

植物乳杆菌在青梅汁中的生长及苹果酸 乳酸发酵特性研究

熊捷, 何翠婵, 林伟锋, 叶君, 陈中

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 以自制总酸含量为 2.38% (以苹果酸计) 的青梅汁为原料, 采用植物乳杆菌 LP-L134-1-P 的苹果酸乳酸发酵 (MLF) 对青梅汁进行生物降酸, 研究了在青梅汁中植物乳杆菌 LP-L134-1-P 接种量、pH、温度、糖含量和柠檬酸-柠檬酸钠的对生长及其酸代谢的影响。结果表明: 由植物乳杆菌 LP-L134-1-P 发酵的青梅汁, 其总酸总体呈先上升再下降的趋势; pH 值为 3.50, 接种量为 10^8 CFU/g 时, 能正常引发 MLF, 且接种量越大, MLF 的降酸幅度越大; 接种量为 10^9 CFU/g, pH 值为 3.50 时, 发酵温度 ≥ 25 °C 时, 才能引发 MLF; 接种量为 10^9 CFU/g, pH 值 ≥ 3.10 时, 即能引发 MLF, 且 pH 值越高, 越容易发生 MLF; 在青梅汁中添加 1.00% 的葡萄糖, 植物乳杆菌 LP-L134-1-P 使体系的酸度只升不降, 证实植物乳杆菌 LP-L134-1-P 优先代谢葡萄糖转化成乳酸, 抑制了 MLF 的发生; 在柠檬酸-柠檬酸钠缓冲体系中, 植物乳杆菌 LP-L134-1-P 不能使体系的酸度降低, 证实植物乳杆菌 LP-L134-1-P 不能单独利用柠檬酸作为碳源, 进行 MLF。

关键词: 青梅汁; 植物乳杆菌 LP-L134-1-P; 苹果酸乳酸发酵; 降酸

文章编号: 1673-9078(2013)12-2850-2854

Growth and Malolactic Fermentation Characteristics of *Lactobacillus plantarum* in Plum Juice

XIONG Jian, HE Cui-chan, LIN Wei-feng, YE Jun, CHEN Zhong

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Plum juice was used as material and *Lactobacillus Plantarum* LP-L134-1-P was used as inoculation strain for malolactic fermentation (MLF) to reduce acids in juice. The effects of the inoculation amount, pH, fermentation temperature, sugar content, and sodium citrates buffer system on deacidification and the growth of *Lactobacillus Plantarum* LP-L134-1-P in plum juice were studied. The results showed that the total acids increased at the first stage and then decreased during the fermentation. The MLF proceeded normally at pH 3.50 with the inoculation amount of 10^8 CFU/g. And the bigger inoculation amount was, the more acids were reduced through MLF. When the inoculation amount was increased to 10^9 CFU/g and pH was 3.50, the MLF could be performed only if the fermentation temperature was more than 25 °C. It would be easy to perform MLF when the inoculation amount was 10^9 CFU/g and pH was no less than 3.10. The acidity of plum juice went up with addition of 1.00% glucose, indicating that glucose was prior to convert into lactic acid, thus inhibiting the MLF. In sodium citrates buffer system, the acidity was not reduced, proving that *Lactobacillus Plantarum* LP-L134-1-P could not use citric acid as carbon resource to run MLF.

Key words: plum juice; *Lactobacillus plantarum* LP-L134-1-P; malolactic fermentation; deacidification

青梅, 又称果梅、酸梅, 属于蔷薇科植物, 在我国已有二千多年的栽培历史。鲜青梅中含有多种氨基酸、脂类、纤维素、蛋白质、无机盐、有机酸和多种微量元素, 具有很高的营养价值^[1]。此外, 青梅具有

收稿日期: 2013-07-09

基金项目: 广东省教育部产学研结合项目 (2011B090400311)

