

保宁醋醋曲中产多糖乳酸菌的筛选及其代谢产物分析

刘阳¹, 邓静², 姜元华¹, 易宇文², 乔明锋², 吴华昌¹

(1. 四川旅游学院食品学院, 四川成都 610100)

(2. 四川旅游学院烹饪科学四川省高等学校重点实验室, 四川成都 610100)

摘要: 保宁醋因其复杂微生物体系和酿造工艺而形成独特风味, 其风味物质和营养成分主要由各种功能性微生物发酵生成, 其中乳酸菌是非常关键的一类菌株, 其对保宁醋的风味和营养物质的形成具有重要作用。本研究以稀释涂布平板法从保宁醋醋曲中分离得到 12 株乳酸菌, 通过定性试验、产酸率、耐酸试验和胞外多糖测定等实验, 得到一株产多糖量为 191.98 mg/L、产酸率为 1.62% 的乳酸菌 L7, 鉴定为发酵乳酸杆菌(*Lactobacillus femertum*), 其发酵液中 3-羟基-2-丁酮和乙酸相对含量较高, 分别为 36.22%、45.76%, HPLC 检测到乳酸、乙酸, 含量分别为 66.56 mg/100 mL 和 104.08 mg/100 mL, 这表明 L7 将有利于提高食醋酸度以及川芎嗪含量。产多糖乳酸菌在食醋发酵过程中的具有重要作用, 而此次所得乳酸杆菌对保宁醋生产和发酵工艺改良具有指导意义。

关键词: 保宁醋醋曲; 产多糖乳酸菌; 代谢产物

文章编号: 1673-9078(2018)03-184-190

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.03.027

Screening of Polysaccharide-producing Lactic Acid Bacteria in Baoning Vinegar Koji and Analysis of Its Metabolites

LIU Yang¹, DENG Jing², JIANG Yuan-hua¹, YI Yu-wen², QIAO Ming-feng², WU Hua-chang¹

(1. College of Food, Sichuan Tourism University, Chengdu 610100, China)

(2. Culinary Science Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan Tourism University, Chengdu 610100, China)

Abstract: Baoning vinegar had a unique flavor due to the complex microbial system and unique brewing process. The flavor substances and nutrients were mainly produced by fermentation of various functional microorganisms. *Lactobacillus* was one of the most important strains, which played an important role in the formation of flavors and nutrients in Baoning vinegar. In this study, 12 strains of lactic acid bacteria were isolated from Baoning vinegar koji by dilution separation methods. *Lactobacillus* L7 was obtained with an acid-producing rate of 1.62% and polysaccharide yield of 191.98 mg/L, and was identified as *Lactobacillus femertum*. HPLC analysis showed that the contents of 3-hydroxy-2-butanone and acetic acid in fermentation broth were 36.22% and 45.76% respectively, and the contents of lactic acid and acetic acid were 66.56 mg/100 mL and 104.08 mg/100 mL, respectively. These results suggested that the strain L7 would be beneficial to improve the vinegar acidity and ligustrazine content. Consequently, the polysaccharide-producing lactic acid bacteria played an important role in the vinegar fermentation process, and the *Lactobacillus* obtained in this study had significance for improving the fermentation process and production of Baoning vinegar.

Key words: Baoning vinegar koji; polysaccharide-producing lactic acid bacteria; metabolite

保宁醋是我国四大传统名醋之一, 其先后荣获 1915 年“巴拿马太平洋万国博览会”金奖, 2002 年成为国家免检产品, 并在 2005 年获“中国驰名商标”等多种

收稿日期: 2017-11-13

基金项目: 四川省教育厅科技成果重大培育项目(15CZ0029); 四川省科技支撑计划项目(2015NZ0037); 四川省学术带头人后备人选基金项目(83-000001)

作者简介: 刘阳(1990-), 男, 硕士, 研究实习员

通讯作者: 吴华昌(1970-), 男, 教授, 研究方向: 传统食品发酵

荣誉, 享誉国内外^[1]。

保宁醋生产的主要原料是大米、麸皮, 添加自然通风制成的醋曲, 以生料固态发酵的方式在低温条件下酿造而成, 其中自然通风制曲是整个酿造工艺的关键环节, 决定酿造微生物的种类及数量, 直接影响保宁醋的风味特征及感官评定。此外, 由于在制曲酿造过程中, 添加了白叩、砂仁、杜仲、当归、五味和薄荷等六十多种中草药, 使保宁醋具有独特的中草药香味, 色泽鲜亮、酸味柔和适中、醇香回甜、经久不腐,

