培养基 pH 调控法高密度发酵唾液乳杆菌 XH4B 研究

杜新永，高世阳，刘同杰，林永华，何国庆

（浙江大学生物系统工程与食品科学学院，浙江省食品微生物技术重点实验室，浙江杭州 310058）

摘要：本研究以 MRS 培养基为基础，通过优化碳、氮源及无机盐的配方和用量，再结合补料发酵，最终实现唾液乳杆菌 XH4B 高密度培养的目的。以乳酸菌的生物量为指标，同时考查发酵液 pH 值、乳酸含量等，最终确定酵母粉和蔗糖为最佳氮、碳源，同时增加乙酸钠用量至 2%、磷酸二氢钠 0.6%，可以对发酵液酸化时提供一定的缓冲作用。采用优化的 PY-Suc 培养基，唾液乳杆菌 XH4B 的生物量最高能达到 6.91 g/L，明显高于 MRS 培养基的 5.01~6.30 g/L（P<0.05）。等量补料培养并且采用 NaOH 中和发酵液 pH 值时，乳酸最高积累速度可以达到 5.958 g/(L·h，但是随着培养时间延长，积累速度迅速下降。发酵酸化较严重时（乳酸含量 9~10 g/L），唾液乳杆菌 XH4B 的生物量积累变缓。结论：优化 MRS 培养基，并加大乙酸钠、磷酸二氢钠等能够缓冲发酵液的无机盐用量，结合补料发酵，可以实现唾液乳杆菌 XH4B 的高密度培养。

关键词：唾液乳杆菌；α-半乳糖苷酶；高密度培养；乳酸含量；补料发酵

文章篇号：1673-9078(2014)5-196-201

High Cell Density Fermentation of *Lactobacillus salivarius* XH4B Via pH Adjustment

DU Xin-yong, GAO Shi-yang, LIU Tong-jie, LIN Yong-hua, HE Guo-qing

(Zhejiang Provincial Key Laboratory of Food Microbiology, Biosystem Engineering and Food Science of Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: Culture medium ingredients of nitrogen, carbohydrate and inorganic salts were optimized based on MRS for high cell density fermentation *of Lactobacillus salivarius* XH4B, including the adjustment of pH value as well as culture medium fed-batch. According to the biomass of *L. salivarius* XH4B, the best nitrogen and carbon sources were yeast extract and sucrose, respectively. Addition of sodium acetate (2%) and monosodium orthophosphate (0.6%) provided buffer effect for the pH value during incubation, these salts also contributed to LAB growth. By using the optimized PY-Suc culture medium, the biomass of *L. salivarius* XH4B reached 6.36~6.91 g/L, higher than that in MRS culture medium which was 5.01~6.30 g/L ($P < 0.05$). When lactic acid concentration exceeded 10 g/L, the accumulation of biomass ceased which meant the acid inhibited *L. salivarius* XH4B growth. Therefore, the optimization of MRS culture medium with sodium acetate and monosodium orthophosphate could buffer the pH value of culture medium, and new culture medium combined with fed-batch fermentation resulted in high cell density of *L. salivarius* XH4B.

Key words: *Lactobacillus salivarius*; α-galactosidase; high cell density; lactic acid; fed-batch fermentation

在乳酸菌培养中，当乳酸含量超过 35 g/L 的浓度之后，会对乳酸菌的生长产生严重的胁迫作用[1]。因此，在乳酸菌发酵中，通过调控培养基的 pH 值，能够有效地促进乳酸菌的生长。Acuna 等培养嗜热链球菌（*Streptococcus thermophilus*）和德氏乳杆菌（*Lactobacillus delbrueckii*）时，通过在线检测乳酸、乳糖、半乳糖与生物量之间的线性关系，确定 NaOH 添加量，调节发酵液 pH 值，能够较为准确地（误差范围 10.8~12.6%）预测两种乳酸菌的生物量[2]。Adamberg 等采用 pH auxostat（电脑控制的发酵液 pH 稳定装置）培养嗜热链球菌（*S.thermophilus*）与保加利亚乳杆菌（*L.bulgaricus*），生长速度获得了较大的提高[3]。

然而，单纯的 pH 调节很难实现乳酸菌的高密度培养，因为阻遏乳酸生长的代谢废物并不仅限于乳酸（或醋酸），因而控制 pH 值的变化仅能部分地减缓这种抑制[1]。为了有效解除代谢废物的生长抑制，在乳酸菌高密度培养时，一般采用补料[4]、增加膜过滤装

