

四川腊肉中乳酸菌的筛选、产酸特性 及其氨基酸产物分析

Screening of lactic acid bacteria from Sichuan bacon and analysis on its acid production characteristics and amino acid production

刘有晴¹ 黄丹¹ 于华¹ 毛祥¹ 刘达玉² 程华¹

LIU You-qing¹ HUANG Dan¹ YU Hua¹ MAO Xiang¹ LIU Da-yu² CHENG Hua¹

(1. 四川理工学院生物工程学院, 四川 自贡 643000; 2. 肉类加工四川省重点实验室, 四川 成都 610106)

(1. School of Biotechnology Engineering, Sichuan University of Science and Engineering, Zigong, Sichuan 643000, China; 2. Sichuan Province Key Laboratory of Meat Processing, Chengdu, Sichuan 610106, China)

摘要:对四川腊肉中乳酸菌进行筛选,研究其产酸特性及氨基酸产物。利用可培养方法,对四川腊肉中乳酸菌进行分离筛选,利用 16S rDNA 的序列测定技术对其鉴定,并对分离菌株在不同温度、pH、NaCl 浓度、亚硝酸浓度条件下的生长代谢、产酸能力进行研究及发酵产物中氨基酸成分进行测定分析。结果显示:分离菌株为植物乳杆菌(*Lactobacillus paraplantarum*),分离菌株对数生长期为 6~18 h;最适产酸作用温度范围为 30~40 °C;最适产酸作用 pH 范围为 5.5~6.0;对 NaCl 及 NaNO₂ 耐受能力分别达 6.0% 和 150 mg/L;分离菌株释放游离氨基酸 11 种,其中必需氨基酸占总氨基酸含量的 45.76%,可为后续该植物乳杆菌在发酵肉类中的应用提供基础研究数据。

关键词:四川腊肉;植物乳杆菌;鉴定;产酸特性;游离氨基酸

Abstract: The lactic acid bacteria were screened in Sichuan bacon, and the acid production characteristics and amino acid products were also studied. Using culture methods, lactic acid bacteria were isolated and screened from Sichuan bacon, and identified by 16S rDNA sequencing technique. Studied the growth metabolism and acid production capacity on the different temperature, pH, NaCl concentration, nitrite concentration and fermentation products of amino acid. The results showed that the isolation strain was *Lactobacillus paraplantarum*. Through conditions of producing acid and free amino acid analysis, logarithmic growth phase of strain was 6~18 h; the optimum fermentation acid temperature range was 30~40 °C; optimum fermentation acid pH range was 5.5~6.0; had good endurance abilities to

the salt concentration 6.0% and the nitrite content 150 mg/L; this strain had 11 kinds of free amino acid, and the essential amino acids accounted for 45.76% of total amino acid content. This study could provide basic research data for the application of *Lactobacillus paraplantarum* in fermentation meat products.

Keywords: Sichuan bacon; *Lactobacillus paraplantarum*; identification; characteristics of acid production; free amino acid

发酵肉制品是指自然或人工控制条件下,利用微生物发酵作用生产的具有特殊风味、色泽和质地,且具有较长保存期的肉制品^[1]。1969 年,乳酸菌已被 FAO(世界粮农组织)和 WHO(世界卫生组织)认可为目前唯一在食品中使用的细菌素防腐剂^[2]。Adisorn Swetwivathana 等^[3]认为乳酸菌可作为防腐剂也主要归因于其代谢产物如有机酸、细菌素等能控制病原菌和腐败菌的生长。因此,对发酵肉制品乳酸菌的研究具有非常重要的意义。

四川传统发酵肉制品主要包括腊肉、酱肉以及香肠等均采用自然发酵,微生物的代谢活动对其风味物质形成在前期工艺和后熟工艺中均有重要的贡献^[4-5]。传统的自然发酵风味主要是由乳酸菌、酵母菌等优势菌与其他菌种相互作用所形成^[6]。不同批次的肉制品质量及风味难以保持稳定,所以对四川传统发酵肉制品后熟过程中与风味物质形成相关的微生物^[7-8]进行分离鉴定,并对其代谢产物进行研究,有利于对后续该菌株在发酵肉制品中的应用提供基础研究数据,更有利于选育优良的微生物菌种作为发酵剂用于发酵肉制品工业化生产。

本研究采用倾注培养法从传统发酵肉制品中筛选出产酸能力强的优势植物乳杆菌,并进行分子生物学鉴定,对分离菌株在不同温度、pH、NaCl 浓度、亚硝酸浓度条件下的生长代谢、产酸特性进行研究,并测定其所产生的游离氨基酸