成为我国传统药醋的典型代表^[2]。

食醋酿造中的产酸微生物种类繁多,除功能性醋酸菌外,大量乳酸菌不仅能发酵产生乳酸和乙酸等有机酸,还可以提供众多的挥发性物质、氨基酸等风味物质,从而有效改善食醋的风味^[3]。此外,乳酸菌还可产生胞外多糖等功能性物质,具有降血脂、抗辐射和增强免疫能力等益生功能,这对于提升食醋的功能性,满足当前的消费趋势具有重要研究方向^[4]。目前,在保宁醋酿造研究中,多涉及醋醅中醋酸菌产酸能力方面,关于保宁醋固态酿造醋曲中产酸产多糖乳酸菌的分离、鉴定及应用少有报道。

本研究采用可培养的方法从保宁醋醋曲中,以产酸量、产多糖含量及耐酸能力为指标筛选乳酸菌,以生理生化试验和 16S rDNA 分子生物学鉴定方法相结合进行菌株鉴定,并对其代谢产物进一步分析,探究其在保宁醋发酵过程中的发挥作用,对保宁醋生产和发酵工艺的改良具有指导意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 材料来源

保宁醋醋曲,四川省保宁醋有限公司提供。

1.1.2 仪器设备

SHP0201147047 电子分析天平,上海恒平科学仪器有限公司; SW-CJ-IF 超净工作台,苏净集团苏州安泰空气技术有限公司; LDZX-50FBS 立式压力蒸汽灭菌器,上海深谱医疗器械厂; BH200 微生物显微镜,宁波舜宇仪器有限公司; S-3C 型 pH 计,成都世纪方舟科技有限公司; DY-6C 电泳仪,北京市六一仪器厂; S1000PCR 扩增仪,美国 Bio-Rad 公司; GelDoc 2000 紫外凝胶成像仪,美国 Bio-Rad 公司; 7890A-5975B 气相色谱质谱,美国 Agilent 公司; Agilent 1200 高效液相色谱,美国 Agilent 公司。

1.1.3 主要试剂

葡萄糖、酵母浸粉、蛋白胨、硫酸铵、硫酸镁、琼脂粉、氯化钙、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸二氢钾,均为分析纯,成都市科龙化工试剂厂; DL2000 DNA Marker、rTaq 酶、dNTP 等 PCR 相关试剂,大连宝生物有限公司。

1.1.4 培养基

MRS 固体培养基:葡萄糖 20%,蛋白胨 10%,牛肉膏 8%,酵母粉 4%,柠檬酸三铵 2%, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1.5%,乙酸钠 5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2%, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.38%,吐温 80 1%,琼脂 15%,蒸馏水 1000 mL, pH

6.2, 121 °C 高压灭菌 30 min。

乳酸菌分离培养基(溴甲酚紫 MRS 培养基):在 MRS 培养基中加入 160 mg/L 溴甲酚紫,蒸馏水 1 L、pH 6.2, 121 °C 高压灭菌 20 min。

1.2 实验方法

1.2.1 乳酸菌的分离

样品预处理:称取 10 g 醋曲样品于装有 30 mL dH_2O 的离心管中,涡旋均匀,四层纱布过滤后备用。

富集培养及稀释涂布:取 2 mL 加入已灭菌的 MRS 液体培养基中,28 °C,150 r/min 摇床培养 24 h 后,取 1.0 mL 菌液于盛有 9 mL 0.85%生理盐水的试管中,依次用已灭菌 0.85%生理盐水稀释,获得最终浓度为 $10^{-3} \sim 10^{-5}$ 的稀释液,每个稀释度吸取 100 μ L 稀释液涂布于溴甲酚紫 MRS 培养基平板上,28 °C 倒置培养 2~3 d。

纯化及保藏:挑取变色圈较大的菌株,划线纯化 2~3 次,镜检后接种于斜面试管进行短期保藏,采用甘油保藏法进行长期保藏。

1.2.2 乳酸菌的筛选

乳酸菌的定性试验:分别挑取两环纯化后的乳酸菌接种于 50 mL 液体 MRS 培养基中,37 °C,静置培养 12 h 后,以 5%的接种量接入新的液体 MRS 培养基中,37 °C 静置培养 4 d,分别取 10 mL 发酵液,5000 r/min 离心 10 min 取上清液,采用纸层析法^[5]进行乳酸定性试验,以未接种 MRS 培养基为空白对照。

乳酸菌的产酸率测定:分别挑取两环定性后乳酸菌接种于 50 mL 液体 MRS 培养基中,37 °C 静置培养 12 h,以 3%接种量接种于 100 mL 液体 MRS 培养基,继续静置培养 4 d,取 10 mL 发酵液加入装有 40 mL 蒸馏水的三角瓶中,滴加 1~2 滴酚酞,摇匀后用滴定法测定产酸率,每株菌平行 3 次,产酸率计算见公式(1)。

$$\text{产酸率}(\%) = \frac{C_{NaOH} \times V \times 0.09}{V_0} \times 100 \quad (1)$$

