

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

郑亚平¹, 王均豪², 王晨晨², 张宇¹, 姜毓君¹, 满朝新^{1*}

(1. 东北农业大学食品学院乳品科学教育部重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150030)

(2. 湖北均瑶大健康饮品股份有限公司, 湖北宜昌 443000)

摘要: 以植物乳植杆菌 J26 为研究对象, 通过 Biolog GEN III Microstation 自动微生物鉴定系统筛选碳氮源, 优化后用 25 g/L 的麦芽糖及葡萄糖 (1:1) 混合代替 MRS 培养基中碳源, 10 g/L 的牛肉膏与酵母粉 (1:1) 混合代替 MRS 培养基中氮源。利用单因素实验确定菌株的最优发酵条件为: 培养基初始 pH 值为 5.6, 发酵温度为 33 ℃, 接种量为 4%。在此条件下, 采用 5 L 发酵罐进行高密度发酵, 植物乳植杆菌 J26 在发酵 14 h 到达稳定期, 活菌数可达到 4.35×10^{10} CFU/mL。由于, 植物乳植杆菌 J26 活菌数高并且发酵活力强, 因此可作为发酵剂, 用于豆乳的发酵, 可以获得具有良好活菌数 (3.56×10^8 CFU/mL)、持水性 (48.12%) 和质构特性的发酵豆乳。通过优化高密度发酵工艺可以有效提高发酵液活菌数, 为植物乳植杆菌 J26 高密度发酵工艺的应用及发酵豆乳产业化提供理论基础。

关键词: 植物乳植杆菌 J26; 高密度发酵; 工艺优化; 豆乳

文章编号: 1673-9078(2024)10-154-164

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.10.0997

Process Optimization of the High-density Fermentation with *Lactiplantibacillus plantarum* J26 and Its Application to the Fermentation of Soy Milk

ZHENG Yaping¹, WANG Junhao², WANG Chenchen², ZHANG Yu¹, JIANG Yujun¹, MAN Chaoxin^{1*}

(1.Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)(2.Hubei Junyao Health Drinks, Yichang 443000, China)

Abstract: *Lactiplantibacillus plantarum* J26 was used as the research object. The carbon and nitrogen sources were screened using the Biolog GEN III Microstation automated microbial identification system. After optimization, a mixture of 25 g/L maltose and glucose (1:1) was used to replace the carbon source in the MRS medium, and a mixture of 10 g/L beef paste and yeast powder (1:1) was used to replace the nitrogen source in the MRS medium. The optimal fermentation

引文格式:

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.

ZHENG Yaping, WANG Junhao, WANG Chenchen, et al. Process optimization of the high-density fermentation with *Lactiplantibacillus plantarum* J26 and its application to the fermentation of soy milk [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(10): 154-164.

收稿日期: 2023-08-23

基金项目: 黑龙江省“双一流”学科协同创新成果建设项目 (LJGXCG2022-017)

作者简介: 郑亚平 (1998-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 乳制品微生物, E-mail: 2456183557@qq.com

通讯作者: 满朝新 (1978-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 乳品科学技术, E-mail: mcxwh2006@qq.com

conditions for the strains determined by single factor experiment were as follows: initial pH of the medium, 5.6; fermentation temperature, 33 °C; inoculation amount, 4%. Under these conditions, a 5-liter fermenter was used for high-density fermentation. *Lactiplantibacillus plantarum* J26 reached the stable stage after 14 h of fermentation, and the viable cell count could reach 4.35×10^{10} CFU/mL. Because *Lactiplantibacillus plantarum* J26 has a high viable cell count and high fermentation activity, thus can be used as a starter for the fermentation of soy milk. Fermented soy milk with a good viable bacterial count (3.56×10^8 CFU/ml), water-holding capacity (48.12%), and textural characteristics was obtained. By optimizing the high-density fermentation process, the number of viable bacteria in the fermentation broth can be effectively increased. This provides a theoretical basis for the application of high-density fermentation with *Lactiplantibacillus plantarum* J26 and the industrialization of fermented soy milk.

Key words: *Lactiplantibacillus plantarum* J26; high density fermentation; process optimization; soy milk

植物乳植杆菌 (*Lactiplantibacillus plantarum*) 是一种常见于发酵乳制品中的菌株, 属于厌氧或兼性厌氧菌, 被广泛用于豆乳、酸奶等食品发酵中并在食品发酵及医疗保健有良好应用^[1]。其还具有多种益生作用, 可改善胃肠道功能^[2]、调节免疫^[3]和减轻酒精性肝损伤^[4]等。

高密度发酵工艺是通过优化培养基配方及发酵工艺参数和特性进一步优化, 并能够提高产量、缩短生长周期等的方法。乳酸菌高密度发酵可使菌体活力及密度得到提升^[5], 有利于制备菌粉用于发酵乳制品。目前, 菌粉制备主要通过真空冷冻干燥^[6]和喷雾干燥^[7]等方法, 然而, 由于喷雾干燥在生产过程中设备内壁容易残留产品, 消耗动能大, 并且废气中易带有微粒^[8], 导致产品损耗, 因此制备发酵剂常采用真空冷冻干燥技术, 真空冷冻干燥在低温下进行可避免温度过高致死微生物的现象并且获得溶解度较高的菌粉^[9], 此外, 真空冷冻干燥技术能保持食品的形状并减少食品中风味及营养成分的损失^[10], 其制备的菌粉具有活菌数高、方便储存、保质期长等优点, 因此植物乳植杆菌发酵工艺优化有重大研究意义。

研究表明, 植物乳植杆菌可用于发酵豆乳并有助于提升营养、丰富食品多样性等。任海东等^[11]通过从酸奶发酵剂中分离得到的菌株应用于豆乳发酵, 获得了蛋白水解活性较高、质构特性优良的发酵豆乳。Wei 等^[12]从云南特色发酵食品中分离出嗜酸乳杆菌、嗜热链球菌、类干酪乳杆菌、罗伊氏乳杆菌、德氏乳杆菌保加利亚亚种 5 株具有较强发酵性能的乳酸菌, 按一定体积比进行复配, 发酵得到了具有良好特性的发酵豆乳。此外, 研究表明发酵豆乳生产工艺优化能显著提高豆乳工业生产率与产品品质, 大大降低发酵工业的生产成本, 延长货架

期^[13], 同时利用植物乳植杆菌发酵豆乳可以通过提高多酚等含量, 进而提升其抗氧化能力^[14]。然而, 通过优化植物乳植杆菌高密度发酵工艺制备发酵剂, 进而探究植物乳植杆菌发酵豆乳对其理化性质影响的相关研究较少, 仍需进一步探究。

