

干酪乳杆菌LK-1的发酵特性及其在菠萝果汁中的应用

杨 莲, 彭芍丹, 马俊杰, 章程辉, 吴 广, 黄晓兵, 李积华, 廖良坤

Fermentation Characteristics of *Lactobacillus casei* LK-1 and Its Application in Pineapple Juice

YANG Lian, PENG Shaodan, MA Junjie, ZHANG Chenghui, WU Guang, HUANG Xiaobing, LI Jihua, and LIAO Liangkun

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023030140>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

酶解-发酵法制备鱼鲜汁的工艺优化

Optimization of Enzymatic Hydrolysis-Fermentation Process for Preparing Fish Juice

食品工业科技. 2021, 42(22): 185-192 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021030160>

复合益生菌协同发酵葡萄汁菌种筛选与工艺优化

Screening of Probiotic Strains and Process Optimization for Synergistic Fermentation of Grape Juice

食品工业科技. 2020, 41(13): 122-127 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.13.020>

适于南瓜汁原料益生菌的分离鉴定及发酵工艺优化

Isolation, Identification and Fermentation Process Optimization of Probiotics for Pumpkin Juice

食品工业科技. 2020, 41(17): 91-97 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.17.015>

植物乳杆菌发酵黑果腺肋花楸果汁的工艺优化

Optimization of Fermentation Process of *Aronia melanocarpa* Fruit Juice by *Lactobacillus plantarum*

食品工业科技. 2018, 39(17): 133-138, 151 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.17.023>

无机硒在干酪乳杆菌和啤酒酵母混合发酵过程中的相互作用

Interaction of Inorganic Selenium in the Mixed Fermentation Process of *Lactobacillus casei* and *Saccharomyces cerevisiae*

食品工业科技. 2019, 40(10): 164-167, 173 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.10.027>

纳豆发酵猪肉脯的工艺优化

Processing Optimization of Fermented Dried Meat Slice with Natto

食品工业科技. 2021, 42(21): 231-240 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021060195>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

杨莲, 彭芍丹, 马俊杰, 等. 干酪乳杆菌 LK-1 的发酵特性及其在菠萝果汁中的应用 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(1): 199–207. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030140

YANG Lian, PENG Shaodan, MA Junjie, et al. Fermentation Characteristics of *Lactobacillus casei* LK-1 and Its Application in Pineapple Juice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(1): 199–207. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030140

· 工艺技术 ·

干酪乳杆菌 LK-1 的发酵特性及其在菠萝果汁中的应用

杨 莲^{1,2}, 彭芍丹^{2,*}, 马俊杰^{2,3}, 章程辉¹, 吴 广^{2,4}, 黄晓兵², 李积华², 廖良坤²

(1. 海南大学食品科学与工程学院, 海南海口 570228;

2. 中国热带农业科学院农产品加工研究所, 农业农村部热带作物产品加工重点实验室,
海南省果蔬贮藏与加工重点实验室, 广东湛江 524001;

3. 云南农业大学热带作物学院, 云南普洱 665000;

4. 华中农业大学食品科学技术学院, 湖北武汉 430070)

摘 要: 为利用干酪乳杆菌制备发酵菠萝果汁饮品, 本研究对干酪乳杆菌 LK-1 (*Lactobacillus casei* LK-1, *L. casei* LK-1) 的生长曲线、产酸、耐酸和耐糖等特性进行研究分析, 并以活菌数和总酸为指标, 通过单因素实验及响应面法考察 *L. casei* LK-1 发酵菠萝果汁的最佳条件。结果表明, *L. casei* LK-1 在 pH5~7 和 0%~10% 质量分数葡萄糖环境下, 具备良好的生长繁殖能力; 在酸性 (pH3) 和高糖 (40% 质量分数葡萄糖) 环境中培养 3 h, 其存活率分别为 76% 和 71%; 在 MRS 培养基中培养 48 h, 产酸量为 5.35 g/kg, 产酸能力良好, 适用于果汁的发酵。 *L. casei* LK-1 发酵菠萝果汁的最佳条件为: 初始 pH6.8, 发酵温度 37 °C, 接种量 1% (v/v), 发酵时间 30 h, 此条件下制备的发酵菠萝果汁饮品活菌数为 8.99 ± 0.04 lg CFU/mL, 总酸含量为 7.16 ± 0.26 g/kg, 且色泽鲜亮, 酸甜适口, 风味较好, 为 *L. casei* LK-1 在发酵食品中的进一步应用提供了理论和技术依据。

关键词: 干酪乳杆菌 LK-1, 菠萝果汁, 发酵, 工艺优化

中图分类号: TS251.6

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2024)01-0199-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030140

本文网刊:



Fermentation Characteristics of *Lactobacillus casei* LK-1 and Its Application in Pineapple Juice

YANG Lian^{1,2}, PENG Shaodan^{2,*}, MA Junjie^{2,3}, ZHANG Chenghui¹, WU Guang^{2,4}, HUANG Xiaobing²,
LI Jihua², LIAO Liangkun²

(1. School of Food Science and Engineering, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. Agricultural Products Processing Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Key Laboratory of Tropical Crop Products Processing of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Hainan Key Laboratory of Storage & Processing of Fruits and Vegetables, Zhanjiang 524001, China;

3. College of Tropical Crops, Yunnan Agricultural University, Pu'er 665000, China;

4. College of Food Science & Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: In order to utilize *Lactobacillus casei* to prepare fermented pineapple juice beverage, the growth curve, acid production, acid tolerance, and sugar tolerance characteristics of *Lactobacillus casei* LK-1 (*L. casei* LK-1) were investigated and analyzed in this research. Moreover, the optimal conditions for the fermentation of pineapple juice by *L. casei* LK-1

收稿日期: 2023-03-13

基金项目: 海南省自然科学基金 (321QN0926); 广东省科技专项资金项目 (2021A05208; 2021A05211)。

作者简介: 杨莲 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 农产品加工, E-mail: 937755104@qq.com。

* 通信作者: 彭芍丹 (1989-), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 农产品加工, E-mail: peony@catas.cn。

were explored by single-factor test and response surface methodology, with the viable cell count and total acid content as indicators. As revealed by the results, *L. casei* LK-1 grew and reproduced well in an environment with pH5~7 or containing 0% to 10% glucose. The survival rates of it were 76% and 71%, respectively, after 3 h of incubation in an acidic (pH3) or high sugar (40% glucose) environment. Besides, after 48 h incubation in MRS medium, its acid production was 5.35 g/kg, which was good for the fermentation of the juice. The optimal conditions for fermenting pineapple juice with *L. casei* LK-1 were: Initial pH of 6.8, fermentation temperature of 37 °C, inoculum level of 1% (v/v), as well as fermentation time of 30 h. Under this preparation condition, the viable cell count of fermented pineapple juice was 8.99 ± 0.04 lg CFU/mL, the total acid content was 7.16 ± 0.26 g/kg, and the juice was bright in color, sweet and sour with excellent flavor. The results of this research can provide a theoretical and technical basis for the further application of *L. casei* LK-1 in fermented foods.

