

杜斌,吴文能,王继玥,等. 侗族传统腌鱼中乳酸菌的分离鉴定与生物学特性[J]. 江苏农业科学,2018,46(7):185-188.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.07.046

侗族传统腌鱼中乳酸菌的分离鉴定与生物学特性

杜斌,吴文能,王继玥,周笑犁,余旭

(贵阳学院食品与制药工程学院,贵州贵阳 550005)

摘要:对侗族传统发酵腌鱼中的乳酸菌进行分离鉴定,并对其生长特性进行研究。从产品中分离得到乳酸菌疑似菌株 16 株,经生理生化鉴定,初步确定为消化乳杆菌(8 株)、植物乳杆菌(4 株)、草乳杆菌(2 株)和发酵乳杆菌(2 株)。结合生理生化鉴定结果,对样品中分离出的 ZZY-6、CJY1-1、ZZY-3 和 CJY2-3 等 4 株分离菌株进行 16S rDNA 基因序列分析,构建系统发生树。经分析可知,ZZY-6 为消化乳杆菌(*Lactobacillus alimentarius*),CJY1-1 为植物乳杆菌(*L. plantarum*),ZZY-3 为草乳杆菌(*L. graminis*),CJY2-3 为发酵乳杆菌(*L. fermentum*)。生长特性研究结果显示,分离所得菌株均具有良好的生长性能、产酸性能和耐盐性,但均未检测到脂肪酶活性,仅植物乳杆菌表现出蛋白酶活性。

关键词:发酵腌鱼;乳酸菌;分离;生物学特性

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)07-0185-04

贵州黔东南苗族、侗族自治州的传统民族食品腌鱼,主要是以稻田养殖的鲤鱼为原料,将鲤鱼由背部剖开并除去内脏,盐腌 16~24 h 后,拌入糯米饭、辣椒粉及其他辅助香料入坛(桶),放置于避光阴凉的地方自然发酵而成。腌鱼集甜、酸、辣、麻、咸于一体,口感软嫩,味道鲜美,可生吃,亦可煎、炸、烤、蒸,是当地民众招待客人的上乘佳肴^[1-2]。但是由于传统手工艺制作过程复杂,发酵时间较长,目前腌鱼还没有大规模生产和上市流通。乳酸菌作为传统发酵肉制品中的优势菌群,对产品风味的形成和营养品质变化起着至关重要的作用。目前对于少数民族传统发酵肉制品中乳酸菌的研究还比较缺

乏,为此,本研究以侗族传统民族食品腌鱼为材料,对成品中的乳酸菌进行分离鉴定,并利用 16S rRNA 序列分析方法进行菌种鉴定,以期发现腌鱼中特有的菌种资源,为改进其传统工艺,进而发掘有益乳酸菌打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 试验材料 本试验用稻田鲤鱼捕捉于贵州省黔东南州黎平县,采用当地农户传统腌制方法腌制 60d 制成成品,另外收集当地农户的腌鱼成品,共 3 份样品。采样时严格按照 GB/T4789.1—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 总则》操作。腌鱼样品分别编号为 ZZY、CJY-1、CJY-2 (ZZY 为自制腌鱼,CJY-1、CJY-2 为采集样品)。

1.1.2 培养基及主要试剂 MRS 肉汤培养基,购自北京奥博星生物技术有限公司;PCR 相关试剂,均购自北京全式金生物技术有限公司;微量生化鉴定管,购自青岛海博生物技术有限公司。

收稿日期:2016-11-07

基金项目:贵州省科技厅博士基金(编号:黔科合基础[2017]1167);

贵州省教育厅青年科技人才成长项目(编号:黔教合 KY 字[2016]242);贵州省普通高等学校功能食品重点实验室(编号:黔教合 KY 字[2016]007);贵州省大学生创新创业训练计划(编号:201710976012);贵阳学院人才启动基金(编号:201603751113)。

作者简介:杜斌(1983—),男,内蒙古呼和浩特人,博士研究生,讲师,主要从事食品微生物研究。E-mail:daniellu83@hotmail.com。

porosity product (carrot) as affected by power ultrasound [C]//3rd International Conference on Diffusion in Solids and Liquids, 2007: 764-769.

