

几种发酵蔬菜中乳酸菌的分离与筛选

商 军¹, 钟方旭^{1,*}, 王亚林¹, 孙 毅²

(1. 武汉工业学院生物与制药工程系, 湖北 武汉

430023 2. 武汉小蜜蜂食品有限公司, 湖北 武汉

430023)

摘 要: 从泡白菜、泡萝卜和泡辣椒中分离出 11 个乳酸菌株, 对各菌株进行了初步鉴定和筛选。结果表明: 不同泡菜中的乳酸菌株有明显差异, 分离的菌株多以杆状和球状存在, 其中泡萝卜中以短乳杆菌为主, 泡辣椒中以短乳杆菌和片球菌为主, 泡白菜中以短乳杆菌和链球菌为主; 供试样品中还含有环丝菌属, 丹毒丝菌属, 肠球菌属等三个菌属的乳酸菌, 乳杆菌属在三种泡菜中存在最广泛。三种泡菜中均含有产亚硝酸盐菌株, 其中泡辣椒中的肠球乳酸菌产较多亚硝酸盐, 不能作为纯种发酵菌种; 各菌种在纯种发酵时所表现出来的适应能力, 产酸能力和风味也各不相同。最后采用泡萝卜发酵试验筛选出 4 个菌株, 泡制的萝卜口感和风味好, 盐度低, 产酸速度快, 发酵 7d 即可基本成熟, pH 值可降到 4.0 以下, 保质期长、抑制杂菌能力强。

关键词: 泡菜; 乳酸菌; 纯种发酵; 亚硝酸盐

Separation and Screening of Lactic Acid Bacteria from Several Traditional Fermented Vegetables

SHANG Jun¹, ZHONG Fang-xu^{1,*}, WANG Ya-lin¹, SUN Yi²

(1. Department of Biological and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan

430023, China

2. Little Bee Foodstuff Ltd., Wuhan 430023, China)

Abstract: 11 lactic acid bacteria strains were separated from three kinds of traditional fermented vegetables (cabbage radish, and pimiento), and primarily identified and screened in this paper. The results showed that the lactic acid bacteria strains are obviously different, most of them exist in bacillus form and spherical form; Short *Lactobacillus* is mainly found in fermented radish, while short *Lactobacillus* and *Pediococcus* combined are primarily found in fermented pimiento; whereas *Streptococcus* and small *Lactobacillus* are dominating in fermented cabbage. Besides the above lactic acid bacteria, there are also three other kinds of lactic acid bacteria: *Brochothrix*, *Erysipelothrix* and *Enterococcus* also. *Lactobacillus* diffused widely in three vegetables. There are also acid nitrite producing strains existed in the three fermented vegetables. Specifically, *Enterococcus* separated from pimiento must not be used as pure fermentation strain because of high nitrite producing capability. Different strains show much different capability in producing acid and different flavor during pure fermentation; For pure fermentation of radish, four strains were screened to give good taste and flavor, low salinity, rapid acid producing, long shelf-life and strong capability of restraining bad microorganism. The fermented time can be controlled in seven days, and pH can be achieved below pH4.

Key words fermented vegetables, lactic acid bacteria, pure fermentation, nitrite

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)04-0195-05

传统泡菜制作已有几千年的历史, 其原理是利用各种有益微生物(主要是乳酸菌)对蔬菜切割处理时涌出的汁液进行发酵产酸, 降低泡菜 pH 值, 同时结合食盐的高渗透压作用, 共同抑制其他有害微生物的生长, 防止蔬菜腐败变质^[1], 并且在乳酸菌的代谢过程中, 会产生抑制有害微生物生长的细菌素, 提高了发酵蔬菜的抗菌活性, 另外还会形成具有独特风味的有机物质(多糖、柠檬酸、乳酸、醋酸、双乙酰等); 而乳酸菌本身具有协调人体代谢、抗肿瘤、降低胆固醇水平、改善肝

