

保加利亚乳杆菌分批发酵工艺研究

李艾黎, 都立辉, 霍贵成

(东北农业大学乳品科学教育部重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘 要: 研究得出保加利亚乳杆菌适宜的碳氮源分别为乳糖和牛肉膏, 适宜的碳氮比例为 6:1。在 10L 发酵罐水平上探明了新型培养基的增殖效果, 证实保加利亚乳杆菌在优化发酵培养基中 42℃ 培养 8h 后的活菌数达到 3.6×10^9 cfu/mL, 增殖效果是经 10% 脱脂乳培养后的 1.5 倍。同时发现, 当发酵液中乳酸盐浓度高于 37.2g/L 会抑制菌体生长, 亟待发展新技术来解决代谢产物遏制的难题。

关键词: 保加利亚乳杆菌, 分批发酵, 生长抑制物

Abstract: In this study, it's found that the optimum carbon sources and nitrogen sources for *L.bulgaricus* were lactose and beef extract respectively, the suitable ratio of carbon/nitrogen sources was C:N=6:1. The promoting effect of the optimum medium was investigated in 10L jar-fermentor, it proved that *L.b* obtained its maximum yield at 8 hours and viable counts reached 3.6×10^9 cfu/mL in the medium, which was as much as 1.5 times in 10% skim milk medium. At the same time, when the concentration of salt reached 37.2g/L, it would inhibit the growth of cells, so there is a need to develop new technology to solve such problem as soon as possible.

Key words: *L.bulgaricus*; batch-fermentation; growth-inhibiting substance

中图分类号: TS201.3 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2005)12-0057-03

德氏乳杆菌保加利亚亚种(*Lactobacillus delbreuckii* ssp. *Bulgaricus*)属于乳杆菌属的热细菌亚属, 或专性同型发酵菌群^[1]。作为重要的食品工业用菌株, 保加利亚乳杆菌的发酵培养密度直接影响各企业的生产, 但长期以来其在实际生产中所需的一些培养控制条件、技术指标往往是在低水平的三角瓶条件下获得, 缺乏对发酵过程的动力学解析, 无法在目的微生物的生理生化特性、营养供给及发酵设备三者之间建立起有机联系。这使得当反应器规

模发生变化时, 发酵结果常常不能重复。针对上述问题, 本研究利用 10L 搅拌发酵罐探究保加利亚乳杆菌的发酵过程动力学行为, 尝试将实验室成果向工业发酵规模过渡。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

保加利亚乳杆菌(*L.b*) 为东北农业大学畜产品加工研究所提供。

全自动机械搅拌发酵罐 上海国强生化工程设备有限公司 pH 计 梅特勒-托利多 Delta320; 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 碳氮源对乳酸菌生长的影响

1.2.1.1 碳氮源种类的影响 在 10% 脱脂乳中分别添加 1%(w/v) 碳源(葡萄糖、蔗糖、乳糖)或 0.5%(w/v) 氮源(大豆蛋白胨、酪蛋白胨、胰蛋白胨、牛肉膏) *L.b* 按 3%(w/v) 接种量 42℃ 培养 6h, 测定菌株活菌数的变化。

1.2.1.2 碳氮源比例的影响 适当调整 6% 乳清培养基中最适氮源的含量, 比较不同碳氮源比例 C/N(w/w)=1:1、2:1、4:1 和 6:1 对菌株生长的影响。

1.2.2 分批发酵培养 *L.b* 按 3% 接种于优化培养基, 流加 20%(v/v) 氨水恒定 pH6.0~6.2, 42℃ 培养菌体 16h 后放罐。培养期间每隔 2h 取发酵液样品, 测定活菌数和发酵活力并绘制生长曲线, 对照组为 12% 脱脂乳。

