

干酪乳杆菌产酸培养基的优化

丁海梅¹,杜丽平¹,张志民²,肖冬光¹,张煜行²,吴荣荣²,何娜²

(1.天津科技大学生物工程学院,天津 300457;2.衡水老白干酿酒(集团)有限公司,河北 衡水 053000)

摘要: 为了提高干酪乳杆菌发酵产酸量,本研究以 MRS 培养基为基础培养基,通过单因素实验和 4 因素 3 水平正交试验确立了干酪乳杆菌 HJB-006 的最佳氮源、碳源、生长盐类等成分配比及培养基初始 pH 值。结果表明,葡萄糖 2.2%、酪蛋白胨 1.35%、MgSO₄·7H₂O 0.2%、MnSO₄·7H₂O 0.7%、牛肉膏 1.0%、酵母膏 0.5%、柠檬酸三铵 0.2%、乙酸钠 0.8%、吐温-80 1 mL/L,培养基初始 pH 值为 6.0,用此培养基在 37℃ 恒温下发酵 24 h,其乳酸产量较优化前提高 45.45%。

关键词: 干酪乳杆菌; 乳酸; 培养基; 优化

中图分类号: Q93-3; TS262.3; Q939 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2013)05-0014-04

Optimization of the Culture Medium of Lactic acid-producing *Lactobacillus casei* Strain HJB-006

DING Haimei^{1,2}, DU Liping¹, ZHANG Zhimin², XIAO Dongguang¹, ZHANG Yuhang², WU Rongrong^{1,2} and HE Na²

(1.College of Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457; 2.Hengshui Laobaigan

Liquor-making Group Co.Ltd., Hengshui, Hebei 053000, China)

Abstract: In order to improve lactic acid-producing capacity of *Lactobacillus casei* strain HJB-006, the best culture medium including the ratio of carbon source, nitrogen source and nutrient salts, and initial pH value were determined by single factor experiment and orthogonal test of four factors and three levels. The results were as follows: glucose 2.2%, casein peptone 1.35%, MgSO₄·7H₂O 0.2%, MnSO₄·7H₂O 0.7%, beef extract 1.0%, yeast extract 0.5%, ammonium citrate tribasic 0.2%, sodium acetate trihydrate 0.8%, twain-80 1 mL/L, and initial pH value was 6.0. As a result, lactic acid-producing capacity of *Lactobacillus casei* strain HJB-006 had increased by 45.45% by use of the optimized culture mediums (24 h fermentation at 37 °C).

Key words: *Lactobacillus casei*; lactic acid; culture medium; optimization

乳酸广泛应用于食品、医药、化妆品、工业、农业等各个行业中。在固态法白酒发酵过程中,乳酸菌具有促进美拉德反应、促进发酵,维护与保持酿酒微生态环境等作用;乳酸菌主要代谢产物乳酸是形成乳酸乙酯及其他香味成分的重要物质基础。乳酸具有缓冲调味,降低白酒刺激感,消除饮后上头,促进新酒老熟,增加酒体的浓厚度,延长白酒后味的作用,同时可以消除酒的苦味、增加酒体回甜感,对丰富白酒风味和提高白酒质量有重大作用^[1-2];在果酒、饮料、肉类、食品、糕点等中起到防腐保鲜的功能;在啤酒酿造中,能调整 pH 值促进糖化,有利于酵母发酵,提高啤酒质量,增加其风味,延长保质期;在医药方面,在病房、手术室、实验室等场所中采用乳酸蒸气消毒;乳酸聚合所得聚乳酸,可制成手术缝线,能自动降解成乳酸而被人体吸收;在化妆品行业中,乳酸广泛用作

许多护肤品、沐浴产品的保湿滋润剂、pH 调节剂;在农、畜牧业方面,可用于生产缓释农药;乳酸聚合物也可用于生产农用环保薄膜^[3-6]。可见乳酸的用途较广,研究优化产酸培养基具有广阔的应用价值。

