

副干酪乳杆菌Lp.R3的高密度培养工艺优化

方诗会, 熊尧, 张召, 林俊芳, 陈涛, 郭丽琼

Optimization of High-density Culture Process of *Lacticaseibacillus paracasei* Lp.R3

FANG Shihui, XIONG Yao, ZHANG Zhao, LIN Junfang, CHEN Tao, and GUO Liqiong

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024060197>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

副干酪乳杆菌ALAC产抗真菌肽发酵工艺的优化

Optimization of Fermentation Process for Antifungal Peptide Production by *Lacticaseibacillus paracasei* ALAC

食品工业科技. 2023, 44(24): 168–174 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022110322>

风味酵母A10-2的高密度培养及其生长动力学

High Density Culture Process and Growth Kinetics of Flavor Yeast A10-2

食品工业科技. 2022, 43(24): 153–159 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022030030>

乳酸菌高密度培养技术的研究进展

Research Progress of Lactic Acid Bacteria High-density Culture Technology

食品工业科技. 2022, 43(19): 436–445 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021090289>

粗壮脉纹孢菌高密度培养基的优化及补料策略

Optimization of High-density Medium of *Neurospora crassa* and Feeding Strategy for Its High Yield

食品工业科技. 2020, 41(23): 63–70,77 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020020160>

微囊化酿酒酵母FM-S-115的高密度培养

High Cell Density Culture of *Saccharomyces cerevisiae* FM-S-115 in Microencapsulation

食品工业科技. 2020, 41(15): 205–210,204 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.15.032>

人参提取物胁迫培养对副干酪乳杆菌JLUs66菌株生长特性及耐受性的影响

Effect of Ginseng Extract Stress Culture with *Lactobacillus paracasei* JLUs66 on Strain Growth Characteristics and Tolerances

食品工业科技. 2022, 43(11): 144–150 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021090253>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

方诗会, 熊尧, 张召, 等. 副干酪乳杆菌 Lp.R3 的高密度培养工艺优化 [J]. 食品工业科技, 2025, 46(9): 196–205. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024060197

FANG Shihui, XIONG Yao, ZHANG Zhao, et al. Optimization of High-density Culture Process of *Lacticaseibacillus paracasei* Lp.R3[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(9): 196–205. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024060197

· 工艺技术 ·

副干酪乳杆菌 Lp.R3 的高密度培养工艺优化

方诗会^{1,2}, 熊尧², 张召², 林俊芳¹, 陈涛^{2,*}, 郭丽琼^{1,*}

(1. 华南农业大学食品学院生物工程系, 广东广州 510640;
2. 广东南芯医疗科技有限公司, 广东广州 510535)

摘要: 副干酪乳杆菌 Lp.R3 (*Lacticaseibacillus paracasei* Lp.R3) 是一株具有优良功能的益生菌, 为实现其产业化应用对其进行高密度培养以提高活菌数。本研究通过单因素实验和正交试验优化, 考察了培养基成分、静态培养条件以及发酵罐工艺对 Lp.R3 活菌数的影响。确定了优化后的最佳培养基配方为葡萄糖 30 g/L、酵母浸粉 50 g/L、无水乙酸钠 10 g/L、硫酸锰 0.1 g/L、吐温 80 1 g/L; 最佳培养条件为温度 35 °C、初始 pH7、接种量为 1%, 此时活菌数为 4.75×10^9 CFU/mL, 是 MRS 培养基的 2.91 倍; 在 5 L 发酵罐中的最佳发酵工艺为: 不通气搅拌、发酵过程恒定 pH 为 5、25% 的氨水作中和剂、补料液为 75 g/L 的葡萄糖、采用连续变速补料, 活菌数提高到了 2.56×10^{10} CFU/mL, 是基础的 MRS 培养下的 15.51 倍。该研究建立了 Lp.R3 的高密度生产方法, 为 Lp.R3 的工业化生产提供了技术支持。

关键词: 副干酪乳杆菌, 高密度培养, 恒 pH 培养, 工艺优化, 活菌数

中图分类号: TS201.3

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2025)09-0196-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024060197

本文网刊:



Optimization of High-density Culture Process of *Lacticaseibacillus paracasei* Lp.R3

FANG Shihui^{1,2}, XIONG Yao², ZHANG Zhao², LIN Junfang¹, CHEN Tao^{2,*}, GUO Liqiong^{1,*}

(1. Department of Bioengineering, College of Food Science, South China Agricultural University,
Guangzhou 510640, China;
2. Guangdong Longsee Biomedical Corporation, Guangzhou 510535, China)

Abstract: *Lacticaseibacillus paracasei* Lp.R3 is a probiotic strain with excellent functions. In order to realize its industrial application, high-density cultivation was carried out to increase the number of viable bacteria, the effects of medium composition, static culture conditions, and fermentation tank processes on the number of viable Lp.R3 bacteria were investigated by single factor experiments and orthogonal experiments optimization. The best result (4.75×10^9 CFU/mL of viable bacteria number) was achieved when Lp.R3 cultured in the medium supplemented with 30 g/L glucose, 50 g/L yeast extract, 10 g/L anhydrous sodium acetate, 0.1 g/L manganese sulfate, and 1 g/L Tween80 under the culture conditions of 1% inoculation level, pH7 and 35 °C, which was 2.91 times greater than that cultured in MRS medium. In terms of the production in 5 L fermentation tanks, the best result (2.56×10^{10} CFU/mL of viable bacteria number) was given when Lp.R3 fermented under constant pH of 5 neutralized by 25% ammonia, continuous variable feed of 75 g/L glucose, and agitation without aeration, which was 15.51 times greater than that cultured in MRS medium. In summary, the high-density production protocol of Lp.R3 was optimized in present study, providing a promising guide to accomplish large-scale

收稿日期: 2024-06-14

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目 (2022B0202050002); 国家自然科学基金项目 (32072646, 32272785); 2021 年度佛山市科技创新团队 (青年拔尖人才) (2120001010795)。

作者简介: 方诗会 (2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品营养与健康, E-mail: 909479409@qq.com。

* 通信作者: 陈涛 (1979-), 男, 博士, 副主任技师, 研究方向: 微生物筛选与食品药品应用, E-mail: eric@longseemed.com。

郭丽琼 (1963-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品组学与健康, E-mail: guolq@scau.edu.cn。

production of Lp.R3.

Key words: *Lacticaseibacillus paracasei*; high-density culture; constant pH cultivation; process optimization; viable count

副干酪乳杆菌是公认的具有一定益生特性的同型发酵乳酸菌, 广泛分布于人体肠道^[1]以及口腔中^[2], 常被用做于食品发酵剂^[3]以及生物制药或益生菌菌粉补充剂^[4], 同时也有研究用副干酪乳杆菌来合成高值有机酸, 如 L-乳酸^[5]等。不同的副干酪乳杆菌菌株表现出活性和功能性的差异, 导致其生产及应用的不同。副干酪乳杆菌 Lp.R3(*Lacticaseibacillus paracasei* Lp.R3)经前期研究证明具有改善肠道炎症反应^[6]、提高免疫力、抗肿瘤^[7]等作用, 有潜力成为新的活体生物药物。目前 Lp.R3 作为抗肿瘤的一类创新药已经获得了 NMPA 药物临床试验批准^[8], 为了进一步提高临床试验的药物生产率以及商业价值, 高密度培养 Lp.R3 的工艺开发至关重要。

