

乳酸菌和酵母菌复合发酵芹菜汁制备泡菜母液条件的优化

张晓, 夏延斌*

(湖南农业大学食品科技学院, 湖南 长沙 410128)

摘要: 利用乳酸菌和酵母菌复合发酵芹菜汁制备发酵母液, 对植物乳杆菌、短乳杆菌和鲁氏酵母 3 种菌的混合培养条件进行优化, 分析碳、氮源种类及比例、培养温度、pH、接种比例及接种量对 3 种菌在芹菜汁中的生长情况。结果表明, 较优培养条件为发酵母液的起始 pH 6.5, 发酵母液中添加乳糖与酵母膏的质量比 5 : 1, 培养温度 30 ℃, 植物乳杆菌、短乳杆菌和鲁氏酵母按三角瓶液态培养的纯菌种体积比 2 : 2 : 1, 接种量 7%。在此条件下, 乳酸菌活菌数可达 1.78×10^8 cfu/mL, 酵母菌活菌数可达 1.22×10^8 cfu/mL。

关键词: 芹菜泡菜; 复合发酵; 发酵母液; 乳酸菌; 酵母菌

中图分类号: TS205.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2013)02-0204-05

Optimizing mother liquid condition for celery pickle preparation based on composite fermentation of lactic acid bacteria and yeast

ZHANG Xiao, XIA Yan-bin*

(College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: Mother ferment liquid for optimizing mixed cultivation of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* and *Zygosaccharomyces rouxii* was first prepared in employing composite fermentation of lactic acid bacteria and yeast. The effect of various carbon and nitrogen sources, their ratio, temperature, pH, inoculation quantity and rate on the growth of the three bacteria in celery liquid were tested. The results showed that the optimal condition for the three bacteria growth were: original pH was 6.5, the ratio of lactose to yeast extract was 5 : 1, the temperature was 30 centigrade, the proportion in volume among *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* and yeast was 2 : 2 : 1, and 7 percent inoculum dose. In these condition, the number of total lactic acid bacteria and yeast could reach 1.78×10^8 cfu/mL and 1.22×10^8 cfu/mL, respectively.

Key words: celery pickle; composite fermentation; celery; lactic acid bacteria; yeast

泡菜是以乳酸菌为主, 兼有酵母菌和醋酸菌等发酵而成的传统食品。传统泡菜生产中的自然发酵受季节、气候等因素的影响较大, 并存在发酵周期长、质量不稳定等缺陷^[1]。为了改善传统生产方式的不足, 许多学者对采用纯菌种发酵泡菜进行了研究^[2-6]。由于纯菌种发酵对不同原料的适应性不强, 因此, 在生产实践中采用菜汁培养发酵母液, 利用发酵母液再发酵泡菜。该方法虽然简单易行, 但需要选择菌种和菌种组合方式。目前, 关于泡菜的研究

主要集中在泡菜中乳酸菌区系和乳酸菌的分离^[7]以及乳酸菌纯菌种发酵, 也有学者对泡菜中酵母菌进行了研究^[8], 从发酵初期泡菜中分离出酵母菌种, 如异常汉逊酵母、德氏酵母、罗斯酵母、毕赤氏酵母、鲁氏酵母、红酵母等, 发现发酵型酵母对泡菜的风味和成熟度有重要影响。

笔者采用乳酸菌和酵母菌复合发酵制备泡菜母液, 旨在能将该母液直接加入到蔬菜中进行发酵, 使生产出的泡菜产品质量均一、稳定, 实现泡

收稿日期: 2012-12-03

作者简介: 张晓(1988—), 女, 湖南益阳人, 硕士研究生, 主要从事食品化学与营养研究, zhangx880202@126.com; *通信作者, xy520523@yahoo.com.cn

菜标准化生产。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

芹菜购于湖南农业大学农贸市场；菌种为植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)、短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) 和鲁氏酵母 (*Saccharomyces rouxii*)，从发酵辣椒中分离、筛选得到。

MRS 培养基是将蛋白胨 10 g、牛肉膏 10 g、酵母膏 5 g、柠檬酸二铵 2 g、葡萄糖 10 g、Tween-80 1 mL、 K_2HPO_4 2 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58 g、 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.25 g、蒸馏水 1 L 混合后，调 pH 至 6.2。这种培养基主要用于乳酸菌计数、活化、发酵种子制备。若配制 MRS 固体培养基，在 MRS 液体培养基中添加琼脂 20 g。