乳酸(lactic acid),又名 α-羟基丙酸、2-羟基丙酸、丙醇酸,有 DL-型、D-型、L-型 3 种同分异构体。目前工业生产乳酸的方法主要包括发酵法、合成法和酶法,其中化学合成法原料有毒性,酶法工艺复杂,且其工业应用还有待于进一步研究,而发酵法工艺简单,原料充足,发展早且较成熟,约占乳酸生产的 70% 以上^[7]。用于生产乳酸的菌种主要有乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)和根霉属(*Rhizopus*),采用乳酸菌发酵生产乳酸具有糖利用率高、能耗低、设备简单,操作方便等优点^[8]。

现有的乳酸测定方法有:对羟基联苯法^[9]、EDTA 滴

收稿日期:2012-10-22

作者简介:丁海梅(1988-),女,山东日照人,硕士,研究方向:现代酿造技术。

通讯作者:杜丽平,女,副教授,硕士生导师,主要研究方向:现代酿造技术和生物分离工程。Email: dlp123@tust.edu.cn。

优先数字出版时间 2013-02-05;地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20130205.1458.004.html>。

定法^[10]、气相色谱法^[11]、酶法^[12]、毛细管电泳法^[13]、电位分析法^[14]、原子吸收法^[15]、比色法^[16]、高效液相色谱法^[17]。高效液相色谱法(HPLC),具有分离效能高、灵敏度高、分析速度快等优点^[18],较其他测定乳酸的方法具有优越性。

综上所述,本实验选用干酪乳杆菌 HJB-006 为实验菌株,以乳酸产量为测定指标,采用单因素和正交实验考查培养基基本组分对菌体产酸量的影响,以期获得最佳培养基。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

菌种:干酪乳杆菌(HJB-006),衡水老白干酒业有限公司菌种室保藏。

试剂:乳酸标品,购自 Sigma 公司;乙腈、甲醇(色谱纯)购自西华特种试剂厂;其余试剂为分析纯、生化试剂。

MRS 培养基:蛋白胨 10 g/L,酵母浸出物 5 g/L,牛肉膏 10 g/L,葡萄糖 20 g/L,吐温-80 1 mL/L,乙酸钠(3H₂O)0.8%,柠檬酸三铵 0.2%,缓冲盐(11.4%的 MnSO₄·7H₂O 溶液、2.12%的 MgSO₄·7H₂O 溶液)5 mL,蒸馏水 1 L,121 °C 灭菌 20 min。

仪器:电子恒温培养箱、高速离心机、超净工作台、高压灭菌器、752 紫外可见分光光度计、PHS-W pH 计、超声波清洗器 KQ13200E、安捷伦高效液相色谱仪。

1.2 实验方法

1.2.1 发酵方法

将斜面菌种接入装有 10 mL 液体 MRS 培养基的试管中,37 °C 下恒温活化培养 24 h,以 3% 的量接种到装有 50 mL 液体 MRS 培养基的 100 mL 三角瓶中,37 °C 下恒温静置培养 18 h 后作为种子液,将种子液按 3% 接种量接种到 50 mL 发酵培养基中,37 °C 静置发酵 24 h。

1.2.2 HPLC 法检测发酵液中乳酸含量

色谱柱:Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱(4.6×250 mm×5 μm);流动相:0.01 mol/mL 磷酸氢二铵溶液:乙腈(98:2),以 40% 磷酸调 pH2.45;进样量:20 μL,流速:1 mL/min;柱温:35 °C,检测波长:210 nm。

样品处理:发酵液摇匀,取适量经 1100 r/min 高速离心 10 min 后取上清液稀释 6~8 倍,经 0.45 μm 有机相膜过滤,进样测定。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 不同碳源类别对干酪乳杆菌 HJB-006 产酸的影响

