

无糖发酵红豆乳乳酸菌的筛选及驯化

王 丽,董英丽,双 全*

(内蒙古农业大学食品科学与工程学院,内蒙古呼和浩特 010018)

摘 要:以从内蒙古传统发酵食品中分离的 50 株乳酸菌为对象,在无糖 LB 培养基进行初筛的基础上,于红豆乳中以产酸能力和蛋白质分解能力为目标值进行复筛,再对筛选出的菌株进行驯化。结果表明,50 株供试乳酸菌经初筛获得 3 株生长状况较好的菌株 S2-4、Sc8-1 和 NM-6。复筛结果表明 NM-6 在红豆乳中 37 °C 培养 48 h 时其总酸度和游离氨基氮含量分别达到 0.27% 和 1.215 mmol/L。再对菌株 NM-6 进行驯化后,其总酸度和游离氨基氮含量比驯化前分别提高了 59.3% 和 25.3%。驯化后的菌株在红豆乳中有更好的适应性,增强了菌株的活力,从而有助于提高酸豆乳产品的质量。

关键词:乳酸菌,无糖培养基,红豆乳,驯化,筛选

Screening and taming of *Lactic acid bacteria* in the fermented sugar-free red bean milk

WANG Li, DONG Ying-li, SHUANG Quan*

(College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract: The growth ability of 50 *Lactic acid bacteria* strains isolated from the traditional fermented food in Inner Mongolia were screened in the sugar-free LB medium, and acid producing capability and protein decomposition capability were measured as the goal value in the red bean milk. Then the protein decomposition capability of selected strain was tamed gradually. The results showed that the three strains (S2-4, Sc8-1 and NM-6) were screened out with good growth ability, and one of the best strain NM-6 was selected by measuring protein decomposition capability in the red bean milk, and its total acidity and the free amino nitrogen content at 37 °C for 48 h were 0.27% and 1.215 mmol/L, respectively. After taming, the total acidity and the free amino nitrogen content of strain NM-6 were improved by 59.3% and 25.3%. The tamed strain had better adaptability in the red bean milk, at the same time the higher strain activity was helpful to improve the quality of soymilk yoghurt products.

Key words: *Lactic acid bacteria*; sugar-free medium; red bean milk; taming; screening

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)23-0186-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.23.030

红豆是一种高蛋白、低脂肪、多营养的功能食品^[1],其蛋白质含量比禾谷类物质高 2~3 倍,且含有人体必需的 8 种氨基酸^[2]。红豆中还富含膳食纤维,可通过降低葡萄糖在体内的吸收速度来维持餐后血糖的稳定,是糖尿病患者食用的理想主食之一^[3]。此外红小豆提取物具有显著的抗氧化、降高血压、降胆固醇等作用^[4-5]。据报道,发酵后的红豆乳营养价值提高并更易于人体吸收^[6]。本实验为了充分发挥红豆乳固有的营养价值及乳酸菌的益生功能^[7],以从内蒙古传统发酵食品中分离的乳酸菌为对象,在无糖 LB 培养基和红豆乳中以产酸能力和蛋白质分解能力为指标进行筛选,并对其驯化。以使菌株能更好的适应在红豆乳中生长。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

市售红豆;供试乳酸菌 50 株(全部乳酸菌来自内蒙古农业大学实验室提供,从酸菜、奶酪、马奶酒等传统发酵食品中分离并初步鉴定的并经编号的菌株)。

MRS 液体培养基:大豆蛋白胨 10 g/L、牛肉膏 10 g/L、酵母提取粉 5 g/L、柠檬酸氢二铵 2 g/L、无水乙酸钠 5 g/L、磷酸氢二钾 2 g/L、Tween 80 1 g/L、硫酸镁 200 mg/L、硫酸锰 54 mg/L、无水葡萄糖 20 g/L, pH6.5, 121 °C 20 min 灭菌。

LB 培养基:胰蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L、NaCl 10 g/L, 121 °C 20 min 灭菌。

SW-CJ-2FD 洁净工作台 上海大龙医疗设备有限公司; HVE-50 全自动立式高压灭菌器

收稿日期:2015-03-23

作者简介:王丽(1990-),女,硕士,研究方向:食品工程,E-mail:15024908453@163.com。

* 通讯作者:双全(1964-),男,博士,教授,研究方向:食品科学,E-mail:shuangquan@imau.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金(31460443)。