[16] Mulet A, C R J, Sanju N N, et al. New food drying technologies - use of ultrasound [J]. Food Science and Technology International, 2003, 9(3): 215-221.

[17] Cárcel J A, Benedito J, Rosselló C, et al. Influence of ultrasound intensity on mass transfer in apple immersed in a sucrose solution [J]. Journal of Food Engineering, 2007, 78(2): 472-479.

[18] 赵芳,陈振乾,施明恒. 苹果片超声波预干燥传质过程试验研究[J]. 东南大学学报(自然科学版), 2011, 41(1): 124-128.

[19] Sun B Z, Huai X L, Jiang R Q, et al. Mass transfer during osmotic dehydration using acoustic cavitation [J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2005, 13(1): 13-17.

[20] 张丽晶,林向阳,彭树美,等. 响应面法优化绿茶微波真空干燥工艺条件[J]. 食品科学, 2009, 30(22): 122-125.

[21] Cárcel J A, García - Pérez J V, Riera E, et al. Improvement of convective drying of carrot by applying power ultrasound influence of mass load density [J]. Drying Technology, 2011, 29(2): 174-182.

[22] 马空军,贾殿赠,包文忠,等. 超声场强化渗透脱水传质机理模型研究[J]. 食品科学, 2011, 32(13): 94-101.

[23] Rastogi N K. Opportunities and challenges in application of ultrasound in food processing [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2011, 51(8): 705-722.

[24] Clemente G, Sanjuan N, Andres Cárcel J, et al. Influence of temperature, air velocity, and ultrasound application on drying kinetics of grape seeds [J]. Drying Technology, 2014, 32(1): 68-76.

1.2 仪器与设备

立式电热压力蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂;电热恒温培养箱,上海一恒科技有限公司;2720 Thermal Cycler PCR 仪,Applied Biosystems;DYY-5 型电泳仪,北京市六一仪器厂;FR980 凝胶成像仪,上海复日科技仪器有限公司;SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 菌株分离纯化 取 3 g 样品,剪碎后放入 MRS 液体培养基中,37 ℃ 恒温厌氧培养 48 h 后,对培养液进行 10 倍梯度稀释,取 200 μL $10^4 \sim 10^7$ 倍稀释液于含有 2% CaCO_3 的 MRS 固体培养基中,37 ℃ 培养 48 h,挑取有溶钙圈的单菌落接种于 MRS 固体培养基中,进行多次划线分离,挑选革兰氏阳性(G^+)、过氧化氢酶阴性(H_2O_2^-)的单菌落并进行保藏。

1.3.2 生理生化鉴定 参考《一般细菌常用鉴定方法》^[3],对分离纯化的乳酸菌进行生理生化鉴定。

1.3.3 16S rDNA 分析

1.3.3.1 16S rDNA 基因序列 PCR 扩增 取单菌落置于离心管中,加入 20 μL 无菌蒸馏水重悬,沸水浴 10 min,12 000 r/min 离心 5 min。上清中即含 16S rDNA 基因。采用细菌通用引物 16S rDNA-F:5'-CAGAGTTTGATCTCGCT-3',16S rDNA-R:5'-AGGAGGTGATCCAGCCG CA-3',以基因组 DNA 为模板 PCR 扩增 16S rDNA 基因。

25 μL 反应体系:1 μL 模板 DNA,各 2.5 μL 引物(1 $\mu\text{mol/L}$),12.5 μL 2 × EasyTaq PCR SuperMix,6.5 μL 去离子水。反应程序:94 ℃ 5 min;94 ℃ 1 min,58 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min,25 个循环;72 ℃ 2 min。用 1.0% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.3.3.2 菌株同源性分析及系统发育树的构建 将菌株序列在 GenBank 数据库中进行 Blast 同源性比对分析,运用 MEGA 7.0 软件的相邻算法构建系统发育树,判断目的菌株的分类地位。

1.3.4 菌株生长能力和产酸能力测定 将待测菌株接种于 MRS 液体培养基中,37 ℃ 培养 24 h,以未接种菌液的 MRS 培养基作为空白对照,每隔 2 h 取 200 μL 培养液,采用酶标仪测定其 $D_{600\text{nm}}$ 及培养液 pH 值。每个样平行测定 3 次。

