

酱油发酵酱醅中耐盐乳酸菌的 分离筛选及产酸特性

黄丹, 梁源, 左勇, 毛祥, 刘有晴, 叶光斌

(四川理工学院 生物工程学院, 四川 自贡 643000)

摘要: 对酱油酱醅中耐盐乳酸菌进行分离鉴定,并对分离菌株在不同培养条件下产乳酸能力进行研究。采用加 CaCO_3 和 NaCl 梯度平板 MRS 培养基对酱醅中耐盐乳酸菌进行分离、筛选,并结合形态学指标及 16S rDNA 序列分析对其进行鉴定,研究了分离菌株不同发酵温度、 NaCl 质量浓度、pH 条件下的产乳酸特性。实验结果表明:分离获得的耐盐乳酸菌菌株为德氏乳杆菌保加利亚亚种(*Lactobacillus bulgaricus*)。该菌株最适发酵温度为 38 ℃,在 NaCl 质量浓度 18 g/dL 的条件下,产乳酸量可达 22.68 g/L,在中性及偏碱性条件下均能较好地合成乳酸。

关键词: 乳酸菌;鉴定;发酵;耐盐能力

中图分类号:TS 264.2 文献标志码:A 文章编号:1673—1689(2014)06—0652—05

Isolation and Screening of Salt-Tolerance Lactic Acid Bacteria Strains from Soy Sauce Mash and Study on Its Characteristic Producing Lactic Acid

HUANG Dan, LIANG Yuan, ZUO Yong, MAO Xiang, LIU Youqing, YE Guangbin

(School of Biotechnology Engineering, Sichuan University of Science and Engineering, Zigong 643000, China)

Abstract: The salt-tolerance lactic acid bacteria strain was isolated and identified from soy sauce mash in this study. The ability producing lactic acid was studied in different culture conditions. The salt-tolerance lactic acid bacteria strain was isolated and screened by MRS medium with CaCO_3 and NaCl gradient plate from soy sauce mash. They were identified according to morphology characters and 16S ribosomal RNA (rRNA) gene sequencing methods. The ability producing lactic acid was studied at different fermentation temperature, NaCl concentration and pH value. The results showed: the strain with superior salt-tolerant was identified as *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. The optimum temperature was 38 ℃. When NaCl concentration was 18%, the titer of lactic acid reach at 22.68 g/L. furthermore, it was found that a high lactic acid production was achieved at a neutral or slight alkaline environmental.

Keywords: lactic acid bacteria, fermentation, identification, salt-tolerance ability

收稿日期: 2013-09-14

基金项目: 四川省企业技术创新专项(2011XM225);四川省科技厅资助项目(09R02);四川省教育厅资助项目(CC10Z01);四川理工学院学
科建设工程资助项目(2013TS13);四川理工学院培育基金项目(2013PY08);四川理工学院研究生创新基金项目(Y2013005)。

作者简介: 黄丹(1968—),女,四川自贡人,教授,主要从事固态酿造微生物及其应用的研究。E-mail: huangdan3212006@126.com

酱油在中国烹饪中占有重要的地位,在呈香、呈味、呈色等方面具有其它调味品不可替代的功能。酱油酿造是以源自大豆和小麦的植物蛋白质及碳水化合物为主要原料,生产涉及到多种有益微生物的联合协同作用。其中最重要的是乳酸菌和酵母菌,它们的主要作用是发酵糖类产生小分子醇、醛、酸、酯、酚类等风味物质,这是酱油风味产生的主要途径^[1]。其中乳酸菌是酱油发酵体系中的主要细菌,在发酵期间,耐盐性乳酸菌代谢产生乳酸、乙酸等种类丰富的有机酸,从而使整个发酵体系的pH值开始下降;当发酵体系的pH值下降到适宜酵母菌生长繁殖的时候,耐盐酵母便开始大量生长繁殖,产生以醇类为主的各种小分子物质,赋予酱油特有的醇味,同时大量的醇类和部分有机酸发生酯化反应后产生酯类等风味物质,赋予酱油特有的酱香、豉香和酯香^[2]。同时,乳酸菌可将精氨酸分解成鸟氨酸,并产生对丝氨酸、苏氨酸和苯丙氨酸等进行特异性脱羧基的作用,从而左右着酱油的香气^[3]。可见,乳酸菌的代谢活动对酱油香气和风味形成起着重要作用。目前,对乳酸菌用于酱油后发酵以促进酱油香气和风味形成的研究很活跃,崔瑞迎等将耐盐乳酸菌用于高盐稀态发酵,发现酱醅中2-甲基丁酸、2-甲基丁醇、乙酸异戊酯质量分数分别较对照组高53.4%、337.3%、388.2%^[4]。严留俊对乳酸菌增加酱油风味进行了探讨性研究,确定了多菌种混合顺序变温发酵法进行酱油发酵的可行性^[1]。刘卓研究了添加耐盐乳酸菌与酱醅中的酵母的协同作用,以及耐盐乳酸菌对发酵工艺的控制和对酱油主要风味的影响,研究结果表明,在酱醅发酵过程中,耐盐乳酸菌的添加明显促进T酵母的生长,而与S酵母存在着相互促进的关系^[5]。可见,对酱油生产中的耐盐乳酸菌进行分离筛选,研究其菌株特性,对于开发酱油生产中的功能微生物、提高酱油品质具有重要意义。

