基于蔗糖代谢途径分析保加利亚乳杆菌的后酸化性能

唐宗馨，杨硕，段勃帆，陈禹含，孟祥晨*

（东北农业大学食品学院，乳品科学教育部重点实验室，黑龙江哈尔滨 150030）

摘要：弱后酸化能力是乳酸菌作为发酵剂使用时的重要特性。为研究保加利亚乳杆菌蔗糖代谢途径对发酵乳后酸化起到的作用，该研究比较了五株保加利亚乳杆菌的后酸化性能，分析了保加利亚乳杆菌的生长情况、糖代谢和产酸能力，探究了蔗糖代谢产酸相关基因的差异表达及关键酶活性，并研究了外源添加蔗糖代谢关键酶前后保加利亚乳杆菌的生长情况。结果表明，*Lb.* 1 后酸化能力最弱，在以蔗糖为碳源的培养基中生长缓慢，KLDS 1.0207 后酸化能力最强。发酵 24 h 后，二者蔗糖转化率分别为 5.85%和 85.39%，乳酸含量分别为 1.13 g/L 和 11.81 g/L。在含双糖（乳糖:蔗糖=1:1.5）的 MRS 培养基中生长时，KLDS 1.0207 蔗糖代谢途径中基因 *sac*A、*pgi*、*gap*、*pgk*、*ldh* 表达量极显著高于 *Lb.* 1（$P<0.01$），KLDS 1.0207 蔗糖酶活性显著高于 *Lb.* 1（$P<0.05$），达到 1.31 U/mg。在 *Lb.* 1 的蔗糖培养基中补充蔗糖酶后，$OD_{600\,nm}$ 增至原来的 5 倍。因此，蔗糖酶活性对保加利亚乳杆菌代谢蔗糖至关重要，编码蔗糖酶的 *sac*A 基因表达下调显著减弱蔗糖酶活性，菌株后酸化能力明显下降。

关键词：保加利亚乳杆菌；蔗糖代谢；后酸化；发酵乳；蔗糖酶

文章编号：1673-9078(2023)12-142-150 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.12.0083

Analysis of Post-acidification Property of *Lactobacillus bulgaricus* Based on Sucrose Metabolism Pathway

TANG Zongxin, YANG Shuo, DUAN Bofan, CHEN Yuhan, MENG Xiangchen*

(Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, School of Food Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Weak post-acidification ability is an important characteristic of lactic acid bacteria when being used as a starter culture. In order to study the role of *Lactobacillus bulgaricus* sucrose metabolic pathway on post-acidification of fermented milk, in this study, the post acidification performances of five *Lactobacillus bulgaricus* strains was compared, the growth status, sugar metabolism and acid production capacity of *Lactobacillus bulgaricus* were analyzed, the differential expression of genes related to sucrose metabolism and acid production and the activities of key enzymes were investigated, and the growth of *Lactobacillus bulgaricus* before and after the exogenous addition of key enzymes for sucrose metabolism, were studied. The results showed that *Lb.* 1 had the weakest post-acidification ability and grew slowly in the medium with sucrose as the carbon source. KLDS 1.0207 had the strongest post-acidification ability. After fermentation for 24 h, the sucrose conversion rates were 5.85% and 85.39%, respectively, and the lactic acid contents were 1.13 g/L and 11.81 g/L, respectively, for these two strains. The expression levels of *sac*A, *pgi*, *gap*, *pgk* and *ldh* in the sucrose metabolism pathway of KLDS 1.0207 were extremely significantly higher than those for *Lb.*1 when MRS containing disaccharide (lactose:sucrose=1:1.5) was used as the growth medium ($P<0.01$), with the activity of sucrose enzyme of KLDS 1.0207 being significantly higher (reaching 1.31 U/mg) than that of *Lb.* 1 ($P<0.05$). The $OD_{600\,nm}$ increased

引文格式：

唐宗馨,杨硕,段勃帆,等.基于蔗糖代谢途径分析保加利亚乳杆菌的后酸化性能[J].现代食品科技,2023,39(12):142-150

TANG Zongxin, YANG Shuo, DUAN Bofan, et al. Analysis of post-acidification property of *Lactobacillus bulgaricus* based on sucrose metabolism pathway [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(12): 142-150

收稿日期：2023-01-30

基金项目：国家自然科学基金项目（32272291）

作者简介：唐宗馨（1998-），女，硕士研究生，研究方向：食品微生物，E-mail：15636170152@163.com

通讯作者：孟祥晨（1970-），女，博士，教授，研究方向：乳品科学、食品微生物，E-mail：xchmeng@163.com

by 5 times after sucrase was supplemented into the sucrose medium of *Lb*. 1. Therefore, the activity of sucrase is crucial for the sucrose metabolism in *Lactobacillus bulgaricus*. The downregulation of the expression of *sac*A gene encoding sucrase significantly weakened the activity of sucrase, and the post-acidification ability of the strain decreased significantly.

Key words: *Lactobacillus bulgaricus*; sucrose metabolism; post-acidification; fermented milk; sucrase

发酵乳是指以原料乳为底物，经保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌等发酵剂发酵而制成的乳制品，因其具有丰富的营养物质、独特的风味以及对人体的健康益处深受消费者喜爱[1]，发酵剂的产酸能力不仅会影响发酵乳制品的风味，还会影响发酵乳在贮藏过程中的产酸情况[2]。发酵乳在贮藏、运输、销售等食用前阶段，其中的乳酸菌继续以缓慢的速度持续代谢产生乳酸，乳酸量过大会使产品出现消费者不可接受的过度酸味，导致发酵乳感官品质下降，这种现象被称为发酵乳的后酸化。后酸化会使发酵乳的流变性质变差，降低其中益生菌的存活，缩短产品保质期，严重影响发酵乳的可食用性[3,4]。目前发现，影响发酵乳后酸化的因素包括：菌株特性[5]、牛奶成分[6]、温度和 pH 值[7,8]等，其中，选择使用后酸能力弱的菌株发酵制作发酵乳是控制后酸化的重要措施之一。

