

一株发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) 对柠檬酸的发酵特性研究

胡丽云^{1,2}, 余元善¹, 徐玉娟¹, 肖更生¹, 吴继军¹, 傅曼琴¹

(1. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 农业部功能食品重点实验室, 广东省农产品加工重点实验室, 广东广州 510610) (2. 江西农业大学生物科学与工程学院, 江西南昌 330045)

摘要: 本文讨论了一株能高效转化利用高酸性水果(如青梅)中柠檬酸的发酵乳杆菌菌株的发酵特性。结果表明, 该菌株能以柠檬酸为主要碳源和能源的基础培养液中进行发酵生长, 在转化利用柠檬酸的过程中仅仅产生少量的乙酸和乳酸, 因此能将培养液中可滴定酸含量降低50%以上。菌株对乙醇具有较高的耐受性, 当培养液中乙醇浓度达到9%(V/V)以上时, 菌株的生长和柠檬酸代谢也就受到明显的抑制; 菌株对亚硫酸盐非常敏感, 培养液中仅仅添加0.5 mM的亚硫酸钠后, 菌株的生长和柠檬酸代谢将会被完全抑制。培养液中蔗糖的添加能促进菌株的生长和柠檬酸代谢, 但在柠檬酸存在的情况下, 该菌株对蔗糖的转化利用较弱, 因此, 发酵期间培养液中糖的总含量并没有出现明显的下降。

关键词: 发酵乳杆菌; 降酸; 柠檬酸; 发酵

文章编号: 1673-9078(2016)8-109-114

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.8.017

Study on the Fermentation Characteristics of Citric Acid by a *Lactobacillus fermentum*

HU Li-yun^{1,2}, YU Yuan-shan¹, XU Yu-juan¹, XIAO Geng-sheng¹, WU Ji-jun¹, FU Man-qin¹

(1. Sericultural & Agri-Food Research Institute Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Functional Foods, Ministry of Agriculture, Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Guangzhou 610610, China) (2. College of Biological Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: Fermentation characteristics by a *Lactobacillus fermentum* strain that can utilize citric acid in citrus fruits such as green plum were studied. Results showed that *L. fermentum* could grow in the basic culture medium with citric acid as the main source of carbon and energy. Citric acid metabolism yielded small amounts of acetic acid and lactic acid; hence, the total titratable acid content in the culture medium could be reduced by more than 50%. The strain has a high tolerance to ethanol, as ethanol concentration greater than nine percent (v/v) inhibits growth of the strain and citric acid metabolism. The strain is sensitive to sulfite; and the growth of the strain and citric acid metabolism are completely inhibited by 0.5 mM of sodium sulfite. Sucrose improved the growth of the strain and increased citric acid metabolism; however, no significant decrease in sucrose was observed during fermentation, indicating that the ability to utilize sucrose is low in the presence of citric acid.

Key words: *Lactobacillus fermentum*; deacidification; citric acid; fermentation

果酒是以各种水果为原料经过破碎、压榨取汁或带皮籽发酵、浸泡或调配等工艺酿造而成的低度饮料酒, 它富含有机酸、酯类及多种维生素。一般用来发酵果酒的原料都含有丰富的有机酸, 柠檬酸、苹果酸

收稿日期: 2015-09-08

基金项目: 广东省自然科学基金研究团队项目(2015A030312001); 广东省科技计划项目(2012B091000074); “广东省特支计划”科技创新青年拔尖人才项目(2014TQ01N120)

作者简介: 胡丽云(1990-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 微生物

通讯作者: 肖更生(1965-), 男, 研究员, 硕士, 研究方向: 农产品深加工

和酒石酸是水果中含量较高的三种有机酸^[1]。

在果酒酿造过程中酸度调整是至关重要的, 适量的有机酸能使酒醇厚爽口, 平衡酒中的苦味, 并且还能抑制细菌活动。但有机酸含量过高, 则会造成酒味酸涩、酒体粗糙、难以入口, 往往还会出现酒液失光、混浊的现象^[2,3]。目前国内外对果汁果酒降酸方法的研究主要有化学、物理和生物降酸法。化学法主要是加糖水稀释或弱碱中和, 该方法的缺陷是产品的口感差, 且生物活性成分含量大大降低。物理法是利用离子交换树脂法或电渗析等方法除去有机酸, 该方法的设备