作者对酱油酱醅中的耐盐乳酸菌进行了分离鉴定,并根据酱油后发酵环境条件对其菌株特性进行了研究,其结果对耐盐乳酸菌应用于生产实践具有重要的指导意义。

1 材料与方法

1.1 材料

酱醅,由百年老字号酿造企业提供;MRS培养

基,参照文献[6]中的方法制备。

主要设备:超净工作台,苏州净化设备厂制造;H752型紫外分光光度计,上海光谱仪器有限公司制造;PHS-3C精密pH计,上海雷磁仪器厂制造;1100型PLC,美国安捷伦公司制造;HITACHI CR22G高速离心机,日本HITACHI公司制造。

1.2 方法

1.2.1 NaCl梯度平板的制备 配制MRS培养基两份装,在一份MRS培养基中加入质量浓度20 g/dL的NaCl标记为A培养基,另一份标记为B培养基,121℃灭菌20 min,待培养基冷却至50℃时,先倒A培养基于平皿内,斜置冷却,等凝固后再倒入B培养基,平面放置冷却。

1.2.2 耐盐乳酸菌的富集、分离及初筛 200 mL MRS液体培养基中添加10 g/dL NaCl,加入酱醅25 g,38℃恒温培养箱培养48 h。取富集培养液进行梯度稀释,再吸取0.2 mL稀释液涂布于NaCl梯度平板,38℃培养48 h。挑取处于高质量浓度NaCl区域的菌落于含碳酸钙的MRS固体平板上划线纯化。

1.2.3 分离菌株的形态学特征 对分离菌株进行革兰氏染色及个体形态观察,参见文献[6]。

1.2.4 分离菌株的16S rDNA寡核苷酸序列分析

1) 菌体16S rDNA的提取:取2.0 mL的培养液12 000 r/min离心1 min;沉淀物加入500 μL的TE缓冲液重悬,加入30 μL体积分数10%的SDS 65℃温浴1 h,再置于-80℃超低温冰箱放置15 min,将离心管转移到65℃水浴锅放置15 min,如此重复3次,以促进细胞破裂。再于4℃6 000 r/min离心10 min,转移上清液到2 mL的离心管中,加等体积酚-氯仿-异戊醇(体积比25:24:1),剧烈振荡5 min,静置10 min后,13 000 r/min离心20 min。后将上层水相移入新的离心管中,加入0.6倍体积异丙醇,室温沉淀1 h,13 000 r/min离心20 min,弃上清液,可见黑褐色沉淀。去除残余的异丙醇液体,加入1 000 μL体积分数70%乙醇,并转移至2 mL的离心管内,静置10 min,4℃,13 000 r/min离心15 min,弃上清液,去除残余的乙醇液体,置于超净台吹风10 min,除尽乙醇,再入100 μL无菌水,置65℃水浴锅水浴1 h,促进DNA的溶解。

2) 16S rDNA的PCR扩增及测序:取68 μL无菌水、10 μL PCR buffer、8 μL dNTPs、6 μL

MgCl₂、2 μL 1492r 引物、2 μL 8F 引物、2 μL Taq 酶、2 μL 模板于EP管中,选定 ygb1 扩增条件(94 ℃ 预变性 4 min,30 个循环包括 94 ℃变性 1 min, 55 ℃退火 1 min,最后 72 ℃延伸 1 min,4 ℃保温) 扩增。将 PCR 产物纯化后由上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

