

不同培养基对酒酒球菌 SD-2a 存活率及膜脂肪酸组分的影响

赵文英^{1,2}, 李华^{1*}, 王爱莲¹, 李中超¹, 王华¹

(¹西北农林科技大学葡萄酒学院, 杨陵 712100)

(²中北大学化工与环境学院, 太原 030051)

摘要:【目的】为获得高效的葡萄酒乳酸菌发酵剂, 本文研究了 3 种具有不同 pH 缓冲能力的培养基对酒酒球菌接种存活率、冻干存活率及细胞膜脂肪酸组分的影响。【方法】采用平板计数法测定菌体的接种存活率、冻干存活率; 并采用 GC/MS 色谱方法测定收获菌体细胞膜脂肪酸组分。【结果】实验结果表明, 没有添加苹果酸的 ATB 培养基, 其 pH 缓冲能力弱。分别与 FMATB 和 MATB 培养基相比, ATB 培养基培养获得的菌体, 其接种模拟酒培养基后的存活率提高了 20.3% 和 40.2%, 其冷冻干燥存活率提高了 48.5% 和 68.3%, 其细胞膜中 C19cyc11 的相对含量提高了 10.0% 和 36.8%, 其细胞膜 U/S 值提高了 20.4% 和 45.2%。【结论】本文推测 ATB 培养基培养所得菌体, 由于自我酸胁迫反应, 增强了其对葡萄酒胁迫因素及冷冻干燥的抗性, 而该反应与菌体细胞膜脂肪酸组分的变化密切相关。故 ATB 培养基更适合于酒酒球菌 SD-2a 发酵剂的制备。

关键词: 酒酒球菌; 接种存活率; 冻干存活率; 膜脂肪酸组分

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 10-1319-05

苹果酸-乳酸发酵 (Malolactic fermentation, MLF) 可使新 (生) 葡萄酒的酸涩、粗糙等特点消失, 达到理想的酸度平衡, 果香、醇香加浓, 酒体柔软、肥硕, 微生物稳定性增强。而能够适应葡萄酒环境、较专一地进行 MLF、并对葡萄酒质有增益作用的主要是酒酒球菌 (*Oenococcus oeni*)^[1]。由于葡萄酒生境恶劣复杂, 人工接种诱导 MLF 时, 往往由于菌体的大量死亡, 而无法成功启动 MLF^[2]。究其原因有两方面, 一是实验室培养获得的菌体失去了对葡萄酒环境的天然抗性, 造成接种存活率下降^[3]; 二是菌体在冷冻干燥过程中受到损伤, 导致冻干后存活细菌数减少^[4,5]。因此, 对于葡萄酒乳酸菌发酵剂的生产, 除保证菌体的高密度培养外, 更需注重培养条件对菌体接种存活率和冻干存活率影响的研究。

酒酒球菌的酸胁迫适应性反应机制^[6]已引起了人们的广泛关注, 并有研究^[7-10]认为经酸胁迫处理后

的酒酒球菌能通过合成胁迫蛋白及改变细胞膜流动性, 以提高菌体的接种存活率。本论文以酒酒球菌 SD-2a 为试材, 研究了具有不同 pH 缓冲能力的培养基对菌体接种存活率、冻干存活率及细胞膜脂肪酸组分的影响, 以评价菌体的自我酸胁迫是否可以提高其对葡萄酒环境及冷冻干燥的抗性。同时通过测定不同培养基条件下, 菌体细胞膜脂肪酸组分的变化, 以阐明在膜脂肪酸水平上酒酒球菌的自我酸胁迫适应机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 酒酒球菌 SD-2a, 山东烟台地区自然 MLF 分离获得, 并通过了生理及分子生物学鉴定^[11]。该菌保存在 -80℃ 冰箱中。

1.1.2 培养基: ① 基础培养基: 每升含 5 g 酵母浸粉, 10 g 蛋白胨, 0.2 g MgSO₄·7H₂O, 0.05 g MnSO₄·4H₂O,

基金项目: 陕西省科技攻关项目(2005K02-G02)

