

酸菜汁中乳酸菌的 筛选和产酸性能的优化

刘珊珊^{1,2}, 王 聪¹, 魏金艳¹, 朱龙岗¹, 张陈云^{1,2}

(1.天津农学院食品科学与生物工程学院,天津 300384;

2.天津市农副产品深加工技术工程中心,天津 300384)

摘要:本文从甘肃地区自制酸菜汁中分离出 39 株革兰氏阳性菌,过氧化氢酶实验均为阴性。通过滴定法筛选获得 6 株产酸率高于 1% 的菌株,经形态学鉴定均为杆菌,其中 LS-9 菌株的产酸率最高。通过单因素实验确定了 LS-9 菌株培养基的最佳碳源为葡萄糖,最佳氮源为胰蛋白胨。利用正交实验优化培养条件为葡萄糖添加量 20 g/L,胰蛋白胨添加量 12 g/L,发酵温度为 36 ℃。其中温度对菌株发酵产酸影响最大,其次是胰蛋白胨添加量,葡萄糖添加量对发酵产酸影响最小。验证实验表明,菌株在最佳条件下的产酸率为 1.74% ± 0.05%。经 16S rRNA 测序和系统进化树分析,LS-9 菌株与干酪乳杆菌的同源性较高。全脂奶发酵实验表明 LS-9 凝乳时间约为 6 h,酸度 102.4 °T,活菌数可达 1.25 × 10⁸ CFU/mL。

关键词:酸菜汁,乳杆菌,产酸,优化

Screening and acid production optimization of lactic acid bacteria from sauerkraut juice

LIU Shan-na^{1,2}, WANG Cong¹, WEI Jin-yan¹, ZHU Long-gang¹, ZHANG Chen-yun^{1,2}

(1.College of Food Science and Bioengineering, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China;

2.Tianjin Engineering and Technology Research Center of Agricultural Products Processing, Tianjin 300384, China)

Abstract: In this study, 39 gram-positive strains with negative results of catalase tests were isolated from home-made sauerkraut juice in Gansu province. Six strains with more than 1% acid production rates were obtained by screening using titration method and identified as *Lactobacillus* genus by morphology, and LS-9 strain showed the highest acid production rate among the six strains. The optimum carbon source for LS-9 strain was glucose and the optimum nitrogen source was tryptone by single factor experiments. The optimum cultivation conditions were 20 g/L glucose and 12 g/L tryptone at 36 °C by orthogonal test. Temperature had the greatest effect on the acid production of fermentation followed by tryptone amount, and glucose amount had the least effect on the acid production of fermentation. Acid production rate was 1.74% ± 0.05% under optimum conditions. LS-9 strain shared high identity with *Lactobacillus casei* by 16S rRNA sequencing and phylogenetic tree analysis. The results of whole-fat milk fermentation showed that the curd formation time of LS-9 was roughly 6 h with acidity of 102.4 °T and viable count of 1.25 × 10⁸ CFU/mL.

Key words: sauerkraut juice; *Lactobacillus*; acid production; optimization

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2018)03-0112-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2018.03.023

酸菜是一类风味独特、营养丰富、品种多样的发酵蔬菜制品,在我国东北、甘肃、四川等地深受喜爱。传统酸菜的制作以自然发酵为主,利用附着在蔬菜表面的微生物产生一系列生物化学变化,其中乳酸菌在酸菜发酵过程中必不可少^[1]。乳酸菌在发酵过程中产生乳酸降低了 pH,产生细菌素等抗菌物质,同时结合食盐的渗透压作用,共同抑制腐败菌的生长^[2]。此外,乳酸菌代谢过程形成多种风味物质和生

理活性物质,丰富了营养成分和保健功能。乳酸菌作为益生菌,在调节肠道菌群平衡、降低胆固醇、促进消化吸收等方面表现出良好的效果^[3]。发酵蔬菜中的乳酸菌主要包括乳杆菌属、明串珠菌属和片球菌属,它们在发酵前期和后期都发挥着重要作用^[4-5]。例如 Wu 等人^[6]从我国东北地区酸菜汁中分离获得了植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、清酒乳杆菌(*Lactobacillus sakei*)、短乳杆菌(*Lactobacillus*