式中:V 为发酵液样品滴定耗用的 NaOH 体积, mL; V_0 为样品的体积, mL; C_{NaOH} 为 NaOH 标准溶液浓度, mol/L; 0.09 为总酸转换乳酸系数。

1.2.3 多糖乳酸菌的筛选

胞外多糖的提取及测定:将活化后的乳酸菌接种于 MRS 液体培养基中,37 °C 静置培养 24 h 后,取 5 mL 发酵液,5000 r/min 离心 10 min,取上清液加入 2.5 mL 20%TCA(三氯乙酸)溶液,4 °C 过夜,1000 r/min 离心 20 min,取上清液,加入 3×95%乙醇,置于 4 °C 冰箱中过夜,4 °C、1000 r/min 离心 20 min,取沉淀加入

10 mL 蒸馏水溶解后, 装于透析袋中, 以蒸馏水透析 24 h 后, 换用超纯水透析 24 h, 其中每 8 h 更换蒸馏水或超纯水。透析结束后, 透析液定容至 25 mL, 为 EPS(extracellular polysaccharide)溶液^[5]。采用苯酚-硫酸法^[6]测定 EPS 溶液吸光度, 操作步骤同乳酸菌的定性实验, 根据葡萄糖标准曲线计算乳酸菌胞外多糖含量。

产多糖乳酸菌的耐酸性试验: 将活化后较高产多糖乳酸菌以 3% 接种量接种于不同 pH(2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0) 的液体 MRS 培养基中, 37 °C 静置培养 24 h 后, 在波长为 600 nm 处测定培养液吸光度。以 pH 为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制产多糖乳酸菌的耐酸性能曲线。

1.2.4 产酸菌的鉴定

产酸菌的生理生化鉴定: 参考《伯杰明细菌手册》进行生理生化试验。

DNA 提取: 参考吉志伟等^[7]文献中方法, 提取 DNA。

PCR 扩增: 采用引物 27F/1492r 对醋酸菌和乳酸菌的 16S rDNA 区进行特异性扩增, 其 PCR 扩增体系参考文献^[8]。测序结果经 BLAST 同源比对后, 在 Mega 6.0 软件中采用 Neighbor-join-in 法构建系统发育树, 进行同源性分析。

1.2.5 发酵液的挥发性物质分析

将初筛菌株接种于 50 mL 液体 MRS 培养基, 30 °C, 120 r/min 培养 5 d, 以未接种发酵培养为空白对照, 准确量取 7 mL 发酵液于 15 mL 顶空瓶中恒温 (65 °C) 水浴, 将 50/30 μm DVB/CAR/PDMS 萃取头插入顶空瓶中平衡 10 min 后吸附 30 min(在固相微萃取装置上实现)后, 将萃取头移入气相色谱的高温汽化室中解吸 5 min, 进行 GC-MS 分析。色谱、质谱条件参照刘阳等^[9]文献中条件。

1.2.6 发酵液的有机酸分析

发酵液前处理: 取 10 mL 发酵液, 5000 r/min 离心 20 min, 准确量取 5 mL 上清液于 100 mL 容量瓶中, 分别加入 2 mL 10.6% 亚铁氰化钾(需要避光保存)和 2 mL 30% 硫酸锌, 摇匀后用 ddH₂O 定容。室温下静置沉淀 30 min, 取澄清液 5000 r/min 离心 20 min 后, 取上清液, 上清液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 滤液采用 HPLC 进行有机酸分析^[10]。

液相系统: Agilent 1200; Gemini 色谱柱: C18 4.6×250 mm, 5 μm; 流动相: (NH₄)₂HPO₄/甲醇=95/5, pH 2.7; 进样体积: 20 μL; 流动速度: 0.4 mL/min; 柱温: 20 °C; 检测器: UV 210 nm。

有机酸的定性、定量分析: 以保留时间和样品加

标定性, 将不同浓度的有机酸标准溶液在同样的色谱条件下进样, 以有机酸浓度为横坐标(mg/mL), 有机酸峰面积(mV)为纵坐标, 绘制标准曲线, 采用峰面积外标法定量, 得到不同有机酸的线性范围、回归方程及相关系数。有机酸计算公式见公式 2:

$$C = \frac{C_{\text{样}} \times N \times 100}{W \times (1 - M) \times 1000} \quad (2)$$

式中: C 为醋醅中有机酸含量, g/100 g 干醅; C 样为由有机酸标准曲线所得有机酸浓度, mg/mL; N 为样品稀释倍数; W 为醋醅质量, g; M 为醋醅水分含量, %。