近年来，随着发酵乳市场逐渐发展壮大，发酵乳品种越来越多，营养价值越来越丰富，已经成为生活的必需品，但其后酸化问题却一直制约着发酵乳行业的发展。无论是消费者还是生产制造商都越来越关心发酵乳的货架期品质稳定性问题。一些研究人员尝试通过改善工艺水平控制发酵乳后酸化[9]，一些研究人员试图使用添加剂、细菌素减弱发酵乳的后酸化情况[10,11]，同时也有人对菌株的诱变育种和基因工程方面进行了大量研究[12]，但突变菌株的安全性及遗传稳定性都不确定，不能从根本上解决后酸化问题。研究表明保加利亚乳杆菌具有很强的耐酸性和产酸能力，是发酵乳发酵后期的优势菌，也是导致后酸化的主要菌株[13]。在产酸过程中，保加利亚乳杆菌通过 β-半乳糖苷酶将乳糖分解成半乳糖和葡萄糖，通过蔗糖酶（β-D-呋喃果糖苷水解酶）将蔗糖分解成果糖和葡萄糖，葡萄糖进入糖酵解（EMP）途径产生丙酮酸，丙酮酸在乳糖脱氢酶的催化下分解代谢为乳酸，逐渐地使培养基质酸化[14]。目前，有研究揭示了保加利亚乳杆菌代谢乳糖相关基因的表达[15]，还有研究证明可以通过调控保加利亚乳杆菌乳糖代谢途径中产酸关键酶的活性来减弱发酵乳的后酸化[16]，而针对保加利亚乳杆菌蔗糖代谢途径的研究鲜有报道。因此，基于保加利亚乳杆菌蔗糖代谢途径研究保加利亚乳杆菌的后酸化性能，对调控发酵乳后酸化、提高发酵乳质量和货架期内的品质稳定性有非常重要的意义。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

1.1.1 菌株

东北农业大学乳品科学教育部重点实验室前期分离保藏的保加利亚乳杆菌 *Lb*. 1、*Lb*. 2、KLDS 1.1011、KLDS 1.1006 及 KLDS 1.0207。

1.1.2 培养基

MRS 培养基（葡萄糖质量分数 2%），北京奥博星生物技术有限公司；脱脂乳培养基：12 g 脱脂乳溶于 100 mL 蒸馏水；乳糖培养基：将 MRS 中的葡萄糖换为等质量乳糖；蔗糖培养基：将 MRS 中的葡萄糖换为等质量蔗糖；双糖培养基：将 MRS 中的葡萄糖换为等质量的乳糖和蔗糖（乳糖:蔗糖=1:1.5）。

1.1.3 试剂

乳糖、蔗糖、半乳糖、乳酸标准品（色谱纯），天津市科密欧化学试剂有限公司；蔗糖酶，北京红润宝顺科技有限公司；微生物蔗糖酶检测试剂盒，江苏酶免实业有限公司；RNA 反转录试剂盒、Talent qPCR PreMix（SYBR Green）实时聚合酶链式反应试剂盒、培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒，天根生化科技有限公司。

1.2 仪器与设备

SPL-150 型恒温培养箱，天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司；Waters 2695 高效液相色谱仪，美国 Waters 公司；光学显微镜，上海光学仪器一厂；DK-8 D 型电热恒温水槽，上海一恒科技有限公司；Model 680 型酶标仪，美国 Beckman 公司；紫外分光光度计，美国 Bio-Rad 公司；荧光定量 PCR 仪，美国 Applied Biosystems 公司；微量台式离心机，美国 Beckman 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 保加利亚乳杆菌后酸能力的测定

将实验室保藏的 5 株保加利亚乳杆菌分别接种至脱脂乳培养基中活化 2 代，再以 3%（*V*/*V*）的接种量接种至质量分数为 6%的蔗糖脱脂乳培养基中，42 ℃发酵至 70 ºT，4 ℃冷藏 12 h 后记作贮藏的起点，再于 4 ℃贮藏 21 d，每隔 3 d 取样测定 pH 值、滴定酸度和

活菌数。

参考国标（GB 5009.237-2016）[17]测定发酵乳的pH值；参考国标（GB 5009.239-2016）[18]测定发酵乳的滴定酸度，最终滴定酸度采用吉尔涅尔度（°T）表示；参照国标（GB 4789.35-2016）[19]测定发酵乳中活乳酸菌的数量。

1.3.2 保加利亚乳杆菌发酵乳的糖代谢活性测定

1.3.2.1 样品的前处理

取经发酵、冷藏后熟后贮藏第0、7、14、21天的发酵乳，采用Carrez法处理除去样品中的蛋白质收集上清液[20]。

1.3.2.2 蔗糖、乳糖、半乳糖及乳酸含量的测定

分别取蔗糖、乳糖、半乳糖和乳酸标准品，加去离子水配制为20 g/L的标准储备液，稀释至合适浓度并混合作为液相色谱的混合标准品。

分别取经1.3.2.1处理后的上清液和混合标准品各1.5 mL，分别过0.22 μm滤膜以去除蛋白及细菌菌体，使用液相色谱仪检测蔗糖、乳糖、半乳糖及其代谢产生乳酸的含量，进样量为10 μL[21]。

色谱条件：HPX-87H色谱柱（酸柱），检测波长254 nm，柱温60 ℃，流动相为5 mmol/L H_2SO_4，分离时间为30 min，流速0.6 mL/min。

Hi-plexH色谱柱（糖柱），检测波长254 nm，柱温60 ℃，流动相为纯水，分离时间为15 min，流速0.6 mL/min。

在上述条件下，获得蔗糖保留时间为9.94 min，标准曲线为y=18 848x+7 446.4，R^2=0.995 8；乳糖保留时间为8.73 min，标准曲线为y=13 487x+15 122，R^2=0.996 5；半乳糖保留时间为10.46 min，标准曲线为y=16 849x+6 144.7，R^2=0.995 2；乳酸保留时间为20.93 min，标准曲线为y=70 066x-47 603，R^2=0.991 8。式中的y表示液相色谱中的峰面积（mV·s）；x表示质量浓度（g/L）。

1.3.3 保加利亚乳杆菌在含不同碳源培养基中的生长情况

分别取后酸能力差异最大的*Lb.* 1和KLDS1.0207活化2次后，以3%（*V*/*V*）的接种量接种至乳糖和蔗糖培养基中，37 ℃培养24 h，每隔2 h取样，记录发酵24 h过程中菌株的pH值和$OD_{600\ nm}$。

1.3.4 发酵液蔗糖及乳酸含量的测定

将*Lb.* 1与KLDS 1.0207以3%（*V*/*V*）接种量接种至蔗糖培养基中，37 ℃下培养24 h，分别取0 h和24 h的培养物1.5 mL，在12 000 r/min转速下离心10 min，取上清液过0.22 μm滤膜以去除蛋白及细菌菌体，使用高效液相色谱仪按照1.3.2.2方法检测蔗糖及乳酸的含量。

1.3.5 荧光定量PCR检测蔗糖代谢相关基因表达量

1.3.5.1 菌体的收集

将*Lb.* 1与KLDS1.0207以3%（*V*/*V*）接种量分别接种至双糖培养基中，37 ℃下培养24 h后，取培养物400 μL于4 ℃、12 000 r/min离心2 min后收集菌体。

