

戴意强,单成俊,刘小莉,等. 乳酸菌发酵黑莓汁增加胞外多糖工艺初探[J]. 江苏农业科学,2020,48(18):214-218.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.18.043

# 乳酸菌发酵黑莓汁增加胞外多糖工艺初探

戴意强<sup>1</sup>,单成俊<sup>1</sup>,刘小莉<sup>1</sup>,吴寒<sup>1</sup>,王英<sup>1</sup>,程先玲<sup>2</sup>,郗海燕<sup>4</sup>,韩延超<sup>4</sup>,周剑忠<sup>1</sup>,夏秀东<sup>1,3</sup>

(1. 江苏省农业科学院农产品加工研究所,江苏南京 210014; 2. 江苏惠田农业科技开发有限公司,江苏扬州 211400;

3. 江苏今世缘酒业股份有限公司,江苏淮安 223411; 4. 浙江省农业科学院食品科学研究所,浙江杭州 310021)

**摘要:**为增加黑莓汁中乳酸菌胞外多糖含量,利用产胞外多糖乳酸菌 MB2-1 和 JX5 发酵黑莓汁,并测定发酵过程中黑莓汁的 pH 值、黏度及多糖含量随时间的变化情况,以确定用于发酵黑莓汁的乳酸菌种类和碳源。结果表明,添加葡萄糖作为碳源时,乳酸菌 MB2-1 和 JX5 发酵在 32 h 时胞外多糖产量最高,分别为 2.75 g/L 和 3.06 g/L,说明将乳酸菌 JX5 作为发酵菌株,葡萄糖作为碳源添加到黑莓汁中进行发酵,可增加黑莓汁中乳酸菌胞外多糖含量。

**关键词:**乳酸菌;黑莓汁;多糖;碳源;发酵;黏度

**中图分类号:** TS275.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)18-0214-05

黑莓浆果风味独特、营养丰富,含有多多种具有生物活性的化合物,是酿酒和生产果汁、果酱、医疗保健品等的天然原料。黑莓中富含维生素 C、酚酸、鞣花酸、鞣花素、类黄酮(包括花青素)和类胡萝卜素等促进健康的物质,具有抗氧化、代谢调节、消除

疲劳、延缓衰老、提高免疫力等作用<sup>[1-2]</sup>。因此随着人们生活水平的提高和对健康生活的追求,研究和开发黑莓相关的产品将具有广阔的前景。

胞外多糖(EPS)是一类由特殊微生物在生长代谢过程中分泌到细胞壁外的一类次级代谢产物<sup>[3]</sup>。EPS 具有多种生理活性功能,可以增强机体免疫力,具有抗肿瘤、降低血清中胆固醇<sup>[4]</sup>、降血压、抗氧化和改善人体肠道微生态环境<sup>[5]</sup>等作用。乳酸菌 EPS 是一类来源可靠安全,对人体无毒副作用,并且具有独特的理化和流变学特性的物质,因此可以作为增稠剂、稳定剂、乳化剂应用到食品工业中,已经成为了一种天然安全无公害的食品级添加剂<sup>[6]</sup>。

笔者研究了 2 株产胞外多糖乳酸菌在添加不同

收稿日期:2019-09-11

基金项目:江苏省科技计划(编号:BE2018367);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(18)2017];农业农村部果品产后处理重点实验室、浙江省果蔬保鲜与加工技术研究重点实验室开放课题。

作者简介:戴意强(1995—),男,江苏南京人,硕士研究生,研究方向为食品生物技术。E-mail: yq-dai@foxmail.com。

通信作者:夏秀东,博士,副研究员,研究方向为食品生物技术。E-mail: 86084056@163.com。

[2] 窦培元,栾晓宁,朱连连,等. 牛蒡根中有效成分的含量测定[J]. 山西中医学院学报,2018,19(4):30-33,44.

[3] 许志新. 速溶型牛蒡粉的制备工艺研究[D]. 苏州:苏州大学,2015.