投资和运行成本较高,果汁中很多营养和生物活性物质保留率也较低。微生物法是目前果汁果酒降酸的主要发展方向^[3-6],它利用微生物分解果汁果酒中的有机酸,同时还能够增加果汁果酒的风味和生物活性。但目前常用的降酸菌株主要作用于苹果酸,对柠檬酸和酒石酸的降酸效果较差,对大多数以柠檬酸为主要有机酸的果汁中不能发挥作用^[7-9]。因此利用现代分子生物技术选育能够降解柠檬酸的微生物将是果酒降酸研究的另一大突破点。

项目组前期从青梅果(青梅果中柠檬酸含量高达3.5%以上)中筛选出一株能高效降解柠檬酸的乳酸菌,经生理生化和16S rDNA法鉴定为发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)^[3]。本文主要讨论了该菌的生理生化特性及其对乙醇、亚硫酸盐等的耐受性,以期为该菌在高酸性水果果酒酿造中的降酸应用提供参考。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*),从鲜青梅果中分离出,本实验室保藏;牛肉膏、蛋白胨和酵母粉,购自广东环凯生物科技有限公司;其它化学试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

UV-1800型分光光度计;美国Hunter Lab公司生化培养箱SPX-250B,上海佳胜实验设备有限公司;超净工作台SW-CJ-2FD,苏净集团苏州安泰空气技术有限公司;高效液相色谱仪LC1200,美国安捷伦科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 基础培养液配方

蛋白胨10 g/L,牛肉膏5 g/L,酵母膏2 g/L,氯化钠5 g/L和柠檬酸10 g/L,用蒸馏水定溶。

1.3.2 起始 pH 和柠檬酸浓度对菌株生长的影响

向基础培养液中添加柠檬酸或碳酸钠,调节其pH值在2.1~4.0范围之间,各种不同pH的培养液经85℃水浴杀菌10 min,冷却至室温后接种发酵乳杆菌菌(10^5 CFU/mL),在30℃条件下静态发酵36 h后用于微生物和其它理化指标的测定。

1.3.3 乙醇浓度对菌株生长的影响

在配置基础配养液时,向基础培养液中添加乙醇,

使乙醇的终浓度分别为3%、6%、9%、12%、15%(V/V),用柠檬酸或碳酸钠将基础培养液的pH值分别调节至2.2、2.6、3.1、3.6、4.0,各种不同乙醇浓度的培养液经85℃水浴杀菌10 min,冷却至室温后接种发酵乳杆菌(10^5 CFU/mL),在30℃条件下静态发酵36 h后用于微生物和其它理化指标的测定。

1.3.4 亚硫酸盐添加对菌株生长的影响

向基础培养液中分别添加终浓度为0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mmol/L的亚硫酸钠,各种不同亚硫酸盐浓度的培养液经85℃水浴杀菌10 min,冷却至室温后接种发酵乳杆菌(10^5 CFU/mL),在30℃条件下静态发酵36 h后用于微生物和其它理化指标的测定。

1.3.5 蔗糖的添加对菌株生长的影响

向基础培养液中分别添加终浓度为5%、10%、15%、20%(m/V)的蔗糖,各种不同蔗糖浓度的培养液经85℃水浴杀菌10 min,冷却至室温后接种发酵乳杆菌菌(10^5 CFU/mL左右),在30℃条件下静态发酵36 h后用于微生物和其它理化指标的测定。

1.3.6 糖和有机酸的分析

菌株发酵液经离心、过0.22 μm的滤膜后直接用HPLC分析。糖组分分析的HPLC的色谱条件为:Shodex Asahipak NH₂P-504E(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱;柱温30℃;蒸发光检测器进行检测,ELSD漂移管温度为40℃;使用75%乙腈为流动相,流速为1 mL/min,进样量为10 μL^[10];有机酸分析的HPLC的色谱条件为:Agilent Zorbax Carbohydrate(4.6 mm×150 mm, 5 μm)色谱柱,柱温30℃;紫外检测波长为210 nm;使用0.1 M磷酸氢二氢铵(pH为2.7)为流动相,流速为0.1 mL/min,进样量为10 μL^[11]。

1.3.7 pH 和可滴定酸分析

pH值用pH计直接测定;可滴定酸的测定参考GB/T 12293-90《水果、蔬菜制品可滴定酸度的测定》中的方法,采用直接滴定法测定,总酸度以氢氧化钠的摩尔当量表示^[12]。