高密度培养技术主要指通过对培养基成分、静态培养条件和发酵罐工艺进行优化, 使乳酸菌细胞群体密度超过常规培养 10 倍以上的培养技术。在培养基成分方面, 主要是在基础 MRS 培养基上优化, 如李盼盼等^[9]优化的培养基配方为酵母提取物 16 g/L、蛋白胨 13 g/L、葡萄糖 30 g/L、牛肉膏 5 g/L、CH₃COONa 4 g/L、吐温 80 1.5 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.25 g/L、柠檬酸二胺 2.0 g/L、K₂HPO₄ 2.0 g/L、MnSO₄ 0.2 g/L。在此优化培养基下, 鼠李糖乳杆菌 LP216 的活菌数是 MRS 活菌数的 2.71 倍。此外还有研究采用了复杂的半成品谷物豆类^[10]或工业加工废物^[11]作为碳和氮的来源, 减少了生产成本。关于静态培养条件, 对乳酸菌活菌数影响最大的因素主要是温度、初始 pH 以及接种量。王英等^[12]通过正交试验考察了培养温度、接种量、初始 pH 三个主要因素对副干酪乳杆菌 FM-LP-4 菌株生长发育的影响, 发现其主要影响因素是培养温度, 其次是初始 pH。关于发酵罐工艺优化, 常见的有补料分批培养法^[13]、化学中和法以及离子交换法等。吴迪^[14]结合化学中和法、离子交换法和补料分批法, 将产香型干酪乳杆菌 TCS 活菌数提高到了 10.01 lg CFU/mL, 是优化前的 9.3 倍。说明通过优化培养基组成、静态培养条件和发酵罐工艺相结合的方式可以显著提高乳酸菌的活菌数。

本实验主要通过单因素实验和正交试验确定了 Lp.R3 最佳的培养基配方和最佳静态培养条件, 再以优化后的培养基和静态培养条件为基础, 运用全自动 5 L 玻璃发酵罐进行工艺优化, 获得高密度发酵 Lp.R3 的最佳工艺, 以期提高 Lp.R3 在生产时的活菌数, 降低生产成本。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

副干酪乳杆菌 Lp.R3(*Lacticaseibacillus paracasei* Lp.R3) 从健康婴儿粪便中分离得到, 保藏编

号为 CGMCCNo.22008; 葡萄糖、蔗糖、吐温 80、氨水、氢氧化钠、氢氧化钾、麦芽糖、可溶性淀粉 阿拉丁生化科技股份有限公司; 无水乙酸钠、柠檬酸氢二铵、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾 上海麦克林生化科技股份有限公司; 蛋白胨、大豆蛋白胨、酪蛋白胨、胰蛋白胨 北京 Solarbio 科技有限公司; 酵母浸粉、牛肉浸粉、低聚果糖 生工生物工程(上海)股份有限公司; 硫酸镁、硫酸锰、硫酸锌 西陇科学股份有限公司; 番茄汁 市售。

GL-21M 离心机 湘仪离心机仪器有限公司; MB-820 培养箱 浙江美壁仪器有限公司; SW-CJ-2D 超净工作台 科凯特(广州)净化设备科技有限公司; UV-1100 紫外可见分光光度计 上海美谱达仪器有限公司; Bioscreen C 全自动生长曲线测定仪 Oy Growthcurves Ab Ltd; BLBIO-5GJ-6 玻璃发酵罐 百伦生物科技有限公司; FD100A 灭菌锅 致微(厦门)仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种活化以及生长曲线测定 将于-80 ℃ 甘油保存的菌液划线接种到固体 MRS 培养基上, 置于 37 ℃ 恒温培养箱中倒置培养 48 h 后挑取单菌落到 MRS 液体培养基中 37 ℃ 静置培养 24 h, 活化两次即得发酵种子液。将种子液以 2% (v/v) 的接种量接种到液体 MRS 培养基中, 37 ℃ 下静置培养 48 h, 每隔 2 h 用分光光度计测定菌体在 600 nm 处的光密度。

1.2.2 培养基配制以及活菌数的测定 MRS 液体培养基: 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 10 g, 牛肉浸粉 8 g, 乙酸钠 5 g, 酵母浸粉 4 g, 磷酸氢二钾 2 g, 柠檬酸氢二钾 2 g, 硫酸镁 0.2 g, 硫酸锰 0.04 g, 吐温 80 1 mL, 加蒸馏水至 1000 mL, 于 118 ℃ 下灭菌 15 min。

MRS 固体培养基: 向 MRS 液体培养基中加入 1.5%~2.0% (w/v) 琼脂粉。

活菌计数采用 GB4789.35-2023《食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验》方法进行。

1.2.3 单因素实验

1.2.3.1 碳源、氮源、无机盐和微量元素种类筛选 参考魏敏^[15]的方法并修改, 以 MRS 培养基为基础, 将其中的碳源分别替换成浓度为 20 g/L 的(葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、可溶性淀粉、低聚果糖), 将其中的氮源(酵母浸粉、蛋白胨、牛肉浸粉)分别替换成浓度为 20 g/L 的(酵母浸粉、蛋白胨、牛肉浸粉、大豆蛋白胨、酪蛋白胨、胰蛋白胨), 将其中的缓冲盐(无水乙酸钠、柠檬酸氢二铵、磷酸氢二钾)分别替换成浓度为 10 g/L 的(无水乙酸钠、柠檬酸氢二铵、磷酸氢二钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾), 将其中的微量元素(硫酸锰、硫酸镁)分别替换成浓度为 0.2 g/L 的(硫酸

酸锰、硫酸镁、硫酸锌、硫酸锰:硫酸镁(1:1)),保持其他成分不变,接种量为1%,初始pH为6,在37℃下静置培养20 h后根据1.2.2的方法计算活菌数。

1.2.3.2 碳源、氮源、无机盐和微量元素添加量单因素优化 参考马精阳^[16]的方法并修改,根据1.2.3.1的实验结果,固定培养基成分为葡萄糖20 g/L、酵母浸粉20 g/L、无水乙酸钠10 g/L、硫酸锰0.2 g/L。将葡萄糖按照(10、20、30、40、50 g/L)的浓度,酵母浸粉按照(10、20、30、40、50 g/L)的浓度,无水乙酸钠按照(5、7.5、10、12.5、15、17.5、20、22.5 g/L)的浓度,硫酸锰按照(0.05、0.1、0.2、0.3、0.4 g/L)的浓度进行优化。接种量为1%,初始pH为6,在37℃下静置培养20 h后根据1.2.2的方法计算活菌数。

1.2.4 正交试验 根据上述四个主要成分的添加量单因素优化结果,选取碳源、氮源、缓冲盐和微量元素四个因素的最适添加量范围进行四因素三水平的正交试验,其他条件不变,以活菌数为指标进行正交试验,试验因素表如表1所示。

表1 正交试验的因素与水平
Table 1 Factors and levels of orthogonal tests

水平	葡萄糖 (g/L)	酵母浸粉 (g/L)	无水乙酸钠 (g/L)	硫酸锰 (g/L)
1	10	30	10	0.05
2	20	40	12.5	0.1
3	30	50	15	0.2

1.2.5 静态培养条件研究 在优化后的培养基基础上,固定初始培养条件为温度37℃、接种量1%、初始pH6。保持其他条件不变,逐步探究在不同接种量(1%、2%、3%、4%、5%)、不同初始pH(5.5、6、6.5、7、7.5)、不同温度(30、32、35、37、39℃)下静置培养20 h后的活菌数,将每步的结果应用于下一步。

1.2.6 发酵罐工艺优化

1.2.6.1 通气和搅拌 在上一步优化的培养基和培养条件的基础上,运用5 L的发酵罐(装液量为2 L)分别探究不通入无菌空气搅拌、通入无菌空气搅拌、静置三种培养方式对Lp.R3活菌数的影响,向发酵罐通入无菌空气时罐压恒定为0.04 MPa,搅拌转速为100 r/min,其他条件保持一致,恒定pH为5.5,中和剂均为5 mol/L NaOH,发酵开始时一次性补入为70 g/L的葡萄糖,发酵20、24和36 h时后进行取样测定活菌数,将此步最优的结果应用于下一步试验中,后续的每一步同理。