作者简介: 熊捷 (1965-), 男, 博士, 教授, 研究方向为粮食、油脂及植物蛋白工程

通讯作者: 林伟锋 (1970-), 男, 博士, 讲师, 研究方向为食品生物技术;

陈中

抑菌、驱虫、抗氧化、抗疲劳、抗肿瘤等生理作用, 具有良好的保健和药用价值^[2]。青梅的特点是低糖高酸, 鲜食较少, 传统加工产品有果脯、蜜饯和咸胚半成品等。

苹果酸乳酸发酵 (malolactic fermentation, MLF) 作为葡萄酒的一种有效生物降酸方法, 又称为二次发酵^[3]。在 MLF 过程中发生的氨基酸、多糖及多元醇代谢和蛋白质水解、酯类的分解与合成等代谢反应能改变酒中氨基酸、酯类、醛类和其他有机酸等呈香物质的浓度和含量, 对葡萄酒的风味有修饰的作用^[4~5]。能

够进行 MLF 的乳酸菌主要有乳杆菌属、明串珠菌属、片球菌属和酒球菌属等^[6-7]。大量研究表明,果酒的酒度、pH、SO₂、温度、O₂ 和 CO₂ 以及碳水化合物、氨基酸、维生素和矿物质、有机酸的含量、抑菌剂、葡萄酒的酿造方法、酒中微生物之间的相互作用等因素都会影响乳酸菌的生长及 MLF 的发生^[3,8-9]。

植物乳杆菌属于乳杆菌属,革兰氏阳性、兼性厌氧、耐酸、耐胆盐菌,最适生长温度为 30~35 ℃,最适生长 pH 为 6.5 左右^[10]。目前,国内外直接将植物乳杆菌应用于果汁中进行生物降酸的研究极少^[11]。青梅汁含有丰富的有机酸,包括柠檬酸、苹果酸、琥珀酸和酒石酸等,而在国内对青梅汁降酸的研究仅限于化学降酸法。本文将应用植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) LP-L134-1-P 的 MLF 对青梅汁进行生物降酸,为植物乳杆菌 LP-L134-1-P 在果汁生物降酸中的应用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

青梅汁:由青梅果肉与水按料液比 1:1 混合打浆制备,pH 值为 2.85,总酸含量为 2.38% (以苹果酸计);植物乳杆菌 LP-L134-1-P 由本实验室人员从成人粪便中分离、纯化,经中国科学院微生物研究所鉴定,再通过扩大培养、离心、冻干等步骤制成菌粉,活菌数为 1.78×10^{11} CFU/g;柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 0.10 mol/L; NaHCO₃ 食品级,市售。

1.2 仪器与设备

pHS-25 数显 pH 计 上海精密科学仪器有限公司; SW-CJ-ECU 超净工作台,苏州净化设备有限公司; YX-280D 灭菌锅,合肥华泰医疗设备有限公司; GHP-9270 隔水式培养箱,上海一恒科学仪器有限公司。

1.3 方 法

1.3.1 植物乳杆菌 LP-L134-1-P 在青梅汁中的生长与发酵特性

分别取青梅汁 100.00 g,用 1.00 mol/L NaHCO₃ 溶液调节其 pH 值,再于 121 ℃ 的灭菌锅中灭菌 20 min,冷却至室温,接入植物乳杆菌 LP-L134-1-P,混合均匀,置于恒温培养箱中发酵。每隔一定时间取样检测菌量,测定 pH 值和总酸。考察初始 pH 值、接种量、发酵温度和糖含量对植物乳杆菌 LP-L134-1-P 在青梅汁中的生长及 MLF 的影响。

1.3.2 测定方法

总酸:采用 GB/T 15038-2006 电位滴定法 (以苹果酸计);活菌数的测定:采用 GB/T 4789.35 平板菌落计数法;总糖:采用 GB/T 15038-2006 直接滴定法。