Key words: *Lactobacillus casei* LK-1; pineapple juice; fermentation; process optimization

益生菌是指摄入一定数量后可对宿主产生有益作用的活性微生物,其已被普遍公认为有助于调节肠道菌群和维持肠道健康^[1-2]。目前益生菌在乳制品、果蔬发酵及肉类发酵等方面均有较多的应用和研究。采用果蔬汁制备益生菌发酵产品,不仅为益生菌的生长繁殖提供所需的基本物质,还可通过发酵提高果蔬汁的品质,满足不同人群对营养健康的需求^[3-4]。干酪乳杆菌是研究和应用较多的益生菌之一,其因益生特性而闻名,常用于食品发酵或辅助发酵以改善食品特性^[5-6]。研究证实,采用干酪乳杆菌发酵果蔬汁可产生多种有益作用,如提高果蔬抗氧化能力和活性成分^[7]、延长果蔬贮藏期^[8]、增强果蔬生理功效以及改善果蔬风味等^[9-10],可有效改善和提高产品品质。

菠萝(*Ananas comosus*(L.)Merrill),又名凤梨,是我国主要的热带水果之一,其富含维生素C、碳水化合物、有机酸、酚类物质以及蛋白酶等营养和活性成分,具有促进脂肪代谢、抗炎、增强免疫力等多种生理功效^[11-12]。目前,我国菠萝以鲜售为主,其加工产品多为罐头、果干、果酱等,产品形式单一,附加值低,高值功能性产品较缺乏,有必要进一步丰富菠萝产品品类,拓宽菠萝产业链条。菠萝果汁营养丰富,可为微生物生长繁殖及代谢提供所需营养物质,适合开发发酵果汁饮品。目前已有研究人员采用植物乳杆菌、嗜酸乳杆菌以及酵母菌等作为发酵剂制备益生菌发酵菠萝果汁。李伊娜等^[13]研究发现,干酪乳杆菌或植物乳杆菌单独发酵可获得品质较好的发酵菠萝浆。NGUYEN等^[14]采用嗜酸乳杆菌,植物乳杆菌以及乳酸双歧杆菌等乳酸菌发酵菠萝果汁,并获得品质较好的益生菌饮品。赵治巧等^[15]采用酵母菌和植物乳杆菌发酵菠萝果实后获得营养丰富的菠萝酵素。就目前研究来看,已有较多的益生菌被应用于菠萝果汁发酵,但利用干酪乳杆菌发酵菠萝果汁的研究较少,尤其是系统性地探究干酪乳杆菌在菠萝果汁中的发酵条件。发酵条件对获得高活菌数和高品质的益生菌发酵饮品至关重要。

干酪乳杆菌 LK-1(*Lactobacillus casei* LK-1, *L. casei* LK-1)是实验室前期从传统发酵泡菜中筛选出的优质菌株,其在火龙果果汁发酵中展现了优质的发酵性能^[16]。为进一步探究 *L. casei* LK-1 在其他果蔬汁中的发酵能力,对 *L. casei* LK-1 的生长曲线、产

酸、耐酸和耐糖等特性进行研究分析,并将其应用于菠萝果汁的发酵。通过单因素实验和响应面法确定 *L. casei* LK-1 在菠萝果汁中发酵的最佳工艺,并对在最佳工艺下获得的发酵菠萝果汁饮品进行感官评价,为 *L. casei* LK-1 在发酵食品中的进一步应用提供理论基础和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

干酪乳杆菌 LK-1(*Lactobacillus casei* LK-1)从传统发酵泡菜中筛选分离得到,保藏于中国热带农业科学院农产品加工研究所实验室^[16];佳果源 100%NFC 菠萝果汁 市购,其基本营养信息可见表 1;MRS 肉汤培养基 广东环凯微生物科技有限公司;0.1 mol/L 氢氧化钠标准滴定溶液 山东惠普化学科技有限公司;NaCl、葡萄糖 西陇科学股份有限公司;食用纯碱 湖南海联三一小苏打有限公司。

表 1 NFC 菠萝果汁基本营养成分
Table 1 NFC pineapple juice essential nutrients

项目	含量(g/100 mL)
蛋白质	0
脂肪	0
碳水化合物	12.3
钠	0

M8 型紫外分光光度计 上海美谱达仪器有限公司;HJ-CJ-2D 型双人净化工作台 上海苏净实业有限公司;PHS-3C pH 计 上海仪电科学仪器股份有限公司;HG-50 全自动高压蒸汽灭菌锅 日本 hirayama 公司;LRH-250A 生化培养箱 广东泰宏君科学仪器股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 *L. casei* LK-1 的生长特性

1.2.1.1 *L. casei* LK-1 生长曲线测定 将甘油保藏的 *L. casei* LK-1 按 1%(v/v)接种量接入 MRS 肉汤培养基中,在 37 °C 培养箱中静置培养 24 h,在培养 0~4 h 期间每隔 1 h 取样,4~24 h 期间每隔 2 h 取样,采用紫外分光光度计在 600 nm 波长处测定其吸光值 OD_{600 nm}。

1.2.1.2 *L. casei* LK-1 在酸性和高糖环境下的生长

及耐性测定 将甘油保存的 *L. casei* LK-1 按 1% (v/v)接种量接入 MRS 肉汤培养基,在 37 ℃ 培养箱中静置培养 8 h 后获得活化的发酵液,按 5%(v/v)接种量分别接种于不同 pH(3、4、5、6、7)和添加了不同质量分数葡萄糖(0%、10%、20%、30%、40%)的 MRS 肉汤培养基,置于 37 ℃ 下培养 24 h,每隔 2 h 取样测定 OD_{600 nm},并于第 0、3、14、24 h 分别取样测定活菌数,按式(1)计算样品中菌株的存活率:

$$\text{存活率}(\%) = \frac{N_t}{N_0} \times 100$$

式 (1)

式中: N₀ 表示第 0 h 的活菌数,CFU/mL; N_t 表示培养第 t h 的活菌数,CFU/mL。

1.2.2 *L. casei* LK-1 产酸测定 将按 1.2.1.2 活化的发酵液以 5%(v/v)接种量接入 MRS 肉汤培养基中,37 ℃ 静置培养 48 h,每隔 6 h 取样,测定其 pH 和总酸含量。