HIRAYAMA; 电热恒温培养箱 上海一恒科学仪器有限公司; Thermo CR3i 冷冻型多功能离心机、TU-1810紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司。

1.2 实验方法

1.2.1 红豆乳的制备: 挑选新鲜、饱满、无虫蛀的红豆进行搓洗, 彻底清除附在豆子表面上的脏污, 以干净清水充分冲洗几次。然后按红豆:水 = 1:4 浸泡红豆, 水温 30~35 °C, 浸泡时间 12 h, 用少许 5% NaHCO₃ 溶液调浸泡液的 pH 至 7.5~8.5, 用豆浆机将浸泡好的红豆榨汁, 制成浓度为 4% 的红豆乳, 105 °C 灭菌 15 min 后, 然后冷却至 4 °C 备用接菌^[8]。

1.2.2 无糖发酵红豆乳乳酸菌的筛选

1.2.2.1 乳酸菌在无糖 LB 培养基中的初筛 将经活化好的供试乳酸菌 50 株, 接种于无糖的 LB 培养基中 37 °C 恒温培养 24 h, 根据其生长能力 OD 值的测定初步筛选出优势乳酸菌。

1.2.2.2 乳酸菌在红豆乳中的复筛 将初筛乳酸菌按 2% 接种量分别接种于浓度为 4% 的新鲜红豆乳中, 于 37 °C 恒温培养 48 h, 同时将未接菌的 4% 的红豆乳置于同样的条件下 37 °C 恒温培养 48 h 作为对照组, 分别测定 0、24、48 h 时其总酸度和游离氨基氮含量, 从中选出产酸能力和蛋白质分解能力较强的菌株。总酸度测定参照 GB 5413.34-2010《食品安全国家标准乳和乳制品酸度的测定》方法^[9]。游离氨基氮测定采用 OPA 试剂法^[10-13]。

1.2.3 筛选菌株的驯化 将筛选乳酸菌在不同比例的 LB 培养基和红豆乳的混合培养基中于 37 °C 恒温培养 24 h 进行驯化^[14-15] (LB 培养基: 红豆乳 = 10:0; 8:2; 5:5; 2:8), 驯化后接入红豆乳中 37 °C 培养 48 h, 通过测定 0、8、16、24、32、48 h 不同时间段内红豆乳的总酸度和游离氨基氮含量, 比较筛选菌株驯化前后其产酸能力和蛋白质分解能力的变化。

1.2.4 数据处理 实验数据用 SPSS19.0 进行处理, 用 Excel 作图。

2 结果与分析

2.1 无糖发酵红豆乳乳酸菌的筛选

2.1.1 供试乳酸菌在无糖 LB 培养基中的生长能力 结果表明绝大部分乳酸菌在无糖 LB 培养基中于 37 °C 培养 24 h 后的 OD 值都小于 0.50, 只有 3 株乳酸菌 S2-4、Sc8-1 和 NM-6 的 OD 值大于 0.50, 其 OD 值对应分别为 0.568、0.502、0.538 (结果过多未出示)。

2.1.2 筛选菌株在红豆乳中的产酸能力 将初筛的 3 株菌接种于红豆乳中, 与对照组相比 37 °C 培养不同时段内的总酸度含量测定结果见表 1。

由表 1 可知, 3 株菌在发酵红豆乳中随着发酵时间的延长其总酸度比对照组明显增高, 其中菌株 NM-6 的产酸能力相对较强, 在 37 °C 培养 48 h 时的总酸度可达到 0.27%, 是发酵前的 5.4 倍。发酵 0 h 和 24 h 时的总酸度之间差异显著 ($p < 0.05$), 而发酵 24 h 和 48 h 时其总酸度之间差异不显著 ($p > 0.05$)。由显著性分析可得该菌在发酵 24 h 以内的酸度增长

要明显高于 24 h 以后时段, 说明菌株 NM-6 的生长对数期在发酵 24 h 以内出现。

表 1 筛选菌株在不同培养时间的总酸度 ($x \pm sd, n = 6$)

