

文章编号:1009-038X(2004)06-0103-04

## 鳕鱼下脚料水解液的连续乳酸发酵

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:** 探讨了胚芽乳杆菌在鳕鱼下脚料水解液(4 g/L 葡萄糖)中的生长及产酸情况, 结果表明, 在 32℃ 的恒温室, 经过 24 h 的静止培养, 水解液的 pH 值为 4.3, 菌落数(CFU)为  $4.0 \times 10^9$ , 低于相同条件下在 MRS 培养的 pH 值 3.8, 菌落数(CFU)  $5.5 \times 10^9$ ; 但在水解液中培养至 72 h 时, 水解液的 pH 值可降至 4.1. 在水解液中静止培养的前 20 h 是胚芽乳杆菌生长的旺盛期, 连续培养应从静止培养 15 h、pH 值 4.5 左右开始. 在连续培养的 105 h 内, 新鲜培养基的流加速度为 70 mL/d, pH 值几乎能恒定在 4.5 左右, 葡萄糖和乳酸含量也基本保持恒定.

**关键词:** 鳕鱼下脚料水解液; 胚芽乳杆菌; 连续发酵

**中图分类号:** TQ 921.3

**文献标识码:** A

## Continuous Lactic Acid Fermentation of Haddock Hydrolysate

LU Hong-mei

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

**Abstract:** In this paper, *Lactobacillus plantarum* was incubated in haddock hydrolysate with 4.0 g/L glucose at 32 °C. After 24 hours' incubation, the pH value and the colony forming units (CFU) were 4.3 and  $4.0 \times 10^9$  respectively, while those values in fermentation with MRS medium 3.8 and  $5.5 \times 10^9$ , respectively. The pH value of haddock hydrolysate could reach to 4.1 after 72 hours' batch incubation, and the fast growth period was the first 20 hours. The continuous fermentation was started after 15 hours' batch incubation and the pH value dropped to 4.5. Continuous lactic acid fermentation was successfully conducted for a period of 105 hours at a nutrient feed rate of 70 mL/d, and a constant pH of 4.5, lactic acid and glucose concentration were maintained constantly.

**Key words:** haddock hydrolysate; *Lactobacillus plantarum*; continuous fermentation

近年来,我国对鱼下脚料研究的主要方向是对低值蛋白资源的高值化利用,生产如鱼露、水解鱼蛋白等附加值较高的产品,但其工艺复杂、生产成本低、加工损失较大<sup>[1~3]</sup>. 国外则更多的直接将鱼下

脚料水解液酸化后作饲料或肥料,该方法工艺简单、成本低、无大量废水产生. 鳕鱼的下脚料是除去市售鱼肉后所剩的鱼头、尾和骨骼(有时也包括内脏),约占原鱼的 60%. 鳕鱼下脚料水解液来自绞碎

收稿日期:2004-02-12; 修回日期:2004-04-08.

作者简介:卢红梅(1967-),女,重庆忠县人,副教授,环境化学博士研究生.

的下脚料,在较高温度经木瓜蛋白酶使蛋白质水解,鱼骨过滤去除后,将水解液进行酸化处理以作饲料添加剂或肥料.对于酸化处理,可用有机酸或无机酸,如果仅用如硫酸等无机酸,其pH值必需降至2.0才能较长时间地保藏,并且在肥料或饲料添加剂被使用之前必需进行中和处理,利用乳酸发酵将pH值降至4.0左右,再加0.1%~0.2%的苯甲酸、丙酸或山梨酸就能达到长期保藏的目的.利用有机酸降低酸度具有较大优势,因为这样就能直接利用鱼类下脚料而不需要预先中和,并且有机酸和微生物菌体能被饲养动物和土壤利用,可提高饲料的营养价值且不会产生由于利用无机酸时导致的土壤酸度逐渐下降而破坏土壤的结果<sup>[4,5]</sup>.

胚芽乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*),又名植物乳杆菌,属于一种产酸能力较高的同型乳酸发酵菌种,适合于对鳕鱼下脚料水解液进行乳酸发酵,但发酵时需外加可发酵性糖,已有利用废糖蜜作碳源成功的报道<sup>[4]</sup>.作者主要探讨了添加葡萄糖时鳕鱼下脚料水解液的乳酸发酵及连续发酵系统的建立.