2 结果与讨论

2.1 接种量对植物乳杆菌 LP-L134-1-P 在青梅汁中的生长及 MLF 的影响

在青梅汁 (pH 3.50) 中,分别以 10^8 、 10^9 、 10^{10} CFU/g 的菌体生物量接入植物乳杆菌 LP-L134-1-P,在 30 ℃ 培养箱发酵,结果见图 1 和图 2。

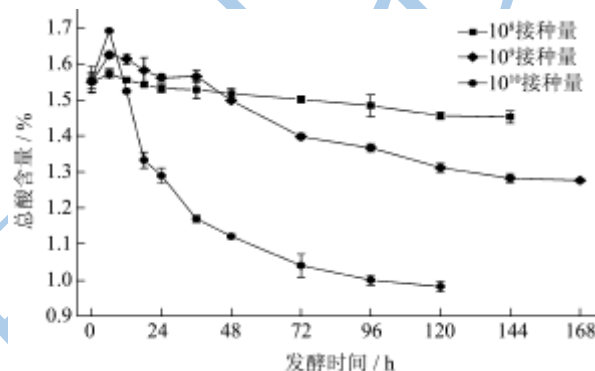


图 1 接种量对植物乳杆菌 LP-L134-1-P 降酸的影响

Fig.1 Influence of inoculation amount on the deacidification of *Lactobacillus plantarum* LP-L134-1-P

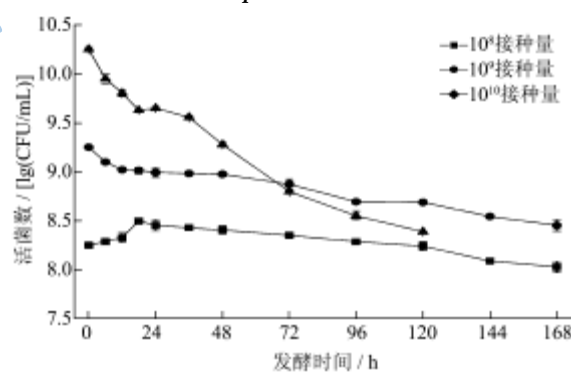


图 2 接种量对植物乳杆菌 LP-L134-1-P 生长的影响

Fig.2 Influence of inoculation amount on the growth of *Lactobacillus plantarum* LP-L134-1-P

由图 1 可得:三个接种量的青梅汁,其总酸的变化均呈先上升后下降的趋势;接种量越大,样品的产酸幅度及降酸速率越大,发酵周期越短。接种量为 10^{10} CFU/g 的样品,在发酵的前 12 h,其产酸幅度最高;12~96 h,样品的降酸速率最快;120 h 发酵结束,样品酸度下降到最低值,为 0.98%、下降了 0.57%,pH 值上升了 0.51 个单位;而接种量为 10^9 CFU/g 和 10^8 CFU/g 的样品,其酸度分别降低了 0.27 和 0.10%。本

试验样品总酸的变化趋势,与文献^[11]中植物乳杆菌 R23 使枇杷汁的酸度呈先下降后上升的研究结果不同,这说明青梅汁中植物乳杆菌 LP-L134-1-P 的发酵是先以糖代谢为主,继而进行有机酸代谢。有关糖含量对植物乳杆菌 LP-L134-1-P 降酸的影响见 2.4。

由图 2 可得:青梅汁中菌体生物量总体呈下降的趋势;接种量越大,菌体细胞死亡越快。发酵结束后,接种量为 10^{10} CFU/g 和 10^9 CFU/g 的样品,其菌体存活率约为 1.10% 和 15.96%;而接种量为 10^8 CFU/g 的样品,菌量下降非常缓慢,与初始接种量基本保持一致。这与文献^[12]的研究结果相一致。因此,在青梅汁中,植物乳杆菌 LP-L134-1-P 的接种量 $\geq 10^8$ CFU/g 时,即能引发 MLF,从而对青梅汁进行生物降酸。

