

共固定化乳酸菌、根霉及酵母 互生体系的生态学效应分析

陈军, 沈建, 夏志华, 许宝孝

(上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234)

摘要: 应用共固定化技术建立乳酸菌 L3, 根霉 R2 和酵母 Y5 三菌之间的互生发酵体系. 通过对固定化载体微环境的生态学特性分析, 结果表明: 乳酸菌, 根霉和酵母细胞分别以 1: 2: 1 的初始细胞比例组成的共固定化细胞体系, 在亚适量供氧条件下最有利于形成生态分布协调的多菌群体体系.

关键词: 共固定化细胞; 协同发酵性能; 生态学分布

中图分类号: TS262.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-5137(2003)03-0068-07

乳酸菌、根霉和酵母是传统混合酿造体系中的重要组成微生物. 由于各自生长代谢所需生态环境以及所进行的生化反应过程各不相同, 因而各菌在多菌种发酵体系中所起的作用也各不相同. 但在传统的游离细胞的多菌混合培养状态下, 各菌所处的生境是均同的, 这就很难保持各菌之间最适宜的代谢平衡关系, 难以发挥菌体自身的发酵潜力, 因而在传统发酵过程中发酵条件的控制相当复杂. 这也是造成传统发酵效率低、周期长、产品品质不稳定的一个主要原因.

以往的研究表明在发酵过程中通过乳酸菌、根霉和酵母等多菌种之间形成协调的生境更有利于促进糖化、醇化等一系列复杂生化过程的进行^[1-3]. 本文在研究共固定化乳酸菌、根霉和酵母的发酵性能的基础上, 进一步从多菌生长的生态效应上研究共固定化细胞协同性发酵的机理, 以进一步揭示共固定化细胞的生理代谢特征.

1 材料及方法

1.1 菌种

乳酸杆菌 L3, 根霉 R2, 酵母菌 Y5. 以上菌种均为本室从小曲中分离、筛选.

1.2 培养基

增殖培养基: 牛肉膏 0.5%, 酵母膏 0.5%, 蛋白胨 1%, 葡萄糖 1%, 乳糖 0.5%, NaCl 0.5%, pH6.8, 0.1 MPa, 20min;

发酵培养基: 淀粉 1% ~ 5%, 黄豆粉 1.5%, 磷酸二氢钾 0.05%, 硫酸镁 0.025%, 0.1 MPa 灭菌 20min, pH 自然.

收稿日期: 2002-11-11

基金项目: 上海市高校科技发展基金资助项目(项目编号 97D16)

作者简介: 陈军(1966-), 男, 上海师范大学生命与环境科学学院副教授.

1.3 固定化材料

海藻酸钠,卡拉胶,氯化钙,氯化钾等.

1.4 共固定化方法

(1) 固定化细胞的活化:乳酸杆菌 L3 接种到液体增殖培养基中 30℃ 静置培养 24h;根霉 R2 接种到 PDA 平板上,30℃ 培养 2~4 d;酵母菌 Y5 接种到液体增殖培养基中 30℃,120r/m 振荡培养 48h.

(2) 标准菌悬液的制备:乳酸杆菌 L3 增殖培养液 4℃,4000r/m,离心 20min;取菌体细胞沉淀,加无菌水调制含菌 $10^9 \sim 10^{10}$ /mL 菌悬液;无菌水洗涤平板上的根霉 R2 孢子,调整孢子浓度为 $10^5 \sim 10^6$ /mL;酵母菌 Y5 培养液 4℃,4000r/m,离心 15min;取菌体细胞沉淀,加无菌水调制含菌 $10^8 \sim 10^9$ /mL 菌悬液.

(3) 共固定化:无菌条件下分别按不同的比例取各种不同的菌悬液混合,取混合菌悬液 20mL 加到 50mL 2.5% 海藻酸钠卡拉胶混合溶液中混合均匀,用恒流泵将含菌混合液滴入 5% CaCl_2 ,0.5% KCl 溶液中制成共固定化凝胶颗粒.固化 4h 后用无菌水冲洗备用.颗粒直径为 4~5mm.

(4) 共固定化颗粒的增殖:每 10g 共固定化颗粒加入 70mL 增殖培养基,于 250mL 三角瓶中 30℃,120r/m 振荡培养 48h 后用无菌水冲洗备用.