YPD 培养基是由酵母膏 10 g、葡萄糖 20.0 g、琼脂 20.0 g、蛋白胨 2 g、水 1 L 混合而成，pH 自然^[9-10]。以上培养基均于 121 °C 灭菌 20 min。

主要设备为高压灭菌锅、电子天平、紫外无菌操作台、恒温培养箱、榨汁机、pH 计、恒温摇床。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化

将保藏的菌种接入 MRS 和 YPD 斜面培养基，分别于 37、28 °C 培养至出现菌落后，从斜面上挑取菌苔到另一斜面，重复 2 次，得到活化菌种。从活化好的菌种中挑取菌落，接入 MRS 液体培养基及 YPD 液体培养基中，分别于 37、28 °C 恒温振荡培养箱中培养 18 h，得到三角瓶液态培养的纯种菌液。

1.2.2 泡菜母液的制备

将新鲜芹菜去除绿叶，清洗，滤干，切成长 2~3 cm 的长条，榨成汁。称取汁液 50 g，加水 100 mL，充分混合，用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液或 0.1 mol/L 柠檬酸溶液调节 pH，在 121 °C 条件下灭菌 20 min，加入菌液，在恒温振荡培养箱中培养 48 h，即得泡菜母液。统计乳酸菌数和酵母菌数。

1.2.3 发酵母液培养条件优化

1) 单因素试验。在芹菜汁中添加葡萄糖和酵母膏。初始试验条件：pH 为 6.5；植物乳杆菌、短乳

杆菌、鲁氏酵母的体积比为 2 : 2 : 1；接种量 3%；温度 25 °C。依次改变碳源、氮源、碳氮源比例、pH、菌种接种量之比、接种量和温度，分析各因子对乳酸菌和酵母菌生长的影响^[11-14]，并筛选出较优参数。

2) 正交试验。分别以乳酸菌数和酵母菌数作为参考指标，根据单因素试验结果，选取主要影响因素及相应水平进行正交试验，以优化发酵母液培养条件的工艺参数。

3) 验证试验。采用两次平行试验，对正交试验中所得的最优组合进行验证试验^[15-16]。

1.2.4 指标测定及数据处理

乳酸菌与酵母菌总数参照文献^[17]中的方法进行测定：在 MRS 固体培养基中添加 500 μg/mL 的硫酸铜来抑制酵母菌的生长，采用稀释平板计数法^[18]测定乳酸菌总数；在酵母菌固体培养基 (YPD) 中添加 500 μg/mL 硫酸链霉素，排除乳酸菌生长对酵母菌总菌数检测的干扰，得到发酵产品中的酵母菌总数。

数据统计与分析采用正交设计助手 3.1.1 软件进行。

2 结果与分析

2.1 发酵母液培养条件优化的单因素试验结果

2.1.1 适宜碳源的选取

由表 1 可见，蔗糖发酵母液中菌体的增值略低，这可能与菌体缺乏分解淀粉等大分子碳水化合物的酶系有关。相对葡萄糖而言，乳糖对乳酸菌和酵母菌增殖的促进作用更明显，其菌体数量也高于空白组，所以，选取乳糖为碳源。

2.1.2 适宜氮源的选取

由表 1 可以看出，氮源是影响菌落总数的重要因素，添加氮源发酵母液中的总菌数比不添加氮源的明显要高，且最终 pH 更低。因为乳酸菌和酵母菌分解蛋白质的能力有限，其增殖速率与汁液中蓄积的游离氨基酸和多肽等物质的含量密切相关。以酵母膏为氮源的泡菜母液中活菌数比其他氮源的活菌数多，这可能是酵母膏提供的多肽类和氨基酸能很好地被酵母菌和乳酸菌利用，促进菌体生长，

因此, 选用酵母膏为氮源。

2.1.3 适宜碳氮比的选取

由表1可知, 在碳、氮比中, 随着碳源所占比例的增加, 乳酸菌和酵母菌总数逐渐增多, 表明以乳糖和酵母膏为碳源和氮源对其菌体生长有很好的促进作用, 且乳酸菌数变化比较明显。当碳氮比为4:1时, 菌落总数较多。

