

泡菜用乳酸菌富集培养工艺的研究*

周国磊,董英

(江苏大学食品与生物工程学院,江苏 镇江,212013)

摘要 以植物乳杆菌和肠膜明串珠菌为试验菌株,选用麦芽汁和水解植物蛋白粉作为富集培养基质,在5L发酵罐采用正交试验分别对植物乳杆菌和肠膜明串珠菌进行富集培养工艺条件的优化。结果表明,植物乳杆菌最佳培养条件为总糖度7%的麦芽汁、2.5%水解植物蛋白粉、接种量5%、35℃培养,以30%氨水控制培养液pH值为6.0左右,培养20h,富集活菌浓度为 1.60×10^{10} cfu/mL;肠膜明串珠菌最佳培养条件为总糖度7%的麦芽汁、2.0%水解植物蛋白粉、接种量为5%、30℃培养,以30%氨水控制培养液pH值为6.0左右,培养15h,富集活菌浓度为 1.01×10^{10} cfu/mL。

关键词 植物乳杆菌,肠膜明串珠菌,恒定pH值培养

泡菜(Pickles)是以蔬菜为原料,利用食盐的渗透作用,经乳酸菌为主的微生物发酵制成的具有特定风味的发酵蔬菜制品^[1]。纯种接种生产工艺是在泡菜生产过程中接入外源纯种乳酸菌^[2]。人工接种乳酸菌发酵泡菜可以保证泡菜的质量和安全性,缩短发酵周期,有利于实现大规模工业化生产^[3,4]。

在乳酸菌富集培养的方法中,化学中和法是目前应用最广的方法,在乳酸菌培养过程中,添加中和剂不断中和乳酸菌代谢产生的乳酸,保持发酵液pH值稳定,控制乳酸增多对乳酸菌繁殖生长的反馈抑制,能够促进乳酸菌大量繁殖。常用的中和剂有 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 、 Na_2CO_3 、 NaOH 等^[5,6]。在泡菜用乳酸菌富集培养研究方面,陈仲翔等采用番茄汁、浓缩胡萝卜汁等作为碳源成分组成富集培养基对泡菜用乳酸菌株分别进行了富集培养,取得了较好的富集活菌浓度,接近 1.0×10^{10} cfu/mL^[7,8]。

本研究采用5L发酵罐恒定pH值对发酵泡菜用2株乳酸菌株:植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*,缩写为*L. p*)和肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*,缩写为*L. m*)进行富集培养条件的优化,以确定*L. p*和*L. m*高密度培养的培养条件,为生产泡菜用直投式乳酸菌发酵剂奠定基础。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种

第一作者:硕士研究生(董英教授为通讯作者)。

*江苏省高技术研究项目(BG2007339)

收稿日期:2007-10-25,改回日期:2008-02-15

植物乳杆菌(*L. p*),江苏大学应用生物技术实验室保藏;肠膜明串珠菌(*L. m*),中国科学院微生物研究所。

1.1.2 培养基

菌种活化培养基:MRS液体培养基;活菌计数培养基:MRS琼脂培养基;富集培养基:麦芽汁,镇江天目湖啤酒厂商用啤酒麦芽,水解植物蛋白粉,江苏无锡协和食品有限公司。

1.1.3 试验设备

GJB-5型玻璃发酵罐,江苏镇江格瑞生物工程有限公司;YX400Z高压灭菌锅,上海三申医疗器械有限公司;3110-P1000型移液器,德国Eppendorf公司;7200型分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司;Avanti-J25型离心机,美国Beckman Coulter公司;2WA型阿贝折射仪,上海光学仪器厂。

1.2 试验方法

1.2.1 麦芽汁的制备

干麦芽粉碎,1份麦芽4份水,在72℃水浴锅中糖化1h左右,糖化结束采用滴加碘液确定终点^[9]。将糖化液用2层纱布粗滤,然后离心(离心条件:3500 r/min,15 min)得麦芽糖化上清液,加水稀释调节,采用阿贝折射仪测定麦芽汁的总糖度。

1.2.2 种子液的制备

挑取活化好的*L. p*和*L. m*的斜面菌落,接入10 mL MRS液体培养基中,*L. p*在37℃下,*L. m*在28℃下静置培养18h,然后用移液枪无菌操作取7.5 mL(接种量5%)转入150 mL MRS液体培养基中静置培养18h,制备种子液于4℃冰箱中短时保存并准备接种。

