

自然发酵酸菜汁中乳酸菌的分离筛选 与鉴定研究

陈晓平¹, 刘华英¹, 魏小川¹, 马艳梅¹, 宋丽军²

(1. 吉林农业大学食品工程学院, 吉林 长春 130118; 2. 吉林省标准研究院, 吉林 长春 130022)

摘 要: 从自然发酵的酸菜汁中分离出 3 株高产酸菌株, 利用现代分析技术与经典分类法对上述三株高产酸菌株进行了系统的细菌学鉴定。鉴定结果表明, 三株高产酸菌株分别为肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)、短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)和植物乳酸杆菌(*Lactobacillus plantarum*)。

关键词: 酸菜汁; 乳酸菌; 分离鉴定

Study on Separation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Naturally Fermented Sauerkraut

CHEN Xiao-ping¹, LIU Hua-ying¹, WEI Xiao-chuan¹, MA Yan-mei¹, SONG LI-jun²

(1. College of Food Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. Jilin Province Standard Research Institute, Changchun 130022, China)

Abstract: 3 strains of lactic acid bacteria from natural fermentation sauerkraut were separated and systematically identified. On the basis of morphology, physiological and biochemical features with modern analytical methods and classical methods. The results indicated that the 3 strains are *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus plantarum*.

Key words: sauerkraut; lactic acid bacteria; separation and identification

中图分类号: TS255.54

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)02-0091-04

利用乳酸菌进行发酵, 加工、贮存蔬菜的方式已有几千年的历史了^[1], 并在全世界许多国家和地区广为流传。不仅是因为其简便、易掌握, 而且还因为其能进一步改善蔬菜风味、增进食欲^[2]。我国蔬菜资源丰富, 酸菜作为我国东北地区一种传统的乳酸发酵蔬菜制品, 其口感清爽, 营养丰富, 风味独特^[3]。其汁液中富含乳酸菌活菌, 赋予酸菜多种营养保健功效^[4]。对其深入研究且开发利用, 对提高人民健康水平、开发蔬菜加工品种、蔬菜原料的综合利用有着积极意义。

本研究旨在对传统自然发酵的酸菜进行乳酸菌的分离

鉴定, 为酸菜的纯菌发酵和现代工业化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料

大白菜 吉林农业大学农贸市场; 食盐 长春市盐业公司。

1.1.2 主要试剂及仪器

蛋白胨、酵母提取物、吐温 80、牛肉膏、琼脂;

收稿日期: 2005-04-27

作者简介: 陈晓平(1963-), 男, 教授, 博士, 研究方向为功能食品。

参考文献:

- [1] 金世琳. 乳品工业手册[M]. 轻工业出版社, 1987.
- [2] 唐静静, 刘乘, 董海祥. 牛奶及果汁的物质及相关设备[J]. 包装与食品机械, 2003, 21(3): 27-28.
- [3] 朱海清. 超声波对牛奶的均质效果研究[J]. 粮油加工与食品机械,

2002, (5): 42.

- [4] 冯叙桥, 赵静. 食品质量管理学[M]. 中国轻工业出版社, 1995.
- [5] 马钢. 酸奶制品制作技术及最新配方[M]. 中国农业出版社, 1994.
- [6] 赵平. 牛奶均质效果的测定[J]. 中国乳品工业, 1999, 26(2): 34.
- [7] 金世琳. 乳品工业手册[M]. 轻工业出版社, 1987.

生化试剂; 乳酸、 K_2HPO_4 、柠檬酸铵、柠檬酸二铵、乙酸钠、葡萄糖、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 、 $CaCO_3$ 、正丁醇、甲酸等化学试剂; 分析纯; 恒温培养箱、生化培养箱 上海科学仪器厂; DX-50 显微镜奥林巴斯; 722 分光光度计 山东高密分析仪器厂; 751 紫外可见分光光度计 上海科学仪器厂; HS-840U 超净工作台 苏州医用仪器厂; YXQ.SG41.280A 电热手提式高压杀菌锅 上海医用核子仪器厂; E-201-C 酸度计 上海精密科学仪器有限公司; ALC-210.2 电子天平北京赛多利斯天平有限公司。

1.1.3 培养基^[5]