表1 不同培养条件下发酵母液中的乳酸菌数和酵母菌数

Table 1 Influence of different factors on the growth of actic acid bacteria and yeast 10^8 cfu/mL

| 培养条件 | 乳酸菌数 | 酵母菌数 |
|------------|------|------|
| 葡萄糖 20 g/L | 1.12 | 0.92 |
| 蔗糖 20 g/L | 0.89 | 0.65 |
| 乳糖 20 g/L | 1.34 | 1.05 |
| 不添加 | 0.56 | 0.34 |
| 酵母膏 5 g/L | 1.40 | 1.09 |
| 蛋白胨 5 g/L | 1.06 | 0.89 |
| 牛肉膏 5 g/L | 1.12 | 0.96 |
| 不添加 | 0.62 | 0.34 |
| 碳氮比 2:1 | 1.24 | 0.40 |
| 碳氮比 3:1 | 1.60 | 0.60 |
| 碳氮比 4:1 | 1.68 | 0.85 |
| 碳氮比 5:1 | 1.70 | 1.08 |
| 培养温度 20 °C | 0.67 | 0.36 |
| 培养温度 25 °C | 0.80 | 0.68 |
| 培养温度 30 °C | 0.94 | 0.84 |
| 培养温度 35 °C | 1.11 | 0.78 |
| pH 4.5 | 0.50 | 0.42 |
| pH 5.5 | 0.98 | 0.72 |
| pH 6.5 | 1.21 | 0.94 |
| pH 7.5 | 1.06 | 1.24 |
| 接种比例 1:1:1 | 0.56 | 0.50 |
| 接种比例 2:2:1 | 0.98 | 0.72 |
| 接种比例 3:3:1 | 1.25 | 1.05 |
| 接种比例 4:4:1 | 1.32 | 1.15 |
| 接种量 1% | 0.67 | 0.65 |
| 接种量 3% | 1.07 | 0.80 |
| 接种量 5% | 0.85 | 0.40 |
| 接种量 7% | 0.64 | 0.30 |

2.1.4 适宜培养温度的选取

由表1可知, 随着温度升高, 发酵母液中酵母菌总数先增多, 后减少, 这是因为酵母菌的适宜生长温度为28~30 °C; 当温度高于30 °C, 酵母菌生长受到抑制。因乳酸菌生长缓慢, 所以乳酸菌数总体变化不大。综合考虑乳酸菌与酵母菌的数量和生产耗能, 选取适宜培养温度为30 °C。

2.1.5 适宜接种量的选取

由表1可知, 不同接种量对发酵母液中菌体的高密度培养有一定的影响, 当接种量为3%时, 乳酸菌和酵母菌的活菌数最多; 接种量为5%时, 活菌数反而减少。这可能由于接种量大, 菌体生长量多, 发酵后期因营养缺乏导致部分菌体死亡, 因此, 选择适宜接种量为3%。

2.1.6 适宜接种比例的选取

由表1可见, 以植物乳杆菌、短乳杆菌、鲁氏酵母体积比为3:3:1进行接种时, 产品中乳酸菌与酵母菌的数量比例较为合适, 符合生产要求; 当乳酸菌与酵母菌比例过低时, 泡菜母液产品和质量受到影响; 当比例过高时, 酵母菌在泡菜母液中的比例增大。综合考虑, 选取适宜接种比例为3:3:1。

2.1.7 适宜起始 pH 的选取

由表1可见, 起始 pH 值为6.5时, 活菌数量较多。起始 pH 值过低或过高都不利于菌体生长, 当 pH 过低时, 由于混合菌在培养过程中产生酸, 使得 pH 值下降较快, 影响酵母菌生长; 当 pH 为7.5时, 乳酸菌生长受到抑制, 这是因为酵母菌发酵糖产生甘油影响了乳酸菌生长。调节发酵母液的 pH 为6.5, 有利于3种菌的协调生长, 适宜 pH 为6.5。