收稿日期：2013-11-28

基金项目：国家自然科学基金项目（31130042）；“十二五”国家科技支撑计划项目（2012BAD37B01）

作者简介：杜新永（1973-），男，博士研究生，研究方向：乳酸菌应用

通讯作者：何国庆（1957-），男，博士，教授，研究方向：食品微生物，功能食品

置[5]、细胞固定化[6]，或者诱导生物膜的方法[7]，来稀释或减缓代谢废物对乳酸菌生长的抑制，提高乳酸菌生物量或者代谢产物的生产效率[8]，达到乳酸菌高密度培养的标准（菌落总数 $10^{9\sim10}$ cfu/mL 以上）[9]。比较批次、连续补料、批次补料三种乳酸菌生产模式，Aguirre-Ezkauriatza 等通过发酵干酪乳杆菌（*L.casei*），认为批次补料能够更好地平衡营养供应，并且对于抑制乳酸菌生长的代谢废物有着更好的稀释效果[4]。Lee 等在长双歧杆菌（*Bifidobacterium longum*）的培养过程中，采用于双向过滤装置（cross-flow filtration system），用来去除抑制乳酸菌生长的代谢废物，证明比起单纯的 pH 控制的批次培养，乳酸菌的生物量有着极大的提高[10]。

相对而言，培养基的优化在实现乳酸菌高密度培养过程中，也是一种经济、有效的方式。靳志强等通过优化培养基中牛肉膏、柠檬酸铵、酵母粉等氮源的用量，实现了德氏乳杆菌（*Lactobacillus delbeueckii*）保加利亚种 S-1 的高密度培养，最大菌落总数达到了 10^9 cfu/mL[11]。本研究用到的唾液乳杆菌（*L.salivarius*）XH4B 是具有较高的 α-半乳糖苷酶活力的益生乳酸菌，能够有效降解豆粕等农作物下脚料中的 α-半乳糖苷类寡糖，能够用作益生菌制剂添加到饲料中，或者用作发酵剂生产发酵豆乳。本研究通过优化培养基碳、氮源的组成，以及无机盐组分对乳酸菌培养过程中的酸化进行控制，并且，通过检测乳酸及醋酸的量对乳酸菌生物量积累的影响，结合补料发酵，实现了唾液乳杆菌（*L.salivarius*）XH4B（GeneBank 索引号：JX125456；由本实验室自行筛选、具有较高 α-半乳糖苷酶活力的益生乳酸菌）高密度培养的目的。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

唾液乳杆菌（*L.salivarius*）XH4B：本实验室保存。

采用 MRS 作为基础培养基：蛋白胨 1%，牛肉膏 1%，酵母粉 0.5%，柠檬酸二铵 $(NH_4)_2HC_6H_5O_7$ 0.2%，葡萄糖 2%，吐温 80 1.0 mL，乙酸钠 $CH_3COONa\cdot3H_2O$ 0.5%，$MgSO_4\cdot7H_2O$ 0.58%，$MnSO_4\cdot4H_2O$ 0.25% (pH 6.2~6.6)。

主要试剂：培养基所用酪蛋白胨、胰蛋白胨、酵母粉为 Oxid 公司产品，p-nitrophenyl、pNPG (p-nitrophenyl-α-D-galactopyranoside)、棉子糖（Raffinose）、水苏糖（Stachyose）均为 Sigma 公司产品，实验所用其余试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器设备

厌氧培养箱，YQX-II 型，上海青苗；超净工作台，JB-HS-1300，江苏苏州佳宝；高压灭菌锅，立式 MLS-3750，三洋（SANYO）；高速冷冻离心机，Eppendorf5417R，德国；高压液相色谱（HPLC），LC2010，岛津（Shimadzu）；高压液相色谱（HPLC）：1200，美国安捷伦（Agilent，USA）。