本研究利用 Biolog GEN III Microstation 自动微生物鉴定系统筛选碳氮源, 通过研究不同碳氮源的利用情况, 将筛选出的碳氮源混合代替 MRS 培养基中碳氮源, 优化了植物乳植杆菌 J26 高密度发酵工艺, 获得植物乳植杆菌 J26 高密度发酵的最适条件。同时, 将高密度发酵得到的植物乳植杆菌 J26 菌粉作为发酵剂用于发酵豆乳, 并对其质构特性、持水力、活菌数、产酸能力等进行测定。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌种

植物乳植杆菌 J26 (*Lactiplantibacillus plantarum* J26) 保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC), 保藏编号为 CGMCC NO.5448, 由本实验室从内蒙古传统乳制品中分离。

1.1.2 试剂

麦芽糖、葡萄糖、蔗糖、D-甘露醇、氯化钠、牛肉膏、蛋白胨、氢氧化钠、无水乙醇、碳酸氢钠、氢氧化钾等均为国产分析纯试剂; 白砂糖 (市售), 发酵剂 (市售); MRS 培养基, 上海楷洋生物技术有限公司。

1.1.3 仪器

真空冷冻干燥机, 德国 Christ 冷冻干燥机; 5 L 发酵罐, 梅特勒-托利多仪器有限公司; ME204 电子

天平, 梅特勒-托利多仪器有限公司; 生物洁净工作台, 北京东联哈尔仪器制造; 移液器, Eppendorf 公司; BSP-150 生化培养箱, 苏州安泰; 灭菌锅, 上海三申医疗器械有限公司; 低温冷冻离心机, 上海离心机械研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株活化及生长曲线的建立

将植物乳植杆菌 J26 按照 3% (V/V) 的接种量接种至 100 mL MRS 液体培养基中, 在 37 °C 下培养 20 h。每隔 2 h 测定一次菌液的 OD₆₀₀, 以时间为横坐标, OD₆₀₀ 为纵坐标建立菌株的生长曲线。

1.2.2 植物乳植杆菌 J26 高密度发酵培养基成分筛选及工艺优化单因素试验

1.2.2.1 Biolog GEN III Microstation 自动微生物鉴定系统筛选碳氮源

将活化好的植物乳植杆菌 J26 在培养基上三区划线, 37 °C 培养 48 h 获得足够接种的菌量。用棉签从琼脂平板中沾取直径 3 mm 的菌落制备菌悬, 将菌悬液倒入 V 型加样水槽中, 使用 8 道移液器将菌悬液吸入移液器吸头中, 按每孔 100 μL 的量将菌悬液按顺序加入微孔板的所有孔中, 盖好微孔板的盖子, 将微孔板直接放入 OmniLog 的读数仪中, 48 h 后查看结果。

1.2.2.2 碳氮源的优化及碳氮源添加量的确定

对于碳源, 参考闫天文等^[15]方法并进行修改, 根据 Biolog GEN III Microstation 自动微生物鉴定系统得到的结果, 按 20 g/L 添加量, 将 D- 甘露醇、D- 麦芽糖、蔗糖、葡萄糖依次单独添加代替培养基的碳源, 并两两按照 1:1 互配添加代替培养基的碳源进行实验, 随后按 3% 接种量接种于含有培养基的 250 mL 的锥形瓶中, 初始 pH 值为 6.2, 在 37 °C 恒温培养箱中静置发酵 24 h, 然后用发酵罐发酵, 测定菌液发酵终点活菌数。筛选出最适碳源后, 考察当发酵完成时碳源添加量 (20、25、30、35、40 g/L) 对菌液活菌数的影响。

对于氮源, 参考刘利利等^[16]方法并进行修改, 根据 Biolog GEN III Microstation 自动微生物鉴定系统得到的结果, 在优化碳源的基础上, 按 18 g/L 添加量, 将酵母粉、牛肉膏、蛋白胨、大豆蛋白、L- 半胱氨酸、四氧嘧啶依次单独添加代替 MRS 液体培养基中的氮源, 并两两按照 1:1 互配添加代替

培养基的氮源进行实验, 以优化氮源后的 MRS 培养基作为对照。测定菌液发酵终点活菌数, 筛选出最适氮源。在此基础上, 考察当发酵完成时氮源添加量 (10、15、20、25、30 g/L) 对菌液活菌数的影响。

1.2.2.3 接种量的影响

选择不同接种量 3%、4%、5%、6% (V/V) 接种种子液于发酵培养基中, 初始 pH 值 5.6, 置于恒温箱内静置培养 14 h, 测定培养液的吸光值。

1.2.2.4 温度影响

按最适接种量接种种子液于发酵培养基中, 初始 pH 值 5.6, 分别在 30、33、36、40 °C 静置培养 14 h, 测定其吸光值。

1.2.2.5 pH 值的影响

根据 Xiong 等^[17]方法, 选择 pH 值分别为 5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0 在 5 L 发酵罐内分批发酵, 按最佳接种量接种, 最佳温度培养, 搅拌速度控制在 150 r/min, 每隔 2 h 测定吸光值, 选择其最佳 pH 值。

1.2.2.6 活菌数的影响

根据 Wang 等^[18]方法并进行修改, 取 1 mL 的菌液于 9 mL PBS 缓冲液中进行梯度稀释, 从中稀释到 10⁻¹², 菌液加入平皿后加入 MRS 琼脂培养基进行基内培养, 每个梯度三个平行, 在灭菌 MRS 固体培养基上进行涂布, 37 °C 倒置培养 24~48 h, 记录菌落总数, 用 CFU/mL 表示。

1.3 植物乳植杆菌 J26 发酵豆乳测定

精选大豆用清水清洗, 以豆水比 1:9 进行浸泡, 于 4 °C 环境浸泡 12 h, 将浸泡好的大豆放入磨浆机中, 磨浆时间为 15 min。将过滤后的豆浆在 55 MPa 高压下均质 3 次, 在 105 °C 高温条件下处理 15 min, 冷却至室温后备用。

按照宫俊峰等^[19]的研究方法, 利用真空冷冻干燥技术制备植物乳植杆菌 J26 发酵剂。在豆浆中加入 7% 蔗糖 (高温干燥灭菌) 混匀, 将制备好的植物乳植杆菌 J26 发酵剂、豆乳发酵剂 (保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌、植物乳杆菌, 市售)、植物乳植杆菌 J26 和豆乳发酵剂 1:2 (混合), 按市售发酵剂的接种量分别接种于豆奶中, 接种完成后于 37 °C 培养箱发酵 (以 pH 值 4.5 为发酵终点), 发酵结束后于 4 °C 后熟 24 h 制成成品, 对三组发酵豆乳的质构、持水力、pH 值、酸度、活菌数分别进行检测, 比较三者的发酵特性, 优选出发酵特性良好的发酵剂。