1.5 共固定化细胞的培养

分别取共固定化细胞颗粒按不同比例接入 250mL 三角瓶进行试验,每瓶装发酵培养基 50mL,各设平行组 5 瓶.培养过程按实验给定的条件控制.

1.6 测定方法

固定化细胞的计数:按金其荣等^[4].

还原糖测定:斐林试剂法,测定总糖时,发酵液先经 HCL 水解后再测定.

乙醇含量:GC9800 气相色谱仪测定.色谱柱:固定相 SE30 固定液,硅藻土载体,长 2m;柱温 150℃,汽化温度 250℃,检测器温度 250℃;载气(N_2)50mL/min;柱前压 0.08Mpa;灵敏度选择进样 0.4~0.8 μL 时峰值适当为准.

常规指标:按《工业发酵分析》测定.

共固定化颗粒内部细胞分布状态:扫描电镜观察,上海师范大学分析测试中心.

2 结果

2.1 海藻酸钠浓度对共固定化细胞的生长性能的影响

在保持卡拉胶浓度 0.5% 不变的条件下,改变固定化载体海藻酸钠的浓度制作共固定化细胞,测定

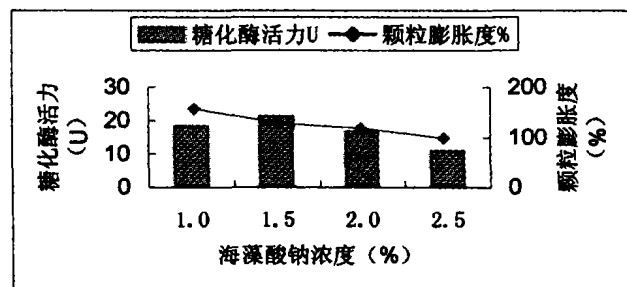


图1 海藻酸钠浓度对固定化颗粒的影响

在不同载体浓度下被固定细胞的生长情况,结果见图1.由图1可见,随着海藻酸钠浓度的增加,固定化

颗粒的抗膨胀性能有了较好地提高,但在很大程度上使颗粒内细胞的生长受到了限制,影响了细胞的发酵性能.这主要是因为载体浓度增加使载体凝胶对细胞的封闭程度增强,影响了物质在凝胶颗粒内部的扩散;而海藻酸钠浓度太低,又会使凝胶的封闭性能太差,被固定化细胞容易泄漏引起固定化功能失效.综合共固定化载体强度及共固定化细胞的生长,海藻酸钠浓度以2%为宜.

2.2 共固定化初始菌体细胞数量的对发酵性能的影响

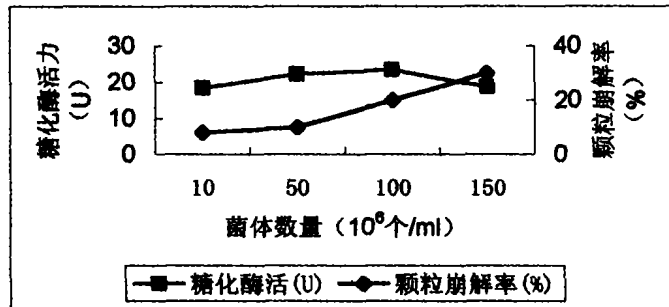


图2 初始细胞数对共固定化颗粒性能的影响

由图2可见,在共固定化时向载体溶液中混入的细胞数量对颗粒发酵性能有一定的影响.菌体细胞起始数量在 $1 \times 10^8 - 5 \times 10^8$ 时生长情况较好,颗粒在增殖后的崩解率较低;而高细胞密度共固定化不仅不会增加发酵培养液中的糖化酶活,而且固定化颗粒破碎严重.因此在共固定化时需要调整细胞数量在 $4 \times 10^6 \sim 6 \times 10^8$ 较为适合.

2.3 菌种的配比对共固定化颗粒发酵性能的影响

分别以不同的菌种组合进行共固定化,考察共固定化颗粒发酵时的产酸、糖化酶和乙醇情况.结果见图3.