1.2.6.2 恒pH培养 恒pH培养也叫化学中和法,通过BLBIO-5GJ-6发酵罐的自动在线检测反馈流加中和剂维持pH恒定。对菌株分别采用恒定pH(5、5.5、6、6.5、7)培养,其他条件保持一致,中和剂均为5 mol/L NaOH,发酵开始时一次性补入为70 g/L的葡萄糖,并在发酵20、24和36 h时进行取样测定活菌数。

1.2.6.3 中和剂种类选择 中和剂的种类在恒pH培养时是关键性因素,在恒pH培养下,分别探究了25%氨水、5 mol/L NaOH、5 mol/L KOH为中和剂时Lp.R3活菌数的变化,保持其他条件不变,发酵开始时一次性补入为70 g/L的葡萄糖,并在发酵20、24和36 h时进行取样测定活菌数来选择合适的中和剂种类。

1.2.6.4 补料液种类和添加量优化 参考陈百莹等^[17]的方法并进行修改,测定Lp.R3在发酵罐上恒pH培养,不补料时的生长曲线,每隔4 h取样后分别测定活菌数、OD₆₀₀值以及残糖浓度,并绘制成生长曲线图。在对数生长末期时向发酵液中以每小时3.4 g/L的恒定速率补加以下四种浓度相同的补料液G1:葡萄糖、G2:葡萄糖+番茄汁、G3:葡萄糖+酵母浸粉(4:1)、G4:优化后的全培养基,并在发酵20、24和36 h时进行取样测定活菌数。再根据试验结果对最优的补料液种类进行添加量的优化,补料液的添加量分别设置为75、60、45 g/L。

1.2.6.5 补料方式优化 补料方式优化参考靳志强等^[18]的方法并进行修改。采用不通气搅拌的方式恒pH培养Lp.R3,补料液为75 g/L的葡萄糖。分别比较连续恒速流加补料(B1)、分批恒速流加补料(B2)、连续变速流加补料(B3)、分批一次性补料(B4)四种不同的补料方式对发酵20、24和36 h时Lp.R3活菌数的影响。分批补料培养是指将发酵过程分两个阶段进行,第一个阶段是分批培养,即不进行补料操作正常培养至对数生长末期,第二个阶段是进行补料操作;连续培养则只有一个阶段。

连续恒速流加补料 B1: 发酵开始就以每小时3.4 g/L的恒定速率将补料液加到发酵罐中。

分批恒速流加补料 B2: 分批培养结束后以每小时3.4 g/L的恒定速率将补料液加到发酵罐中。

连续变速流加补料 B3: 发酵开始就逐渐增加补料速率将补料液加到发酵罐中,类似指数流加,但由于流速的自动连续变化难于操作,采用逐步增加流速的方法进行补料,达到分批培养的对数期之前采用每小时1.5 g/L的较低补料速率,在分批培养对数生长末期后开始增加补料速率至每小时4.5 g/L。

连续一次性补料 B4: 发酵开始就将补料液一次性加到发酵罐中。

1.3 数据处理

数据使用Graphpad Prism 9绘图,SPSS 27进行单因素方差分析(Duncan Test, $P < 0.05$),为保证实验的准确性,每实验进行三次重复,每次重复三个平行,结果用“平均值±标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 生长曲线

Lp.R3在MRS培养基中37℃培养48 h,根据全自动生长曲线次测定仪的测定结果绘制生长曲线

图如图 1, R3 在 0~2 h 处于迟滞期, 2~20 h 处于对数生长期, 20 h 后进入到稳定期, 48 h 内未见衰退期, 稳定期较长, 适合工业化生产。

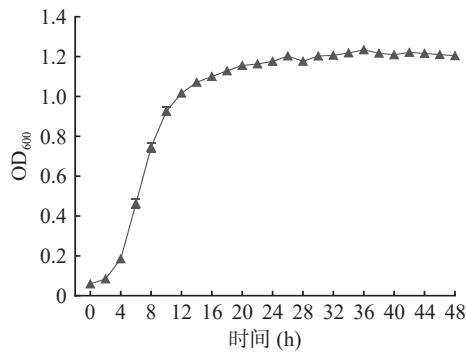


图 1 Lp.R3 生长曲线
Fig.1 Lp.R3 growth curve

2.2 单因素实验

对乳酸菌培养有较强普适性的 MRS 培养基, 因为成分复杂营养丰富可培养大部分的乳酸菌, 但是其成本也较高, 且在针对特定菌株进行富集培养时有效成分并不明确。而对基础培养基中的主要营养物质进行筛选一直都是提高乳酸菌活菌数的有效手段^[19]。

2.2.1 碳源、氮源、无机盐和微量元素种类筛选 碳源是微生物生长和繁殖的重要能量来源, 不同碳源对不同菌株的促生长作用不同, 由图 2A 可知葡萄糖和海藻糖可以显著提升 Lp.R3 的活菌数($P<0.05$), 而蔗糖、麦芽糖、低聚果糖等多糖对 Lp.R3 无明显促进作用, 从工业化角度考虑选择成本更低的葡萄糖为唯一碳源。而姚国强等^[20]发现 *L.reuteri* IMAU10240 对麦芽糖的利用效果最好, 证明不同乳酸菌对碳源的利用偏好不一样。

氮源分为有机氮源和无机氮源。副干酪乳杆菌由于自身酶系简单, 缺少多种氨基酸合成途径, 只能从外界摄取, 而酵母浸粉、牛肉膏、蛋白胨这类有机氮源富含氨基酸、多肽类, 能满足菌种生长所需营养的多方面需求^[21]。由图 2B 可知相同浓度的酵母浸粉和 MRS 培养基中的复合氮源(酵母浸粉、蛋白胨和牛肉浸粉)对 Lp.R3 活菌数的影响显著, 从简化生产配方以及成本考虑选用非动物氮源酵母浸粉为唯一氮源。

由图 2C 可知无水乙酸钠对 Lp.R3 活菌数具有显著的促进作用, 与基础的 MRS 相比并无显著性差异, 可以判断在 MRS 培养基中的缓冲盐主要是无水乙酸钠起主要作用, MRS 里面的其他成分如磷酸氢二钾和柠檬酸氢二铵对 Lp.R3 活菌数并无显著促进作用。Parecha 等^[22]也发现基础的 MRS 培养基中存在的大多数盐通常不会影响菌体的生物量。其他两种常见的缓冲盐, 磷酸二氢钾和磷酸氢二钠也对活菌数无显著促进作用。因此可以选用无水乙酸钠为唯一的缓冲盐。