1.3.5.2 RNA的提取及逆转录

采用天根RNA prep Pure培养细胞/细菌总RNA提取试剂盒提取菌体总RNA，按照反转录试剂盒说明书在冰浴条件下混合体系并合成cDNA，合成后于-20 ℃保存。

1.3.5.3 引物的设计及RT-qPCR分析

以*rep*A为内参基因，使用QuantStudio 3系统和TB Green® Premix Ex Taq™ II测定目标基因的表达。反应体系为20 μL，反应条件：95 ℃预变性30 s，95 ℃变性5 s，60 ℃延伸30 s，共进行40个循环，并记录循环阈值。引物采用Primer 5.0软件设计（表1），部分引物的设计参照文献。

计算方法：*Lb.* 1培养物为对照组，以相同取样条件KLDS1.0207培养物作为试验组，根据ΔCt=目标基因Ct-内参基因Ct，ΔΔCt=ΔCt试验组-ΔCt空白组，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$相对定量法计算目标基因相对表达量。

表1 实时荧光定量RT-qPCR引物

Table 1 Primers of RT-qPCR

引物名称	核苷酸序列（5′→3′）	引物来源
*rec*A	F-TCCTGTCTCAGCCAAACACT R-GTCACCCATTTCACCTTCG	[22]
*sac*A	F-ATCCAGGTCAAATGCCGCTTCAG R-GGAACATCAACCGCCACTACTACAG	自行设计
*gtf*A	F-CAGAGCATGTGACTGAGCACTTCC R-GGACTCGTTACAGCATCTGCCTTG	自行设计
pgi	F-GGTTGTCTTCTGCGGTAAC R-CTTGGCTGCTTCTTCCTTG	[15]
gap	F-ACTCACTTGCTCCAATGGCTAACG R-TTGCGGAAGTTGTTGCCTCTGTC	自行设计
pgk	F-GTATCGTGGCTGCTTTGC R-ACTTCCTTGCCTTCGTTTG	[15]
ldh	F-GTCTTCTCTGACGCCAAGTTCTACG R-TTGCCAACGATTGACGGGTAGC	自行设计

1.3.6 蔗糖酶活性测定

胞内酶的提取：将*Lb.* 1与KLDS1.0207以3%（*V*/*V*）的接种量接种至蔗糖培养基中，37 ℃培养20 h（对数生长期后期），分别取*Lb.* 1与KLDS 1.0207培养物10 mL于4 ℃，8 000 r/min离心10 min收集菌体，

将菌体悬浮于 8 mL 的 20 mmol/L 的磷酸盐缓冲液（pH 值 7.5）后，加入 1 mL 的 10 mg/mL（20 000 U/mg）的溶菌酶，于 37 ℃下水浴 50 min，将悬浮液 10 000 r/min 离心 10 min 以除去细胞残片和未破碎的细胞，离心后上清液即为胞内酶的粗酶液[16]。

酶活性的测定：将处理后的粗酶液加于酶标板孔底部，之后按照试剂盒说明书进行操作，试验结束后取出溶液立即在 450 nm 处测定吸光度值。在上述条件下，获得蔗糖酶标准曲线为 y=0.294 9x+0.082 6，R^2=0.993。式中：y 表示 $OD_{450\,nm}$；x 表示酶活力（U/mg）。

1.3.7 *Lb.* 1 在含蔗糖酶的蔗糖培养基中的生长

取 *Lb.*1 以 3%（*V*/*V*）的接种量分别接种至蔗糖培养基和补充质量分数为 3‰蔗糖酶的蔗糖培养基中，37 ℃下培养 24 h，每隔 2 h 取样，测定 $OD_{600\,nm}$ 和 pH。

1.4 数据统计分析

所有试验均独立重复三次，结果以“平均值±标准差（Standard Deviation，SD）”表示。采用 SPSS 25 软件进行统计学分析，采用 GraphPad Prism 9 软件进行绘图。两样本比较采用独立样本 t 检验，多样本比较采用 ANOVA 分析和 Tukey 检验，P<0.01 表示差异极显著，P<0.05 表示差异显著，P>0.05 为差异不显著。

2 结果与讨论

2.1 保加利亚乳杆菌的后酸化能力比较

发酵乳酸度是衡量消费者对货架期内产品接受程度的重要指标[23,24]，乳酸菌活菌数一定程度上可以反应发酵乳的新鲜度和品质[25]。本试验使用 5 株保加利亚乳杆菌分别发酵脱脂乳，测定了发酵乳在 4 ℃贮藏期间 pH 值、滴定酸度和活菌数的变化。结果表明，在 0~9 d 的贮藏期间，pH 值下降快，酸度也急剧升高；贮藏 9~21 d 期间，pH 值下降与滴定酸度上升的速率逐渐趋于平缓。5 株菌的后酸化能力由大到小依次为：KLDS 1.0207＞KLDS 1.1006＞*Lb.* 2＞KLDS 1.1011＞*Lb.* 1；其中，KLDS 1.0207 发酵乳的滴定酸度变化最大，*Lb.* 1 发酵乳的滴定酸度变化最小；在贮藏 21 d 结束时，二者的 pH 值分别降至 4.03 和 4.23（图 1a），滴定酸度分别增加了 46.00 °T 和 30.00 °T（图 1b）。菌株在贮藏期内 pH 值与滴定酸度的变化量越小，表明发酵乳的后酸化越弱[26,27]。

发酵乳在 4 ℃贮藏过程中，随酸度升高活菌数降低。初始接种量均为 10^6 CFU/mL，发酵结束后转入 4 ℃贮藏，贮藏开始时活菌数均高于 10^8 CFU/mL，而 12 d 后活菌数大部分降至 10^8 CFU/mL 以下，后酸化程度低的 *Lb.* 1 发酵乳贮藏 21 d 后，从开始的 10^8 CFU/mL 降至 10^7 CFU/mL，活菌数下降了近一个数量级；后酸化程度高的 KLDS 1.0207 从开始 10^8 CFU/mL 贮藏 21 d 降至 10^6 CFU/mL，活菌数下降了两个数量级（图 1c）。在贮藏过程中，由于持续产酸，导致 pH 值下降，不利于乳酸菌的存活，故导致乳酸菌数量下降[28]，不同菌株对酸耐受能力不同，贮藏期间存活差异也比较大[29]。选择后酸能力最弱的保加利亚乳杆菌 *Lb.* 1 与后酸能力最强的 KLDS 1.0207 进行后续试验。