[4] Rubel I A, Pérez E E, Genovese D B, et al. *In vitro* prebiotic activity of inulin-rich carbohydrates extracted from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers at different storage times by *Lactobacillus paracasei*[J]. Food Research International, 2014, 62: 59-65.

[5] Velázquez - Martínez J R, González - Cervantes R M, Hernández - Gallegos M A, et al. Prebiotic potential of *Agave angustifolia* Haw fructans with different degrees of polymerization[J]. Molecules, 2014, 19(8):12660-12675.

[6] Alves Moro T M, Celegatti C M, Aparecida Pereira A P, et al. Use of burdock root flour as a prebiotic ingredient in cookies[J]. LWT - Food Science and Technology, 2018, 90:540-546.

[7] Chaikham P, Kemsawasd V, Seesuriyachan P. Spray drying probiotics

along with maoluang juice plus *Tiliacora triandra* gum for exposure to the *in vitro* gastrointestinal environments[J]. LWT - Food Science and Technology, 2017, 78:31-40.

[8] Li D D, Kim J M, Jin Z Y, et al. Prebiotic effectiveness of inulin extracted from edible burdock[J]. Anaerobe, 2008, 14(1):29-34.

[9] Li H P, Lu M J, Guo H F, et al. Protective effect of sucrose on the membrane properties of *Lactobacillus casei* Zhang subjected to freeze-drying[J]. Journal of Food Protection, 2010, 73(4):715-719.

[10] 程艳薇,谭书明. 乳酸菌抗热保护剂的优化组合[J]. 中国调味品, 2010, 35(7):55-59.

[11] 陈合,寇建波,杨妍,等. 干酪乳杆菌抗热保护剂的 Plackett - Burman 试验研究[J]. 陕西科技大学学报(自然科学版), 2017, 35(4):122-125,137.

[12] 曾海英,谭书明,母应春,等. 常压干燥乳酸菌粉生产菌株高温驯化及抗热保护剂筛选[J]. 贵州农业科学, 2010, 38(8):207-209.

[13] 范娜,陈雪峰. 益生菌抗热保护剂的研究[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(4):94-98.

碳源的条件下发酵黑莓汁中 pH 值、黏度和产胞外多糖情况,以期开发一种新型产胞外多糖乳酸菌发酵黑莓汁饮料。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

黑莓来源于江苏省南京市溧水区白马种植基地;植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) JX5,由江苏省农业科学院农产品加工研究所食品生物工程研究室保存;瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*) MB2-1,由南京农业大学食品科技学院食品微生物研究室保存。

### 1.2 试剂及仪器

试剂:MRS 肉汤培养基(北京奥博星生物技术有限公司);浓硫酸(南京化学试剂股份有限公司);苯酚、无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司)。

仪器:3K15 离心机[西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司];DV-1+Pro 黏度计(上海尼润智能科技有限公司);FiveEasy Plus pH 计[梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司];Epoch 酶标仪(美国伯腾仪器有限公司);Agilent 1290 高效液相色谱(安捷伦科技有限公司)。

### 1.3 试验方法

1.3.1 黑莓果汁制备工艺 黑莓果汁制备工艺流程如下:黑莓浆果清洗→打浆→离心取上清→加入碳源(3%葡萄糖、3%蔗糖、1%乳糖)→85℃巴氏杀菌 20 min→接种→发酵→85℃巴氏杀菌 20 min→成品。

1.3.2 乳酸菌培养及对黑莓汁的接种 挑取活化好的乳酸菌单菌落接种到液体 MRS 培养基中,37℃培养 48 h。将一定体积含乳酸菌的 MRS 液体培养基离心去上清,用无菌水洗涤沉淀 2 次,再加入同体积无菌水,混匀,按 3% 的接种量分别接种到处理过的黑莓汁中。

