

林标声,吴江文,江火香,等. 适合银杏叶发酵的菌株筛选及发酵效果[J]. 江苏农业科学,2016,44(4):315-317.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.04.090

适合银杏叶发酵的菌株筛选及发酵效果

林标声^{1,2}, 吴江文¹, 江火香¹, 戴爱玲^{1,2}, 杨小燕^{1,2}

(1. 龙岩学院生命科学学院, 福建龙岩 364012; 2. 福建省预防兽医学与兽医生物技术重点实验室, 福建龙岩 364012)

摘要:研究了适合银杏叶发酵的菌株及其发酵效果。结果表明,银杏叶添加浓度为 40%~50% 时,地衣芽孢杆菌、嗜热乳杆菌、产朊假丝酵母适合用于银杏叶发酵,其最佳的比例混合为 2:1:1,最优的发酵工艺条件为接种量 5%,含水量 50%、发酵时间 15 d,发酵温度 30 ℃,与发酵前物料相比,发酵后银杏叶制剂菌株大量生长,产生乳酸,粗蛋白、氨基酸含量显著上升,提高了产品的益生菌含量、适口性及营养成分。

关键词:银杏叶;发酵菌株;筛选;地衣芽孢杆菌;嗜热乳杆菌;产朊假丝酵母

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)04-0315-03

银杏(*Ginkgo biloba* L.) 是世界上最古老的孑遗植物,为中国特有珍稀树种,分布广泛,资源丰富。银杏的药用价值主要体现在叶和果实上,我国宋朝时民间就使用银杏叶治疗哮喘和支气管炎^[1]等疾病。自 20 世纪 60 年代起,国内外学者对银杏叶的化学成分、药理作用、药物功效等进行了大量的相关研究,结果表明,银杏叶化学成分复杂,种类较多,许多成分具有重要的生理功能及活性^[2]。到目前为止,从银杏叶中分离出的化学活性成分有 160 余种,包括银杏黄酮类、有机酸类、萜内酯类、烷基酚酸类、银杏酚类、醇类及甾类等^[3]。银杏叶的食用安全性也较高,目前,以银杏叶及提取物为原料的药物和保健食品等已经大量上市。特别是近年来银杏叶作为

饲料添加剂,在畜禽饲养方面有了一定的运用,能起到促进畜禽肠胃吸收、促生长、增强免疫力等功效,其作为一种新型饲料添加剂在畜牧业中具有广阔的开发应用前景^[4-5]。银杏叶的相关开发,主要以银杏叶提取物为主,但银杏叶提取物的传统溶剂浸提法既造成了大量有效成分的损失,也无法保证产品的纯天然性^[6]。而利用微生物发酵银杏叶制成微生物发酵剂,既克服了传统方法的缺点,又使银杏叶功效成分得到更好的直接释放^[7]。从国内外资料调查可知,银杏叶在畜牧业上的应用还很少,特别是将银杏叶微生物发酵剂开发及作为饲料添加剂在生猪中的应用还未见报道,可能是银杏叶制剂的相关成分对微生物有一定的抑制作用,限制了银杏叶发酵制剂的研制与开发^[8-9]。因此,本研究以银杏叶为发酵基质,通过筛选适合银杏叶发酵的优良菌株,优化其配伍组合,考察其发酵效果,为将来进一步开发出操作易行、装置简易且成本低廉、营养丰富、适口性好的银杏叶发酵制剂产品提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

银杏叶购自市场,在 60 ℃ 烘干后粉碎,过 20 目筛备用,装入自封袋密封保存。

收稿日期:2015-11-04

基金项目:福建省发改委省级战略性新兴产业技术开发专项(编号:闽发改高技[2013]577);福建省科技厅设区市属高校科研立项(编号:JK2014051);福建省科技厅重大专项(编号:2014NZ0002);福建省大学生创新创业训练计划(编号:201511312053)。

作者简介:林标声(1980—),男,福建连城人,硕士,讲师,主要从事微生物学研究。E-mail:150391768@qq.com。

通信作者:杨小燕,教授,主要从事动物医学研究。E-mail:Lyxy1988@126.com。

[8] 吕恩利,杨洲,陆华忠,等. 保鲜运输用液氮充注气调温度调节性能的优化[J]. 农业工程学报,2012,28(13):237-243.