1.3.1 豆乳发酵过程中pH值的测定

将发酵好的豆乳在室温下用 pH 计测定 0、2、4、6、8、10、12 h 的 pH 值, 测定豆乳发酵过程中 pH 值的变化情况。

1.3.2 豆乳发酵过程中滴定酸度测定

根据郭谦等^[20]研究方法, 分别称取 0、2、4、6、8、10、12 h 的发酵过程中的豆乳 5 g 于 100 mL 三角瓶中测定其滴定酸度, 加入 40 mL 去离子水, 再加入 2~3 滴酚酞指示剂, 用 0.10 mol/L 的 NaOH 标准溶液滴定至微红色并在 1 分钟内不消失。滴定酸度 (吉尔涅尔度 °T) 为 100 mL 豆乳消耗 0.10 mol/L NaOH 的毫升数, 消耗 1 mL 0.10 mol/L 的 NaOH 相当于 10 °T。

1.3.3 豆乳发酵过程中活菌数测定

方法同 1.2.2.6。

1.3.4 豆乳发酵过程中持水力测定

根据朱亚军^[21]等方法并进行修改, 称取成品豆乳 10.0 g, 6 000 r/min, 4 °C 条件下离心 15 min, 去除乳清后进行称重, 持水力公式如下:

$$X = \frac{A-B}{B} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

X—豆乳持水力, %;

A—豆乳样品质量, g;

B—豆乳离心后下沉质量, g。

1.3.5 豆乳发酵质构的测定

根据董世荣等^[22]方法, 将发酵好的豆乳用质构仪测定样品质构参数。

1.4 统计分析

每组实验至少做 3 个平行。采用 SPSS 20.0 统计软件进行显著性差异分析; 数据计算、绘图采用 GraphPad Prism 软件。

2 结果与讨论

2.1 植物乳植杆菌 J26 生长曲线及活菌数测定

由图 1 可知, 植物乳植杆菌 J26 生长过程在 0~3 h 为延迟期, 3~14 h 为对数期, 15~24 h 为稳定期。菌体进入稳定期, 结构和生理发生变化, 菌体抗性增加^[23], 因此, 选择 14 h 为收获期, 此时活菌数最高, 隋春光等^[24]研究表明植物乳杆菌 LP-S2 发

酵 15 h 为最佳收获期, 说明不同菌株高密度发酵收获期存在差异。

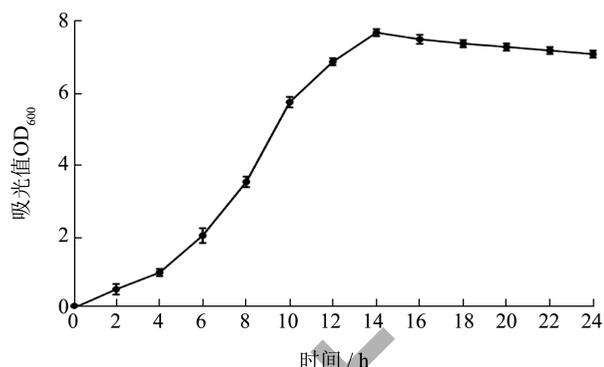


图 1 植物乳植杆菌 J26 生长曲线

Fig.1 Growth curve of *Lactiplantibacillus plantarum* J26

2.2 Biolog GEN III Microstation 自动微生物鉴定系统结果分析

植物乳植杆菌 J26 对碳源底物利用情况: A-1 阴性对照孔作为参照, 植物乳植杆菌 J26 对 D- 麦芽糖、D- 纤维二糖、蔗糖、D- 甘露醇中碳源底物有利用能力, 并且利用效果最好; 其次, 对 D- 甘露糖、 α -D- 葡萄糖、N- 乙酰 -D- 葡萄糖也有较好的利用; 同时, 对 D- 果糖、 β - 甲酰 -D- 葡萄糖苷、D- 水杨苷表现出一定的可利用性, 呈阳性反应; 对其他碳源利用能力明显较低 (如图 2, 如表 1)。A-10 阳性对照孔作为参照, 植物乳植杆菌 J26 对化学物质较敏感, 尤其是乳酸钠化学物质的敏感性最显著; 其次, 对 1 wt.% NaCl、万古霉素、四唑紫、四唑蓝、亚硝酸钾有一定的敏感性 (如图 2)。

植物乳植杆菌 J26 对氮源底物利用情况: A-1 阴性对照孔作为参考, 植物乳植杆菌 J26 菌株对 L- 半胱氨酸、鸟嘌呤、四氧嘧啶有利用这些氮源底物的能力, 并且利用效果最好, 其次, 对 D, L-2- 氨基辛酸也有较好的利用, 呈阳性反应 (如图 3, 如表 2)。

2.3 碳氮源种类及其添加量的确定

根据实际应用以及 Biolog GEN III Microstation 自动微生物鉴定系统结果分析, 将 D- 甘露醇、D- 麦芽糖、蔗糖、葡萄糖单一或混合添加组分别代替 MRS 培养基中的碳源, 在 33 °C 条件下发酵 14 h, 实验结果如图 4a 所示, 单一碳源与混合碳源中, 麦芽糖与葡萄糖 (1:1) 相结合为碳源使菌体活菌数最高, 麦芽糖与葡萄糖 (1:1) 混合添加发酵效果最好, 活菌数达 2.82×10^{10} CFU/mL。并且确定以 25 g/L 麦

芽糖与葡萄糖 (1:1) 混合添加量为最适, 活菌数达 2.82×10^{10} CFU/mL (如图 4b)。

将酵母粉、牛肉膏、蛋白胨、大豆蛋白胨、L-半胱氨酸、四氧嘧啶及混合添加组分别代替 MRS 培养基中氮源, 发酵 14 h 实验结果如图 5a 所示, 单一氮源与混合氮源中, 10 g/L 牛肉膏与酵母粉 (1:1) 相结合为氮源使植物乳植杆菌 J26 活菌数最高, 牛肉膏与酵母粉 (1:1) 混合添加发酵效果

