

传统鱼露发酵液中优势乳酸菌的分离、纯化与初步鉴定

张 豪,章超桦*,曹文红,李瑞杰

(广东省水产品加工与安全重点实验室,广东普通高等学校水产品深加工重点实验室,
广东海洋大学食品科技学院,广东湛江 524088)

摘 要:为了研究传统鱼露发酵过程中乳酸菌的种类及性质,以发酵周期为两年的传统鱼露发酵液为研究对象,利用乳酸菌分离培养基对中后期发酵液中的优势乳酸菌进行筛选,并考察其生理生化性质。研究结果表明:从发酵液中分离获得28种乳酸菌,其中至少有5种优势乳酸菌贯穿整个鱼露发酵的中后期,经生理生化鉴定初步确定R₁为发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)、R₂为德氏乳杆菌乳亚种(*L.delbrueckii subsp. lactis*)、R₄为短乳杆菌(*L.brevis*)、R₅为乳酸乳球菌乳亚种(*L.lactis subsp. lactis*),而R₃未能鉴别出种属。其中R₁、R₄的耐盐性比较强,而R₃、R₅的产酸能力则相对较强。这5株乳酸菌均不具有对蛋白质和脂肪的降解能力。这为下一步多菌种的添加应用奠定基础。

关键词:鱼露, 酸菌, 分离, 鉴定

Isolation, purification and identification of dominant lactic acid bacteria from traditional fish sauce

ZHANG Hao, ZHANG Chao-hua*, CAO Wen-hong, LI Rui-jie

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Products Processing and Safety, Key Laboratory of Advanced Processing of Aquatic Products of Guangdong Higher Education Institution, College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: In order to study the species and characteristics of LAB Strains in the fish sauce. The two-years fermented fish sauce was used for this study. The dominant LAB strains in the mid-term and later were analyzed by the means of the medium of LAB isolation. It was also investigated the physiological and biochemical properties. Results showed that 28 bacterial strains were isolated from naturally fermented fish sauce and at least 5 kinds of dominant LAB throughout the middle and late. According to results of physiological and biochemical experiments, 4 dominant strains were identified, which were *Lactobacillus fermentum* (R₁), *L. delbrueckii subsp. lactis* (R₂), *L. brevis* (R₄) and *L. lactis subsp. lactis* (R₅). But R₃ was failed to identify the species. In addition, the salt tolerance ability of R₁ and R₄ was better than the others. The R₃ and R₅ had a relatively higher acid production ability. While all of them could not decompose protein and lipid. Results laid the foundation for the further applications.

Key words: fish sauce; lactic acid bacteria; isolation; identification

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)24-0186-04

鱼露(fish sauce)亦称鱼酱油,其营养丰富,味道鲜美,是我国东南沿海、日本以及东南亚一带的传统调味料,在国内又以潮汕鱼露最为典型^[1]。传统的鱼露生产是盐渍和发酵两者相结合的产物,即利用盐渍抑制腐败微生物,通过鱼体自身的蛋白酶以及微生物的共同作用进行水解的过程,从而达到生产鱼露的目的^[2]。众所周知,鱼露在前期盐渍自溶的基础上,通过中后期长期的陈化,慢慢形成鱼露所特有的

风味。乳酸菌作为鱼露中后期发酵的优势菌,其变化与鱼露的各项理化指标及游离氨基酸的变化有着密切的联系,并对鱼露风味的形成有着积极的贡献^[3-5]。而目前对鱼露中后期风味形成有着密切联系的优势菌——乳酸菌研究还比较少。

本实验旨在通过对后期发酵液的不同阶段(12、15、18、21、24个月)中乳酸菌的分离鉴定,从而获得贯穿整个发酵中后期的优势菌种,并研究其生化特性及酶活性。以期对中后期乳酸菌种类、特性有一定的了解,为进一步探究乳酸菌对鱼露风味的影响提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

传统鱼露发酵样品 发酵周期为两年,以蓝圆

收稿日期:2013-06-04 * 通讯联系人

作者简介:张豪(1987-),男,硕士研究生,主要从事水产品高值化加工与利用方面的研究。

基金项目:广东省水产蛋白改性技术研究团队专项经费(2011A020102005)。

表1 5个分离菌株的形态特征
Table 1 Characteristics of five isolated strains

编号	菌落形态	革兰氏染色	个体形态
R ₁	白色, 圆形, 表面干燥, 边缘整齐	G ⁺	菌体短杆状, 单生或成对
R ₂	微黄, 圆形, 表面湿润, 边缘褶皱	G ⁺	菌体细杆状, 单生或成链
R ₃	白色, 中间隆起, 表面湿润, 粘稠, 边缘褶皱, 向周围蔓延	G ⁺	菌体杆状, 彼此排列成V形, 有假分枝出现
R ₄	乳白色, 圆形, 表面湿润光滑, 边缘整齐	G ⁺	菌体短杆状, 单生、成对或成链
R ₅	白色, 圆形, 表面湿润, 边缘整齐	G ⁺	菌体球形, 单生或成对