2.2 温度对植物乳杆菌 LP-L134-1-P 在青梅汁中的生长及 MLF 的影响

在青梅汁 (pH 3.50) 中,以 10^9 CFU/g 的菌体生物量接入植物乳杆菌 LP-L134-1-P,分别置于 22 °C、25 °C、30 °C、35 °C 的培养箱中发酵,结果见图 3 和图 4。

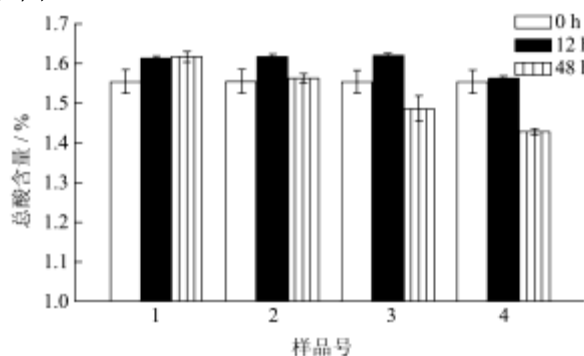


图 3 发酵温度对植物乳杆菌 LP-L134-1-P 降酸的影响

Fig.3 Influence of fermentation temperature on the deacidification of *Lactobacillus plantarum* LP-L134-1-P

注: 1: 22 °C, 2: 25 °C, 3: 30 °C, 4: 35 °C。

由图 3 可得:当发酵温度为 22 °C 时,植物乳杆菌不能起到降酸作用;当发酵温度 ≥ 25 °C 时,随着发酵温度的升高,MLF 的降酸幅度大,降酸速率快。发酵温度为 30 °C 和 35 °C 的两个样品,在 12~48 h 内,其酸度下降的幅度相同,为 0.14%。这是因为较低温度抑制了苹果酸乳酸酶(MLE)的活性,而在 30~35 °C 的环境下,MLE 活性较高,有利于菌体进行 MLF^[3-4]。

由图 4 可得:与初始接种量 10^9 CFU/g 相比,发酵 48 h 后,青梅汁中菌体生物量均呈下降趋势;温度越高,菌体细胞死亡越快,其存活率就越低。

因此,为了保证 MLF 的正常进行,应适当提高

发酵温度,使之达到 25 °C 以上,较适宜的发酵温度为 30~35 °C。

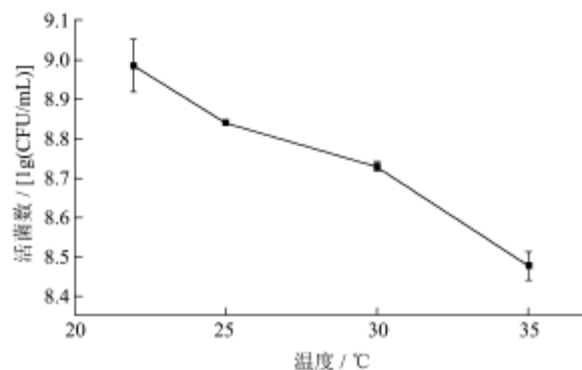


图 4 发酵温度对植物乳杆菌 LP-L134-1-P 生长的影响

Fig.4 Influence of fermentation temperature on the growth of *Lactobacillus plantarum* LP-L134-1-P

2.3 pH 对植物乳杆菌 LP-L134-1-P 在青梅汁中的生长及 MLF 的影响

用 NaHCO_3 溶液调整青梅汁的初始 pH 为 2.85、3.10、3.30、3.50、3.70、4.00,以 10^9 CFU/g 的菌体生物量接入植物乳杆菌 LP-L134-1-P,在 30 °C 的培养箱发酵,结果见图 5 和图 6。