最好, 活菌数达 2.67×10^9 CFU/mL (如图 5b)。Lai 等^[25]研究发现当碳源 36.64 g/L (葡萄糖:麦芽糖质量比 2:3)、氮源 47.83 g/L (酵母粉:蛋白胨质量比 1:1) 时, 植物乳植杆菌的活菌数最高, 说明不同菌株对于碳氮源利用情况不同, 因此根据活菌数生长情况优化植物乳植杆菌 J26 碳氮源是必要的, 为进一步优化高密度发酵工艺提供前期基础。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	26	41	129	27	162	87	162	28	28	100	90	55
B	32	47	24	78	78	89	26	21	27	85	58	64
C	92	100	61	17	21	19	19	18	24	176	75	79
D	28	177	19	14	21	19	22	15	17	48	60	66
E	29	23	19	15	16	20	24	17	20	49	45	57
F	44	21	22	18	11	34	16	15	16	81	90	94
G	25	23	22	15	11	20	19	15	15	69	38	82
H	23	27	19	19	17	20	14	14	15	79	57	70

图 2 植物乳植杆菌 J26 Biolog 碳源结果

Fig.2 *Lactiplantibacillus plantarum* J26 Biolog carbon source results

注: 图 2 中颜色深浅代表植物乳植杆菌 J26 对应表 1 中碳源的利用程度, 颜色越深、数值越高的孔表示对碳源利用程度越高。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	15	14	12	11	11	11	11	11	11	11	78	18
B	18	11	16	11	11	12	11	11	11	15	14	23
C	13	11	13	11	11	11	11	11	11	12	13	24
D	18	15	11	11	11	11	11	11	13	15	13	18
E	23	13	11	11	12	15	11	29	24	34	24	19
F	19	15	14	11	13	72	11	11	12	11	19	23
G	28	18	30	85	36	11	11	13	11	46	21	25
H	27	23	18	17	15	11	11	12	16	16	24	34

图 3 植物乳植杆菌 J26 Biolog 氮源结果

Fig.3 *Lactiplantibacillus plantarum* J26 Biolog nitrogen source results

注: 图 3 中颜色深浅代表植物乳植杆菌 J26 对应表 2 中氮源的利用程度, 颜色越深、数值越高的孔表示对氮源利用程度越高。

表 1 植物乳植杆菌J26Biolog碳源结果

Table 1 *Lactiplantibacillus plantarum* J26 Biolog carbon source results

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
Negative Control 阴性对照	Dextrin 糊精	D-Maltose	D-Trehalose D-海藻糖	D-Cellobiose D-纤维二糖	Gentiobiose 龙胆二糖	Sucrose 蔗糖	D-Turanose D-松二糖	Stachyose 水苏糖	Positive Control	pH6	pH5
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
D-Raffinose 蜜三糖, 棉子糖	α -D-Lactose α -D-乳糖	D-Melibiose 蜜二糖	β -Methyl-D-Glucoside β -甲基-D-葡萄糖苷	D-Salicin D-水杨苷	N-Acetyl-D-Glucosamine N-乙酰-D-葡萄糖胺	N-Acetyl- β -D-Mannosamine N-乙酰- β -D-甘露糖胺	N-Acetyl-D-Galactosamine N-乙酰-D-半乳糖胺	N-Acetyl-Neuraminic Acid N-乙酰神经氨酸	1% NaCl	4% NaCl	8% NaCl
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
a-D-Glucose a-D-葡萄糖	D-Mannose D-甘露糖	D-Fructose D-果糖	D-Galactose D-半乳糖	3-Methyl Glucose 3-甲基葡萄糖	D-Fucose D-岩藻糖	L-Fucose L-岩藻糖	L-Rhamnose L-鼠李糖	Inosine 肌苷	1% Sodium Lactate 1% 乳酸钠	Fusidic Acid 核链胞酸	D,Serine D-丝氨酸
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
D-Sorbitol D-山梨醇	D-Mannitol D-甘露醇	D-Arabitol D-阿拉伯醇	myo-Inositol 肌醇	Glycerol 甘油	D-Glucose6-P04 D-葡萄糖-6-磷酸	D-Fructose-6-P04 D-果糖-6-磷酸	D-Apartic Acid D-天冬氨酸	D-Serine D-丝氨酸	Troleanandomycin 酷竹桃毒素	Rifamycin SV 利福霉素 SV	Minocycline 二甲胺四环素
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
Gelatin 明胶	Glycy-L-Proine 氨基乙酰-L-脯氨酸	L-Alanine L-丙氨酸	L-Arginine L-精氨酸	L-Aspartic Acid L-天冬氨酸	L-Glutamic Acid L-谷氨酸	L-Histidine L-组胺	L-Pyroglutamic Acid L-焦谷氨酸	L-Serine L-丝氨酸	Lincomycin 林肯霉素, 洁霉素	Guanidine 胍盐酸胍	Niaproof 4 硫酸四苯钠
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
Pectin 果胶	D-Galacturonic Acid D-半乳糖醛酸	L-Galactonic Acid L-半乳糖醛酸内	D-Gluconic Acid D-葡萄糖酸	D-Gluconic Acid D-葡萄糖酸	Glucuronamide 葡萄糖醛酰胺	Mucic Acid 粘酸:粘液酸	Quinic Acid 奎宁酸	D-Saccharic Acid D-糖质酸	Vancomycin 万古霉素	Tetrazolium Violet 四唑紫	Tetrazoium Blue 四唑蓝
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
p-Hydroxy-Phenylacetic Acid p-羟基-苯乙酸	Methyl Pyruvate 丙酮酸甲酯	D-Lactic Acid Methyl Ester D-乳酸甲酯	L-Lactic Acid L-乳酸	Citric Acid 柠檬酸	a-Keto-Glutaric Acid a-酮-戊二酸	D-Malic Acid D-苹果酸	L-Malic Acid L-苹果酸	Bromo-Succinic Acid 溴丁二酸	Nalidixic Acid 蔡啉酮酸	Lithium Chloride 氯化锂	Potassium Tellurite 亚碲酸钾
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12
Tween 40 吐温 40	γ -Amino-Butyric Acid V-氨基丁酸	a-Hydroxy-Butyric Acid a-羟基丁酸	B-Hydroxy-D,L Butyric Acid B-羟基-D,L 丁酸	a-Keto-Butyric Acid a-酮丁酸	Acetoacetic Acid 乙酰乙酸	Propionic Acid 丙酸	Acetic Acid 乙酸	Formic Acid 甲酸	Aztreonam 氨曲南	Sodium Butyrate 丁酸钠	Sodium Bromate 溴酸钠

