

白贝自然发酵调味液中乳酸菌的分离鉴定 及生物学特性的研究

张大为, 张洁, 田永航

(海南热带海洋学院, 海南省海洋食品工程技术研究中心, 海南三亚 572022)

摘要: 以白贝自然发酵味液为分离源, 分离得到 26 株疑似乳酸菌, 经过菌落形态、菌体形态、生理生化实验、16s rDNA 鉴定, 确定 3 号菌株和 6 号菌株分别为植物乳杆菌和戊糖片球菌。分别对两种菌株的生长曲线、产酸能力、耐酸能力、耐盐能力等生物学特性考察。结果表明, 两种菌株 6 h 后开始进入对数生长期, 3 号菌株和 6 号菌株分别于 18 h 和 20 h 后进入稳定期, 3 号菌株生长速度较 6 号菌株快, 且进入稳定期后, 3 号菌株菌体浓度 OD 值达到 1.73 左右, 6 号菌株达到菌体浓度 OD 值达到 1.56 左右; 两种菌株 6 h 后, 产酸速度加快, 18 h 后 3 号菌株菌液 pH 值达到 3.5, 6 号菌株菌液 pH 值达到 3.6, 3 号菌株产酸能力较强; 两种菌株在 pH 值为 3.5 时, 均有良好生长, 3 号菌株菌液浓度 OD 值达到 1.742, 6 号菌株菌液浓度 OD 值达到 1.597; 两种菌株均能耐受 3%~4% 的盐, 6 号菌株的耐盐能力略强于 3 号菌株。两种菌株具有良好的产酸、耐酸和耐盐特性, 为后续应用奠定了一定的基础。

关键词: 白贝; 发酵; 乳酸菌; 鉴定; 特性

文章编号: 1673-9078(2019)11-76-82

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.11.011

Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Natural Fermented Sauce of *Monetaria moneta* and Study of Their Biological Characteristics

ZHANG Da-wei, ZHANG Jie, TIAN Yong-hang

(Hainan Tropical Ocean University, Hainan Engineering Research Center of Seafood, Sanya, 572022, China)

Abstract: Twenty-six suspected lactic acid bacteria were isolated from naturally-fermented sauce of *Monetaria moneta*. After colony morphology, bacterial morphology, physiological and biochemical experiments and 16S rDNA identification, *Lactobacillus plantarum* and *Tabacillus pentosae* strains No. 3 and No. 6 were identified as *Lactobacillus plantarum* and *Tabacillus pentosae* respectively. The growth curve, acid production capacity, acid tolerance and salt tolerance of the two strains were investigated. The results showed that the two strains began to enter logarithmic growth phase after 6 hours, strain 3 and strain 6 entered stable phase after 18 hours and 20 hours, respectively. The growth rate of strain 3 was faster than that of strain 6, and the OD value of strain 3 reached about 1.73 and that of strain 6 reached about 1.56 after entering the stable stage. After 6 hours, the acid production rate of the two strains accelerated, and after 20 hours, the acid production capacity of strain 3 became stable, and the acid production capacity of the two strains was strong at pH 3.5. Both strains could tolerate 3%~4% of salt, and strain 6 had a slightly stronger salt tolerance than strain 3.

Key words: *Monetaria moneta*; fermentation; lactic acid bacteria; identification; characteristics

白贝 (*Monetaria moneta*), 别名为海白、贝子、贝齿等, 是重要的贝类资源。贝壳呈扁圆形, 体色一般为黄白色或灰白色, 有白色细纹, 气味略咸, 广泛分布于南海。白贝肉鲜甜、肥美, 营养丰富, 食用广

收稿日期: 2019-06-04

基金项目: 海南热带海洋学院校级青年专项基金项目 (RHDQN201831); 海南热带海洋学院科研项目 (RHDXB201709)

作者简介: 张大为 (1977-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 应用微生物

通讯作者: 张洁 (1980-), 女, 讲师, 研究方向: 食品科学

泛。目前主要以直接食用为主, 附加值低, 没有见到深加工的报道。我国贝类加工目前主要集中在冷冻品、干制品, 尚处于初加工阶段, 产品附加值低, 原料没有得到充分的利用^[1,2]。如果利用白贝为原料, 进行进一步加工成即食白贝肉、白贝调味液等附加值高的产品, 将会产生可观的经济效益和社会效益。