1.3 指标值测定方法

1.3.1 活菌数测定 保加利亚乳杆菌的分离与计数均采用 MRS 培养基^[2], 37℃ 培养 48h 后计算菌落数目。

1.3.2 发酵活力测定 取不同生长阶段的 3% 菌液接种于 10%(w/v) 的脱脂乳中, 42℃ 培养 3.5h 后在室温下测定发酵液 pH。

1.3.3 比生长速率测定 根据 $2^N = X_2/X_1$, 采用活菌

收稿日期: 2005-05-10

作者简介: 李艾黎(1978-), 女, 在读博士生, 研究方向: 食品发酵及乳品加工。

基金项目: 国家 863 计划“课题(2002AA24804)资助。

数作为比较指标,计算公式如下^[3]:

$$\ln X_t - \ln X_0 = \mu(t - t_0)$$

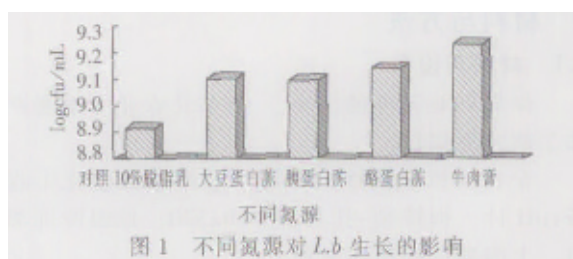
X_t 和 X_0 分别为时间 t 和开始时的细胞密度, μ 为比生长速率。

1.3.4 实验统计方法 实验数据重复测定 3 次 ($n=3$), 采用 SPSS11.0 软件中的 Student-Newman-Keuls test 进行多重比较, 最小差异显著水平为 95%。

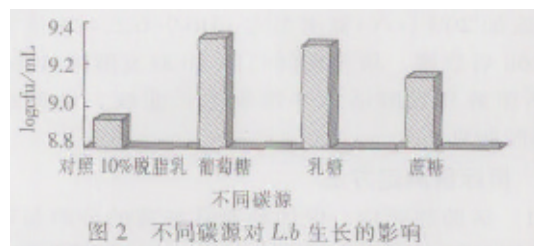
2 结果与讨论

2.1 碳氮源对保加利亚乳杆菌生长的影响

2.1.1 不同氮源的影响 如图 1 所示, 因乳酸菌的蛋白质分解能力有限, 其增殖速度快慢和培养基中蓄积的游离氨基酸和肽类等物质的含量密切相关^[4], 故 *L.b* 适宜的氮源主要是水解蛋白类物质, 特别是牛肉膏和酪蛋白胨 ($p<0.05$)。其中牛肉膏提供了大量多肽类、核苷酸类、有机酸类和高缓冲磷酸盐等水溶性营养物质, 而酪蛋白胨则富含氨基酸和维生素类, 尤其是 V_{B1} 的含量较高, 有助于从多方面满足菌体的营养要求^[5]。



2.1.2 不同碳源的影响 如图 2 所示, 蔗糖的增殖效果略低 ($p<0.05$), 这与乳酸菌缺乏分解淀粉等大分子碳水化合物的酶系有关^[6]。相对乳糖而言, *L.b* 更容易吸收和利用单糖——葡萄糖, 不过乳糖也极大地促进了 *L.b* 的增殖, 使得测定指标值显著高于参照组 10%脱脂乳 ($p<0.05$)。由于制备的乳酸菌发酵剂成品终需在牛乳中发酵乳糖进行生产, 所以确定工业用碳源为乳清粉或乳清浸出液; 另外, 因葡萄糖属于乳酸菌优先利用的快速碳源, 若含量过多易产生碳源分解代谢物阻遏作用(加速乳酸产生), 所以只考虑适量添加 0.1%~0.5%葡萄糖来促进乳酸菌增殖。



2.1.3 碳氮源比例的影响 兼性厌氧的乳酸菌除利用碳源作为碳架参与菌体合成和提供维持生命活动能源的作用外, 其主要作用为进行同型发酵转化成乳酸^[8], 是需要量最大的营养源, 添加比例往往远高于氮源。而生产中究竟使用多少浓度的碳源最为合

适, 可以按下列说明进行估算: 一般 *L.b* 耐受乳酸的最大量为 2%^[9], 理论上乳酸菌经同型发酵途径每消耗 1mol 葡萄糖会转化成 2mol 乳酸和 2mol ATP, 若产生 2%乳酸需要消耗约 2%葡萄糖, 而总糖消耗量应达到 3%~4%或略高才能满足 *L.b* 的营养要求。