功能、缓解乳糖不耐症和增强免疫等保健功能^[2]。

蔬菜乳酸发酵无论从营养的角度还是从蔬菜保鲜的角度来说都具有很高的价值^[3], 但传统的作坊式泡菜加工方法具有发酵周期长, 产品稳定性差, 大规模生产难, 亚硝酸盐含量高等诸多弊端, 严重影响了蔬菜发酵工业的发展。通过纯种乳酸发酵能解决传统泡菜存在的不足^[4], 研制能直接用于蔬菜发酵的乳酸菌剂对于我国的蔬菜发酵工业和出口创汇具有重要意义。本文从不同泡菜来源中, 分离和筛选出多个乳酸菌株, 对其基

收稿日期: 2006-05-31

*通讯作者

基金项目: 武汉市科学技术局重大科技产业化专项基金(20062001010); 湖北省教育厅科学研究重点项目(D200618008)

作者简介: 商军(1982-), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品发酵。

本代谢特性进行了研究,为进一步研制蔬菜发酵纯种乳酸菌剂奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

泡萝卜(R)、泡辣椒(P)和泡白菜(C)购自当地超市;分离培养基和种子培养基均采用MRS,分离培养时添加溴甲酚紫作为指示剂;产酸产气培养基、石蕊牛乳培养基、硝酸盐培养基、明胶液化培养基、吲哚试剂、产硫化氢培养基均采用赵斌的方法^[5];新鲜萝卜购自市场。

1.2 仪器

HQ45Z型恒温摇床,扫描电子显微镜(scanning electron microscope SEM)(Hitachi S-3000N),PHS-3C型精密pH计,生化培养箱,高效液相色谱仪(DIONEX)。

1.3 方法

1.3.1 乳酸菌分离,纯化流程与方法

乳酸菌分离,纯化流程:泡菜样品采集→活化→分离→纯化培养→鉴定。将所采集的泡菜在30℃下活化培养48h,应用十倍稀释法^[5]将1ml泡菜汁稀释至 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} ,运用平板稀释涂布法^[5]进行平板涂布分离,挑选直径在1.5mm以下,能使培养基中溴甲酚紫变红或变黄的菌落,运用平板划线法^[5]反复划线分离,直至革兰氏染色^[5]观察中菌株颜色、大小、形态一致。

1.3.2 分离菌种的扫描电子显微镜观察

将纯种乳酸菌接种在MRS液体培养基中,30℃培养48h,摇匀,吸取100μl发酵液涂布盖玻片上,自然风干。经离子溅射仪(Eiko IB-5)镀金膜后,用扫描电子显微镜观察拍照,加速电压15kV。

1.3.3 乳酸与总酸含量测定

发酵液中乳酸含量测定采用HPLC法。纯化的乳酸菌种在液体MRS中培养24h,取培养液10ml,5000×g离心15min,取上清液用针筒过滤器(Φ0.22μ)过滤,滤液用HPLC测定乳酸含量,乳酸标准品购自Fluka公司(货号69785)。

HPLC条件: C₁₈-A柱, 5μ, PN2000-150×046; 常温常压; 流速: 0.8ml/L; 进样量: 20μl; 紫外检测波长: 215nm。

总酸含量测定采用GB/T 12456-90方法。

1.3.4 纯化乳酸菌种的生理鉴定

参照赵斌的方法^[5],对所分离的乳酸菌株分别进行产酸产气、石蕊牛乳、接触酶、硫化氢、氧化酶、明胶液化和吲哚试验等生理检测试验。

1.3.5 硝酸盐还原试验^[5]

接种与培养:将纯化后的乳酸菌接种到硝酸盐培养基上,在30℃下培养48h,另外保留一支不接种的硝酸盐培养基作为对照。

结果检测:把培养液平分为两份,分别检测其中的亚硝酸盐和硝酸盐,方法I:其中一管加入格利西亚硝酸试剂A、B各1滴,如出现红色,则为正反应。如不出现红色,则进行方法II:在另一管中加入少量锌粉,并加热,再加入格利西亚硝酸试剂A、B各1滴,如出现红色,则证明硝酸盐仍存在,为负反应。如不出现红色,则说明硝酸盐已经被还原,为正反应。

1.3.6 乳酸菌株纯种发酵试验

挑选出6个菌种,以新鲜萝卜为材料,洗净、去皮、切块、装坛备用。用煮沸的开水配制浓度为3%的食盐水,待冷却后导入坛中,按3%~5%的接种量接种乳酸菌,在30℃培养箱中发酵,分别在1、3、7、15d后记录其风味和酸度的变化。