2.2 发酵母液培养条件优化的正交试验结果

根据单因素试验结果, 设计表2正交试验。

表2 正交试验的因素和水平

Table 2 Factors and levels of orthogonal test

| 水平 | 因素 | | | | |
|----|--------|-----------|----------|---------|-------|
| | A(碳氮比) | B(培养温度/℃) | C(接种量/%) | D(接种比例) | E(pH) |
| 1 | 2 1 | 20 | 1 | 1 1 1 | 4.5 |
| 2 | 3 1 | 25 | 3 | 2 2 1 | 5.5 |
| 3 | 4 1 | 30 | 5 | 3 3 1 | 6.5 |
| 4 | 5 1 | 35 | 7 | 4 4 1 | 7.5 |

正交试验结果及其极差分析(表3)表明,主要考虑乳酸菌生长情况时,碳氮比、接种量、pH、培养温度和接种比例的影响依次减小。各处理间差异较大,最优组合为 A₄B₄C₄D₂E₃ 或 A₄B₃C₄D₂E₃, 即碳氮源质量比 5 1、培养温度 35 或 30℃、接种量 7%、接种比例为 2 2 1、pH 为 6.5。

由表3可见,当主要考虑酵母菌生长情况时,碳氮比、pH、接种量、培养温度和接种比例的影响依次减小。最优组合为 A₄B₄C₄D₂E₃, 即碳氮源质量比 5 1、培养温度 35℃、接种量 7%、接种比例为 2 2 1、pH 为 6.5。

表3 正交试验结果

Table 3 The results of orthogonal test

| 试验号 | A | B | C | D | E | 乳酸菌数/(×10 ⁸ cfu·mL ⁻¹) | 酵母菌数/(×10 ⁸ cfu·mL ⁻¹) |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|---|---|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0.53 | 0.42 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0.76 | 0.70 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 3 | 1.12 | 0.82 |
| 4 | 1 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0.97 | 0.73 |
| 5 | 2 | 1 | 2 | 4 | 4 | 0.82 | 0.60 |
| 6 | 2 | 2 | 1 | 4 | 3 | 0.88 | 0.70 |
| 7 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 1.46 | 1.05 |
| 8 | 2 | 4 | 3 | 2 | 1 | 1.09 | 0.92 |
| 9 | 3 | 1 | 3 | 4 | 2 | 1.16 | 0.98 |
| 10 | 3 | 2 | 4 | 3 | 1 | 0.90 | 0.72 |
| 11 | 3 | 3 | 1 | 2 | 4 | 0.80 | 0.62 |
| 12 | 3 | 4 | 2 | 1 | 3 | 1.24 | 1.05 |
| 13 | 4 | 1 | 4 | 2 | 3 | 1.76 | 1.26 |
| 14 | 4 | 2 | 3 | 1 | 4 | 0.96 | 0.73 |
| 15 | 4 | 3 | 2 | 4 | 1 | 1.10 | 1.05 |
| 16 | 4 | 4 | 1 | 3 | 2 | 1.41 | 1.02 |
| K ₁ (乳酸菌) | 0.845 | 1.067 | 0.905 | 1.047 | 0.905 | | |
| K ₂ (乳酸菌) | 1.063 | 0.875 | 0.980 | 1.103 | 1.198 | | |
| K ₃ (乳酸菌) | 1.025 | 1.120 | 1.083 | 1.063 | 1.250 | | |
| K ₄ (乳酸菌) | 1.307 | 1.177 | 1.272 | 1.027 | 0.887 | | |
| R(乳酸菌) | 0.462 | 0.302 | 0.367 | 0.076 | 0.363 | | |
| K ₁ (酵母菌) | 0.667 | 0.815 | 0.690 | 0.813 | 0.778 | | |
| K ₂ (酵母菌) | 0.817 | 0.713 | 0.850 | 0.875 | 0.938 | | |
| K ₃ (酵母菌) | 0.843 | 0.885 | 0.862 | 0.790 | 0.958 | | |
| K ₄ (酵母菌) | 1.015 | 0.930 | 0.940 | 0.865 | 0.670 | | |
| R(酵母菌) | 0.348 | 0.217 | 0.250 | 0.085 | 0.288 | | |