以 MRS 培养基为基础培养基,3% 接种量接种于装有 50 mL 液体 MRS 培养基的 100 mL 三角瓶中,37 °C

下恒温静置发酵 24 h,用 HPLC 法测定产酸量,得到最佳碳源,测定结果见图 1。

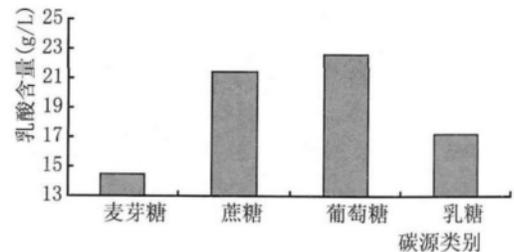


图 1 不同碳源类别对干酪乳杆菌 HJB-006 产酸量的影响

2.1.2 葡萄糖浓度对干酪乳杆菌 HJB-006 产酸的影响

选取对培养基产酸影响较大的葡萄糖作为碳源,进一步考察其添加浓度对产酸的影响,结果见图 2。

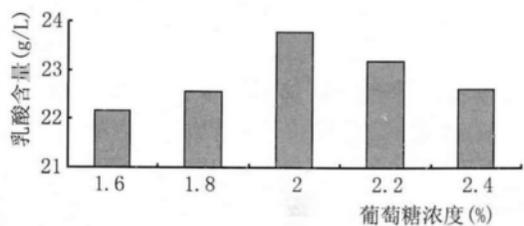


图 2 葡萄糖浓度对干酪乳杆菌 HJB-006 产酸量的影响

由图 1、图 2 可知,在 4 种碳源培养基中,以葡萄糖为碳源产酸量最高,且当葡萄糖浓度为 2.0% 时,产乳酸量最高。葡萄糖浓度过低,没有充足的营养,浓度过高,则会增加培养基的渗透压,抑制磷酸果糖激酶的合成速度,致使葡萄糖利用率下降^[19]。

2.1.3 不同氮源类别对干酪乳杆菌 HJB-006 产酸量的影响

以植物来源的大豆蛋白胨、玉米浆,动物来源的胰蛋白胨、普通动物蛋白胨及酪蛋白胨为氮源,添加浓度为 1.0%,评价不同来源的氮源对产酸的影响,以获得最佳氮源,结果见图 3。

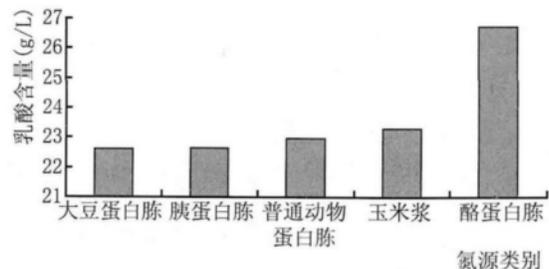


图 3 氮源类别对干酪乳杆菌 HJB-006 产酸量的影响

2.1.4 酪蛋白胨浓度对干酪乳杆菌 HJB-006 产酸量的影响

选取对干酪乳杆菌产酸影响较大的酪蛋白胨作为氮源,进一步考察其添加浓度对产酸的影响,结果见图 4。

由图 3、图 4 可知,以酪蛋白胨为氮源,乳酸产量最

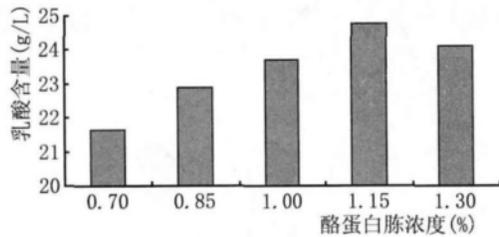
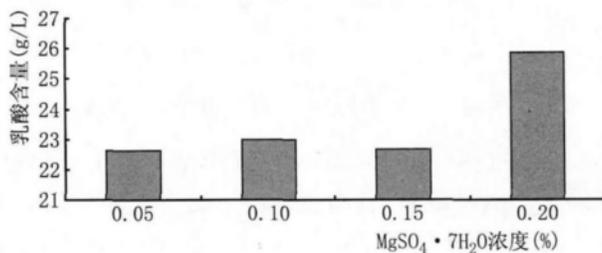
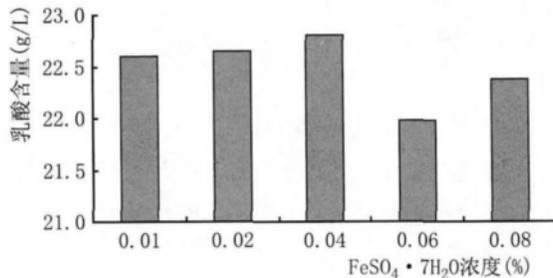
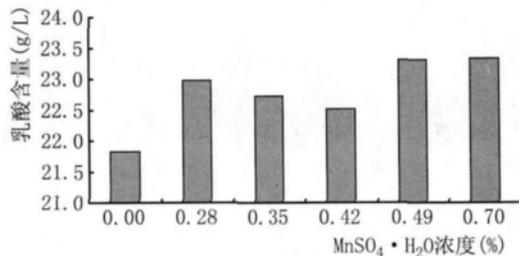


