

酒类酒球菌 SD- 2a 高密度培养的研究

王 华, 罗 华, 黄 科

(西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要: 对酒类酒球菌 SD- 2a 液体培养条件和半连续高密度培养进行了研究, 研究表明, 酒类酒球菌 SD- 2a 的适宜培养条件为: 培养温度 25 ℃, 接种量 5%, pH 值 4.8。在培养过程中, 每 4 h 添加一次 CaCO₃ 溶液, 调整 pH 值至最适值。并结合优化培养条件, 对酒类酒球菌 SD- 2a 进行半连续法高密度培养, 使其菌体密度达到了 6.5 × 10¹⁰ cfu/mL, 比二次培养前提高了近 10 倍。

关键词: 微生物; 酒类酒球菌 SD- 2a; 高密度培养; 生长曲线

中图分类号: Q93- 3; TS261.1 文献标识码: A 文章编号: 1001- 9286(2007) 04- 0069- 04

Research on High- cell- density Cultivation of *Oenococcus oeni* SD- 2a

WANG Hua, LUO Hua and HUANG Ke

(College of Enology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi, 712100 China)

Abstract: The high-cell-density cultivation of *Oenococcus oeni* SD-2a and semi-continuous way was researched. The results showed that the optimal culturing conditions were as follows: culture temperature 25 ℃, pH 4.8, inoculation size 5%. Adjusting the pH value by using CaCO₃ during culturing to obtain the optimal pH value. With using semi-continuous way, based on the optimal conditions, the cell population could obtain over 6.5 × 10¹⁰ cfu/mL, as almost 10 times as before.

Key words: microbe; *Oenococcus oeni* SD-2a; high cell density culture; growth curve

苹果酸-乳酸发酵(MLF)是在葡萄酒酒精发酵结束之后在乳酸菌(主导菌为酒类酒球菌)的作用下,将苹果酸分解为乳酸和 CO₂ 的过程^[1]。葡萄酒经过 MLF 后,总酸含量显著下降,新葡萄酒的酸涩粗糙感消失,变得柔软。同时 MLF 还增加了微生物的稳定性,并可以形成复杂风味^[1]。

但由于葡萄酒较高的酒精含量、较低的 pH 值,使得直接接种乳酸菌进行 MLF 存在较多困难^[2]。在葡萄酒酿造发达国家,大都是从葡萄酒中分离自然优良酒类酒球菌,生产商业冷冻干燥发酵剂进行 MLF^[3]。而冷冻干燥发酵剂制备的关键技术之一就是实现菌体的高密度培养^[4]。高密度培养技术能提高发酵液中的菌体密度,目前实现高密度培养的方法有:固定化、补料分批培养、沉降、离心和微孔膜使细胞截流形成细胞循环等^[5]。

本实验所选菌种酒类酒球菌 SD- 2a 为本院自行选育、保藏,具有更强的酿酒适应性^[6]。本文从酒类酒球菌 SD- 2a 的培养条件(温度、接种量、pH 值、pH 值调整方式)和半连续高密度培养等几个方面对酒类酒球菌 SD- 2a 的高密度培养作试验,初步确定酒类酒球菌 SD- 2a

高密度培养的条件,以期对冷冻干燥发酵剂的制备提供理论和实践指导。

1 试验材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌种

酒类酒球菌 SD- 2a: 西北农林科技大学葡萄酒学院选育并保藏。

1.1.2 培养基

番茄汁培养基(ATB)为:酵母浸粉 0.5%,蛋白胨 1%,葡萄糖 1%,MgSO₄·7H₂O 0.02%,MnSO₄·4H₂O 0.005%,盐酸半胱氨酸 0.05%,番茄汁 25%(v/v),蒸馏水配制,115 ℃ 灭菌 20 min。在配制固体培养基时添加 1.5%的琼脂。

1.2 实验仪器与设备

pHS- 3B 型精密 pH 计、MJX 型霉菌培养箱、TGL- 16G 冷冻离心机、贝朗 2.0 全自动发酵罐、752 紫外分光光度计、HS 型超净工作台等。

1.3 实验方法

基金项目:科技部科技成果重点推广项目 2004EC000317。

收稿日期:2007- 02- 02

作者简介:王华(1959-),女,河北阜城人,教授,博导,西北农林科技大学食品学院副院长,葡萄酒学院实验研究中心主任,主要从事葡萄与葡萄酒的研究工作。

1.3.1 种子的制备^[7]