乳酸菌分离固体培养基、MRS 培养基、用于肠膜明串珠菌的 HP 选择性培养基、PY 基础培养基、PYG 琼脂培养基。

1.2 方法

1.2.1 乳酸菌的分离筛选

取外观无污染, 味道纯正的自然发酵酸菜液为分离样, 经稀释后于双层乳酸菌分离固体培养基中 $38^\circ C$, 48h 培养, 挑取溶 $CaCO_3$ 圈较大、培养基变黄的菌落, 划线分纯。

产酸量测定:

采用 0.1N 的 NaOH 碱液滴定法, 以酚酞为指示剂, 分析结果以乳酸计。

$$\text{乳酸} = \frac{N_{NaOH} \cdot V_{NaOH} \times 0.09}{V_{\text{样品}}} \times 100$$

1.2.2 乳酸菌鉴定

1.2.2.1 产乳酸鉴定

通过纸层析乳酸定性试验确定出产乳酸细菌。

纸层析法: 新华 1# 滤纸, 溶液系统为正丁醇: 甲酸: 水 = 10: 2: 15, 显色剂为 0.04% 溴酚蓝乙醇溶液, 0.1N NaOH 调 pH 至 6.7, 乳酸标准溶液浓度为 2%, 标准液、各菌株发酵液以毛细管点样, 上行层析, 显色比较各斑点的 R_f 值。

1.2.2.2 形态学鉴定^[6]

将分纯的菌种分别涂到 MRS 琼脂培养基上, $38^\circ C$, 24h 培养, 观察菌落特征, 取典型菌落涂片革兰氏染色, 油镜下观察菌体形态。

1.2.2.3 生理生化特性鉴定^[5]

(1) 生化特性研究

对分离出的菌种分别进行糖发酵产酸试验、过氧化氢酶试验、硝酸盐还原试验、产生吡啶(靛基质)试验、精氨酸水解试验、明胶液化试验、硫化氢产生试验、葡聚糖产生试验。

(2) 生理特性研究

① 生长曲线的绘制 将 1% 的相应菌液接入培养基中, 每隔 4h 吸取菌液做系列梯度稀释, 作混合平板, L-6 于 $30^\circ C$, L-7 和 L-8 于 $35^\circ C$ 培养 2~3d, 菌落计数。以培养时间为横坐标, 菌落总数的对数为纵坐标, 绘制生长曲线。

② 培养温度及时间对菌株生长的影响 OD 值以同温下不接种培养基作对照, 定期取出接种培养基在波长 $\lambda = 600nm$ 测定。

(3) 运动性检查

采用半固体穿刺法^[6]。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的分离筛选结果

经分离筛选, 得 L-1、L-2、L-3、L-4、L-5、L-6、L-7、L-8、L-9 菌株。

结果见表 1。

表 1 乳酸菌的分离与优选结果
Table 1 The results of separation and identification of lactic acid bacteria

菌株	L-1	L-2	L-3	L-4	L-5	L-6	L-7	L-8	L-9
溶 $CaCO_3$ 圈(mm)	1.5	1.7	2.6	1.9	2.8	2.9	3.4	3.3	1.8
产酸量(%)	1.2	1.4	1.9	1.5	2.0	2.0	2.6	2.4	1.5

由表 1 结果可知, 各菌株的溶 $CaCO_3$ 圈的大小与产酸量的多少呈正相关; 在 L-1~L-9 各菌株中, 以 L-7 的溶 $CaCO_3$ 圈最大, 达 3.4mm, 产酸量也最多, 达 2.6%, 其次为 L-8, 溶 $CaCO_3$ 圈为 3.3mm, 产酸量为 2.4%, 再次为 L-6, 溶 $CaCO_3$ 圈为 2.9mm, 产酸量为 2.0%。L-5 虽产酸量也达 2.0%, 但其溶 $CaCO_3$ 圈不如前三者, 因此, 以 L-7、L-8 和 L-6 作为优选出的 3 个高产酸菌株。