1.2.3 菠萝果汁发酵工艺优化

1.2.3.1 单因素实验设计 以菠萝果汁初始 pH、发酵温度、接种量和发酵时间作为实验因素,考察其对发酵菠萝果汁中活菌数及总酸含量的影响。具体操作为:在接种量 1%、发酵温度和时间均为 37 ℃ 和 24 h 的条件下,考察菠萝果汁初始 pH(4.7、5.7、6.7、7.7)对发酵菠萝果汁中活菌数和总酸含量的影响;在菠萝果汁初始 pH 为 6.7、接种量 1%、发酵时间 24 h 条件下,考察发酵温度(26、32、37、42 ℃)对发酵菠萝果汁中活菌数和总酸含量的影响;在菠萝果汁初始 pH 为 6.7、发酵温度和时间均为 37 ℃ 和 24 h 条件下,考察接种量(0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%)对发酵菠萝果汁中活菌数和总酸含量的影响;在初始 pH 为 6.7、发酵温度 37 ℃ 和接种量 1% 的条件下,考察发酵时间(0、6、12、24、36、48 h)对发酵菠萝果汁中活菌数和总酸含量的影响。实验中使用食用纯碱调节菠萝果汁 pH,并将其置于 90 ℃ 下水浴 10 min 进行灭菌,待冷却至室温后再接菌。

1.2.3.2 响应面试验设计 在单因素实验确定的因素水平下,对各实验因素进行响应面试验,以总酸含量为响应值,利用 Design-expert 8.0.6 软件进行试验设计(表 2)。

表 2 菠萝果汁发酵工艺优化的试验因素与水平
Table 2 Factors and levels for the optimization of the pineapple juice fermentation process

水平	因素			
	A初始pH	B发酵温度(℃)	C接种量(%)	D发酵时间(h)
-1	5.7	32	0.5	12
0	6.7	37	1	24
1	7.7	42	1.5	36

1.2.4 感官评价 由 10 个经过感官培训的学生和老师(男:女=1:1)组成感官评价小组,对常温下的 NFC 菠萝果汁,发酵前菠萝果汁(pH 调至 6.8,并在 90 ℃

下水浴 10 min),发酵后菠萝果汁进行评分,去掉最高和最低分后取平均值作为最终评分结果^[17],感官评定标准见表 3。

表 3 感官评定标准
Table 3 Sensory evaluation standards

评分项目	评分标准	得分(分)
色泽(20分)	色泽鲜亮,亮黄色	15~20
	色泽稍暗,淡黄色	10~14
	色泽暗淡,黄色过深或过浅	0~9
香气(20分)	菠萝香味浓郁,风味好,无异味	15~20
	菠萝香味较淡,风味较好,无异味	10~14
	菠萝香味寡淡、风味较差或有轻微异味	0~9
口感(40分)	酸甜适口,柔和适宜,口感细腻均匀	25~40
	酸甜较为和谐,无明显粗糙口感	10~24
	酸甜比例不协调,过酸或过甜,口感粗糙	0~9
组织形态(20分)	组织形态均匀,无分层现象	15~20
	组织形态较均匀,有轻微分层现象	10~14
	组织形态不均匀,有明显分层现象	0~9

1.2.5 指标测定 活菌数的测定参照 GB 4789.35-2016《食品微生物学检验乳酸菌检验》^[18];总酸的测定参照 GB/T 12456-2021《食品中总酸的测定》^[19],以乳酸计;pH 采用 pH 计测定。

1.3 数据处理

每个实验均重复 3 次,实验数据经 Excel 2010 初步分析整理后,采用 Origin Pro 8.0 对数据进行分析 and 作图;采用 Design-Expert 8.0.6 软件对响应面试验设计结果进行分析和作图。实验数据采用单因素方差分析,*P*<0.05 表示统计学差异显著,*P*>0.05 表示统计学差异不显著。

2 结果与分析

2.1 *L. casei* LK-1 的生长特性

2.1.1 生长曲线 由图 1 可知,0~3 h 为 *L. casei* LK-1 的延滞期,3~8 h 为对数生长期,8 h 后进入稳定期。*L. casei* LK-1 仅需 5 h 左右即可从对数生长期进入稳定期,表明菌株生长繁殖速度较快。快速的生长速度是工业化菌株的要求之一^[20],本研究菌株 *L. casei*

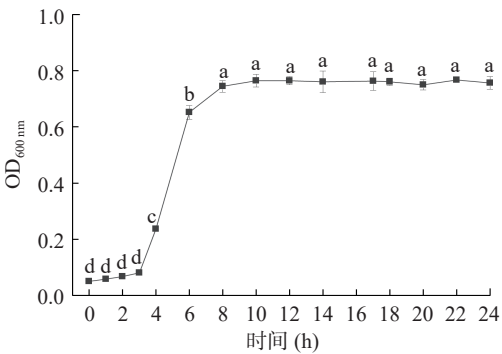


图 1 *L. casei* LK-1 的生长曲线

Fig.1 Growth curve of *L. casei* LK-1

注:同一条曲线上不同字母表示其统计学差异显著(*P*<0.05);图 7~图 10 同。

LK-1 具备应用于工业生产的潜力。由于发酵 8 h 处于 *L. casei* LK-1 的对数生长末期和稳定期初期,不仅具有高活菌数,而且菌株生长繁殖能力较强,因此选择发酵 8 h 作为该菌株的最佳接种时间。

2.1.2 在酸性环境下的生长及耐性 大多果蔬汁偏酸性,且乳酸菌在生长繁殖过程中会产生大量的有机酸导致 pH 的持续降低^[21],用于果蔬发酵的菌株需要在酸性环境下具备较好的生长繁殖能力和耐受性。同时,优良益生菌也需具备良好的酸耐受性,才能在胃肠道运输期间保有足够的活菌数^[22],确保有效地发挥其益生功效。*L. casei* LK-1 在酸性条件下生长和耐受情况如图 2 和图 3 所示,随 pH 的上升,*L. casei* LK-1 的生长繁殖能力逐渐增强。在 pH5~7 环境下,*L. casei* LK-1 能够保持良好的生长繁殖,当 pH ≤ 4 时,菌株的生长繁殖被抑制甚至造成菌株的死亡,表明该菌株更适于弱酸性至中性环境下生长。与王帅静等^[20]从西藏牦牛粪和乳源分离筛选出的乳酸菌在酸性环境的生长状况一致,均表现出低 pH 环境下的弱生长能力,可能是由于低 pH 环境引起菌株细胞膜的电荷变化,进而影响细胞膜对营养物质的吸收代谢以及酶活性^[23],导致菌株的生长繁殖受到抑制。在 pH3 环境下能否存活是衡量菌株酸耐受性的标准之一^[24],相对于 0 h (7.65±0.05 lg CFU/mL),*L. casei* LK-1 暴露在 pH3 环境下 3 h 时具有较高的活菌数,为 7.53±0.02 lg CFU/mL,对应的存活率为 76%,与徐小轻^[25]研究的干酪乳杆菌 NA-2 在 pH2~4 条件