2 结果与分析

2.1 初步分离筛选

将泡菜汁稀释涂布的平板培养48h后,挑选菌落直径在1.5mm以下,能使指示剂变红或变黄,菌落表面光滑的菌株进行划线培养。从泡白菜汁中分离出5个菌株(C),泡辣椒汁中分离出4个菌株(P),泡萝卜汁中分离出2个菌株(R),三种发酵蔬菜中共分离到11个具有典型乳酸菌菌落特征的菌株。

2.2 分离菌种纯化

对11个菌株进行反复划线分离和革兰氏染色观察,直至革兰氏染色观察中,菌株形态、大小及颜色均一致为止。革兰氏染色观察发现,11个菌种在革兰氏染色中均呈阳性,但随着培养时间的变长,部分菌种革兰氏染色会变红,可能是因为随着菌种的老化和培养基成分的变化导致细胞壁成分发生了改变^[7]。乳酸菌菌体较小,在光学显微观察时有时难以确定菌种是否已纯化,也难观察到菌种的立体形状和更多结构细节,有必要进一步采用扫描电子显微镜进行观察。本文选取了部分扫描电子显微镜观察结果列于图1,11个菌株主要以杆菌、球菌形态存在,其中数目最多的是短杆菌。泡白菜中的乳酸菌较丰富,形态以杆菌(C₂、C₄)、短杆菌(C₃、C₅)和球菌(C₁)为主;泡辣椒中以成对或四联球菌(P₁、P₃)、短杆菌(P₂、P₄)为主;泡萝卜中以短杆菌(R₁、R₃)为主。

2.3 乳酸、总酸含量测定

所分离的乳酸菌在MRS液体培养基中培养24h后,采用HPLC和滴定法分别测定乳酸、总酸含量,各菌株的产酸量如图2所示。图中显示,培养24h后乳酸含量

表3 其它生理鉴定结果及菌种分属
Table 3 Results of other physiological identification and strains classification

| 试验 | C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ | C ₅ | R ₁ | R ₃ | P ₁ | P ₂ | P ₃ | P ₄ |
|-----|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 接触酶 | — | + | — | — | — | — | — | — | — | + | — |
| 氧化酶 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 硫化氢 | + | — | — | + | — | — | + | — | — | + | — |
| 明胶 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 吡啶 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 分属 | 链球 | 环丝 | 乳杆 | 丹毒丝 | 乳杆 | 乳杆 | 丹毒丝 | 片球 | 乳杆 | 肠球 | 乳杆 |

表5 优选菌种的纯种发酵
Table 5 Pure fermentation of excellent strains

| 菌种 | 1d | 3d | 7d | 15d |
|----------------|-----------|-------------|-------------------|---------------------|
| R ₁ | 略变酸 | pH4.0, 有酸香味 | pH3.5, 香脆可口, 有醇香。 | pH3.5, 酸香味, 萝卜变软 |
| P ₁ | 变酸, pH5.0 | pH4.0, 有酸香味 | pH3.8, 酸香味浓。 | pH3.2, 香味浓郁, 酸味强烈 |
| C ₁ | 无变化 | 酸香味 | pH4.0, 香脆可口 | pH3.7, 酸香味, 萝卜变软 |
| C ₂ | 无变化 | 有霉味 | 有酸香味, 但口感不好。 | pH3.7, 酸香浓郁, 但口感不太好 |
| C ₅ | 无变化 | 略有酸味 | pH4.0, 酸香味浓而质地爽脆 | pH3.5, 酸香味浓但萝卜太软 |
| P ₄ | 无变化 | 无变化 | 有酸香味, 也有陈味 | pH3.7, 酸香味但口感不好 |