1.3.3 黑莓汁中糖分组成和含量的测定 样品经 11 000 r/min 离心后过 0.45 μm 滤膜,稀释 10 倍后测定糖分组成。用超纯水配制 10 mg/mL 棉子糖、蔗糖、葡萄糖、木糖和果糖母液,待用。标准液浓度依次为 1.0、0.8、0.4、0.2、0.1 mg/mL。以进样量为横坐标、峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。

色谱分析条件为流动相:超纯水;流动相流速:0.5 mL/min;色谱柱:Agilen Hi-Plex Ca 糖分析柱;检测器:示差折光检测器;柱温:80℃;进样量:

25 μL。

1.3.4 发酵黑莓汁 pH 值的测定 将发酵 0、32、120 h 的黑莓汁摇匀后,用 pH 计测定不加入碳源、加入葡萄糖、蔗糖以及乳糖的发酵黑莓汁 pH 值。

1.3.5 发酵黑莓汁黏度的测定 用量筒量取 30 mL 发酵 0、32、120 h 的黑莓汁,用黏度计测定不加入碳源、加入葡萄糖、蔗糖以及乳糖的发酵黑莓汁的黏度,转子型号为 0 号转子,转速为 60 r/min。

1.3.6 发酵黑莓汁多糖含量的测定 采用苯酚-硫酸法测定发酵黑莓汁中的多糖含量。称取样品 1.0 g(精确至 0.001)置于 50 mL 具塞离心管中,缓慢加入 20 mL 无水乙醇,涡旋振荡,混匀,4℃提取 1 h,再用 4 000 r/min 的转速离心 10 min,弃上清液。不溶物用 80% 乙醇溶液洗涤、离心,用去离子水将沉淀超声溶解后再次离心,取上清液,残渣用去离子水洗涤 2 次。将所有上清液转入到 50 mL 容量瓶中,加去离子水定容。

分别吸取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 标准葡萄糖溶液置于 20 mL 具塞试管中,并用蒸馏水补足至 1.0 mL。向试样中先后加入 1.0 mL 苯酚和 5.0 mL 浓硫酸,混匀后于 30℃下水浴 20 min,并于 490 nm 处测定吸光度。

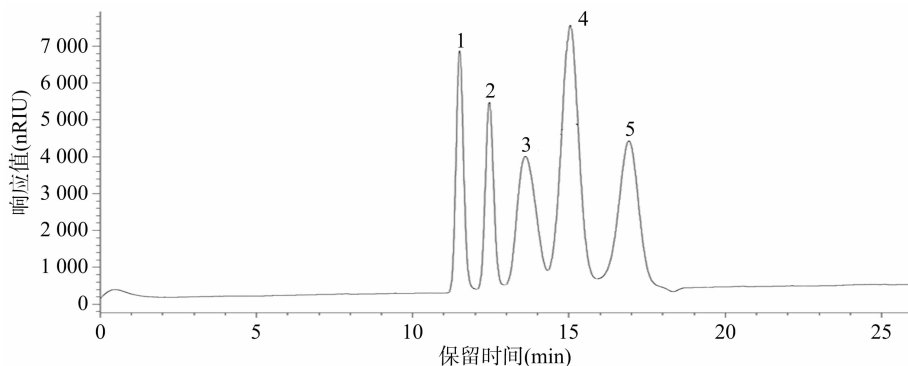
## 2 结果与分析

### 2.1 黑莓汁中糖分组成和含量

利用液相色谱仪测定黑莓汁中糖分组成和含量,结果发现,所用品种的黑莓汁中糖分组成为葡萄糖和果糖。图 1 是糖类标准品的色谱峰,棉子糖、蔗糖、葡萄糖、木糖、果糖分离效果好,保留时间分别为 11.503、12.452、13.604、15.028、16.920 min。黑莓汁中糖分的 HPLC 分析结果见图 2,可以看出,糖分离效果很好,根据出峰时间可知,黑莓汁中含有葡萄糖和果糖。根据葡萄糖标准曲线( $y = 174\,121.422\,16x - 1\,214.766\,07$ ,  $r^2 = 0.996\,3$ )和果糖标准曲线( $y = 224\,217.087\,47x - 1\,650.563\,79$ ,  $r^2 = 0.997\,7$ )得到,黑莓汁中葡萄糖和果糖含量分别为 26.70 mg/mL 和 20.97 mg/mL。说明黑莓汁中含有丰富的糖分,不添加糖分或者添加适量的糖分即可满足乳酸菌生长代谢所需。

