

文章编号 :1009-038X(2003)04-0072-04

电能在鳕鱼下脚料水解液乳酸发酵中的应用

卢红梅

(贵州工业大学 化学与生物工程学院, 贵州 贵阳 550003)

摘要:研究了外加直流电应用在鳕鱼下脚料水解液中胚芽乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)的乳酸发酵. 在电能发酵(E-E F)系统中, 中性红浓度和电压值对 MRS 肉汤和水解液的影响明显不同. 在最适的中性红浓度(100 $\mu\text{mol/L}$)和电压(1.0 V)条件下, 鳕鱼下脚料水解液经 48 h 的发酵后乳酸量提高了 11.7%, 最终 pH 值为 4.060.

关键词:胚芽乳杆菌; 鳕鱼; 下脚料水解液; 电能发酵; 乳酸发酵

中图分类号: TQ 920.1

文献标识码: A

Application of Electro-Energizing Method to Lactic Acid Fermentation by Haddock Hydrolysate

LU Hong-mei

(Chemical and Biological Engineering College, Guizhou University of Technology, Guizhou 550003, China)

Abstract: An electro-energizing fermentation (E-E F) method was used in lactic acid fermentation haddock with hydrolysate and by *Lactobacillus plantarum*. The influence of neutral red (NR) and the voltage applied to MRS broth and haddock hydrolysate were apparently different. With the optimum NR concentration of 100 $\mu\text{mol/L}$ and applied voltage of 1.0 V, the lactic acid production with haddock hydrolysate (as % of control) increased 11.7% and the final pH value was 4.060, after 48 hours fermentation.

Key words: *Lactobacillus plantarum*; haddock; hydrolysate; electro-energizing fermentation; lactic acid fermentation

鳕鱼的下脚料是除去市售鱼肉后所剩的鱼头、尾和骨骼, 约占原鱼的 60%^[1]. 通过木瓜蛋白酶的水解作用, 其产物可作为饲料添加剂或肥料. 但不论作何种用途, 都不可避免地需要对水解液进行保藏, 大多数采用酸化的方法进行保藏, 如果仅用如硫酸等无机酸, 其 pH 值必须降至 2.0 才能较长时间地保藏, 并且在使用肥料或饲料添加剂之前必须进行中和处理, 利用乳酸发酵将 pH 值降至 4.0, 再加苯甲酸、丙酸或山梨酸就能达到保藏的目的.

的. 利用有机酸降低酸度具有较大的优势, 因为这样就能直接利用鱼类下脚料而不需要预先中和, 并且有机酸可被饲养动物和土壤微生物直接利用, 不会由于利用无机酸而导致的土壤酸度逐渐下降从而破坏土壤^[2].

电能发酵(E-E F, electro-energizing fermentation)提高发酵产率首先是由 Hongo 和 Lwahara 提出来的, 他们将电能用在黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*)的谷氨酸发酵中, 能使 L-谷氨酸质量分

收稿日期 2002-10-25; 修回日期 2003-03-22.

作者简介: 卢红梅(1967-)女, 重庆忠县人, 副教授, 发酵工程博士研究生.

万方数据

数增加 15%^[3]。电能发酵中的氧化态中性红(NR, neutral red)作为一种人工电子载体,对菌体无毒、易与细胞膜耦合且能还原 NAD,同时电流可将 NR 还原^[4]。对于葡萄糖的乳酸发酵,经糖酵解所产生的丙酮酸在乳酸脱氢酶的催化下作为受氢体被还原为乳酸^[5]。故乳酸发酵中胚芽乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)为耗氢菌,在电化学生物反应器的培养基中,电还原的中性红可作为菌体生长和代谢的还原力(reducing power),即 NR 被阴极电流持续还原,接着被胚芽乳杆菌或混合的产乳酸培养基氧化,同时将 NAD 还原成 NADH₂,乳酸脱氢酶就能将 NADH₂ 的氢传给丙酮酸以生成乳酸^[4]。

本试验的目的在于比较电能发酵系统中胚芽乳杆菌在其最适培养基 MRS 和鳕鱼下脚料水解液中的乳酸发酵,探索鳕鱼下脚料水解液中电能发酵的最适电压值和中性红浓度。

1 材料与方法

1.1 微生物培养条件

胚芽乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)是从水化的 Stabasil(多种乳酸菌复合粉末,Medipharm, USA)中分离出来的。其液体培养基为乳酸杆菌 MRS 肉汤培养基(每升蒸馏水中包含蛋白胨 3 g, 10.0 g, 牛肉浸膏 10.0 g, 酵母浸膏 5.0 g, 葡萄糖 20.0 g, 聚山梨酸酯 80 1.0 g, 柠檬酸铵 2.0 g, 醋酸钠 5.0 g, 硫酸镁 0.1 g, 硫酸锰 0.05 g, 磷酸二氢钾 2.0 g), 固体斜面培养基中加入 1.5 g/dL 的琼脂, 软性琼脂保藏培养基中加入 0.75 g/dL 的琼脂。菌种通常作穿刺培养于软性琼脂保藏培养基中,于 4℃ 下保存 1~2 个星期再转接。使用前在固体斜面培养基中活化培养(32℃ 下 24 h),再用 MRS 肉汤培养基进行逐级扩培,每次经 32℃ 培养 12~24 h。