目前, 发酵型海鲜调味品研究逐渐受到研究者的关注, 进行了大量的研究^[3-5]。主要集中在传统自然发酵法和现代速酿技术两种典型海鲜调味品的研究与开

发。传统自然发酵法是在一定的温度下将新鲜的海产品加入适当盐及其他辅料,利用原料中原有的酶以及所处环境内乳酸菌、耐酸性酵母等微生物进行发酵而制得最终调味品,最典型的产品就是鱼露。但传统发酵调味品的加工存在发酵周期长、成本高、产量低等弊端。因此,快速酿造方法的发展和探索成为重点研究方向,现代速酿技术包含了自然发酵、加曲发酵和加酶发酵等方法。黄志斌等采用低盐结合恒温发酵的方式,即减少盐度、提高温度进行发酵,有效缩短了发酵周期,且发现蛋白质分解率与盐腌制时间呈正相关^[6]。于小航发现采用低盐固态发酵法,并在发酵处理过程中加入鳀鱼浓缩液获得的成品酱油品质较好。加曲发酵法是参考传统酱油酿造的方法,通过添加米曲霉进行发酵酿造,在发酵过程中米曲霉会形成蛋白酶、脂肪酶及淀粉酶等活性酶来分解原料中的蛋白质、碳水化合物及脂肪等物质,进而形成具有较高营养和较好风味的调味品。张旭等利用扇贝裙边、豆粕及小麦,采用高盐稀态发酵工艺法,通过混合多菌种形成发酵曲,然后添加混合酵母菌处理,开发了扇贝裙边酱油。魏巍等在扇贝中添加豆粕和大米,再经高压灭菌,然后添加米曲霉发酵制成香味浓郁的扇贝酱^[7]。李阳明等在确保枯草芽孢杆菌的有效生长的前提下,通过混合制曲的手段制作鱼露,将氨基酸态氮作为判定因子,对盐浓度、大豆曲加曲量以及保温温度三者条件进行研究,取得了良好效果。大量研究表明,菌种是决定发酵海鲜调味品的关键所在,因此,筛选品质优良的特定菌种,对于增强产品品质至关重要^[8-13]。

本研究以白贝自然发酵调味液为分离源,从中分离得到性能优良的乳酸菌,并通过生理生化实验和16s rDNA方法,对分离得到的乳酸菌进行鉴定,并对其生物学特性进行分析,为提高发酵白贝调味液的品质、提高其营养价值奠定一定的基础。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

白贝:购于三亚市荔枝沟农贸市场。

1.2 主要试剂

MRS培养基:购于青岛高科园海博生物技术有限公司;革兰氏染色液:购于广东环凯微生物科技有限公司。其余试剂均为分析纯,购于西陇化工股份有限公司。

1.3 主要设备

LRH-250F型生化培养箱,金坛市盛蓝仪器制作有限公司;ME204E型电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;T6新世纪型紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限公司;SQ510C型立式蒸汽灭菌锅,重庆雅马拓科技有限公司;PB-10型酸度计,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司。

1.4 试验方法

1.4.1 白贝自然发酵调味液的制备工艺流程

白贝→浸泡吐沙→取肉洗净→白贝肉→打浆→自然发酵→白贝自然发酵调味液

1.4.2 乳酸菌分离纯化方法

将1g白贝自然发酵调味液样品加入9mL无菌生理盐水,经10、10²、10³、10⁴倍的梯度稀释后,取不同浓度的稀释液0.2mL,倒入MRS固体培养基表面,用涂布棒涂布使其铺满整个平板,每个稀释度做三个平行,最后用透明膜封口。在干燥器口抹一层凡士林,蜡烛点在干燥器底部,放入培养皿,盖上玻璃盖,待蜡烛燃尽时,将其放置37℃培养箱中培养48h。挑取单菌落接入新鲜液体MRS培养基进行活化,而后转入固体MRS培养基平板,在相同条件下培养。直至得到纯菌为止,将纯菌接入MRS斜面培养基放入4℃冰箱保存,备用。

1.4.3 疑似乳酸菌生理生化特性检测^[14,15]

1.4.3.1 过氧化氢酶试验

向37℃培养48h待测菌株中滴入3%过氧化氢溶液,待3min,观察菌株周围有无气泡产生,有气泡产生即为阳性反应,反之即为阴性反应。

1.4.3.2 葡萄糖产酸试验

向MRS液体培养基中加入溴甲酚绿指示剂,一式四份,三支培养疑似菌落,一支作为空白试验,用封口膜封口后放入干燥器中37℃恒温培养箱厌氧培养48h。观察其培养液颜色变化,培养基颜色由红棕色变成黄色,即证明有酸性物质产生。