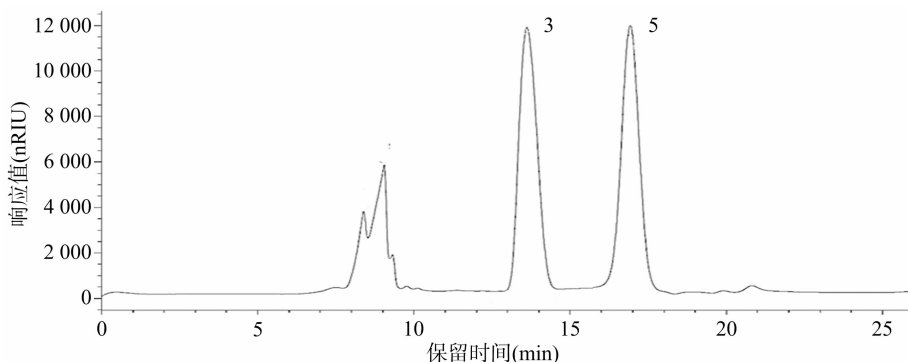
### 2.2 发酵黑莓汁 pH 值变化

乳酸菌可以利用糖类发酵产酸,但由于对不同糖类的利用能力有所不同,乳酸菌在不同碳源下的生长状况和产酸能力不同。



1—棉子糖; 2—蔗糖; 3—葡萄糖; 4—木糖; 5—果糖

图1 标准品 HPLC 图



3—葡萄糖; 5—果糖

图2 黑莓汁中糖分 HPLC 图

本研究探讨了不同碳源对产胞外多糖乳酸菌 MB2-1 发酵黑莓汁 pH 值的影响(图 3-A)。与发酵 0 h 的 pH 值相比,相同碳源下乳酸菌 MB2-1 发酵黑莓汁在 32、120 h 时的 pH 值显著增加( $P < 0.05$ );除添加葡萄糖和乳糖的黑莓汁外,相同碳源下发酵黑莓汁 pH 值在 32、120 h 之间无显著性差异( $P > 0.05$ )。添加不同的碳源和不添加糖分之间在 0、32 h 时发酵液 pH 值无显著性差异( $P > 0.05$ )。乳酸菌 MB2-1 发酵黑莓汁在发酵过程中 pH 值维持在 2.98~3.26 范围内。

乳酸菌 JX5 发酵添加不同碳源的黑莓汁 pH 值变化,图 3-B 所示。乳酸菌 JX5 发酵黑莓汁在 0 h 时 pH 值维持在 3.0 左右;发酵 32 h 时,不添加碳源或者添加葡萄糖、乳糖作为碳源之间 pH 值无显著差异( $P > 0.05$ ),而添加蔗糖的发酵黑莓汁 pH 值较低。与发酵 32 h 时添加乳糖的发酵黑莓汁 pH 值相比,发酵 120 h 时添加乳糖的发酵黑莓汁 pH 值显著降低( $P < 0.05$ )。除添加乳糖的发酵黑莓汁外,32 h 和 120 h 发酵黑莓汁 pH 值无显著性差异( $P > 0.05$ )。