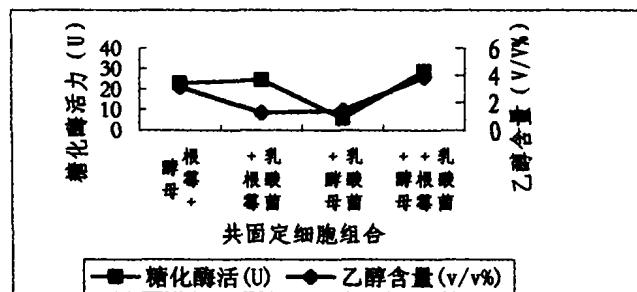


图3 不同种类的菌种对共固定化颗粒发酵性能的影响

由图可见,固定化三菌只有在共同存在时其糖化活力以及乙醇转化率才有明显地提高.仅有根霉与乳酸菌存在时其糖化酶活力为28.59U/mL;根霉与酵母协同发酵时其糖化活力只有25.55U/mL;而三种固定化微生物共同存在时则其糖化活力32.46U/mL,显著提高了6.91U/mL.其原因可能是乳酸菌的发酵产物能有效地促进根霉的生长,而随着糖化产糖的积累,又在一定程度上抑制了根霉分泌糖化酶的能力,影响了糖化力的进一步增加.当酵母将糖分及时地转化为乙醇时,根霉的受产物抑制作用被解除,其糖化力得以快速增加;与此同时,乳酸菌的生长也受到根霉和酵母分解培养基中的淀粉、蛋白质等产生葡萄糖、氨基酸等小分子营养物质影响,有利于乳酸菌的发酵产酸,发酵培养基呈偏酸环境,使得生态环境更适应于根霉、酵母的生长.又由于酵母产醇浓度不高(小于6%),对乳酸菌及根霉的生长不构

成抑制,未妨碍其生长代谢活动的正常进行,这样就使得共固定化三菌之间的关系得以协调,发酵过程能够高效进行.实验说明了在适当的基质浓度中固定化乳酸菌、根霉和酵母是在相互协同的过程中完成整个发酵过程的.实验结果还发现乳酸菌的存在使发酵液中乙醇浓度的上升速率比不含乳酸菌的共固定化颗粒快,可能对颗粒的物质通透性有某种帮助,有待进一步论证.

2.4 不同比例的3种细胞固定化协同发酵性能

通过调整共固定化细胞内菌体数和霉菌孢子数之间的最初比例,控制凝胶内3种微生物细胞的比例关系,从而定量地控制淀粉转化为葡萄糖,避免葡萄糖过多地消耗转化为霉菌的菌丝体,提高乙醇的产率.结果如图4所示.

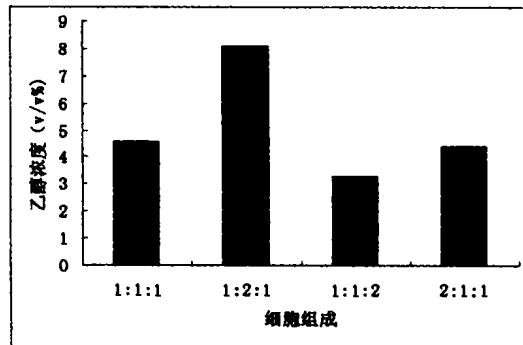


图4 共固定化细胞组成的发酵产醇性能(发酵72h)

对乳酸菌、根霉和酵母三种细胞进行不同比例混合进行共固定化发酵试验,可以发现固定化初始细胞数比例对共固定化细胞发酵性能有明显影响.发酵72h时气相色谱测试发酵液的乙醇含量显示如图4.综合各项试验结果表明:共固定体系的发酵转化率,淀粉、还原糖和乙醇相互之间的协调关系都有显著地变化.其中1:2:1的配比其发酵的协同性能较好.

2.5 淀粉浓度对共固定化体系发酵性能的影响

选取1%、3%、5%和8%的淀粉浓度的发酵培养基对共固定化发酵体系进行发酵试验,30℃,120r/m培养72h其发酵性能如图5所示.