将斜面保存菌种接种活化于液体 ATB 培养基中, 于 25℃ 培养 4 d。

1.3.2 培养温度对酒类酒球菌 SD- 2a 生长的影响

将培养温度设置为 18℃、22℃、25℃、28℃、31℃, 通过实验选择酒类酒球菌 SD- 2a 生长的最适温度范围。

1.3.3 接种量对酒类酒球菌 SD- 2 培养的影响

将处于生长对数期的酒类酒球菌 SD- 2a 种子液以 1%、3%、5%、7% 的接种量接入 pH 值为 4.8 的 ATB 培养基中。通过对吸光度的测量, 确定 SD- 2a 最佳接种量。

1.3.4 酒类酒球菌 SD- 2a 最适 pH 值的选择

培养过程中将 pH 值设定为 4.2、4.5、4.8、5.1、5.3, 在生长过程中保持 pH 值为初始值。通过生长曲线来确定 SD- 2a 的最适生长 pH 值。

1.3.5 培养过程中 pH 值的调节方式的选择

为了消除培养过程中 pH 值降低对菌体生长的抑制作用, 在培养过程中添加碱溶液以中和产生的酸。选用的碱液为: 20% 的 Na_2CO_3 、 CaCO_3 。按以下两种方式进行添加:

1.3.5.1 每 4 h 测定一次 pH 值, 添加碱液, 将发酵液 pH 值调整至初始值。

1.3.5.2 培养过程中流加碱液, 始终保持 pH 值恒定。

培养过程中, 每隔 4 h 测定一次 OD 值, 作生长曲线, 观察菌体生长在 pH 值影响下的变化趋势, 以确定最佳 pH 调整方法。

1.3.6 正交试验

在前单因素实验的基础上进行温度、接种量、pH 值、pH 值调整方式的 4 因素 3 水平正交试验, 以确定酒类酒球菌 SD- 2a 的最佳培养条件。

1.3.7 SD- 2a 的半连续培养。

在菌体培养至对数期时, 将菌液无菌低温离心, 8000 r/min, 5 min, 再加入等量新鲜培养基继续培养, 以生长曲线确定培养时间。在培养后 12 h、30 h、48 h、66 h 测活菌数。

1.4 检测项目

1.4.1 吸光度的测定: 紫外分光光度计法^[8]。

1.4.2 菌数测定: 平板梯度稀释法^[9]。

1.4.3 pH 值测定: 精密 pH 计^[9]。

2 结果与分析

2.1 温度选择(图 1)

由图 1 可以看出, 培养温度对酒类酒球菌 SD- 2a 的生长有较大影响。18℃、22℃ 时酒类酒球菌 SD- 2a

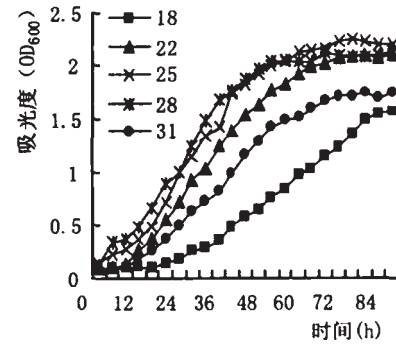


图 1 温度对 SD-2a 生长的影响

生长迟缓, 延滞期较长, 并且生长的全过程中一直保持较缓的生长状态。随着培养温度的升高, 酒类酒球菌 SD- 2a 生长延滞期逐渐减短, 很快达到对数生长期。25℃、28℃ 培养时对数生长期较长。当培养温度提高至 31℃ 时, 酒类酒球菌 SD- 2a 生长迟缓。由此可确定酒类酒球菌 SD- 2a 最适生长温度范围在 25~28℃。

2.2 接种量对 SD- 2a 生长的影响(图 2)