[9] 陈叔平,昌锐,刘振全,等. 低温翅片管换热器的传热试验研究[J]. 低温技术,2006,34(2):91-93.

[10] 刘建军,张继军,王振涛,等. 果蔬气调冷库环境的智能化控制系统[J]. 轻工机械,2005,22(2):91-93.

[11] 林锋,谢晶,陈邓曼. 果蔬气调库贮藏中温湿度控制及气密性措施[J]. 制冷,2000,19(4):41-44.

[12] 王广海,吕恩利,陆华忠,等. 基于 PLC 的多厢体气调试验平台控制系统的设计与实现[J]. 江苏农业科学,2015,43(5):389-392.

[13] 韩小腾,陆华忠,吕恩利,等. 保鲜运输用高压雾化加湿系统湿度调节特性的试验[J]. 农业工程学报,2011,27(7):332-337.

[14] 吴琼,张长利,董守田. 马铃薯贮藏环境监测系统设计[J]. 农机化研究,2013,35(1):138-140.

[15] 吕恩利,陆华忠,杨洲,等. 气调保鲜运输车通风系统阻力特

性试验[J]. 农业机械学报,2011,42(3):120-124.

[16] Castro L, Vigeant C, Cortez L A B. Cooling performance of horticultural produce in containers with peripheral openings[J]. Post-harvest Biology and Technology,2005,38(3):254-261.

[17] Ferrua M J, Singh R P. Modeling the forced-air cooling process of fresh strawberry packages. Part I: Numerical model[J]. International Journal of Refrigeration,2009,32(2):335-348.

[18] Vigneault C, Markarian N R, Silva A, et al. Pressure drop during forced-air ventilation of various horticultural produce in containers with different opening configurations[J]. Transactions of the ASAE,2004,47(3):807-814.

[19] 闫国琦,杨洲,马征. 龙眼压差通风预冷装置风速控制与能耗分析[J]. 农业机械学报,2009,40(3):125-129.

[20] 吕恩利,陆华忠,杨洲,等. 番茄差压预冷过程中的通风阻力特性[J]. 农业工程学报,2010,26(7):341-345.

初始菌株来源:市场购买的各畜用复合微生物发酵剂冻干菌粉(包括酵母菌,双歧杆菌、嗜热乳杆菌,枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌等),各有效菌活性乳酸菌含量 ≥ 20 亿/g。

1.2 方法

1.2.1 银杏叶发酵的整体工艺流程

发酵菌种(筛选、配比)→37℃ 红糖水活化(30 min)
↓
发酵原料(银杏叶、红糖,硫酸铵、水等)→混合→呼吸膜包装、密封→发酵(常温、10~15 d)→检测产品(总菌数、pH 值、营养成分等)。

1.2.2 银杏叶发酵发酵菌株的筛选 银杏叶发酵液与发酵菌株培养基的配制:将银杏叶粉碎后,过筛 40~50 目,短时瞬间高温蒸煮,配制出浓度为 300~600 mg/mL 溶液加入到适合各菌生长的培养基中,作为筛选培养基。

分别取 1 g 复合菌剂于 9 mL 无菌水中,振荡 15~20 min 后,适当稀释。分别取 0.1~0.2 mL 稀释液于筛选培养基中,酵母菌采用 YPD 培养基,乳酸菌采用 MRS 培养基,芽孢杆菌采用菌液 60℃ 加热 15~20 min 后涂布于 LB 培养基中。培养观察不同浓度银杏叶条件下各菌长势,挑选生长旺盛、形态完整的菌株作为选定菌株。经形态、显微、生理生化鉴定,最终确定适合银杏叶发酵的微生物菌株类型及属性。