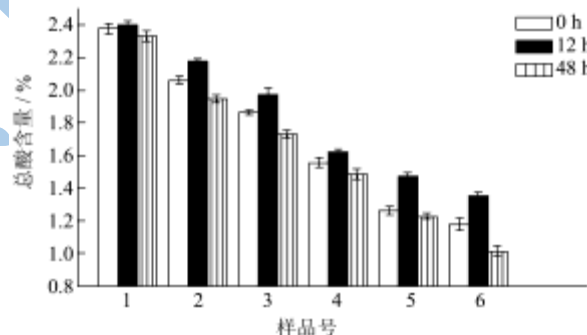


图 5 pH 对植物乳杆菌 LP-L134-1-P 降酸的影响

Fig.5 Influence of pH on the deacidification of *Lactobacillus plantarum* LP-L134-1-P

注: 1: pH 2.85, 2: pH 3.10, 3: pH 3.30, 4: pH 3.50, 5: pH 3.70, 6: pH 4.00。

由图 5 可得:随着 pH 的升高,样品产酸和降酸的幅度及速率都增大。pH 值 4.00 的样品,在 12~48 h 内,其酸度降低了 0.34%。这是因为在低 pH 值条件下,菌细胞的增殖能力受到抑制,主要靠初始接种的菌细胞自溶而获得 MLE,其浓度相对较低,因此 MLF 降酸的幅度较小^[4,12]。

由图 6 可得:发酵过程中,菌体细胞的存活率随 pH 值的降低而降低;当样品的 pH 值低于 3.50 时,菌体细胞迅速死亡;而当样品的 pH 值高于 3.50 时,菌

体生物量下降缓慢,且 pH 值越高,菌体细胞存活率越大。这是由于样品初始 pH 值过低,改变了菌体细胞膜的透性,使得菌体细胞的新陈代谢受阻,死亡速率加快。发酵 48 h 后,初始 pH 值 2.85 的样品,其菌体细胞存活率仅为 1.52%;初始 pH 值 4.00 的样品,其菌体细胞存活率达到了 75.84%。

因此, pH 值越高,植物乳杆菌 LP-L134-1-P 的死亡率越低,降酸效果越显著,即越容易发生 MLF。

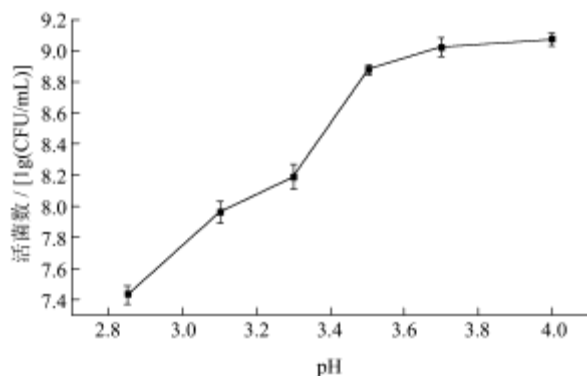


图 6 pH 值对植物乳杆菌 LP-L134-1-P 在青梅汁中生长的影响
Fig.6 Influence of pH on the growth of *Lactobacillus plantarum* LP-L134-1-P

2.4 糖含量对植物乳杆菌 LP-L134-1-P 在青梅汁中的生长及 MLF 的影响

为了验证糖含量对植物乳杆菌 LP-L134-1-P 降酸的影响,本试验在青梅汁 (pH 3.60) 中,分别添加 0%、1.00% 的葡萄糖,再以 10^9 CFU/g 的菌体生物量接入植物乳杆菌 LP-L134-1-P,在 30 °C 的培养箱中发酵,结果见图 7、图 8 和图 9。

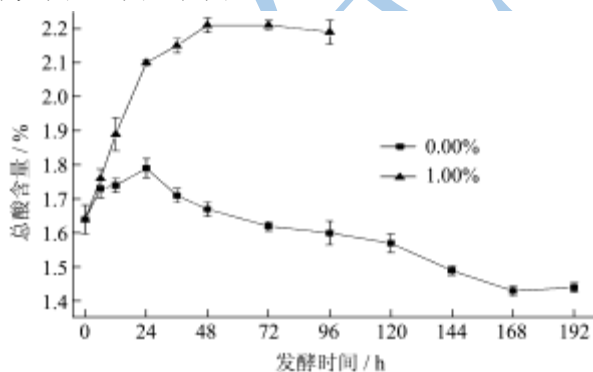


图 7 总糖含量对植物乳杆菌 LP-L134-1-P 降酸的影响
Fig.7 Influence of total sugar content on the deacidification of *Lactobacillus plantarum* LP-L134-1-P