鲐为原料, 与一定比例的海盐混合, 在(30±5)℃下分别已自然发酵12、15、18、21、24个月, 由广东省汕头鱼露厂有限公司提供; 分离培养基、MC固体培养基、MRS固体培养基、明胶液化培养基、吡啶实验培养基、H₂S产生实验、硝酸盐还原实验的培养基、糖醇类碳源发酵管 北京陆桥技术有限责任公司; NaCl等试剂 均为分析纯, 广州化学试剂公司。

01J2003-04立式压力蒸汽灭菌器 上海博迅实业有限公司; sky-1102C恒温培养摇床 上海苏坤实业有限公司; SW-CJ-2FD 超净工作台 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; SLI-700恒温培养箱 上海爱朗仪器有限公司; PHS-2pH计 上海精科; UX2200H 电子天平 SHIMADZU CORPORATION JAPAN; L1100双目微生物显微镜 广州市广精精密仪器有限公司; 岛津UV-2550紫外可见分光光度计 日本岛津公司。

1.2 实验方法^[6-7]

1.2.1 发酵液样品的采集 传统鱼露发酵过程是一个开放的环境, 因此, 在取样时, 要尽量避免外界空气杂菌的影响, 所取不同阶段的发酵液均为距其上表面8~12cm处的样品。

1.2.2 乳酸菌的分离 在MC固体培养基中, 选取具有明显数量优势的菌株划线分离, 直到得到纯菌株。纯化后的菌株分别接种到MRS斜面培养基, 置于4℃冰箱中保存备用。

1.2.3 乳酸菌的鉴定

1.2.3.1 形态学鉴定 将分离纯化后的菌株涂布到MRS固体培养基上, (35±0.2)℃下培养48h, 观察菌落特征, 取典型菌落进行革兰氏染色, 并在油镜下观察菌体形态。

1.2.3.2 生理生化实验 对分离后的菌株进行接触氧化酶实验、产H₂S实验、明胶液化实验、硝酸盐还原实验、葡萄糖产气实验; 用半固体培养基测定菌株的运动性。

1.2.3.3 糖醇类发酵实验 通过菌株的糖醇类发酵实验, 检验分离菌株对各种糖醇类碳源的利用情况。

1.2.3.4 耐盐实验 将分离菌株接种于MRS肉汤培养基中, (35±0.2)℃下培养24h。吸取一定量菌株培养液接种到NaCl含量(质量分数)为0、3%、6%、9%、12%的MRS肉汤培养基中, (35±0.2)℃下培养48h, 于650nm下测定OD值。

1.2.4 蛋白酶和脂肪酶活性实验 采用添加10%脱脂乳的MRS固体培养基, 分别滴入0.2mL的菌液涂布均匀, (35±0.2)℃培养48h。若有透明圈出现, 则可判

定该菌株有分解蛋白质的能力。采用添加10%猪油和中性红指示剂的MRS固体培养基, 分别滴入0.2mL的菌液涂布均匀, (35±0.2)℃培养48h。若有红色斑点出现, 则可判定该菌株有分解脂肪的能力。

1.2.5 优势乳酸菌24h的生长曲线及产酸能力的测定 在MRS肉汤培养基中, 分别接入经活化过的分离菌株, 在(35±0.2)℃下振荡培养, 用分光光度计于波长650nm处每隔4h测定其吸光度值(OD值), 连续测定24h, 以不接种的MRS肉汤培养基作为对照, 并同时对应测定其24h内的pH的变化情况。

2 结果与讨论

2.1 中后期鱼露发酵液中不同阶段乳酸菌的分离鉴定

通过对两年制鱼露发酵液中后期不同阶段乳酸菌的分离与鉴定, 共分离获得28种乳酸菌, 其中有5种优势乳酸菌贯穿整个鱼露发酵的中后期, 分别编号为R₁、R₂、R₃、R₄、R₅, 其形态特征及菌体特征见表1与图1。