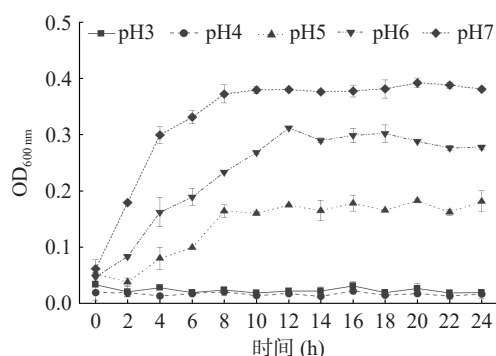


图 2 *L. casei* LK-1 在不同 pH 条件下的生长曲线

Fig.2 Growth curve of *L. casei* LK-1 in different pH conditions

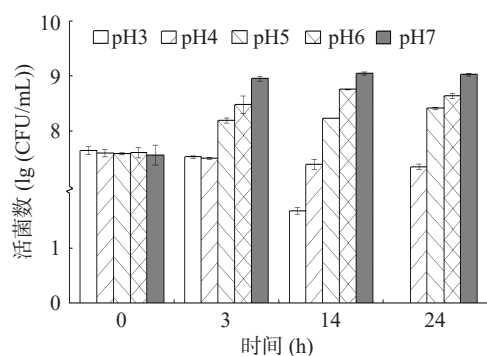


图 3 *L. casei* LK-1 在不同 pH 条件下的活菌数

Fig.3 Viable cell counts of *L. casei* LK-1 in different pH conditions

下存活率相近,表明 *L. casei* LK-1 在短时间内具有较好的酸耐受性。干酪乳杆菌对酸性环境的耐受性,可能与其相关应激蛋白的大量表达有关^[26]。

2.1.3 在高糖环境下的生长及耐性 由图 4 和图 5 可知,随葡萄糖质量分数的增大,OD_{600 nm} 和活菌数逐渐降低,说明 *L. casei* LK-1 受到的抑制作用逐渐增强,对比焦媛媛等^[27]研究也有一致的结果。在葡萄糖质量分数为 10% 环境下培养 24 h 后活菌数可达 8.72±0.02 lg CFU/mL,而对照组(0%)为 8.79±0.05 lg CFU/mL,表明糖添加量在 10% 以下时,对 *L. casei* LK-1 的生长繁殖影响较小。当葡萄糖质量分数 ≥ 20% 时,对菌株的生长繁殖抑制作用较强。当葡萄糖质量分数为 40% 时,相对于 0 h (7.67±0.03 lg CFU/mL),培养 3、14 和 24 h 后可维持较高的活菌数,分别为 7.52±0.03、7.44±0.01 和 7.28±0.13 lg CFU/mL,对应的存活率分别为 71%、59%、41%,表明 *L. casei* LK-1 可在高糖环境中长时间存活,展现了较强的耐糖能力。综上结果,*L. casei* LK-1 在一定的糖浓度下可保持较好的生长繁殖能力,并在高糖环境下具有良好的耐受性,具备用于较高糖果汁发酵的潜力。

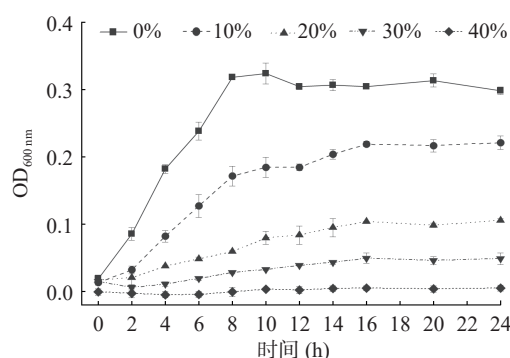


图 4 *L. casei* LK-1 在不同质量分数葡萄糖条件下的生长曲线

Fig.4 Growth curve of *L. casei* LK-1 under different mass fractions of glucose

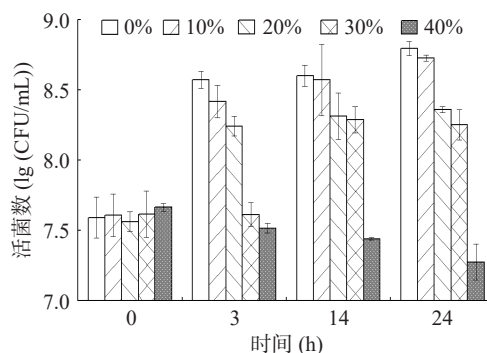


图 5 *L. casei* LK-1 在不同质量分数葡萄糖条件下的活菌数

Fig.5 Viable cell counts of *L. casei* LK-1 under different mass fractions of glucose

2.2 *L. casei* LK-1 的产酸特性

菌株的产酸能力是其作为发酵剂的重要指标^[28-29]。由图 6 看出,在培养 0~12 h 期间,pH 快速下降,总酸含量迅速增加,该时期对应于 *L. casei* LK-

1 的对数生长期,菌株快速的繁殖加快了对基质中碳水化合物的利用和代谢,产生大量的有机酸,从而导致 pH 的快速下降和总酸的迅速升高。在培养 12 h 后, pH 先缓慢降低后趋于稳定,总酸先缓慢增加后趋于稳定, pH 最低为 4.28,总酸含量最高可达 9.46 ± 0.12 g/kg,相对于发酵前(总酸含量 4.11 ± 0.11 g/kg),总酸产量为 5.35 g/kg。结果表明, *L. casei* LK-1 的产酸速度较快,具备较好的产酸能力。

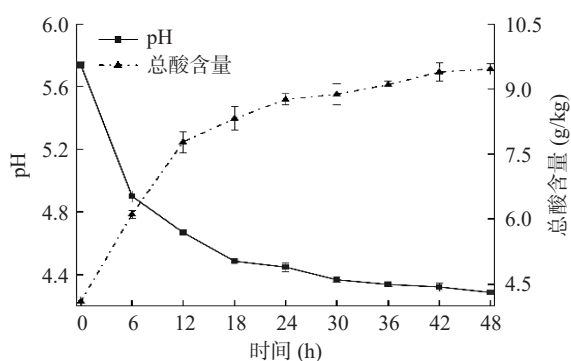


图 6 *L. casei* LK-1 在 MRS 培养基中的产酸曲线

Fig.6 Acid-producing curve of *L. casei* LK-1 in MRS medium

2.3 菠萝果汁发酵工艺优化

2.3.1 菠萝果汁初始 pH 对活菌数和总酸的影响

pH 会影响菌株在食品中的生长繁殖和代谢^[30]。总酸含量是衡量发酵程度的重要指标,其高低可反映发酵菌株的产酸情况,且会直接影响产品的感官品质和保质期^[31]。如图 7 所示,菠萝果汁初始 pH 在 4.7~7.7 范围内,发酵后果汁的总酸含量变化不显著($P>0.05$)。菠萝果汁的初始 pH 越大,其发酵前的总酸含量则越少,当发酵 24 h 后,总酸含量无显著性差异,表明随着 pH 的增大, *L. casei* LK-1 的产酸量逐渐增加。同时,活菌数随初始 pH 的增大也逐渐增加。推测可能是 pH 过低时,导致细胞膜生物功能发生改变和胞内酶活性降低,影响了菌株的代谢以及胞内外物质的进出,使得菌株的生长繁殖和产酸减缓。由图 7 可知,菠萝果汁初始 pH 为 5.7~7.7 时,较适宜于发酵菌株的产酸和生长繁殖,故选取初始 pH 5.7、6.7、7.7 进行响应面实验。