1.4.3.3 糖发酵试验

向葡萄糖、蔗糖、乳糖发酵培养基中倒置放入杜氏管,每种培养基各4支,1支作为空白对照,121℃灭菌20min,冷却后接入纯化后的菌种。将试管放入37℃培养箱培养48h,观察试管的颜色变化及杜氏小管中是否有气泡产生。培养基由绿色变为黄色,为阳性。

1.4.3.4 甲基红试验

取适量分离纯化的菌种接种于葡萄糖蛋白胨液体培养基中,做3个重复并设空白对照,于37℃培养箱中培养48h。加数滴甲基红试剂,观察结果,呈现红色者为阳性,呈现黄色者为阴性。

1.4.3.5 V-P 试验

向葡萄糖蛋白胨液体培养基中接种分离纯化的菌种, 做 3 个重复并设空白试验, 放入 37 °C 培养箱培养 48 h, 向干净的试管中加入 2.5 mL 培养液, 先滴加 0.6 mL 5% α -萘酚无水乙醇溶液, 再滴加 0.2 mL 40% 氢氧化钠溶液, 摇晃 2~5 min, 阳性常立即使溶液显示红色, 如果没有出现红色, 则放于常温或者 37 °C 恒温水浴锅中, 若 2 h 内仍不显红色, 则判定为阴性。

1.4.3.6 吲哚试验

向胰蛋白胨液体培养基的试管中接种分离纯化的乳酸菌, 做 3 个重复并设空白试验, 放于 37 °C 培养箱培养 48 h。沿管壁缓缓滴加对二甲基氨基苯甲醛试剂于菌液表面, 在菌液表面出现红色反应者为阳性。如果颜色较浅, 则滴 4~5 滴乙醚于培养液, 震荡均匀, 让乙醚分散在培养基中。静置 30 s, 乙醚上浮至液面, 再接着加入对二甲基氨基苯甲醛试剂, 如菌液含有吲哚, 吲哚可被提取在乙醚层中, 浓缩的吲哚和试剂反应, 则颜色更为明显。

1.4.3.7 硫化氢试验

取适量分离纯化的菌种接种到培养基中, 做三组平行并设空白试验, 于 37 °C 培养箱培养 48 h。产硫化氢使培养基变为黑色, 有黑色出现则为阳性, 阴性结果需观察 7 d。

1.4.3.8 石蕊牛乳试验

取适量分离纯化的菌种接种到硫化氢固体穿刺培养基中, 做 3 组平行并设空白试验, 于 37 °C 培养箱培养 48 h。产硫化氢使培养基变为黑色, 有黑色出现则为阳性, 阴性结果需观察 7 d。

1.4.3.9 淀粉水解试验

将分离纯化后的菌株接种于淀粉培养基上, 做 3 组平行并设空白对照, 放入 37 °C 培养箱培养 24 h。将卢戈氏碘液滴到培养基上, 让溶液铺满培养基表面, 如不显色则证明淀粉已被水解, 为阳性结果, 如显蓝黑色, 则为阴性结果。

1.4.3.10 明胶液化试验

将纯化后的菌种接种于明胶培养基中, 37 °C 培养箱厌氧培养 24 h, 将其置于 4 °C 冰箱中 30~60 min, 观察培养基是否液化, 明胶被液化为阳性结果, 明胶凝固为阴性结果。

1.4.4 疑似乳酸菌的 16S rDNA 鉴定

将菌株纯化后, 采用天根生化科技有限公司基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA, 然后进行 16S rDNA 特异性 PCR 扩增、产物提纯、电泳纯度检测, 将扩增产物送到生工生物工程(上海)有限公司广州分公司进行测序, 将测序结果在 NCBI 官网进行基因序列比

对, 利用 MEGA7 软件构建系统发育树, 对所分离的优势菌株进行鉴定。

1.4.5 乳酸菌生物学特性分析^[16,17]