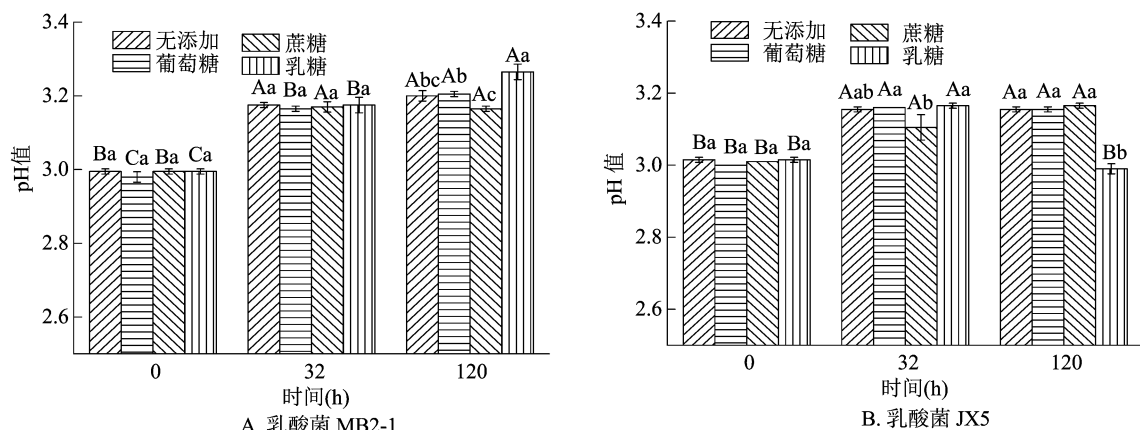
在添加碳源和不添加碳源的情况下,与 0 h 的

pH 值相比,乳酸菌 MB2-1 和乳酸菌 JX5 发酵黑莓汁 pH 值在 32 h 时显著上升( $P < 0.05$ ),这可能是因为一方面随着发酵时间的增加,黑莓汁中碳源含量减少限制了乳酸菌的生长,且乳酸菌在衰退期菌体发生自溶,氨基氮含量增加,造成 pH 值上升。另一方面可能由于发酵过程中乳酸菌将黑莓汁中的有机酸消耗或转化为其他有机酸。

### 2.3 发酵黑莓汁黏度变化

乳酸菌发酵过程中一般采用间接的方法来定量测定 EPS 的产量<sup>[7]</sup>,其中对黏度的测定就是一种间接测定方法,但是黏度和 EPS 产量没有必然的对应关系<sup>[8-9]</sup>。

不同碳源对乳酸菌 MB2-1 发酵黑莓汁黏度的影响如图 4-A 所示。在 0 h 时,不添加碳源和添加葡萄糖、蔗糖、乳糖的黑莓汁黏度分别为 5.39、5.87、5.73、5.35 cp。在 32 h 时,发酵黑莓汁黏度显著下降( $P < 0.05$ ),分别下降为 4.99、5.15、4.79、4.87 cp。与发酵 32 h 时的发酵黑莓汁相比,发酵 120 h 时不添加碳源和添加葡萄糖的发酵黑莓汁黏度显著增加( $P < 0.05$ ),而添加蔗糖的发酵黑莓汁黏度显著降低( $P < 0.05$ )。



柱上不同大写字母表示同种处理在不同时间差异显著( $P < 0.05$ ); 小写字母表示相同时间不同处理差异显著( $P < 0.05$ )。图 4、图 5 同

图3 碳源种类对乳酸菌发酵黑莓汁 pH 值的影响

如图 4 - B 所示,乳酸菌 JX5 发酵黑莓汁在不添加碳源和添加葡萄糖、蔗糖、乳糖情况下起始黏度分别为 5.22、5.67、5.40、5.40 cp; 在 32 h 时,发酵黑莓汁黏度分别为 5.00、5.36、5.09、4.98 cp。与发酵 32 h 时的发酵黑莓汁相比,乳酸菌 JX5 发酵 120 h 后,不添加碳源和添加葡萄糖的黑莓汁黏度显著上升( $P < 0.05$ ),分别为 5.74 cp 和 5.75 cp。除添加蔗糖和乳糖的黑莓汁外,乳酸菌 MB2 - 1 和