1.3.8 菌株生长速率的测定[13]

取发酵后的培养液,在600 nm的波长下测定发酵液的吸光值,以未发酵的培养液为空白对照,菌株的生长量与OD₆₀₀的吸光值成正比。

1.4 统计分析

采用SPSS 11.5软件对数据进行方差分析(Duncan's multiple range tests),并用Origin 8.0软件制图。结果以X±SD表示,(p<0.05)为差异显著。

2 结果与讨论

2.1 起始 pH 和柠檬酸浓度对菌株生长的影响

基础培养液(含 10 g/L 的柠檬酸)的自然 pH 值为 3.0。当添加柠檬酸继续降低培养液的 pH 时,菌株的生长速率明显下降(图 1),表 1 是培养液中柠檬酸的浓度和各自对应的 pH。与之相反,当添加碳酸钠提高培养液的 pH 时,菌株的生长速率显著提高,当 pH 升高到 3.5 时,菌株生长速率的增加不再明显(图 1)。表 2 是 pH 值为 3.5 的基础培养液经发酵乳杆菌发酵 36 h 后培养液 pH 和有机酸组分的变化。从表 2 可知,经过 36 h 的发酵后,培养液中 86.2% 的柠檬酸被菌株转化利用,仅仅产生了 2.85 g/L 和 2.82 g/L 的乳酸和乙酸,培养液的可滴定酸含量下降了 50% 以上,达到了明显的降酸效果。从上结果可知,高浓度的柠檬酸对菌株的生长仍然有明显的抑制作用,但一般常见高酸水果的 pH 在 2.5 以上,并不会完全抑制该菌株的生

长,在实际果汁降酸的应用中,为加快该菌株在高酸果汁中的生长,可以考虑采用固定化细胞的方式接种,减缓低 pH 对菌株生长的抑制作用^[5,7]。

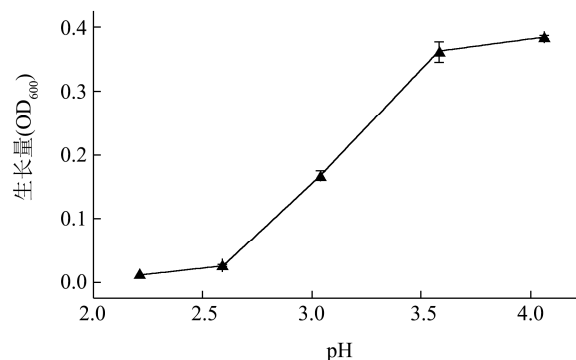


图 1 起始 pH 对发酵乳杆菌生长速率的影响

Fig.1 Effect of initial pH on the growth rate of *Lactobacillus fermentum*

表 1 柠檬酸浓度 (g/L) 对发酵乳杆菌生长速率的影响

Table 1 Effect of citric acid concentration (g/L) on the growth rate of *Lactobacillus fermentum*

柠檬酸浓度	10	20	30	40	50
培养基的起始 pH	2.97±0.01	2.55±0.01	2.34±0.01	2.22±0.01	2.12±0.01
发酵 36 h 后的生长量 (OD ₆₀₀)	0.169±0.007	0.020±0.002	0.0115±0.0005	0.0085±0.002	0.002±0.001

表 2 基础培养液 (pH 3.5) 经发酵乳发酵 36 h 后培养液中有有机酸组分的变化

Table 2 Change in organic acid content in basal broth (pH 3.5)

可滴定酸度/(mM NaOH 当量/100 mL)	乳酸/(g/L)	乙酸/(g/L)	柠檬酸/(g/L)	
未发酵组	12.90±0.29	N.D.	N.D.	13.62±0.97
发酵 36 h 后	6.29±0.03	2.85±0.09	2.82±0.11	1.89±0.07