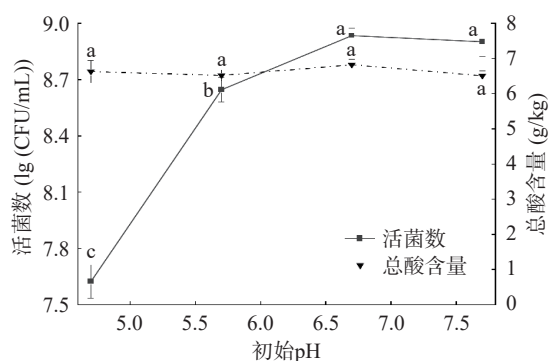


图 7 初始 pH 对发酵菠萝果汁中活菌数和总酸的影响

Fig.7 Effect of the initial pH on viable cell count and total acid in fermented pineapple juice

2.3.2 发酵温度对活菌数和总酸的影响 温度会通过影响生物大分子的结构和功能以及酶的活性等来影响菌株的生长繁殖、代谢物产量以及产品的酸度和风味^[32]。如图 8 所示,在发酵温度为 26~42 °C 范围内,发酵菠萝果汁中活菌数差异不显著($P>0.05$),表明该温度范围均可适宜于 *L. casei* LK-1 的生长繁殖。在产酸方面,发酵温度为 37 °C 时, *L. casei* LK-1 具有最高的产酸量,菠萝果汁中总酸含量由发酵前 0.72 g/kg 增加至 7.08 g/kg。当发酵温度低于或高于 37 °C 时,可能影响了菌株胞内酶的活性,导致代谢缓慢、产酸减少,因此发酵菠萝果汁的总酸含量处在较低水平。由图 8 可知,发酵温度为 32~42 °C 时,发酵菠萝果汁中活菌数和总酸含量较适宜,故选择 32、37 和 42 °C 进行响应面实验。

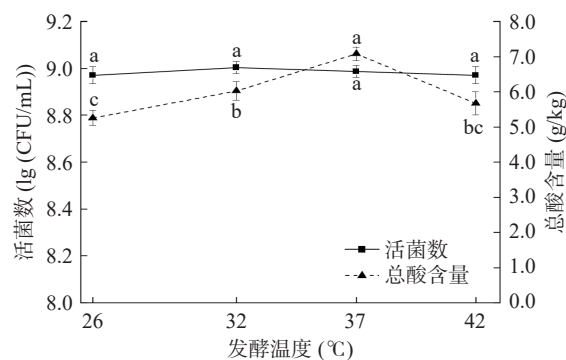


图 8 发酵温度对发酵菠萝果汁中活菌数和总酸的影响

Fig.8 Effect of fermentation temperature on viable cell count and total acid in fermented pineapple juice

2.3.3 接种量对活菌数和总酸的影响 如图 9 所示,在接种量 0.5%~2.5% 的范围内,发酵菠萝果汁中活菌数变化不显著($P>0.05$),但接种量从 0.5% 增加至 1% 时,其总酸含量由 5.78 ± 0.13 g/kg 显著增加至 6.95 ± 0.21 g/kg ($P<0.05$);当接种量继续升至 2.5% 时,发酵菠萝果汁中总酸含量呈现下降趋势,但不显著($P>0.05$)。接种量过低时,菌株初始基数小,菌株的生长空间相对较大,发酵速率慢,导致同发酵时间内产酸量少,发酵不充分^[33],随接种量的增加,菌株发酵速率增加,可在短时间内产生大量的乳酸,导致总

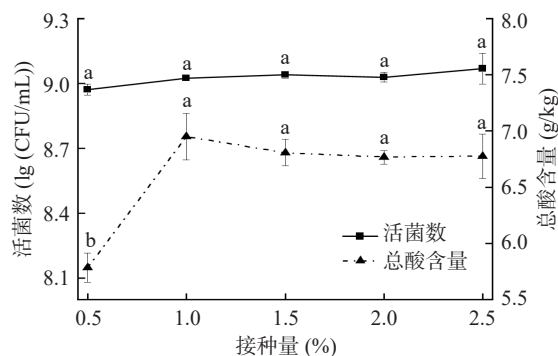


图 9 接种量对发酵菠萝果汁中活菌数和总酸的影响

Fig.9 Effect of inoculation amount on viable cell count and total acid in fermented pineapple juice

酸含量增加。由图 9 可知,接种量为 0.5%~1.5% 时,发酵菠萝果汁中活菌数和总酸含量较高,故选取 0.5%、1%、1.5% 接种量进行响应面实验。

2.3.4 发酵时间对活菌数和总酸的影响 由图 10 可知,随着发酵时间的增加,发酵菠萝果汁中活菌数先增加,后趋于稳定,最后逐渐降低。相对于 0 h,发酵 6 h 后活菌数显著增加($P<0.05$);发酵 12~24 h 期间活菌数无显著变化($P>0.05$),但显著高于发酵 6 h 时活菌数($P<0.05$);发酵 24 h 后活菌数显著下降($P<0.05$),在发酵 36 h 和 48 h 时,活菌数分别为 8.90 ± 0.03 lg CFU/mL 和 8.79 ± 0.04 lg CFU/mL。总酸含量在发酵前 24 h 内迅速上升,但在发酵 24 h 后无显著变化($P>0.05$)。推测是由于发酵时间过短时,发酵菌株处于自身繁殖阶段,代谢物质较少,随着发酵时间延长,代谢物质乳酸等的积累,使产品总酸含量逐渐增加。由图 10 可知,发酵时间为 24 h 时,发酵菠萝果汁具有较高的活菌数和总酸含量,分别为 9.03 ± 0.02 lg CFU/mL 和 6.83 ± 0.17 g/kg,故选取发酵时间 12、24 和 36 h 进行响应面实验。

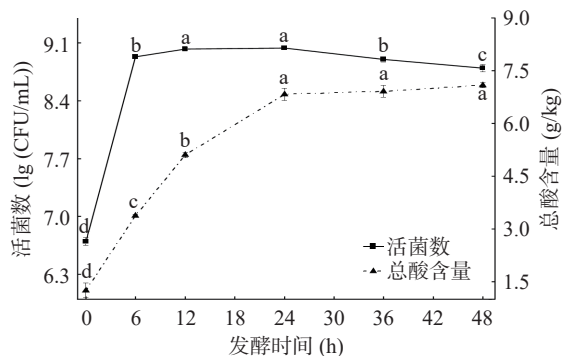


图 10 发酵时间对发酵菠萝果汁中活菌数和总酸的影响
Fig.10 Effect of fermentation time on viable cell count and total acid in fermented pineapple juice