2.2 乳酸菌的鉴定结果

2.2.1 纸层析乳酸定性结果

采用乳酸定性分析, 通过纸层析法对乳酸标准溶液和 L-7、L-8 和 L-6 三菌株的各 I、II、III 号发酵液进行对比试验, 试验结果见表 2。

表 2 结果表明, L-7、L-8 和 L-6 的发酵液中均含有

表 2 发酵液 R_f 值测定结果
Table 2 R_f value of fermented juice

样品	柠檬酸	乳酸	L-7 发酵液			L-8 发酵液			L-6 发酵液		
			I	II	III	I	II	III	I	II	III
R_f 值	0.483	0.731	0.719	0.724	0.698	0.742	0.736	0.733	0.712	0.694	0.725

表4 L-7、L-8和L-6糖发酵结果
Table 4 Sugar fermentation of L-7, L-8 and L-6

菌株	发酵糖类													
	葡萄糖	果糖	乳糖	半乳糖	蔗糖	麦芽糖	甘露糖	核糖	棉籽糖	松三糖	甘露醇	山梨醇	淀粉	木糖
L-7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-8	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	±
L-6	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

注：“+”为阳性反应；“±”为不确定性反应；“-”为阴性反应。

表5 L-7、L-8和L-6生化鉴定结果
Table 5 Physiological and biochemical experiment of L-7, L-8 and L-6

菌株	鉴定项目						
	H ₂ O ₂ 酶试验	硝酸盐还原试验	产生吲哚试验	精氨酸水解试验	葡聚糖产生试验	明胶液化试验	硫化氢产生试验
L-7	-	-	-	-	-	-	-
L-8	-	-	-	-	-	-	-
L-6	-	-	-	-	-	-	-

乳酸，说明此三个菌株为产乳酸菌株。

2.2.2 形态学鉴定结果

L-7、L-8和L-6菌株的形态学鉴定结果见表3。

表3 L-7、L-8和L-6的形态学特征鉴定结果
Table 3 The morphologic character of the L-7,L-8 and L-6

菌株	形态特征
L-6	菌落在培养基上多呈凸透镜状突起，菌落直径0.5~1.0mm，光滑、圆形、灰白色，革兰氏染色阳性，兼性厌氧。培养液中生长物浑浊。菌体为直径0.8~1.2μm的球状或豆状。呈单个或短链排列。
L-7	菌落突起，圆形、光滑、白色，革兰氏染色阳性。培养液中生长物浑浊，菌体呈圆端直杆状，直径0.9~1.2μm，长2~6μm，单个或成对排列。
L-8	菌落灰白色，表面粗糙，圆形，边缘整齐，中间有深色突起。菌体呈短粗杆状，直径0.9~1.2μm，长1.5~3μm单个或成对排列。

由表3结果可知，L-7菌株具有植物乳酸杆菌(L.p)的形态学特征；L-8具有短乳杆菌(L.b)的形态学特征；L-6具有肠膜明串珠菌(L.m)的形态学特征。

2.2.3 生理生化特性鉴定结果

2.2.3.1 生化特性鉴定结果

结果见表4、表5。

由表4、表5结果可知，L-7、L-8和L-6的生化鉴定结果分别与L.p、L.b和L.m所具有的特性一致。

2.2.3.2 生理鉴定结果

(1)生长曲线的绘制

L-7、L-8和L-6菌株生长曲线见图1。

由图1可见，L-6菌株在培养4h后即进入对数生长期，20h进入稳定期。L-7和L-8菌株具有类似的生长曲线，至32~48h进入稳定期。从三菌株的比较看，生长的前期应以L-6为主，后期应以L-7和L-8为主。