1.2.3 恒定 pH 值培养

L. p 和 *L. m* 分别进行单一菌种富集培养。5 L 发酵罐中装 3 L 麦芽汁蛋白粉培养基,121 ℃ 灭菌 30 min,冷却后,在酒精火焰上方,将种子液 150 mL(接种量 5%)接种到 5 L 发酵罐中的 3 L 麦芽汁蛋白粉培养基中,控制温度并以 30% 氨水控制培养液 pH 值恒定,以普通无菌氮气保持罐内压强为 0.05 MPa,并将搅拌速度调为 200 r/min。*L. p* 和 *L. m* 的培养时间分别为 15 h 和 20 h,培养结束测定培养液中活菌浓度以及残糖含量。

1.2.4 乳酸菌生长曲线的绘制

在 600 nm 处,以未接种的培养基作为空白稀释后调节 7200 型分光光度计的 0 点,每隔 3 h 以与空白相同的稀释倍数稀释乳酸菌培养液,测定其 OD 值,以时间为横坐标,OD 值为纵坐标,分别绘制 *L. p* 和 *L. m* 的生长曲线。

1.2.5 乳酸菌活菌数的测定

乳酸菌活菌数的测定采用梯度稀释平板计数法^[10],即在无菌操作条件下,吸取充分搅匀的培养液 1 mL,加到 9 mL 灭菌生理盐水中,制成 1 : 10 的均

匀稀释液,再依次进行 10 倍递增稀释,至适当稀释度,吸取 1 mL 置于灭菌培养皿中,然后倒入约 15 mL 水浴至 50 ℃ 左右的 MRS 琼脂计数培养基,摇匀待其凝固,*L. p* 和 *L. m* 分别于 37 ℃ 和 28 ℃ 恒温培养箱中倒置培养 36 h 后,用菌落计数器计数。

1.2.6 培养液中残糖量的测定^[11]

采用 3,5-二硝基水杨酸比色法测定麦芽汁和培养液中还原糖以及总糖的含量。测定培养液中残糖之前先对其进行离心(3 500 r/min,15 min),除去菌体和杂质,测定上清液中的糖含量。

2 结果和讨论

试验中,选取麦芽汁和水解植物蛋白粉分别作为 *L. p* 和 *L. m* 富集培养基的碳源和氮源。选择麦芽汁总糖度(A)、水解植物蛋白粉(B)、温度(C)、pH 值(D)作为 *L. p* 和 *L. m* 富集培养条件的试验因素,通过单因素试验确定了各因素的试验水平,设计 $L_9(3^4)$ 的正交试验,以确定 *L. p* 和 *L. m* 的培养条件。因素水平见表 1 和表 3。

表 1 *L. p* 培养条件正交试验因素水平表

水平	(A) 麦芽汁总糖度/%	(B) 水解植物蛋白粉/%	(C) 温度/℃	(D) pH 值
1	7	2.0	30	5.5
2	8	2.5	35	6.0
3	9	3.0	40	6.5

表 2 *L. p* 培养条件正交试验结果

序号	A	B	C	D	活菌数 $\times 10^{-8}$ /cfu \cdot mL $^{-1}$
1	1	1	1	1	101
2	1	2	2	2	160
3	1	3	3	3	115
4	2	1	2	3	133
5	2	2	3	1	88
6	2	3	1	2	141
7	3	1	3	2	106
8	3	2	1	3	129
9	3	3	2	1	93
k_1	125.3	113.3	123.7	94.0	
k_2	120.7	125.7	128.7	135.7	
k_3	109.3	116.3	103.0	125.7	
R	16.0	12.4	25.7	41.7	
优水平	A ₁	B ₂	C ₂	D ₂	

2.1 *L. p* 富集培养条件的优化试验

由表 2 可以看出,采用 5L 发酵罐恒定 pH 值对 *L. p* 进行富集培养正交试验时,D(pH 值)对 *L. p* 培

养液富集活菌浓度的影响最大,B(水解植物蛋白粉)影响最小。各因素对培养液富集活菌浓度影响的主次顺序依次为:pH 值>温度>麦芽汁总糖度>水解

植物蛋白粉。*L. p* 的最佳培养条件为 $A_1B_2C_2D_2$ ，即：总糖度 7% 的麦芽汁，2.5% 水解植物蛋白粉，35℃ 培养，pH=6。培养 20 h 结束，*L. p* 培养液富集活菌浓度为 1.60×10^{10} cfu/mL。