图4 酪蛋白胨浓度对干酪乳杆菌 HJB-006 产酸量的影响

高,这可能是因为酪蛋白胨较其他蛋白胨更有利于菌体的吸收利用,所以选择酪蛋白胨为最适氮源。当酪蛋白胨的添加浓度为 1.15% 时,乳酸产量最高。

2.1.5 金属盐类及培养基初始 pH 值对干酪乳杆菌 HJB-006 产酸量的影响

金属离子通常为各类酶的激活剂^[20],影响着菌体的代谢活动,以 MRS 培养基为基础培养基,考查 $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 对干酪乳杆菌产酸量的影响,结果见图 5~图 7。

图5 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 浓度对干酪乳杆菌 HJB-006 产酸量的影响图6 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 浓度对干酪乳杆菌 HJB-006 产酸量的影响图7 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 浓度对干酪乳杆菌 HJB-006 产酸量的影响

由图 5~图 7 可知,当 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 的质量浓度为 0.2% 时,乳酸产量最高,较不添加时提高了 21.79%。 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 对产酸影响的变化曲线较为平缓; $MnSO_4 \cdot H_2O$ 添加浓度为 0.7 g/L 时,乳酸产量较不添加时提高

6.91%。结果表明,3 种金属盐中 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 对产酸影响较大,这可能与 Mg^{2+} 是葡萄糖激酶、醛缩酶、磷酸甘油酸激酶等主要酶的激活剂和复合酶的中心组分有关^[20]。

2.1.6 培养基初始 pH 值对干酪乳杆菌 HJB-006 产酸量的影响

考察培养基的初始 pH 值对干酪乳杆菌 HJB-006 产酸量的影响,结果见图 8。

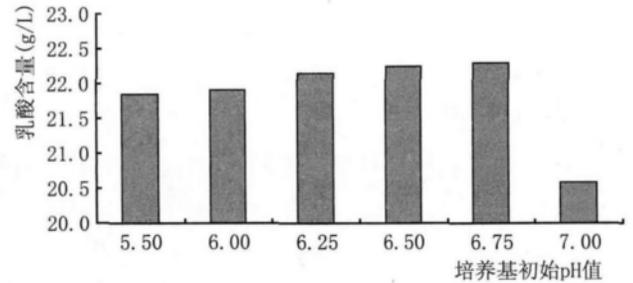


图8 培养基初始 pH 值对干酪乳杆菌 HJB-006 产酸量的影响

由图 8 可知,当 pH6.75 时,乳酸产量最高。pH 值太低,菌体生长受到抑制,pH 太高则不利于正常代谢产酸,所以 pH6.75 为最适培养基初始 pH 值。

2.2 正交试验

以上单因素实验初步探讨了培养基的基本成分配比及培养基初始 pH 值对干酪乳杆菌产酸的影响,考虑到各因素之间的交互作用,基于单因素实验中各因素对干酪乳杆菌产酸的影响程度不同,以选定的碳源、氮源、培养基初始 pH 值、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 浓度为因素,每个因素设置 3 个水平,进行正交试验。对正交实验结果进行直观分析、方差分析^[21],得出干酪乳杆菌的最佳产酸培养基组合,具体因素水平及试验结果见表 1。