3) 16S rDNA 序列测定及同源性比较:将测序结果输入 NCBI 中与数据库中已有的序列进行比较分析。

1.2.5 分离菌株的产酸特性 将分离菌株在 MRS 培养基上于 38 ℃培养 24 h,并用无菌水稀释至菌悬液在 600 nm 吸光度为 1,按体积分数 10%接种于 MRS 液体培养基中,固定 10 g/dL NaCl 于不同温度培养,固定温度添加不同质量浓度 NaCl,和固定前二者调不同 pH 的方法来进行分离菌株产酸特性研究。产酸性能用产乳酸量表示。

1.2.6 乳酸含量的测定

1) 样品的处理:取 20 mL 发酵液于 10 000 r/min、4 ℃下离心 10 min,去除菌体后得上清液用于分析。

2) HPLC 法分析:取含有乳酸的发酵上清液稀释 50 倍,取稀释液 5 mL,经过 0.45 μm 孔径的微滤膜过滤,得到的滤液用于 HPLC 分析。色谱条件:1100 型 PLC,色谱柱为 DiamonsilTMC18;流动相组成为 0.1 mol/L 的 KH₂PO₄(5%体积分数甲醇);进样量 10 μL;体积流量 0.5 mL/min;检测器为紫外检测器(210 nm);柱温为室温。

3) 乳酸的定量:将测试样色谱图和相同条件下的标准样色谱图作对比,观察相同保留时间下乳酸特征吸收峰。根据样品色谱图中特征峰与标准样吸收峰的峰面积比,求出样品中的乳酸含量。

1.2.7 pH 的测定 以无菌操作吸取少量(约 5 mL)已摇匀的菌液于小烧杯中,再经校准过的精密 pH 计进行测定。

2 结果与讨论

2.1 目的菌株的分离筛选

通过富集培养及 NaCl 梯度平板涂布分离,将处于高质量浓度 NaCl 区域的菌落于含碳酸钙的 MRS 固体平板上划线纯化,根据溶钙圈获得产酸能力强的菌株。

2.2 分离菌株的形态学特征

分离菌株菌落呈乳白色、凸起、边缘整齐、较湿

润。革兰氏染色呈阳性反应,杆菌。

2.3 分离菌株 16S rDNA 的同源序列分析

纯化的 PCR 产物经测序后,其 16S rDNA 序列在 GenBank 核酸序列数据库中进行同源性比较,结果表明其与 GenBank 数据库中已知菌德氏乳杆菌保加利亚亚种(*Lactobacillus bulgaricus*)的 16S rDNA 序列具有 99%相似性。结合形态学特征,可以判断为同种。菌株的 16S rRNA 序列有 1 313 bp。序列分析结果:

```
1 ctaatacatg caagtcgagc gagctgaatt caaagatycc
ttcgggrtga
51 ttgttgac gctagcggcg gatgggtgag taacacgtgg
gcaatctgcc
101 ctaaagactg ggatagcact tggaaacagg tgctaatacc
ggataacaac
151 atgaatcgca tgattcaagt ttgaaaggcg gcgtaagctg
tcactttagg
201 atgagcccg cgccgattag ctagtgtgtg gggtaaaggc
ctaccaaggc
251 aatgatgcgt agccgagttg agagactgat cggccacatt
gggactgaga
301 caggcccaa actctacgg gaggcagcag tagggaatct
tccacaatgg
351 acgcaagtct gatggagcaa cgcctctgta gtgaagaagg
tttctggatc
401 gtaaagctct gttgtgtg aagaaggata gaggcagtaa
ctgtcttta
451 ttgacggta atcaaccaga aagtcacggc taactacgtg
ccagcagccg
501 cggtaatagc taggtggcaa gcgtgtccg gatttattgg
gcgtaaaggc
551 agcgaggcg gaatgataag tctgatgtga aagccacgg
ctcaaccgtg
601 gaactgcatc ggaaactgtc attcttgagt gcagaagagg
agagtggaat
651 tccatgtgta gcggtggaat gcgtagatat atggaagaac
accagtggcg
701 aaggcggctc tctgtctg aactgacgt gaggtctgaa
agcatgggta
751 gcgaacagga ttatataccc tggtagteca tgccgtaaac
gatgagcgt
801 aggtgttggg gactttccgg tctcagtc gcgagcaaac
```