1.3 实验方法

1.3.1 培养基的优化

以 MRS 为基础培养基，37 ℃厌氧培养 3 d 后，以生物量为考察目标，分别对氮源、碳源、无机盐进行了优化。

氮源选用了 7 种：酵母粉、鱼粉蛋白胨、细菌酶蛋白胨、蛋白胨、胰蛋白胨、牛肉浸膏、豆粕浸液，将 MRS 配方中的酵母粉、牛肉膏、蛋白胨、柠檬酸二铵全部用上述氮源替换，用量分别为 1%、2%、3% 三个浓度，并且用氮源转化率来综合评判唾液乳杆菌 XH4B 对不同氮源的偏好性：

$$\text{氮源化率}/\% = \text{生物量}/\text{氮源添加量}\times100\% \quad (1)$$

碳源选择了 9 种：葡萄糖、半乳糖、α-乳糖、蔗糖、木糖、棉子糖、水苏糖、可溶性淀粉、瓜尔豆胶。上述碳源总用量为 2%，替换 MRS 培养基中的葡萄糖。

无机盐主要加大了乙酸钠、柠檬酸二铵的用量，提高到 2.5%，改良配方中，两者仅用一种。另外，还选用了能够在酸溶液中形成缓冲体系的柠檬酸钠、磷酸氢二钠盐，与 MRS 培养基相比，观察 pH 变化及生物量的积累情况。

1.3.2 pH 值、生物量的测量

pH 值的测定直接用带有玻璃探头的 pH 计来测定。

生物量的计算则是取 50 mL 充分振荡均匀的发酵液，经 10000 g 离心 10 min 后，冻干或者 80 ℃烘干至少 36 h，称量至恒重后，再计算出生物量。

1.3.3 乳酸及醋酸含量的测定

收集培养 4~48 h 的发酵液，12000 g 离心 20 min 后去除沉淀。上样前先用 0.22 μm 水相滤纸进行过滤，稀释 10 倍后备用。检测柱为 Waters 6.5×30 mm C18 柱，流动相 A 相为 97%的 0.01 mol/L KH_2PO_4 (pH3.5) 的缓冲液，B 相为 3%甲醇溶液。流速 0.8 mL/min，检测波长 237 nm，检测时长为 10 min。

乳酸及醋酸浓度计算的标准方程：

乳酸浓度的标准方程（R^2=0.9931）：

$$Y=0.0253x+213.42 \quad (2)$$

醋酸浓度的标准方程（R^2=0.9917）：

$$Y=0.0389x-140.83 \quad (3)$$

注：上述方程中，“x”代指峰面积（5.7 min 和 6.4 min），“Y”指的是乳酸（或醋酸）的浓度（mg/mL）。

1.3.4 唾液乳杆菌 XH4B 生长参数计算

生物量（g/L）和乳酸（g/L）的积累速率用来表示乳酸菌的生长速度，其中，生物量的积累速率（r_B=d[X]dt）以干细胞的质量为参数，而乳酸的积累速率（r_L=d[S_L]/dt）则以发酵液中乳酸的总质量为参数进行计算。计算公式如下：

生物量积累速率：

$$r_B=d[X]dt \quad (4)$$

乳酸积累速率：

$$r_L=d[S_L]/dt \quad (5)$$

注：上述方程中“r_B”或“r_L”代指速率，g/(L·h)；d[X]指生物量（干细胞质量积累的量），(g/L)；d[S_L]指乳酸的浓度(g/L)，“t”代指培养时间，（h）。

1.4 数据处理与统计分析

数据处理采用 Microsoft Excel 2010，图表的绘制采用 Sigmaplot 10.0 以及 Excel 2010。三维矩阵关系图的绘制采用 OriginPro 8.5。统计学分析及相关性计算采用 SPSS 13.0，显著性差异的分析选择 Turkey 法，alpha=0.05。

2 结果与分析

2.1 培养基碳、氮源优化

2.1.1 氮源优化效果

从图 1 可以看出，不同的氮源对于生物量的积累的有着显著的影响。氮源用量为 1%、2%、3%时，7 种氮源的培养基生物量分别为 2.03 g/L、2.81 g/L、3.44 g/L，差异十分显著（P<0.01），可以看出氮源的用量对于生物量的积累起到至关重要的作用，增大氮源的用量，能够有效地提高乳酸菌的生物量。7 种氮源的平均生物量为 3.12 g/L，高于该数值的氮源有酵母粉（4.38 g/L）、细菌酶蛋白胨（3.53 g/L）、蛋白胨（3.56 g/L）、豆粕浸液（3.27 g/L）。

另外，随着氮源用量的增加，生物量增加最为显著的是酵母粉，呈现出明显的梯度。以 3%氮源的生物量为基准，考察 1%和 2%氮源的生物量，酵母粉的增量分别是 241.1%和 153.3%；细菌蛋白胨为 259.2%和 117.3%；蛋白胨则是 155.6%和 157.3%。