表 2 植物乳植杆菌J26Biolog氮源结果

Table 2 *Lactiplantibacillus plantarum* J26 Biolog nitrogen source results

A1 NegativeControl 阴性对照	A2 Ammonia 氨	A3 Nitrite 亚硝酸盐	A4 Nitrate 硝酸盐	A5 Urea 尿素	A6 Buret 双缩脲	A7 L-Alanine L-丙氨酸	A8 L-Arginine L-精氨酸	A9 L-Asparagine L-天冬酰胺	A10 L-Aspartic Acid L-天冬氨酸	A11 L-CysteineL- 半胱氨酸	A12 L-Glutamic Acid L-谷氨酸
B1 L-Glutamine L-谷氨酰胺	B2 Glycine 甘氨酸	B3 L-Histidine L-组氨酸	B4 L-Isoleucine L-异亮氨酸	B5 L-Leucine L-亮氨酸	B6 L-Lysine L-赖氨酸	B7 L-Nethionine L-蛋氨酸	B8 L-Phenylalanine L-苯丙氨酸	B9 L-Proline L-脯氨酸	B10 L-Serine L-丝氨酸	B11 L-Threonine L-苏氨酸	B12 L-Tryptophan L-色氨酸
C1 L-Tyrosine L-酪氨酸	C2 L-Valine L-缬氨酸	C3 D-Alanine D-丙氨酸	C4 D-Asparagine D-天冬酰胺	C5 D-Aspartic Acid D-天冬氨酸	C6 D-Glutamic Acid D-谷氨酸	C7 Lysine D-赖氨酸	C8 D-Serine D-丝氨酸	C9 D-Valine D-缬氨酸	C10 L-Citrulline L-瓜氨酸	C11 L-Homoserine L-高丝氨酸	C12 L-Ornithine L-鸟氨酸
D1 N-Acetyl-D, L-Glutamic Acid N-乙酰-D, L-谷氨酸	D2 N-Phthaloyl-L- Glutamic Acid N-酞酰-L-谷 氨酸	D3 L-Pyroglutamic Acid L-焦谷氨酸	D4 Hydroxylamine 羟胺	D5 Methylamine 甲胺	D6 N-Amylamine N-戊胺	D7 N-Butylamine N-丁胺	D8 Ethylamine 乙胺	D9 Ethanolamine 乙醇胺	D10 Ethylenediamin 乙二胺	D11 Putrescine 腐胺	D12 Agmatine 胍丁胺
E1 Histamine 组胺	E2 β -Phenylethyl- amine β -苯乙胺	E3 Tyramine 酪胺	E4 Acetamide 乙酰胺	E5 Formamide 甲酰胺	E6 Glucurona Mide 葡萄糖胺	E7 D,L-Lactamide D,L-乳酸胺	E8 D-Glucosamine D-氨基葡萄糖	E9 D-Galactosamine D-半乳糖胺	E10 D-Mannosamine D-甘露糖胺	E11 N-Acetyl-D- Glucosamine N-乙酰-D-葡 糖胺	E12 N-Acetyl-D- Galactosamine N-乙酰-D-半 乳糖胺
F1 N-Acetyl-D- Mannosamine N-乙酰-D- 甘露糖胺	F2 Adenine 腺嘌呤	F3 Adenosine 腺苷	F4 Cytidine 胞苷	F5 Cytosine 胞嘧啶	F6 Guanine 鸟嘌呤	F7 Guanosine 鸟苷	F8 Thymine 胸腺嘧啶	F9 Thymidine 胸苷	F10 Uracil 尿嘧啶	F11 Uridine 尿苷	F12 inosine 肌苷
G1 Xanthine 黄嘌呤	G2 Xanthosine 黄原苷	G3 Uric Acid 尿酸	G4 Alloxan 四氧嘧啶	G5 Allantoin 尿囊素	G6 Parabanic Acid 对羟基苯甲酸	G7 D,L- α -Amino- N-Butyric Acid D,L- α -氨基 -N-丁酸	G8 γ -Amino-N- Butyric Acid γ -氨基-N-丁酸	G9 ϵ -Amino-N- Caproic Acid ϵ -氨基-N-己酸	G10 D,L- α -Amino- Caprylic Acid D,L- α - 氨基辛酸	G11 δ -Amino-N- Valeric Acid δ -氨基-N- 戊二酸	G12 α -Amino-N- Valeric Acid α -氨基-N- 戊二酸
H1 Ala-Asp	H2 Ala-Gln	H3 Ala-Glu	H4 Ala-Gly	H5 Ala-His	H6 Ala-Leu	H7 Ala-Thr	H8 Gly-Asn	H9 Gly-Gln	H10 Gly-Glu	H11 Gly-Met	H12 Met-Ala

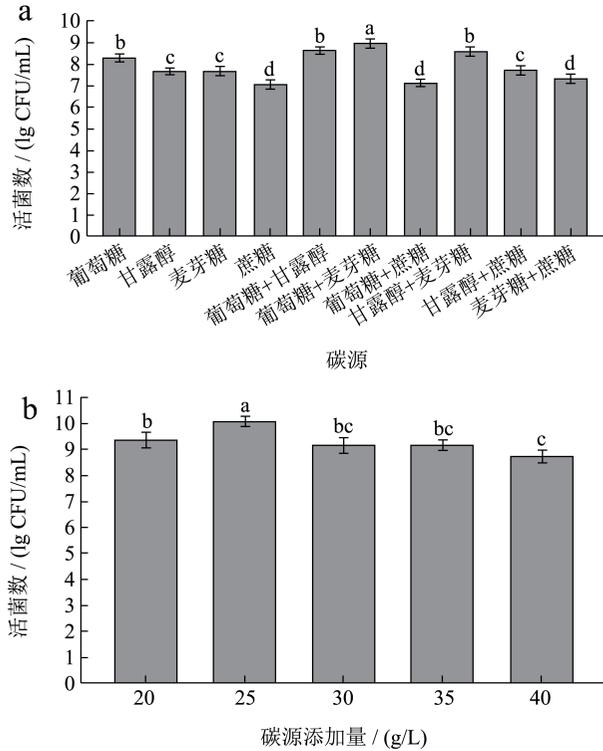


图4 植物乳植杆菌 J26 在不同碳源及添加量发酵终点的活菌数

Fig.4 *Lactiplantibacillus plantarum* J26 viable counts at fermentation end points with different carbon sources and additives

注：不同字母间表示不同组间具有显著性差异， $P < 0.05$ 。

下图同。

2.4 接种量的确定

实验结果表明当接种量为4%进行发酵时，获得的活菌数最高，当接种量较低时，菌体密度小，当接种量较高时，菌体密度大，消耗营养物质多^[26]，营养物质不足延缓菌体生长，接种量过高和过低都不利于菌体的生长（如图6）。