由图 2D 可知与未添加任何微量元素的组别相

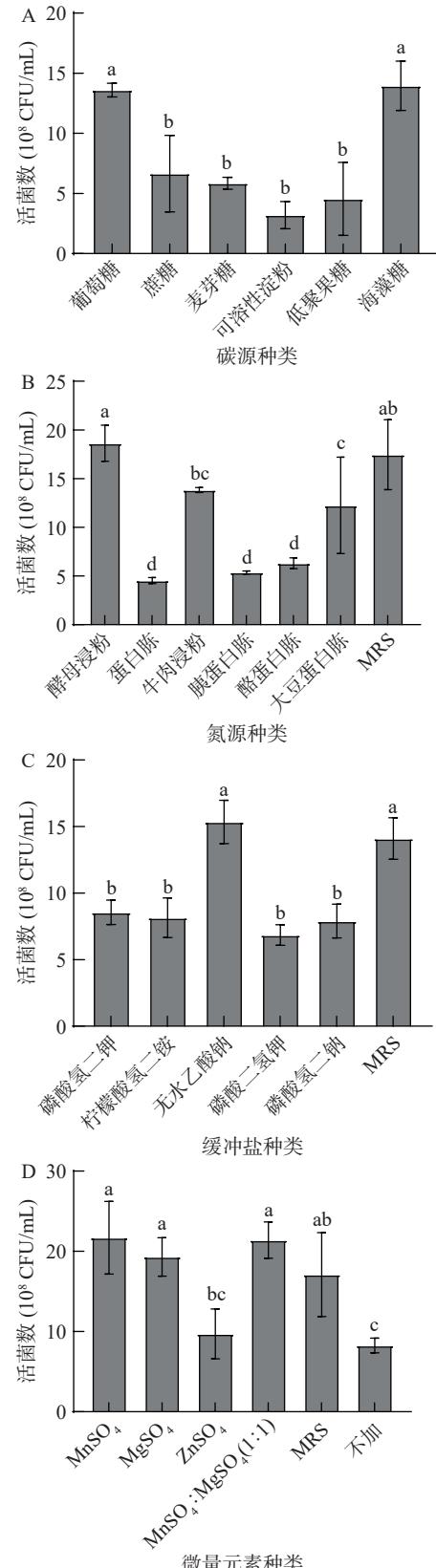


图 2 碳源(A)、氮源(B)、无机盐(C)和微量元素(D)种类对 Lp.R3 活菌数的影响

Fig.2 Effect of carbon source (A), nitrogen source (B), inorganic salt (C), and trace element (D) species on viable Lp.R3 bacteria number

注: 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$), 图 3~图 7、图 9~图 11 同。

比, 向培养基中加入 $MnSO_4$ 或 $MgSO_4$ 时都对 Lp.R3

的活菌数有显著性促进作用($P<0.05$),而 ZnSO_4 与不加微量元素的对照组相比无显著性差异。 MnSO_4 与 MgSO_4 之间无显著性差异,与二者1:1和1:5(MRS)的复配组合也没有显著性差异。锰被证明是一种必需的生长因子,它是乳酸脱氢酶的组成成分,是糖酵解途径关键代谢酶的激活剂^[23]。Poddar等^[24]也有发现 $L. paracasei$ 在MRS培养基(含锰)和MRS培养基(不添加锰)中培养18 h后,细胞浓度分别达到 9.26 ± 0.21 和 8.70 ± 0.19 lg CFU/mL。说明锰离子对副干酪乳杆菌的生长有显著的促进作用,故选择硫酸锰为唯一的微量元素。

2.2.2 葡萄糖、酵母浸粉、无水乙酸钠和硫酸锰添加量单因素优化 培养基中各组分的添加量对于乳酸菌的生长繁殖至关重要,当添加量过低时,营养物质消耗快,限制了乳酸菌的生长繁殖。但当添加量增加时,培养基中的渗透压也会随之升高,影响细胞内水分活度、细胞膜通透性、蛋白质分子结构与细胞生理功能,从而影响最终的活菌数^[25]。基于上述对培养基成分种类的筛选分别探究添加不同浓度的葡萄糖、酵母浸粉、无水乙酸钠和硫酸锰对Lp.R3活菌数的影响。

由图3A可知,虽然随着葡萄糖浓度增加Lp.R3活菌数出现先升高后降低的趋势,但在10~50 g/L范围内没有显著性差异,从成本角度考虑选择最佳的添加量范围为10~30 g/L。由图3B可知,随时酵母浸粉浓度的增加,Lp.R3活菌数先上升后下降,在40 g/L时最高。由图3C可知,Lp.R3的活菌数随着无水乙酸钠浓度的增加先上升后下降,浓度增加到10~20 g/L对活菌数的影响无显著性差异,当浓度大于20 g/L时,活菌数明显降低,田佳雪^[26]也发现虽然在培养基中添加缓冲盐可以在一定程度上降低酸对菌体的抑制作用,但过高的浓度可能使得pH调节机制失衡,导致活菌数降低。由图3D可知,随着 MnSO_4 浓度的增加,活菌数出现先上升后下降的趋势,当 MnSO_4 添加量为0.1 g/L时,Lp.R3活菌数最高。综上葡萄糖、酵母浸粉、无水乙酸钠和硫酸锰的最适添加量范围分别为10~30、30~50、10~15、0.05~0.2 g/L。

2.3 正交试验

根据上述单因素实验结果,选取培养基中的主要成分葡萄糖、酵母浸粉、无水乙酸钠和硫酸锰进行四因素三水平的正交试验,其他条件不变,得到活菌数最高的组合。试验结果与分析如表2。

根据正交试验结果显示,最优的组合为 $A_3B_3C_1D_2$,即葡萄糖30 g/L、酵母浸粉50 g/L、无水乙酸钠10 g/L、 MnSO_4 0.1 g/L。在此组合下活菌数达到了 4.57×10^9 CFU/mL。由此确定最终的优化培养基成分和配比为:葡萄糖30 g/L、酵母浸粉50 g/L、无水乙酸钠10 g/L、 MnSO_4 0.1 g/L、吐温80 1 g/L。

2.4 Lp.R3静态培养条件优化

在静态培养时,初始pH、温度和接种量都对菌

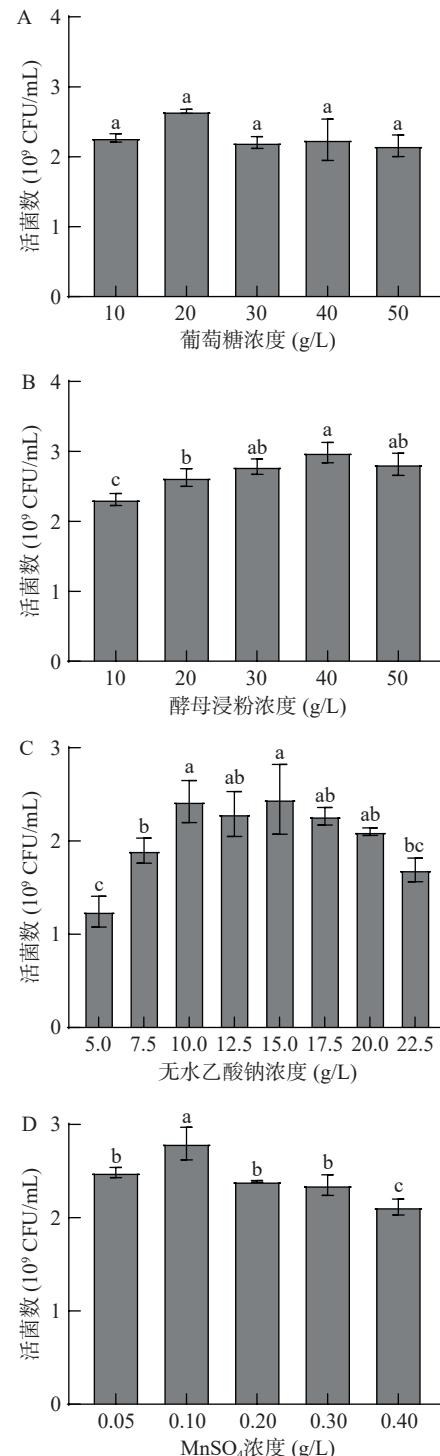


图3 葡萄糖(A)、酵母浸粉(B)、无水乙酸钠(C)和硫酸锰(D)不同添加浓度对Lp.R3活菌数的影响

Fig.3 Effect of different added concentrations of glucose (A), yeast immersion powder (B), anhydrous sodium acetate (C) and manganese sulfate (D) on the number of Lp.R3 viable bacteria