## 1 材料与方 法

### 1.1 鳕鱼下脚料水解液的制备

将鳕鱼下脚料用绞肉机绞碎,加入质量分数0.0125%的乙氧喹和质量分数0.05%的木瓜蛋白酶水溶液;71℃搅拌加热15 min,再升温至90℃,保持10 min灭酶;最后用冰水将醪液降温至40~45℃,用20目的尼龙网过滤,滤过液即水解液贮于一20℃备用.

### 1.2 微生物培养条件

胚芽乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)是从水化的Stabilisil(商业用多种乳酸菌复合粉末,Medipharm,USA)中分离出来的.菌体保存在冷冻的MRS加体积分数15%甘油的贮存液中(-75℃).使用前先在室温或32℃水浴中解冻菌液,后将菌液用划线法在MRS平板上进行分离,32℃下培养24 h.培养皿上应无杂菌生长,挑选较大的典型菌落接种于MRS试管斜面上,32℃下培养24 h,将一环菌液接种入MRS试管,32℃下培养12~24 h,即得菌种接种液<sup>[6]</sup>.

### 1.3 间歇和连续发酵方法

50 g/L的葡萄糖水溶液单独灭菌,冷却后无菌加入经过灭菌、冷却的鳕鱼下脚料水解液中,使葡萄糖的质量浓度为4.0 g/L,将扩培好的胚芽乳杆

菌接种液按接种量体积分数5%接入水解液中.在32℃恒温室内静止培养,并定期取样分析.

对于连续发酵,先将200 mL接种后的醪液静止培养15 h,然后将培养液无菌移入已灭菌的连续发酵系统中.该系统的发酵容器带有侧管,并与一装有500 mL的已灭菌、调糖的水解液贮液槽相连,一个计量泵控制液体从贮液槽进入发酵室,计量泵的开关由时间控制器(Fisher Scientific, Cat. No. 06-662-7)控制.新鲜培养基从发酵室顶部的管内泵入发酵室底部,底部的磁力搅拌器在不停地搅拌,当新鲜培养基泵入时,从发酵室的侧臂上等量地流出已发酵好的醪液并进入收集器内.

## 1.4 样品分析

1.4.1 乳酸分析 见文献<sup>[6,7]</sup>.

1.4.2 葡萄糖分析 取1 mL解冻的上清液放入试管内,加入1 mL酶液(0.045 mol/L醋酸缓冲液中加入59 μg/mL 3,3'-二甲氧基联苯胺、8.7 μg/mL过氧化物酶、0.9 μg/mL葡萄糖氧化酶,调pH值为5.1),试管在37℃中水浴保温1 h,取出后加1滴1 mol/dm<sup>3</sup> HCl,再加1 mL蒸馏水,然后在400 nm下以试剂为空白测光密度值,定量计算可查葡萄糖标准曲线(0~4 mg/管).所有样品均一式2份.

1.4.3 pH值测定 无菌吸取发酵液5~10 mL,放入洁净试管内,待冷至室温后用数字pH计(Fisher Scientific Accumet Model 25 pH/ion meter)直接测量,pH计使用前用pH 4.0和pH 7.0的缓冲液标准化.

## 2 结果与讨论

### 2.1 鳕鱼下脚料水解液对胚芽乳杆菌的影响

过20目筛的水解液呈醪液状,其固形物质量分数约为16.5%.将胚芽乳杆菌培养在含葡萄糖4 g/L的水解液和最适培养基MRS(4 g/L葡萄糖)肉汤中,图1从pH值及菌落数的变化体现胚芽乳杆菌在这两种基质中的生长情况.从图1可见,经过24 h的培养,胚芽乳杆菌在水解液中培养时其pH值的降低速度低于在MRS中培养的情况,且最终pH值在水解液中为4.3,而在MRS中为3.8;从菌体的生长情况看,在水解液中菌体的生长在开始有一速度较慢的缓冲阶段(2 h),在MRS中则没有,菌落的生长速率和最大生长量也略低于在MRS中的培养.虽然胚芽乳杆菌不能以最佳的状态在水解液中生长和产酸,但也能满足乳酸发酵的要求.