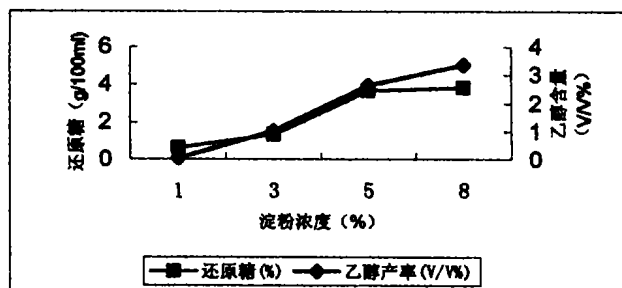


图5 淀粉浓度对共固定化细胞发酵性能的影响

从以上4种浓度的淀粉发酵液的发酵可见在发酵前72小时的还原糖和乙醇的变化情况.淀粉浓度小于3%时还原糖和乙醇生成速率较为平缓,产率较低.而淀粉浓度在3%~5%共固定化颗粒发酵转化明显增加,还原糖和乙醇生成速率协同性能良好,随着淀粉浓度大于5%以上时,曲线斜率趋缓,说明还原糖和乙醇生成速率减小.由于还原糖进一步向乙醇转化,糖的积累不再增加,有利于三菌之间代谢的更加协调一致.

2.6 摇床转速对共固定化体系发酵性能的影响

在共固定化颗粒的摇瓶培养中,选用不同的转速对1:2:1菌数比组成的共固定化细胞体系的发酵性能的影响如图6所示。

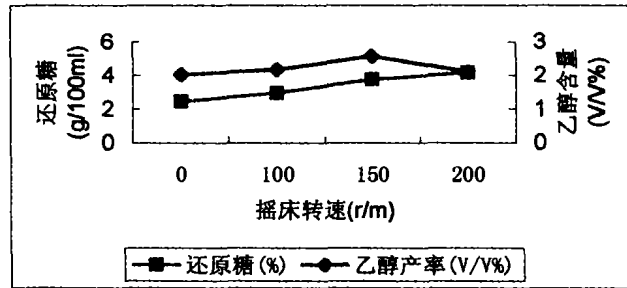


图6 溶氧对固定化细胞发酵性能的影响

从图6可以看出,随着摇床转速的增加共固定化细胞颗粒的产糖及产醇速率也呈现相应的增长趋势.摇床转速高于150r/m时,颗粒表面菌丝缠绕成菌丝球,培养液酸度增加,乙醇的含量有所下降.这是由于固定化颗粒对氧气扩散有阻碍作用,摇床转速增加会使颗粒表面好氧性根霉菌体容易过快生长,形成菌丝球,进一步阻止了氧气向颗粒内部传递,造成内部缺氧的生态环境,从而使共固定颗粒内部的乳酸菌和酵母在厌氧条件下分泌乳酸和乙醇等代谢物质。

2.7 共固定化细胞的协同发酵条件的优化

以淀粉浓度、发酵温度和摇床转速为因素,设定不同水平进行正交试验,结果如表1,2,3所示。

表1 正交试验

水平	因素		
	淀粉浓度(%)	发酵温度℃	摇床转速(r/m)
1	1	10	0
2	3	20	100
3	5	30	200

表2 正交表面化L9(3⁴)

实验号	A	B	C	酸度	糖化酶活(U)	乙醇浓度(V/V%)
1	1	10	0	0.71	4.35	1.334
2	1	20	100	0.55	16.43	2.585
3	1	30	200	0.48	28.30	3.270
4	3	10	100	0.63	14.32	4.052
5	3	20	200	0.42	24.65	4.580
6	3	30	0	0.89	9.45	8.073
7	5	10	200	0.43	20.76	5.430
8	5	20	0	0.86	12.64	7.509
9	5	30	100	0.62	18.35	8.854

从正交试验的结果分析来看,1:2:1共固定化细胞颗粒发酵体系中影响产酸的主要因素是通气.氧气供给不足时,产酸明显增加.这与根霉在厌氧状态下产酸有关;影响糖化酶活力的最主要因素也是通风,其次是温度,在200r/m和30℃时糖化酶活力较高;而淀粉浓度对发酵过程中乙醇生成速率影响明显.综合可以看出,在利用固定化乳酸菌、根霉和酵母组合成为共同发酵体系进行发酵过程中,要使该体系的发酵得以协同进行,必须权衡基质浓度、发酵温度和通风量三者之间的对立统一的关系,恰当地