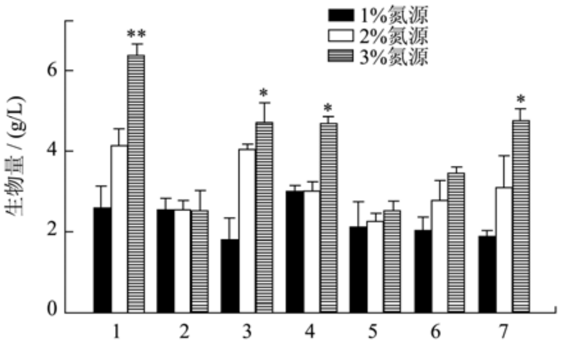

图 1 不同氮源对唾液乳杆菌 XH4B 生长促进作用

Fig.1 Biomass yield of *L.salivasrius*XH4B with different nitrogen sources

注：横坐标所示氮源分别是（1~7）：酵母粉、鱼粉蛋白胨、细菌酶蛋白胨、蛋白胨、胰蛋白胨、牛肉浸膏、豆粕浸液；培养基中碳源的用量分别是 10~30%。（**）表示极显著差异（P<0.01），（*）表示显著差异（P<0.05）。

表 1 不同氮源培养唾液乳杆菌 XH4B 生物转化率（%）

Table 1 Conversion percent of *L. salivarius* XH4B biomass with various nitrogen sources

氮源		酵母粉	鱼粉蛋白胨	细菌酶蛋白胨	蛋白胨	胰蛋白胨	牛肉浸膏	豆粕浸液
用量	1%	26.33±0.23*	25.60±0.23*	18.25±0.23	30.13±0.23*	21.30±0.23*	20.28±0.23*	19.07±0.23
	2%	20.72±0.23	12.72±0.23	20.16±0.23	14.90±0.23	11.21±0.23	14.03±0.23	15.56±0.23
	3%	21.17±0.23	8.44±0.23	15.77±0.23	15.63±0.23	8.40±0.23	11.47±0.23	15.99±0.23

注：数值表示方法为：均值±方差；（*）表示显著性差异（P<0.05）。

以发酵结束时的菌体的生物量与培养基中氮源添加量的比率（方程 1）来比较唾液乳杆菌 XH4B 对不同氮源的偏好性，实验结果见表 1。从表 1 中可以看出，生物量转化率最高的氮源为蛋白胨，1%用量时达到 30.13%，其他如酵母粉、鱼粉蛋白胨、胰蛋白胨均超过了 20%，而细菌酶蛋白胨、豆粕浸液转化率较低，仅有 18.25~19.07%。与图 1 的分析结果相同，随着氮源用量的增加，仅有酵母粉在生物量转化率上维持到 20%以上，其他氮源的生物量转化率迅速降低，当氮源用量达到 3%时，鱼粉蛋白胨、胰蛋白胨的生物量转化率甚至于<10%。