*通讯作者。Tel/Fax: +86-29-87092107; E-mail: lihuawine@nwsuaf.edu.cn

作者简介: 赵文英(1977-), 女, 山西临汾人, 讲师, 博士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: zzrlzwy2@sohu.com

收稿日期: 2008-04-01; 修回日期: 2008-05-22

0.5 g 盐酸半胱氨酸, 250 mL 番茄汁。番茄汁的制备: 新鲜西红柿, 沸水浸泡, 去皮, 挤汁过滤后, 在沸水中煮 2 h, 过滤后低温过夜, 高速离心 (6000 × g, 10 min), 取上清液。② 在基础培养基的基础上, 改变碳源组成, 建立 ATB、FMATB、MATB 培养基, 见表 1。蒸馏水配制, 调至 pH 4.8, 100 kPa 灭菌 20 min。

表 1 各培养基中的碳源组成

Table 1 Addition of glucose, fructose, DL-malate to basal medium

Medium	Glucose/(g/L)	Fructose/(g/L)	DL-malate/(g/L)
ATB	10		
FMATB	2	3	5
MATB			10

1.1.3 模拟酒培养基: ① 模拟酒精发酵结束后葡萄酒的基础培养基参照 Vaillant^[12]。② 以基础培养基为基础, 分别用 0.5 mol/L HCl/NaOH 调节培养基 pH, 用无水乙醇调节培养基乙醇含量, 配制成 A、B、C、D 4 种 pH、乙醇含量不同的模拟葡萄酒培养基, 见表 2。由于 SO₂ 易挥发, 且游离 SO₂ 量与 pH 密切相关, 不容易控制, 因此在模拟酒培养基中没有添加 SO₂。

表 2 模拟酒培养基的胁迫因素

Table 2 Stress factors in wine-like media

Stress factors	Wine-like media			
	A	B	C	D
pH value	3.5	3.5	3.2	3.2
Alcohol content (V/V)	10%	14%	10%	14%

1.1.4 主要试剂和仪器: GC/MS: Thermo Trace GC ultra-DSQ, 美国 Finnigan 公司; 冷冻干燥机: Virtis GENESIS XL, 美国 SP 工业公司; 752 分光光度计: 上海第三分析仪器厂; pH-3B 型精密 pH 计: 上海雷磁仪器厂。

1.2 酒球菌 SD-2a 在不同培养基中生长曲线的测定

在进行生长试验之前, 将冷冻保藏的 SD-2a 菌株转接至 ATB 培养基中, 在 25℃ 条件下活化 7 d, 然后在同样的培养基中, 再转接 2 次, 分别培养 72 h。将第 3 次培养好的菌悬液, 按 2% (V/V) 接种量接入 100 mL 各培养基中^[2]。每种培养基设置 3 个重复。在 25℃ 条件下静置培养, 每隔 6 h 吸取一定量的菌悬液, 测定其在 600 nm 处的吸光度值。并用 pH 计测定培养基 pH 值, 绘制出生长曲线。

1.3 接种模拟酒培养基后存活率的测定

离心 (6000 × g, 10 min, 20℃) 收获不同培养基条件下生长至稳定前期的菌悬液, 用灭菌的生理盐水冲洗

2 次, 并稀释至 OD₆₀₀ 约为 0.6, 然后将稀释后的菌悬液按 1% (V/V) (即约 5.0 × 10⁶ CFU/mL) 的接种量直接接入 100 mL 各模拟酒培养基中, 在 20℃ 避光条件下密闭发酵。利用梯度稀释平板计数法测定接种模拟葡萄酒培养基起始和 48 h 后的活菌数。独立进行接种试验 2 次。

接种存活率的计算:

$$\text{接种存活率} = N_{48h} / N_{0h} \times 100\%$$

N_{0h} 是模拟葡萄酒培养基中起始的活菌数 (CFU/mL)