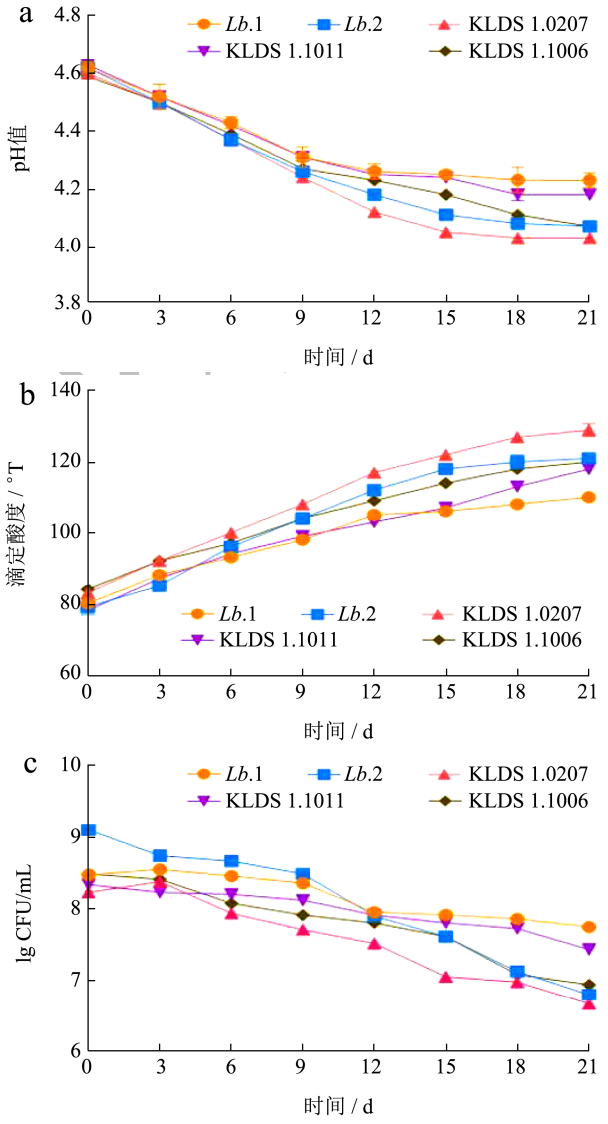


图 1 发酵乳 4 ℃贮藏 21 d 的滴定酸度（a）、pH 值（b）及活菌数（c）变化

Fig.1 Changes in acidity (a), pH value (b) and viable bacteria count (c) of fermented milk stored at 4 ℃ for 21 days

2.2 发酵乳在贮藏期间的糖代谢活性分析

Lb. 1 和 KLDS 1.0207 发酵乳贮藏 21 d，检测碳水化合物的代谢情况，结果表明，在贮藏期间 KLDS

1.0207 发酵乳的蔗糖含量从 4.70 g/L 下降至 3.25 g/L，差异显著（$P<0.05$），而弱后酸化菌株 *Lb.*1 发酵乳的蔗糖含量从 5.34 g/L 下降至 4.78 g/L，差异不显著（$P>0.05$），该菌蔗糖代谢一直处于较低水平；KLDS 1.0207 发酵乳的乳糖含量从 13.70 g/L 下降至 4.62 g/L，*Lb.* 1 发酵乳的乳糖含量从 13.48 g/L 下降至 6.61 g/L，均存在显著性差异（$P<0.05$）；半乳糖含量从贮藏期开始就一直在积累，随着贮藏时间延长，半乳糖的含量逐渐增多，贮藏 21 d 后，*Lb.* 1 与 KLDS 1.0207 发酵乳的半乳糖积累量分别达到 2.87 g/L 和 2.93 g/L，二者乳酸含量分别增加到 5.67 g/L 和 12.17 g/L。上述结果表明后酸化弱的菌株 *Lb.* 1 蔗糖代谢率低，产酸缓慢；后酸化强的菌株 KLDS 1.0207 在贮藏期间则持续代谢蔗糖产酸（表 2）。

在糖代谢过程中，乳糖在 *β*-半乳糖苷酶的作用下水解成葡萄糖和半乳糖，其中，葡萄糖通过类似于磷酸转移酶系统（PTS）转运至胞内，乳糖和半乳糖通过通透酶系统进行转运[14]。蔗糖可以在蔗糖酶（*β*-D-呋喃果糖苷水解酶）的作用下水解成葡萄糖和果糖转运至胞内，也可以先经 PTS 系统转运至胞内再进行水解[30]。研究表明大多数乳酸菌只能代谢蔗糖、乳糖和葡萄糖，而不能利用半乳糖，可能是其不能合成调节 D-半乳糖代谢途径（Leior 途径）中的半乳糖激酶，也可能是由于乳糖-半乳糖的反向转座子运输竞争抑制了半乳糖激酶的活性[14]。

糖代谢途径是为乳酸菌正常生长提供能源和还原力的重要化学反应途径，其中保加利亚乳杆菌不能代谢戊糖，但能通过碳水化合物降解代谢蔗糖、乳糖、葡萄糖和果糖进而生成乳酸，而糖代谢能力较弱的保加利亚乳杆菌只能低效率地通过碳水化合物发酵和底物水平磷酸化的方式获取少量能量，产生较少的 ATP 维持其生命活动并进行生物合成，影响了菌株的能量代谢，能在一定程度上控制发酵乳的后酸化[31,32]。本试验中，半乳糖从贮藏开始就逐渐积累，随着时间的延长，半乳糖的积累量增多，后酸能力强的菌株 KLDS 1.0207 糖代谢能力和产酸能力远远超过了后酸能力弱的 *Lb.* 1，后酸能力弱的 *Lb.* 1 蔗糖代谢能力异常弱，其发酵乳在贮藏 7~21 d 间蔗糖含量无显著差异，可见两株菌表现出的后酸化能力的差异与它们的蔗糖代谢密切相关。

表 2 高效液相色谱法测定发酵乳在 4 ℃贮藏期间蔗糖、乳糖、半乳糖及乳酸的含量（g/L）

Table 2 Determination of sucrose, lactose, galactose and lactic acid in fermented milk by HPLC during storage at 4 ℃ (g/L)