2.4 响应面优化试验结果

运用 Design-Expert 8.0.6 软件对表 4 中总酸含量进行拟合,得到回归方程为: $Y=6.99+0.056A+0.23B+0.22C+0.82D-0.06AB-0.12AC+0.15AD+0.075BC-0.30BD+0.11CD-0.17A^2-0.860B^2-0.52C^2-0.82D^2$,对上述回归方程进行方差分析,结果见表 5。

由表 5 方差分析可知,所建模型 P 值 <0.0001 、 F 值为 27.98、 $R^2=0.97$ 以及失拟误差 ($P=0.3121>0.05$) 不显著,表明该方程模型拟合度较好,可用来反映初始 pH、发酵温度、接种量和发酵时间对总酸含量的影响。结果表明,4 个因素中对发酵菠萝果汁总酸含量影响大小为发酵时间>发酵温度>接种量>初始 pH。其中,发酵时间、发酵温度、接种量的一次项和二次项均对总酸含量有极显著性影响($P<0.01$),而初始 pH 的一次项和二次项均对总酸含量无显著性影响($P>0.05$);发酵时间和发酵温度的交互项对发酵菠萝果汁的总酸含量有影响显著($P<0.05$),其余交互项不显著($P>0.05$)。

表 4 菠萝果汁发酵工艺优化响应面实验设计方案和结果

Table 4 Design scheme and results of response surface experiment for optimization of pineapple juice fermentation process

试验号	A	B	C	D	Y: 总酸含量(g/kg)
1	-1	-1	0	0	5.44
2	1	-1	0	0	6.02
3	-1	1	0	0	5.93
4	1	1	0	0	6.27
5	0	0	-1	-1	4.69
6	0	0	1	-1	5.07
7	0	0	-1	1	5.91
8	0	0	1	1	6.72
9	-1	0	0	-1	5.43
10	1	0	0	-1	5.04
11	-1	0	0	1	6.69
12	1	0	0	1	6.90
13	0	-1	-1	0	5.12
14	0	1	-1	0	5.75
15	0	-1	1	0	5.35
16	0	1	1	0	6.28
17	-1	0	-1	0	6.08
18	1	0	-1	0	6.28
19	-1	0	1	0	6.64
20	1	0	1	0	6.37
21	0	-1	0	-1	3.97
22	0	1	0	-1	4.82
23	0	-1	0	1	6.47
24	0	1	0	1	6.12
25	0	0	0	0	6.89
26	0	0	0	0	7.09
27	0	0	0	0	7.24
28	0	0	0	0	6.80
29	0	0	0	0	6.94

表 5 响应面实验结果方差分析

Table 5 Variance analysis of response surface methodology results

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	18.14	14	1.30	27.98	<0.0001	显著
A-初始pH	0.037	1	0.037	0.81	0.3840	
B-发酵温度	0.65	1	0.65	14.11	0.0021	**
C-接种量	0.56	1	0.56	12.16	0.0036	**
D-发酵时间	7.99	1	7.99	172.46	<0.0001	**
AB	0.014	1	0.014	0.31	0.5859	
AC	0.055	1	0.055	1.19	0.2933	
AD	0.090	1	0.090	1.94	0.1850	
BC	0.022	1	0.023	0.49	0.4972	
BD	0.36	1	0.36	7.77	0.0145	*
CD	0.046	1	0.046	1.00	0.3347	
A ²	0.18	1	0.18	3.88	0.0690	
B ²	4.80	1	4.80	103.63	<0.0001	**
C ²	1.76	1	1.76	37.90	<0.0001	**
D ²	4.40	1	4.40	95.08	<0.0001	**
残差	0.65	14	0.046			
失拟误差	0.53	10	0.053	1.74	0.3121	不显著
纯误差	0.12	4	0.030			
总和	18.79	28				

注: *表示显著($P<0.05$), **表示极显著($P<0.01$)。

各试验因素以及两两交互作用对总酸含量影响的响应面曲线如图 11 所示。由响应曲面的陡峭程

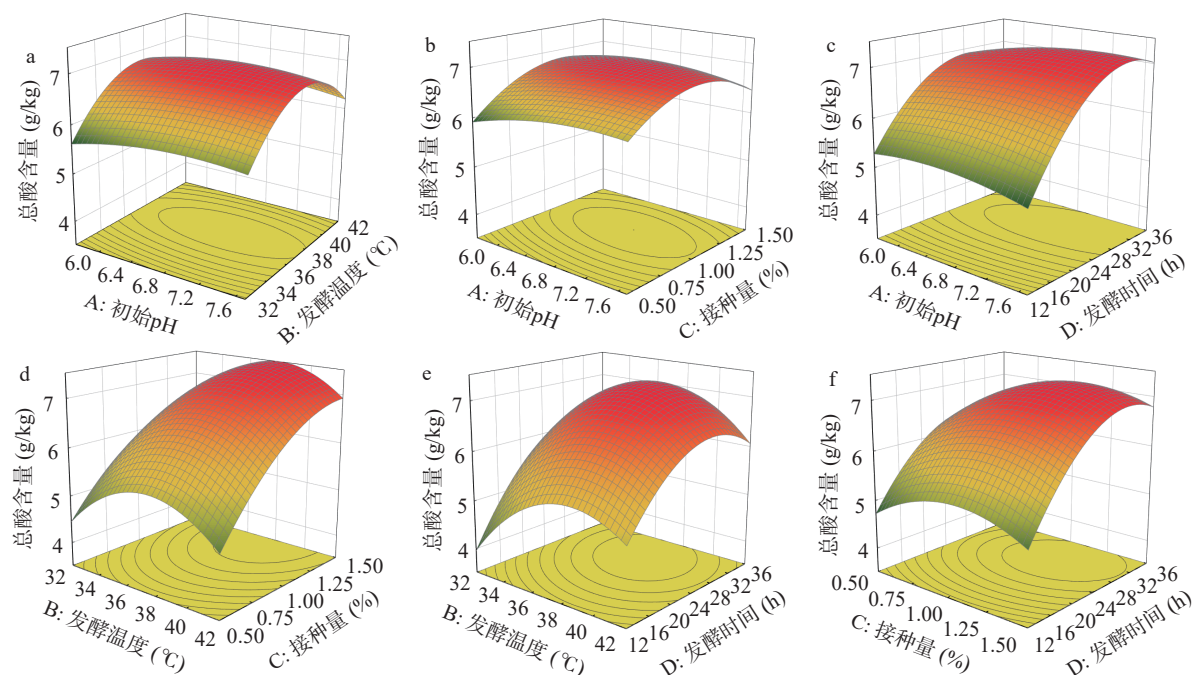


图 11 各因素交互作用对总酸含量影响的响应面图

Fig.11 Response surface of the interaction of various factors to the effect of total acid content