1.2.7 数据统计分析

实验数据处理由 GC-MS 数据分析软件系统完成, 未知化合物经计算机检索同时与 NSIT、RTLPEST 两个谱库相匹配, 仅当匹配度大于 800(最大值为 1000)的鉴定结果才予以报道。利用 IBM SPSS Statistics 19.0 软件数据分析, Origin 8.5 软件用于作图分析。

2 结果与分析

2.1 产多糖乳酸菌的筛选

2.1.1 乳酸菌定性试验

从保宁醋醋曲中得到疑似乳酸菌菌株共 12 株, 分别编号为 L1~L12, 采用层析法检测 12 株菌株是否产生乳酸, 结果如表 1 所示, 乳酸标准样品的 Rf 值为 0.82, 其他菌株的 Rf 值均在 0.82 左右, 可确定 12 株菌株均能产生乳酸。

表 1 乳酸菌的纸层析试验

Table 1 Paper chromatography of lactic acid bacteria

菌株	Rf 值
空白	0.00
L1	0.82
L2	0.83
L3	0.82
L4	0.83
L5	0.83
L6	0.81
乳酸标准	0.82
L7	0.82
L8	0.82
L9	0.81
L10	0.82
L11	0.82
L12	0.82

2.1.2 乳酸菌产酸测定

乳酸菌的产酸率是衡量乳酸菌性能的一个重要的

指标, 通过酸碱滴定法测定乳酸的含量, 其结果如图 1 所示。

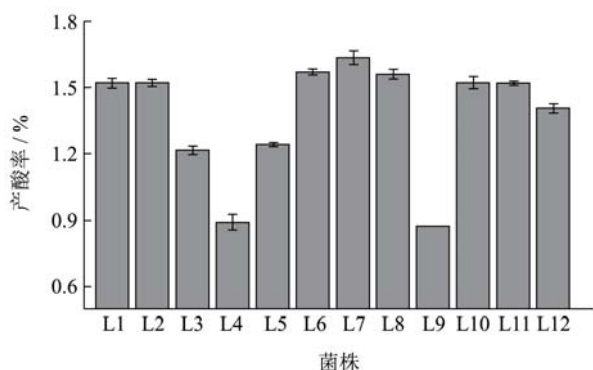


图 1 乳酸菌的产酸率

Fig.1 Acid-producing rate of lactic acid bacteria strains

图 1 中, 菌株 L3、L4、L5、L9 的产酸率较低, 均低于 1.30%, 菌株 L12 产酸率稍低于 1.50%, 为 1.41%, 其余菌株产酸率均稍高于 1.50%, 菌株 L7 的产酸率最高, 达到 1.62%。目前, 研究中的乳酸菌的产酸率均较低, 大多低于 1.50%, 故而选择产酸率在 1.50%左右的菌株 L1、L2、L6、L7、L8、L10、L11 和 L12 进行后期试验。

2.1.3 产多糖乳酸菌的筛选

乳酸菌胞外多糖的测定: 经过对乳酸菌胞外多糖的提取, 并采用苯酚-硫酸法测定吸光度, 依据葡萄糖标准曲线, 计算 8 株乳酸菌发酵液的多糖含量, 其结果如图 2 所示。

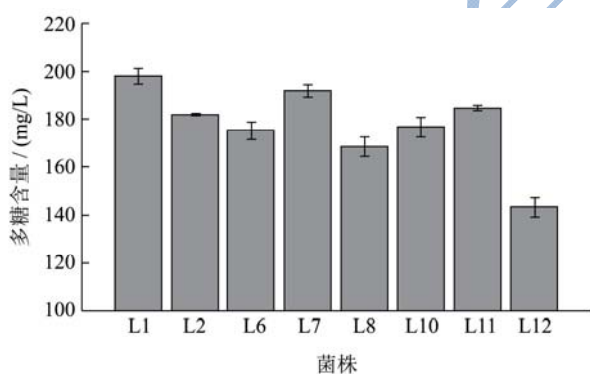


图 2 乳酸菌发酵液多糖含量

Fig.2 Polysaccharide contents of fermentation broth of lactic acid bacteria

图 2 中, 除菌株 L12 外, 不同菌株的产多糖含量有所差异, 菌株 L12 产多糖含量最低, 仅为 143.27 mg/L, 菌株 L1 产多糖含量最高, 其次为 L7、L11、L2, 分别达到 198.05 mg/L、191.98 mg/L、184.80 mg/L 和 182.07 mg/L, 均高于本实验室在泡菜中筛选得到一株产量为 108.00 mg/L 的乳酸菌。此外, 唐血梅等^[10]人从新疆酸奶中得到一株多糖含量为 121.60 mg/L 的乳酸菌, 而菌株 L1、L7、L11 和 L2 的多糖含量均