乳酸菌 JX5 发酵黑莓汁黏度随时间的增加先减小后增大,这可能是由于乳酸菌生长前期利用黑莓汁中如糖类是具有黏度的营养物质,导致发酵黑莓汁整体黏度下降,而发酵后期,发酵黑莓汁中产生了其他具有黏性的物质,如乳酸菌胞外多糖等。值得注意的是在 MB2 - 1 和 JX5 发酵 120 h 后添加蔗糖发酵黑莓汁黏度显著下降,这可能是因为黑莓汁中的微生物利用了黑莓汁中存在的多糖。

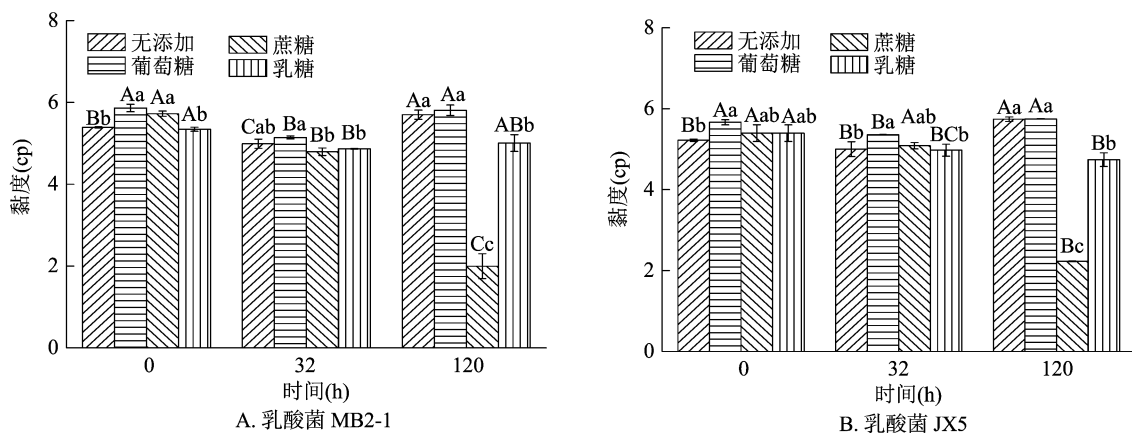


图4 碳源种类对乳酸菌发酵黑莓汁黏度的影响

## 2.4 发酵黑莓汁多糖含量变化

乳酸菌胞外多糖是乳酸菌在生长代谢过程中分泌到细胞外部的糖类化合物。由图 5 可知,是否加入碳源或者加入不同的碳源,乳酸菌发酵黑莓汁多糖含量随时间的增加先增加后减少,这是因为乳酸菌在发酵过程中会产生多糖,当黑莓汁中营养物质被消耗殆尽时,多糖可能被再次利用。在添加葡萄糖、蔗糖、乳糖情况下,乳酸菌 MB2 - 1 和乳酸菌 JX5 发酵黑莓汁中多糖含量在 32 h 时显著上升

( $P < 0.05$ ),分别为 2.75、2.69、2.41 g/L 和 3.06、2.52、2.50 g/L。乳酸菌 MB2 - 1 和乳酸菌 JX5 发酵添加不同碳源的黑莓汁在 0 h 时多糖含量无显著性差异( $P > 0.05$ )。在添加葡萄糖、蔗糖、乳糖情况下,乳酸菌 MB2 - 1 和乳酸菌 JX5 发酵黑莓汁在 120 h 时多糖含量显著下降( $P < 0.05$ ),分别为 1.60、1.13、1.61 g/L 和 1.47、1.27、1.82 g/L。由图 5 可知,乳酸菌 MB2 - 1 和乳酸菌 JX5 在添加葡萄糖作为碳源时,发酵 32 h 的黑莓汁中胞外多糖含量