贮藏时间/d	蔗糖		乳糖		半乳糖		乳酸	
	Lb. 1	KLDS 1.0207	*Lb.* 1	KLDS 1.0207	*Lb.* 1	KLDS 1.0207	*Lb.* 1	KLDS 1.0207
0	5.34±0.11 ^{a}	4.70±0.07 ^{a}	13.48±0.76 ^{a}	13.70±0.77 ^{a}	2.44±0.05 ^{c}	3.56±0.07 ^{d}	2.52±0.03 ^{c}	2.65±0.04 ^{d}
7	4.79±0.06 ^{b}	3.80±0.12 ^{b}	11.09±0.39 ^{b}	10.54±0.78 ^{b}	3.34±0.22 ^{b}	5.67±0.05 ^{c}	4.31±0.27 ^{b}	5.67±0.01 ^{c}
14	4.79±0.06 ^{b}	3.49±0.09 ^{c}	9.21±0.51 ^{c}	5.48±0.53 ^{c}	4.97±0.06 ^{a}	6.11±0.16 ^{b}	5.43±0.10 ^{a}	9.06±0.20 ^{b}
21	4.78±0.04 ^{b}	3.25±0.03 ^{d}	6.61±0.48 ^{d}	4.62±0.48 ^{c}	5.31±0.44 ^{a}	6.49±0.24 ^{a}	5.67±0.01 ^{a}	12.17±0.30 ^{a}

注：不同字母表示同一组别、同种菌株不同时间段差异显著，$P<0.05$。

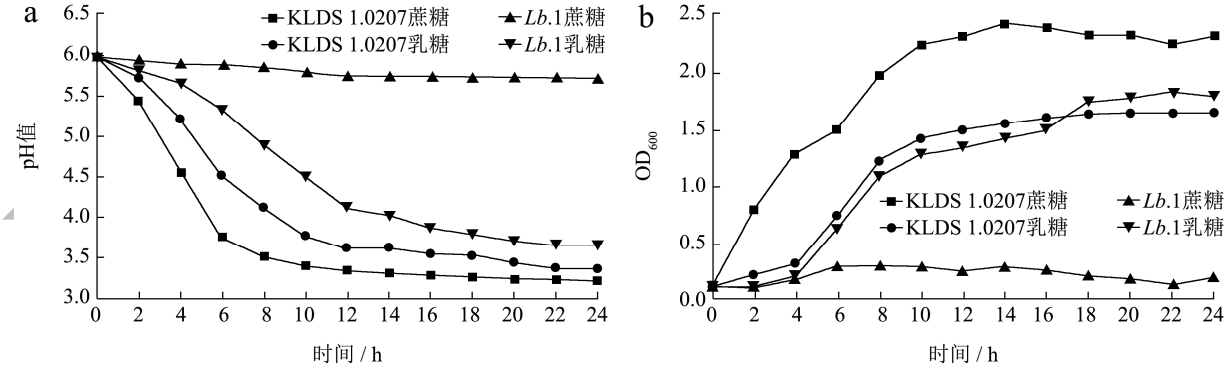


图 2 保加利亚乳杆菌 *Lb.* 1 和 KLDS 1.0207 在蔗糖培养基和乳糖培养基中 37 ℃培养 24 h 的 pH（a）及 $OD_{600\ nm}$（b）变化

Fig.2 Changes of pH (a) and $OD_{600\ nm}$ (b) of *Lb.* 1 and KLDS 1.0207 cultured at 37 ℃ for 24 h on sucrose and lactose medium

2.3 *Lb.* 1 与 KLDS 1.0207 在含不同碳源培养基中的生长

两株菌分别接种至蔗糖和乳糖培养基中培养 24 h，发现两株菌的生长速率相差较大，KLDS 1.0207 在两种培养基中的生长速率明显高于 *Lb.* 1。在乳糖培养基中生长 24 h 后，KLDS 1.0207 与 *Lb.* 1 的 $OD_{600\ nm}$ 差异较小；在蔗糖培养基中生长 24 h 后，KLDS 1.0207 的 $OD_{600\ nm}$ 大约是 *Lb.*1 的 10 倍，前者 pH 值为 3.22，而

Lb. 1 仅为 5.72（图 2）。可见与 KLDS 1.0207 相比，菌株 *Lb.* 1 在蔗糖培养基中的生长缓慢，产酸少，这可能是导致 *Lb.* 1 后酸化能力弱的原因之一。

2.4 两株菌对蔗糖的利用

将 *Lb.* 1 和 KLDS 1.0207 接种于蔗糖培养基发酵 24 h 后，二者的蔗糖终转化率分别为 5.85%和 85.39%，前者极显著低于后者（$P<0.01$），发现菌株 *Lb.* 1 利用蔗糖能力很差；此时两培养物上清液中乳酸质量浓度分别为 1.13 g/L 和 11.81 g/L，差异极显著（$P<0.01$）（表 3）。上述结果表明，保加利亚乳杆菌对蔗糖的利用能力显著影响乳酸的生成量，蔗糖利用能力弱，乳酸生成量也低。蔗糖酶以及 PTS 转运系统中蔗糖磷酸化酶活性可以影响保加利亚乳杆菌代谢蔗糖的能力[33]，*Lb.* 1 生长速率缓慢，代谢蔗糖生成乳酸量低，可能是由于该菌株的蔗糖酶、蔗糖磷酸化酶活性较弱，影响了蔗糖的水解代谢，乳酸生成量也随之减少，导致了菌株的低代谢率和弱产乳酸能力。

表 3 两株菌在蔗糖培养基中 37 ℃培养 24 h 后蔗糖及乳酸的含量（g/L）

Table 3 Sucrose and lactic acid content of two strains cultured in sucrose medium at 37 ℃ for 24 h (g/L)

发酵时间/h	蔗糖		乳酸	
	Lb. 1	KLDS 1.0207	*Lb.* 1	KLDS 1.0207
0	21.57±0.42 ^{a}	19.80±0.27 ^{a}	0.21±0.01 ^{b}	0.23±0.01^{b}
24	20.31±0.05 ^{a*}	3.15±0.04 ^{b*}	1.13±0.01 ^{a*}	11.81±0.26 ^{a*}