高于 121.60 mg/L, 表明四株乳酸菌的胞外多糖含量较高, 并且四株乳酸菌发酵液中多糖含量并无明显差异, 故而选用该四株乳酸菌进行后期耐酸性能试验。

2.1.4 产多糖乳酸菌的耐酸性试验

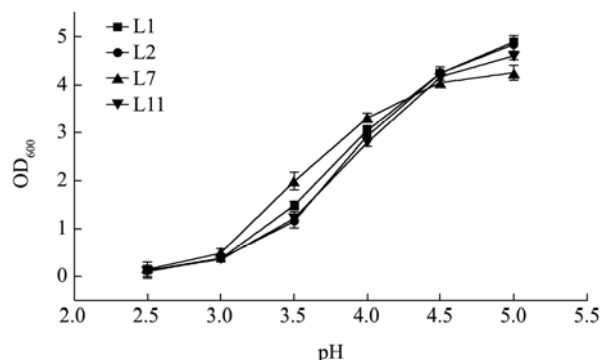


图 3 产多糖乳酸菌的耐酸能力

Fig.3 Acid-resistant ability of polysaccharide-producing lactic acid bacteria

将活化后的菌株接种于不同 pH 的液体 MRS 培养基中培养, 培养结束后, 在波长 600 nm 下测定发酵液的吸光度。其变化情况如图 3 所示。

图 3 中, 四株乳酸菌随 pH 增加, 其发酵液的吸光度逐渐增加, 在 pH 为 2.5 时, 四株乳酸菌均能生长, 但其发酵液吸光度均在 0.1~0.2 范围内, 表明其生长受到明显的抑制。

在 pH 在 3.0~5.0 的范围时, 菌株 L1、L2 发酵液的吸光度随 pH 变化而明显变化, 并未出现较为平缓的趋势, 菌株 L11 在 pH 为 3.0~4.5 范围内, 发酵液吸光度变化强烈, 在 pH 4.5 后, 变化开始有所平缓。菌株 L7 在 pH 为 3.0~4.0 范围内, 发酵液吸光度变化最为明显, 但在 pH 4.0 后, 发酵液吸光度开始趋于平缓, 变化程度均小于其他三株乳酸菌。综合考虑乳酸菌的产酸量、产多糖量以及耐酸能力, 选用乳酸菌 L7 进行后期的生物强化试验。

2.2 生理生化鉴定及 16S rDNA 分子鉴定

2.2.1 L7 的生理生化鉴定

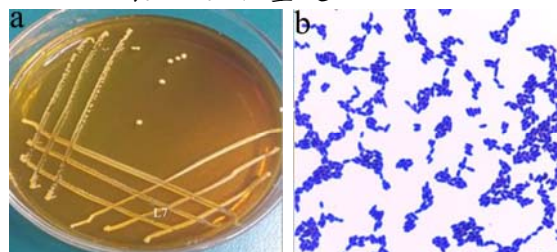


图 4 乳酸菌的菌落形态和个体形态

Fig.4 Colony morphology and individual morphology of the isolated lactic acid bacteria

将菌株 L7 接种于醋酸菌分离培养基和 MRS 培养

基础上, 观察其菌落形态, 通过革兰氏染色观察其个体形态, 对其进行部分生理生化试验。其菌落形态及个体形态结果如图 4 所示, 生理生化试验结果如表 2 所示。L7 菌落较小为圆形, 乳白色或乳黄色, 边缘整齐, 湿润光滑, 有光泽, 革兰氏染色为阳性菌, 为短杆状, 多为单生, 参考《伯杰细菌手册》可初步判定乳酸菌 L7 为发酵乳杆菌属。

表 2 乳酸菌的生理生化鉴定

Table 2 Physiological and biochemical identification of lactic acid bacteria

生理生化试验	结果	糖发酵试验	结果
接触酶	-	葡萄糖	+
淀粉水解	-	乳糖	+
明胶液化	-	麦芽糖	+
七叶苷水解	-	海藻糖	+
吲哚试验	+	鼠李糖	-
H ₂ S 试验	-	纤维二糖	+
运动性	-	甘露醇	-
15 °C 生长	+	山梨醇	-
45 °C 生长	+	D-果糖	+
棉籽糖	+	D-木糖	D