由表 1 的数据统计结果可知, 当培养基中乳清粉(乳糖含量约为 50%)和牛肉膏比例约为 6:1 时 *L.b* 的活菌数值 ($p<0.05$) 和产酸性能都是最高的。本实验的测定值在理论值范围, 进一步说明了优选的碳氮源比例符合实际情况, 并初步确定优化培养基配方为 6%乳清+1%牛肉膏+0.5%酵母粉。

表 1 碳氮源比例对保加利亚乳杆菌生长的影响 ($\bar{X} \pm SE$)

碳氮源比例 C:N	产酸性能 pH	活菌数 (Log cfu/mL)	发酵活力 pH
6%乳清:6%牛肉膏	3.91	8.938 ^d	4.55
6%乳清:3%牛肉膏	3.65	9.041 ^c	4.45
6%乳清:2%牛肉膏	3.67	9.190 ^b	4.38
6%乳清:1%牛肉膏	3.63	9.224 ^a	4.42

注: a, b, c, d Student-Newman-Keuls test, $\alpha=0.05$ 。

2.2 保加利亚乳杆菌的分批发酵

在简单分批培养过程中, 除随时调节培养液的酸碱度外, 与外界没有其他物料交换, 这使得细胞浓度、基质浓度和菌体代谢产物的浓度均在不断发生变化^[10]。由此可推断分批发酵的优化控制能否实现, 取决于我们对发酵过程中菌体生长与底物消耗的动态平衡及内在规律是否有充分的认识, 从而对其进行有目的的控制。

2.2.1 细胞的生长特性 如图 3 所示, *L.b* 的生长代谢可明显分为四个阶段: 延滞期 (0~2h), 可以认为微生物在此阶段调整自身代谢的酶系以便适应新环境; 对数期 (4~8h), 此时优化培养基中营养丰富, 有害代谢产物少, *L.b* 在单位时间内的比生长速率达到 0.757/h, 高于在 12%脱脂乳培养基中的 0.685/h; 稳定期 (8~12h), 因细胞快速繁殖, 迅速消耗营养物质, 使得细胞数目和菌体发酵活力逐渐达到最高点, 此时 *L.b* 在优化培养基中的活菌数为 $3.6 \times 10^9 \sim 3.2 \times 10^9$ cfu/mL, 发酵活力为 pH4.3, 而在 12%脱脂乳培养基中的活菌数约为 $2.6 \times 10^9 \sim 2.4 \times 10^9$ cfu/mL, 菌体发酵活力 pH4.4; 衰亡期 (12~16h), 因生长环境开始恶化, 活细胞数量和发酵活力逐渐降低。

2.2.2 代谢产物的影响 如图 4 所示, 用于中和菌体代谢产物的氨水流加速率也间接反映出 *L.b* 的生长速率。在氨水消耗量高峰处, 细胞也出现了最大生长速率, 同时 *L.b* 的发酵活力也是最高的; 虽然 *L.b* 的乳酸盐耐受范围在 2.12~50.62g/L 之间, 一旦发酵液中的乳酸盐浓度超过了 37.2g/L (发酵 8h 时), 氨水流加速率明显开始减缓, 菌体细胞也逐渐进入生长稳定期。