表1 干酪乳杆菌 HJB-006 产酸量正交 $L_9(3^4)$ 实验结果与分析

试验号	A:酪蛋白胨 (%)	B:葡萄糖 (%)	C:pH 值	D: $MgSO_4$ 浓度 (g/L)	乳酸含量 (g/L)
1	1(1.0)	1(1.8)	1(6.75)	1(0.2)	22.7250
2	1	2(2.0)	2(6.5)	2(0.3)	25.5035
3	1	3(2.2)	3(6.9)	3(0.1)	27.8303
4	2(1.15)	1	2	3	22.7872
5	2	2	3	1	25.7811
6	2	3	1	2	27.8284
7	3(1.35)	1	3	2	23.5675
8	3	2	1	3	24.9204
9	3	3	2	1	29.6821
k_1	25.353	23.027	25.158	26.063	
k_2	25.466	25.402	25.991	25.633	
k_3	26.057	28.447	25.726	25.179	
R	0.704	5.420	0.833	0.884	

由表 1 和表 2 分析显示,极差 R 的大小依次为 $B > D > C > A$, 即其主次因素依次为葡萄糖浓度、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 浓度、培养基的初始 pH 值及酪蛋白胨浓度。由极差 R 得到各因素最优组合为 $B_3D_1C_2A_3$, 即当葡萄糖的浓

表 2 乳酸含量方差分析

因素	平方和	自由度	F 比	F0.05	显著性
酪蛋白胨浓度	0.857	2	0.072	4.460	
葡萄糖浓度	44.295	2	3.737	4.460	* *
Mg ²⁺ 浓度	1.087	2	0.092	4.460	
pH 值	1.171	2	0.099	4.460	
误差	47.41	8			

度为 2.2%, MgSO₄·7H₂O 的浓度为 0.2%、培养基的初始 pH6.5、酪蛋白胨的浓度为 1.35% 时,干酪乳杆菌产酸量最高,较优化前有所提高。

3 结论

对干酪乳杆菌 HJB-006 的发酵产酸培养基进行研究,单因素结果表明, MnSO₄·7H₂O、FeSO₄·7H₂O 的最佳质量浓度分别为 0.7 g/L、0.04 g/L。正交实验结果表明,干酪乳杆菌 HJB-006 最佳发酵产酸参数为酪蛋白胨 1.35%,葡萄糖 2.2%,MgSO₄·7H₂O 0.2 g/L,培养基的初始 pH6.5。酪蛋白胨为干酪乳杆菌提供丰富的氮源,而葡萄糖作为单糖是产酸的主要能源物质, Mg²⁺ 为产酸过程中酶类的激活剂,且微酸性环境有利于菌体发酵产酸。

参考文献:

- [1] 谢玉球,钟雨,谢旭,等.乳酸菌在固态法白酒生产中的地位和作用[J].酿酒科技,2008(11):83-86.
- [2] 张中义,畅晓霞.有机酸对大曲酒品质影响分析[J].酿酒,2009,36(5):37-39.
- [3] 施安辉,周波.乳酸菌分类、生理特性及在食品酿造工业上的应用[J].中国调味品,2001(11):3-6.
- [4] 崔耀军,于培星,王学金.乳酸及其衍生物应用现状与发展前景[J].中国食品工业,2001(7):36.
- [5] 苏彤.乳酸及其衍生品开发应用前景广阔[J].化工中间体,2003(12):15-17.
- [6] 程蓉,钱欣.聚乳酸的改性及应用进展[J].化工进展,2002,21

(11):824-826.