综上所述，在设定优化培养基时，应该首先增加酵母粉的用量，适当增加蛋白胨（或细菌蛋白胨）的用量。

现代食品科技

2.1.2 碳源优化效果

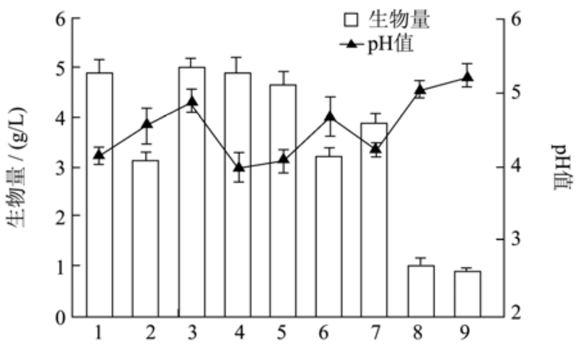

图 2 不同碳源对唾液乳杆菌 XH4B 生长及 pH 值的影响

Fig.2 Biomass and pH value of *L.salivasrius*XH4B with different carbohydrates

注：横坐标所示碳源分别是（1~9）：葡萄糖、半乳糖、α-乳糖、蔗糖、木糖、棉子糖、水苏糖、可溶性淀粉、瓜尔豆胶。

唾液乳杆菌 XH4B 可以利用多种碳源产酸，也就是说，该菌种对于碳源的选择性不强，从图 2 可以看出，除了两种多糖：可溶性淀粉与瓜尔豆胶之外，其他 7 种单糖、双糖或寡糖都可以作为惟一碳源，进行唾液乳杆菌 XH4B 的培养。瓜尔豆胶是由 β-1, 4 吡喃甘露糖（β-1, 4-linked mannopyranosyl）单元和 α-1, 6 半乳糖苷甘露糖（α-1, 6-linked galactopyranosyl）单元组成的多糖。瓜尔豆胶中含有的 α-半乳糖苷，能够有效诱导黑曲霉、米曲霉等丝状真菌产生 α-半乳糖苷酶[13]。但是，唾液乳杆菌 XH4B 虽有 α-半乳糖苷酶活性，却缺乏其他的水解酶系，不能利用瓜尔豆胶，以此作为惟一碳源时，菌体不能正常生长。

除去可溶性淀粉与瓜尔豆胶，其他 7 种碳源的平均生物量为 4.24 g/L，高于此均值的碳源分别是乳糖（5.01 g/L）、葡萄糖（4.91 g/L）、蔗糖（4.89 g/L）、麦芽糖（4.67 g/L）。但是统计学分析的结果，各种碳源之间的生物量差异不显著（P>0.05）。

在批次发酵的过程中，pH 值的变化也可以用来反映乳酸菌对于该碳源的利用效率。初始培养基的 pH 值为 6.80 左右，经过 3 d 的培养，菌体不能正常生长的可溶性淀粉与瓜尔豆胶的发酵液 pH 值为 5.03 和 5.23，而其他培养基的 pH 值平均为 4.37。其中，pH 值最低的为蔗糖（3.99），其次为麦芽糖（4.08）和葡萄糖（4.15）。

2.1.3 无机盐对发酵液 pH 调控效果

接种唾液乳杆菌 XH4B 之后，随着菌体的旺盛生长，发酵液迅速酸化。从图 3 可以看出，MRS 基础培养基培养 24 h 后 pH 值由初始的 6.86 下降到 4.76，继续培养至 48 h 后，pH 值降至 3.54。而几种具有缓冲作用的无机盐，均可以在一定程度上减缓发酵液的酸化速率，而柠檬酸铵除了可以用作无机氮源之外，NH_4^+也能直到中和发酵液 pH 值的作用，因此，该组发酵液 pH 值下降最慢。但是，过多的无机氮源会对乳酸菌的生长产生毒害作用，因此，该样品中乳酸菌生长势量差，柠檬酸二铵的用量不能过多。

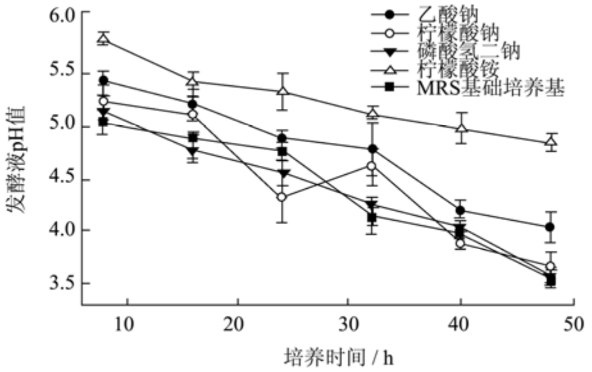

图 3 不同盐类缓冲发酵液 pH 效果

Fig.3 pH buffering by different salts

具有较好的 pH 值缓冲作用，同时也不会对唾液乳杆菌 XH4B 生长造成影响的无机盐是乙酸钠、柠檬酸钠及磷酸氢二钠，在 48 h 培养过程中，三种无机盐的平均 pH 值分别是 4.73、4.48、4.43，乙酸钠对于发酵液 pH 值的缓冲效果最好，显著优于其他两种无机盐和 MRS 基础培养基（P<0.05）。