度来看,除发酵温度与发酵时间的交互作用对发酵菠萝果汁的总酸含量有着显著性影响外,其余的各试验因素交互作用均不明显,与方差分析结果一致。

通过对模型方程及响应面的分析,确定最佳发酵工艺为初始 pH6.82、发酵温度 37.32 °C,接种量 1.14%,发酵时间 30.03 h,预测在此条件下总酸含量为 7.24 g/kg。为了更好地控制和实现生产条件,将优化的工艺条件调整为初始 pH6.8、发酵温度 37 °C、接种量 1%、发酵时间 30 h。在此发酵条件下,发酵后菠萝果汁中总酸含量为 7.16 ± 0.26 g/kg,活菌数为 8.99 ± 0.04 lg CFU/mL,总酸含量与模型预测值较一致,验证了模型的可靠性。

2.5 感官评价

对在优化工艺条件下获得的发酵菠萝果汁进行

感官评价,结果见图 12。由图可知,所选 4 个评价指标中除组织指标外,发酵后菠萝果汁的气味、色泽和口感评分均高于发酵前菠萝果汁,但在气味上略低于 NFC 菠萝果汁,这主要与菠萝果汁发酵前的处理有关。用于发酵的 NFC 菠萝果汁经过水浴灭菌(90 °C, 10 min)和 pH 调节(pH6.8)后,色泽变暗,糖酸比失衡,菠萝特征风味变淡,经过 *L. casei* LK-1 发酵后,发酵风味增加,风味层次更为丰富。此外,由于乳酸等有机酸成分的产生,使得发酵菠萝果汁的酸度增加,相对于发酵前菠萝果汁,发酵后菠萝果汁酸甜更为适口,色泽透亮,口感评分与 NFC 菠萝果汁相近。发酵前后菠萝果汁以及 NFC 菠萝果汁的感官评分分别为 48.62、76.75、81.87 分,表明 *L. casei* LK-1 发酵菠萝果汁具有良好的感官品质。

3 结论

干酪乳杆菌是生产和应用中重要的益生菌。本研究以 *L. casei* LK-1 为研究对象,通过耐酸、耐糖性实验和产酸性能测定探究该菌株的耐酸、耐糖、产酸等特性。*L. casei* LK-1 在 pH5~7 和 0%~10% 质量分数葡萄糖环境下,具备良好的生长繁殖能力;在酸性(pH3)和高糖(40% 质量分数葡萄糖)环境中培养 3 h,其存活率分别为 76% 和 71%;在 MRS 培养基中培养 48 h,产酸量为 5.35 g/kg,产酸能力良好。结果表明,*L. casei* LK-1 在一定的酸性和糖浓度环境下,具有较好的生长繁殖能力,且具备较好的耐酸、耐糖能力和产酸性能,适用于弱酸或较高糖果汁发酵。

将 *L. casei* LK-1 应用于菠萝果汁的发酵,建立干酪乳杆菌发酵菠萝果汁的发酵工艺。以活菌数和总酸含量为指标,对菠萝果汁初始 pH、发酵温度、接种量和发酵时间进行单因素实验,以确定实验因素水

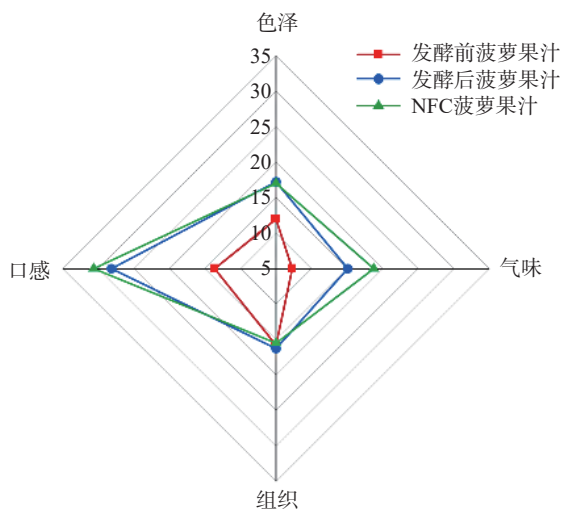


图 12 不同处理菠萝果汁感官评价

Fig.12 Sensory evaluation of pineapple juice with different treatments

平;并以总酸含量为指标,进行响应面试验。根据响应面试验结果,获得最优发酵条件为:菠萝果汁初始 pH6.8、发酵温度 37℃、菌种接种量 1%、发酵时间 30 h,此时发酵菠萝果汁中总酸含量为 7.16 ± 0.26 g/kg,活菌数为 8.99 ± 0.04 lg CFU/mL。此条件下发酵的菠萝果汁饮品色泽鲜亮,酸甜适口,风味较好,具有良好的感官品质,可为干酪乳杆菌在果蔬汁的进一步生产应用提供依据。