注: N.D.表示未检出。

2.2 乙醇的添加对菌株生长的影响

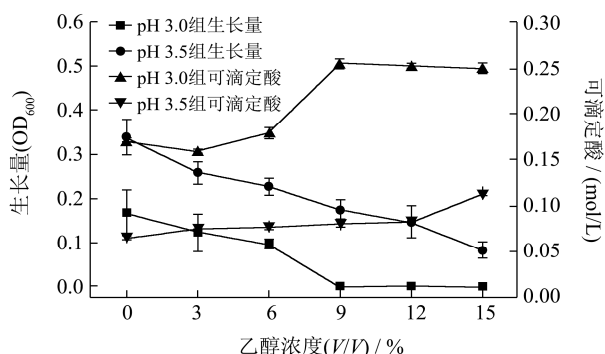


图 2 乙醇添加量对发酵乳杆菌生长和降酸能力的影响

Fig.2 Effect of different concentrations of ethanol on the growth and deacidification of *Lactobacillus fermentum*

随着基础培养液体中乙醇添加量的增加,发酵乳杆菌的生长速率明显下降(图 2),但与未添加乙醇组相比,当基础培养液(pH 3.5)的乙醇浓度高达 12% 时,菌株的生长量也仅减少了一半,并且有 94.39% 柠

檬酸被转化利用,说明发酵乳杆菌在基础培养液中对乙醇的耐受性很高。

然而,当基础培养液的 pH 为 3.0 时,发酵乳杆菌对乙醇的耐受性明显降低(图 2)。从图 2 可知,在 pH 3.0 的基础培养液中,当酒精浓度高达 9% 时,菌株生长受到抑制,柠檬酸的代谢也明显减缓,生成乳酸和乙酸的能力也明显降低(图 3)。同样,在 pH 3.5 的基础培养液中,酒精浓度高达 12% 以上时,柠檬酸的代谢速率也明显下降(图 3),说明菌株的柠檬酸降解能力与菌株的生长具有明显的正相关性。

2.3 亚硫酸盐的添加对菌株生长的影响

当向基础培养液(pH 3.0)中添加微量的亚硫酸钠时,发酵乳杆菌的生物量急剧下降,几乎没有表现出生长,同时可滴定酸含量也没有出现明显下降,说明发酵乳杆菌对 SO₂ 非常敏感,能抑制该菌株的生长和柠檬酸代谢(表 3)。

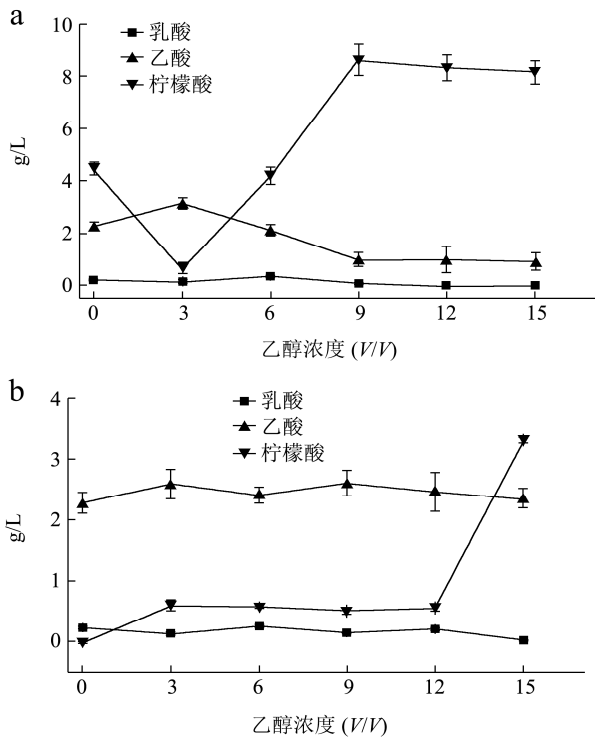


图3 乙醇添加量对 pH 3.0 (a) 和 pH 3.5 (b) 的基础培养液中发酵乳杆菌有机酸代谢的影响

Fig.3 Effect of different concentrations of ethanol on the organic acid metabolism of *Lactobacillus fermentum* in the basal broth (a-pH 3.0; b- pH 3.5)

表3 亚硫酸盐添加量对发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) 生长和有机酸代谢的影响

Table 3 Effect of sulfite on the growth and organic acid metabolism of *Lactobacillus fermentum*

亚硫酸钠添加量/(mM/L)	生长量/(OD ₆₀₀)	可滴定酸/(mol NaOH 当量/L)
0	0.338±0.036	0.06±0.01
0.5	N.D.	0.26±0.02
1.0	N.D.	0.27±0.03
1.5	N.D.	0.26±0.04
2.0	N.D.	0.26±0.05
2.5	N.D.	0.26±0.05