1.3.5 温度对菌株生长的影响 将分离菌株接种于 MRS 液体培养基中,分别于 15、20、30、37、45、50 ℃ 条件下培养 24 h,以未接种菌液的培养基作为空白对照, $D_{600\text{nm}}$ 的测定方法同“1.3.4”节,研究温度对待测菌株生长代谢的影响。

1.3.6 NaCl 浓度对分离菌株生长代谢的影响 将分离菌株接种于含盐量分别为 0%、2%、4%、6%、8%、10% 的 MRS 液体培养基中,37 ℃ 培养 24 h,以未接种菌液的培养基作为空白对照, $D_{600\text{nm}}$ 测定方法同“1.3.4”节。

1.3.7 蛋白酶活性的测定 参照文献[4]进行,略有改动,分别以添加 15% 脱脂牛乳的 MRS 和营养琼脂固体培养基作为测定蛋白酶活性的专用培养基。将待测菌接种于 MRS 液体培养基中,于 37 ℃ 培养 24 h 后,无菌吸取 100 μL 培养液,接种于蛋白酶检测专用培养基中,涂布均匀,于 37 ℃ 培养 24 h,若菌落周围有透明环,则为阳性。

1.3.8 脂肪酶活性的测定 参照文献[5]进行,略有改动,

分别以添加 15% 牛油、0.5% 中性红指示剂的 MRS 和营养琼脂固体培养基作为测定脂肪酶活性的专用培养基。将待测菌株接种于 MRS 液体培养基中,于 37 ℃ 培养 24 h 后,无菌吸取 100 μL 培养液,接种于脂肪酶检测专用培养基中,涂布均匀,于 37 ℃ 培养 24 h,若培养基上出现红色斑点,则为阳性。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离

本试验采用 MRS 选择性培养基,对 3 个样品中的优势乳酸菌群进行分离及纯化。经显微镜观察菌落形态、革兰氏染色、过氧化氢酶试验,得到 G^+ 和 H_2O_2^- 菌株共 16 株,初步鉴定均为乳酸菌。其中从样品 ZZY 中分离得到 7 株,从 CJY-1 中分离得到 6 株,从 CJY-2 中分离得到 3 株。所获菌株的菌落形态多为边缘整齐、表面光滑或稍粗糙,MRS 培养基中的菌落呈乳白色或浅黄色凸起的圆形。镜检观察全部为杆状或短杆状,成单、对或堆排列。

2.2 生理生化鉴定

对上述 16 株乳酸菌进一步进行生理生化鉴定试验,结果见表 1。可以看出,所有乳酸菌产酸,不可水解明胶和淀粉;查阅《一般细菌常用鉴定方法》《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》^[3,6],初步确定乳酸菌主要为消化乳杆菌(8 株)、植物乳杆菌(4 株)、草乳杆菌(2 株)和发酵乳杆菌(2 株)。可以看出,消化乳杆菌为侗族传统腌鱼产品中的优势乳酸菌之一,从菌株数量来看较多。该结果与盐干带鱼微生物区系研究较为相似^[7],但与其他传统肉制品的微生物区系研究具有较大的差异,如干腌牛肉(Cecina de Leon)以及云南干腌火腿中乳酸菌属细菌以植物乳杆菌、发酵乳杆菌为优势菌^[8],这可能是由加工原料及加工工艺的不同造成的。

2.3 16S rDNA 分析

根据生化鉴定结果,分别对菌株 ZZY-6、CJY1-1、ZZY-3 和 CJY2-3 进行 16S rDNA 分子生物学鉴定,将 PCR 扩增产物用琼脂糖凝胶电泳进行分析,如图 1 所示,4 株待测菌条带明亮清晰,且无明显拖尾,均在 1 500 bp 附近,可以进行序列检测。