鳕鱼下脚料磨碎并用木瓜蛋白酶水解^[1]。50 g/dL 的葡萄糖水溶液单独灭菌,冷却后于无菌状态下加入经过灭菌、冷却的鳕鱼下脚料水解液中,使葡萄糖的质量浓度为 3.0 g/dL,将扩培好的菌液按接种量 5% 接入水解液中。

氧化态中性红(3-氨基-7-二甲氨基-2-甲基苯盐酸)溶液(1.0 g/dL)用过滤法除菌,并按要求的质量浓度加入;鳕鱼水解液培养基作阴极,100 mmol/L 磷酸钠加 100 mmol/L NaCl 缓冲液(pH 值 6.0)用作阳极。

1.2 乳酸分析

1.2.1 发酵水解液的澄清 取 5.0 mL 发酵样品置于试管中,加入 0.3 mL 25 g/dL 的 ZnSO₄,再

用 5 mol/L 的 NaOH 将 pH 值调至 7.6~7.8,然后在 10 000 r/min 下离心 20 min,倾出上清液,在 -20℃ 下贮存。

1.2.2 乳酸比色分析法取 1 mL 解冻的上清液于试管内,加入 1 滴 1.0 g/dL 的 CuSO₄ 溶液,在不断搅拌的情况下缓慢加入 6 mL 浓硫酸,在室温下放置 5 min,然后将该试管放入冰水中冷至 20℃ 以下,再加入 1 滴(0.05 mL)磷-羟基二苯溶液(按 1.0 g/dL 溶解于 0.08 mol/L NaOH 溶液中),将试管内液体混匀,室温下放置过夜,于在 570 nm 处用 1 cm 的比色皿以试剂空白为对照测其光密度。用醋酸锂(1.04~10.4 μg/mL, Sigma 公司)作标准曲线。所有样品皆两份^[6]。

1.3 反应装置

电化学生物反应系统采用硼硅酸玻璃制成,阴极和阳极用一种电合成的阳离子选择膜分隔开(见图 1)。除了质子或阳离子可以通过外,化学物质或代谢物均不能通过。阴阳极是精细的石墨纺织毡,并用铂丝将其与阴阳电极相连,选择铂丝的理由是其优于大多数材料的钝性和化学不活泼性。在阴极加入 150~170 mL 接种后的培养液,在阳极加入等容量的电解质溶液,参比和工作电极应完全浸入阴、阳极溶液中。生物反应器的底部不停地进行磁力搅拌,从培养的开始就通入直流电。

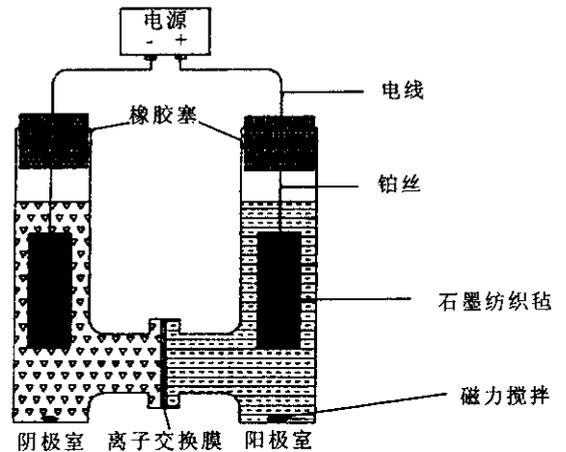


图 1 电化学生物反应装置简图

Fig. 1 Schematic figure of the electrochemical bioreactor system

2 结果与讨论

2.1 胚芽乳杆菌在 MRS 中的培养

MRS 肉汤是胚芽乳杆菌的标准培养基,不同的中性红浓度和电压值对乳酸增加百分率和 pH 值的影响见表 1。在 MRS 肉汤中,胚芽乳杆菌 24 h 内就可完成发酵。表 1 中中性红的浓度分别是 10, 50,