基金项目:肉类加工四川省重点实验室重点项目(编号:14-R02);四川理工学院学科建设工程资助项目(编号:2013TS13)

作者简介:刘有晴(1990-),女,四川理工学院在读硕士研究生。

E-mail:15196006977@163.com

通讯作者:黄丹

收稿日期:2015-08-11

含量,为后续该植物乳杆菌在肉制品发酵过程中的应用提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 材料与试剂

材料:四川农家自制腊肉;

NaOH、NaCl、邻苯二甲酸氢钾、磺基水杨酸:分析纯,天津市天力化学试剂有限公司;

氨基酸标准溶液(Asp、Glu、Ser、His、Gly、Thr、Arg、Ala、Tyr、Cys、Val、Met、Phe、Ile、Leu、Lys):上海西宝生物科技股份有限公司;

MRS培养基(用于乳酸菌的分离鉴定):蛋白胨 10 g,乙酸钠 5 g,牛肉膏 10 g,柠檬酸铵 2 g,酵母粉 5 g,磷酸氢二钾 2 g,葡萄糖 20 g,硫酸镁 0.5 g,硫酸锰 0.5 g,吐温 80 1 mL,碳酸钙 20 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL,调 pH 值至 6.8;

肉汤培养基^[9]:牛肉膏 2%,蛋白胨 2%,葡萄糖 1%,盐 3%,NaNO₂ 0.015%,pH 6.5。

1.1.2 仪器与设备

酶标仪:Multiskan FC 型,北京昊诺斯科技有限公司;

全自动氨基酸分析仪:L8900 型,天美(中国)科学仪器有限公司;

凝胶成像仪:TS2-310 型,美国 UVP LLC 公司;

PCR 仪:Maetraycler nexus gradient 型,美国 Eppendorf 公司。

1.2 植物乳杆菌分离鉴定

1.2.1 植物乳杆菌筛选 采用倾注培养法^[10],对四川腊肉中乳酸菌进行分离,挑取有溶钙圈的单个菌落接种于 MRS 固体培养基中,多次划线分离,取单菌落做镜检观察和触媒试验,选取革兰氏阳性、过氧化氢酶阴性的单个菌落,进行后续研究。

1.2.2 植物乳杆菌鉴定 采用 CTAB 法^[11]对分离菌株的 DNA 进行提取,并对其进行 PCR 扩增,正向引物为 27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';反向引物为 1492R:5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'。PCR 扩增体系总体积 50.0 μL,包括 1.0 μL 基因组 DNA,5.0 μL 10×Buffer(含 2.5 mmol/L Mg²⁺),1.0 μL Taq 聚合酶(5 U/μL),1.0 μL dNTP(10 mmol/L),1.5 μL 正向引物,1.5 μL 反向引物,39.0 μL ddH₂O。将扩增出的 PCR 产物送往上海杰李生物技术有限公司进行测序。

1.2.3 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 6.0 软件构建系统发育树,判定目的菌株分类地位。

1.3 分离菌株最适产酸作用条件

1.3.1 分离菌株生长曲线及产酸的测定 将分离菌株接种于 MRS 液体培养基中,37 °C 培养 24 h,以未接种的 MRS 培养基做空白对照,每隔 2 h 取 20 μL 发酵液采用酶标仪测定其菌体浓度 OD 值,每隔 4 h 取 10 mL 发酵液测定其总酸含量。

1.3.2 分离菌株在不同温度、pH、NaCl 及 NaNO₂ 浓度下产酸条件 将分离菌株接种于 MRS 液体培养基培养 24 h 后,吸取 1 mL 接入不同温度、pH、NaCl 浓度及 NaNO₂ 浓度的液体 MRS 培养基中培养 24 h,以相同条件下的空白培养基作对照,于波长 600 nm 处测定吸光度,并采用电位滴定法测定其总酸含量,每个样平行测定 3 次,确定最适产酸条件。

1.4 分离菌株游离氨基酸含量测定

(1) 样品前处理:将对数期菌株接种于肉汤培养基中,以 1.3 所研究的最适产酸温度及时间进行培养。移取菌株发酵液 500 μL 于 25 mL 容量瓶中,加入 10 mL 8% 磺基水杨酸溶液,定容至刻度线。静置 15 min,取一定量溶液过 0.22 μm 滤膜。所得滤液进行氨基酸分析。