2.4 测序结果分析

将 PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序分析,通过 BLAST,将所测定的菌株序列结果与 GenBank 数据库中已知菌株序列进行比对,寻找与目的基因序列同源性最高的已分类的菌种,然后用软件 MEGA 6 进行序列分析,构建系统发育树。如图 2 所示,所分离菌株 ZZY-6、CJY1-1、ZZY-3 和 CJY2-3 的遗传进化分别与已知消化乳杆菌(*Lactobacillus alimentarius* W369/*L. alimentarius* IMAU80036)、已知植物乳杆菌(*L. plantarum* Ni344/*L. plantarum* WCFS1)、已知草乳杆菌(*L. graminis* LMG 9825)和已知发酵乳杆菌(*L. fermentum* KFC/*L. fermentum* M17-1)同处于一个分支,同源性高达 99%。这一结果与生化鉴定结果完全一致。

2.5 菌株生长特性

2.5.1 生长曲线的测定 对菌株 ZZY-6、CJY1-1、ZZY-3 和 CJY2-3 进行生长曲线研究。由图 3 可知,4 株乳酸菌中只有草乳杆菌 ZZY-3 在培养 6 h 后进入生长对数期,18 h 后才趋于平缓生长,而其他 4 株菌均表现出相似的生长特性,在

表 1 分离菌株的生理生化鉴定

指标	ZZY-1	ZZY-2	ZZY-3	ZZY-4	ZZY-5	ZZY-6	ZZY-7	CJY1-1	CJY1-2	CJY1-3	CJY1-4	CJY1-5	CJY1-6	CJY2-1	CJY2-2	CJY2-3
果糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
海藻糖	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	±
鼠李糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
甘露糖	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+
木糖	-	+	+	+	-	-	±	+	-	-	+	-	-	+	-	±
半乳糖	+	±	+	±	+	+	+	±	+	+	±	+	+	+	+	+
山梨醇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
蔗糖	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+
麦芽糖	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+
D-阿拉伯糖	±	+	-	+	±	±	±	+	±	±	+	±	±	-	±	±
甘露醇	-	±	-	±	-	-	-	±	-	-	±	-	-	-	-	-
纤维二糖	+	-	+	-	+	+	±	-	+	+	-	+	+	+	+	±
乳糖	-	+	±	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	±	-	+
淀粉	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
明胶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V-P 反应	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注：“+”表示阳性，“-”表示阴性，“±”表示 11% ~89% 的菌株为阳性。表 2 同。

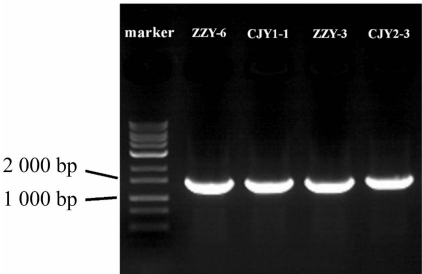


图1 16S rDNA区域扩增电泳结果

4 h 后进入对数生长期,14 h 后达到稳定生长期,比较 $D_{600\text{ nm}}$ 可知,消化乳杆菌 ZZY-6、植物乳杆菌 CJY1-1 和发酵乳杆菌 CJY2-3 的生长速率要高于草乳杆菌 ZZY-3,更早到达平台期。

2.5.2 产酸性能的测定 图 4 表明,ZZY-6、CJY1-1、ZZY-3 和 CJY2-3 等 4 株待测菌株均有较好的产酸能力,培养 4 h 后,菌株 ZZY-6、CJY1-1 和 CJY2-3 发酵液的 pH 值均快速下降。培养 14 h 后,这 3 株菌培养 pH 值均下降到 4.0 左右。而菌株 ZZY-3 培养 16 h 后发酵液 pH 值才降到 4.0,