2.2 不同碳源产酸性（乳酸、醋酸）

利用碳源充分产酸是考察发酵能力的重要指标之一，利用葡萄糖、蔗糖、乳糖、棉子糖、水苏糖作用碳源，唾液乳杆菌 XH4B 乳酸和醋酸的平均产量分别为 7.90 mg/mL 和 5.56 mg/mL。以葡萄糖为碳源时，经过 36 h 的发酵，可以得乳酸的最高产量 10.45 mg/mL，产量最低的则是棉子糖，经过 4 h 发酵，乳酸的产量仅为 5.59 mg/mL。至于醋酸的产得一，最高值 7.84 mg/mL 和最低值 3.65 mg/mL 分别是葡萄糖（24 h）和水苏糖（8 h）作为碳源时获得的。以乳酸为产酸量考察指标，葡萄糖为最佳碳源，显著优于其他碳源（P<0.01），而棉子糖则是相对产乳酸能力最弱的（P<0.01）。以醋酸为考察指标时，葡萄糖依旧是最佳碳源（P<0.05），水苏糖和棉子糖产醋酸能力较弱（P<0.05）。总体来说，发酵产酸能力最强的为葡萄糖（P<0.01），其次为蔗糖和乳糖（P<0.05）。

为了调控发酵液 pH 值，防止培养液过快酸化阻遏唾液乳杆菌 XH4B 的生长，碳源的选择应该避免葡萄糖，再结合图 2 不同碳源对生物量积累的作用，最终确定蔗糖为最佳碳源。

结合上述讨论，MRS 培养基改良为 PY-Suc 培养基，配方如下：PY（蛋白胨 0.5%，胰蛋白胨 0.5%，

酵母粉 1%）为氮源，2%蔗糖为碳源，无机盐为无水乙酸钠 2%，KH_2PO_4 0.6%，$MgSO_4·7H_2O$ 0.6%，$MnSO_4·4H_2O$ 0.2%）60%（最终培养基 pH 6.5~6.8）。

表 2 不同碳源乳酸及醋酸产量（mg/mL）

Table 2 Production of lactic and acetic acid fermented by various carbohydrates

时间/h	葡萄糖		蔗糖		乳糖		棉子糖		水苏糖	
	LA	AA	LA	AA	LA	AA	LA	AA	LA	AA
4	8.27±0.20	6.09±0.05	7.76±0.09	4.63±0.01	7.07±0.08	4.95±0.12	5.59±0.13	5.77±0.04	6.49±0.06	3.85±0.09
8	10.01±0.04	6.51±0.16	7.16±0.17	4.55±0.10	6.73±0.06	4.06±0.10	6.69±0.16	4.95±0.22	6.89±0.17	3.65±0.09
12	10.34±0.12	6.13±0.25	7.50±0.08	5.24±0.23	7.17±0.27	6.71±0.26	6.16±0.05	4.98±0.02	6.87±0.26	4.46±0.11
24	9.12±0.02	7.84±0.09	7.91±0.29	5.60±0.13	7.48±0.08	6.83±0.06	6.74±0.06	6.24±0.15	7.21±0.07	4.67±0.11
36	10.45±0.25	7.82±0.09	10.34±0.35	5.98±0.04	8.12±0.19	5.66±0.23	6.96±0.27	5.59±0.13	7.12±0.02	4.94±0.02
48	9.50±0.13	7.23±0.17	9.73±0.23	5.05±0.12	9.57±0.03	6.43±0.15	7.00±0.03	5.04±0.02	8.09±0.19	5.35±0.23

注：LA：乳酸(Lactic Acid)，AA：醋酸（Acetic Acid）；数据表示：均值±标准差。

2.3 高密度培养的结果

补料培养过程中，发酵液不断被稀释，在 4 d 的培养过程中，生物量为 6.36~6.91 g/L，平均为 6.72 g/L。而采用 MRS 基础培养基时，37 ℃厌氧培养 3 d 后，最高生物量可以达到 6.30 g/L（酵母粉，图 1）和 5.01 g/L（乳糖，图 2），而采用 PY-Suc 培养基以后，培养 24 h 后，生物量可以达到 6.86 g/L，明显高于 MRS 培养基（$P<0.05$）。

表 3 唾液乳杆菌 XH4B 在 pH 调控发酵时的参数

Table 3 *L.salivarius* XH4B growth kinetics during pH buffering fermentation

批次	pH 值	生物量/(g/L)	细胞生长率/[g/(L·h)]			乳酸产生率/[g/(L·h)]		
			均值	最高	最低	均值	最高	最低
1	5.45±0.33	6.86±0.09	0.294±0.041	0.603±0.064*	0.014±0.000	1.346±0.058	6.958±0.138*	0.155±0.022
2	5.02±0.30	6.91±0.21	0.089±0.024	0.207±0.015	0.010±0.000	0.678±0.024	1.751±0.099	0.000±0.000
3	4.93±0.03*	6.76±0.13	0.084±0.014	0.204±0.000	0.001±0.000	0.520±0.021	1.556±0.054	0.000±0.000
4	4.79±0.15*	6.36±0.35	0.087±0.000	0.220±0.040	0.000±0.000	0.394±0.095	0.781±0.024	0.000±0.000