(2) 检测条件:Biochrom Li 型阳离子交换树脂,4.6 μm×200 mm;测定波长 570、440 nm;缓冲液流速 25.0、31.2 mL/h;柱温 31~76 °C;茚三酮溶液流速 20.0 mL/h;分析时间 125 min,进样量 20 μL。每个样品重复进样 2 次^[12]。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离鉴定

2.1.1 分离菌株鉴定 从四川腊肉中筛选出几株有溶钙圈、过氧化氢试验阴性同时革兰氏染色阳性的产酸能力强的乳酸菌株,对分离菌株进行分子生物学鉴定。鉴定结果显示:命名为 S7 的菌株为植物乳杆菌。该分离菌株菌落形态为乳白色,有光泽,边缘整齐,表面光滑,不透明;菌体形态为短杆状,其菌落及菌体形态见图 1、2。



图 1 分离菌株菌落形态

Figure 1 Colony morphology of isolated-strain

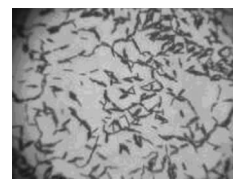


图 2 分离菌株菌体形态

Figure 2 The morphology of isolated-strain

2.1.2 分离菌株分子生物学鉴定 该菌株的 DNA 及 PCR 扩增产物电泳图见图 3、4。由图 3 可知,该菌株的初提 DNA 有条带,可用于 PCR 扩增。由图 4 可知,该条带清晰,说明此次扩增很成功,其条带长度为 1 400 bp 左右,可用于后续测序分析。

2.1.3 分离菌株同源性分析和系统发育树的构建 由 Mega 6.0 软件,绘制的系统发育树见图 5。由图 5 可知,分离菌株与 GenBank 数据库中植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum* DSM 10667)的 16S rDNA 具有 99% 的相似性,

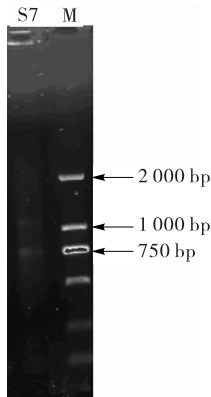


图 3 菌株 DNA 电泳图

Figure 3 DNA chart of strain

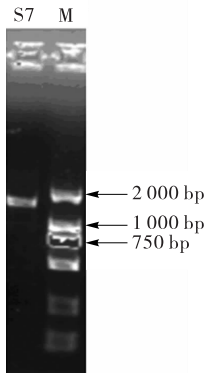


图 4 菌株 PCR 产物电泳图

Figure 4 PCR product chart of strain

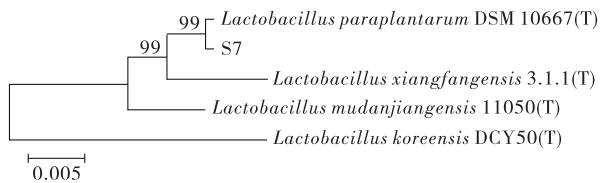


图 5 S7 系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree of S7

因此分离菌株鉴定为植物乳杆菌(*Lactobacillus paraplantarum*)。

2.2 分离菌株最适产酸条件

2.2.1 分离菌株生长曲线及产酸的测定 由图 6 可知,分离菌株生长较快,其对数生长期为 6~18 h。由图 7 可知:菌株在接种 4 h 后总酸逐渐升高,在进入菌株生长稳定期后其