收稿日期: 2017-07-10

作者简介: 刘珊珊(1984-),女,博士,讲师,研究方向:食品微生物, E-mail: lsn_nxy@aliyun.com。

基金项目: 天津农学院科技发展基金资助项目(2016NYB08);天津农学院高校教师教育改革创新引导发展项目(20170413)。

curvatus)、副干酪乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei*) 和肠膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*)。

发酵蔬菜制品中乳酸菌种类丰富,对我国乳酸菌资源的开发利用具有重要意义。产酸性能既是乳酸菌的特性,也是产品品质的重要因素,关系着生产周期和成本^[7]。传统发酵蔬菜加工具有群众基础和市场需求,但产品品质因生产环境的不同而缺乏稳定性^[8]。因此,对传统食品中乳酸菌资源进行开发,筛选获得产酸能力强且发酵产品风味好的乳酸菌菌株,才能更好地满足食品工业发酵过程。本文以酸菜汁中分离获得的乳杆菌为研究对象,通过单因素实验和正交实验对培养条件进行优化,提高菌株的产酸率,同时对菌株进行 16S rRNA 序列测定,以期对开发和制备相关发酵剂提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

材料 采用传统方法制作的酸菜汁,采集自甘肃西北地区;全脂奶粉(雀巢,蛋白含量 24%)、脱脂奶粉(完达山,蛋白含量 34%)和白砂糖 市售;培养基 MRS 培养基、BCP 培养基,按文献进行配制^[9]。

超净工作台(SW-CJ-1FD) 苏州苏洁净化工程设备有限公司;立式压力蒸汽灭菌锅(LDZX-50KB) 上海申安医疗器械厂;pH 计(PHS-3C) 上海仪电科学仪器股份有限公司;电子天平(JT201N) 上海精天电子仪器有限公司;电热恒温培养箱(HBYQ) 天津华北实验仪器有限公司;紫外分光光度计(TU-1810) 北京普析通用仪器有限公司;显微镜(YS100) 尼康仪器(中国)有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 乳酸菌的分离和初步鉴定 取 1 mL 酸菜汁样品加入 9 mL 灭菌生理盐水,充分混合后进行梯度稀释并涂布于 MRS 固体培养基中,37 °C 恒温培养 48 h,对单菌落进行分离、纯化并编号,通过革兰氏染色、过氧化氢酶实验^[10],初步筛选乳酸菌。

1.2.2 乳酸菌的产酸实验 将单菌落在 MRS 液体培养基中培养 48 h 后,按 2% 的体积分数接种于 MRS 液体培养基中,于 37 °C 静置培养 48 h,以 MRS 培养基作为空白对照测定产酸率^[11]。筛选产酸率高于 1% 的菌株,将菌液梯度稀释后涂布于 BCP 固体培养基,37 °C 恒温培养 24 h,观察培养基颜色变化情况,进行产酸验证。同时分别测定 0、12、24 h 时菌液的 OD₆₀₀ 值和产酸率。

$$\text{产酸率}(\%) = \frac{C_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}} \times 0.09}{V_0} \times 100$$

式中: C_{NaOH} 指 NaOH 标准溶液的摩尔浓度(0.1 mol/L); V_{NaOH} 指滴定所用的 NaOH 标准溶液的体积(mL); V_0 为样品的体积(mL); 0.09 为总酸转换乳酸系数。

1.2.3 单因素实验 将 MRS 液体培养基中 2% 的葡萄糖分别替换为等量的果糖、蔗糖或麦芽糖等碳源,将 MRS 液体培养基中 1% 的蛋白胨分别替换为等量的胰蛋白胨、大豆蛋白胨或酪蛋白胨等氮源。按 2% 的体积分数将活化三代后的菌株接种到上述各培养

基中,测定不同培养时间(0、12、24 h) 菌液的 OD₆₀₀ 值和产酸率,以确定最佳碳源和氮源种类。

1.2.4 培养条件因素水平选取 以碳源(葡萄糖)含量、氮源(胰蛋白胨)含量和温度为考察因素,通过正交实验测定菌株按 2% 的体积分数接种培养 24 h 的产酸率,因素水平见表 1。最佳培养条件通过极差分析来确定^[12]。