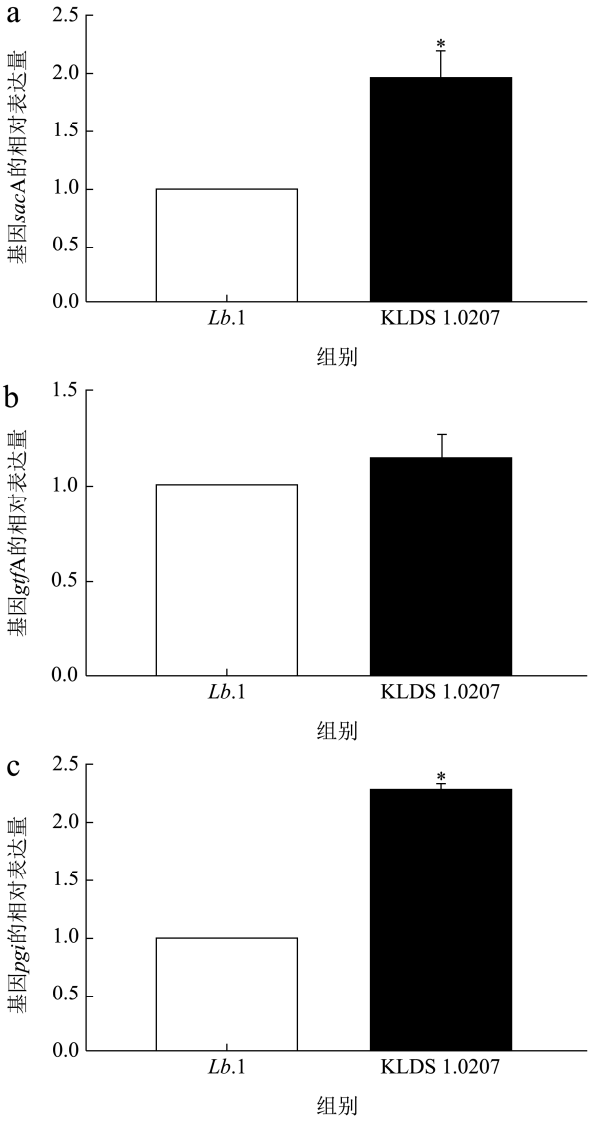
注：不同字母表示同一组别、同一菌株不同时间段差异极显著；*表示不同组别、不同菌株同一时间段差异极显著，$P<0.01$。

2.5 蔗糖代谢途径关键基因的表达量

将 *Lb.* 1 和 KLDS 1.0207 接种于双糖培养基中培养 24 h 后，发现 KLDS 1.0207 菌株与蔗糖代谢生成乳酸相关的基因 *sac*A、*pgi*、*gap*、*pgk*、*ldh* 的相对表达量均极显著高于菌株 *Lb.*1（$P<0.01$），而基因 *gtf*A 的相对表达量与 *Lb.* 1 无显著差异（$P>0.05$），其中，KLDS 1.0207 菌株 *sac*A 基因的表达量是 *Lb.*1 的 1.96 倍（图 3）。

Fernandez 等[34]揭示了保加利亚乳杆菌乳糖代谢途径中的基因 *pgi*、*fru*K、*fba*、*tpi*A、*gap*、*pgk*、*eno*、*pyk*、*ldh*、*tuf*、*pur*R 和 *clp*C 参与了该菌的酸胁迫过程。李晨等[15]发现在保加利亚乳杆菌发酵脱脂乳过程中，基因 *tpi*A、*gap*、*ldh*、*atp*A 表达量变化明显，其中基因 *tpi*A 的过量表达会影响菌株的产酸和生长。上述基因都是乳糖代谢途径中的关键基因，但还未见针对蔗糖代谢途径相关基因的报道。

基因 *sac*A 编码的蔗糖酶参与蔗糖水解过程[35]，基因 *gtf*A 编码的蔗糖磷酸化酶参与蔗糖的转运过程[36]，基因 *pgi* 编码的 6-磷酸葡萄糖脱氢酶、基因 *gap* 编码的 3-磷酸甘油醛脱氢酶参与糖酵解途径，基因 *pgk* 编码的磷酸甘油酸激酶[37]、*ldh* 编码的乳酸脱氢酶参与丙酮酸代谢生成乳酸的过程[38]。*sac*A 为蔗糖代谢途径中的上游基因，KLDS 1.0207 中 *sac*A 相对表达量显著高于菌株 *Lb.* 1（$P<0.01$），基因 *gtf*A 的相对表达量差异不显著。结果表明：与 *Lb.*1 相比，KLDS 1.0207 有更强的蔗糖水解能力，这导致 KLDS 1.0207 代谢蔗糖生成较多的葡萄糖和果糖进入糖酵解途径继续代谢，对应糖酵解途径中的 *pgi*、*gap* 基因的相对表达量上升，进而促进丙酮酸代谢及丙酮酸代谢途径中的基因 *pgk*、*ldh* 的相对表达量升高，生成更多乳酸。因此蔗糖代谢途径中的 *sac*A 基因是影响保加利亚乳杆菌 *Lb.*1 后酸的关键基因。



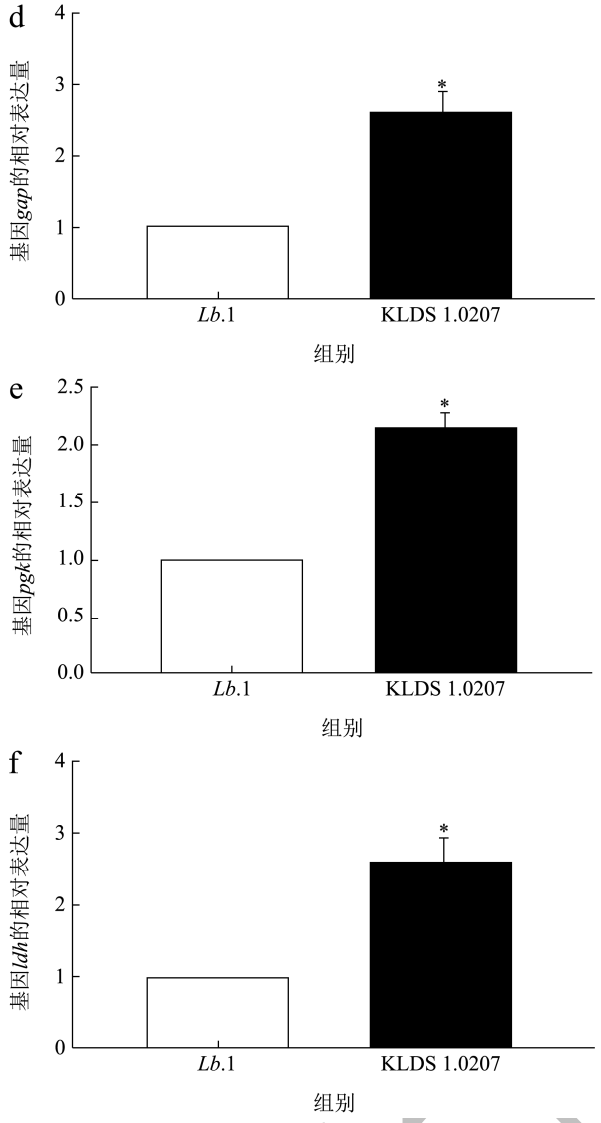


图 3 两株保加利亚乳杆菌在双糖培养基中于 37 ℃培养 24 h 时蔗糖代谢相关基因的表达

Fig.3 Expression of genes related to sucrose metabolism in two strains of *Lactobacillus bulgaricus* cultured in disaccharides medium at 37 ℃ for 24 h