1.2.3 发酵菌株最适合菌株配比、接种量的筛选 将所筛选的各菌均培养至 10 亿~100 亿个/mL,各均按设定的比例取量混合,总菌量再按物料总量 4%~5% 的比例接入到 35~37℃ 温水中搅拌、活化 20~30 min,温水中含总发酵物料 80~100 mg/mL 红糖。菌株活化后,与银杏叶 450~480 mg/mL、硫酸铵 40~50 mg/mL、维生素 C 1~2 mg/mL、硫酸钾 1~2 mg/mL 混合均匀,并补充水分至 450 mg/mL,用装量 1~2 kg 呼吸膜包装、密封,常温(25℃)生料发酵 12 d,发酵后检测各项指标,选定最合适的菌株组合比例。各菌比例及接种量按表 L₈2⁷ 正交试验表安排进行。

1.2.4 银杏叶发酵工艺条件的优化 将所筛选的各菌均培养至 10 亿~100 亿个/mL,按照选定的最优组合的发酵菌株比例及接种量加入 35~37℃ 温水搅拌、活化 20~30min,温水中含总发酵物料 80~100 mg/mL 红糖。菌株活化后,与银

杏叶 450~480 mg/mL、硫酸铵 40~50 mg/mL、维生素 C 1~2 mg/mL、硫酸钾 1~2 mg/mL 混合均匀,并补充水分至 400~500 mg/mL,用装量 1~2 kg 呼吸膜包装、密封,常温(20~35℃)生料发酵 10~15 d。发酵物料含水量、发酵温度及发酵时间是银杏叶发酵效果的重要因素,试验采用 L₉3⁴ 正交表进行优化试验。

1.2.5 银杏叶发酵效果的评价 在选定的最优工艺条件下发酵银杏叶,对其进行感官评定及营养分析,并与发酵前物料成分进行对比分析,分析银杏叶发酵后各指标的变化情况。

1.2.6 测定分析方法 pH 值采用上海雷磁仪器厂生产的 PHS-25 型酸度计测定;乳酸含量采用南京建成乳酸检测试剂盒测定;纤维采用酸碱煮沸法测定;黄酮采用芸香苷比色法测定;蛋白凯氏定氮法测定;总氨基含量采用 S433D 全自动氨基酸测定。各检测方法参照国家饲料检测分析标准进行^[10]。

2 结果与分析

2.1 发酵菌株的筛选及鉴定

不同浓度银杏叶条件下,所接各菌的长势情况见表 1,结果表明,不同类型的培养基中,银杏叶浓度越高,其对菌株的抑制作用越强。为了充分利用银杏叶中的营养成分,综合考虑选定银杏叶添加浓度 40%~50% 时,并从中筛选生长旺盛、长势良好、形态结构完整的菌落进行扩培、鉴定^[11],结果见表 2,选定的菌株鉴定为地衣芽孢杆菌、嗜热乳杆菌、产朊假丝酵母。

表 1 不同浓度下银杏叶对微生物生长的影响			
银杏叶煮液浓度 (%)	LB 培养基	MRS 培养基	YPD 培养基
30	+++++	+++	+++
40	+++	+	++
50	++	+	+
60	+	-	-

注:“+”表示菌种长势,越多表示菌种长势越好;“-”表示菌种不生长。

表 2 筛选菌株的形态及生理生化鉴定			
培养基	形态鉴定	生理生化鉴定	结论
LB 培养基	菌落白色、扁平、表面粗糙皱褶、边缘不整齐、细胞呈杆状,有芽孢,近中生,椭圆形,孢囊稍膨大,直径为 0.8 μm	发酵 D-甘露醇、柠檬酸盐,不发酵山梨醇、阿拉伯糖、木糖、苦杏仁苷,淀粉水解,明胶液化, V. P. 试验阳性	地衣芽孢杆菌
MRS 培养基	菌落灰白,凸起、表面粗糙、边缘卷曲,细胞球形,成对或成链排列,有二球体连接、三球体连接等,无芽孢,直径为 0.5~2.0 μm	发酵七叶苷、纤维二糖和麦芽糖、水杨素和蔗糖,不能发酵甘露醇、山梨醇	嗜热乳杆菌
YPD 培养基	菌落乳白色,边缘有菌丝,平滑,有光泽,细胞呈腊肠形、椭圆形,直径为 3.5~4.5 μm	发酵葡萄糖、棉子糖,蔗糖、硝酸盐,不能发酵乳糖、半乳糖、麦芽糖和蜜二糖	产朊假丝酵母