(2)最适生长温度测定结果

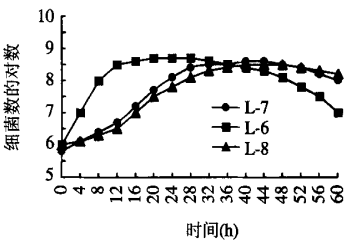


图1 生长曲线
Fig.1 The curve of growth

L-7、L-8、L-6菌株生长与温度关系见图2~4。

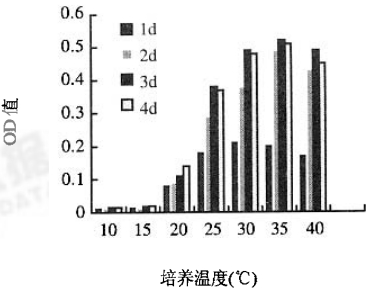


图2 L-7菌株生长与温度关系
Fig.2 The effects of temperature on L-7

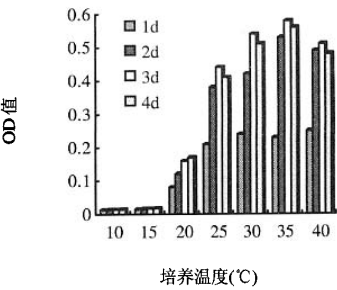


图3 L-8菌株生长与温度关系
Fig.3 The effects of temperature on L-8

β - 环糊精和染料木黄酮包合作用的研究

程霜¹, 杜凌云², 牛梅菊², 朱明才¹

(1.聊城大学食品科学与工程系, 山东 聊城 252059; 2.聊城大学化学系, 山东 聊城 252059)

摘要: 以 β - 环糊精与染料木黄酮的摩尔比、包合温度及包合时间为变量设计正交试验优化 β - 环糊精与染料木黄酮的包合反应工艺参数, 利用紫外和红外吸收光谱、热重和导数热重分析、差示扫描量热分析等测试方法对 β - 环糊精与染料木黄酮的包合物和主、客体分子进行了表征; 比较了包合物与游离主、客体的光谱性质的差异, 实验结果表明: β - 环糊精与染料木黄酮能形成摩尔比为 1:1 的水溶性好、热稳定性强的包合物, 该包合物可广泛应用于多个领域。

关键词: β - 环糊精; 染料木黄酮; 包合作用; 热稳定性; 水溶性

Study on Inclusion Interaction of β -Cyclodextrin and Genistein

CHENG Shuang¹, DU Ling-yun², NIU Mei-ju², ZHU Ming-cai¹

(1.Department of Food Science and Engineering, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China;

2.Department of Chemistry, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

Abstract: Inclusion complexes of genistein with β -cyclodextrin were prepared. An orthogonal test with three factors including molar ratio of β -CD versus genistein, inclusion temperature and stirring time was designed to investigate the optimum technology

收稿日期: 2005-02-28

作者简介: 程霜(1970-), 男, 博士, 研究方向为膳食黄酮与健康。

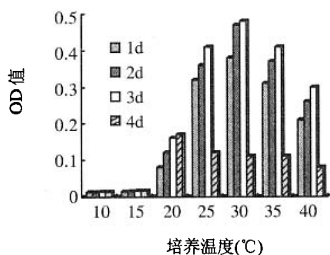


图4 L-6菌株生长与温度关系

Fig.4 The effects of temperature on L-6

由图2、图3和图4可见, L-7、L-8菌株的最适生长温度为30~35℃, L-6菌株的最适生长温度为25~30℃。

2.2.3.3 运动性检查结果

通过半固体洋葱穿刺法对L-7、L-8和L-6菌株的运动性检查结果可见, 三菌株均生长于接种的穿刺线上, 边缘清晰, 无扩散现象。表明L-7、L-8和L-6均无运动性。

3 结论

从自然发酵酸菜汁中分离得到3株高产酸菌株。经纸层析法测定所产酸为乳酸, 鉴定该3株高产酸菌株为乳酸菌。采用经典细菌学分类鉴定方法, 经一步的生态学鉴定、生理生化特性鉴定和运动性鉴定, 确定该3株高产酸菌分别为: 肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*, Lm)、短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*, Lb)和植物乳酸杆菌(*Lactobacillus plantarum*, Lp)。

参考文献:

- [1] 钟之绚, 郭剑. 酸白菜发酵中乳酸菌群的分布[J]. 微生物学报, 1995, 31(1): 74-76.
- [2] 任涛, 王英. 微生物对蔬菜研制风味及品质的影响[J]. 中国调味品, 1989, (7): 5-8.
- [3] 侯红漫, 宋海波, 刘扬, 等. 酸菜汁中乳酸菌的分布[J]. 食品科学, 1997, 18(1): 29-32.
- [4] 杨洁彬, 郭兴华, 等. 乳酸菌—生物学基础及应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1996.
- [5] 凌代之, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [6] 布坎南 R. E, 吉本斯 R. E, 等. 伯杰细菌鉴定手册(第八版)[M]. 北京: 科学出版社, 1984.