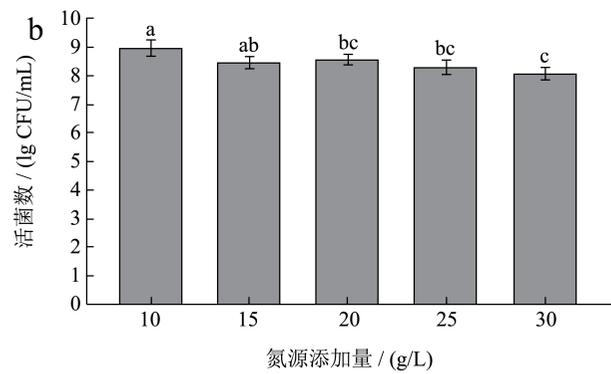
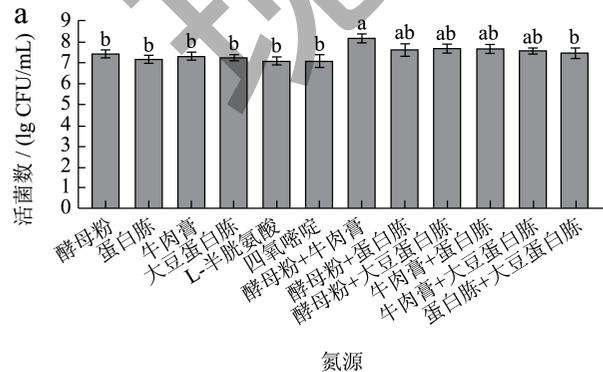


图5 植物乳植杆菌 J26 在不同氮源及添加量发酵终点的活菌数

Fig.5 *Lactiplantibacillus plantarum* J26 viable counts at fermentation end points with different nitrogen sources and additives

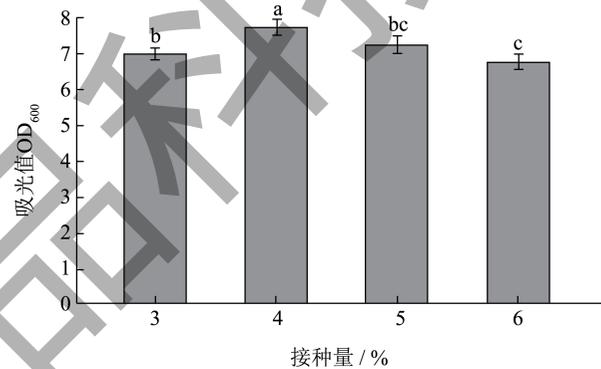


图6 植物乳植杆菌 J26 在不同接种量下的吸光值 OD₆₀₀

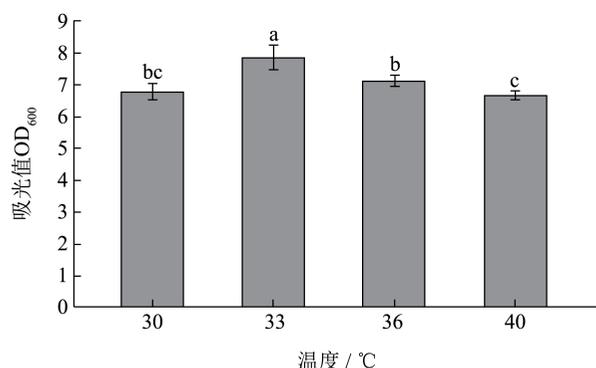
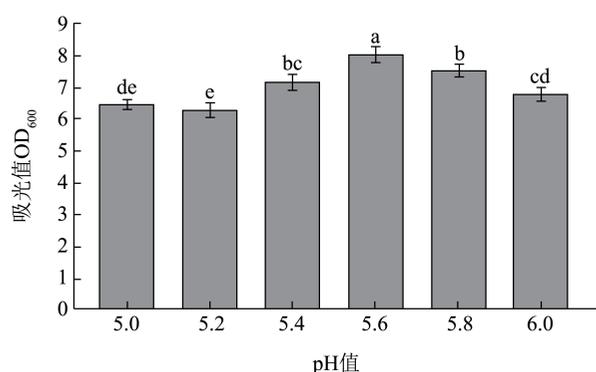
Fig.6 Light absorption value OD₆₀₀ of *Lactiplantibacillus plantarum* J26 at different inoculations

2.5 温度的确定

由图7可知，最佳培养温度为33℃，此时菌体生长繁殖快，发酵温度过低会影响菌体自身酶的活性^[27]，温度过高会使细胞内蛋白质变性，温度过高和过低会导致菌体生长发育迟缓。

2.6 最适pH值的确定

菌株高密度发酵过程中pH值对菌液活菌数存活有一定的影响，适宜的pH值有利于菌体在发酵过程中保持较高活力^[28]。如图8所示，在pH值为5.6时，菌体冻干后存活因子最高，pH值过低时不利于菌体保持活力，当pH值高于5.6时，菌体存活因子下降，高于或低于最适pH值都不利于菌体的生长。所以最终选择初始pH值为5.6。

图7 植物乳植杆菌 J26 在不同温度下的吸光值 OD₆₀₀Fig.7 Light absorption OD₆₀₀ of *Lactiplantibacillus plantarum* J26 at different temperatures图8 植物乳植杆菌 J26 在不同 pH 值下的吸光值 OD₆₀₀Fig.8 Light absorption OD₆₀₀ of *Lactiplantibacillus plantarum* J26 at different pH values

2.7 最佳发酵条件下植物乳植杆菌J26活菌数测定

利用单因素实验确定菌株的最优发酵条件为：培养基初始 pH 值为 5.6，发酵温度为 33 °C，接种量为 4%。在此条件下，植物乳植杆菌 J26 发酵 14 h 到达稳定期，活菌数可达到 4.35×10^{10} CFU/mL。

2.8 发酵豆乳

2.8.1 豆乳发酵过程中的pH值与酸度值变化情况

由图 9a 可知，三种发酵剂在发酵豆乳过程中 pH 值的变化，可知植物乳植杆菌 J26 作为发酵剂可最快达到发酵终点，植物乳植杆菌 J26 在豆乳中的产酸速度为最快，发酵 10 h 的 pH 值能达到 4.35，市售发酵剂为产酸最慢，pH 值为 4.79，而复合发酵剂 pH 值为 4.59。图 9b 为三种发酵剂在发酵豆乳过程中酸度的变化，在发酵结束时 pH 值在 4.35 左右，植物乳植杆菌 J26 发酵剂滴定酸度最高 83.98 °T，市售发酵剂滴定酸度最高 62.67 °T，复合发酵剂滴定酸度最高 70.35 °T，综上所述，植物乳