注：*表示与 *Lb.* 1 相比，差异极显著（P<0.01）。

2.6 蔗糖酶活性测定

蔗糖酶活性对保加利亚乳杆菌蔗糖代谢和菌株生长意义重大，通过测定后酸化能力不同的保加利亚乳杆菌 *Lb.* 1 和 KLDS 1.0207 的蔗糖酶活性，发现：后酸能力强的 KLDS 1.0207 菌株蔗糖酶活力显著高于后酸能力弱的 *Lb.* 1（P<0.05）（图 4）。推测菌株蔗糖酶活力高，蔗糖水解能力强，水解后会生成更多的葡萄糖和果糖，为糖酵解途径提供更多的原料，进而生成更多的乳酸，导致发酵乳在贮藏时 pH 值下降，酸度上升。因此，可以通过调控蔗糖酶活性，控制蔗糖水解，弱化后酸。

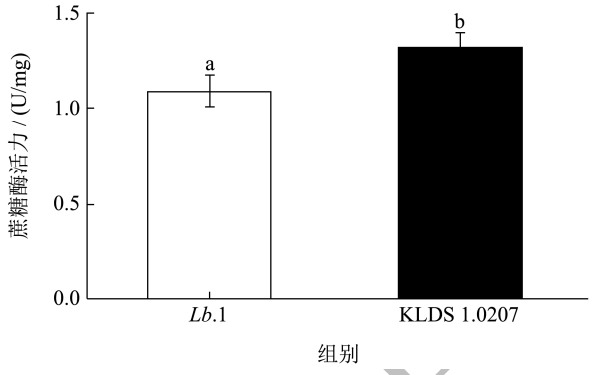


图 4 两株保加利亚乳杆菌在蔗糖培养基中于 37 ℃培养 20 h 时的蔗糖酶活力

Fig.4 Sucrase activity of two *Lactobacillus bulgaricus* strains cultured in sucrose medium for 20 h at 37 ℃

注：字母表示与 *Lb.*1 相比，差异显著（P<0.05）。

2.7 添加蔗糖酶后 *Lb.* 1 的生长情况

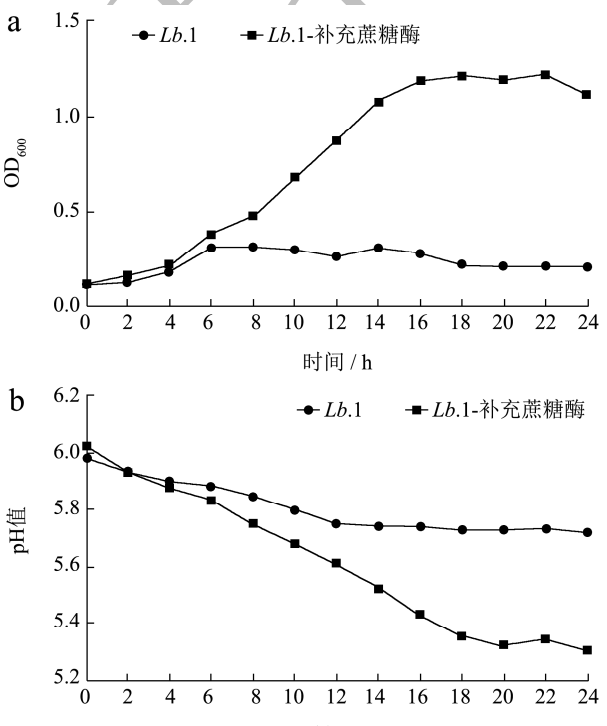


图 5 保加利亚乳杆菌 *Lb.* 1 在补充蔗糖酶的蔗糖培养基中于 37 ℃培养 24 h 过程中的 $OD_{600\ nm}$（a）及 pH（b）的变化情况

Fig.5 Changes in OD_{600nm} (a) and pH (b) of *Lb.* 1 cultured in sucrose medium supplemented with sucrase for 24 h at 37 ℃

在蔗糖培养基中补充蔗糖酶后，分析菌株 *Lb.* 1 在 37 ℃培养 24 h 过程中的 pH 值、$OD_{600\ nm}$，发现在培养基中补充蔗糖酶后 *Lb.* 1 的 $OD_{600\ nm}$ 大约是未补充蔗糖酶的 5 倍（图 5a），*Lb.* 1 的生长明显得到改善。补充蔗糖酶的培养物 pH 值为 5.30，而未补充蔗糖酶的培养物的 pH 值仅为 5.72，*Lb.* 1 在补充蔗糖酶后产酸明显增多（图 5b）。可见菌株 *Lb.* 1 由于自身蔗糖酶

活性较弱导致其蔗糖水解能力较弱，在培养基中补充蔗糖酶后，蔗糖能更多地被水解成果糖和葡萄糖，再进一步被 *Lb*. 1 利用。上述结果表明，蔗糖酶活性会影响保加利亚乳杆菌对蔗糖的代谢，进而影响菌株在蔗糖培养基中的生长及产酸情况。

3 结论

保加利亚乳杆菌 *Lb*.1 是一株弱后酸化菌株，在蔗糖培养基中生长较差，蔗糖代谢能力弱，乳酸产量低。*Lb*. 1 蔗糖酶活性以及编码蔗糖酶的基因 *sac*A 的相对表达量都很低，因此其发酵乳在贮藏期间蔗糖代谢产酸下降，表现出较强的弱后酸化能力。上述结果表明，蔗糖水解是保加利亚乳杆菌蔗糖代谢途径中的一个关键步骤，可以通过调控保加利亚乳杆菌蔗糖水解酶活性，降低蔗糖代谢产生乳酸，从而达到弱化发酵乳后酸的目的。本研究为有针对性的解决发酵乳后酸化问题，提高产品货架期内品质稳定性提供了新思路，对发酵剂的开发具有非常重要的意义。

参考文献

[1] Santos C, Carmago N, Adriana F, et al. Post-acidification and evaluation of anthocyanins stability and antioxidant activity in aai fermented milk and yogurts (*Euterpe oleracea* Mart.) [J]. Revista Brasileira De Fruticultura, 2017, 39(5): e-871.

[2] Ricardo O, Ana F, Patrizia P, et al. Use of lactulose as prebiotic and its influence on the growth, acidification profile and viable counts of different probiotics in fermented skim milk [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 145(1): 22-27.