注: N.D.表示未检出。

2.4 糖浓度对菌株生长和降酸特性的影响

与未添加蔗糖的基础培养液 (pH 3.0) 组相比, 添加 5% 的蔗糖后, 菌株的生长速率显著提高, 且可滴定酸的减少速率也明显加快 (图 4)。从图 5 进一步可知, 未添加蔗糖组的基础培养液在发酵 12 h 后, 柠檬酸的减少速率明显下降, 而添加蔗糖组中柠檬酸的含量在整个发酵期间均能保持较快的下降, 糖的添加

能促进发酵乳杆菌的生长, 并加快柠檬酸的降解。同时, 从图 5 可知, 添加 5% 蔗糖组的基础培养液在发酵后期乳酸的增加量明显高于未添加蔗糖组, 说明培养液中部分蔗糖可能被该菌代谢成了乳酸。

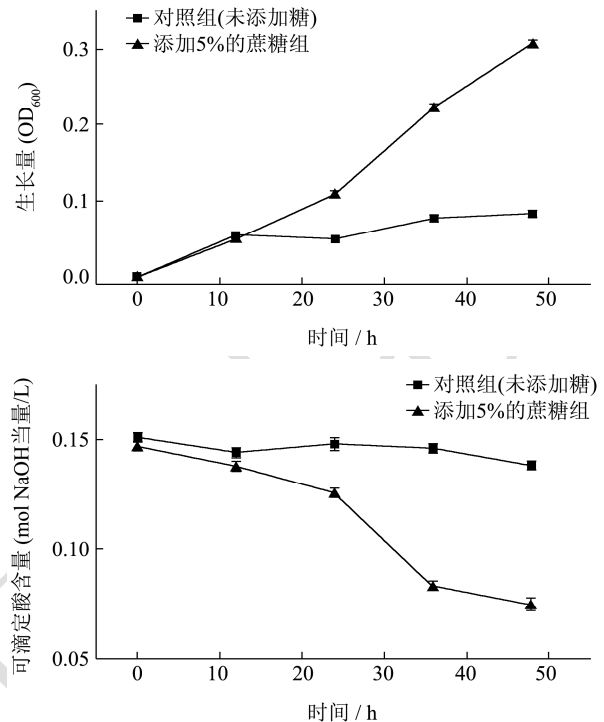
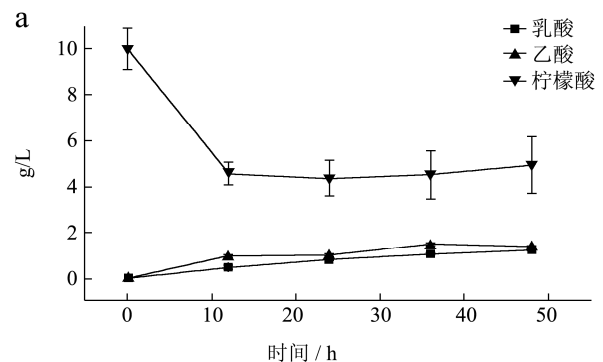


图4 蔗糖的添加对发酵乳杆菌生长量和基础培养液中可滴定酸含量的影响

Fig.4 Effect of sucrose on the growth of *Lactobacillus fermentum* and the content of titratable acid

为进一步确定蔗糖添加后的代谢情况, 采用 HPLC 法分析了该菌株发酵期间培养液中各种糖的含量变化。从图 6 可知, 菌株发酵前期, 培养基中的部分蔗糖水解生成了果糖和葡萄糖, 说明菌株具有产生蔗糖水解酶的能力。发酵的前期阶段, 菌株中糖的总含量并没有出现明显下降 ($p>0.05$), 仅仅在发酵后期随着柠檬酸含量的逐渐耗尽, 菌株才开始大量利用糖进行乳酸代谢以维持菌株的生长, 也进一步说明该菌能在糖的存在下优先利用柠檬酸为碳源进行生长。