100 $\mu\text{mol/L}$,所使用的直流电电压分别为 0.5, 1.0 和 2.0 V. pH 值直接从发酵液测出,乳酸增加百分率(%)是相对于空白值(无电能、不加中性红)增加的百分率.表 1 还列出在电能和中性红共同作用(E-E F)与只加中性红、不加电能(N-E-E F)的对照.结果表明,在 MRS 肉汤培养基中,胚芽乳杆菌发酵的最适中性红浓度和电压是 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.5 V,在此条件下经过 24 h 发酵,乳酸质量分数增加 13.9%,最终 pH 值是 3.588.至于不同浓度中性红对发酵的影响,在电压为 0.5 V 和 1.0 V 的情况下,无论是在电能系统还是非电能系统,10 $\mu\text{mol/L}$ 的中性红浓度比 50, 100 $\mu\text{mol/L}$ 的效果都好,且 50 $\mu\text{mol/L}$ 略优于 100 $\mu\text{mol/L}$,即中性红的添加能增加乳酸的产量,且在适宜的电压作用下,其增加百分率要高得多.对于所使用的电压,在 MRS 肉汤培养基的 3 种中性红浓度中,有效电压 0.5 V 优于 1.0 V.当电压增加到 2.0 V 时,在所加的中性红浓度下,乳酸产量减少,电压对乳酸产量和 pH 值的影响较中性红大.

2.2 胚芽乳杆菌在水解液中的培养

在鳕鱼下脚料水解液中,不同的中性红浓度和电压值对乳酸增加百分率和 pH 值的影响见表 2.表 2 是发酵 24 h 和 48 h 的结果,其中性红浓度和电压值分别为 10, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.5, 1.0, 1.5 V.发酵 24 h 时,最佳的中性红浓度和电压值分别是 100 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.5 V,其 pH 值和乳酸的相对增加量为 4.248% 和 11.5%.经过 48 h 的培养后,最佳的中性红浓度和电压值是 100 $\mu\text{mol/L}$ 和 1.0 V,其 pH 值和乳酸的相对增加量为 4.060% 和 11.7%.相对于 MRS 肉汤培养基,在鳕鱼下脚料水解液中,中性红浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的影响较 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 50

$\mu\text{mol/L}$ 大,而在 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 之间的影响不大.从表 2 还可以看出,在电压为 0.5 V 下,发酵 24 h 的乳酸增加量大于发酵 48 h 的乳酸增加量.而在电压为 1.0 V 下,除了中性红浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的样品外,发酵 48 h 的乳酸增加量大于发酵 24 h 的乳酸增加量.当电压增至 1.5 V 时,乳酸产量低于对照样, pH 值高于对照样.对中性红的影响,除了 1.5 V 的情况外,几乎所有其它样品(50 $\mu\text{mol/L}$, 0.5 V, N-E-E F 样除外)在试验的中性红浓度下,其乳酸质量分数都高于对照样, pH 值低于对照样;所有样品在 0.5 V 和 1.0 V 的作用下的乳酸产量和 pH 值都优于非电压作用的样品.

比较胚芽乳杆菌在 MRS 和水解液电能发酵中的最适条件,在水解液中 NR 浓度和电压值(100 $\mu\text{mol/L}$, 1.0 V)皆高于在 MRS 中的值(10 $\mu\text{mol/L}$, 0.5 V),且能耐受的最高电压、发酵周期和最低 pH 值也不同,这可能是由于水解液中固形物质量分数较高(16%~18%),导致了高渗透压影响菌体的正常生长,但电能发酵对菌体的生长和产酸有明显的促进作用.同时,在电能(E-E F)或非电能(N-E-E F)系统中,中性红的添加能有效地增加乳酸产量,这可能是由于中性红的性质如非抑制性、亲脂性、高疏水性和低电容使乳酸产量在电能或非电能系统中都有所增加.在电能系统中,电流可作为一种外加的还原力源,但完整的细胞不能直接与电极作用,而被电能还原的中性红载有电子,当中性红与细胞膜耦合时,电子进入细胞的新陈代谢,使细胞生长速度加快并产生更多的代谢产物^[7].当电压增加到一定值时,胚芽乳杆菌的生长和代谢就会受阳极溶液电解作用的影响,因为电解作用会在阳极产生诸如氯气这样的有毒产物.

表 1 MRS 肉汤中中性红浓度和电压值对乳酸质量分数和 pH 值的影响

Tab. 1 Effect of different NR concentration and applied voltage on lactic acid production(as % of control) and pH value in MRS broth

电压/V	pH 值或乳酸增加百分率/%	中性红溶液浓度					
		10 $\mu\text{mol/L}$		50 $\mu\text{mol/L}$		100 $\mu\text{mol/L}$	
		E-E F (1)	N-E-E F (2)	E-E F	N-E-E F	E-E F	N-E-E F
0.5	pH 值	3.588	3.709	3.637	3.680	3.649	3.399
	乳酸增加百分率/%	13.9	5.5	4.2	2.3	3.8	1.6
1.0	pH 值	3.670	3.708	3.701	3.722	3.630	3.689
	乳酸增加百分率/%	10.9	3.6	2.5	0.5	1.4	1.0
2.0	pH 值	3.740	3.690	3.755	3.706	3.698	3.633
	乳酸增加百分率/%	-10.0	3.3	-5.3	2.4	-7.0	1.4

注: E-E F, 电能发酵; N-E-E F, 指非电能发酵(Non-electro-energizing fermentation), 但加有中性红(下同).