参考文献

- [1] MASLAK E, ZLOCH M, ARENDOWSKI A, et al. Isolation and identification of *Lactococcus lactis* and *Weissella cibaria* strains from fermented beetroot and an investigation of their properties as potential starter cultures and probiotics[J]. *Foods*, 2022, 11(15): 2257.
- [2] DIMITROVSKI D, MAJA DIMITROVSKA-VETADJOKA M, HRISTOV H, et al. Developing probiotic pumpkin juice by fermentation with commercial probiotic strain *Lactobacillus casei* 431[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2021, 45(3): 15245.
- [3] KUMAR B V, VIJAYENDRA S V N, REDDY O V S. Trends in dairy and non-dairy probiotic products-a review[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, 52(10): 6112-6124.
- [4] FIJAN S. Microorganisms with claimed probiotic properties: An overview of recent literature[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2014, 11(5): 4745-4767.
- [5] RANADHEERA C, VIDANARACHCHI J, ROCHA R, et al. Probiotic delivery through fermentation: Dairy vs. non-dairy beverages[J]. *Fermentation*, 2017, 3(4): 67.
- [6] BANCALARI E, CASTELLONE V, BOTTARI B, et al. Wild *Lactobacillus casei* group strains: Potentiality to ferment plant derived juices[J]. *Foods*, 2020, 9(3): 314.
- [7] HU X, ZENG J, SHEN F, et al. Citrus pomace fermentation with autochthonous probiotics improves its nutrient composition and antioxidant activities[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2022, 157: 113076.
- [8] ZHANG L, YU X, YAGOUB A E A, et al. Effect of vacuum impregnation assisted probiotics fermentation suspension on shelf life quality of freshly cut lotus root[J]. *Food Chemistry*, 2022, 381: 132281.
- [9] LIU Y, CHEN H, CHEN W, et al. Beneficial effects of tomato juice fermented by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei* antioxidation, antimicrobial effect, and volatile profiles[J]. *Molecules*, 2018, 23(9): 2366.
- [10] MUSTAFA S M, CHUA L S, EL-ENSHASY H A, et al. Kinetic profile and anti-diabetic potential of fermented *Punica granatum* juice using *Lactobacillus casei*[J]. *Process Biochemistry*, 2020, 92: 224-231.
- [11] 张玉梅,周伟,李如一,等. 5种菠萝果实品质比较与评价[J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(10): 22-28. [ZHANG Yumei, ZHOU Wei, LI Ruyi, et al. Comparison and evaluation of fruit quality of five pineapple cultivars[J]. *Food Research and Development*, 2022, 43(10): 22-28.]
- [12] MOHD ALI M, HASHIM N, ABD AZIZ S, et al. Pineapple (*Ananas comosus*): A comprehensive review of nutritional values, volatile compounds, health benefits, and potential food products[J]. *Food Research International*, 2020, 137: 109675.
- [13] 李依娜,邹颖,余元善,等. 不同乳酸菌发酵对菠萝浆品质的影响[J]. *中国酿造*, 2021, 40(2): 111-116. [LI Yina, ZOU Ying, YU Yuanshan, et al. Effect of different lactic acid bacteria fermentation on the quality of pineapple pulp[J]. *China Brewing*, 2021, 40(2): 111-116.]
- [14] NGUYEN B T, BUJNA E, FEKETE N, et al. Probiotic beverage from pineapple juice fermented with *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains[J]. *Front Nutrition*, 2019, 6: 00054.
- [15] 赵治巧,曾莉,万玉军,等. 酵母菌-植物乳杆菌复合发酵菠萝酵素生物活性的初步研究[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(7): 110-115. [ZHAO Zhiqiao, ZENG Li, WAN Yujun, et al. Study on the bioactivity of pineapple Jiaosu fermented by yeast and *Lactobacillus plantarum*[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(7): 110-115.]
- [16] 廖良坤,魏晓奕,林丽静,等. 益生菌发酵火龙果研究[J]. *热带农业工程*, 2016, 40(Z1): 16-19. [LIAO Liangkun, WEI Xiaoyi, LIN Lijing, et al. Fermentation of pitaya by *Lactobacillus casei* LK-1[J]. *Tropical Agricultural Engineering*, 2016, 40(Z1): 16-19.]
- [17] 刘畅,左常洲,彭菁,等. 响应面优化植物乳杆菌发酵番茄汁工艺及其品质评估[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(10): 246-253. [LIU Chang, ZUO Changzhou, PENG Jing, et al. Response surface optimization of the fermentation process of tomato juice by *Lactobacillus plantarum* and its quality evaluation[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(10): 246-253.]
- [18] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局. GB 4789.35-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验[S]. 北京:中国标准出版社, 2016: 1-5. [National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, State Food and Drug Administration. GB 4789.35-2016 National standard for food safety-Microbiology test of food-*Lactobacillus* test[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016: 1-5.]
- [19] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局. GB 12456-2021 食品安全国家标准 食品中总酸的测定[S]. 北京:中国标准出版社, 2021: 1-3. [National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, State Food and Drug Administration. GB 12456-2021 National Standard for Food Safety-Determination of total acid in food[S]. Beijing: Standards Press of China, 2021: 1-3.]
- [20] 王帅静,李啸,刘玲彦,等. 西藏牦牛粪和乳源中益生菌的筛选与鉴定[J]. *中国酿造*, 2021, 40(7): 43-48. [WANG Shuaijing, LI Xiao, LIU Lingyan, et al. Screening and identification of probiotics from yak dung and milk in Tibet[J]. *Chinese Brewing*, 2021, 40(7): 43-48.]
- [21] 王馨. 用于发酵工程的乳酸菌筛选及复配菌剂研究[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学, 2021. [WANG Xin. Screening of lactic acid bacteria used in fermentation engineering and engineering and research on compound bacteria[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2021.]
- [22] ZHANG Q, WANG M, MA X, et al. *In vitro* investigation on lactic acid bacteria isolated from yak faeces for potential probiotics[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 984537.
- [23] 熊素玉,姚新奎,谭小海等. 不同温度及 pH 条件对乳酸菌生长影响的研究[J]. *新疆农业科学*, 2006(6): 533-538. [XIONG Suyu, YAO Xinkui, TAN Xiaohai et al. Effects of different temperatures and pH on the growth of lactic acid bacteria[J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2006(6): 533-538.]
- [24] 赵雪婷. 人源干酪乳杆菌的筛选及其益生性能的研究[D]. 南昌:南昌大学, 2019. [ZHAO Xueting. Identification, characterization, and probiotic potential of *Lactobacillus casei* isolated from

infant feces[D]. Nanchang: Nanchang University, 2019.]

[25] 徐小轻. 食源性干酪乳杆菌 NA-2 抑菌特性及其胞外多糖功效研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2021. [XU Xiaoqing. Antibacterial properties of foodborne *Lactobacillus casei* NA-2 and activities of its exopolysaccharide[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences Thesis, 2021.]

[26] WU C, HE G, ZHANG J. Physiological and proteomic analysis of *Lactobacillus casei* in response to acid adaptation[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2014, 41(10): 1533–1540.

[27] 焦媛媛, 杜丽平, 孙文, 等. 优良梨汁发酵乳酸菌的筛选与发酵性能分析[J]. 食品科学, 2019, 40(2): 141–145. [JIAO Yuan-yuan, DU Liping, SUN Wen, et al. Screening and fermentation characteristics of lactic acid bacteria for fermentation of pear juice[J]. Food Science, 2019, 40(2): 141–145.]

[28] 夏文洋, 徐显睿, 李翠凤, 等. 直投式商业酸乳发酵剂发酵特性评价[J]. 食品工业, 2022, 43(1): 223–228. [XIA Wenyang, XU Xianrui, LI Cuifeng, et al. Performance evaluation on fermentation property of DVS commercial yogurt starter culture[J]. Food Industry, 2022, 43(1): 223–228.]

[29] LORUSSO A, CODA R, MONTEMURRO M, et al. Use of

selected lactic acid bacteria and quinoa flour for manufacturing novel yogurt-like beverages[J]. Foods, 2018, 7(4): 51.

[30] COSTA M G, FONTELES T V, DE JESUS A L, et al. Sonicated pineapple juice as a substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: Process optimization and product stability[J]. Food Chemistry, 2013, 139(1-4): 261–266.

[31] SZUTOWSKA J. Functional properties of lactic acid bacteria in fermented fruit and vegetable juices: A systematic literature review[J]. European Food Research and Technology, 2020, 246(3): 357–372.

[32] 商桑, 高伦江, 曾小峰, 等. 青脆李益生菌饮品的发酵工艺优化及冷藏对其品质的影响[J]. 食品工业科技, 2021, 42(15): 125–130. [SHANG Sang, GAO Lunjiang, ZENG Xiaofeng, et al. Fermentation process optimization and cold storage quality change of prunus americana juice fermented by probiotic[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(15): 125–130.]

[33] 石阳阳, 江远智, 李瑞, 等. 协同发酵生产植物乳杆菌发酵乳及其特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(11): 8–13. [SHI Yangyang, JIANG Yuanzhi, LI Rui, et al. *Lactobacillus plantarum* fermented milk manufactured by co-fermentation and its properties[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(11): 8–13.]