注: “+”代表阳性; “-”代表阴性; “D”代表可变。

2.2.2 L7 的 16S rDNA 分子鉴定

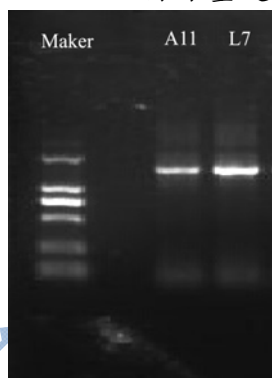


图 5 PCR 扩增电泳图

Fig.5 PCR amplification electrophoresis of the strain L7 DNA

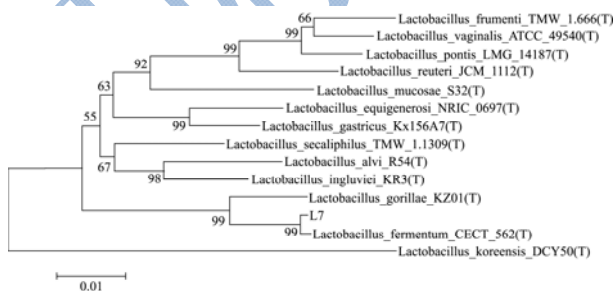


图 6 L7 系统发育树示意图

Fig.6 Phylogenetic tree of the strain L7

以乳酸菌 L7 的 DNA 为模板, 27F/1492r 为引物, 进行 PCR 扩增, 其扩增产物以 1% 的琼脂糖电泳检测,

其扩增结果如图 5 所示。送往上海杰李生物有限公司测序, BLAST 基因比对后, MEGA 6.0 软件构建系统进化发育树, 结果如图 6 所示, 发酵乳酸杆菌 (*Lactobacillus_femertum_CECT_562*) 与菌株 L7 在同一分支上, 同源率为 99%, 故可认为菌株 L7 发酵乳酸杆菌(*Lactobacillus_femertum*)。

2.3 代谢产物分析

2.3.1 乳酸菌 L7 发酵液中挥发性物质分析

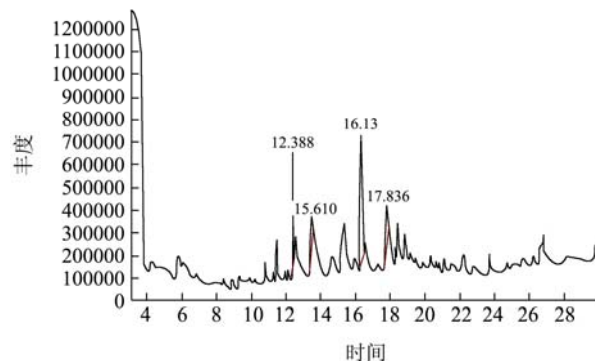


图 7 空白发酵液总离子流图

Fig.7 Ion-flow graph of THE blank fermentation broth

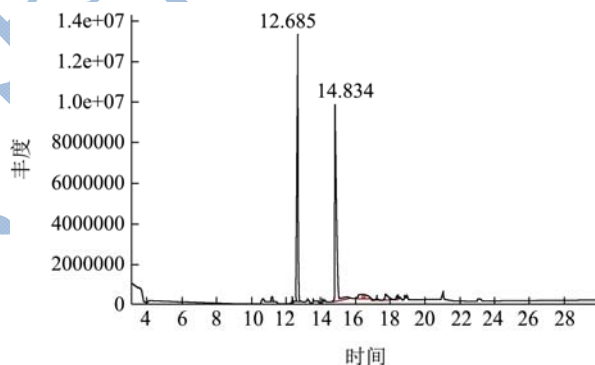


图 8 乳酸菌 L7 发酵液的总离子流图

Fig.8 Ion-flow graph of fermentation broth of the strain L7

采用 HS-SPME-GC-MS 法检测乳酸菌发酵液中的挥发性成分种类及相对含量, 其结果如图 7、图 8、表 3 所示。

表 3 中, 空白发酵液和 L7 发酵液中分别检出挥发性物质 4 种和 11 种, 其中空白发酵液中主要是吡嗪和醛类物质, 在 L7 发酵液中并未检出 2,5-二甲基吡嗪和苯甲醛, 并且其他两种物质均显著减少, 表明该四种挥发性物质可能被 L7 所利用。菌株 L7 可产生 9 种新的代谢产物, 其中醇类物质 4 种、酯类 1 种、酸类 1 种、酮类 1 种及其他物质 2 种, 主要的挥发性物质为乙酸和 3-羟基-2-丁酮, 相对含量分别达到 45.76% 和 36.22%, L7 也可生成较多的乙酸, 不仅可增加成品醋的酸度, 提高出酸率, 而且乙酸与乙醇等醇类物质酯化生成各种酯类物质从而增加其风味成分。目前,

有研究发现芽孢杆菌可产生 3-羟基-2-丁酮^[11]、川芎嗪^[12]等物质, 关于乳酸菌生成 3-羟基-2-丁酮的研究较少, 而乳酸菌 L7 可产生大量 3-羟基-2-丁酮, 这将为川芎嗪的生成提供前提物质, 而川芎嗪是食醋中重要