2.2 发酵菌株最适合菌株配比、接种量

发酵菌株最适合菌株配比、接种量的试验结果见表 3。结果表明,地衣芽孢杆菌生长最为旺盛,生长快,当其比例多时,微生物总菌数也多。当微生物总菌数高时,各菌联合作用,银杏叶基质利用较多,所得蛋白含量、产生的乳酸含量也较高,为了便于提高工作效率,选定总菌数为筛选指标参考依据,按

正交试验结果,选定的最优组合为 A₂B₁C₁D₂,即地衣芽孢杆菌:嗜热乳杆菌:产朊假丝酵母=2:1:1,接种量 5%,此条件下各菌生长旺盛,乳酸含量较多,粗蛋白和多肽含量也较高。

2.3 发酵工艺条件的优化

银杏叶发酵工艺条件的优化结果见表 4、表 5,结果表明,

表 3 最适合菌株配比、接种量正交试验结果

试验号	A:地衣芽孢杆菌	B:嗜热乳杆菌	C:产朊假丝酵母	D:接种量	检测指标		
					总菌数 (亿个/mL)	粗蛋白 含量(%)	乳酸含 量(%)
1	1	1	1	4%	123	19.82	0.53
2	1	1	1	5%	110	19.59	0.60
3	1	2	2	4%	97	19.40	0.51
4	1	2	2	5%	76	18.69	0.59
5	2	1	2	4%	157	17.74	0.45
6	2	1	2	5%	172	18.29	0.56
7	2	2	1	4%	142	18.14	0.42
8	2	2	1	5%	180	18.30	0.58
k_1	101.5	134.8	138.8	124.0			
k_2	162.8	123.8	125.5	134.5			
R	61.3	11.0	13.3	10.5			

最佳的制备工艺条件为 $A_3B_3C_2$, 即含水量 50%、发酵时间 15 d、发酵温度 30 ℃, 其中发酵物料含水量对发酵过程影响最大, 达到极显著水平。

2.4 银杏叶发酵效果评价

银杏叶发酵后与发酵前的营养成分进行对比分析, 结果见表 6。结果表明, 发酵后复合菌株大量生长, 嗜热乳杆菌产生了乳酸的香味, 并且地衣芽孢杆菌、产朊假丝酵母将银杏叶中的纤维、黄酮分解, 使其发酵物质中的粗蛋白、氨基酸含量

表 6 银杏叶发酵前后的感官评定及营养分析

项目	感官评定	pH 值	乳酸含量 (%)	总菌数 (个/mL)	总纤维含量 (%)	总黄酮含量 (%)	粗蛋白含量 (%)	总氨基酸含量 (%)
发酵前	墨绿色, 树叶涩味	5.08	≈0	1.12×10^5	1.06	1.15	11.17	7.57
发酵后	棕褐色, 酸香味浓, 质地细腻	4.25	0.69	2.20×10^{10}	0.18	0.99	20.31	10.18
变化		-0.83	0.69	2.20×10^{10}	-0.88	-0.16	9.14	2.61