株的生长和生理活性具有重要作用。接种量过高时,菌体大量生长,营养物质消耗较快,同时产生乳酸会抑制菌株的生长^[27]。合适的初始pH对于乳酸菌生长十分关键,当pH过低,需要消耗更多的能量来维持渗透压的平衡,菌株的酶活性受到抑制,pH过高时,会导致细胞膜的破裂,从而影响乳酸菌的生长和代谢^[28]。培养温度主要通过影响乳酸菌关键酶的活

表 2 正交试验结果与分析

Table 2 Results and analysis of the orthogonal experiments

试验号	A (葡萄糖)	B (酵母浸粉)	C (无水乙酸钠)	D (硫酸锰)	活菌数 ($\times 10^9$ CFU/mL)
1	3	2	3	1	4.00
2	3	3	1	2	4.57
3	2	1	3	2	3.26
4	2	3	2	1	4.11
5	2	2	1	3	3.77
6	1	3	3	3	2.63
7	1	1	1	1	2.06
8	3	1	2	3	3.12
9	1	2	2	2	2.36
K_1	7.052	8.442	10.400	10.175	
K_2	11.143	10.127	9.591	10.194	
K_3	11.689	11.315	9.893	9.514	
k_1	2.351	2.814	3.467	3.392	
k_2	3.714	3.376	3.197	3.398	
k_3	3.896	3.772	3.298	3.171	
R	1.546	0.958	0.270	0.227	
较优水平	A_3	B_3	C_1	D_2	
因素主次	A>B>C>D				

性发挥作用, 在较高的生长温度下, 可观察到能量代谢途径受到抑制, 而在较低的温度下其代谢缓慢, 生长也会受到抑制^[29]。以正交试验结果得到的优化培养基为基础, 分别探究不同接种量、初始 pH 和温度对 Lp.R3 活菌数的影响。根据图 4A 可得, 当接种量为 1% 时活菌数最高, 随着接种量的增加活菌数呈现减少的趋势, 1% 与 5% 相比可以显著提高活菌数 ($P<0.05$)。图 4B 可知, 当初始 pH 为 7 时活菌数最高, 但在 6~7.5 范围内无显著性差异。图 4C 可以看出当温度为 35 ℃ 时对 Lp.R3 的生长具有显著促进作用, 当温度大于和小于 35 ℃ 时活菌数都出现了明显的降低, 证明温度对 Lp.R3 的生长影响很大。综上 Lp.R3 最佳的培养条件是接种量为 1%、初始 pH 为 7, 温度为 35 ℃, 在此条件下 Lp.R3 活菌数最高为 4.75×10^9 CFU/mL, 是 MRS 培养的 2.91 倍。

2.5 发酵罐工艺优化

2.5.1 通气与搅拌对 Lp.R3 活菌数的影响 乳酸菌为厌氧或兼性厌氧微生物, 厌氧环境利于大部分乳酸菌的生长, 但是部分菌株具有一定的氧耐受能力, 所以改变气体环境可能会影响乳酸菌的生长; 而搅拌也可以使菌体与培养液中的营养物质与气体充分接触, 影响菌体的生长。由于 Lp.R3 是兼性厌氧的微生物, 在有氧和无氧条件下都能生长, 因此对是否通入无菌空气和搅拌这两个条件进行考察。由图 5 可得在 5 L 的生物反应器中发酵 20 h 时, 在都搅拌的情况下, 通气与不通气相比 Lp.R3 活菌数显著降低 ($P<0.05$), 说明向发酵罐中以恒定的压力 (0.04 MPa) 通入无菌空气会显著降低 Lp.R3 的活菌数, 在 36 h 不通气搅拌与静置组相比 Lp.R3 活菌数具有显著提升 ($P<0.05$), 说明搅拌可以提高 Lp.R3 的活菌数, 故后续试验都采用不通气搅拌的方式。

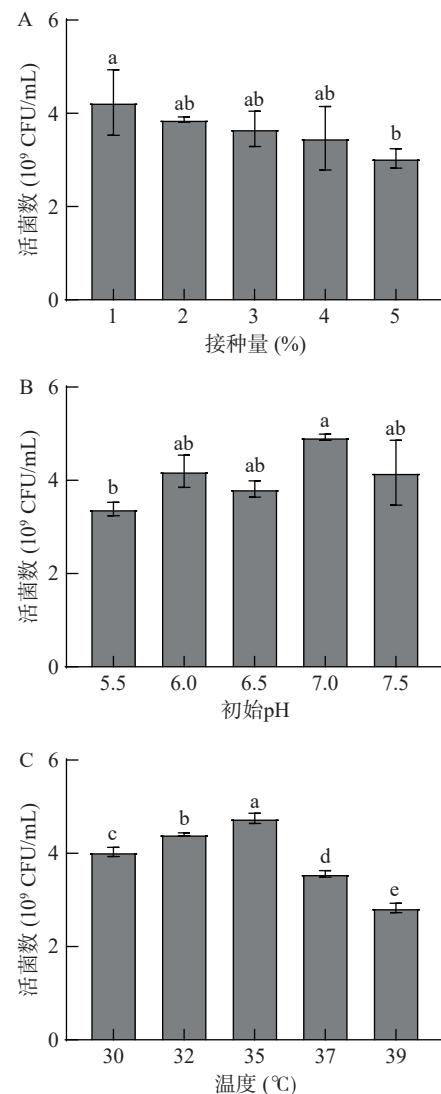


图 4 接种量(A)、初始 pH(B) 和温度(C)对 Lp.R3 活菌数的影响

Fig.4 Effect of inoculum (A), initial pH (B) and temperature (C) on viable Lp.R3 bacteria count

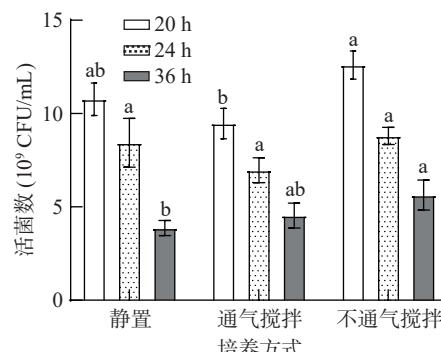


图 5 培养方式对 Lp.R3 活菌数的影响

Fig.5 Effect of the culture mode on the number of Lp.R3 viable bacteria

2.5.2 恒 pH 培养对 Lp.R3 活菌数的影响 随着发酵的进行乳酸菌产生的有机酸和 H^+ 会对菌体生长产生抑制作用^[30]。恒 pH 培养(化学中和法)就是通过流加碱液中和剂维持发酵液恒定的 pH, 来缓解酸抑制, 但是当 pH 过高也会对菌体的生长产生不利影

响。Wang 等^[31]发现 pH 控制在 4.2~5.7 之间时, *L. rhamnosus* LS-8 的最大细胞密度显著增加且当 pH 维持在 4.7 时, 细胞密度最高。但周宁萍等^[32]发现维持发酵罐 pH 为 7 时, 植物乳杆菌 *L. plantarum* NCU001929 的活菌数最高, 此现象说明不同细菌的最佳生长 pH 不同, 这是由细菌的属或种决定的。图 6 显示副干酪乳杆菌 Lp.R3 在生物反应器中发酵 20 h 后, 随着时间的增加, 当 pH>5 时, 活菌数逐渐减少, 且 pH 越高, 现象越明显。通过镜检发现当 pH 越高菌体逐渐衰退裂解(可观察到菌体变长变细)现象越明显, 说明该菌不适用较高的 pH 培养, 如果 pH 维持在过高的值, 细胞会迅速进入衰退期, 这将缩短活菌收集的可用操作时间范围, 无法满足发酵工业的要求。但当 pH<5 时, Lp.R3 的生长受到抑制, 如 CK(不控制 pH 发酵 20 h 后 pH 为 4.0~4.5)虽然在发酵 24 h 和 36 h 时的活菌数稳定, 但最高活菌数仅为 9.8×10^9 CFU/mL。而当 pH 恒定为 5 发酵 24 h 时, Lp.R3 活菌数达到最大值 1.46×10^{10} CFU/mL, 故培养 Lp.R3 的最佳恒定 pH 为 5, 在后续试验中 pH 都控制在 5。