1.4.5.1 乳酸菌生长曲线的测定

在 4 支试管中加入 30 mL 液体培养基, 三支接种菌种, 一支做空白对照, 用接种环接种适量的分离纯化乳酸菌于培养基中, 震荡使其分布均匀, 置于 37 °C 培养箱厌氧培养。分别于 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h、14 h、16 h、18 h、20 h、22 h、24 h。取菌液测定 $\lambda=680$ nm 时的 OD 值, 以培养时间为横坐标, OD 值为纵坐标绘制生长曲线, 了解乳酸菌 24 h 内的生长规律。

1.4.5.2 乳酸菌产酸能力测定

将 30 mL MRS 液体培养基的 pH 值调至 6.2, 接种分离纯化的乳酸菌, 接种三支, 另一支做空白试验, 放入 37 °C 培养箱中厌氧培养, 分别于 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h、14 h、16 h、18 h、20 h、22 h、24 h, 用酸度计测定其 pH 值。以 pH 值为纵坐标, 培养时间为横坐标绘制曲线, 了解乳酸菌 24 h 内的产酸能力。

1.4.5.3 乳酸菌耐酸能力测定

用冰乙酸将 MRS 液体培养基的 pH 分别调节为 1.5、2.5、3.5、4.5、5.5、6.2、6.5, 其中 pH=6.2 的自然培养作为对照, 每个梯度三个平行。向液体培养基中接种分离纯化的乳酸菌, 放于 37 °C 的培养箱厌氧培养 24 h, 于 $\lambda=600$ nm 处测定其 OD 值。

1.4.5.4 乳酸菌耐盐能力测定

向盐浓度依次为 1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0% 和 6.0% 的 MRS 液体培养基中接种分离纯化的乳酸菌, 各留一支做空白试验, 放于 37 °C 培养箱厌氧培养 24 h, 于 $\lambda=600$ nm 处测定其 OD 值。

1.5 数据处理

使用 EXCEL 2010 进行作图, 每个实验数据均做三次平行实验得到, 记录方式为平均值 \pm 标准差; 利用 MEGA7 软件构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离纯化结果

从白贝自然发酵调味液中分离得到 26 株疑似乳酸菌, 通过菌落形态观察及革兰氏染色, 并结合显微镜观察, 菌落及菌体特性表 1 所示。

26 种菌种均能在 MRS 培养基上生长良好, 革兰氏染色阳性, 且过氧化氢酶试验均不产生气泡, 为阴

性反应, 葡萄糖产酸试验培养基颜色由红棕色变为黄色, 证明有酸产生。根据以上试验可得出这 26 株菌株初步判定为乳酸菌。

2.2 菌株生理生化特性测定结果

如表2所示, 对26株疑似乳酸菌进行糖发酵试验、甲基红试验、V-P 试验、吲哚试验、硫酸氢试验、石蕊牛乳试验、淀粉水解试验和明胶液化试验。根据试验结果查阅《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》中的关于乳酸菌生理生化特征的相关描述^[4], 通过对比初步确定1号菌株、3号菌株和6号菌株属于乳酸菌。

2.3 菌株的 16S rDNA 鉴定结果

由于2.2中初步鉴定结果中, 1号菌株生长速度较慢, 故本实验只对3号菌株和6号菌株进行16S rDNA

进一步鉴定。

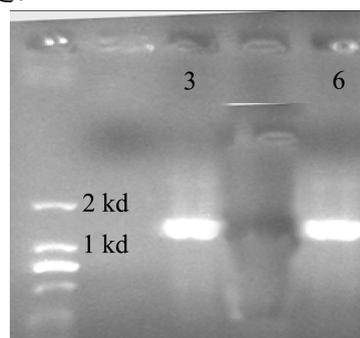


图1 16S rDNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 16S rDNA agarose gel electrophoresis

图1所示, 3号菌株和6号菌株的琼脂糖凝胶电泳图显示, PCR产物纯度高, 特异性条带在1000~2000 bp之间出现证明扩增成功, 进一步将扩增产物进行后续测序。