N_{48h} 是接种后 48h 模拟葡萄酒培养基中的活菌数 (CFU/mL)

1.4 冻干存活率的测定

离心 (6000 × g, 10 min, 4℃) 收获不同培养基条件下生长至稳定前期的菌悬液, 用灭菌后的生理盐水冲洗菌体 2 次, 然后将菌体按 1:10 (W/W) 比例重新悬浮在灭菌后的保护剂溶液中。在室温条件下平衡 15 min 后, 将菌悬液分装在 5 mL 小瓶内, 在冷冻干燥机中真空冷冻干燥 33 h。冻干后的样品立即用同体积的去离子水复水, 在室温下平衡 15 min。利用梯度稀释平板计数法测定冻干前后活菌数。独立进行冻干试验 3 次。

冻干存活率的计算:

$$\text{冻干存活率} = N_a / N_b \times 100\%$$

N_b 是冷冻干燥前菌悬液的活菌数 (CFU/mL)

N_a 是冷冻干燥后菌悬液的活菌数 (CFU/mL)

1.5 细胞膜脂肪酸组分的测定

离心 (10000 × g, 5 min, 4℃) 不同培养基条件下生长至稳定前期的菌悬液, 用灭菌的生理盐水冲洗菌体 2 次, 细胞膜脂肪酸的提取及甲基化方法参照 Rozes^[13]。每种脂肪酸的百分含量可通过计算各脂肪酸峰面积和总体脂肪酸峰面积和的比值来表示。

GC/MS 色谱条件: BPX 70 毛细管色谱柱 60 m × 0.25 mm × 0.3 μm (SGE, Victoria, Australia); 氦气为载气, 流速 1 mL/min; 进样口温度: 230℃; 检测温度: 230℃; 柱温程序: 起始 50℃, 保持 0.5 min, 再以 20℃/min 的速度升高至 100℃, 保持 0.5 min, 再以 6℃/min 的速度升高至 220℃, 然后在此温度下保持 12 min。不分流进样, 进样量 1.0 μL。

质谱条件: 离子源温度 200℃; 电子能量 70 eV; 接口温度 220℃; 电子倍增电压 1568 V; 检测离子 m/z 范围 33 ~ 450。

1.6 数据处理

采用 DPSv7.55 数据处理软件对实验数据的方差显著性进行分析。

2 结果

2.1 不同培养基条件下酒酒球菌 SD-2a 的生长曲线

酒酒球菌可分解己糖,生成有机酸,如乳酸、乙酸等,引起培养基 pH 下降。同时也可以利用培养基中的苹果酸,生成乳酸和 CO₂,引起培养基 pH 升高。酒酒球菌 SD-2a 接种于 3 种培养基中,其 OD 值和培养液 pH 的变化如图 1 所示。其中,ATB 培养基的生长量最大,其次是 FMATB,产量最低的是 MATB。而且不同培养基的 pH 变化有明显差异。ATB 培养基终 pH 最低,为 3.6,FMATB 培养基终 pH 居中,为 4.1,MATB 培养基终 pH 最大,为 4.9。由此可见,培养基中 DL-苹果酸含量越高,其培养基 pH 缓冲能力越强。

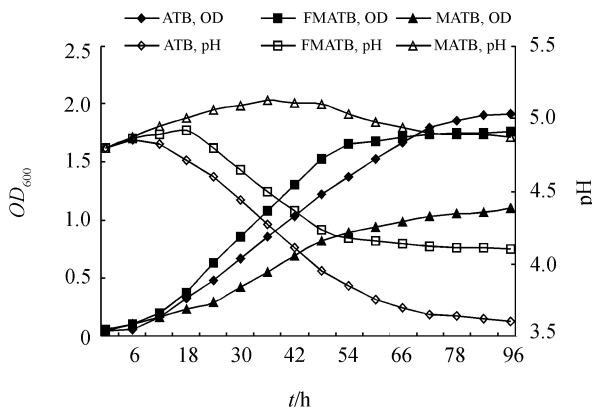


图 1 不同培养基条件下酒酒球菌 SD-2a 的生长及 pH 变化曲线

Fig. 1 The growth curve and change in pH when *O. oeni* SD-2a cells cultured in different media.