注：初始培养基的量为 3 L，此后三次补料，每次 1 L；（*）表示显著性差异（$P<0.05$）；数据表示：均值±标准差。

因为没有发酵液的排出，所以，乳酸等抑制生长的因子在新鲜培养基加入时，可以有一定的程度稀释（表 3）。从 pH 值来看，初始时可以维持在 5.0 左右，但是随着培养时间的延长，最终也逐渐降低。乳酸虽然可以抑制乳酸菌的生长，同时也是发酵时的重要物质，从表 3 中可以看出，最高积累速度可以达到 5.958 g/(L·h)，但是随后积累速度迅速下降。鉴于此，菌体生物量的积累可以分成两个阶段，第一天生物量平均积累速度可达 0.294 g/(L·h)，而之后仅有 0.08 g/(L·h) 的平均积累速度，即仅有第一天的 1/3。

随着补料次数的增加到 3 次，生物量有所降低，也就是说，相对于批次生产，补数次数越多，生物量的积累效果越差。经过 4 次补料生产，得率低于一次性投料，而且时间耗费也长，这也说明单纯性 pH 调控对于实现乳酸菌高密度培养效果不是太好[1]。

2.4 乳酸、培养时间及生物量的交互关系

图 5 整合了唾液乳杆菌 XH4B 培养过程中乳酸含量、生物量及培养时间的变化，显示了三者之间的交互关系。

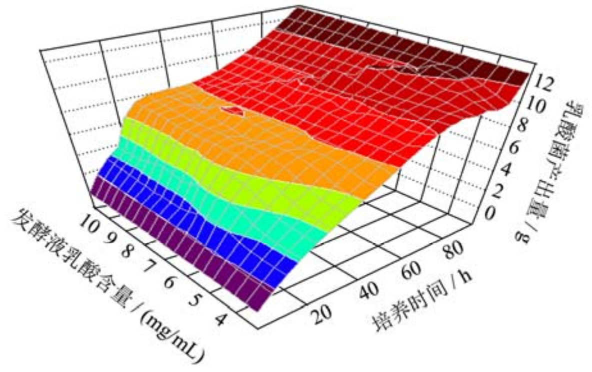

图 5 乳酸、培养时间及生物量交互关系图

Fig.5 Interaction of lactic acid, incubation time and biomass yield

随着培养时间的延长，乳酸积累到 9~10 g/L 的时候，唾液乳杆菌 XH4B 的生物量积累十分迅速。之后，乳酸浓度增加到 10 g/L 之后，生物量的积累出现停滞，说明有机酸已经对菌体的生长产生了抑制作用。补料

时，新的培养基会稀释已经酸化的培养液，引起生物量的再次快速积累（24 h、48 h、72 h）。第一次补料时（24 h），发酵液中的乳酸含量>10 g/L，而生物量的积累十分明显。但是在其他两次补料的时间点（48 h和 72 h），图 5 显示出的生物量增加则很不明显，说明随着乳酸量的增加，补料对于发酵液的稀释效果已经不明显，而代谢物对于菌体的生长抑制则变得显著起来。

3 结论

3.1 以生物量为考察指标时，对于唾液乳杆菌 XH4B 生长促进效果最好的氮源为酵母粉（4.38 g/L），其次细菌酶蛋白胨（3.53 g/L）和蛋白胨（3.56 g/L）。以生物量转化率为考察指标时，最好的氮源为蛋白胨，氮源用量为 1%时达到 30.13%，随着氮源用量的增加，酵母粉的生物量转化率上可以维持到 20%以上，其他氮源的生物量转化率迅速降低。以 3%氮源的生物量为基准，考察 1%和 2%氮源的生物量，酵母粉的增量分别是 241.1%和 153.3%。对于促进唾液乳杆菌 XH4B 生长较好的碳源分别是乳糖（5.01 g/L）、葡萄糖（4.91 g/L）、蔗糖（4.89 g/L）、麦芽糖（4.67 g/L）。对发酵液的酸化，各种单糖和寡糖的平均 pH 值为 4.37。其中，pH 值最低的为蔗糖（3.99），其次为麦芽糖（4.08）和葡萄糖（4.15）。