[3] Guénard V, St-Gelais D, Villeneuve S, et al. Short communication: Effect of stirring operations on changes in physical and rheological properties of nonfat yogurts during storage [J]. Journal of Dairy Science, 2020, 103(1): 210-214.

[4] Settachaimongkon S, Valenberg H, Gazi I, et al. Influence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 on post-acidification, metabolite formation and survival of starter bacteria in set-yoghurt [J]. Food Microbiology, 2016, 59: 14-22.

[5] Londonl E, Chaurin V. Use of *Lactobacillus mucosae* DPC 6426, an exopolysaccharide-producing strain, positively influences the techno-functional properties of yoghurt [J]. International Dairy Journal, 2015, 40(1): 33-38.

[6] 罗安东,周雪松,曾建新,等.酪蛋白水解产物对不同酸奶发酵时间及品质影响[J].现代食品科技,2007,23(9):50-52.

[7] Shalini, Mishra H. Effect of synbiotic interaction of fructooligosaccharide and probiotics on the acidification profile, textural and rheological characteristics of fermented soy milk [J]. Food and Bioprocess Technology, 2012, 6(11): 3166-3176.

[8] Tamime A. Microbiology of Yoghurt and Related Starter Cultures [M]. Tamime and Robinson's Yoghurt, 2007.

[9] Alhejaili M, Olson D W, C Velázquez, et al. Short communication: Influence of an aqueous myrrh suspension on yogurt culture bacteria over yogurt shelf life [J]. Journal of Dairy Science, 2019, 102(3): 2011-2016.

[10] Zhang X, Zhang S, Li D Y, et al. Niacin inhibits post-acidification of yogurt based on the mining of LDB_RS00370 biomarker gene [J]. Food Research International, 2022, 162(A): 111929.

[11] 李海燕,乔成亚,龚广予,等.乳酸链球菌素对酸奶品质影响的研究[J].食品工业科技,2012,33(4):146-148,152.

[12] Deshwal G K, Tiwari S, Kumar A, et al. Review on factors affecting and control of post-acidification in yoghurt and related products [J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 109: 499-512.

[13] Faragm A, Salehh A, Ahmady E, et al. Dissecting yogurt: The impact of milk types, probiotics, and selected additives on yogurt quality [J]. Food Reviews International, 2021, 38: 634-650.

[14] 张夙夙.乳酸菌的乳糖/半乳糖代谢及其应用[D].济南:山东大学,2020.

[15] 李晨,张国文,赵云,等.酸奶后酸化中保加利亚乳杆菌关键基因表达分析[J].中国食品学报,2018,18(7):256-262.

[16] 李琦.低pH条件下嗜热链球菌产酸关键酶及控制研究[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2010.

[17] GB 5009.237-2016,食品安全国家标准 食品pH值的测定[S].

[18] Hang F, Jiang Y, Yan L, et al. Preliminary study for the stimulation effect of plant-based meals on pure culture *Lactobacillus plantarum* growth and acidification in milk fermentation [J]. Journal of Dairy Science, 2020, 103(5): 4078-4087.

[19] GB 4789.35-2016,食品安全国家标准 食品微生物学检验乳酸菌检验[S].

[20] 王成凤,李柏良,岳莹雪,等.弱后酸化保加利亚乳杆菌KLDS1.1011 的筛选及其全基因组注释研究[J].食品工业科技,2021,42(6):103-110.

[21] Lindmark M, Helen A, Ohlsso N, et al. Lactose, glucose and galactose content in milk, fermented milk and lactose-free milk products [J]. International Dairy Journal, 2017, 73: 151-154.

[22] 孙永胜,许沙,王宇航,等.酸冷胁迫下保加利亚乳杆菌定量PCR内参基因的筛选[J].中国食品学报,2021,21(12):230-241.

[23] 贾庆超,孔欣欣.市售酸奶在贮藏过程中品质的变化[J].中国乳品工业,2020,48(6):26-30.

[24] 任然,唐善虎,李思宁,等.四株益生菌对发酵酸奶保质期理化特性和益生菌数的影响[J].食品与发酵工业,2020,46(18):85-90.

[25] 杨海莺,牛天娇,沈晓艺,等.酸奶在不同贮藏条件下的品质动力学及货架期预测研究[J].粮油食品科技,2021,29(4):170-180.

[26] Jia R, Chen H. Effects of fermentation with *Lactobacillus rhamnosus* GG on product quality and fatty acids of goat milk yogurt [J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(1): 221-227.

[27] Moongah B, Schoustras E, Linnemanna R, et al. Influence of fermentation temperature on microbial community composition and physicochemical properties of mabisi, a traditionally fermented milk [J]. LWT - Food Science & Technology, 2021, 136(part2): 110350.

[28] 宋蓉,谭莎莎,李斌,等.魔芋寡糖对酸奶品质及贮藏期间乳酸菌数量的影响[J].食品与发酵工业,2019,45(8):93-97.

[29] Liu L, Li C, Liu J. Rheological and physical characteristics of non-fat set yogurt prepared with EPS-producing *Streptococcus thermophilus* and an H^+-ATPase-defective mutant *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* [J]. International Journal of Food Properties, 2017, 20(4): 745-753.

[30] 赖鲸慧,祝元婷,陈媛,等.乳酸菌代谢低聚果糖/菊粉途径及机理的研究进展[J].食品科学,2022,43(9):364-372.

[31] Hutkinsr W, Nannenn L. pH homeostasis in lactic acid bacteria [J]. Elsevier, 1993, 8: 2354-2365.

[32] 焦晶凯.乳酸菌代谢研究进展[J].乳业科学与技术,2020,43(2):49-55.

[33] 陈臣,卢艳青,于海燕,等.乳酸菌代谢低聚糖机理的研究进展[J].中国食品学报,2019,19(6):274-283.

[34] Fernandez A, Ogawa J, Penaud S, et al. Rerouting of pyruvate metabolism during acid adaptation in *Lactobacillus bulgaricus* [J]. Proteomics, 2008, 8(15): 3154-3163.

[35] 陈艳,田康明,李玉,等.以蔗糖为底物利用重组大肠杆菌合成甘露醇[J].微生物学通报,2014,41(11):2182-2189.

[36] 段培枫,尤甲甲,徐美娟,等.重组枯草芽孢杆菌全细胞催化合成 2-O-*α*-D-甘油葡糖苷[J].生物工程学报,2020,36(9):1918-1928.

[37] Martinussen J, Solem C, Holm A K, et al. Engineering strategies aimed at control of acidification rate of lactic acid bacteria [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2013, 24(2): 124-129.

[38] 樊斌.保加利亚乳杆菌产D-乳酸碳代谢途径改造[D].长春:吉林农业大学,2020.

现代食品科技