Table 1 Total acidity of the selected strains in different culture time ($x \pm sd, n = 6$)

初筛菌	总酸度 (%)		
	0 h	24 h	48 h
S2-4	0.05 ± 0.01 ^a	0.20 ± 0.02 ^b	0.22 ± 0.01 ^b
Sc8-1	0.05 ± 0.03 ^a	0.19 ± 0.02 ^b	0.24 ± 0.02 ^c
NM-6	0.05 ± 0.01 ^a	0.22 ± 0.01 ^b	0.27 ± 0.03 ^b
对照组	0.05 ± 0.01 ^a	0.06 ± 0.03 ^{ab}	0.08 ± 0.02 ^b

注: 同行肩标不同小写字母表示差异显著 ($p < 0.05$), 相同字母为差异不显著 ($p > 0.05$), 表 2、表 3 同。

2.1.3 筛选菌株在红豆乳中的蛋白质分解能力 根据 OPA 试剂法, 由 L-苯丙氨酸标准溶液的浓度及其吸光度值制作的标准曲线见图 1。以标液的浓度对吸光度值 (OD 值) 进行直线回归, 得出回归方程为 $y = 0.4641x - 0.0089, R^2 = 0.9979$ 。

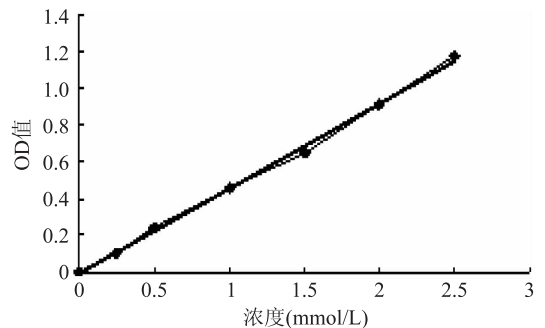


图 1 L-苯丙氨酸标准曲线

Fig.1 The standard curve of L-phenylalanine

将初筛的 3 株菌接种于红豆乳中, 37 °C 培养不同时段内的游离氨基氮含量测定结果见表 2。

表 2 筛选菌株在不同培养时间的游离氨基氮含量 ($x \pm sd, n = 6$)

Table 2 Free amino nitrogen content of the selected strains in different culture time ($x \pm sd, n = 6$)

初筛菌	游离氨基氮含量 (mmol/L)		
	0 h	24 h	48 h
S2-4	0.659 ± 0.011 ^a	1.053 ± 0.016 ^b	1.107 ± 0.013 ^c
Sc8-1	0.657 ± 0.018 ^a	1.042 ± 0.022 ^b	1.028 ± 0.025 ^b
NM-6	0.661 ± 0.010 ^a	1.090 ± 0.019 ^b	1.215 ± 0.016 ^b
对照组	0.648 ± 0.012 ^a	0.655 ± 0.018 ^a	0.672 ± 0.015 ^a

由表 2 可知, 3 株菌在发酵红豆乳中随着发酵时间的增加其游离氨基氮含量比对照组有明显的增长, 其中菌株 NM-6 的蛋白质分解能力相对较强, 培养 48 h 后其游离氨基氮含量达到 1.215 mmol/L, 比发酵前增加了 83.8%, 由显著性分析可得在发酵 0 h 和 24 h 时的游离氨基氮含量之间差异显著 ($p < 0.05$), 而发酵 24 h 和 48 h 时其游离氨基氮含量之间差异不显著 ($p > 0.05$)。该菌在发酵 24 h 以内的游离氨基氮含量的增量明显高于 24 h 以后阶段, 这说明菌株 NM-6 的蛋白质分解能力主要在发酵前期阶

段呈现。从产酸和蛋白分解能力综合判断,选择菌株 NM-6 作为驯化菌株。

2.2 筛选菌株 NM-6 的驯化

2.2.1 菌株 NM-6 在红豆乳中的适应性 筛选菌株 NM-6 在 LB 培养基和红豆乳不同比例混合培养基中逐级并连续传代驯化结果见表 3。

表 3 菌株 NM-6 在不同比例培养基中 pH 和酸度的驯化值($x \pm sd, n = 6$)

Table 3 The pH and acidity value of strain NM-6 in different taming medium($x \pm sd, n = 6$)