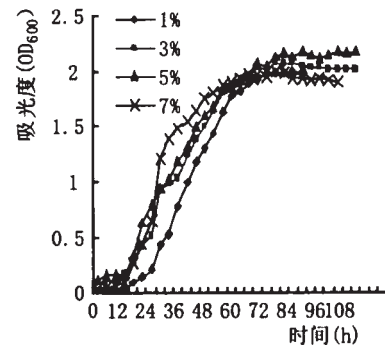


图 2 接种量对 SD-2a 生长的影响

由图 2 可以看出, 接种量为 1% 的菌液生长延滞期较长; 接种量为 3%、5% 的菌液生长延滞期短, 对数期长, 最后达到更高的吸光度值。接种量为 7% 时, 菌体很快开始对数期的生长, 但对数期持续时间短, 可能是由于前期生长过快, 产生的有机酸类代谢物质过快积累, 抑制了菌体自身的生长。因此, 选择 5% 左右的接种量进行正交试验。

2.3 培养过程中 pH 值对生长的影响(图 3)

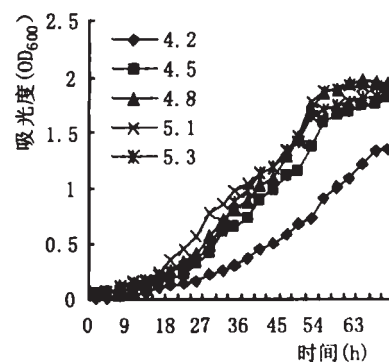


图 3 pH 值对 SD-2a 生长的影响

培养环境的 pH 值是影响酒类酒球菌 SD-2a 生长的重要因素之一。pH 值的变化会影响菌的生长速度、代谢活动及生存^[9]。由图 3 可以看出, 当 pH 值为 4.2 时, 较明显地抑制了酒类酒球菌 SD-2a 的生长, 延滞期长达 33 h, 并且生长缓慢, 对数生长期并不明显。培养 pH 值提高至 4.8 时, 延滞期缩短至 22 h, 出现了明显的对数生长期。但 SD-2a 的生长并不是随着 pH 值的上升而呈上升趋势, 当 pH 值升高到 5.3 时, 菌体的长势略有下降。因此可确定酒类酒球菌适合生长 pH 值范围为 4.5~5.3。

2.4 pH 值的调整 图 4)

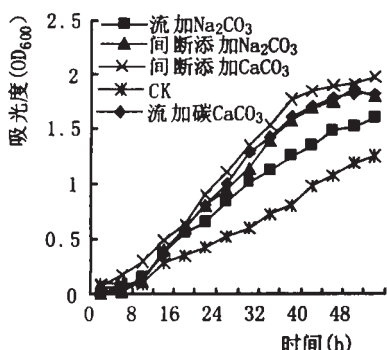


图 4 pH 值调节对 SD-2a 生长的影响

由图 4 可以看出, 在酒类酒球菌 SD-2a 生长过程中, 用碱液调节培养环境的 pH 值, 会促进菌体的生长。在添加碱液的方式上, 间断添加碱液比流加效果好, 且添加 CaCO₃ 比添加 Na₂CO₃ 更能促进菌体生长, 这是由于 Ca²⁺ 对乳酸脱氢酶具有激活作用^[10]。

2.5 正交试验

在前面的单因素实验基础上通过正交试验优化培养条件, 结果见表 1~表 4。

表 1 酒类酒球菌培养条件试验因素水平表 L₉(3⁴)

水平	因素 A (温度℃)	因素 B (接种量%)	因素 C (pH 值)	因素 D (pH 值调节方式)
1	22	3	4.8	流加 CaCO ₃
2	25	5	5.1	间断添加 CaCO ₃
3	28	7	5.3	间断添加 Na ₂ CO ₃

表 2 正交试验各处理指标值

处理号	A	B	C	D	指标值					
					OD 值			活菌数		
1	1	1	1	1	1.853	1.933	1.922	63	82	78
2	1	2	2	2	1.933	1.967	1.979	87	102	90
3	1	3	3	3	1.885	1.891	1.862	39	56	42
4	2	1	2	3	1.864	1.876	1.883	89	69	48
5	2	2	3	1	1.781	1.891	1.86	56	72	75
6	2	3	1	2	1.868	1.941	1.915	77	92	69
7	3	1	3	2	1.988	2.041	2.03	92	108	124
8	3	2	1	3	2.076	2.091	2.088	106	123	125
9	3	3	2	1	2.019	2.082	2.041	131	169	113

表 3 酒类酒球菌培养条件中指标的极差分析结果 (OD 值)