表1 菌落及菌体形态特征

Table 1 The morphological characteristics of colonies and thallus

菌号	菌落形态 (培养 48 h)	菌体特征
1	圆形, 大菌落, 边缘不整齐, 表面粗糙呈乳白色	革兰氏阳性, 杆状
2	圆形, 边缘整齐, 表面光滑呈乳白色	革兰氏阳性, 杆状
3	圆形, 大菌落, 边缘整齐, 表面粗糙呈乳白色	革兰氏阳性, 杆状
4	圆形, 小菌落, 边缘不整齐, 表面光滑呈乳白色	革兰氏阳性, 杆状
5	椭圆形, 小菌落, 边缘不整齐, 表面粗糙呈乳白色	革兰氏阳性, 杆状
6	圆形, 小菌落, 边缘不整齐, 表面光滑呈乳白色	革兰氏阳性, 球状
7	大菌落, 边缘不整齐, 表面粗糙呈乳白色	革兰氏阳性, 杆状
8	圆形, 大菌落, 边缘整齐, 表面光滑呈乳白色	革兰氏阳性, 杆状
9	圆形, 边缘整齐, 表面光滑呈乳白色	革兰氏阳性, 球状
10	圆形, 大菌落, 边缘整齐, 表面光滑呈乳白色	革兰氏阳性, 杆状
11	圆形, 大菌落, 边缘整齐, 表面光滑呈乳白色	革兰氏阳性, 杆状
12	圆形, 大菌落, 边缘整齐, 表面光滑呈乳白色	革兰氏阳性, 杆状
13	圆形, 大菌落, 边缘整齐, 表面光滑呈乳白色	革兰氏阳性, 杆状
14	圆形, 边缘不整齐, 表面粗糙呈微黄色	革兰氏阳性, 球状
15	圆形, 小菌落, 边缘整齐, 表面光滑呈乳白色	革兰氏阳性, 球状
16	圆形, 大菌落, 边缘整齐, 表面光滑呈乳白色	革兰氏阳性, 杆状
17	圆形, 小菌落, 边缘不整齐, 表面光滑呈乳白色	革兰氏阳性, 球状
18	圆形, 小菌落, 边缘不整齐, 表面光滑呈乳白色	革兰氏阳性, 杆状
19	椭圆形, 边缘整齐, 表面光滑呈乳白色	革兰氏阳性, 球状
20	扁平状菌落, 边缘不整齐, 表面粗糙呈乳白色	革兰氏阳性, 球状
21	边缘不整齐, 表面粗糙呈乳白色	革兰氏阳性, 杆状
22	圆形, 大菌落, 边缘不整齐, 表面粗糙呈乳白色	革兰氏阳性, 杆状
23	圆形, 大菌落, 边缘不整齐, 表面粗糙呈乳白色	革兰氏阳性, 杆状
24	大菌落, 边缘不整齐, 表面粗糙呈乳白色	革兰氏阳性, 杆状
25	边缘不整齐, 表面粗糙呈乳白色	革兰氏阳性, 杆状
26	圆形, 大菌落, 边缘不整齐, 表面粗糙呈乳白色	革兰氏阳性, 杆状

表2 疑似乳酸菌株生理生化特性结果

Table 2 The physiological and biochemical characteristics of suspected lactic acid strains

试验项目	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
葡萄糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
蔗糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
乳糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
过氧化氢酶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
葡萄糖产酸	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
甲基红试验	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
V-P 试验	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
吲哚试验	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
硫酸氢试验	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
石蕊牛乳试验	+	+	+	+	+	-	+	ND	+	+	+	+	+
淀粉水解试验	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
明胶液化试验	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

试验项目	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
葡萄糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
蔗糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
乳糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
过氧化氢酶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
葡萄糖产酸	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
甲基红试验	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
V-P 试验	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
吲哚试验	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
硫酸氢试验	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
石蕊牛乳试验	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
淀粉水解试验	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
明胶液化试验	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

注：“+”表示阳性，“-”表示阴性，“ND”为无明显变化。

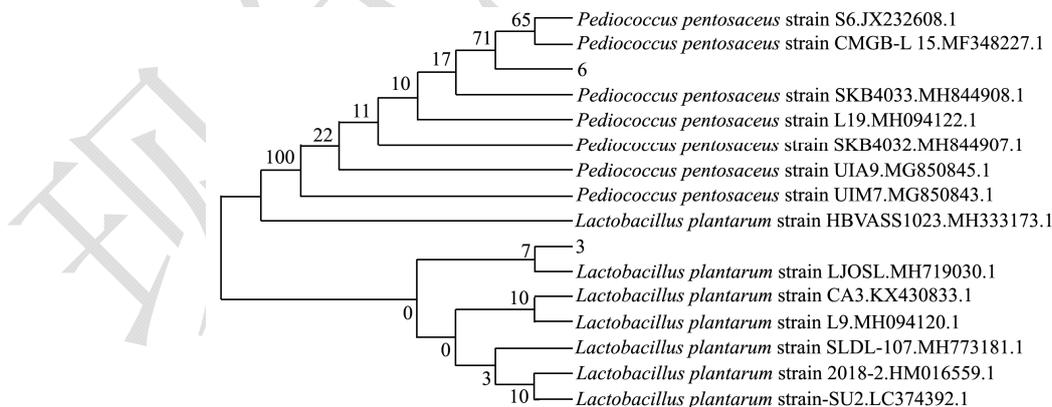


图2 3号菌株和6号菌株的基因序列系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of No.1 and No.6 strains gene sequences