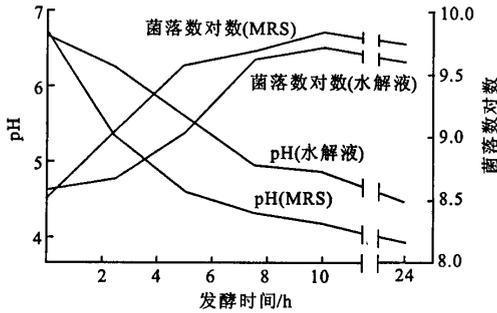


图 1 胚芽乳杆菌培养在水解液及 MRS 中的 pH 值及菌落数比较

Fig.1 The pH values and colony forming units (CFU) in MRS broth and haddock hydrolysate

2.2 鳕鱼下脚料水解液中胚芽乳杆菌的静止培养

当葡萄糖溶液为 4 g/L 时,胚芽乳杆菌在鳕鱼下脚料水解液中乳酸发酵的 pH 值、乳酸及葡萄糖含量的变化见图 2。从图中可看出,在发酵的前 20 h 内,发酵液的 pH 值下降、葡萄糖含量减少和乳酸含量增加几乎都呈线性关系,20 h 后,pH 值、葡萄糖和乳酸含量的变化趋于缓和,当发酵至 72 h 时,水解液的 pH 值为 4.1,说明经过较长时间的培养,其 pH 值能降至 4.0 左右,可满足贮藏的要求。同时,培养的前 20 h 是发酵最旺盛的时期,连续发酵应当在菌体生长的对数生长期到稳定期之间,故连续发酵必须从前 20 h 的某一点开始。

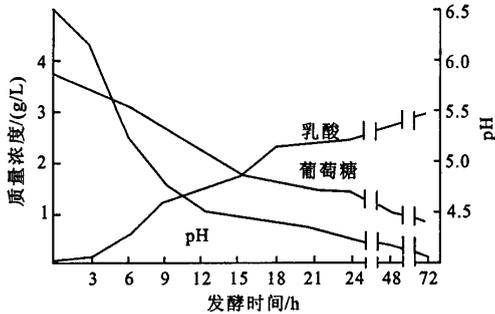


图 2 水解液乳酸发酵过程中 pH 值、乳酸及葡萄糖含量随时间的变化

Fig.2 The changes of pH value, lactic acid and glucose concentrations in haddock hydrolysate with *L. plantarum* fermentation

2.3 连续发酵前,静止培养时间的确定

从图 2 可知,连续发酵应从间歇培养的 20 h 以内开始,具体应静止培养多久,图 3 中 A,B,C 3 个样分别取静止培养 10,15,20 h 时开始连续培养的结果。这 3 个样的 pH 值分别为 4.7,4.5,4.3;菌落数分别为  $5.16 \times 10^9$ ,  $6.10 \times 10^9$ ,  $4.08 \times 10^9$ ;连续发

酵时新鲜培养基的流加速度分别为 70,70,55 mL/d。图 3 中样品 A 是初始 pH 值为 4.7,即培养 10 h 的样品,此时菌落数经过 10 h 的培养尚未达到最高值,当新鲜培养基的流加速度为 70 mL/d 时,在 80 h 培养时间内 pH 值从 4.7 升至 4.9;若静止培养 20 h(样品 C)时开始连续培养,由于难以保持较低的初试 pH 值(pH 4.3),同时活菌数已有所降低,培养液即使流加速度较低(55 mL/d),在连续发酵的 80 h 内其 pH 值仍从 4.3 升至 4.5;只有当静止培养 15 h、pH 值为 4.5 的样品 B,其菌落数可达最高,在适当的新鲜培养液流加速度下(70 mL/d),pH 值基本稳定在 4.5 左右。故在连续发酵前,静止培养时间应为 15 h、pH 值 4.5 左右。虽然鳕鱼水解液经连续发酵后的 pH 值在 4.5 左右,由于胚芽乳杆菌为兼性厌氧微生物,在缺氧的情况下仍能继续发酵,将 pH 值在 4.5 左右的发酵液密闭置于常温下,1 周内其 pH 值能降至 4.0 左右。

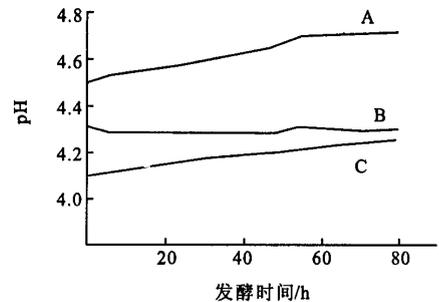


图 3 不同静止培养时间开始连续发酵的 pH 值比较

Fig.3 The pH value changes in continuous fermentation with different starting time