培养基(LB:红豆乳)	pH	总酸度(%)
10:0	4.12 ± 0.02 ^a	0.39 ± 0.03 ^a
8:2	4.24 ± 0.03 ^b	0.32 ± 0.04 ^b
5:5	5.03 ± 0.01 ^c	0.25 ± 0.05 ^{bc}
2:8	5.18 ± 0.02 ^d	0.18 ± 0.02 ^d

注:同列肩标不同小写字母表示差异显著($p < 0.05$),相同字母为差异不显著($p > 0.05$),表 4 同。

从表 3 可以看出当混合培养基 LB:红豆乳 = 1:1 时,总酸度与比例 8:2 的组别无显著性差异($p > 0.05$),且经反复实验结果分析得出在混合培养基(1:1)中驯化效果较好且酸度较稳定,因此后方选择这个比例进行实验。

由表 3 和表 4 可知,菌株 NM-6 在驯化培养基中随着红豆乳比例的增大,其产酸能力总体呈现下降趋势,即豆乳比例越大,总酸度越小。将菌株 NM-6 在混合培养基中进行连续传代驯化后,其产酸能力随着传代次数的增加而增强。驯化第 1 代时的总酸度为 0.25%,传代到第 4 代时的总酸度为 0.42%,传代到第 8 代时的总酸度可达到 0.55%,各组之间呈现出差异显著性($p < 0.05$),到第 8 代时其总酸度比传代前提高约 2 倍并且此时其酸度和 pH 均可达到稳定状态。这说明微生物自身具有高度适应环境的能力,当环境发生变化时,能够在其细胞内各种酶的协助下,迅速进行自我调节,使其形成适应于新环境的代谢系统^[14]。

表 4 菌株 NM-6 在混合培养基中的驯化适应性($x \pm sd, n = 6$)

Table 4 The taming fitness of strain NM-6 in the mixture medium($x \pm sd, n = 6$)

驯化代数	pH	总酸度(%)
1	5.03 ± 0.01 ^a	0.25 ± 0.05 ^a
2	4.62 ± 0.03 ^b	0.33 ± 0.02 ^b
3	4.16 ± 0.02 ^c	0.37 ± 0.03 ^b
4	4.05 ± 0.01 ^d	0.42 ± 0.05 ^c
5	3.85 ± 0.03 ^e	0.48 ± 0.04 ^d
6	3.73 ± 0.02 ^e	0.51 ± 0.02 ^d
7	3.66 ± 0.04 ^{ef}	0.54 ± 0.03 ^{de}
8	3.69 ± 0.03 ^{ef}	0.55 ± 0.05 ^e
9	3.59 ± 0.06 ^f	0.56 ± 0.04 ^e
10	3.62 ± 0.01 ^f	0.55 ± 0.01 ^e

2.2.2 菌株 NM-6 的驯化效果

2.2.2.1 菌株 NM-6 驯化前后产酸能力的变化 驯化前后的菌株 NM-6 在红豆乳中培养时的总酸度含量变化情况如图 2 所示。

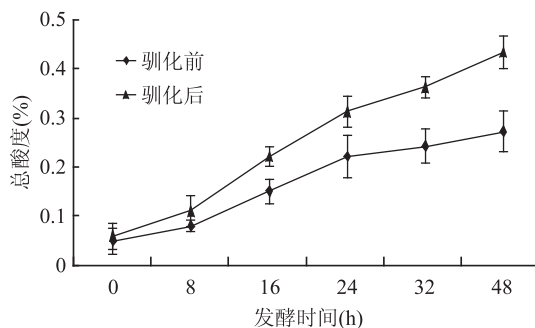


图 2 菌株 NM-6 驯化前后总酸度含量的变化
Fig.2 The total acidity content of strain NM-6 through taming

由图 2 可知,在驯化后,菌株 NM-6 的产酸能力比驯化前均有所提高,在发酵 24 h 时的总酸度为 0.31%,约是原来的 1.4 倍,在 48 h 时的总酸度达到 0.43%,约是原来的约 1.6 倍,这说明菌株 NM-6 对红豆乳的适应性逐渐增强,产酸能力逐渐增大,呈现出良好的生长趋势。该菌株经驯化后可达到发酵酸豆奶所要求的酸度(0.3%~0.5%)^[14]。