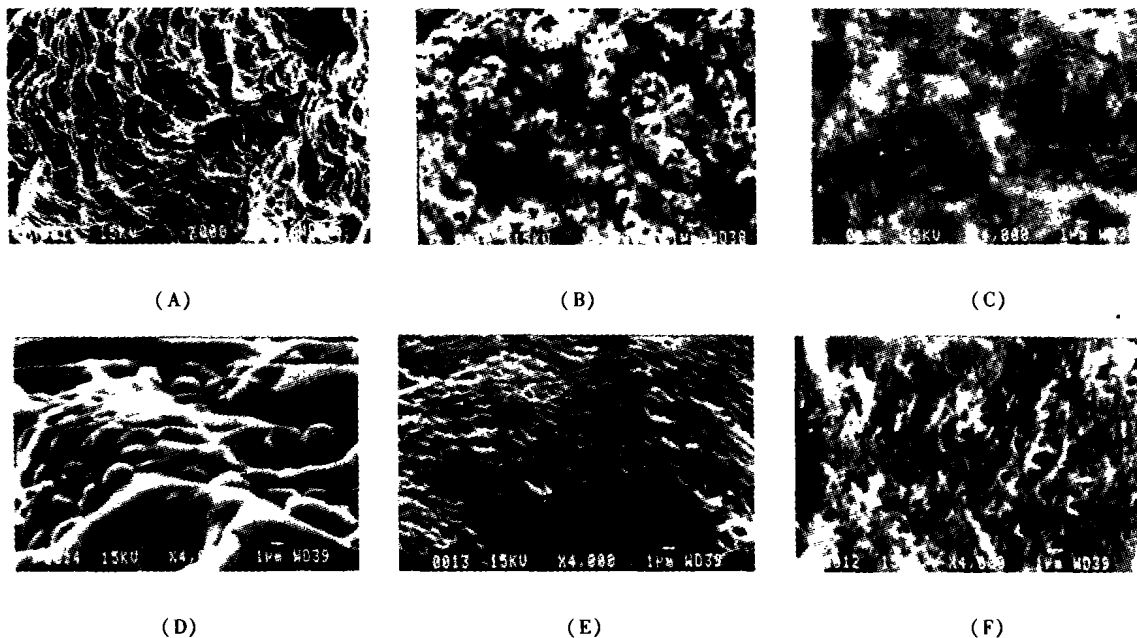
调整发酵条件之间的控制值。

表3 K值比较

因素	酸度			糖化酶活力			乙醇含量		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
K1	1.76	1.79	2.48	49.08	39.43	26.44	7.198	10.816	16.916
K2	1.94	1.65	1.80	48.42	53.73	49.10	16.705	14.674	15.991
K3	1.91	1.99	1.33	51.75	56.10	73.71	21.793	20.197	13.280
K1	0.59	0.60	0.83	16.36	13.14	8.81	2.396	3.605	5.693
K2	0.65	0.55	0.60	16.14	17.91	16.36	5.568	4.891	5.164
K3	0.64	0.66	0.44	17.25	18.70	24.57	7.264	6.732	4.427
R	0.06	0.11	0.39	1.11	5.56	15.76	4.868	3.127	1.212

2.8 供氧速度对共固定细胞生态分布的影响

采用2%海藻酸钠和0.5%卡拉胶复合载体制成的共固定化乳酸菌、根霉和酵母颗粒在不同的供氧条件下,颗粒内部的细胞生长情况有明显差异.低速度(小于100r/m)摇瓶培养容易使颗粒表面形成絮状菌丝球体,颗粒直径明显增大,基质传递到颗粒内部细胞阻力大,内部细胞生长缓慢,颗粒内细胞生态分布呈现表层好氧性丝状菌丝体密集,表层细胞较为密集,而中心部位细胞数较少(见图7颗粒照片A, B, C).转速达到150r/m以上的培养过程颗粒表面菌丝缠绕密集,颗粒体积稍有扩大,内部细胞呈现出由表及内的细胞种类和数量的规律性变化.0r/m和100r/m摇床转速培养条件下,1:2:1共固定化细胞颗粒内部情况见电子显微镜照片(见图7颗粒照片E, F).