将3号和6号菌株序列于NCBI数据库中比对,分别找出7株于其基因序列同源性较高的菌种,序列相似度为98%~99%。将所有基因序列构建系统发育树,结果如图2所示,从图中可以看出3号菌株与已

知植物乳杆菌LJOSL.MH 719030.1同处于同一分枝,同源性为99%,故鉴定为植物乳杆菌。6号菌株与已知戊糖片球菌S6.JX 232608.1和CMGB-L15均处于同一分枝,同源性为99%,故鉴定为戊糖片球菌。

2.4 3号菌株和6号菌株的生物学特性分析结果

2.4.1 3号菌株和6号菌株的生长曲线

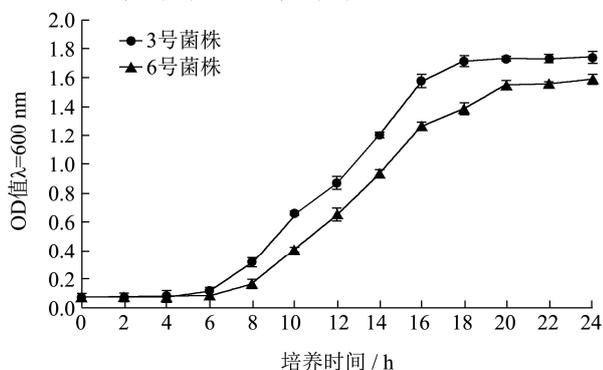


图3 3号菌株和6号菌株的生长曲线

Fig.3 Growth curve of No.3 and No.6 strains

从图3可以看出,3号乳酸菌和6号乳酸菌的生长趋势大致相同,即0~6h为延滞期,6h后进入对数生长期,菌体细胞此时迅速生长。3号乳酸菌18h后结束对数生长期,开始进入稳定期,3号菌株菌体浓度OD值达到1.73左右。而6号乳酸菌20h后才进入稳定期,菌体浓度OD值达到1.56左右,生长速度较3号乳酸菌慢。从菌体浓度角度来看,在对数生长期和稳定期阶段,3号乳酸菌都要高于6号乳酸菌。

2.4.2 3号菌株和6号菌株的产酸能力

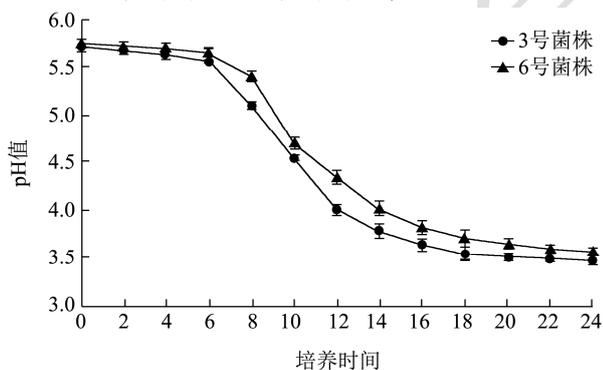


图4 3号菌株和6号菌株24h内的产酸能力

Fig.4 Acid production capacity of No.3 and No.6 strains within 24 hours

图4为3号菌株和6号菌株在24h内的产酸能力。从图中可以看出3号、6号菌在0~6h期间pH值下降较慢,说明产酸速度缓慢,pH值下降范围分别为5.69~5.57、5.74~5.64,6~18h期间产酸速率显著上升,18~24h期间产酸速率降低。从图中曲线的变化情况可以看出,3号菌的pH在相同时间内均低于6号菌,说明3号菌株产酸能力较强,6号菌株次之。18h后3号菌株菌液pH值达到3.5,6号菌株菌液pH值达到