实践指导, 在蔬菜纯种发酵中我们要充分考虑不同蔬菜中的优势碳源而接种相应的乳酸菌, 也可以根据蔬菜中各种碳源的的比例采用适宜比例的复合菌种。

2.6 其它生理试验

通过上述产酸产气试验、石蕊牛乳试验及其它生理试验, 对分离的乳酸菌进行了初步鉴定。萝卜发酵液中以乳杆菌(R₁)为主, 还有丹毒丝菌(R₃); 发酵辣椒中以片球菌(P₁)和乳杆菌(P₂, P₄)为主, 还有肠球菌(P₃); 发酵白菜汁中以乳杆菌(C₃, C₅)和链球菌(C₁)为主, 还含有少量环丝菌(C₂)和丹毒丝菌(C₄)。其中乳杆菌在三种发酵蔬菜中广泛存在, 是蔬菜发酵中的优势菌种。

2.7 亚硝酸盐试验

表4 不同菌种的亚硝酸盐试验
Table 4 Nitrite test of different strains

| 方法 | 深红色 | 浅红色 | 无色 |
|------|----------------|--|---|
| 方法I | P ₃ | C ₄ , R ₃ | C ₁ , C ₂ , C ₃ , C ₅ , R ₁ , P ₁ , P ₂ , P ₄ |
| 方法II | | C ₁ , C ₃ , P ₂ , P ₄ , C ₂ | R ₁ , P ₁ , C ₅ |

从表4可以看出, 在方法I中, P₃菌株使硝酸盐培养基变为深红色, C₄、R₃菌株使硝酸盐培养基变为浅红色, 表明这3株乳酸菌能代谢产生亚硝酸盐, 不适宜作为纯种发酵菌种。赵玲艳^[6]从泡辣椒中分离的菌株的硝酸盐反应全部为阴性, 而我们从泡辣椒中分离的P₃产亚硝酸盐能力最强, 这可能是因为地域不同其乳酸菌的代谢特性差异造成。

采用方法I不能显色的部分菌种培养液可在方法II中显色, 表明这些菌种培养液中的硝酸盐仍然存在; 但也有部分菌种(R₁、P₁、C₅)既不会在方法I中显色, 也不会方法II中显色, 表明这些菌种能够分解硝酸盐, 但不会将其转化为亚硝酸盐, 而是转化为其它含氮化合物

被代谢掉, 这些菌种能在不产生亚硝酸盐的同时将硝酸盐代谢掉, 是较理想的纯种发酵菌种。

2.8 乳酸菌种纯种发酵试验

根据亚硝酸盐及其它生理鉴定实验结果, 选取不产亚硝酸盐, 产酸量较高, 来自不同发酵蔬菜, 分属于不同菌属的六个菌种(C₁, C₂, C₅, R₁, P₁, P₄), 分别接种到装有萝卜的发酵坛中, 分批取样测定酸度, 品尝其风味, 结果记录于表5。

六个乳酸菌种中, 来自于泡萝卜的R₁泡制的萝卜风味最好, P₁、C₁、C₅次之; P₁产酸速度最快, R₁次之, C₁、C₅较快。发酵试验中共筛选出4个风味较好, 产品质量稳定的菌株(R₁, P₁, C₁, C₅), 发酵时间可控制在7d内, pH值达到4.0以下, 比传统方法泡制蔬菜的周期缩短4倍。影响发酵蔬菜风味的因素有: ①产酸速度。由于发酵蔬菜制作中很少采用严格灭菌处理, 故发酵蔬菜中含有较多杂菌, 一般利用高盐来抑制杂菌的生长; 在低盐条件下, 乳酸菌产酸越快, 产量越多就能更好地抑制其它杂菌的生长, 保证其风味; ②菌种来源。来自于源发酵蔬菜的菌种能更好的适应该种发酵蔬菜环境而快速繁殖、产酸, 其发酵蔬菜的风味也会相应的好一些; 来自于其它发酵蔬菜的菌种虽然在初期阶段不能很快适应新的泡菜环境, 但经过驯化适应后, 也能较好的利用不同蔬菜中的碳源、氮源, 最终提高产酸量, 促使发酵蔬菜风味变好。

3 结 论

不同的发酵蔬菜中所含的菌种不同, 总的来说, 发酵蔬菜中乳酸菌起着主导作用, 主要为革兰氏阳性菌; 分离的所有乳酸菌株均能利用葡萄糖产酸, 但不能产气; 不同的乳酸菌株的产酸能力及乳酸占总酸比例差