指标	A	B	C	D
k1	1.9139	1.9322	1.9652	1.9313
k2	2.0507	1.9629	1.9604	1.9624
k3	1.8754	1.9449	1.9143	1.9462
R	0.1752	0.0307	0.0509	0.0311

表 4 酒类酒球菌培养条件中指标的极差分析结果 (菌落数)

指标	A	B	C	D
k1	71.0	83.7	99.6	93.2
k2	121.2	92.9	92.8	93.4
k3	71.9	87.6	73.8	77.4
R	50.2	9.2	26.0	16.0

由极差分析结果可以看出, R 值 A > C > D > B, 4 个因素对酒类酒球菌 SD-2a 的影响大小依次为: 培养温度 > pH 值 > pH 值改变方式 > 接种量, 即酒类酒球菌最佳培养条件为: 培养温度 25、接种量 5%、pH 值 4.8。pH 值调节方式为间断添加 CaCO₃。

2.6 酒类酒球菌 SD-2a 的高密度半连续培养 图 5、图 6)

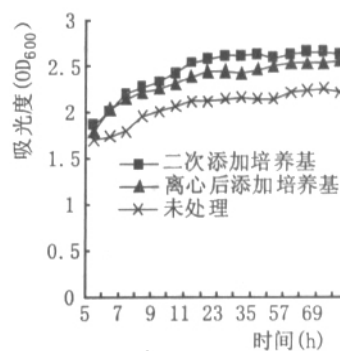


图 5 半连续培养过程中菌体 OD 值的变化

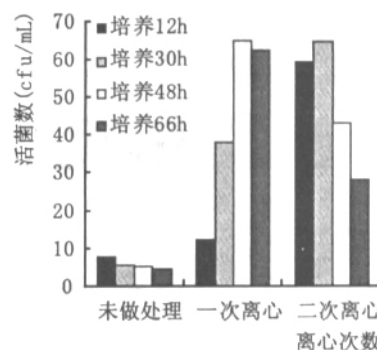


图 6 培养过程中活菌数变化情况

由图 5 中可以看出, 第一次将种子液在对数期无菌低温离心后添加新鲜培养基继续培养, 促进了菌体的进一步生长。最大活菌数达到 6.5 × 10¹⁰ cfu/mL, 是最初活菌数 (7.8 × 10⁹ cfu/mL) 的近 10 倍。二次离心添加培养基后菌液的吸光度也有了一定幅度的增加, 最大活菌数达到

6.44 × 10¹⁰ cfu/mL, 与第一次添加菌液培养后最高活菌数 (6.5 × 10¹⁰ cfu/mL) 基本持平, 没有多大增幅, 并且随着吸光度的增加, 活菌数呈快速下降趋势。这说明, 二次离心后, 菌体在新鲜培养液中也有生长, 但此时, 菌体已呈现衰亡趋势, 菌悬液中已经存在大量的死亡菌体及菌体生长的代谢产物, 这都成为菌体正常生长的阻碍因素。因此, 考虑到生产操作过程及成本问题, 选择菌体生长至对数期进行一次离心后添加菌液的操作。

3 结论

3.1 酒类酒球菌 SD- 2a 培养的最适条件为: ATB 培养基, 培养温度为 25 , 接种量为 5 %, 最适 pH 值为 4.8。

3.2 在酒类酒球菌 SD- 2a 的培养过程中, 每间隔 4 h 用 CaCO₃ 溶液调节 pH 值, 使菌体始终生长在最适 pH 值环境下, 可延长对数生长期。

3.3 采用半连续高密度培养方式, 在菌体生长至对数末期时无菌低温离心, 添加等量新鲜培养基继续培养, 可使菌体密度达到 6.5 × 10¹⁰ cfu/mL, 是离心前菌体密度的近 10 倍。达到了较好的高密度培养效果。

参考文献:

[1] 李华.现代葡萄酒工艺学[M].西安:陕西人民出版社,

2000.68- 76.