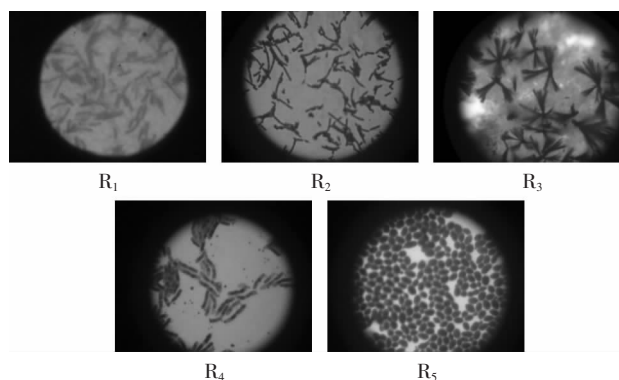


图1 5个分离菌株的菌体形态(1000×)

Fig.1 Cell morphology of five isolated strains (1000×)

由表1、图1可以看出, 中后期鱼露发酵液中的优势乳酸菌多数为白色, 菌落表面湿润、光滑, 边缘整齐, 均为革兰氏阳性菌; 个体形态不尽相同, 杆状、假分枝状和球状。

2.2 乳酸菌的生理生化鉴定结果

乳酸菌的生理生化反应与糖醇类发酵实验结果分别见表2和表3。5种乳酸菌的接触酶实验均为阴性, 不运动, 不产H₂S和吡啶, 不液化明胶, 可利用葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、果糖和半乳糖。5种菌株都不能利用鼠李糖和山梨糖。相比较而言, R₁、R₄的耐盐性要强于R₂、R₃、R₅。

根据菌体和菌落形态、生理生化实验及糖醇类发酵实验结果, 对照《乳酸菌——生物学基础及应

用》^[8]、《乳酸菌分类鉴定及实验方法》^[9]和《伯杰细菌鉴定手册》^[10]对菌株进行鉴定分析。鉴定结果为:R₁为发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)、R₂为德氏乳杆菌乳亚种(*L.delbrueckii subsp.lactis*)、R₄为短乳杆菌(*L.brevis*)、R₅为乳酸乳球菌乳亚种(*L.lactis subsp.lactis*),而R₃未能鉴别出种属。

表2 5个分离菌株的生化特性

Table 2 Biochemistry characters of five isolated strains

理化性质实验	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
运动性	-	-	-	-	-
接触酶	-	-	-	-	-
产粘性	-	-	+	-	-
产硫化氢	-	-	-	-	-
硝酸盐还原	-	-	-	-	-
明胶液化	-	-	-	-	-
葡萄糖产气	-	-	-	-	-
耐3% NaCl	+	+	+	+	+
耐6% NaCl	+	+	+	+	-
耐9% NaCl	+	-	-	+	-
耐12% NaCl	-	-	-	-	-

注:+,90%为阳性菌株;- ,90%为阴性菌株;表3、表4同。

表3 糖醇发酵实验结果

Table 3 Fermentation results of sugar and alcohol

糖醇发酵实验	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
棉籽糖	+	-	-	+	-
蔗糖	+	+	+	+	+
甘露醇	-	+	+	-	+
麦芽糖	+	+	+	+	+
甘露糖	+	+	-	-	+
鼠李糖	-	-	-	-	-
葡萄糖	+	+	+	+	+
山梨醇	-	-	+	-	+
木糖	+	-	-	+	-
阿拉伯糖	+	+	-	+	-
果糖	+	+	+	+	+
乳糖	+	+	+	+	+
半乳糖	+	+	+	+	+
纤维二糖	-	+	-	-	+
山梨糖	-	-	-	-	-

2.3 乳酸菌对蛋白质和脂肪能力的测定

实验中对分离的5株乳酸菌对蛋白质和脂肪的降解活性进行了分析,其结果见表4。鱼露发酵的中后期是其风味形成的关键时期,发酵液中的乳酸菌

表4 蛋白质和脂肪降解活性

Table 4 Degradation activity of protein and fat

指标	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
蛋白质降解活性	-	-	-	-	-
脂肪降解活性	-	-	-	-	-

如果具有蛋白质酶和脂肪酶活性,则可能引起腐败、出现酸败等现象^[11-12]。从表4可知,所分离的R₁、R₂、R₃、R₄、R₅均不具有蛋白质酶活性和脂肪酶活性。

2.4 乳酸菌24h生长曲线及产酸能力的测定

由图2可以看出,所分离的5种菌株在4h以后OD值明显升高,进入对数生长期,在培养16h后,OD值均达到较高水平,此后变化幅度趋于平稳,说明菌种已进入生长稳定期。乳酸菌在发酵液中产生大量的乳酸、乙酸等,提高了酸度,从而抑制其他杂菌的生长,并能促进鲁氏酵母等一些增香酵母菌的繁殖和发酵^[13-14],从而与酵母菌共同作用,形成鱼露特有的风味。同时,产酸能力的大小也是衡量乳酸菌能否作为发酵剂的重要指标之一。由图3可见,5株乳酸菌分别在MRS肉汤培养基中的整体pH都呈下降趋势,期间前4h下降较缓慢,此后,菌液的pH急剧下降,16h后pH变化较小。相对而言,R₃、R₅的产酸能力较强,在培养24h后的pH为4.0左右。而R₁、R₄的产酸能力较弱,在培养24h后的pH为4.5左右。