植杆菌 J26 作为发酵剂，发酵速率较优于其余两组发酵，可证明其有良好的发酵性能。

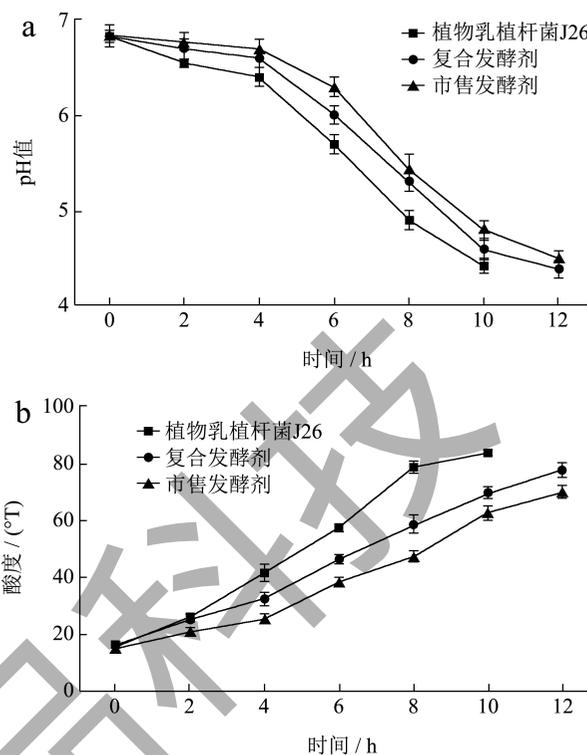


图9 植物乳植杆菌 J26、复合发酵剂与市售发酵剂发酵后 pH 值及酸度的变化

Fig.9 Changes in pH and acidity after fermentation of *Lactiplantibacillus plantarum* J26, compound fermenters and commercially available fermenters

2.8.2 豆乳发酵过程中活菌数的变化

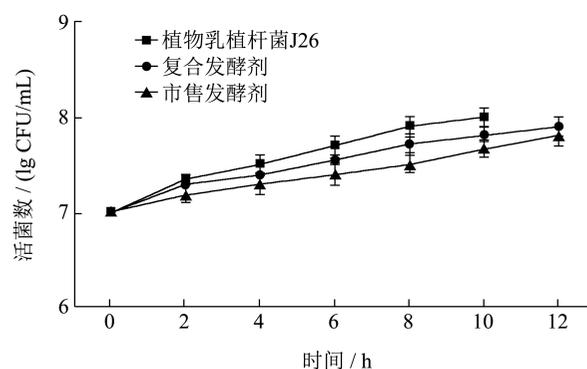


图10 植物乳植杆菌 J26、复合发酵剂与市售发酵剂发酵过程中活菌数随时间的变化

Fig.10 Changes of viable bacteria count with time in the fermentation process of *Lactiplantibacillus plantarum* J26, compound starter and commercial starter

发酵终点活菌数结果证明，由图 10 可知，与其他组合相比，植物乳植杆菌 J26 发酵时生长较好，发酵终点的活菌数为 3.56×10^8 CFU/mL。其

他两组在发酵终点时的活菌数均低于植物乳植杆菌 J26，其中复合发酵剂组生长较快，活菌数达 1.23×10^8 CFU/mL，市售发酵剂活菌数为 1.01×10^8 CFU/mL。活性益生菌数量是发酵乳功能的关键因素，对于乳制品行业来说，提高最终产品中活菌的数量非常重要^[29]。因此，植物乳植杆菌 J26 更适合发酵豆乳。

2.8.3 豆乳发酵过程中持水力的变化

持水力是发酵乳的重要理化指标之一，由图 11 可知，发酵过程中植物乳植杆菌 J26 持水性较高，可达 48.12%，与其他两组相比具有显著变化。这可能与豆乳在发酵过程中 pH 值、粘度、活菌数变化有关^[30]。研究发现，当在牛奶中添加 0.5% 的明胶时，可以显著提升酸奶的持水力^[31]。发酵豆乳持水性与其组织状态呈正相关，可以防止乳清析出，有利于产品贮藏及风味保留^[32]。

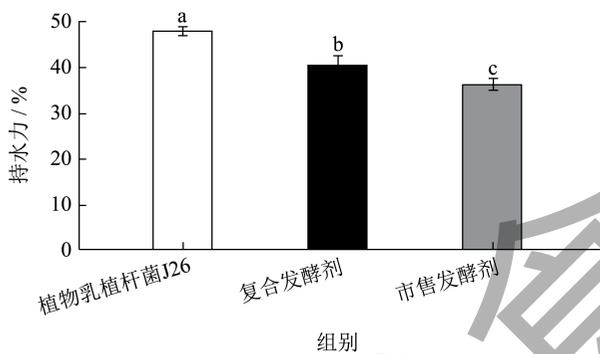


图 11 植物乳植杆菌 J26、复合发酵剂与市售发酵剂发酵终点持水力变化

Fig.11 *Lactiplantibacillus plantarum* J26, compound fermenters and commercially available fermenters fermentation endpoint water holding capacity change

2.8.4 豆乳发酵过程中质构的变化

表 3 植物乳植杆菌 J26、复合发酵剂与市售发酵剂发酵后质地特性值

Table 3 Texture characteristics of *Lactiplantibacillus plantarum* J26, compound starter and commercial starter after fermentation

发酵剂种类	硬度/g	稠度/(g/s)	粘度指数/(g/s)
植物乳植杆菌 J26	18.67 ± 0.32^a	530.22 ± 3.03^a	13.89 ± 0.33^a
复合发酵剂	16.04 ± 0.22^b	520.78 ± 3.78^b	11.12 ± 0.29^b
市售发酵剂	14.12 ± 0.10^c	510.69 ± 4.99^c	10.49 ± 0.19^c

注：不同字母间表示不同组间具有显著性差异， $P < 0.05$ 。

不同发酵剂制备豆乳的质构参数如表 3 所示，

结果表明，发酵豆乳的硬度、稠度、粘度指数均显著高于两组发酵豆乳 ($P < 0.05$)，然而，研究表明乳酸菌在豆乳中生长代谢时，蛋白质水解增加，酸度较高导致乳清析出，可能导致粘度降低^[33]，但植物乳植杆菌 J26 发酵豆乳未出现乳清析出，说明植物乳植杆菌 J26 可发酵具有良好质构特性的豆乳，有助于稳定豆乳的结构。