- [2] 骆艳娥,李华,刘树文,李泽福.固定化酒类酒球菌 31DH 酿造干红葡萄酒的研究[J].食品科技,2001,(6): 46- 48.
- [3] 张春晖,李华,张军翔.葡萄酒中酒类酒球菌的分离——抑制剂对酵母菌生长的抑制效应[J].食品与发酵工业,2002, 28(8): 13- 16.
- [4] Egon Bech Hansen.Commercial bacterial starter culture for fermented food of the future[J].Int.J.Food Microbiol,2002, (78): 119-131.
- [5] 刘馨磊,肖春明,许延涛,等.补料分批法高密度培养凝结芽孢杆菌[J].生物技术,2001,11(6): 21- 24.
- [6] 张春晖,夏双梅,李华.酒类酒球菌的分离及发酵适应性研究[J].中国食品学报,2004,4(2): 35- 38.
- [7] 刘芳.优选酒类酒球菌(Oenococcus oeni)酿酒特性的研究[C].西北农林科技大学 2002 届硕士学位论文.2002.
- [8] 张春晖.中国优良酒类酒球菌 Oenococcus oeni 的分离筛选及苹果酸-乳酸发酵研究[C].西北农林科技大学 2001 届博士学位论文.2001.
- [9] 程丽娟,薛泉宏.微生物学实验技术[M].西安:世界图书出版公司,2000.80-83.
- [10] 闫征,王昌禄,顾晓波.pH 值对乳酸菌生长和乳酸产量的影响[J].食品与发酵工业,2001,29(6): 33- 38.

秦含章百岁铜像在稻花香隆重揭幕



秦含章铜像揭幕仪式

本刊讯: 中国酒界泰斗秦含章先生百岁生日庆典暨铜像揭幕仪式于 2007 年 3 月 26 日在湖北稻花香集团隆重举行。秦含章先生携夫人索颖亲自出席庆典揭幕仪式, 中国食品协会副会长潘裕仁, 中国酿酒工业协会理事长王延才, 中国著名白酒专家沈怡方、高景炎、陶家驰、金佩章等, 四川剑南春集团总工程师徐占成、江苏今世缘酒业公司总工程师吴建峰、湖北白云边酒业股份有限公司总工程师熊小毛、湖北黄鹤楼酒业股份有限公司总经理陈佳, 宜昌市人大、夷陵区政府和稻花香集团的领导及全国新闻媒体的记者共 200 余人出席这一盛典。中国食品协会副会长潘裕仁、中国酿酒工业协会理事长王延才、宜昌市人大副主任谭春玉、稻花香集团董事长蔡宏柱共同为秦含章铜像揭幕。揭幕仪式热烈而庄重。

秦含章是中国著名的科学家和工程技术专家、中国食品科学技术、工业发酵与酿造技术的开拓者和学术带头人、当代中国酒业的“活化石”。他致力于酒业科研与实践 70 余年, 在科研、生产、发展各个方面做出的重大贡献, 深刻影响着中国酒业几代人。他以 80 岁高龄完成的 85 万字巨著《新编酒经》成为中国酒业发展的里程碑。从 20 世纪 90 年代开始, 秦老对稻花香集团的发展给予极大关注和亲切关怀, 亲自为该集团文化广场题写“华夏第

一爵”牌名, 并以 99 岁高龄亲自出席稻花香 151 “惠民工程竣工庆典且即兴赋诗一首: 三江峡谷好风光, 万户英雄皆宜昌; 地面小康欢欣日, 天边大醉稻花香!”

为彰显秦含章先生的馨香高德与精神, 在秦老百岁华诞之际, 湖北稻花香集团特为秦老立了一尊高 4.26 米的半身铜像, 并在该集团文化广场隆重举行庆典揭幕仪式。庆典揭幕仪式上, 蔡宏柱代表集团董事会和全体职工向秦老祝寿, 深情表达敬爱之情与美好祝福; 潘裕仁、王延才、陶家驰分别发表了热情洋溢的祝寿辞。秦含章先生精神饱满、中气十足地发表了致感谢言, 对稻花香集团寄予厚望, 殷切地期望稻花香“建成百亿元企业”的宏伟目标早日实现。并题赠稻花香集团《桃花情》一首: “三月桃花满天开, 四方仙客接地来; 浓香美酒人爱醉, 长寿健康宜昌魁”。

庆典揭幕仪式结束后, 秦老夫妇还兴致勃勃地与中国食品协会副会长潘裕仁、中国酿酒工业协会理事长王延才、中国著名白酒专家沈怡方、高景炎、陶家驰、金佩章等贵宾参观了稻花香集团的生产车间, 对稻花香集团的现代化设备和控制系统赞不绝口, 并即兴赋诗留念。(小雨)



中国酿酒工业协会王延才理事长致祝寿辞