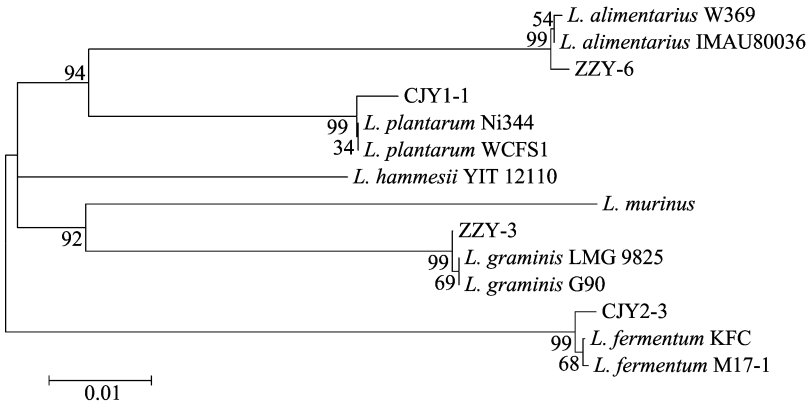


图2 基于16S rDNA 序列的乳酸菌系统发育树

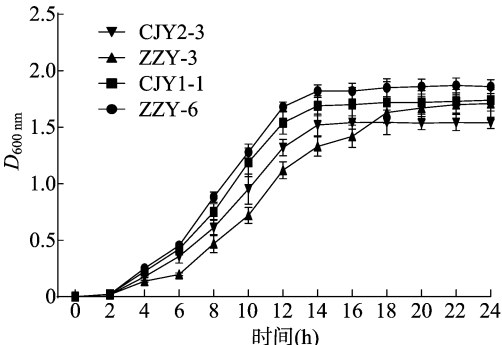


图3 分离菌株生长曲线

这与菌株生长情况基本是对应的。结果表明,分离菌株符合发酵肉制品发酵剂的要求,可快速使环境 pH 值下降,因此能抑制腐败菌的生长^[9],提高产品的安全性。

2.5.3 发酵温度对分离菌株生长代谢的影响 温度对于菌株生长及产酸影响较大,由图 5 可知,环境温度在 15 ~37 ℃ 范围内时,分离菌株的 $D_{600\text{ nm}}$ 逐渐升高,当温度高于 40 ℃ 时,其 $D_{600\text{ nm}}$ 开始下降;当温度继续升高,菌株的生长受到极大抑制,因此分离菌株最适发酵温度为 37 ℃。

2.5.4 NaCl 浓度对生长的影响 传统腌鱼腌制时通常要加入一定量的 NaCl,鱼体内 NaCl 含量较高,而对 NaCl 的耐受能力是选择发酵肉制品发酵剂的一个重要因素,筛选出的菌

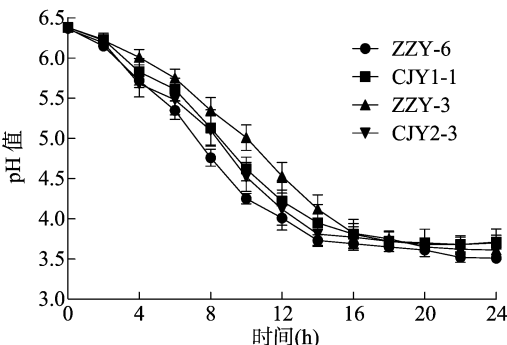


图4 分离菌株产酸曲线

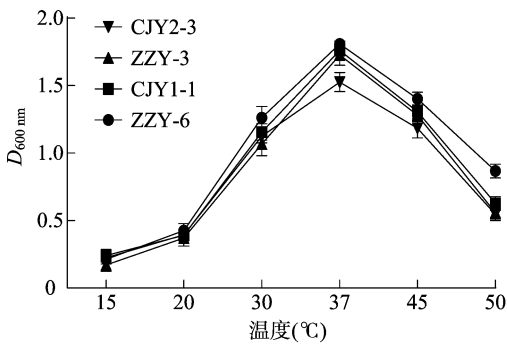


图5 温度对分离菌株生长的影响

株通常要求至少能够在 6% 的 NaCl 浓度下正常生长^[10]。本试验考察了 NaCl 浓度对 4 株菌株生长的影响,如图 6 所示,随着 NaCl 浓度的升高,4 株菌株的生长均受到不同程度的抑制,随着 NaCl 浓度增大,抑制作用越强;当 NaCl 浓度在 0 ~ 4% 时,菌株受到的抑制作用较小;当 NaCl 浓度达到 6% 时,菌株生长力均有所下降但仍能生长,表明这 4 株菌对 NaCl 具有一定的耐受能力,该分离菌株在腌鱼发酵过程中有较强竞争力,可作为相关肉制品的备选发酵剂。