表 1 正交实验培养条件因素水平

Table 1 Factor and level of culture conditions in orthogonal test

水平	因素		
	A 葡萄糖 (g/L)	B 胰蛋白胨 (g/L)	C 温度 (°C)
1	18	8	34
2	20	10	36
3	22	12	38

1.2.5 发酵性能测定

1.2.5.1 发酵酸奶的制备 将脱脂奶粉溶于水配制 12% 的脱脂奶培养基,115 °C 灭菌 15 min,冷却后按照 3% 的比例将 LS-9 活化过夜,作为发酵剂菌株。将全脂奶粉溶于水加入 6% 的白砂糖,95 °C 灭菌 5 min,冷却后按照 3% 比例接种发酵剂菌株,在 42 °C 的培养箱中发酵至凝乳状态,置于 4 °C 冷藏后熟 24 h^[13]。

1.2.5.2 酸度的测定 称取 10 g 样品,置于 100 mL 的锥形瓶中,加入 20 mL 蒸馏水,混匀后加入 2~3 滴 1% 酚酞指示剂,用标定的 0.1 mol/L NaOH 溶液滴定,滴至微红色后,30 s 不褪色,酸度计算公式^[14]为:

$$\text{酸度}(\text{°T}) = \frac{C \times V \times 100}{m \times 0.1}$$

式中: C 是 NaOH 的浓度(mol/L); V 是消耗 NaOH 的体积(mL); m 为样品的质量(g); 0.1 为酸度理论定义的氢氧化钠的摩尔浓度。

1.2.5.3 菌落计数 将发酵酸奶样品用无菌生理盐水进行连续 10 倍稀释,取 10^{-5} ~ 10^{-7} 稀释度涂布 MRS 固体平板,37 °C 静置培养 48 h 后进行菌落计数。

1.2.6 16S rRNA 序列分析与鉴定 将 LS-9 待检菌株送上海生工生物工程有限公司进行 16S rRNA 测序,并登录 NCBI 网站的 GenBank 数据库进行 Blast 分析。利用 MEGA7.0 软件包将标准菌株序列与 LS-9 菌株 16S rRNA 测定序列以 Clustal W 进行比对,采用邻接法(Neighbor-joining, NJ) 构建系统进化树,并进行 1000 次重复的 Boot-straps 统计学检验,分析菌株亲缘关系。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的初步筛选

在 MRS 固体培养基中筛选获得 39 株革兰氏阳性菌株,过氧化氢酶实验均为阴性,其中包括杆菌 7 株和球菌 32 株。通过滴定法初筛获得 6 株产酸率大于 1% 的菌株,其编号分别为 LS-3, LS-4, LS-5, LS-6, LS-8 和 LS-9。由图 1 可知,通过 BCP 平板验

证6株菌的菌落产酸后使周围pH发生改变,培养基由紫色变成黄色。这6株菌经形态学鉴定均为杆菌(图2)。据报道,乳杆菌在榨菜、萝卜、豇豆和青菜为原料的泡菜液中都有检出,在泡菜发酵中产生挥发性物质或酶,对泡菜风味起到积极影响^[15]。



图1 BCP 平板菌落图

Fig.1 Bacterial colonies on BCP plate

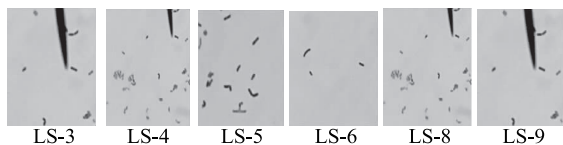


图2 菌株形态观察

Fig.2 Morphological observation of strains

2.2 乳酸菌产酸性能分析

产酸性能是乳酸菌的重要性能之一,高产酸菌株不仅可以缩短发酵周期,降低成本,同时能在发酵初期抑制杂菌的生长繁殖。将活化的LS-3、LS-4、LS-5、LS-6、LS-8和LS-9菌株按2%的接种量接入到MRS液体培养基中,由图3可知,6株乳酸菌培养24h后,除了LS-3的OD₆₀₀值较低外,其余5株乳酸菌的OD₆₀₀值均在2.0以上。由图4可知,LS-9的最终产酸率最高,为1.49%;LS-3的产酸率显著低于其他各组($p < 0.01$),这与LS-3生长速度较慢相关。最终筛选LS-9为高产酸菌株,进行单因素实验优化培养基成分。