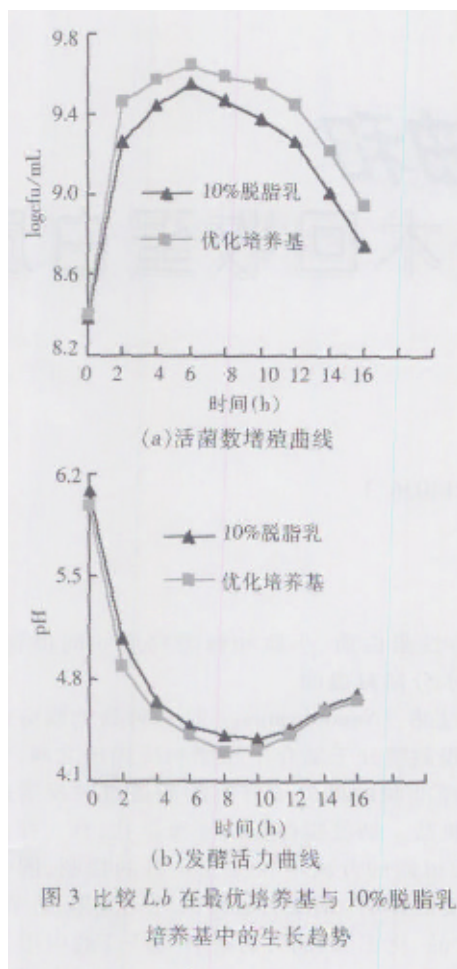


图3 比较 *Lb* 在最优培养基与 10%脱脂乳培养基中的生长趋势

3 结论

在了解微生物生理代谢特性的基础上, 控制其在生物反应器中的逐级放大与工艺优化, 仍是目前工业化发酵生产乳酸菌的重点和难点。由本实验结果可知, 随着发酵规模的扩大, 两个重要因素将影响产物生成量的高低: 营养物质消耗, 生长后期的菌种活力并没有明显降低, 只是培养基中一种或几种营养物质的消耗限制了菌体细胞进一步繁殖。若在培养后期通过补充新鲜的和充足的营养基质, 解除底物消耗的抑制可能会进一步增殖菌体; 代谢产物积累, 在发酵期间生产的乳酸盐随着发酵时间的推移,

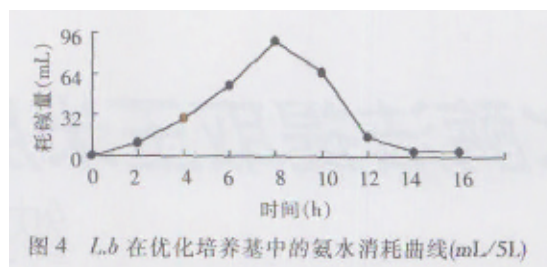


图4 *Lb* 在优化培养基中的氨水消耗曲线(mL/5L)

其含量不断增高, 对菌体的生长产生了严重干扰。如果能采用超滤或透析等方法来解除产物的反馈抑制作用, 细胞的对数生长期会得以延长。

综上所述, 若能突破乳酸菌高密度发酵生产这一瓶颈问题, 将为其广泛应用开创全新的领域, 并引领乳酸菌工业进入另一个崭新时代。

参考文献:

- [1] 杨洁彬. 乳酸菌-生物学基础及应用[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1999.10~15.
- [2] 凌代文. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1999.64~70.
- [3] Ralph Early 著. 乳制品生产技术[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2002.36~55.
- [4] Rajagopal S N, Sandine W E. Associative growth and proteolysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus* in skim milk[J]. J Dairy Sci, 1990,73: 894~899.
- [5] 陈天寿. 微生物培养基的制造与应用[M]. 北京:中国农业出版社, 1995.93~103.
- [6] Cogan T M, Accolas J P. America: Dairy starter cultures—food science and technology[M]. 1996.191~203.
- [7] Brian J B Wood 主编. 发酵食品微生物学[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2001.198~256.
- [8] Parente E, Zottola E A. Growth of thermophilic starters in whey permeate media [J]. J Dairy Sci, 1991,74:20~28.
- [9] 张兰威. 乳酸菌优良菌株选育及直接式酸奶发酵剂的研制[D]. 哈尔滨:东北农业大学博士论文, 2002.43~53.
- [10] 俞俊棠, 唐孝宣. 生物工艺学(下册)[M]. 上海:华东理工大学出版社, 2003.81~99.

(上接第 179 页)

“开始”开始测量。由于采用了计算机, 其采样精度可达小数点后第 4 位(吸光度)。能量 100 左右时, 将测得的漂移值与 0.006Abs 比对。只有当漂移值小于 0.006Abs, 基线才是稳定的。

1.6 实验中测 Mg 含量时加入 SrCl_2 的作用

这是因为镁在空气-乙炔火焰中测定时有很多元素干扰, 如铝、铍、磷、硅、钛、钒和锆对钙有干扰, 铝、磷、硅、钛、对镁有干扰, 而在有释放剂镧或锶存

在下, 这些干扰常可被消除。所以, 在测 Mg 时要加入 SrCl_2 。

2 实验结论

经过实验我们可以看出, 栀子中含有非常丰富的 Mg, 而 Cu、Zn、Fe、Mn 等元素的含量相对较低。我们对栀子作为保健品的开发关键是对其中富含的 Mg 元素的开发, 从而使栀子在食品以及保健品方面得到综合应用。