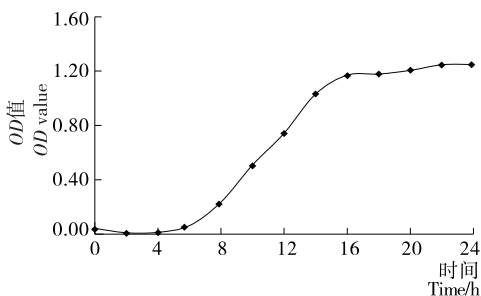


图 6 分离菌株生长曲线

Figure 6 Strains growth curve

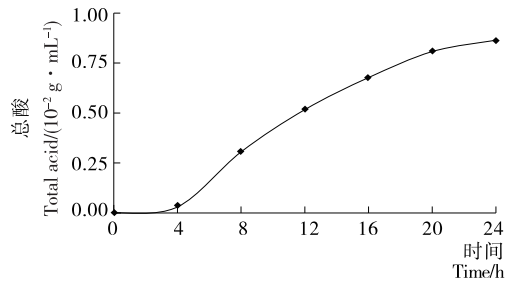


图 7 分离菌株总酸含量变化

Figure 7 Change of total acid content of strains

总酸仍有上升的趋势,说明该分离菌株产酸能力强,可使环境 pH 下降,从而抑制其他杂菌的生长。

2.2.2 分离菌株在不同温度、pH、NaCl 及 NaNO₂ 浓度下产酸条件 由图 8 可知:分离菌株的最适生长及产酸作用温度范围均在 35 °C 左右。

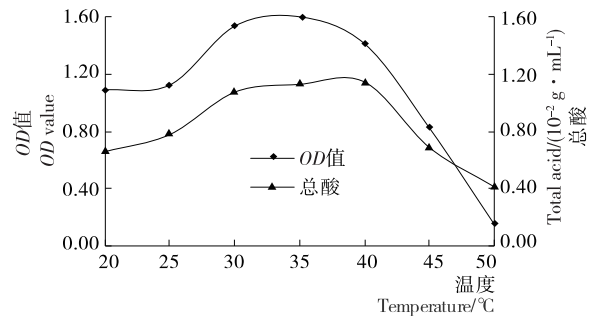


图 8 温度对菌株生长及产酸的影响

Figure 8 Temperature effect on growth and acid production of strain

由图 9 可知:过酸或者过碱的环境下分离菌株的生长及产酸能力均受到抑制,因此菌株的最适作用 pH 值为 5.5 左右。

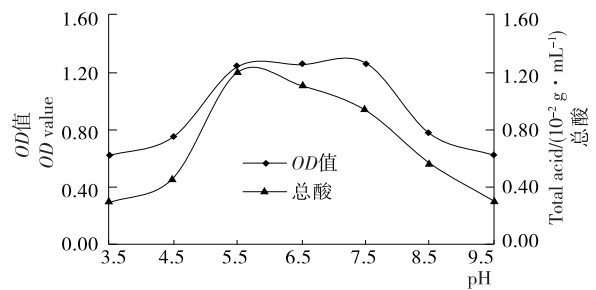


图 9 pH 值对菌株生长及产酸的影响

Figure 9 pH effect on growth and acid production of strain

由图 10 及图 11 可知:分离菌株对 NaCl 浓度及亚硝酸盐浓度有较好的耐受力,在 NaCl 浓度为 0%~6% 时 OD 值变化不大;但随着盐浓度的改变,菌株产酸量有所改变,NaCl 浓度过高或过低其产酸能力受到严重抑制,NaCl 浓度为 2%~4% 时菌株产酸能力最强;随着培养基中 NaNO₂ 浓度的增加菌株的生长及产酸能力均受到抑制,当 NaNO₂ 浓度增加至 150 mg/L 时该分离菌株仍能生长但产酸能力极低,其 OD 值为 0.235 7 和总酸降 0.272 g/100 mL。

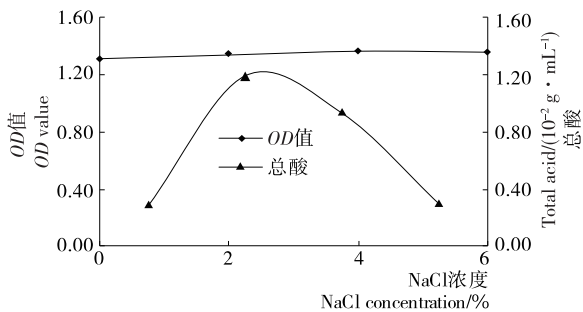


图 10 NaCl 浓度对菌株生长及产酸的影响

Figure 10 NaCl concentration effect on growth and acid production of strain

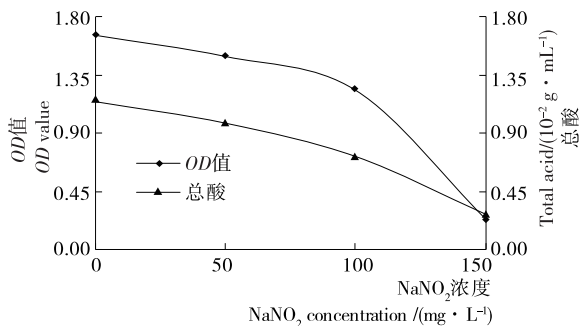


图 11 NaNO₂ 浓度对菌株生长及产酸的影响

Figure 11 NaNO₂ concentration effect on growth and acid production of strain

2.3 分离菌株游离氨基酸分析

对分离菌株发酵液中游离氨基酸进行测定,其计算结果见表 1。由表 1 可知:菌株的发酵液中游离氨基酸含量及种

表 1 分离菌株氨基酸含量[†]