2.2 不同培养基对接种存活率的影响

从表 3 中可看出,随着模拟酒培养基胁迫因素的增强,菌体的接种存活率依次降低。但在 4 种模拟酒培养基中,ATB 培养基所获菌体的接种存活率始终最高,其平均接种存活率为 29.6%;其次是 FMATB 培养基,其平均接种存活率为 24.6%;接种存活率最低的是 MATB 培养基,其平均接种存活率为 21.1%。分

表 3 接种存活率的测定结果(n=2)

Table 3 Survival rate after direct inoculation in wine-like medium with cells cultured in different media

Culture medium	Survival rate after direct inoculation in wine-like media (%)			
	A	B	C	D
ATB	65.5	40.7	7.8	4.5
FMATB	56.8	33.2	5.3	2.9
MATB	48.1	29.9	4.4	2.0

A: a wine-like media with pH3.5, 10%alcohol; B: a wine-like media with pH3.5, 14%alcohol; C: a wine-like media with pH3.2, 10%alcohol; D: a wine-like media with pH3.2, 14%alcohol.

别与 FMATB 和 MATB 培养基相比,ATB 培养基培养所得菌体的接种存活率提高了 20.3%和 40.2%。

2.3 不同培养基对冻干存活率的影响

从冻干试验结果可看出,ATB 培养基所获菌体的冻干存活率为 69.5%,显著高于 FMATB、MATB 培养基,且后两者没有显著性差异。Zhao^[5]在所选最佳保护剂和复水条件下,获得的酒酒球菌最大冻干存活率仅为 53.6%。而 ATB 培养基所获菌体的冻干存活率大于该值。分别与 FMATB 和 MATB 培养基相比,ATB 培养基培养所得菌体的冻干存活率提高了 48.5%和 68.3%。

表 4 不同培养基所得菌体的冻干存活率(n=3)

Table 4 Freeze-drying viability of *O. oeni* SD-2a cells cultured in different media

Culture medium	Freeze-drying viability/%
ATB	69.5 ± 5.8 ^a
FMATB	46.8 ± 6.7 ^b
MATB	41.3 ± 3.2 ^b

^{a,b} statistically different significance (p<0.05).

2.4 不同培养基对细胞膜脂肪酸组分的影响

为探讨不同培养基组分对酒酒球菌生理状态的影响,测定了不同培养基条件下所获菌体的膜脂肪酸组分的相对含量,见表 5。从表中可看出,在被检测出的 11 种膜脂肪酸中,C14:0、C16:0、C16:1cis9、18:1cis11 和 C19cyc11 为主要脂肪酸,共占总脂肪酸含量的 90%以上,这与文献结果一致^[14]。且随着培养基终 pH 的降低,菌体细胞膜脂肪酸组分中 C16:0 相对含量依次降低,而 C19cyc11 相对含量则依次升高。分别与 FMATB 和 MATB 培养基相比,ATB 培养基培养所得菌体细胞膜中 C19cyc11 的相对含量提高了 10.0%和 36.8%。相对应,3 种培养基对菌体细胞膜 TUFA 相对含量的影响较小,变化最明显的是 TSFA 和 TCFA。如果将 CFA 视为 UFA,且将细胞膜 UFA 与 SFA 的比值 (U/S) 作为细胞膜流动性的指标^[14],则 ATB 培养基所获菌体细胞膜的 U/S 值为 1.83,其膜流动性最大;其次是 FMATB,U/S 值为 1.52,其膜流动性居中;MATB,U/S 值为 1.26,其膜流动性最小。分别与 FMATB 和 MATB 培养基相比,ATB 培养基培养所得菌体细胞膜 U/S 值提高了 20.4%和 45.2%。