2.4 连续发酵中最适培养基流加速度的确定

取静止培养至 pH 值 4.5 左右的发酵液开始连续发酵,图 4a,4b,4c 是新鲜培养基流加速度分别为 50,70,120 mL/d 时,在 75~105 h 连续发酵过程中,发酵液的葡萄糖、乳酸含量及 pH 值的变化情况。从图 4c 中可看出,当流加速度为 120 mL/d 时,75 h 的连续培养过程中,pH 值从 4.5 增至 4.7,葡萄糖含量不断增加,乳酸含量不断减少,这已破坏了连续发酵所要求的平衡,说明流加速度过快;从图 4a 可知,当流加速度为 50 mL/d 时,经过 105 h 的连续培养,pH 值从 4.5 降至 4.3,葡萄糖含量不断下降,乳酸含量不断上升,这说明培养基流加速度过低;由图 4b 可知,当流加速度为 70 mL/d 时,pH 值、葡萄糖和乳酸含量在 105 h 的连续发酵过程中虽有一定的波动,但几乎都能稳定在连续发酵的起始值,说明 70 mL/d 的培养基流加速度较适合。故连续发酵中最适培养基流加速度以 70 mL/d

为宜。

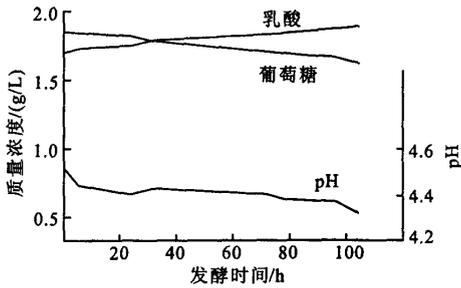


图4a 流加速度为50 mL/d的连续乳酸发酵

Fig. 4a Continuous lactic acid fermentation with 50 mL/day nutrient feed rate

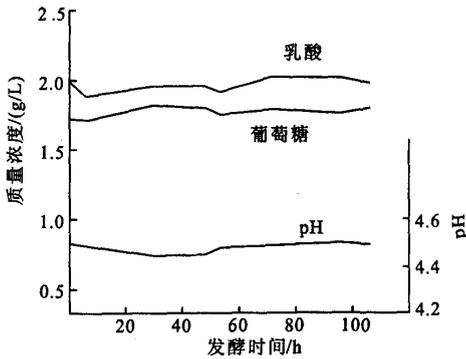


图4b 流加速度为70 mL/d的连续乳酸发酵

Fig. 4b Continuous lactic acid fermentation with 70 mL/day nutrient feed rate

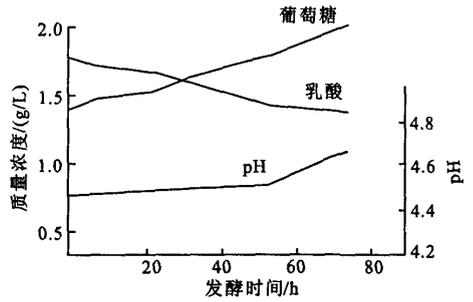


图4c 流加速度为120 mL/d的连续乳酸发酵

Fig. 4c Continuous lactic acid fermentation with 120 mL/day nutrient feed rate

### 3 结论

鳕鱼下脚料水解液对胚芽乳杆菌的生长和产酸虽有一定的影响,但能在培养到72 h时,使水解液的pH值降至4.1,基本满足贮藏对水解液的要求;对鳕鱼下脚料水解液的连续发酵而言,连续发酵前静止培养,以15 h、发酵液pH值4.5左右为宜,此时菌落数达最大,易使连续培养系统保持稳定;在鳕鱼下脚料水解液的连续发酵过程中,新鲜培养基的流加速度以70 mL/d为宜。

### 参考文献:

- [1] 邓尚贵,彭志英,杨萍,等.多酶法在鱼露生产工艺中的应用[J].食品与发酵工业,2001,8(2):32-36.
- [2] 杨萍,邓尚贵,夏杏洲,等.青鱼下脚料水解蛋白的制取及其营养评价[J].海洋科学,2002,26(7):54-58.
- [3] 余杰,陈美珍.酶法制备水解鳕鱼头蛋白及其应用的研究[J].中国海洋药物,2000,19(5):50-55.
- [4] 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.
- [5] Cao H, Giurca R, Levin R E. Continuous propionic acid fermentation of hydrolyzed cod (*gadus morhua*) gurry[J]. J Food Biochem, 1997, 21: 371-382.
- [6] 卢红梅. 电能在鳕鱼下脚料水解液乳酸发酵中的应用[J]. 无锡轻工大学学报, 2003, (4): 72-75.
- [7] Bar S B, Ker S, Summerson W H. Colorimetric determination of lactic acid[J]. J Biol Chem, 1941, 138: 535.

(责任编辑:杨勇)