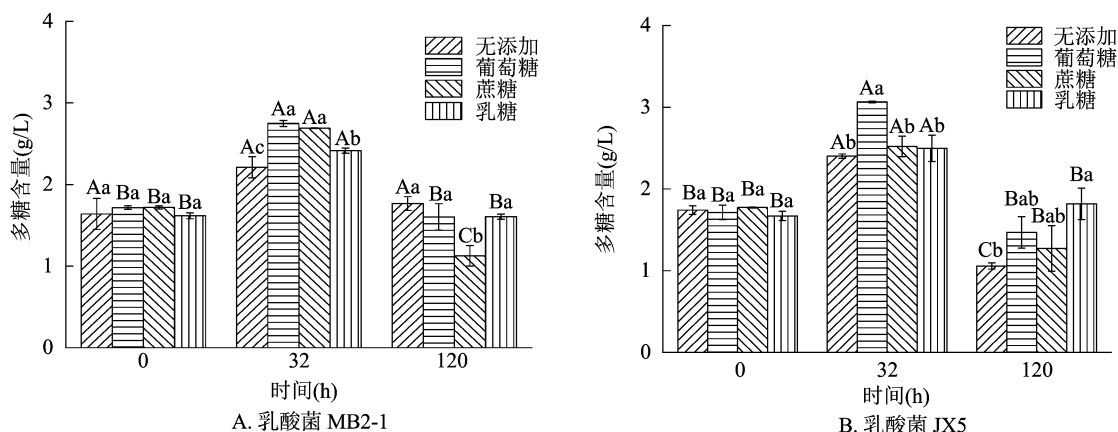


图5 碳源种类对乳酸菌发酵黑莓汁多糖的影响

达到最高。

与图 4 相比,乳酸菌 MB2-1 和乳酸菌 JX5 发酵黑莓汁的多糖产量并未随着黏度的上升而增加,这是因为黏度不仅与 EPS 的含量有关,还与培养基的组成有关,另外发酵黑莓汁中 EPS 与蛋白质之间形成的物理化学复合物也可能在黏度变化中发挥重要作用<sup>[10]</sup>。

### 3 结论

本研究测定 2 株乳酸菌在添加不同碳源的条件下发酵黑莓汁的 pH 值、黏度和多糖产量变化。从多糖产量和乳酸菌生长条件来看,选择乳酸菌 JX5 且加入葡萄糖作为碳源发酵黑莓汁最佳,在发酵 32 h 时胞外多糖产量达 3.06 g/L。

#### 参考文献:

[1] Wang S Y, Lin H S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(2): 140-146.

[2] Ali L, Alsanius B W, Rosberg A K, et al. Effects of nutrition strategy on the levels of nutrients and bioactive compounds in blackberries [J]. European Food Research and Technology, 2012, 234(1): 33-44.

[3] 孟凡岭, 万妹含, 胡风庆. 乳酸菌胞外多糖生物活性研究进展 [J]. 辽宁大学学报(自然科学版), 2018, 45(4): 379-384.

[4] 王瑞琼, 张红星, 熊利霞, 等. 乳酸菌胞外多糖分离纯化方法研究进展 [J]. 食品科学, 2008, 29(8): 700-703.

[5] 崔燕丽, 徐晓芬, 吴正钧, 等. 乳酸菌胞外多糖对人类肠道菌群的影响 [J]. 中国微生态学杂志, 2016, 28(7): 851-856.

[6] 彭家伟, 黄桂东, 黄伟志, 等. 乳酸菌胞外多糖在食品工业中的应用 [J]. 农产品加工, 2017(9): 47-52.

[7] 陈晓红. 乳酸菌胞外多糖的生物合成及其组成和体外抑瘤活性研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2003.

[8] Cerning J, Bouillanne C, Desmazeaud M J, et al. Isolation and characterization of exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus bulgaricus* [J]. Biotechnology Letters, 1986, 8(9): 625-628.

[9] Cerning J, Bouillanne C, Desmazeaud M J, et al. Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophiles* [J]. Biotechnology Letters, 1988, 10(4): 255-260.

[10] Saija N, Welman A D, Bennett R J. Development of a dairy-based exopolysaccharide bioingredient [J]. International Dairy Journal, 2010, 20(9): 603-608.