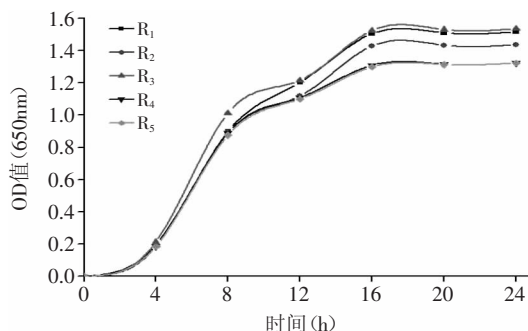


图2 菌液OD值随时间变化曲线

Fig.2 Changes in OD value of culture with time

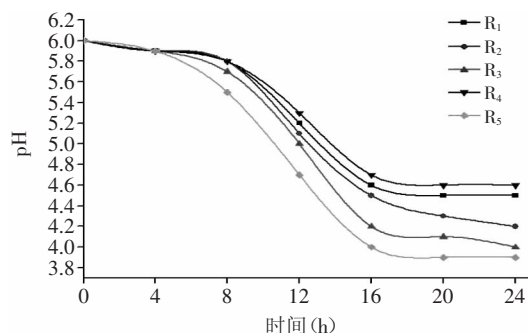


图3 菌液pH随培养时间变化曲线

Fig.3 Changes in pH of culture with time

3 结论

以发酵周期为两年的传统鱼露发酵液为研究对象,分别对中后期不同阶段(12、15、18、21、24个月)发酵液中的乳酸菌进行筛选。共分离获得28种乳酸菌,其中至少有5种优势乳酸菌贯穿整个发酵的中后期,分别是R₁为发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)、R₂为德氏乳杆菌乳亚种(*L.delbrueckii subsp.lactis*)、R₄为短乳杆菌(*L.brevis*)、R₅为乳酸乳球菌乳亚种(*L.lactis subsp.lactis*),R₃未能鉴别出种属。其中R₁、R₄的

(下转第194页)