由此可见,具有不同 pH 缓冲能力的培养基显著影响着菌体细胞膜脂肪酸组分的组成比例,其中酸化能力强的 ATB 培养基明显降低了菌体细胞膜中 C16:0 的相对含量,增加了 C19cyc11 的比例,且增加了细胞膜 U/S 值。这表明菌体为适应不断酸化的环境,促进了 C19cyc11 脂肪酸的合成,并使得细胞膜流动性增加。

表 5 不同培养基条件下稳定前期的酒酒球菌 SD-2a 细胞膜脂肪酸组分

Table 5 Fatty acid composition of early stationary phase cells of *O. oeni* SD-2a cultured in different media

Fatty acids	Relative percent of fatty acid composition/%		
	ATB	FMATB	MATB
C14:0	4.88±0.78	3.25± 0.41	4.20±1.20
C14:1trans11	0.35±0.01	0.28±0.02	0.29±0.02
C16:0	29.63±1.73	34.64±1.22	38.44±1.59
C16:1cis9	9.38±0.73	8.01±1.04	8.71±0.59
C16:1cis11	0.84±0.15	0.89±0.23	0.91±0.52
C17cyc9	0.31±0.03	0.30±0.06	0.47±0.02
C16:2cis9,12	1.18±0.30	0.81±0.15	0.75±0.28
C18:0	0.81±0.04	1.81±0.32	1.61±0.19
C18:1cis11	20.98±2.13	21.25±3.83	21.37±1.68
C18:2cis9,12	0.49±0.03	0.44±0.05	0.48±0.14
C19cyc11	31.16±2.86	28.31±2.09	22.77±4.01
TSFA ^a	35.32±2.55	39.70±1.95	44.25±2.98
TUFA ^b	33.22±3.35	31.68±5.32	32.51±3.23
TCFA ^c	31.47±2.89	28.61±2.15	23.24±4.03
U/S ratio ^d	1.83±0.07	1.52±0.12	1.26±0.09

^aTSFA, total saturated fatty acids; ^bTUFA, total unsaturated fatty acids; ^cTCFA, total cyclopropane fatty acids; ^dU/S ratio, unsaturated : saturated fatty acids ratio (CFA was referred as UFA).

3 讨论

对于酒酒球菌的培养,有研究^[15,16]认为控制培养基 pH 能提高菌体的产量。但这些研究均缺少该培养条件下菌体接种存活率及冻干存活率的数据。Maicas^[4]曾指出控制培养基 pH 的培养方式,会造成菌体的接种存活率明显降低。且有研究^[7,9,10]证实了酸胁迫处理能诱导酒酒球菌产生胁迫蛋白,引起细胞膜流动性增加^[8],从而增强菌体接种葡萄酒后的存活率及对 SO₂ 的抗性。但这些研究主要是通过进行酸休克或酸胁迫适应性处理而进行的,没有有关培养基组分的报道。在本研究中,我们发现培养基中的 DL-苹果酸具有较强的 pH 缓冲能力,而在不添加 DL-苹果酸,而含有大量葡萄糖的 ATB 培养基中,培养所获菌体的接种存活率与冻干存活率均较高。酒酒球菌 SD-2a 在该培养基条件下生长,不仅增强了对模拟酒中胁迫因素的抗性,而且提高了制备过程中对冷冻干燥的抗性,故培养基组分在增强酒酒球菌存活率方面亦发挥着重要作用。

目前,国际上在乳酸菌生物制品制备研究中,利用胁迫适应性反应及胁迫交叉保护反应以提高菌体的存活率正日益受到人们的关注。酒酒球菌 SD-2a 在 ATB 培养基不断酸化的环境中,可能启动了酸胁迫适

应性反应体系,而该反应体系同时增强了菌体对其他胁迫的抗性,赋予了菌体胁迫交叉保护能力。在其他菌体培养研究中有类似报道。Lorca^[17]提出不控制培养基 pH 的培养方式能增强 *L.acidophilus* CRL 639 对多种胁迫(乙醇、H₂O₂、冷冻)的抗性。Silva^[18]也发现在不断酸化的培养基中获得的 *L.delbrueckii* 菌体,增强了对喷雾干燥的耐受性。