3 结论

本文通过优化不同碳氮源、pH 值、温度、接种量获得了植物乳植杆菌 J26 的高密度发酵工艺，最终确定以添加量为 25 g/L 的葡萄糖与麦芽糖 (1:1) 及 10 g/L 的牛肉膏与酵母粉 (1:1) 混合代替为培养基中碳源及氮源，利用单因素实验确定菌株的最优发酵条件为：培养基初始 pH 值为 5.6，发酵温度为 33 °C，接种量为 4%。在此条件下，植物乳植杆菌 J26 发酵 14 h 到达稳定期，活菌数可达到 4.35×10^{10} CFU/mL。同时，利用此条件下得到的发酵剂进行发酵豆乳，通过与市售发酵剂相比，植物乳植杆菌 J26 发酵剂可以获得具有良好活菌数、持水性和质构特性的发酵豆乳，对未来用于发酵乳制品具有研究意义。

参考文献

- [1] FENG L L, ZHANG D, XUN Y P, et al. Research progress on functionality and industrial application of *Lactobacillus plantarum* [J]. China Dairy Industry, 2018, 46(3): 35.
- [2] PENG Z R, LIU X M, NI X Q, et al. Effect of *Lactobacillus plantarum* F1208 on gastrointestinal functions in constipated rats [J]. Food Science, 2013, 34(13): 243-246.
- [3] WEI Y, ZENG X Q, PAN D D, et al. Effects of stachyose-*Lactobacillus plantarum* synbiotics on immune function in mice [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14(1): 14-19.
- [4] GAN Y, CHEN X F, YI R K, et al. Antioxidative and anti-inflammatory effects of *Lactobacillus plantarum* ZS62 on alcohol-induced subacute hepatic damage [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2021, 2021: 7337988.
- [5] 金玉洁. 乳酸菌高密度培养及其对人参皂苷的发酵转化[D]. 杭州: 浙江大学, 2022.
- [6] 刘敏敏, 席茂盛, 李中媛, 等. 植物乳杆菌 CGMCC8198 冻干菌粉的制备工艺优化[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(21): 9-14.
- [7] WEI D P, YE J R, LIANG M J, et al. Spray drying processes of *Bacillus valeriana* YH-18 [J]. Journal of

- Nanjing Forestry University Natural Sciences Edition, 2020, 44(5): 209-214.
- [8] 叶春苗.喷雾干燥技术及其在食品加工中的应用[J].农产品加工,2017,4:63-64.
- [9] 马振兴.嗜酸乳杆菌冻干菌粉的制备及应用研究[D].西安:陕西科技大学,2013.
- [10] 田良玉.乳酸菌高密度规模发酵工艺优化[D].扬州:扬州大学,2018.
- [11] 任海东,李兴飞,成吕睿,等.酸奶发酵剂中菌株分离重组及其在豆乳中的发酵特性[J].食品与发酵工业,2021,47(21):24-31.
- [12] WEI G Q, WANG X F, CHEN Y, et al. Screening and characterizing strains for direct vat set fermentation [J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(1): 184-190.
- [13] 沈建华.基于植物乳杆菌的发酵豆乳制品研究[J].食品工业,2017,38(7):216-218.
- [14] GAN R Y, SHAH N P, WANG M F, et al. *Lactobacillus plantarum* WCFS1 fermentation differentially affects antioxidant capacity and polyphenol content in mung bean (*Vigna radiata*) and soya bean (glycine max) milks [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2017, 41(1): e12944.
- [15] 闫天文,满朝新,刘泳麟,等.一株植物乳杆菌高密度培养的研究[J].中国乳品工业,2014,42(4):33-37.
- [16] 刘利利,周勇,卢宗梅,等.植物乳酸菌高密度发酵培养基优化[J].当代化工,2020,49(4):616-619.
- [17] XIONG T, HUANG J Q, SONG S H, et al. *Lactobacillus plantarum*: Optimization of fermentation medium and investigation of high-density culture methods [J]. Food Science, 2011, 32(7): 262-268.
- [18] WANG Y H, QIAN L, DONG F H, et al. Comparative research on the detection of viable organism preparation of bacillus licheniformis between flow cytometry and plate counting method [J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2018, 35(3): 352-356.
- [19] 宫俊峰,张国柱,赵玉明,等.植物乳杆菌真空冷冻干燥工艺的优化[J].食品工业,2022,43(9):71-74.
- [20] 郭谦.植物乳杆菌的固定化及其在酸乳发酵中的应用研究[D].杭州:浙江工商大学, 2018.
- [21] 朱亚军.豆酸奶适制性菌株的筛选及发酵剂的研制[D].广州:华南农业大学,2018.
- [22] 董世荣,李欣,张晨,等.发酵条件对胶原蛋白肽酸奶质构特性的影响[J].中国乳品工业,2019,47(12):14-8,24.
- [23] SCHWAB C, VOGEL R, GANZLE M G. Influence of oligosaccharides on the viability and membrane properties of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 during freeze-drying [J]. Cryobiology, 2007, 55(2): 108-114.
- [24] 张国柱,宫俊峰,赵玉明,等.植物乳杆菌高密度发酵[J].食品工业,2022,43(10):144-147.
- [25] 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.
- [26] 乔香君,吴影,赵丽娜,等.解淀粉芽孢杆菌BA118高密度发酵工艺研究[J].农产品加工,2022,11:51-57.
- [27] 葛宗昌,孟宪刚.西北酸菜直投式发酵剂菌株高密度培养的研究[J].安徽农业科学,2012,40(27):13566-13569.
- [28] MOON C, JANG S, YUN Y M, et al. Effect of the accuracy of pH control on hydrogen fermentation [J]. Bioresource Technology, 2015, 179: 595-601.
- [29] LIU C G, YI W Z, ZHOU H. Optimization of fermentation conditions of milk with blend probiotic strains based on high viable count [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2013, 29(13): 286-296.
- [30] 雷勇刚,李理.烘烤大豆制备发酵豆乳流变学特性的研究[J].食品工业科技,2012, 33(14):124-127,131.
- [31] 胡文娥,林士强.食用明胶对凝固型酸奶质量的影响探究[J].佛山科学技术学院学报(自然科学版),2015,33(6): 22-25.
- [32] 黄玉军,周帆,于俊娟,等.高转化大豆异黄酮乳酸菌的筛选及在豆乳中的发酵特性[J].食品研究与开发,2021,42(3):157-162.
- [33] CUI L, CHANG S K C, NANNAPANENI R. Comparative studies on the effect of probiotic additions on the physicochemical and microbiological properties of yoghurt made from soymilk and cow's milk during refrigeration storage (R2) [J]. Food Control, 2021, 119: 107474.