由图 7 可得:在发酵过程中,添加了 1.00% 葡萄糖的样品,其酸度呈直线上升的趋势;在发酵前 48 h,其酸度上升到了最大值,为 2.21%。而未添加葡萄糖的样品,其酸度呈先上升后下降的趋势;在发酵前 24

h,其酸度上升到了最大值,发酵 168 h 后,样品的酸度下降到了最低值,为 1.43%,下降了 0.21%。

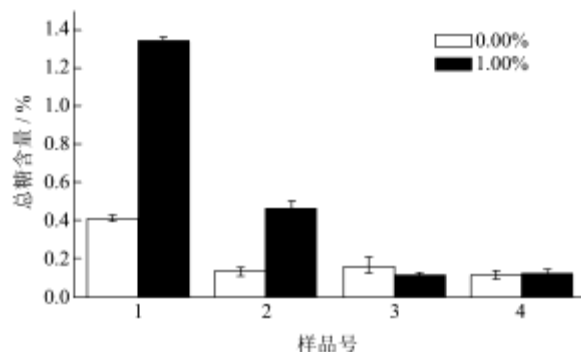


图 8 总糖含量在发酵过程中的变化

Fig.8 The change of total sugar content in the fermentation process

注: 1: 0h, 2: 24h, 3: 48h, 4: 96h。

由图 8 可得:植物乳杆菌 LP-L134-1-P 能完全代谢葡萄糖。当样品中总糖含量降低到 $0.12 \pm 0.02\%$ 时,菌体停止了对碳水化合物的利用;这是因为青梅汁中含有一些植物乳杆菌不可利用的碳水化合物^[13]。这说明植物乳杆菌 LP-L134-1-P 优先进行糖代谢,糖含量越高,产生的乳酸越多,导致样品的酸度上升,抑制了菌体对青梅汁的生物降酸作用。

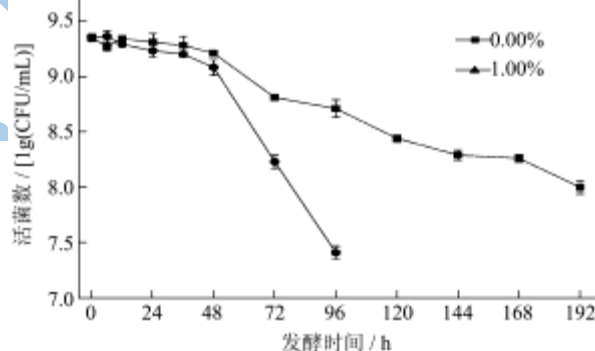


图 9 总糖含量对植物乳杆菌 LP-L134-1-P 生长的影响

Fig.9 Influence of total sugar on the growth of *Lactobacillus plantarum* LP-L134-1-P

由图 9 可得,青梅汁中的菌体生物量总体呈下降的趋势。在发酵后期,样品中葡萄糖含量越高,菌细胞的存活率越低;这是因为菌体代谢葡萄糖主要转化成乳酸,使得样品的酸度上升,而这种高酸度的环境抑制了菌细胞的生长。