按照 $A_1B_2C_2D_2$ 进行 *L. p* 5L 发酵罐恒定 pH 值富集培养试验，接种量 5%，培养 20 h，*L. p* 培养液的富集活菌浓度为 1.65×10^{10} cfu/mL，因此认为正交试验优化结果有效。而且，总糖度 7% 麦芽汁中还原糖含量为 22.1 mg/mL，总糖含量为 31.2 mg/mL；按照最佳培养条件培养 20 h 后，培养液中还原糖含量为 0.6 mg/mL，总糖的含量为 2.3 mg/mL。可知，*L. p* 培养液中残糖量符合培养基中残糖量要求。

表 3 *L. m* 培养条件正交试验因素水平表

水平	(A) 麦芽汁总糖度/%	(B) 水解植物蛋白粉/%	(C) 温度/℃	(D) pH 值
1	7	1.5	25	5.5
2	8	2.0	30	6.0
3	9	2.5	35	6.5

表 4 *L. m* 培养条件正交试验结果

序号	A	B	C	D	活菌数 $\times 10^{-8}$ /cfu \cdot mL $^{-1}$
1	1	1	1	1	67.3
2	1	2	2	2	101
3	1	3	3	3	61.8
4	2	1	2	3	92.6
5	2	2	3	1	43.6
6	2	3	1	2	84.0
7	3	1	3	2	53.7
8	3	2	1	3	73.2
9	3	3	2	1	81.8
k_1	76.8	71.2	74.8	64.2	
k_2	73.4	72.7	91.9	79.6	
k_3	69.6	75.9	53	75.9	
R	7.2	4.7	38.9	15.4	
优水平	A_1	B_2	C_2	D_2	

由表 4 可以看出，采用 5L 发酵罐恒定 pH 值对 *L. m* 进行富集培养正交试验时，C(温度)对 *L. m* 培养液富集活菌浓度的影响最大，B(水解植物蛋白粉)影响最小。各因素对 *L. m* 培养液富集活菌浓度影响的主次顺序依次为：温度> pH 值>麦芽汁总糖度>水解植物蛋白粉。*L. m* 的最佳培养条件为 $A_1B_2C_2D_2$ ，即：总糖度 7% 的麦芽汁，2.0% 水解植物蛋白粉，30℃ 培养，pH6。培养 15 h 结束，富集活菌浓度为 1.01×10^{10} cfu/mL。

按照组合 $A_1B_2C_2D_2$ 进行 *L. m* 5L 发酵罐恒定 pH 值富集培养试验。接种量 5%，培养 15 h，*L. m* 培养液的富集活菌浓度为 1.02×10^{10} cfu/mL，因此认为正交试验优化结果有效。*L. m* 按照最佳培养条

L. p 在最佳培养条件下的生长曲线如图 1 所示。

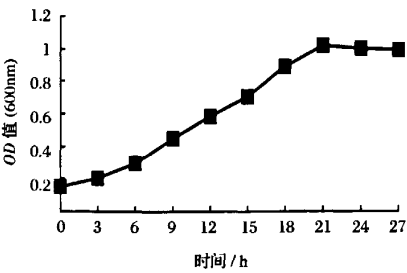


图 1 *L. p* 在恒定 pH 值培养的生长曲线

2.2 *L. m* 富集培养条件的优化试验

件培养 15 h 后，培养液中还原糖含量为 1.4 mg/mL，总糖含量为 2.7 mg/mL。可知，*L. m* 发酵液中残糖量符合培养基中残糖量要求。*L. m* 在最佳培养条件下的生长曲线如图 2 所示。

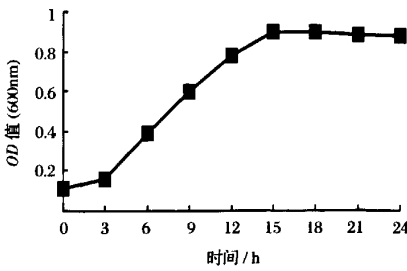


图 2 *L. m* 在恒定 pH 值培养下的生长曲线

麦芽汁和水解植物蛋白粉都是价格比较便宜的培养基原料,糖化后的麦芽汁中糖类主要是葡萄糖、麦芽糖和少量糊精,无论是葡萄糖还是麦芽糖都非常适合作为乳酸菌增殖培养基的碳源。另外,在糖化后的麦芽汁中还存在少量的可溶性蛋白质和游离氨基酸^[12],但是其含量相对较少,不能充分满足 5L 发酵罐恒定 pH 值培养乳酸菌生长过程中对氮源的需求,通过试验前期的预试验也充分说明了这一点。因此在试验中额外添加了水解植物蛋白粉作为 *L. p* 和 *L. m* 富集培养基的氮源。