3.6,而后趋于平稳。结合菌株生长曲线可以看出,18h以后菌株已经进入稳定期,说明pH值3.5~3.6时,菌株能够良好生长。

2.4.3 3号菌株和6号菌株的耐酸能力

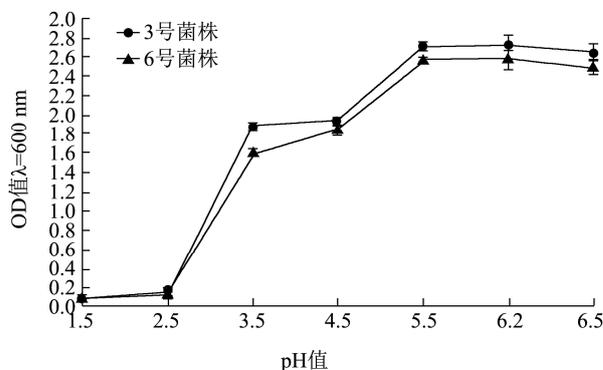


图5 不同pH值对菌株生长的影响

Fig.5 Effects of different pH values on the growth activity of strains

将3号菌株和6号菌株接种于不同pH值的培养基中,培养24h,考察两种菌株的生长情况,图5为耐酸能力的考察结果,从图中可以看出,两种菌株均表现出较好的耐酸能力,在pH值为3.5时,仍生长良好,3号菌株菌液浓度OD值达到1.742,6号菌株菌液浓度OD值达到1.597。但是在pH值为1.5和2.5时,菌株基本不生长。在整个考察范围内,3号菌株的耐酸能力强于6号菌株。

2.4.4 3号菌株和6号菌株的耐盐能力测定结果

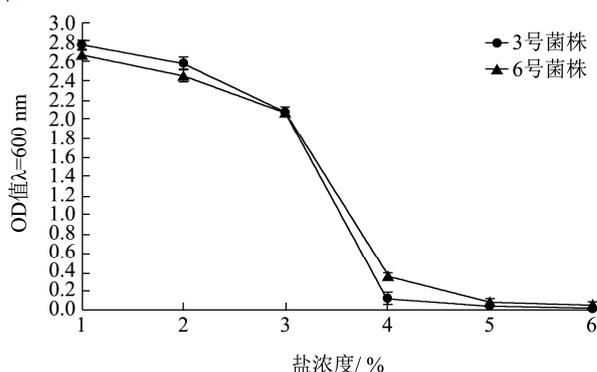


图6 不同盐浓度对菌株生长的影响

Fig.6 Effects of different salt concentrations on the growth activity of strains

将3号菌株和6号菌株分别接种于不同盐浓度的培养基中培养24h,考察其对盐的耐受情况。如图6所示,两种菌株随着盐浓度的增加,由于发酵液渗透压增加,生长逐步受到抑制,盐浓度在1%~3%之间,菌株均生长良好,盐浓度达到3%~4%时,菌体能够生长,但生长受到抑制,3号菌株和6号菌株菌液浓度OD值变化范围分别为1.951~0.119和2.057~0.359,盐

浓度达到 5%以上时, 菌株基本不生长。整个考察范围内 6 号菌株对盐的耐受能力要优于 3 号菌株。

3 结论

以白贝自然发酵调味液为分离源, 分离得到 26 株疑似乳酸菌, 经过菌落形态、菌体形态、生理生化实验、16S rDNA 鉴定, 得到 3 号菌株和 6 号菌株分别为植物乳杆菌和戊糖片球菌。分别对两种菌株的生长曲线、产酸能力、耐酸能力、耐盐能力等生物学特性考察。3 号菌株生长速度较 6 号菌株快, 且进入稳定期后, 菌体浓度也高于 6 号菌株; 3 号菌株的产酸和耐酸能力要比 6 号菌株强, 在 pH 3.5 时均能良好生长; 6 号菌株的耐盐能力略强于 3 号菌株, 但均能耐受 3%~4%的盐浓度。两种菌株具有良好的产酸、耐酸和耐盐特性, 为后续应用奠定了一定的基础。