的功能性物质, 具有扩张血管、改善组织微循环, 提高组织血流灌注、调节脂质代谢、抗脂质过氧化、调节免疫等作用^[13,14], 该物质有利于提升食醋中的功能性, 改善食醋的功能。

表 3 产多糖乳酸菌 L7 发酵液中挥发性成分

Table 3 Volatile components of the fermentation broth of lactic acid bacteria L7

序号	停留时间/min	英文名称	中文名称	相对含量/%	
				空白发酵液	L7 发酵液
1	11.205	1-Butanol, 3-methyl-	异戊醇		1.58
2	11.205	1-Butanol, 3-methyl-, formate	甲酸异戊酯		-
3	12.358	Pyrazine, methyl-	2-甲基吡嗪	17.48	0.50
4	12.685	2-Butanone, 3-hydroxy-	3-羟基-2-丁酮		36.22
5	13.51	Pyrazine, 2,5-dimethyl-	2,5-二甲基吡嗪	8.78	
6	14.834	Acetic acid	乙酸		45.76
7	14.834	Ammonium acetate	乙酸铵		-
8	16.312	Benzaldehyde	苯甲醛	59.39	
9	16.587	2,3-Butanediol	2,3-丁二醇		3.02
10	16.587	2,3-Butanediol, [S-(R*,R*)]-	(2S,3S)-(+)-2,3-丁二醇		-
11	17.782	Benzeneacetaldehyde	苯乙醛	14.35	2.93
12	18.375	Oxime-, methoxy-phenyl-	甲氧基苯基肟		1.14
13	21.015	Phenylethyl Alcohol	苯乙醇		1.73

注: “-”表示可检测, 但无具体相对含量。

2.3.2 发酵液中有有机酸分析

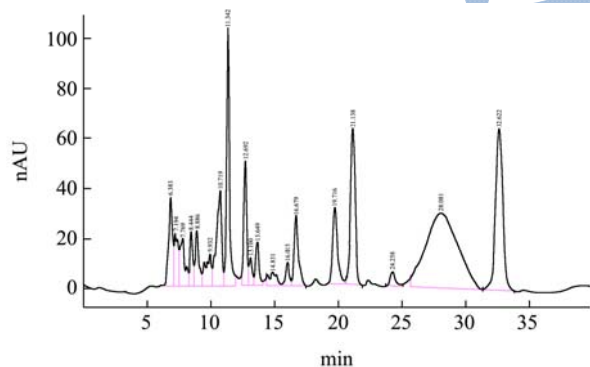


图 9 乳酸菌 L7 发酵液中有有机酸色谱图

Fig.9 Organic acid chromatogram of fermentation broth of Lactic acid bacteria L7

表 4 发酵液中有有机酸检测

Table 4 Detection of organic acid in the fermentation broth

有机酸种类	保留时间/min	L7 发酵液中有有机酸含量/(mg/100 mL)
草酸	7.713	-
L-苹果酸	9.675	-
乳酸	10.853	66.56
乙酸	11.372	104.08
柠檬酸	14.301	-
琥珀酸	15.211	-

注: “-”表示未检测到。

乳酸菌 L7 发酵液中有有机酸的分析: 采用高效液相色谱法检测乳酸菌发酵液中的有机酸的种类及相对含量, 其结果如图 9、表 4 所示。

表 4 中, 乳酸菌 L7 发酵液中均只检测到两种有机酸, 分别为乳酸、乙酸, 其保留时间: 分别为 10.853 min、11.372 min。乳酸含量达到 66.56 mg/100 mL, 乙酸高达 104.08 mg/100 mL。

3 结论

从保宁醋醋曲中筛选得到 12 株乳酸菌, 通过定性、产酸率、耐酸能力试验, 多糖含量测定, 得到一株产多糖量为 191.98 mg/L, 产酸率为 1.62% 的乳酸菌, 分别通过生理生化试验及 16S rDNA 鉴定为发酵乳酸杆菌(Lactobacillus_femertum)。采用固相微萃取-气质联用法和高效液相色谱法分析醋酸菌 L7 发酵液中的风味物质和有机酸含量, 共检测到 11 种挥发性物质, 主要为 3-羟基-2-丁酮和乙酸, 相对含量分别为 36.22% 和 45.76%, 有机酸共检测到乳酸和乙酸, 产量分别为 66.56 mg/100 mL 和 104.08 mg/100 mL, 这将有利于提高食醋酸度以及川芎嗪含量。乳酸菌在食醋发酵过程中发挥重要作用, 而此次所得乳酸杆菌产酸能力突出, 且可高产多糖, 其对保宁醋工业生产和发酵工艺的改