2.5 植物乳杆菌 LP-L134-1-P 在青梅汁和柠檬酸缓冲液中的生长及 MLF 的作用

在青梅汁和柠檬酸缓冲液 (pH 3.60) 中,以 10^9 CFU/g 的菌体生物量接入植物乳杆菌,置于 30 °C 的

培养箱中发酵,结果如图 10 和图 11 所示。

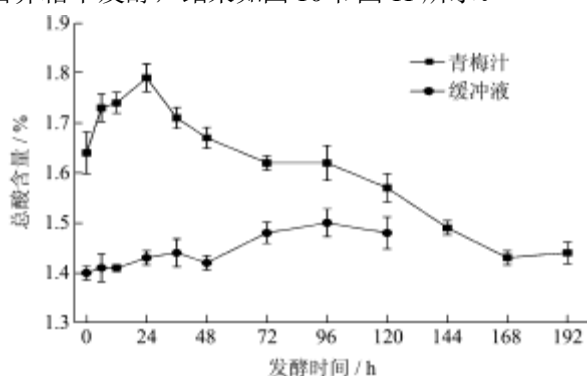


图 10 植物乳杆菌 LP-L134-1-P 在青梅汁和缓冲液中的降酸效果

Fig.10 Effect of deacidification on the plum juice and buffer solution by *Lactobacillus plantarum* LP-L134-1-P

由图 10 可得:在柠檬酸-柠檬酸钠缓冲体系中,菌体细胞不能单独利用柠檬酸作为碳源,引发 MLF。随着发酵时间的增加,体系中的酸度有缓慢上升的趋势;这是因为菌体细胞自溶或死亡释放出核酸、磷壁酸等物质,使得体系中的酸度有所升高^[4]。

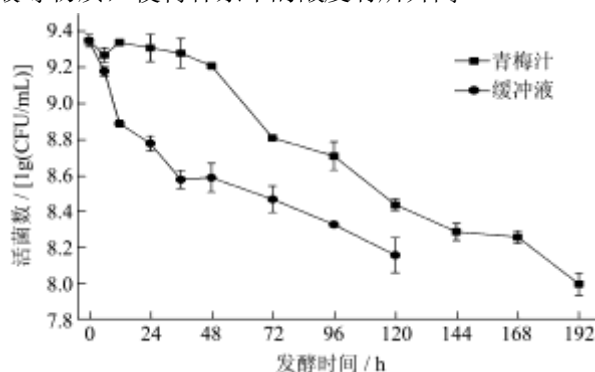


图 11 植物乳杆菌 LP-L134-1-P 在青梅汁和缓冲液中的生长状况

Fig.11 the growth of *Lactobacillus plantarum* LP-L134-1-P in the plum juice and buffer solution

由图 11 可得:在柠檬酸-柠檬酸钠缓冲体系中,菌体生物量呈直线下降的趋势,菌体细胞的死亡率明显高于青梅汁体系;这是因为缓冲体系中 pH 值过低、营养物质单一,缺乏细胞生长所必需的碳源、氮源、生长因子等营养物,从而导致菌体细胞迅速、大量死亡。

3 结论

本实验考察了植物乳杆菌 LP-L134-1-P 的接种量、发酵温度、pH 值和糖含量对青梅汁生物降酸的影响。在本实验条件下,得出的结论如下:

3.1 pH 为 3.50 时,植物乳杆菌 LP-L134-1-P 的接种量为 10^8 CFU/g,能引发 MLF,且接种量越大,降酸

的幅度越大,降酸速率越快。

3.2 在青梅汁 (pH 3.50) 中,接种量为 10^9 CFU/g,发酵温度低于 25 °C 时,不能发生 MLF,较适宜的发酵温度为 30~35 °C。

3.3 接种量为 10^9 CFU/g 时,青梅汁的初始 pH \geq 3.10,植物乳杆菌 LP-L134-1-P 均可发生 MLF,且 pH 值越高,越有利于 MLF 的降酸。