gcattaagcg

851 ctccgcctgg ggagtagcac cgcaaggttg aaactcaaag
gaattgacgg

901 gggcccgccac aagcgggtga gcatgtggtt taattcgaag
caacgcgaag

951 aaccttacca ggtcttgaca tctgtgcta cacctagaga
taggtggttc

1001 ccttcgggga cgcagagaca ggtggtgcat ggctgtcgtc
agctcgtgtc

1051 gtgagatgtt gggtaagtc ccgcaacgag cgcaaccett
gtcttagtt

1101 gccatcatta agtggggcac tctaaagaga ctgccggtga
caaaccggag

1151 gaaggtgggg atgacgtcaa gtcacatgc ccctatgac
ctgggctaca

1201 cacgtgcaac aatgggcagt acaacgagaa
gcgaaccgc gaggtgaagc

1251 ggatctctta aagctgttct cagttcggac tgcaggctgc
aactgcctg cacgaagctg gaa

2.4 分离菌株的产酸特性

2.4.1 不同发酵温度对分离菌株产酸能力的影响

将分离菌株菌悬液接入同一批含 10 g/dL NaCl 的 MRS 液体培养基中, 分别置于 28、33、38、45、48 ℃ 条件下, 静置培养 3 d。将培养液采用 HPLC 来检测分离菌株在不同发酵温度下的乳酸产量, 结果如图 1 所示。

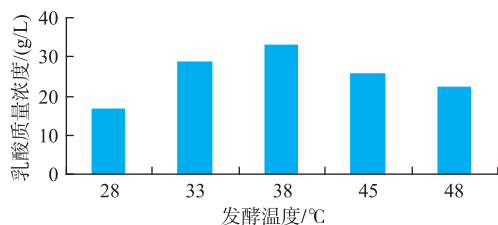


图 1 发酵温度对分离菌株产酸能力的影响

Fig. 1 Effects of temperature on the lactic acid titer by the isolated strain

温度对乳酸菌发酵产乳酸有明显的影响, 随着温度的升高, 乳酸产量随之增加, 38 ℃ 时达到最高, 发酵液乳酸质量浓度超过 3 g/dL, 温度升高超过 45 ℃ 时, 乳酸量开始明显下降。因此, 乳酸菌的适宜培养温度应为 38 ℃。可见该菌株能耐一定的高温, 在合适的温度下产酸较快, 可较好地应用于酱油的高盐稀态发酵工艺和某些低盐固态发酵工艺。

2.4.2 不同 NaCl 质量浓度对分离菌株产酸能力的影响

在同一批 MRS 液体培养基中分别添加 NaCl, 使其质量浓度为 0、4、8、12、16、18 g/dL, 接入分离菌株菌悬液, 38 ℃ 培养 3 d, 采用 HPLC 测定发酵液乳酸质量浓度, 结果见图 2。可知, 随着环境中 NaCl 质量浓度增加, 分离菌株产酸能力受到抑制, 但在不同 NaCl 质量浓度下, 筛选菌株代谢产生乳酸的能力相差不明显, 发酵液中乳酸质量浓度均可达到 2 g/dL 以上。在不同质量浓度 NaCl 环境中能否生长是鉴别乳酸菌是否适合酱油发酵的重要指征, 此菌株能够在高盐环境中正常产酸的性质, 说明该菌适合应用于所有酱油的发酵工艺, 是一株比较优良的酱油风味发酵乳酸菌。

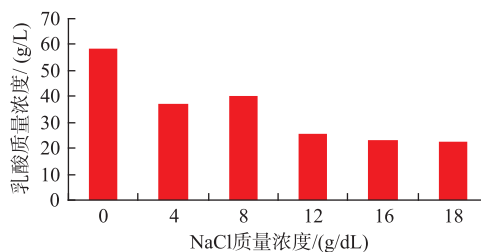


图 2 NaCl 质量浓度对分离菌株产酸能力的影响

Fig. 2 Effects of NaCl concentration on the lactic acid titer by the isolated strain

2.4.3 不同环境 pH 值对分离菌株产酸能力的影响

在同一批含 10 g/dL NaCl 的 MRS 液体培养基中, 添加 HCl 或 NaOH 使其 pH 调至 5.2、5.8、6.4、7.0、7.6、8.2, 38 ℃ 培养 3 d, 结果见图 3。可知, 低 pH 值环境不利于分离菌株乳酸的生产, 在中性及偏碱性条件下都能较好地合成乳酸。