2.2.2.2 菌株 NM-6 驯化前后蛋白质分解能力的变化 驯化前后的菌株 NM-6 在红豆乳中培养时的游离氨基酸含量变化情况如图 3 所示。

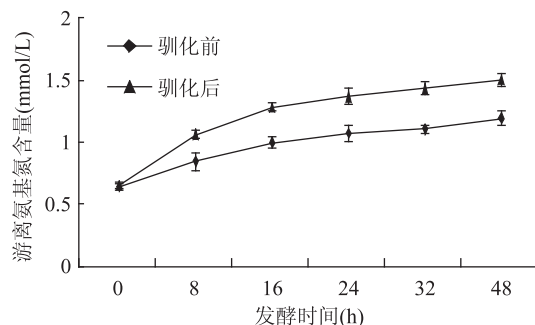


图 3 菌株 NM-6 驯化前后游离氨基酸含量的变化
Fig.3 The free amino nitrogen content of strain NM-6 through taming

由图 3 可知,驯化后菌株 NM-6 在红豆乳培养过程中游离氨基酸的生成能力比驯化前均有所增加,在培养 8 h 时的游离氨基酸含量是 1.084 mmol/L,比驯化前提高了 25.6%,24 h 和 48 h 时的含量分别为 1.302 mmol/L 和 1.387 mmol/L,比驯化前分别提高了 27.2% 和 25.3%。这说明菌株 NM-6 在红豆乳中的蛋白质分解能力在驯化后有所增强,所生成游离氨基酸或功能性短肽类物质的几率增大。

3 结论

实验结果显示,50 株供试乳酸菌经无糖 LB 培养基中初筛以及在红豆乳中复筛后,获得了生长能力、产酸能力和蛋白质分解能力较好的菌株 NM-6,其总酸度和游离氨基酸含量在 37 °C 培养 48 h 时可分别达到了 0.27% 和 1.215 mmol/L,且研究发现该菌的生长对数期出现在 24 h 段内,这样更加有利于缩短发

酵时间,减少成本,有望可以作为无糖发酵红豆乳的生产菌株。

为了使菌株更好的适应红豆乳中的生长,使其在 LB 培养基和红豆乳不同比例的混合培养基中进行驯化。研究发现该乳酸菌在 LB 培养基和红豆乳混合培养基(1:1)中逐级传代的产酸效果和稳定性是最好的,驯化后其总酸度和游离氨基氮含量分别达到了 0.43% 和 1.387 mmol/L,比驯化前分别提高了 59.3% 和 25.3%。在无糖条件下发酵制备的红豆乳其产酸能力和蛋白质分解能力均达到理想的效果,以期今后红豆功能性食品的开发奠定实践基础。

参考文献

- [1] 赵建京,范志红,周威.红小豆保健功能研究进展[J].中国农业科技导报,2009,11(3):46-50.
- [2] Chau C F, Cheung P C K, Wong Y S. Chemical Composition of three Underutilized legume seeds grown in China [J]. Food Chemistry, 1998, 61(4): 505-509.
- [3] 王彤.眉豆、绿豆及赤小豆对餐后血糖影响的研究[J].食品科学,2001,22(5):74-76.
- [4] 孙丽丽,董银卯,李丽,等.红豆生物活性成分及其制备工艺研究进展[J].食品工业科技,2013,34(4):390-392.
- [5] Amarowicz R, Estrella, HernANdez T, et al. Antioxidant activity of extract of adzuki bean and its fractions[J]. Journal of Food Lipids, 2008, 15(1): 119-136.
- [6] 许振伟,臧如瑛,杨新超.酸奶生产菌的筛选以及红豆酸

奶的研制[J].山东食品发酵,2012,165(2):21-26.