另外,细胞膜的物化特性会随着环境胁迫条件的改变而发生变化,从而增强对胁迫因素的适应能力,这种适应性机制包括细胞膜磷脂脂肪酸组分的变化和膜镶嵌蛋白的变化。在本研究中,我们发现在 ATB 培养基中获得的菌体,由于菌体自我酸胁迫作用,细胞膜饱和脂肪酸的相对含量降低了,而环丙烷型脂肪酸的比例增加了,这样促使菌体细胞膜流动性增加。Garbay^[14]认为细胞膜流动性的增加有助于酒酒球菌接种存活率的提高。Smittle^[19]和 Béal^[20]均提出增加菌体细胞膜 U/S 比例,有利于乳酸菌体在冷冻条件下的存活。且 Munoz-Rojas^[21]已从分子生物学水平上证实了菌体细胞膜中环丙烷型脂肪酸,在增强菌体冷冻干燥耐受性方面所发挥的重要作用。故本研究认为接受自我酸胁迫的菌体,其细胞膜脂肪酸组分中增加了 C19cyc11 的相对含量,且细胞膜 U/S 值增加,由此提高了菌体的接种存活率和冻干存活率。

总之,培养基中不同的碳源组分能引起培养基 pH 的明显变化。ATB 培养基没有添加苹果酸,其 pH 缓冲能力弱。该培养基培养获得的菌体,由于自我酸胁迫反应,增强了菌体对葡萄酒胁迫因素及冷冻干燥的抗性,而该反应与菌体细胞膜脂肪酸组分的变化密切相关。故 ATB 培养基适合于酒酒球菌 SD-2a 发酵剂的制备。

参 考 文 献

- [1] 李华. 现代葡萄酒工艺学. 第二版. 西安: 陕西人民出版社, 2000.
- [2] Versari A, Parpinello GP, Cattaneo M. *Leuconostoc oenos* and MLF in wine: A review. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 1999, 23: 447-455.
- [3] Garbay S, Lonvaud-Funel A. Response of *Leuconostoc oenos* to environmental changes. *Journal of Applied Bacteriology*, 1996, 81: 619-625.
- [4] Maicas S, Pardo I, Ferrerm S. The effects of freezing and freeze-drying of *Oenococcus oeni* upon induction of malolactic fermentation in red wine. *International Journal of Food Science and Technology*, 2000, 35: 75-79.
- [5] Zhao G, Zhang G. Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria sub-