- [7] 黄光斗,李柯,张智,等.乳酸的生产方法及应用研究[J].广西轻工业,2006(5):36-37.
- [8] Yun JS,Wee Y J,Ryu H W.Production of optically pure L-(+)-lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1[J].Enzyme Microb.Technol.,2003,33:416-423.
- [9] 梁琼,鲁明波,卢正东,等.对羟基联苯法定量测定发酵液中的乳酸[J].食品科学,2008,29(6):357-360.
- [10] 郑志,姜绍通,潘丽军.EDTA 定钙法测定发酵液中乳酸含量的探讨[J].食品科学,2003,24(3):102-105.
- [11] 吕九琢,徐亚贤,徐金龙.气相色谱法测定发酵法乳酸产品中乳酸及有机杂质[J].北京石油化工学院学报,2003,11(3):46-50.
- [12] 柳畅先,袁浚,吴士筠.酶法测定乳酸[J].分析试验室,2005,24(9):75-77.
- [13] 唐萍,田晶,苑广志,等.毛细管电泳法测定乳酸发酵液中有有机酸[J].食品与发酵工业,2006,32(3):76-78.
- [14] 陈正行.电位分析法测定乳酸的含量[J].无锡轻工业学院学报,1994,13(3):270-272.
- [15] 马鸿飞,王伟,孙为德.原子吸收法测定牛奶中的乳酸[J].盐城工学院学报,1997,10(2):36-38.
- [16] 凌希利,张水华.比色法测定白酒中乳酸含量[J].酿酒科技,1983(2):19-21.
- [17] 冯向东.高效液相色谱法测定白酒中乳酸和乙酸含量[J].酿酒科技,2009(5):115-118.
- [18] 于世林.高效液相色谱方法及应用[M].北京:化学工业出版社,2010.
- [19] 高年发,石青松,马然,等.嗜热乳杆菌 T-1 发酵特性的研究[J].天津科技大学学报,2005,20(2):14-18.
- [20] 黄谷亮,秦菊霞,李楠,等.干酪乳杆菌产 L-乳酸发酵条件的研究[J].广西大学学报,2007,32(4):376-379.
- [21] 李云雁,胡传荣.试验设计与数据处理[M].北京:化学工业出版社,2008.

(上接第 13 页)

- [1] 件优化研究[J].生物技术通报,2012(3):111-116.
- [4] Erich JK, Thorsten E. Lipases for biotechnology[J].Current Opinion in Biotechnology, 2002,13(4):390-397.
- [5] 赵华,赵树欣,李颖宪,张维,等.微生物酶法合成己酸乙酯的研究[J].天津轻工业学院院报,1999(1):15-19.
- [6] 刘维英,韩亚杰,胡坤,代斌,等.合成己酸乙酯脂肪酶产生菌的筛选及发酵条件的研究[J].生物技术通报,2009(3):115-118.
- [7] 邓轶韬,李夏兰,陈宗香,蔡婀娜,等.阿魏酸酯酶产生菌的筛选

及产酶条件的优化[J].华侨大学学报,2011,32(3):300-303.

- [8] 卢世珩,刘光焯,江跃林,黄德英,吴衍庸,等.合成己酸乙酯脂肪酶产生菌的筛选及产酶条件[J].微生物学通报,1994,21(1):23-25.
- [9] 王牛牛,雷振河,吕利华,李奇,等.以红曲霉酯化酶催化合成乳酸乙酯[J].食品与发酵工业,2011,37(1):73-77.
- [10] 吴衍庸.论提高泸型酒质量的三大微生物技术[J].酿酒科技,2002(5):22-25.

中国葡萄酒年消费 21 亿瓶

本刊讯:据国际葡萄酒研究机构发布的数据显示,2012年,中国葡萄酒消费量超过 21.6 亿瓶,和 2011 年 19 亿瓶的消费量相比,增加了 13.68%。预计 2016 年中国葡萄酒消费将达到 30.24 亿瓶。

伴随中国葡萄酒消费水平快速增长,国际巨头纷纷开拓中国市场。法国波尔多葡萄酒闻名世界,中国已成为波尔多葡萄酒第一大进口国,进口量从 2002 年的 42.5 万升增长到去年的 5380 万升,该产区葡萄酒占有 65% 的法国葡萄酒市场。(江源)