2.3 验证试验结果

经验证,组合 $A_4B_4C_4D_2E_3$ 的乳酸菌活菌数达 1.84×10^8 cfu/mL,酵母菌活菌数达 1.24×10^8 cfu/mL。组合 $A_4B_3C_4D_2E_3$ 的乳酸菌活菌数达 1.78×10^8 cfu/mL,酵母菌活菌数达 1.22×10^8 cfu/mL。以上结果与正交试验中的最佳组合所得乳酸菌数和酵母菌数基本持平,因此,从节约能源的角度考虑,选用碳氮源质量比 5 : 1、培养温度 30 °C、接种量 7%、接种比例 2 : 2 : 1、pH6.5 为发酵母液的较优培养条件。

3 结论与讨论

本试验结果表明,乳糖作为发酵母液碳源的效果优于葡萄糖和蔗糖,酵母膏作为氮源比胰蛋白胨和牛肉膏的效果好。用乳酸菌和酵母菌复合发酵芹菜汁制备泡菜母液的较优条件为:碳氮比为 5 : 1(乳糖质量浓度为 20 g/L,酵母膏质量浓度为 5 g/L)、培养温度 30 °C、pH6.5、植物乳杆菌、短乳杆菌和鲁氏酵母的体积比为 2 : 2 : 1、接种量 7%。在该培养条件下,乳酸菌和酵母菌的增殖效果好,乳酸菌活菌数达 1.78×10^8 cfu/mL,酵母菌活菌数达 1.22×10^8 cfu/mL。

采用乳酸菌和酵母菌复合发酵芹菜汁制备泡菜母液,可为纯种发酵技术提供参考。将该泡菜母液直接投入到蔬菜中进行发酵,能减少泡菜生产加工工序。

参考文献:

- [1] 余文华,陈功,丁文军,等.直投式功能菌剂发酵蔬菜技术研究[J].食品与发酵科技,2009,45(4):25-27.
- [2] 沈国华.纯菌接种发酵技术在腌渍蔬菜加工上的应用研究[J].中国调味品,2002,277(3):22-25.
- [3] 吴艳红.多菌种乳酸菌的研制及工业化生产[J].黑龙江日化,1997(4):33.

- [4] Ishikaw K ,Kaot T ,Komiya T .Development of mixed lactic starter cultures for hyposalts pickles and their aging mechanisms[J]. Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology , 2003 , 50(9) : 411-418 .
- [5] 李艾黎,都立辉,霍贵成.保加利亚乳杆菌分批发酵工艺研究[J].食品工业科技,2005,26(12):57-59.
- [6] 蒋和体.果蔬茶汁饮料研制[J].食品工业,1995,233(2):14-15.
- [7] 杨晓辉,籍保平,李博,等.泡菜中优良乳酸菌的分离鉴定及其发酵性能的研究[J].食品科学,2005,26(5):130-133.
- [8] 张兰威.发酵食品[M].哈尔滨:哈尔滨工程大学出版社,1997:1321-1351.
- [9] 黄秀梨,辛明秀,夏立秋,等.微生物学试验指导[M].北京:高等教育出版社,2008:146-149.
- [10] 俞俊棠,唐孝宣.生物工艺学[M].上海:华东化工学院出版社,1991.
- [11] Rajagopal S N , Sandine W E . Associative growth and proteolysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus* in skim milk[J]. J Dairy Sci , 1990(73) : 894-899 .
- [12] Parente E ,Zottola E A .Growth of thermophilic starters in whey permeate media [J]. J Dairy Sci ,1991(74) :20-28 .
- [13] 彭立凤,赵汝淇,谭天伟.微生物脂肪酶的应用[J].食品与发酵工业,2000,26(3):68-73.
- [14] 熊晓辉,于修,熊强,等.乳酸菌发酵剂高密度培养的研究[J].中国调味品,2004(5):17-21.
- [15] 周探春,刘焱,邓放明.斑点叉尾鮰下脚料蛋白酶水解工艺优化[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2013,39(1):95-98.
- [16] 崔丽,李敏,龚志华,等.二氯甲烷萃取绿茶咖啡碱工艺参数的优化[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2011,37(5):562-566.
- [17] 周静,肖嫩群.酵母菌与乳酸菌混合培养条件研究[J].安徽农业科学,2011,39(15):8824-8825.
- [18] 张树政.酶制剂工业(下册)[M].北京:科学出版社,1984:655-670.

责任编辑:王赛群

英文编辑:王 库