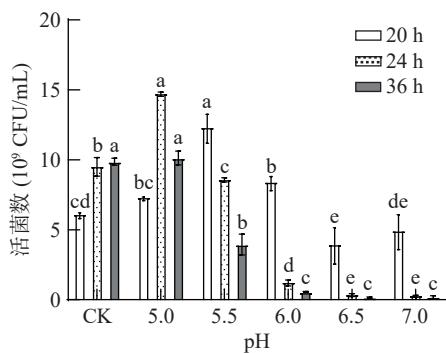


图 6 pH 对 Lp.R3 活菌数的影响
Fig.6 Effect of pH on viable Lp.R3 bacteria count

2.5.3 中和剂种类对 Lp.R3 活菌数的影响 NaOH、KOH 和 NH₃·H₂O 都是工业发酵中常用的中和剂, 此外还有 NaHCO₃、Na₂CO₃、Ca(OH)₂ 等。赖长龙等^[33]发现氨水作为中和剂能显著提高植物乳杆菌的菌体密度, 而彭奎耀^[34]的结果显示 NaHCO₃ 对嗜热链球菌 937 的增殖效果较好。针对不同的微生物或不同培养基质, 不同的中和剂所能达到的效果也不尽相同^[35]。本试验主要比较 KOH、NaOH 和 NH₃·H₂O 这三种中和剂对副干酪乳杆菌 Lp.R3 活菌数的影响。由图 7 可知, 在发酵 20 h 和 24 h 时三种中和剂对 Lp.R3 活菌数的影响无显著性差异, 但到了 36 h 时氨水对 Lp.R3 生长的促进作用显著高于其他两种中和剂($P<0.05$)。采用氨水作为中和剂不仅可以调节 pH, 还可以在发酵后期补充氮源, NH₃·H₂O 与发酵液中的有机酸形成的有机酸铵盐可以重新被副干酪乳杆菌 R3 利用。因此后续试验都选用 25% 的氨水作为中和剂。

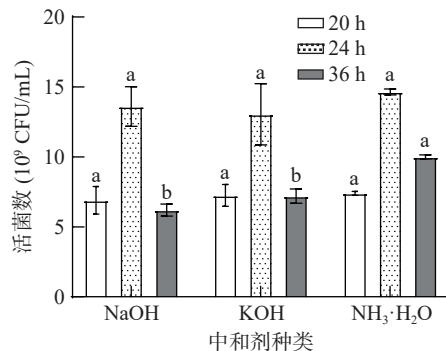


图 7 中和剂对 Lp.R3 活菌数的影响
Fig.7 Effect of the neutralizing agent on the viable Lp.R3 bacteria count

2.5.4 补料液种类以及添加量对 Lp.R3 活菌数的影响 补料培养首先要确定培养末期限制细胞增殖的底物, 即要确定补料液的组分。Lp.R3 在发酵罐上恒 pH 培养的动力学显示(图 8), 到 16 h 时细胞生长开始进入稳定期, OD(2.36) 和活菌数(1.02×10^{10} CFU/mL) 均达到最大值, 同时培养基中葡萄糖剩余(4.57 g/L) 也降到最低, 但此时较大群体的活菌数对碳源的需求也是最高的, 初步判断是底物碳源的消耗限制了乳酸菌的生长, 故在 16 h 时补充碳源十分有必要。

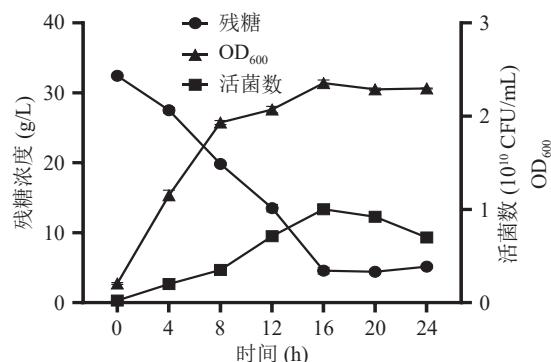


图 8 Lp.R3 在生物反应器中的生长曲线
Fig.8 Lp.R3 growth curves in the bioreactor

为了确定碳源是否为唯一限制性底物, 选择培养基中不同的组分与碳源混合后进行补料。结果如图 9 所示, 与不补料的对照组 CK 相比, 补充 G1(碳源)、G2(碳源混合生长因子番茄汁)、G3(碳源混合氮源)都能显著延长生长对数期, 但是补充 G4(浓缩过的优化培养基)并不能促进 Lp.R3 的生长。在发酵 36 h 时, G3 的效果不如 G1 和 G2, 说明氮源的加入对菌株生长没有促进作用, 而靳志强等^[18]在补料培养时发现葡萄糖和氮源混合物是德氏乳杆菌保加利亚亚种 LDB S-1 必要的补加营养素, 分析可能是其培养基初始氮源含量太低为 30 g/L, 而本试验的初始氮源经优化后含量较高为 50 g/L, 所以氮源不是限制性底物。G1 和 G2 之间无显著性差异, 说明生长因子也不是限制性底物, 故后续选择葡萄糖作为唯一补料液。

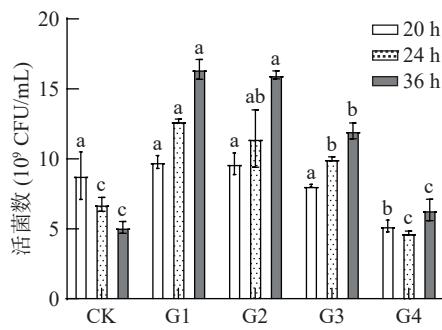


图 9 补料液对 Lp.R3 活菌数的影响

Fig.9 Effect of the filling solution on the number of Lp.R3 viable bacteria

补料液种类确定后进一步对补料量进行优化, 设置三组不同的葡萄糖总量, 分别为 75、60、45 g/L, 图 10 可知, 随着补料总量的增加, 活菌数也增加, 在发酵 36 h 时, 75 g/L 和 45 g/L 的活菌数具有显著性差异($P<0.05$), 葡萄糖浓度过低会对菌株生长有限制性作用, 故后续试验选取 75 g/L 的葡萄糖进行补料。

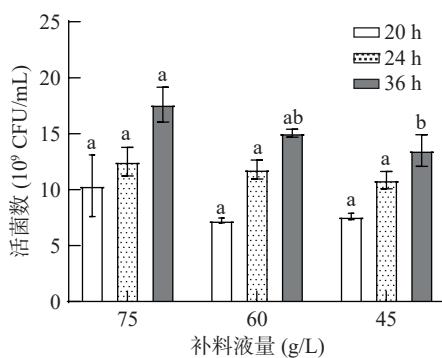


图 10 补料量对 Lp.R3 活菌数的影响

Fig.10 Effect of fed quantity on Lp.R3 viable bacteria count

2.5.5 补料方式对 Lp.R3 活菌数的影响 补料方式对高密度培养来说至关重要, 合适的补料方式可以更好地降低底物抑制作用。由图 11 可得, B1、B2、B3、B4 的活菌数都随着发酵时间的增加而增加, 在发酵 20 h 时 B1、B2、B3、B4 的活菌数分别为 1.685×10^{10} 、 2.04×10^{10} 、 1.855×10^{10} 、 1.56×10^{10} CFU/mL, B2(分批恒速流加)和 B3(连续变速补料)都显著高于 B1(连续恒速补料)和 B4(连续一次性补料)($P<0.05$), 在发酵 36 h 时 B1、B2、B3、B4 的活菌数分别为 2.15×10^{10} 、 2.35×10^{10} 、 2.63×10^{10} 、 2.0×10^{10} CFU/mL, B3 的活菌数显著高于 B2($P<0.05$)。说明发酵一开始加入高浓度的葡萄糖导致渗透压升高, 会对菌体产生一定的抑制作用, 不适合用于高密度生产。而恒速流加补料因为补料速率与菌体的生长速率不对应, 当菌体处于指数生长时对葡萄糖的需求远大于葡萄糖的补料速率, 而导致菌体生长受限, 当迟滞期菌体生长缓慢时, 恒速补料速率太快, 导致葡萄糖浓度升高, 渗透压也升高, 抑制了菌体的生长繁殖。当采用 16 h 前后进行连续变速补料后, 随着培养时间的增加变速补料与其他三种补料方式的差异性就越显著, 故后续试验

