effects of protectant and rehydration conditions on the survival rate and malolactic fermentation efficiency of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* JH287 [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2016, 100(18): 7853-7863.
- [29] 潘海博,覃璐琪,黄燕婷,等.人工神经网络结合遗传算法优化保护剂提高罗伊氏乳杆菌抗冻性能[J].食品科学,2021,42(14):70-77.
- [30] AIDA Y, LEONARDO A E, ÀNGELS C M. Study of the probiotic potential and evaluation of the survival rate of *Lactiplantibacillus plantarum* lyophilized as a function of cryoprotectant [J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): PP19078.
- [31] NELSON R, MONICA M, MARIA M, et al. Fructose derived oligosaccharides prevent lipid membrane destabilization and DNA conformational alterations during vacuum-drying of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus [J]. Food Research International, 2021, 143: PP110235.
- [32] 杨正楠.植物乳杆菌NCU116富硒培养及菌剂制备技术研究[D]. 南昌:南昌大学,2017.
- [33] PRESTES A A, VERRUCK S, VARGAS M O, et al. Influence of guabiroba pulp (*campomanesia xanthocarpa* o.berg) added to fermented milk on probiotic survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions [J]. Food Research International, 2021, 141: 110135.
- [34] 陈淑芳.植物乳杆菌ZDY2013对高盐饮食诱导肾脏损伤的缓解作用研究及其微生态制剂的制备[D].南昌:南昌大学,2022.
- [35] CHOTIKO A, SATHIVEL S. Effects of enzymatically-extracted purple rice bran fiber as a protectant of *L.plantarum* NRRL B-4496 during freezing, freeze drying, and storage [J]. LWT-Food Science and Technology, 2014, 59: 59-64.