Table 1 Contents of free amino acids from strains mg/100 mL

氨基酸种类	氨基酸含量	
	试验组	对照组
天冬氨酸 Asp	0.11	0.07
苏氨酸 Thr *	0.20	0.16
丝氨酸 Ser	0.18	0.16
谷氨酸 Glu	0.48	0.26
甘氨酸 Gly	1.18	0.88
丙氨酸 Ala	0.49	0.44
半胱氨酸 Cys	0.02	0.02
缬氨酸 Val *	0.39	0.33
甲硫氨酸 Met *	0.14	0.18
异亮氨酸 Ile *	0.31	0.25
亮氨酸 Leu *	0.81	0.83
酪氨酸 Tyr	0.40	0.45
苯丙氨酸 Phe *	0.53	0.57
赖氨酸 Lys *	0.21	0.19
组氨酸 His	0.04	0.01
精氨酸 Arg	0.17	0.14
总氨基酸量	5.66	4.94

† “*”表示必需氨基酸。

类丰富,其总氨基酸量为 5.66 mg/100 mL;其中共含有 7 种人体必需氨基酸,总含量达 2.59 mg/100 mL,占总氨基酸含量的 45.76%。在肉制品发酵过程中,由微生物作用释放出的游离氨基酸是腌制品产生一定色泽、香气及风味的重要来源,说明将该分离菌株作为肉类的发酵剂应用于肉制品的发酵过程中,可改善肉制品的风味及品质,同时也可改善发酵食品的营养价值。

3 结论

本研究通过从四川传统发酵肉制品中筛选并鉴定出产酸能力强的优势植物乳杆菌 (*Lactobacillus paraplantarum*)。通过对分离菌株产酸特性及游离氨基酸的分析,结果显示为该菌株的最适发酵条件为时间 18 h,温度 35 °C, pH 5.5,且可耐受 NaCl 浓度为 6%,NaNO₂浓度为 150 mg/L;其释放的游离氨基酸种类多且含量较高,可达 5.66 mg/100 mL,本研究为传统发酵肉制品中乳酸功能菌的筛选及鉴定提供了菌种支持及该菌株的基础发酵条件数据支持。因此,若考虑将该分离菌株作为发酵剂添加入传统发酵肉制品中不仅可改善产品风味,同时也可为后续该菌株在发酵肉制品中的应用研究提供基础试验数据。

参考文献

[1] 张文龙,杜明,洛铁男,等. 肉品发酵剂的研究发展现状[J]. 食品工业科技, 2012, 33(19): 377-381.

[2] 李湘丽,袁廷香,闫吉美. 乳酸菌在发酵香肠生产过程中的应用研究进展[J]. 食品与机械, 2014, 30(6): 233-237.

[3] Adisorn Swetwathana, Wonnop Visessanguan. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for safety improvements of traditional Thai fermented meat and human health[J]. Meat science, 2015, 109: 101-105.

[4] 李沛军,孔保华,郑冬梅. 微生物发酵法替代肉制品中亚硝酸盐呈色作用的研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(17): 388-391.

[5] 苗君莅,陈有容,齐凤兰,等. 乳酸菌在肉制品、酿造业等领域的应用[J]. 乳业科学与技术, 2005(2): 49-53.

[6] 李丙超,胡卫东,唐文才,等. 传统发酵香肠中菌种的分子生物学鉴定[J]. 食品与机械, 2015, 31(3): 20-22.

[7] 赵九飞. 我国传统发酵肉制品中细菌的分离、鉴定与应用研究[D]. 武汉: 武汉工业学院, 2011: 8.

[8] 赵俊仁,孔保华. 自然发酵风干肠中乳酸菌的分离与鉴定[J]. 食品工业科技, 2010, 31(11): 158-160.

[9] 段艳,靳辉,靳志敏,等. 分离自内蒙古传统肉肠乳酸菌的生长及产酸能力研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(10): 206-211.

[10] 武俊瑞,王晓蕊,唐筱扬,等. 辽宁传统发酵豆酱中乳酸菌及酵母菌分离鉴定[J]. 食品科学, 2015, 36(9): 78-83.

[11] 于长青,张丽娜,姚笛. 利用 PCR 鉴定发酵肉制品中分离的植物乳杆菌[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2008, 20(2): 68-71.

[12] 崔春,彭晚晚,任娇艳,等. 米曲霉和乳酸菌混合制曲对小麦大曲制曲效果的影响[J]. 现代食品科技, 2014, 30(5): 156-160.