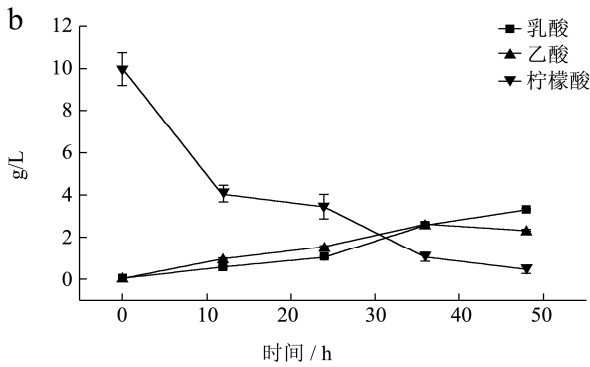


图5 蔗糖的添加对发酵乳杆菌有机酸代谢的影响

Fig. 5 Effect of sucrose (a – with sucrose; b- without sucrose) on the organic acid metabolism of *Lactobacillus fermentum*

注: (a) 未添加蔗糖组; (b) 添加蔗糖组。

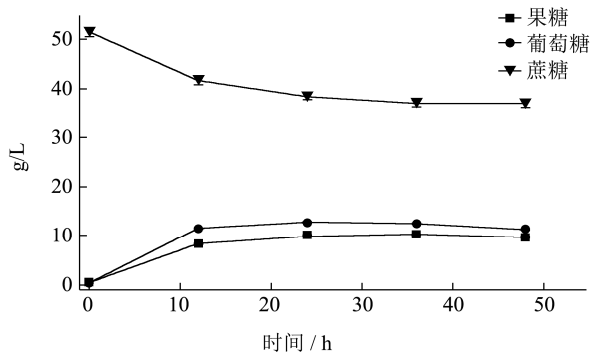


图6 添加5%蔗糖的基础培养液(pH 3.0)在菌株发酵期间各种糖组分含量的变化

Fig.6 Change of sugar content in the basal broth (pH 3.0) upon adding 5% of sucrose during fermentation with *Lactobacillus fermentum*

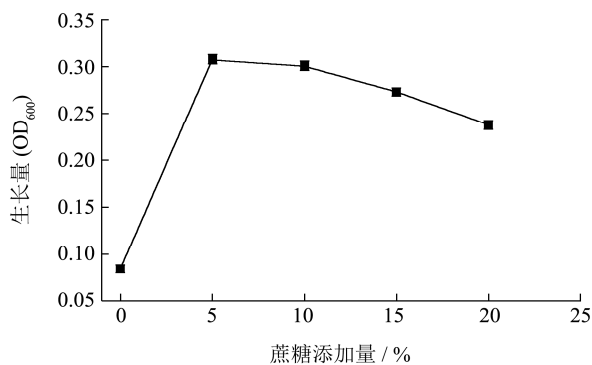


图7 蔗糖添加量对菌株生长量的影响

Fig.7 Effect of sucrose on the growth of *Lactobacillus fermentum*

图7 提供了菌株在不同蔗糖添加量的基础培养液(pH 3.0)中发酵12 h后菌株的生长量。从图7可知,蔗糖的添加能显著提高发酵乳杆菌的生长速率,但随着蔗糖添加量的提高,菌株生长速率的增加量出现明显下降。蔗糖的添加也能显著提高柠檬酸的转化利用速率(图8),蔗糖的添加浓度提高对菌株的有机酸代

谢没有明显影响,进一步说明在柠檬酸存在下,蔗糖仅参与菌株的合成代谢,作为底物参与菌株菌体的合成,从而促进菌株的生长。

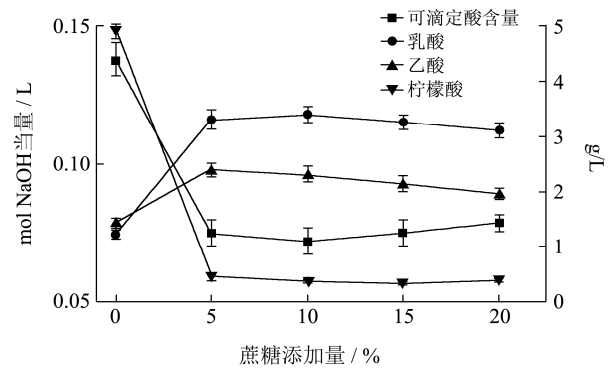


图8 不同蔗糖添加量的培养液发酵48 h后可滴定酸和有机酸的含量

Fig.8 Titratable acid and organic acid content in basal broth with sucrose after 48h fermentation with *Lactobacillus fermentum*