试验采用麦芽汁和水解植物蛋白粉作为富集培养基分别对 *L. p* 和 *L. m* 两乳酸菌株进行富集培养,2 株乳酸菌都获得了较高的活菌浓度,说明采用麦芽汁和水解植物蛋白粉作为泡菜用乳酸菌富集培养基具有更广泛的经济适用性。同时,采用 3,5-二硝基水杨酸比色法测定麦芽汁和培养液中还原糖以及总糖的含量,其结果符合培养基中残糖量要求,说明培养基中的营养成分已得到比较充分的利用。

3 结 论

通过正交试验获得 *L. p* 和 *L. m* 的优化培养条件分别为:

(1) *L. p* 的培养条件:总糖度 7% 的麦芽汁,2.5% 水解植物蛋白粉,接种量为 5%,35 ℃ 培养,以 30% 氨水控制培养液 pH 值为 6.0 左右,培养 20 h,富集活菌浓度为 1.60×10^{10} cfu/mL。

(2) *L. m* 的培养条件:总糖度 7% 的麦芽汁,2.0% 水解植物蛋白粉,接种量为 5%,30 ℃ 培养,以 30% 氨水控制培养液 pH 值为 6.0 左右,培养 15 h,

富集活菌浓度为 1.01×10^{10} cfu/mL。

参 考 文 献

- 何淑玲,李 博,籍保平,等.泡菜中亚硝酸盐问题的研究进展[J].食品与发酵工业,2005,31(11):85~97
- 沈国华,卢英,何丁喜等.纯菌接种发酵技术在腌渍蔬菜加工上的应用研究(一)优良乳酸发酵菌种特性的研究及菌种筛选[J].中国调味品,2002(3):22~25
- Egon Bech Hansen. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future[J]. International Journal of Food Microbiology, 2002,78 (7):119~131
- Toshirou. The cause on the abnormal accumulation of nitrite in pickles of Chinese cabbage (*Brassica pekinensis Rupr.*) [J]. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 2001,48(6):409~415
- 山丽杰,田洪涛,贾英民,等.浓缩型乳酸菌发酵剂制备中几个技术关键问题的探讨[J].中国乳品工业,2002,30(5):66~69
- 黄良昌,吕晓玲,邢晓惠.浅析酸奶发酵剂的研究进展[C].达能营养中心第四届学术研讨会论文集,2001.56~60
- 陈仲翔.泡菜直投式乳酸菌发酵剂的研究[D].江苏大学硕士学位论文,2004.19~36
- 蔡永峰,熊 涛,岳国海,等.直投式生物法快速生产泡菜工艺条件的研究[J].食品与发酵工业,2006,32(6):73~76
- 熊有枝.麦芽糖化温度对糖化时间的影响[J].武汉工业学院学报,2003,22(2):19~20
- 沈 萍,范秀容,李广武.微生物学试验[M].北京:高等教育出版社,1999.92~95
- 陈毓荃.生物化学实验方法和技术[M].北京:科学出版社,2002.97~100
- 王志花.啤酒酿造过程中的蛋白质分解[J].酿酒,1999(4):78~80

Study on Enriching the Lactic Acid Bacteria Starter Culture of Pickles

Zhou Guolei, Dong Ying

(School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

ABSTRACT The cultivation conditions of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* were studied. Wort and hydrolyzed vegetable protein were chosen as the culture medium components. The cultivations were performed in a 5 L fermentor at a constant pH. According to uniformly designed experiment, the optimal cultivation conditions for *L. p* found to be (total sugar content)7% wort, 2.5% hydrolyzed vegetable protein, and 5% seed volume, with constant pH value at 6.0 and culture temperature of 35 ℃. The final cell population got to 1.60×10^{10} cfu/mL after culture for 20 hours. The optimal cultivation conditions for *L. m* found as: 7% wort, 2.0% hydrolyzed vegetable protein, 5% seed volume, with constant pH value at 6.0 and culture temperature of 30 ℃. The final cell population reached 1.01×10^{10} cfu/mL after culture for 15 hours.

Key words *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, constant pH value cultivation