选用 B3 连续的变速补料方式对 Lp.R3 进行高密度培养。

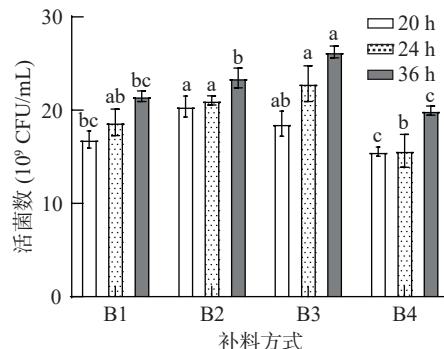


图 11 补料方式对 Lp.R3 活菌数的影响

Fig.11 Effect of feeding mode on the number of Lp.R3 viable bacteria

2.6 Lp.R3 培养工艺优化前后生长曲线对比

由图 12A 可看出, 在生物反应器中进行化学中和法与补料培养相结合的发酵方式使 Lp.R3 的对数期延长至 36 h, 最高 OD 值可达到 14.67, 显著高于摇瓶培养基础培养基(5.31)和优化后的培养基(7.78)。图 12B 可知在发酵 36 h 时发酵罐培养的最高活菌数可达 2.56×10^{10} CFU/mL, 是基础培养基 (1.65×10^9 CFU/mL) 的 15.51 倍, 是优化后的培养基 (4.29×10^9 CFU/mL) 的 5.97 倍, 说明通过合适的发酵罐培养模式可显著提升 Lp.R3 的生物量和活菌数。36 h 后 OD 值基本不变, 活菌数出现下降, 说明发酵达到终点。

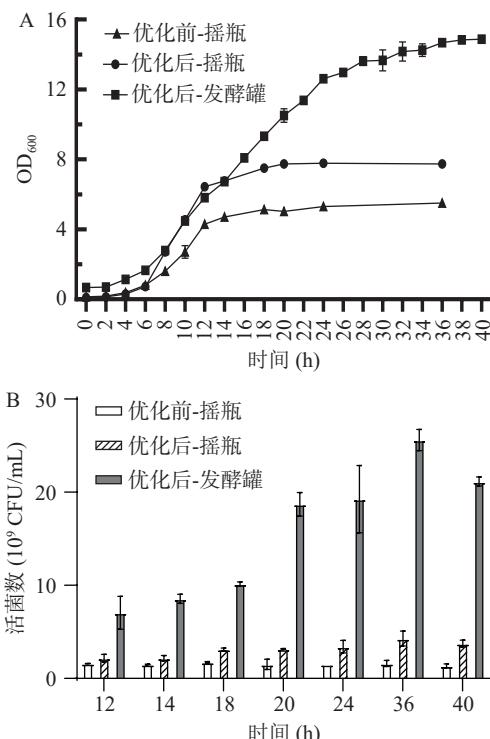


图 12 Lp.R3 培养工艺优化前后的生长曲线(A)与活菌数(B)

Fig.12 Lp.R3 growth curve (A) and number of viable bacteria (B) before and after optimization of culture process

3 结论

本研究通过单因素和正交试验,对培养基成分、静态培养条件和发酵罐工艺进行优化。优化后的培养基较基础MRS组成成分减少了一半,活菌数提高了两倍。根据试验结果,最佳的培养基成分为葡萄糖30 g/L、酵母浸粉50 g/L、无水乙酸钠10 g/L、MnSO₄0.1 g/L、吐温80 1 g/L,最佳的静态培养条件为:接种量1%、温度35 ℃、初始pH为7,在此条件下Lp.R3的活菌数为4.75×10⁹ CFU/mL,在优化后的培养基基础上对发酵罐工艺进行优化,确定了不通气搅拌的培养方式,发酵罐恒定pH为5,以25%的氨水为中和剂,补料液为75 g/L的葡萄糖,补料方式选择连续变速补料,综上得到了一种可以高密度培养Lp.R3的工艺,使得最高活菌数可达2.56×10¹⁰ CFU/mL,是MRS培养基的15.51倍。简化的培养基成分以及高密度的发酵方式为Lp.R3的临床和市场应用提供了更多的可能性,也为实现Lp.R3在食品以及医药行业的工业化生产奠定了基础。