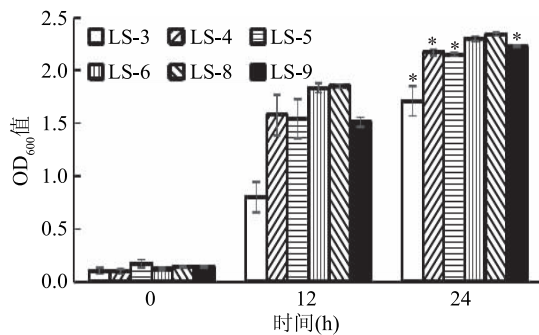


图3 菌株在MRS培养基中的生长情况

Fig.3 Growth situation of strains in MRS medium

注: *代表该实验组OD₆₀₀值/产酸率与最高组相比有显著性差异($p < 0.05$),图4~图8同。

2.3 碳源种类对菌株生长及产酸率的影响

据报道,乳酸菌代谢糖的种类与数量会影响菌株的产酸量^[16]。由图5和图6可知,24h时菌株在

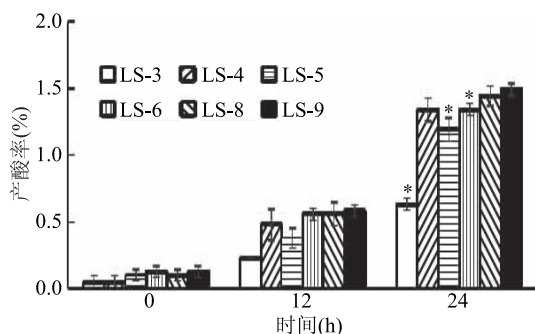


图4 菌株在MRS培养基中的产酸情况

Fig.4 Acid production of strains in MRS medium

葡萄糖、麦芽糖、果糖和蔗糖四种碳源中的生长情况为:葡萄糖>蔗糖>麦芽糖>果糖,葡萄糖与蔗糖间无显著性差异,与麦芽糖之间有显著性差异($p < 0.05$),与果糖相比更为显著($p < 0.01$);产酸情况为:葡萄糖>蔗糖>麦芽糖>果糖,葡萄糖与蔗糖之间无显著差异,与麦芽糖和果糖差异显著($p < 0.01$)。菌株在葡萄糖为碳源的培养基中培养24h后,OD₆₀₀值增长到2.289。菌株生长过程伴随着酸的积累,发酵液中产酸率最终达1.63%。而以果糖为碳源时,菌株生长明显比另外三种碳源培养基要缓慢,产酸率也最低。说明该菌株优先利用葡萄糖,因此选择碳源种类为葡萄糖。同时,结果还说明不同乳酸菌的最适碳源种类存在差异,如泡菜中分离的乳酸菌LJ-4最适碳源为果糖^[17],盐渍黄瓜中分离的乳酸菌L7的最适碳源为乳糖^[18]。