供理论基础。

参考文献

- [1] 宋京城,蔡健. 纤维素酶在食品工业中的应用[J]. 农产品加工·学刊,2010(3):69-71.
- [2] 张明霞,段长青,张文娜. 纤维素酶在食品工业中的应用与展望[J]. 酿酒科技,2005(4):99-100.
- [3] 闫训友,史振霞,张惟广,等. 纤维素酶在食品工业中的应用进展[J]. 食品工业科技,2004,25(10):140-142.
- [4] Escovar-Kousen JM, Wilson D, Irwin D. Integration of computer modeling and initial studies of site-directed mutagenesis to improve cellulase activity on Cel9A from *Thermobifida fusca* [J]. Appl Biochem Biotechnol,2004,113-116:287-297.
- [5] 高培基. 纤维素酶降解机制及纤维素酶分子结构与功能研究进展[J]. 自然科学进展,2003,13(1):21-29.
- [6] Parker A, Maw B, Fedor L. The beta-glucuronidase catalyzed hydrolysis of a glucopyranosiduronamide and a glucopyranoside: evidence for the oxocarbenium ion mechanism for bovine liver beta-glucuronidase[J]. Biochem Biophys Res Commun,1981,103(4):1390-1394.
- [7] Churilova IV, Maksimov VI, Klesov AA. Cellobiose as a regulator of endoglucanase activity of cellulase complexes. Mechanism of the regulation[J]. Biokhimiia,1979,44(11):2100-2102.
- [8] 庞永奇,贾洪革,方荣祥,等. 利用不相容质粒共转化大肠杆菌对Cre重组酶体内重组活性的可视检测[J]. 微生物学报,2005,45(1):125-128.
- [9] 范立强,袁勤生,吴祥甫. 不相容双质粒共表达大肠杆菌肉碱脱水酶基因*caiB*及其辅因子合成酶基因*caiE*[J]. 中国医药工业杂志,2002,33(3):104-108.
- [10] 吴振芳,陈惠,曾氏,等. 内切葡聚糖酶基因在毕赤酵母中高效表达研究[J]. 农业生物技术学报,2009,17(3):529-535.
- [11] 朱龙宝,汤斌,陶玉贵,等. 黑曲霉 β -葡萄糖苷酶基因克隆及在毕赤酵母中分泌表达[J]. 食品与生物技术学报,2012,31(9):973-977.
- [12] Sun J, Phillips CM, Anderson CT, et al. Expression and characterization of the *Neurospora crassa* endoglucanase GH5-1 [J]. Protein Expr Purif,2011,75(2):147-154.
- [13] Sommer B, Friehs K, Flaschel E. Efficient production of extracellular proteins with *Escherichia coli* by means of optimized coexpression of bacteriocin release proteins[J]. J Biotechnol,2010,145(4):350-358.
- [14] 杨巍,张岚,卢智刚. 利用两种不相容质粒在大肠杆菌中共表达DFF45和DFF40[J]. 生物化学与生物物理学报,2001,33:238-242.
- [15] 孙剑,王健琪,翟朝阳. 不相容双质粒共表达人内皮抑素及简化人纤溶酶原饼环区5[J]. 四川大学学报,2006,37(6):839-843.
- [16] Ervin SE, Small PA Jr, Gulig PA. Use of incompatible plasmids to control expression of antigen by *Salmonella typhimurium* and analysis of immunogenicity in mice[J]. Microb Pathog,1993,15(2):93-101.
- [17] 钟声,刘丹平,刘素伟,等. 血管内皮生长因子121和骨形态蛋白2双基因共表达重组腺病毒载体的构建及鉴定[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2011,15(20):3741-3744.
- [18] 王彦,吴奎,毕玉田,等. FasL和Der p2双基因共表达真核表达载体的构建及其在树突状细胞中的表达[J]. 重庆医学,2010,39(20):2697-2703.
- [19] Cheng CY, Yu YJ, Yang MT. Coexpression of omega subunit in *E. coli* is required for the maintenance of enzymatic activity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* RNA polymerase [J]. Protein Expr Purif,2010,69(1):91-98.
- [20] Wang F, Qu H, Zhang D, et al. Production of 1,3-propanediol from glycerol by recombinant *E. coli* using incompatible plasmids system[J]. Mol Biotechnol,2007,37(2):112-119.

(上接第188页)

耐盐性比较强,而 R_3 、 R_5 的产酸能力则相对较强。这5株乳酸菌均不具有对蛋白质和脂肪的降解能力。该结果进一步加深了对鱼露发酵过程中乳酸菌种类、性质的了解,为下一步探讨多菌种发酵鱼露提供了一定的理论基础。

参考文献

- [1] 朱志伟,曾庆孝,阮征,等. 鱼酱油及加工技术研究进展[J]. 食品与发酵工业,2006,32(5):96-100.
- [2] 章超桦. 水产食品学[M]. 第二版. 北京:中国农业出版社,2010:301-302.
- [3] 黄紫燕,朱志伟,曾庆孝,等. 传统鱼露发酵的微生物动态分析[J]. 食品与发酵工业,2010,36(7):18-22.
- [4] Lopetcharat K, Yeung J Choi, Jae W Park, et al. Fish sauce products and manufacturing: a review [J]. Food Reviews International,2001,17(1):65-88.
- [5] 江津津,曾庆孝,朱志伟,等. 耐盐微生物对鲢制鱼露风味形成的影响[J]. 食品与发酵工业,2008,34(11):25-28.
- [6] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:370-378.
- [7] 林伟涛,徐世明,吕加森,等. 中式发酵干肠中乳酸菌的分离筛选、鉴定和培养[J]. 食品工业科技,2010,31(1):194-197.
- [8] 杨洁斌,郭兴华,凌代文. 乳酸菌——生物学基础及应用[M]. 北京:中国轻工业出版社,1991:1-31.
- [9] 凌代文. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京:中国轻工业出版社,1999:6-27.
- [10] Budanan R E, Gibbon N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 北京:中国科学出版社,1984:660-797.
- [11] 赵俊仁,孔保华. 自然发酵干肠中乳酸菌的分离与鉴定[J]. 食品工业科技,2010,31(31):158-160.
- [12] Emanuela Z, Sergio G, Alessandra, et al. Lipolysis and lipid oxidation in fermented sausages depending on different processing conditions and different antioxidants[J]. Meat Science,2004,66:415-423.
- [13] 松本伊左尾. 乳酸菌和酵母菌的添加时期及添加量对酱醪发酵的影响[J]. 中国调味品,1989(7):27-31.
- [14] 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,2008:8-10.