© The Author(s) 2025. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- VERDENELLI M C, GHELFI F, SILVI S, et al. Probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* isolated from human faeces[J]. *Eur J Nutr*, 2009, 48(6): 355–363.
- WANNUN P, PIWAT S, TEANPAISAN R. Purification and characterization of bacteriocin produced by oral *Lactobacillus paracasei* SD1[J]. *Anaerobe*, 2014, 27: 17–21.
- 罗小叶, 田春燕, 刘婉琳, 等. 一株副干酪乳杆菌发酵生产香菇酸奶工艺研究及挥发性成分分析[J]. *中国调味品*, 2024, 49(1): 40–47. [LUO X Y, TIAN C Y, LIU W L, et al. Study on fermentation process of mushroom yogurt by a strain of *Lactobacillus paracasei* and analysis of volatile components[J]. *Chinese Condiments*, 2024, 49(1): 40–47.]
- BERGGREN A, LAZOU AHRÉN I, LARSSON N, et al. Randomised, double-blind and placebo-controlled study using new probiotic lactobacilli for strengthening the body immune defence against viral infections[J]. *European Journal of Nutrition*, 2011, 50(3): 203–210.
- CHOI H, RYU H, PARK K, et al. Direct lactic acid fermentation of Jerusalem artichoke tuber extract using *Lactobacillus paracasei* without acidic or enzymatic inulin hydrolysis[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 114: 745–747.
- HUANG J, YANG Z, LI Y, et al. *Lactobacillus paracasei* R3 protects against dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice via regulating Th17/Treg cell balance[J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 356.
- CHEN T, LI B, ZHENG K, et al. *Lactobacillus paracasei* R3 alleviates tumor progression in mice with colorectal cancer[J]. *Current Microbiology*, 2023, 81(1): 38.
- 国家药品监督管理局药品审评中心[EB/OL]. [2023-11-20]. <https://www.cde.org.cn/main/xxgk/listpage/9f9c74c73e0f8f56a8bfbc646055026d>. [China National Drug Administration Center For Drug Evaluation[EB/OL]. [2023-11-20]. [https://www.cde.org.cn/main/xxgk/listpage/9f9c74c73e0f8f56a8bfbc646055026d. \]](https://www.cde.org.cn/main/xxgk/listpage/9f9c74c73e0f8f56a8bfbc646055026d)
- 李盼盼, 张庆芳, 刘春莹, 等. 鼠李糖乳杆菌LP216高密度发酵培养基优化[J]. *中国酿造*, 2022, 41(4): 87–92. [LI P P, ZHANG Q F, LIU C Y, et al. Optimization of high-density fermentation medium of *Lactobacillus rhamnosus* LP216[J]. *China Brewing*, 2022, 41(4): 87–92.]
- 吕佳璐, 于冰, 张妍, 等. 干酪乳杆菌YQ336高密度培养条件优化[J]. *饲料研究*, 2021, 44(12): 76–80. [LÜ J L, YU B, ZHANG Y, et al. Optimization of high density culture conditions of *L. casei* YQ336[J]. *Feed Research*, 2021, 44(12): 76–80.]
- PENG J, YOU Q, FENG B, et al. Cultivation of *Lactobacillus casei* LT-L614 in high density with sugarcane molasses: Optimization of processing[J]. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 2019, 13(6): 848–856.
- 王英, 周剑忠, 施亚萍, 等. 副干酪乳杆菌FM-LP-4菌株的高密度培养条件优化[J]. *江苏农业科学*, 2018, 46(19): 211–215. [WANG Y, ZHOU J Z, SHI Y P, et al. Optimization of high-density culture conditions for the *L. paracasei* FM-LP-4 strain[J]. *Jiangsu Agricultural Science*, 2018, 46(19): 211–215.]
- 刘振民, 蒋士龙, 莫蓓红. 德氏乳杆菌保加利亚亚种补料分批培养研究[J]. *乳业科学与技术*, 2008, 31(6): 263–265. [LIU Z M, JIANG S L, MO B H. Study on nutritious materials supplement fed cultivation of *Lac. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*[J]. *Journal of Dairy Science and Technology*, 2008, 31(6): 263–265.]
- 吴迪. 产香型干酪乳杆菌TCS高密度培养工艺及生长抑制因素的解除策略研究[D]. 上海: 上海应用技术大学, 2023. [WU D. Study on high density culture process and releasing strategies of growth inhibitors of aroma-producing *Lacticaseibacillus casei* TCS[D]. Shanghai: Shanghai University of Applied Technology, 2023.]
- 魏敏. 副干酪乳杆菌的高密度发酵及其微胶囊化的研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2014. [WEI M. High cell density culture and microencapsulation of *Lactobacillus paracasei*[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2014.]
- 马精阳. 干酪乳杆菌高密度培养与冻干保护剂制备工艺优化[D]. 长春: 吉林农业大学, 2022. [MA J Y. High-density culture of *Lactobacillus casei* and optimization of freeze-drying protective agent preparation process[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2022.]
- 陈百莹, 郑苗, 邓泽元, 等. 植物乳杆菌ZJ316培养基优化和高密度培养的研究[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(7): 65–74. [CHEN B Y, ZHENG M, DENG Z Y, et al. Optimization of fermentation medium and the high-density culturing conditions for *Lactobacillus plantarum* ZJ316[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(7): 65–74.]
- 靳志强, 李平兰. 补料分批法高密度培养德氏乳杆菌保加利亚亚种S-1[J]. *中国乳品工业*, 2007(1): 4–9. [JIN Z Q, LI P L. High cell density culture of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* S-1 in fed-batch fermentation[J]. *Dairy Industry of China*, 2007(1): 4–9.]
- 周杏荣, 周佳豪, 雷文平, 等. 干酪乳杆菌LZ183E高密度培养条件优化[J]. *中国酿造*, 2020, 39(12): 64–68. [ZHOU X R, ZHOU J H, LEI W P, et al. Optimization of high density culture conditions of *Lactobacillus casei* LZ183E[J]. *China Brewing*, 2020, 39(12): 64–68.]
- 姚国强, 张雪梅, 高志敏, 等. *Lactobacillus reuteri* IMAU 10240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. Op-

timization of enrichment medium and high cell density cultivation of *Lactobacillus reuteri* IMAU10240 [J]. *Food Science*, 2017, 38(14): 97–105.]

[21] 张贺田. 副干酪乳杆菌 B1 高密度培养及转录调控机制研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2023. [ZHANG H T. Study on high density culture and transcriptional regulation of *Lactobacillus paracei* B1 [D]. Changsha: Central South University, 2023.]

[22] PARECHA D, ALFANO A, CIMINI D, et al. Vegan grade medium component screening and concentration optimization for the fermentation of the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* IMC 502 (R) using design of experiments [J/OL]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2024. <https://doi.org/10.1093/jimb/kuae016>.

[23] 崔树茂. 乳酸菌的生长抑制和冻干存活的影响因素及规律 [D]. 无锡: 江南大学, 2017. [CUI S M. The impact factors and rules of growth inhibition and freeze-drying survival for lactic acid bacteria [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017.]

[24] PODDAR D, de JONGE M D, HOWARD D L, et al. Manganese accumulation in probiotic *Lactobacillus paracasei* ATCC 55544 analyzed by synchrotron X-ray fluorescence microscopy and impact of accumulation on the bacterial viability following encapsulation [J]. *Food Research International*, 2021, 147: 110528.

[25] 王玉林, 黄洁, 崔树茂, 等. 植物乳杆菌最适生长底物解析及高密度培养工艺 [J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(4): 19–27. [WANG Y L, HUANG J, CUI S M, et al. Analysis of optimal growth substrate and high-density culture process of *Lactobacillus plantarum* [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(4): 19–27.]

[26] 田佳雪. 东北酸菜复合发酵剂的制备及其对酸菜品质影响探究 [D]. 长春: 吉林大学, 2024. [TIAN J X. Preparation of north-east sauerkraut mixed starter cultures and its effect on the quality of sauerkraut [D]. Changchun: Jilin University, 2024.]

[27] 李娜. 植物乳杆菌 ZJ316 的高密发酵及高活性菌制剂的初步研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2020. [LI N. High-density fermentation of *Lactobacillus plantarum* ZJ316 and preliminary study on the high activity bacteria agent [D]. Nanning: Guangxi University, 2020.]

[28] 周亮. 格氏乳杆菌 G098 的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. [ZHOU L. Opti-
mization of medium and high-density fermentation process of *Lactobacillus gasseri* G098 [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2023.]

[29] 左梦楠, 刘伟, 全琦, 等. 乳酸菌高密度培养技术的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(19): 436–445. [ZUO M N, LIU W, QUAN Q, et al. Research progress of lactic acid bacteria high-density culture technology [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(19): 436–445.]

[30] SINGHVI M, ZENDO T, SONOMOTO K. Free lactic acid production under acidic conditions by lactic acid bacteria strains: Challenges and future prospects [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(14): 5911–5924.

[31] WANG T, LU 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.

[32] 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. [ZHOU N P, JIANG X, PEI Q, et al. High-density culture conditions of *Lactobacillus plantarum* NCU001929 isolated from red sour soup [J]. *Food and Fermentation Industry*, 2024, 50(21): 36–44.]

[33] 赖长龙, 曹余, 杨玉, 等. 植物乳杆菌发酵动力学及高密度培养研究 [J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(20): 137–144. [LAI C L, CAO Y, YANG Y, et al. Fermentation kinetics and high density culture studies of *Lactobacillus plantarum* [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2022, 48(20): 137–144.]

[34] 彭奎耀. 嗜热链球菌 937 发酵剂制备技术的研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2023. [PENG K Y. Study on the preparation technology of *Streptococcus thermophilus* 937 starter [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2023.]

[35] 吴军林, 柏建玲, 莫树平, 等. 乳酸菌 R8 高密度培养的发酵工艺研究 [J]. 现代食品科技, 2018, 34(2): 164–170, 251. [WU J L, BAI J L, MO S P, et al. Optimization of culture conditions and medium of lactic acid bacteria R8 cultured in high density fermentation [J]. *Modern Food Science & Technology*, 2018, 34(2): 164–170, 251.]