万方数据

表 2 鳕鱼下脚料水解液中中性红浓度和电压值对乳酸质量分数和 pH 值的影响

Tab.2 Effect of different NR concentration and applied voltage on lactic acid production(as % of control) and pH value in had-dock hydrolysate

电压/V	pH 值或乳酸增加百分率/%	发酵时间/h	中性红溶液浓度					
			10 $\mu\text{mol/L}$		50 $\mu\text{mol/L}$		100 $\mu\text{mol/L}$	
			E-E F (1)	N-E-E F (2)	E-E F	N-E-E F	E-E F	N-E-E F
0.5	pH 值	24	4.254	4.330	4.272	4.295	4.248	4.296
		48	4.130	4.186	4.138	4.154	4.136	4.181
	乳酸增加百分率/%	24	7.1	3.6	4.8	1.1	11.5	4.1
		48	4.2	1.5	1.8	-2.2	10.6	5.5
1.0	pH 值	24	4.304	4.335	4.304	4.315	4.260	4.351
		48	4.143	4.187	4.133	4.169	4.060	4.198
	乳酸增加百分率/%	24	8.8	3.9	2.2	1.7	5.3	3.3
		48	3.4	1.4	7.0	4.5	11.7	2.1
1.5	pH 值	24	4.325	4.315	4.345	4.298	4.328	4.287
		48	4.200	4.157	4.264	4.201	4.197	4.157
	乳酸增加百分率/%	24	-0.8	1.3	-7.3	5.1	-6.7	4.5
		48	-2.1	6.2	-6.0	4.5	-4.0	1.4

3 结 论

中性红和电压对胚芽乳杆菌在 MRS 肉汤培养基和鳕鱼下脚料水解液的作用有明显的不同:首先,产生最高乳酸量和最低 pH 值的中性红浓度和电压值不同.在鳕鱼下脚料水解液中,其中性红浓度和电压值(100 $\mu\text{mol/L}$ 、1.0 V)都高于 MRS 肉汤培养基(10 $\mu\text{mol/L}$ 、0.5 V);第二,最高的有效电压不同.在鳕鱼下脚料水解液中电压应低于 1.5 V,而在 MRS 肉汤培养基中应低于 2.0 V;第三,胚芽乳

杆菌在 MRS 肉汤培养基中的发酵周期为 24 h, pH 值可达 3.588,而在鳕鱼下脚料水解液中发酵周期为 48 h,最终 pH 值为 4.06.对中性红而言,无论在电能(E-E F)或非电能(N-E-E F)系统中,中性红的添加都能有效地增加乳酸产量,同时,在有效的电压范围内,电能使乳酸产量的提高明显高于对照,发酵液的 pH 值降低更明显.

初步探讨了电能发酵在鳕鱼下脚料水解液乳酸发酵中的作用,至于不同种类电子载体的选择及添加的时间、电能作用开始的时间、不同电极材料的影响等方面都有待进一步研究.

参考文献:

- [1] Radu Giurca, Robert E Levin. Optimization of the lactic acid fermentation of hydrolyzed cod gurry with molasses[J]. *J Food Biochem*, 1992, 2: 83-97.
- [2] Cao H, Giurca R, Levin R E. Continuous propionic acid fermentation of hydrolyzed cod(gadus morhua) gurry[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 1997, 21: 371-382.
- [3] Motoyoshi Hongo, Masayoshi Iwahara. Application of electro-energizing method to L-glutamic acid fermentation[J]. *Agric Biol Chem*, 1979, 43(10): 2075-2081.
- [4] Park D H, Laivenieks M, Guettler M V, et al. Microbial utilization of electrically reduced neutral red as the sole electron donor for growth and metabolite production[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 7: 2912-2917.
- [5] 李再资. 生物化学工程基础[J]. 北京:化学工业出版社, 2002. 58-61.
- [6] Barker S B, Summerson W H. Colorimetric determination of lactic acid[J]. *J Biol Chem*, 1941, 138: 535.
- [7] Park D H, Zeikus J G. Utilization of electrically reduced neutral red by *actinobacillus succinogenes*: Physiological function of neutral red in membrane-driven $\mu\text{mol/L}$ rate reduction and energy conservation[J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 4: 2403-2410.

(责任编辑:杨萌,李春丽)