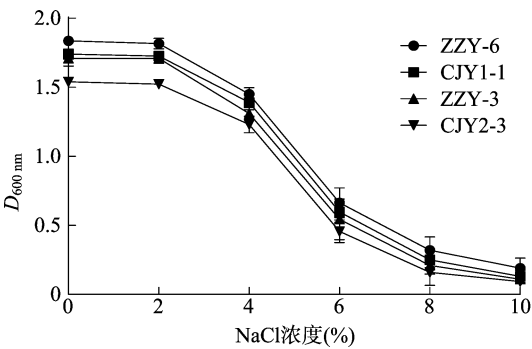


图6 NaCl 浓度对分离菌株生长的影响

2.5.5 蛋白酶活性与脂肪酶活性测定 乳酸菌蛋白酶活性与脂肪酶活性,是筛选性质优良、稳定性强的工业生产菌株的主要指标^[11-13]。本研究初步分析了 4 个菌株的相应酶活性。由表 2 可知,只有植物乳杆菌 CJY1-1 具有蛋白酶活性,而其余 3 株菌株均未检测到蛋白酶活性;这 4 株菌株脂肪酶的检测结果均为阴性,表明分离得到的菌株均不具有脂肪酶活性。

表 2 分离菌株的蛋白酶活性和脂肪酶活性

酶类别	消化乳杆菌 ZZY-6	植物乳杆菌 CJY1-1	发酵乳杆菌 CJY2-3	草乳杆菌 ZZY-3
蛋白酶	-	+	-	-
脂肪酶	-	-	-	-

3 结论

由于地域不同以及制作工艺的差异,侬族传统腌鱼中优势乳酸菌群也略有不同。本研究从 3 份样品中共分离出 16 株乳酸菌。经生理生化鉴定,初步确定乳酸菌主要为消化乳杆菌(8 株)、植物乳杆菌(4 株)、草乳杆菌(2 株)和发酵乳杆菌(2 株),分别选取 1 株菌株,通过 16S rDNA 测序分析进行进一步确认。对分离菌株的生长特性进行研究发现,所得菌株均具有较好的生长能力和产酸性能,并且表现出较高的耐盐能力,而且检测到植物乳杆菌 CJY1-1 具有一定的蛋白酶活性,这些研究数据为了解侬族传统腌鱼中的乳酸菌群、揭示其发酵机制,以及工业化实行纯菌种生产的腌鱼产品提供了菌种支持,并为发掘侬族传统腌鱼中的益生乳酸菌打下了基础。

参考文献:

[1]陈礼强. 侬乡腌鱼的加工方法[J]. 科学养鱼,2004(11):64-65.

[2]石敏,张文学. 浅谈侬族传统食品“腌鱼”的开发价值[J]. 水产科学,2005,24(11):29-30.

[3]中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法[M]. 北京:科学出版社,1978.

[4]Papamanoli E, Tzanetakis N, Litopoulou - Tzanetaki E, et al. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties[J]. Meat Science,2003,65(2):859-867.

[5]Buffa M, Morais J, Jiménez - Belenguer A, et al. Technological characterisation of lactic acid bacteria isolated from raw ewes' milk for cheese making[J]. Milchwissenschaft - Milk Science International, 2006,61(4):404-407.

[6]凌代文,东秀珠. 乳酸菌分类鉴定及实验方法[J]. 微生物学通报,1999(1):6-15.

[7]陈学云,侯鲁娜,丁玉庭,等. 盐干带鱼中乳酸菌的分离鉴定及其生物学特性研究[J]. 食品工业科技,2010,31(11):165-167.

[8]黄艾祥. 云南干腌火腿品质特征形成与微生物作用研究[D]. 重庆:西南大学,2006.

[9]邵淑娟. 产凝乳酶霉菌菌种的诱变选育及其酶学性质研究[D]. 长春:吉林大学,2011.

[10]马德功. 发酵香肠中乳酸菌的分离、筛选及其应用[D]. 济南:山东轻工学院,2008.

[11]张光伟,王宇建,钱萍,等. 酸性蛋白酶高产菌选育的研究[J]. 江苏食品与发酵,2005(3):8-13.

[12]赵霞,马佩珍. 微生物及其酶制剂在肉类工业中的应用[J]. 肉类工业,2003(8):37-40.

[13]Liepe H U. Starter cultures in meat production[J]. Biotechnology, 1984(5):400-424.