3.4 在青梅汁中,样品的葡萄糖含量越高,植物乳杆菌 LP-L134-1-P 优先代谢葡萄糖,使体系的酸度升高,越不利于 MLF 的发生。

3.5 在青梅汁中,植物乳杆菌 LP-L134-1-P 能有效地降低样品的酸度;但在柠檬酸缓冲液中,菌体细胞不能单独利用柠檬酸作为碳源,引发 MLF。

参考文献

- [1] 左绍远,董莎莎.大理地区青梅果营养成分分析[J].大理学院学报,2010,9(6):13-15
ZUO Shao-yuan, DONG Sha-sha. Determination of Nutritional Components of the Green Plum Fruits in Dali [J]. Journal of Dali University, 2010, 9(6): 13-15
- [2] 夏道宗,潘东曼,龚金炎,等.青梅提取物防治氧嗉酸钾致小鼠高尿酸血症的研究[J].现代食品科技,2013,29(1):8-10
XIADao-zong, PAN Dong-man, GONG Jin-yan, et al. Study on the Prevention and Treatment of *Prunus mume* Extracts against Potassium Oxonate Induced Hyperuricemia in Mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(1): 8-10
- [3] Maret du Toit, Lynn Engelbrecht, Elda Lerm, et al. Lactobacillus: the Next Generation of Malolactic Fermentation Starter Cultures-an Overview [J]. Food Bioprocess Technol., 2011, (4): 876-906
- [4] Martineau B, Henick-Kling T. Performance and diacetyl production of commercial strains of malolactic bacteria in wine [J]. Appl. Bacteriol., 1995, 78: 526-536
- [5] Maicas S, Gil J V, Pardo I, et al. Improvement of volatile composition of wines by controlled addition of malolactic bacteria [J]. Food Res. Int., 1999, 32(7): 491-496
- [6] Matthews A, Grimaldi A, Walker M, et al. Lactic acid bacteria as a potential source of enzymes for use in vinification [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70: 5715-5731
- [7] Liu S Q. Malolactic fermentation in wine-Beyond deacidification [J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 92: 589-601
- [8] Spano G, Massa S. Environmental stress response in wine lactic acid bacteria: Beyond Bacillus subtilis [J]. Critical

- Reviews in Microbiology, 2006,32: 77-86
- [9] Bossi A, Rinalducci S, Zolla L, et al. Effect of tannic acid on *Lactobacillus hilgardii* analysed by a proteomic approach [J]. Applied Microbiology, 2007, 102: 787-795
- [10] 王水泉,包艳,董喜梅,等.植物乳杆菌的生理功能及应用[J]. 中国农业科技导报,2010,12(4):49-55
WANG Shui-quan, BAO Yan, DONG Xi-mei, et al. Physiological Function and Application of *Lactobacillus plantarum* [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2010, 12(4): 49-55
- [11] 林晓姿,梁璋成,何志刚,等.植物乳杆菌 R23 酵解枇杷汁有机酸的动态分析[J].中国食品学报,2011,11(3):187-191
LIN Xiao-zi, LIANG Zhang-cheng, HE Zhi-gang, et al. Dynamic Analysis of Organic Acids in Glycolytic Loquat Juice Using *Lactobacillus Plantarum* R23 [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2011, 11(3): 187-191
- [12] 何志刚,梁璋成,任香芸,等.植物乳杆菌 R23 在枇杷酒中生长及苹果酸乳酸发酵特性研究[J].中国食品学报,2011, 11(4):36-41
HE Zhi-gang, LIANG Zhang-cheng, REN Xiang-yun, et al. Studies on Growth and Malolactic Fermentation Characteristics of *Lactobacillus Plantarum* R23 in Loquat Wine [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2011, 11(4): 36-41
- [13] Plumed Ferrer C, Koistinen K M, Tolonen T L, et al. Comparative study of sugar fermentations and protein expression patterns of two *Lactobacillus plantarum* strains grown in three different media [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74: 5349-5358
- [14] 冯镇,张兰威.乳酸菌发生自溶的影响因素研究[J].中国乳品工业,2003,31(3):7-9
FENG Zhen, ZHANG Lan-wei. Study on the Factor of *Lactic Acid Bacteria* Autolytic Phenomena [J]. China Dairy Industry, 2003, 31(3): 7-9