3.2 具有较好的 pH 值缓冲作用，同时也不会对唾液乳杆菌 XH4B 生长造成影响的无机盐是乙酸钠、柠檬酸钠及磷酸氢二钠，在 48 h 培养过程中，三种无机盐的平均 pH 值分别是 4.73、4.48、4.43，乙酸钠对于发酵液 pH 值的缓冲效果最好，显著优于其他两种无机盐和 MRS 基础培养基（$P<0.05$）。

3.3 以乳酸为产酸量考察指标，葡萄糖为最佳碳源，显著优于其他碳源($P<0.01$)，而棉子糖则是相对产乳酸能力最弱的($P<0.01$)。以醋酸为考察指标时，葡萄糖依旧是最佳碳源($P<0.05$)，水苏糖和棉子糖产醋酸能力较弱($P<0.05$)。总体来说，发酵产酸能力最强的为葡萄糖($P<0.01$)，其次为蔗糖和乳糖（$P<0.05$）。

3.4 采用 PY-Suc 培养基以后，培养 24 h 后，生物量可以达到 6.86 g/L，明显高于 MRS 培养基的 5.01~6.30 g/L（$P<0.05$）。等量补料培养并且采用 NaOH 中和发酵液 pH 值时，乳酸最高积累速度可以达到 5.958 g/L·h，但是随后积累速度迅速下降。随着培养时间的延长，乳酸>10 g/L 的时候，唾液乳杆菌 XH4B 的生物量积累变慢。补料时，新的培养基会稀释已经酸化的培养液，引起生物量的再次快速积累。

参考文献

[1] Schiraldi C, V Adduci, V Valli, et al. High cell density cultivation of probiotics and lactic acid production [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2003, 82(2): 213-22

[2] Acuna G, E Latrille, C Beal, et al. Online estimation of biological variables during pH controlled lactic-acid fermentations [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1994, 44(10): 1168-1176

[3] Adamberg K, S Kask, T M Laht, et al. The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study [J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 85(1-2): 171-183

[4] Aguirre-Ezkauriatza E J, J M Aguilar-Yanez, A Ramirez-Medrano, et al. Production of probiotic biomass (*Lactobacillus casei*) in goat milk whey: comparison of batch, continuous and fed-batch cultures [J]. Bioresource Technology, 2010, 101(8): 2837-44

[5] Sung I K, N S Han, and B S Kim. Co-production of biomass and metabolites by cell retention culture of *Leuconostoc citreum* [J]. Bioprocess Biosystem Engineering, 2012, 35(5): 715-720

[6] Westman J O, P Ylitervo, C J Franzen, et al. Effects of encapsulation of microorganisms on product formation during microbial fermentations [J]. Appllied Microbiololgy and Biotechnology, 2012, 96(6): 1441-1454

[7] Pongtharangkul T, A Demirci. Evaluation of culture medium for nisin production in a repeated-batch biofilm reactor [J]. Biotechnology Progress, 2006, 22(1): 217-224

[8] Medaglia G, G Valsesia, S Panke. Development of a high cell-density protocol for the production of pregallidermin, a non-toxic precursor of the lantibiotic gallidermin [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2010, 145(2): 176-185

[9] Yu W K, J Y Kim, K Y Lee, et al. High cell density cultivation of *Bifidobacterium longum* using a calcium carbonate-alginate beads system [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2002, 12(3): 444-448

[10] Lee M S, Y H Park. High cell density culture of Bifidobacterium longum by cross-flow filtration [J]. Agricultural Chemistry and Biotechnology, 1997, 40(1): 18-22

[11] 靳志强,郝林,李平兰,等.德氏乳杆菌保加利亚亚种高密度培养的研究初探[J].现代食品科技,2006,22(2):4-8
JIN Zhi-qiang, HAO Lin, LI Ping-lan, et al. The Preparatory study on high cell density culture of lactobacillus delbeueckii subsp.bulgaricus S-1 [J]. Modern Food and Technology, 2006, 22(2): 4-8

[12] Garro M S, G F de Valdez, G Oliver, et al. Influence of carbohydrates on the alpha-galactosidase activity of lactobacillus fermentum [J]. Current Microbiology, 1996, 33(5): 302-5

[13] Ferreira J G, A P Reis, V M Guimaraes, et al. Purification and characterization of aspergillus terreus alpha-galactosidases and their use for hydrolysis of soymilk oligosaccharides [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011, 164(7): 1111-1125

现代食品科技