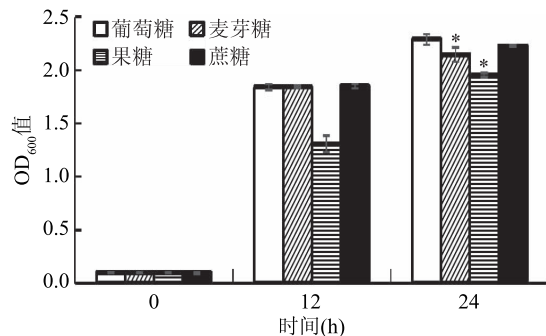


图5 不同碳源培养基中LS-9的生长情况

Fig.5 Growth situation of LS-9 in different carbon sources

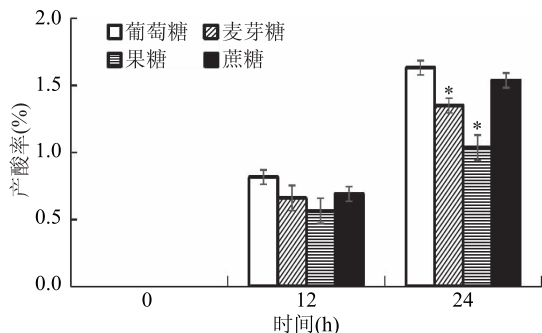


图6 不同碳源培养基中LS-9的产酸情况

Fig.6 Acid production of LS-9 in different carbon sources

2.4 氮源种类对菌株生长及产酸率的影响

菌株在不同氮源培养基中生长的情况如图7所

示,以酪蛋白胨为氮源的培养基菌液 OD₆₀₀ 值显著低于其他三种氮源 ($p < 0.01$)。据报道,泡菜中分离到的乳酸菌 LJ-4 在 1% 胰蛋白胨中的生长情况优于相同添加浓度的牛肉膏、酪蛋白胨和大豆蛋白胨^[17]。由图 8, LS-9 以胰蛋白胨为氮源的最终产酸率最高,为 1.69%,数值与大豆蛋白胨和酪蛋白胨具有显著性差异 ($p < 0.01$)。

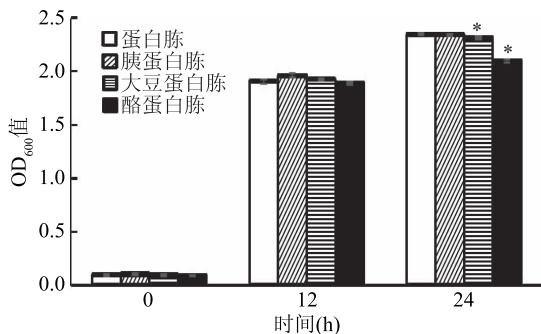


图7 不同氮源培养基中 LS-9 的生长情况

Fig.7 Growth situation of LS-9 in different nitrogen sources

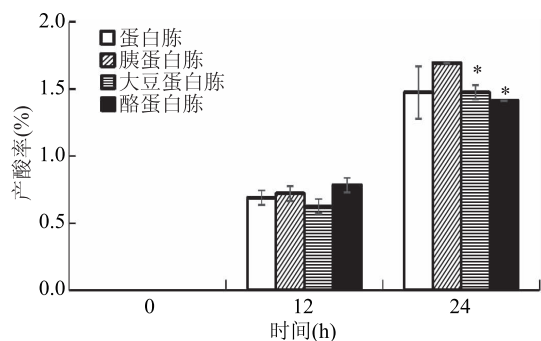


图8 不同氮源培养基中 LS-9 的产酸情况

Fig.8 Acid production of LS-9 in different nitrogen sources

2.5 培养条件对菌株产酸率的影响

对碳源、氮源和温度三个影响因素采用三水平设计(见表1),通过正交实验进行优化,实验结果见表2。通过极差分析可知, A₂B₃C₂ 为最佳发酵条件,即发酵液中葡萄糖的最佳添加量为 20 g/L,胰蛋白胨的最佳添加量为 12 g/L,最佳的发酵温度为 36 ℃。培养条件因素中温度的影响最大,其次是胰蛋白胨,葡萄糖对发酵产酸影响最小。胰蛋白胨含量越高,菌株产酸率越高;葡萄糖含量适中时,产酸率最好。说明相比于碳源来说,菌株对氮源的需求更多。对 A₂B₃C₂ 最佳组合进行验证实验,结果如图 9 所示。随着发酵时间的增加,OD₆₀₀ 值不断上升,有机酸逐渐积累,菌株的生长情况与其产酸率呈正相关。在培养 24 h 后,菌株的产酸率达 1.74% ± 0.05%,高于正交表中的最优结果,说明验证有效,且 24 h 后产酸率仍有进一步上升的可能。

2.6 菌株 16S rRNA 序列测定和同源性分析

文献报道,泡菜中分离出的优良乳酸杆菌种类包括植物乳杆菌、干酪乳杆菌、弯曲乳杆菌、短乳杆菌、嗜酸乳杆菌等^[19]。本研究将 LS-9 菌株 16S rRNA 测序结果与 NCBI 网站中 blast 软件进行同源性分析,使用 MEGA7.0 进行 Clustal X 多重比对, NJ

表2 培养条件优化的正交实验结果

Table 2 Orthogonal test results for optimization of culture condition

实验号	A	B	C	产酸率(%)
1	1	1	1	1.04
2	1	2	2	1.28
3	1	3	3	1.07
4	2	1	2	1.42
5	2	2	3	1.14
6	2	3	1	1.23
7	3	1	3	1.21
8	3	2	1	0.88
9	3	3	2	1.54
K ₁	3.39	3.67	3.15	
K ₂	3.79	3.30	4.24	
K ₃	3.63	3.84	3.42	
R	0.40	0.54	1.09	