- jected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 99: 333–338.
- [6] 赵文英, 李华, 王华. 酒球菌(*Oenococcus oeni*) 胁迫适应性反应机制. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2008, 48: 556–561.
- [7] Guzzo J, Cavin J-F, Divies C. Induction of stress proteins in *Leuconostoc oenos* to perform direct inoculation of wine. *Biotechnology Letters*, 1994, 16: 1189–1194.
- [8] Chu-Ky S, Tourdot-Marechal R, Marechal PA, et al. Combined cold, acid, ethanol shocks in *Oenococcus oeni*: Effects on membrane fluidity and cell viability. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 17: 118–124.
- [9] Beltramo C, Desroche N, Tourdot-Maréchal R. Real-time PCR for characterizing the stress response of *Oenococcus oeni* in a wine-like medium. *Research in Microbiology*, 2006, 157: 267–274.
- [10] Guzzo J, Jobin MP, Diviés C. Increase of sulfite tolerance in *Oenococcus oeni* by means of acidic adaptation. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 160: 43–47.
- [11] 张春晖, 夏双梅, 李华. 酒类酒球菌的分离和发酵适应性研究. *中国食品学报(Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology)*, 2004, 4: 35–38.
- [12] Vaillant H, Formisyn P, Gerbaux V. Malolactic fermentation of wine: study of the influence of some physico-chemical factors by experimental design assays. *Journal of Applied Bacteriology*, 1995, 79: 640–650.
- [13] Rozes N, Garbay S, Denayrolles M, et al. A rapid method for the determination of bacterial fatty acid composition. *Letters in Applied Microbiology*, 1993, 17: 126–131.
- [14] Garbay S, Rozes N, Lonvaud-Funel A. Fatty acid composition of *Leuconostoc oenos*, incidence of growth conditions and relationship with malolactic efficiency. *Food Microbiology*, 1995, 12: 387–395.
- [15] Maicas S, Pilar G-C, Sergi F, et al. Production of *O.oeni* biomass to induce malolactic fermentation in wine by control of pH and substrate addition. *Biotechnology Letters*, 1999, 21: 349–353.
- [16] Zhang DS, Lovitt RW. Studies on growth and metabolism of *Oenococcus oeni* on sugars and sugar mixtures. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 99: 565–572.
- [17] Lorca GL, De Valdez F. A low-pH-inducible, stationary-phase acid tolerance response in *Lactobacillus acidophilus* CRL 639. *Current Microbiology*, 2001, 42: 21–25.
- [18] Silva J, Carvalho AS, Ferreira R, et al. Effect of the pH of growth on the survival of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* to stress conditions during spray-drying. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 98: 775–782.
- [19] Smittle RB, Gilliland SE, Speck ML, et al. Relationship of Cellular Fatty Acid Composition to Survival of *Lactobacillus bulgaricus* in Liquid Nitrogen. *Applied Microbiology*, 1974, 27: 738–743.
- [20] Béal C, Fonseca F, Corrieu G. Resistance to freezing and frozen storage of *Streptococcus thermophilus* is related to membrane fatty acid composition. *Journal of Dairy Science*, 2001, 84: 2347–2356.
- [21] Muñoz-Rojas J, Bernal P, Duque E, et al. Involvement of Cyclopropane Fatty Acids in the Response of *Pseudomonas putida* KT2440 to Freeze-Drying. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72: 472–477.

Influence of culture medium on the viability and membrane fatty acid composition of *Oenococcus oeni* SD-2a

Wenyng Zhao^{1,2}, Hua Li^{1*}, Ailian Wang¹, Zhongchao Li¹, Hua Wang¹

¹College of Enology, Northwest University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

²College of Chemical Engineering and Environment, North University of China, Taiyuan 030051, China)

Abstract: [Objective] To achieve the high quality of malo-lactic starter cultures, we investigated the effect of three culture media on the direct inoculation viability, freeze-drying viability and membrane fatty acid composition of *Oenococcus Oeni* SD-2a. [Methods] We monitored the bacterial growth and change in medium pH when *O. oeni* SD-2a cells were cultured in ATB, FMATB and MATB media. *O. oeni* SD-2a cells in early stationary phase were harvested, and subjected to direct inoculation experiments and freeze-drying processes. Then we determined inoculation and freeze-drying viability. Membrane fatty acid composition of those corresponding *O. oeni* SD-2a cells was determined by GC/MS method. [Results] The results showed ATB medium without supplementation of DL-malate had weak pH buffering capability. Compared with FMATB and MATB, *O. oeni* cells cultured in ATB increased inoculation viability and freeze-drying viability. Concerning the membrane fatty acid composition, it was observed that ATB medium increased distinctly the relative concentration of lactobacillic acid (C19cyc11) and U/S (the unsaturated: saturated fatty acid) ratio in cell membrane lipid composition of *O. oeni* SD-2a. [Conclusion] The increased resistance to wine stressor and freeze-drying was probably a result of the cross protection conferred by self acid stress response induced in ATB medium, which might be related with changes in membrane fatty acid composition of *O.oeni*SD-2a. Therefore, ATB medium was more suitable for preparation of *O. oeni* SD-2a commercial starter cultures.

Keywords: *Oenococcus oeni*; inoculation viability; freeze-drying viability; membrane fatty acid composition