- [7] 梁永海,李凤林,庄威.红小豆双歧杆菌发酵保健饮料生产工艺的研究[J].冷饮与速冻食品工业,2005,11(4):18-20.
- [8] 李南薇,李燕杰,朱艺通.凝固型红豆颗粒酸奶的研制[J].中国乳品工业,2011,39(3):62-64.
- [9] 黄高明,张建华.红枣乳酸菌饮料发酵特性的研究[J].农产品加工学刊,2007,121(12):28-30.
- [10] P.M.N IELSEN, D.PETER SE N, C.DA M BM AN N. Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis [J]. Journal of Food Science, 2006, 66(5): 1365-2621.
- [11] Andersson R E, Danielsson G, Hedlund C B, et al. Effect of Heat-resistant Microbial Lipase on Flavor of Ultra-high-temperature Sterilized Milk [J]. J Dairy Sci, 1981, 64: 375-379.
- [12] Jarrett H W, Cooksy K D, Ellis B, et al. The separation of o-phthalaldehyde derivatives of amino acids by reversed-phase chromatography on octylsilica columns [J]. Analytical Biochemistry, 1986, 153(1): 189-198.
- [13] Abdul Kabir Khan Achakzai. Effect of fertilizer, inoculation and sowing time on free amino acids and mineral nitrogen content of field grown mature soybean seeds [J]. Asian Journal of Plant Sciences, 2003, 2(1): 132-141.
- [14] 陈荷凤.酸豆奶生产菌种的驯化研究[J].中国乳品工业,1996,24(3):16-18.
- [15] 赵宇星,周惠明,钱海峰.酸豆乳生产菌种的驯化研究[J].食品科技,2005(11):28-30.

(上接第 185 页)

- cardioprotective effect and the choice of alcoholic beverage [J]. Am J Cardiol, 2000, 85(2): 280-281.
- [9] 林巧,向超,孙小波,等.樱桃果酒的抗氧化性研究[J].酿酒,2009,36(3):72-75.
- [10] Miller, G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. Anal Chem. 1959, 31: 426-428.
- [11] 李超豪,胡强,吴蔚,等.气相色谱法同时测定白酒中的甲醇和乙(己)酸乙酯[J].食品与机械,2013,29(1):81-84,87.
- [12] Velioglu Y S, Mazza G, Gao L, et al. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruit, vegetables and grain products [J]. J Agric Food Chem, 1998, (46): 4113-4117.
- [13] Arvouet - Grand A, Vennat B, Pourrant A, et al. Standardization of propolis extract and identification of principal constituents [J]. J Pharm. Belg, 1994, 49: 462-468.
- [14] Giusti M M, Wrolstad R E. Characterization of Red Radish Anthocyanins [J]. J Food Sci, 1996, 61(2): 322-326.
- [15] 李丽,李昌宝,邓海燕,等.广西桑葚果汁营养成分及抗氧化活性分析[J].南方农业学报,2012,43(9):1378-1381.
- [16] 徐辉艳,濮智颖,王汉屏,等.桑葚果醋发酵工艺条件的研究[J].食品工业科技,2009,30(2):164-165.
- [17] 郭卫芸,马兆瑞,杨公明,等.桑葚发酵酒的工艺研究[J].酿酒,2005,32(1):80-82.

- [18] 耿红玲,陈宜君.干白桑椹酒发酵工艺的研究[J].酿酒,2013,40(3):72-75.
- [19] 张文娜,张立杰,俞龙泉,等.桑葚果汁的抗氧化活性研究[J].农产品加工学刊,2011,253(8):62-64.
- [20] Patrasa A, Bruntona N P, O' Donnell B, et al. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation [J]. Trend Food Sci Tech, 2010, 21: 3-11.
- [21] 王晓宇,杜国荣,李华.抗氧化能力的体外测定方法研究进展[J].食品与生物技术学报,2012,31(3):247-252.
- [22] Lou H, Hu Y, Zhang L, et al. Nondestructive evaluation of the changes of total flavonoid, total phenols, ABTS and DPPH radical scavenging activities, and sugars during mulberry (*Morus alba* L.) fruits development by chlorophyll fluorescence and RGB intensity values. Food Sci Technol—Leb, 2012, 47: 19-24.
- [23] Hur S J, Lee S Y, Kim Y C, et al. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods [J]. Food Chem, 2014, 160: 346-356.
- [24] 王会,周燕.筛选和表征抗氧化剂的方法——ABTS法[J].广州化工,2012,40(22):41-43.
- [25] Kriengsak T, Unaraj B, Kevin C. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts [J]. J Food Compos Anal, 2006, 16: 669-675.