良具有指导意义。

参考文献

- [1] 刘军. 保宁醋酿造的工艺特性[J]. 江苏调味副食品, 2003, 20(6):11-18
LIU Jun. The craft characteristic of the Baoning vinegar make by fermentation [J]. Jiangsu Condiment and Subsidiary Food, 2003, 20(6): 11-18
- [2] 晨焰. 四川保宁醋[J]. 上海调味品, 1999, 4:8-9
CHEN Yan. Sichuan Baoning vinegar [J]. Shanghai Seasoning, 1999, 4: 8-9
- [3] 张锦盛, 刘军, 朱文优, 等. 固态发酵酿醋中复合麸曲的应用研究[J]. 中国酿造, 2013, 32(1):124-126
ZHANG Jin-sheng, LIU Jun, ZHU Wen-you, et al. Application of compound bran-kojis in vinegar production with solid-state fermentation [J]. China Brewing, 2013, 32(1): 124-126
- [4] 刘军, 朱文优, 杨勇. 保宁醋固态发酵理化指标的动态分析[J]. 中国酿造, 2006, 5:45-47
LIU Jun, ZHU Wen-you, YANG Yong. Dynamic analysis of physio chemical index of Baoning vinegar with solid-state fermentation [J]. China Brewing, 2006, 5: 45-47
- [5] 刘先, 康小红, 孙军德. 高产胞外多糖乳酸菌的筛选与初步鉴定[J]. 农产品加工(学刊), 2010, 3:38-40
LIU Xian, KANG Xiao-hong, SUN Jun-de. Screening and identification of lactic acid bacteria with high EPS-producing capacity [J]. Nongchanpin Jiaogong(Xuekan), 2010, 3: 38-40
- [6] 刘晓涵, 陈永刚, 林励, 等. 蒽酮硫酸法与苯酚硫酸法测定枸杞子中多糖含量的比较[J]. 食品科技, 2009, 34(9):270-272
LIU Xiao-han, CHEN Yong-gang, LIN Li, et al. Comparison of methods in determination of polysaccharide in *Lycium Barbarum* L. [J]. Food Science and Technology, 2009, 34(9): 270-272
- [7] 吉志伟, 刘阳, 邓静, 等. 自然发酵甜面酱中一株芽孢杆菌的分离鉴定及益生特性初探[J]. 中国调味品, 2015, 40(12):26-30
JI Zhi-wei, LIU Yang, DENG Jing, et al. Isolation and identification of a bacillus strain from the spontaneous fermented sweet sauce and preliminary study on probiotic properties [J]. China Condiment, 2015, 40(12): 26-30
- [8] Sekiguchi H, Watanabe M, Nakahara T, et al. Succession of bacterial community structure along the Changjiang river determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2002, 68 (10): 5142-5150
- [9] 刘阳, 邓静, 吴华昌, 等. 柑橘果皮中生香酵母的筛选及挥发性香气成分分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(12):4050-4055
LIU Yang, DENG Jing, WU Hua-chang, et al. Screening of yeast in citrus peels and their volatile aromatic components analysis [J]. Food Safety and Quality Detection Technology, 2014, 5(12): 4050-4055
- [10] 唐血梅, 李海英, 赵芳, 等. 新疆酸马奶中高产胞外多糖乳酸菌筛选鉴定及培养条件优化研究[J]. 新疆农业科学, 2012, 49(8):1540-1545
TANG Xue-mei, LI Hai-ying, ZHAO Fang, et al. Study on screening and identification of a lactic acid bacterium with high EPS producing capacity and optimization of culture conditions in koumiss in Xinjiang [J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2012, 49(8): 1540-1545
- [11] Xiao Z, Ma C, Xu P, et al. Acetoin catabolism and acetylbutanediol formation by *Bacillus pumilus* in a chemically defined medium [J]. PloS one, 2009, 4(5): e5627
- [12] Nicholson W L. The *Bacillus subtilis* ydjL (bdhA) gene encodes acetoin reductase/2,3-butanediol dehydrogenase [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2008, 74(22): 6832-6838
- [13] 杨雪梅. 川芎嗪药理作用研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2010, 31(3):215-217
YANG Xue-mei. Research progress of pharmacological action of ligustrazine [J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2010, 31(3): 215-217
- [14] 黄文东, 杨永飞, 陈建文, 等. 丹参素与川芎嗪对心血管系统的协同作用[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(3):432-436
HUANG Wen-dong, YANG Yong-fei, CHEN Jian-wen, et al. Synergistic effects of danshensu and ligustrazine on cardiovascular system [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2013, 29(3): 432-436