微量稀释法筛选金钱松内生真菌 抗菌活性的研究

何 佳^{1,2}, 陈 钧^{1,*}, 赵启美^{1,2}, 祁红兵¹

(1. 江苏大学生物与环境工程学院, 江苏 镇江 212013

2. 河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471003)

摘 要: 首次对金钱松内生真菌进行了分离, 采用改良氯化三苯四氮唑显色(TTC)微量稀释法, 对其活性菌株进行筛选; 以11种常见导致食品腐败的细菌、酵母菌、霉菌为指示菌, 研究了活性菌株的抗菌能力。结果表明: 金钱松内存在着广泛的具有抗菌活性的内生真菌, 占内生真菌总数的28.5%, 高活性菌株占15.2%, 其中JJ18菌株发酵粗提物具有强烈的抗细菌、酵母菌和丝状真菌的广谱抗菌能力, JJ314抗细菌、酵母菌活性强。金钱松内生真菌抗菌活性是潜在的食品防腐抗菌资源。筛选方法准确可靠。

关键词: 金钱松; 内生真菌; 抗菌活性

Study on Screening Antimicrobial Activity of Endophytes Fungus from *Pseudolarix kaempferi* Gord
with Microdilution Method

HE Jia^{1,2}, CHEN Jun^{1,*}, ZHAO Qi-mei^{1,2}, QI Hong-bing¹

(1. School of Bio-environmental Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

2. School of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

Abstract: Endophytes fungus strains were screened firstly from *Pseudolarix kaempferi* Gord., and the active strains were screened with improved TTC(3, 5-triphenyltetrazolium chloride) microdilution method. MIC(minimum inhibitory concentration)

收稿日期 2006-03-31

*通讯作者

基金项目: 江苏省2004年度博士研究生创新计划项目(xm04-57)

作者简介: 何佳(1964-), 男, 副教授, 博士研究生, 研究方向为微生物来源的活性物质。

异较大; 不同的蔬菜由于其营养成分的差别, 各自适应不同种类的乳酸菌的生长, 其中白菜中以短乳杆菌和链球菌为主, 辣椒中短乳杆菌和片球菌更容易繁殖, 萝卜中以短乳杆菌为主; 由于蔬菜的营养成分复杂, 单碳源菌种不能充分利用其营养成分, 风味代谢产物也不如多菌种丰富, 提示我们在制备乳酸菌剂时宜采用复合菌种。从三种供试泡菜中均分离到产亚硝酸盐的乳酸菌, 有的含量还很高, 证实传统蔬菜加工方法生产的发酵蔬菜存在亚硝酸盐安全隐患。现已证实, 亚硝酸盐是严重致癌化学物质, 在国际社会对食品安全日益重视的今天, 应引起广大发酵蔬菜生产企业、商家、政府主管部门、食品科技工作者, 尤其是广大消费者的高度重视, 严加防范, 加以规避, 采用不产亚硝酸盐的乳酸菌剂进行蔬菜纯种发酵应在广大蔬菜加工企业中推广。

参考文献:

- [1] 张岩, 肖更生, 陈卫东, 等. 发酵蔬菜的研究进展[J]. 现代食品科技, 2005, 21: 184-186.
- [2] 栾金水. 乳酸菌的研究应用进展[J]. 江苏调味副食品, 2004(1): 8-10.
- [3] MAIFRENI M, MARINO M, CONTE L. lactic acid fermentation of *Brassica rapa*: chemical and microbial evaluation of a typical Italian product (brovada) [J]. Eur Food Res Technol, 2004, 218: 469-473.
- [4] 陈仲翔, 董英. 泡菜工业化生产的研究进展[J]. 食品科技, 2004, 33(4): 33-35.
- [5] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- [6] 赵玲艳, 邓放明, 杨抚林, 等. 自然发酵辣椒中优良乳酸菌的分离与鉴定[J]. 食品研究与开发, 2004, 25(3): 105-109.
- [7] 杨洁彬, 郭兴华. 乳酸菌—生物学基础及应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [8] 周德庆. 微生物学教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002.
- [9] 凌代文, 东秀珠. 乳酸菌分类鉴定及试验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.