参考文献

- [1] Fuke S, Ueda Y. Interactions between umami and other flavor characteristics [J]. Trends in Food Science & Technology, 1996, 7(12): 407-411
- [2] 尚军, 吴燕燕, 李来好. 合浦珠母贝肉酶解营养液风味改良研究[J]. 食品科技, 2010, 5: 104-108
SHANG Jun, WU Yan-yan, LI Lai-hao. Study on flavor improvement of enzymatic hydrolysis nutrient solution of *Pinctada martensii* meat in Hepu [J]. Food Science and Technology, 2010, 5: 104-108
- [3] Michael J, Janine H V. Growth of the salt tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* in microtiter plates: effects of NaCl, pH and temperature on growth and fusel alcohol production from branched-chain amino acids [J]. FEMS Yeast Research, 2003, 3: 313-318
- [4] 陆志鸿, 张丽凤, 邱燕翔. 天然海鲜提取物的制备工艺方法[J]. 中国调味品, 2016, 41(4): 112-116
CHEN Zhi-hong, ZHANG Li-feng, QIU Yan-xiang. Preparation of natural seafood extracts [J]. China Condiment, 2016, 41(4): 112-116
- [5] 陈晓婷, 吴靖娜, 苏永昌, 等. 海鲜调味品的种类及研究进展[J]. 渔业研究, 2018, 40(2): 163-168
CHENG Xiao-ting, WU Jing-na, SU Yong-chang, et al. Research progress and types of seafood condiments [J]. Journal of Fisheries Research, 2018, 40(2): 163-168
- [6] 黄志斌, 徐轩成, 杨允庄. 鱼露快速发酵工艺的研究-低盐保温发酵的效果[J]. 水产学报, 1980, 4(2): 141-146
HUANG Zhi-bin, XU Xuan-cheng, YANG Yun-zhuang. Study on Rapid fermentation technology of fish sauce-effect of low salt thermal insulation fermentation [J]. Journal of Aquatic Products, 1980, 4(2): 141-146
- [7] 魏巍. 扇贝酱发酵过程中主要理化指标及成品品质和抗氧化功能研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2014
WEI Wei. Study on the main Physicochemical Indexes, finished product quality and antioxidant function in the fermentation of scallop sauce [D]. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2014
- [8] 代永刚, 田志刚, 南喜平. 乳酸菌及其生理功能研究的进展[J]. 农产品加工(学刊), 2009, 7: 24-26, 29
DAI Yong-gang, TIAN Zhi-gang, NAN Xi-ping. Progress in the study of lactic acid bacteria and its physiological function [J]. Agricultural Products Processing (Journal), 2009, 7: 24-26, 29
- [9] 张倩, 赵鑫磊, 车笑. 乳酸菌在食品加工中的应用[J]. 食品安全导刊, 2018, 19: 76-77
ZHANG Qian, ZHAO Xin-lei, CHE Xiao. Application of lactic acid bacteria in food processing [J]. Guide to Food Safety, 2018, 19: 76-77
- [10] 彭习亮, 马成杰. 乳酸菌的生理功能及其在食品工业中的应用[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(20): 8708-8710, 8776
PENG Xi-liang, MA Cheng-jie. The physiological function of lactic acid bacteria and its application in food industry [J]. Anhui Agricultural Science, 2013, 41(20): 8708-8710, 8776
- [11] 唐贤华, 张崇军, 隋明. 乳酸菌在食品发酵中的应用综述[J]. 粮食与食品工业, 2018, 25(6): 44-46, 50
TANG Xian-hua, ZHANG Chong-jun, SUI Ming. Review on the application of lactic acid bacteria in food fermentation [J]. Food and Food Industry, 2018, 25(6): 44-46, 50
- [12] 焦兴弘. 乳酸菌在肉制品加工过程中的应用[J]. 畜牧兽医科技信息, 2008, 2: 1
JIAO Xing-hong. The application of lactic acid bacteria in the processing of meat products [J]. Animal and Veterinary Science and Technology Information, 2008, 2: 1
- [13] 高鹏飞, 张善亭, 赵树平, 等. 乳酸菌在水产养殖业中的应用[J]. 家畜生态学报, 2014, 35(7): 82-86
GAO Peng-fei, ZHANG Shan-ting, ZHAO Shu-ping, et al. Application of lactic acid bacteria in aquaculture [J]. Journal of Animal Ecology, 2014, 35 (7): 82-86
- [14] 凌代文, 东秀珠. 乳酸菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社. 1993: 57, 80-82.
LING Dai-wen, DONG Xiu-zhu. Classification, Identification and Experimental method of Lactic Acid Bacteria [M]. Beijing: China Light Industry Press. 1993: 57, 80-82

(下转第 292 页)