3 结论

从青梅中筛选出的发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)菌株能在以柠檬酸为主要碳源和能源的基础培养液中进行发酵生长,在转化利用柠檬酸的过程中仅仅产生少量的乙酸和乳酸,因此能将培养液中可滴定酸含量降低50%以上。糖的添加能促进该菌株的生长和柠檬酸代谢,但在柠檬酸存在的情况下,该菌株将蔗糖转化为乳酸的能力较弱。该菌株也具有较强的耐酸性,能适应常见高酸水果的酸浓度和pH,并且其对乙醇的耐受能力能达9%以上,但该菌株对SO₂较敏感,低浓度的SO₂添加能抑制该菌株的生长和柠檬酸的降解。总之,该菌在以柠檬酸为主要有机酸的高酸性果汁和果酒的降酸中具有很好的应用潜力。

参考文献

- [1] 文连奎,赵薇,张微,等.果酒降酸技术研究进展[J].食品科学,2010,11:325-328
WEN Lian-kui, ZHAO Wei, ZHANG Wei, et al. Research progress of acid reducing techniques for fruit wine [J]. Food Science, 2010, 11: 325-328
- [2] 康孟利,凌建刚,林旭东.果酒降酸方法的应用研究进展[J].现代农业科技,2008,24:25-26,30
KANG Meng-li, LING Jian-gang, LIN Xu-dong. Review on application of the method of fruit wine deacidification [J]. Science and Technology of Modern Agricultural, 2008, 24: 25-26, 30
- [3] Yu Y, Xiao G, Xu Y, et al. Changes of quality in the fruits of

- Prunus Mume* during deacidification by fermentation with *Lactobacillus Fermentum* [J]. Journal of Food Science, 2015: 405-410
- [4] Li Q, Xi S, Zhang X. Deacidification of paper relics by plasmid technology [J]. Journal of Cultural Heritage, 2013, 15: 159-164
- [5] Viljakainen S K, Laakso S V. The use of malolactic *Oenococcus oeni* (ATCC 39401) for deacidification of media containing glucose, malic acid and citric acid [J]. European Food Research and Technology, 2000, 211: 438-442
- [6] Iwona P, Malgorzata M, Tadeusz T. Isolation and identification of microorganisms including lactic acid bacteria and their use in microbial deacidification of wines from domestic vineyards [J]. Polish Journal of Microbiology, 2013, 62: 331-334
- [7] 刘延琳,张振文,李华.生物工程途径降解果酒中苹果酸的研究进展[J].农业工程学报,2004,7:1-5
LIU Yan-lin, ZHANG Zhen-wen, LI Hua. Progress in study of malate degradation by biological engineering in fruit wine [J]. Journal of Agricultural Engineering, 2004, 7: 1-5
- [8] Vera E, Sandeaux J, Persin F, et al. Deacidification of clarified tropical fruit juices by electrodialysis. Part II. characteristics of the deacidified juices [J]. Journal of Food Engineering, 2007, 78: 1439-1445
- [9] 李爱霞.植物乳杆菌苹果酸-乳酸发酵性能及其苹果酸-乳酸酶的研究[D].西北农林科技大学,2014
LI Ai-xia. Research of malic acid-lactic acid performance and enzymes of plant lactobacillus [D]. Northwest Agriculture and Forestry of Science and Technology University, 2014
- [10] Kvasnicka F, Price K R, et al. Determination of potato glycoalkaloids using isotachopheresis and comparison with a HPLC Method [J]. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 1994, 17: 1941-1951
- [11] Cunha S C, Fernandes J O, Ferreira I M. HPLC/UV determination of organic acids in fruit juices and nectars [J]. European Food Research and Technology, 2002, 214: 67-71
- [12] GB/T 12293-90-1989.水果、蔬菜制品可滴定酸度的测定[S]
GB/T 12293-90-1989. The Determination of fruit and vegetable products titratable acidity [S]
- [13] 李爱霞,王盼雪,樊明涛,等.植物乳杆菌对 pH、酒精浓度和 SO₂ 浓度耐受性的研究[J].中国酿造,2013,09:42-46
LI Ai-xia, WANG Pan-xue, FAN Ming-tao, et al. Study of plant *Lactobacillus* tolerance for pH, alcohol concentration and SO₂ concentration [J]. China Brewing, 2013, 9: 42-46