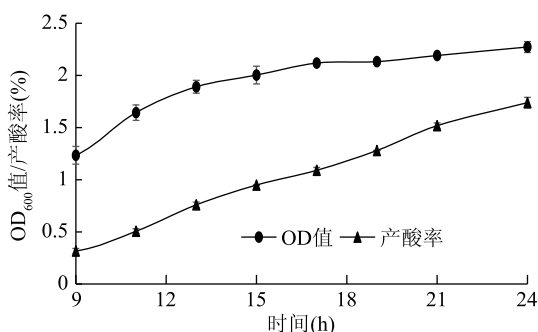


图9 LS-9 菌株在优化条件下的生长和产酸情况

Fig.9 Growth situation and acid production of LS-9 at optimum condition

法建立系统发育进化树的结果如图 10 所示。结果表明,LS-9 菌株和干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) 之间有较高同源性,支持率达 100%,因此将其鉴定为干酪乳杆菌。

2.7 菌株在全脂发酵酸奶中的应用

将 LS-9 应用于全脂奶发酵中,菌株可在全脂奶中大量生长繁殖,凝乳时间大约在 6 h,组织均匀,酸度达 102.4 °T,活菌数为 1.25 × 10⁸ CFU/mL。综合分析,该菌株作为凝固酸奶的发酵剂达到了 GB19302-2010 标准中对发酵乳酸度 ≥ 70 °T 和乳酸菌数 ≥ 1 × 10⁶ CFU/mL 的要求。陈涛^[20]等人就曾将干酪乳杆菌与发酵乳杆菌混合发酵制备酸豆乳,获得组织状态优良、营养物质丰富的发酵产品。

3 结论

乳杆菌作为一种益生菌,在食品发酵、生物防腐、营养保健等方面表现出潜在应用价值。本研究以发酵酸菜汁中来源的一株产酸性较好的乳杆菌为研究对象,确定了其产酸最适的碳源为葡萄糖,氮源为胰蛋白胨;采用正交实验优化的培养条件为葡萄糖添加量 20 g/L,胰蛋白胨添加量 12 g/L,发酵温度为 36 ℃,发酵 24 h 后产酸率为 1.74% ± 0.05%。通过 16S rRNA 序列测定和系统进化树构建结果将其

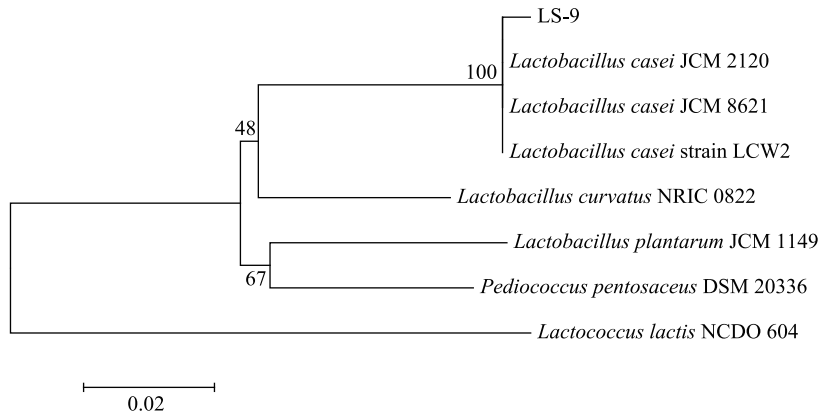


图10 基于16S rRNA的LS-9菌株系统发育树

Fig.10 Phylogenetic tree of LS-9 strain based on 16S rRNA



图11 发酵酸奶的凝固形态

Fig.11 Solidification state of fermented yogurt

鉴定为干酪乳杆菌。将菌株作为发酵剂进行全脂奶发酵实验,凝乳时间约为6 h、酸度为102.4 °T、活菌数为 1.25×10^8 CFU/mL。研究结果为加快乳酸菌在传统发酵食品中的现代化生产提供理论基础。