3 结论与讨论

通过含不同浓度银杏叶的筛选培养基得到适合银杏叶发酵的微生物菌株, 通过鉴定确认为地衣芽孢杆菌、嗜热乳杆菌、产朊假丝酵母, 并通过正交试验, 优化得到了适合银杏叶发酵的最佳工艺条件为: 地衣芽孢杆菌、嗜热乳杆菌、产朊假丝酵母以 2 : 1 : 1 比例混合, 接种量按总发酵物料 5% 接种, 含水量 50%、发酵时间 15 d, 发酵温度 30 ℃, 与发酵前物料相比, 发酵后复合菌株大量生长, 嗜热乳杆菌产生了乳酸的香味, 并且地衣芽孢杆菌、产朊假丝酵母将银杏叶中的纤维、黄酮分解, 使其发酵物质中的粗蛋白、氨基酸含量显著上升, 提高了产品的益生菌含量、适口性及营养成分。

银杏叶发酵制剂的研制国内报道较少, 本研究采用多菌联合发酵银杏叶是一个开创性的工作, 各益生菌相互作用, 对银杏叶中的基质能更好地利用, 所得营养物质更为丰富, 这对银杏叶制剂的推广应用具有更好的现实作用^[12-13]。而对银杏叶发酵制剂产品的实际开发、使用对象、使用效果等有待于进一步研究阐明。

参考文献:

[1] 胡小戎, 曹凤梅. 银杏叶药理作用与应用[J]. 数理医药学杂志, 2003, 16(4): 342-343.
[2] 史清文, 刘素云, 张文素, 等. 银杏叶的研究开发概况[J]. 天然

表 4 发酵工艺条件的正交试验结果

试验号	A:含水量 (%)	B:发酵时间 (d)	C:发酵温度 (℃)	总菌数 (亿个/mL)
1	40	10	20	98
2	40	12	30	122
3	40	15	35	106
4	45	10	30	185
5	45	12	35	172
6	45	15	20	185
7	50	10	35	182
8	50	12	20	184
9	50	15	30	197
k_1	109	155	156	
k_2	181	159	168	
k_3	188	163	153	
R	79	8	15	

表 5 发酵工艺条件的正交试验的方差分析

变异来源	离均平方和	自由度	均方	F 值	P 值
含水量	1.145	2	0.572 **	141.964	0.007
发酵时间	0.009	2	0.004	1.104	0.476
发酵温度	0.038	2	0.019	4.681	0.177
误差	0.008	2	0.004		

显著上升, 提高了产品的益生菌含量、适口性及营养成分。

产物研究与开发, 1995, 7(1): 70-76.

[3] 张玉祥, 李宗伟. 银杏叶有效成分的提取工艺进展[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(6): 1076-1077.
[4] 曹福亮, 陈桂银, 汪贵斌, 等. 银杏叶生物饲料添加剂对黄羽肉仔鸡生长及免疫的影响[J]. 江苏林业科技, 2006, 33(2): 16-17.
[5] 曹福亮, 赵林果, 汪贵斌, 等. 生物转化银杏叶制备复合型生物饲料添加剂的研究及应用前景[J]. 江苏林业科技, 2006, 33(2): 44-47.
[6] 盛建国, 黄东余. 银杏叶提取工艺及其抑菌性能探讨[J]. 食品工业科技, 2005, 26(1): 65-67.
[7] 金 丽. 中药-银杏叶复合饲料添加剂的制备及效果研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2009.
[8] 杨小明, 叶允荣, 王 萍, 等. 银杏叶提取物和银杏酸的抗菌活性研究[J]. 食品科学, 2004, 25(4): 68-71.
[9] 李 焰, 杨小燕, 林跃鑫, 等. 银杏叶有效成分提取与抑菌效果研究[J]. 中国畜牧杂志, 2006, 42(15): 54-56.
[10] 张丽英. 饲料分析及饲料质量检测技术[M]. 3 版. 北京: 中国农业大学出版社, 2007.
[11] 布坎南. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.
[12] 唐燕红, 张日俊. 微生物在中草药添加剂中的应用研究进展[J]. 中国饲料, 2004(12): 20-21, 25.
[13] 陆欣媛, 刘松梅, 郑春英, 等. 中药发酵研究概况[J]. 黑龙江医药, 2006, 19(6): 469-470.