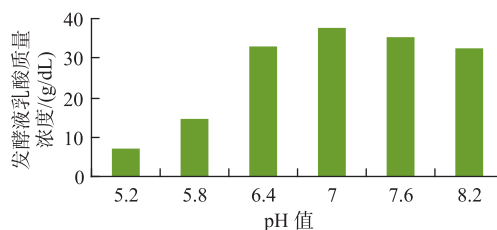


图 3 pH 值对分离菌株产酸能力的影响

Fig. 3 Effects of pH value on the lactic acid titer by the isolated strain

而在酱油发酵过程中, 酱油发酵的酱醅或酱醅初始 pH 接近中性, 很符合该乳酸菌菌株的生长特性。且该菌株在低 pH 条件下乳酸代谢受到抑制, 防

止了在酱油发酵过程中过度地消耗还原糖等原材料造成酱油的过度酸化。该 pH 又接近酱油发酵中产风味酵母菌的最适生长 pH, 有利于下一步耐盐酵母产醇产酯发酵的进行, 比较适合酱油的发酵生产。

3 结 语

通过富集培养和 NaCl 梯度平板法, 从酱油酱醅中分离筛选出一株耐盐乳酸菌, 经 16s rRNA 同源序列分析并结合其形态学、生理生化特征, 鉴定为德氏乳杆菌保加利亚亚种 (*Lactobacillus bulgaricus*), 对其进行合成乳酸特性研究, 表明该菌株在 NaCl 10 g/dL 条件下, 38 °C 产乳酸量可达 33.68 g/L, 且该菌株可耐受 NaCl 18 g/dL 的环境条

件, 在此条件下, 产乳酸量仍可达 22.68 g/L。同时, 在中性及偏碱性条件下都能较好地合成乳酸。可见, 该菌株对环境温度、NaCl 质量浓度以及 pH 值的耐受性均良好, 表明其可较好地应用于酱油生产, 对进一步提高酱油品质有重要的应用前景。不过, 对于该乳酸菌菌株对酱油生产中原料蛋白质的利用率、发酵过程中各酶系的作用, 以及和产香酵母菌之间的相互影响等, 还有待进一步研究探讨。

在酱油酿造过程中添加耐盐乳酸菌有利于酱油风味物质的形成, 提高产品品质, 这已经成为行业共识。目前, 应用于酱油生产的耐盐乳酸菌主要是嗜盐四联球菌, 而对于植物乳杆菌的研究报道还较少, 所以对耐盐植物乳杆菌进行深入研究具有重要意义。

参考文献:

- [1] 严留俊. 改善酱油风味的微生物及工艺研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008.
- [2] 陈伯林. 耐盐乳酸菌在酱油发酵中的应用[J]. 现代食品科技, 2011, 27(11): 1340-1343.
CHEN Bolin. Application of lactic acid bacteria with high salt tolerance in the soy sauce fermentation[J]. **Modern Food Science and Technology**, 2011, 27(11): 1340-1343. (in Chinese)
- [3] Ashenafi M, Busse M. Growth of *Bacillus cereus* in fermenting temph made from various beans and its inhibition by *Lactobacillus plantarum*[J]. **J Appl Bacteriol**, 1991, 70(4): 329-333.
- [4] 崔瑞迎, 郑佳, 梁如, 等. 耐盐乳酸菌和酵母菌对高盐稀态发酵酱油品质的影响[J]. 食品工业科技, 2013, 34(6): 197-201.
CUI Ruiying, ZHEN Jia, LIANG Ru, et al. Effect of halophilic LAB and yeasts on the quality of high-salt dilute-state soy sauce [J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2013, 34(6): 197-201. (in Chinese)
- [5] 刘卓. 耐盐乳酸菌对酱油风味的影响[D]. 天津: 天津科技大学, 2009.
- [6] 黄秀梨, 辛明秀. 微生物学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 施普林格出版社, 1999.

科 技 信 息

欧盟食品安全局提议降低饲料中锌的最高限量

据欧盟食品安全局(EFSA)消息, 5月5日欧盟食品安全局发布通告称, 为更好的确保消费者安全以及维护动物福利与健康, 已提议降低动物饲料中锌的最高限量。

据预测, 这项提议会使得粪肥中锌的含量降低约 20%。欧盟食品安全局将参考成员国以及利益攸关者的意见, 以展开风险评估。

[信息来源] 食品伙伴网. 欧盟食品安全局提议降低饲料中锌的最高限量 [EB/OL]. (2014-5-27). <http://news.foodmate.net/2014/05/263181.html>