参考文献

- [1] 敖晓琳, 张小平, 史令, 等. 四川泡菜中两株优良乳酸菌的鉴定及不同发酵条件对其发酵泡菜品质的影响[J]. 食品科学, 2011, 32(11): 152-156.
- [2] 商军, 钟方旭, 王亚林, 等. 几种发酵蔬菜中乳酸菌的分离与筛选[J]. 食品科学, 2007, 28(4): 195-199.
- [3] 闫刘慧. 泡菜中乳酸菌特性分析及模拟肠道存活定植作用研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2014: 6-8.
- [4] Rhee S J, Lee J E, Lee C H. Importance of lactic acid bacteria in Asia fermented foods [J]. Microbial Cell Factories, 2011, 10(11): S5.
- [5] Chen Y S, Yanagida F, Hsu J S. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from suan-tsai (fermented mustard), a traditional fermented food in Taiwan [J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 101(1): 125-130.

(上接第111页)

- [6] Wu RN, Wu ZX, Zhao CY, et al. Identification of lactic acid bacteria in suancai, a traditional Northeastern Chinese fermented food, and salt response of *Lactobacillus paracasei* LN-1 [J]. Annals of Microbiology, 2014, 64(3): 1325-1332.
- [7] 吴满刚, 管泳宇, 吴雪燕, 等. 豆豉发酵中的乳酸菌复合诱变及产酸条件优化[J]. 食品与机械, 2014, 2: 35-39.
- [8] 张岩, 肖更生, 陈卫东, 等. 发酵蔬菜的研究进展[J]. 现代食品科技, 2005, 21(1): 184-186.
- [9] 陈建华, 朱望银, 杜亚填. 湘西泡菜优质乳酸菌的筛选与应用研究[J]. 食品科学, 2010, 31(1): 201-205.
- [10] 甘伯中, 杜宁娟, 李帆, 等. 青海牧区酸奶中乳酸菌分离及发酵性能的研究[J]. 食品工业科技, 2009, 2: 174-177.
- [11] 龚加路, 赵兴秀, 邹伟, 等. 高产酸乳酸菌的分离鉴定及其益生特性的研究[J]. 中国调味品, 2016, 41(3): 17-31.
- [12] 王钦德, 杨坚. 食品实验设计与统计分析[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2003, 330-361.
- [13] 尚玉琳, 孟祥晨. 不同酸奶发酵剂的发酵性能比较[J]. 食品科技, 2011, 36(10): 41-45.
- [14] GB 5413.34-2010. 食品安全国家标准-乳和乳制品酸度的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [15] 裴乐乐, 罗青春, 孟霞, 等. 不同原料四川发酵泡菜的细菌多样性分析[J]. 中国调味品, 2016, 41(2): 39-43.
- [16] 杜欣, 李理, 刘冬梅. 碳源对益生菌发酵黄浆水抗氧化和抑菌活性的影响[J]. 现代食品科技, 2014, 30(2): 129-134.
- [17] 马伟玲, 尹礼国, 张文学, 等. 泡菜乳酸菌 LJ-4 增殖培养基的优化[J]. 中国调味品, 2014, 39(5): 45-48.
- [18] 曲玲童, 牛文静, 孙征, 等. 锦州腌渍小菜中耐盐乳酸菌的筛选与产酸性能研究[J]. 中国调味品, 2012, 31(6): 83-87.
- [19] 巨晓英, 韩焯, 周志江. 自然发酵泡菜中乳酸菌的分离鉴定[J]. 食品与机械, 2008, 24(5): 29-31.
- [20] 陈涛, 马映昆, 陈福生. 适合豆乳发酵的乳酸菌筛选及其应用[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(3): 76-82.

- [17] 杨晓宁, 张七斤, 杨成龙. 不同来源乳酸菌耐酸耐胆盐实验[J]. 动物医学进展, 2014, 3(2): 73-77.
- [18] Xu S, Liu T, Radji CA, Yang J, Chen L. Isolation, Identification, and Evaluation of New Lactic Acid Bacteria Strains with Both Cellular Antioxidant and Bile Salt Hydrolase Activities *In Vitro* [J]. Journal of Food Protection, 2016, 79(11): 1919-1928.
- [19] 韩甜甜, 梁志军. 杀菌型褐色乳酸菌饮料稳定性的研究[J]. 饮料工业, 2016, 9(1): 18-21.
- [20] EFSA. Guidance on the scientific requirements for health claims related to antioxidants, oxidative damage and cardiovascular health [J]. EFSA Journal, 2011, (1)9: 24-74.