(A-F分别为颗粒表面、表层、中心以及凝胶包埋的细胞和0r/m,100r/m摇床转速下的颗粒内部情况)

图7 共固定化颗粒扫描电镜观察(放大4000倍)

3 讨论

乳酸菌、根霉和酵母组成的共固定化发酵体系比较传统的天然混合发酵,其发酵效率有了明显的提高.所采用的三株菌的固定化颗粒在发酵过程中以适当的初始比例混合进行的确定性混合发酵,不仅有

效地提高了发酵菌种的基因库容,丰富了发酵产物,而且它们之间具有十分显著的互生关系,更有利于加快反应速度,提高发酵基质的产率和生产效率^[1,3]。

好气性根霉在共固定化培养过程中,菌丝易在颗粒表面形成菌丝膜^[5]。其主要原因是因为存在于颗粒表面的根霉孢子因氧气充足而先萌发,在颗粒表面长成了一层菌丝膜。菌丝膜的形成易使颗粒内部酸度增加,引起海藻酸钠的凝固性下降,导致了颗粒的坍塌,影响固定化细胞的发酵性能。通过调整颗粒内部的孢子初始数量和添加卡拉胶等载体以及调节通气量等手段,能有效地改善根霉固定化颗粒的发酵性状^[5-7]。MUSSENDEN等^[7]发现采用k-卡拉胶包埋法固定产黄青霉,能改变菌体的某些生理特性,使菌体的生长期明显延长,增加颗粒内部菌丝量;TANAKA^[8]等尝试了通过调节孢子的接种量的方法来限制颗粒表面菌丝膜的形成速度。

固定化乳酸菌、根霉和酵母在协同发酵过程中,产酸、糖化力以及产醇速度等方面都与一般游离发酵有了明显的差别。其中除了由于固定化细胞具有高密度、高活性及高转化率等原因外,固定化细胞在载体内部生长时其代谢规律也会发生部分改变。Mattasson, 陈家任等^[9,10]提出了微环境对固定化细胞代谢的影响模型,认为固定化微环境与游离状态下的细胞相比,其中的水活度和氧分压都有了降低,从而调节了细胞的代谢。但其中的调节机制尚不能弄清。

参考文献:

- [1] 陈军,等. 固定化乳酸菌,根霉和酵母的协调发酵性能研究[J]. 食品工业科技,2001(1):18-20.
- [2] 陈军,等. 共固定化乳酸菌,根霉和酵母在低度米酒酿造上的试验[J]. 食品与机械,2001(5):20-21.
- [3] 王岁楼,朱光州. 对应用多菌种纯种发酵的认识与实践[J]. 中国调味品,1994(7):11-12.
- [4] 金其荣,等. 多孔性载体为支持体的酵母细胞固定化方法的研究[J]. 食品与发酵工业,1994(4):22-25.
- [5] 李学梅,等. 霉菌固定化综述[J]. 生物工程进展,1999;19(4):62-66.
- [6] 杨洁彬. 乳酸菌[M]. 北京:中国轻工业出版社,1996.
- [7] MUSSENDEN P J, et al. The effect of Chemical Nature of Carriers on yeast Metabolism[J]. Enzyme Microb Technol, 1993,15:2.
- [8] TANAKA H, et al. Immobilized Microbial Cells -A Review[J]. Biotechnol Bioen,1986,28:1761.
- [9] MATTASSON B, et al. The effect of immobilized micro-environment[J]. Euro J Appl Miotechnol,1982,16:52.
- [10] 陈家任,等. 固定化微环境对酿酒酵母代谢的影响[J]. 生物工程学报,1987,3(2):146.

Study on the Ecological Effects of the Mutualism Fermentation System of Co-immobilized Lactic bacteria, Rhizopus and Yeast

CHEN Jun, SHEN Jian, XIA Zhi-hua, XU Bao-xiao

(College of Life and Environment Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

Abstract: Applied co-immobilized technology to cultivate immobilized *Lactobacillus* L3, *Rhizopus*R2 and Yeast Y5 from Xiao-qu in order to study the ecological effectiveness of the Mutualism Fermentation System of the Co-immobilized cells. By a series of experiments to study the ecological system of the micro-environment of the co-immobilized carrier. The results show that mixed cells with initial cells amount proportion 1:2:1 (*Lactobacillus*: *Rhizopus*: yeast) formed mixed fermentation system had favorable synergistic fermentation capabilities under suboptimal oxygen concentration.

Key words: co-immobilization cells; Synergistic Fermentation; ecological effectiveness