

竹笋壳自然发酵物中乳酸菌的分离与鉴定

李巧亮, 张萍, 牛春* (宁夏泰瑞制药股份有限公司质量与技术中心, 宁夏银川 750101)

摘要 [目的]获得促进竹笋壳乳酸发酵的微生物。[方法]以竹笋壳自然发酵物为菌种来源,用 MRS-S 培养基,通过连续定向继代培养,筛选出 pH 下降迅速、乳酸含量高的菌种,并对复合菌株和 4 株单菌的部分发酵性能进行了研究。[结果]通过 16S rDNA 克隆文库分析获得了 4 个克隆,分别为植物乳杆菌亚种(*Lactobacillus plantarum* subsp.)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、乳酸杆菌(*Lactobacillus* sp.)、戊糖乳杆菌(*Lactobacillus pentosus*)。复合菌种培养 24 h 后,pH 下降至 3.16,乳酸含量达 11.41 mg/mL。[结论]该复合菌株能在温度 10~45 °C 和 pH 3~9 的环境中较好地生长,适于不同地区和环境的竹笋壳青贮时广泛应用。

关键词 竹笋壳;乳酸菌;分离;鉴定;发酵性能

中图分类号 S816.3;X172 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)34-0001-03

Isolation, Identification of Lactic Acid Bacteria from Bamboo Shell Natural Fermentation Products

LI Qiao-liang, ZHANG Ping, NIU Chun* (Quality and Technology Center of Ningxia Tairui Pharmaceutical Co. Ltd., Yinchuan, Ningxia 750101)

Abstract [Objective] To obtain the community that could accelerate the fermentation of the bamboo shell. [Method] A lactic acid bacteria community was constructed from the natural fermented products of the bamboo shell by continuous restricted subcultivation in the MRS-S broth. The strains could lower the pH of the broth quickly, and produce high amount of lactic acid. Some of the fermentation characteristics of these four strains and the community were also studied. [Result] The results of 16S rDNA sequencing showed that the closest species of four clones were *Lactobacillus plantarum* subsp., *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus* sp., *Lactobacillus pentosus*. The pH value of the strains dropped to 3.16 and the amount of lactic acid reached 11.41 mg/mL after 24 h cultivation in the broth. [Conclusion] The compound strain could grow well in 10-45 °C and pH 3-9 environment, it is suitable for the wide application of bamboo shell silage in different regions and environments.

Key words Bamboo shell; Lactic acid bacteria; Isolation; Identification; Fermentation performance

竹笋壳是竹笋长成竹子后脱落下来或竹笋经加工后的副产品,产量巨大,若得不到合理利用,会造成很大的资源浪费和环境污染。竹笋壳成分丰富,含水溶物 7.73%、果胶 0.82%、半纤维素 28.12%、木质素 20.34%、纤维素 41.66%^[1],还含有糖、总氮、氨基酸等营养物质^[2]。

秸秆类物质大多被加工成饲料供反刍动物食用。但是,由于秸秆木质纤维素含量高,所以嗜口性差,不易消化。研究表明,微生物发酵是改善秸秆嗜口性和提高饲用价值的重要途径。

贾燕芳等^[3]研究表明,若饲料发酵过程中乳酸菌发酵占优势,饲料品质就好。这表明乳酸能改善秸秆发酵品质,利用乳酸发酵可获得较理想的秸秆青贮饲料。近年来研究表明,通过限制性培养定向驯化自然微生物群体,可获得微生物组成稳定、功能强大、对外界环境稳定的微生物群体^[4]。笔者用竹笋壳自然发酵物为菌种来源,通过长期定向限制性培养筛选出 pH 下降迅速、乳酸产量高、对环境变化耐性强的乳酸菌复合系,并对其组成多样性和代谢性质进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 样品来源 元竹竹笋壳,由宁夏茂盛源食品有限公司提供。将竹笋壳粉碎至 1~2 cm,加水 70%,填充于 100 mL 螺口瓶,封口后 30 °C 下恒温自然发酵。发酵 9 d 后,选择 pH 小于 4.0 并发出酸香味的发酵物作为菌种筛选来源。

1.2 培养基 MRS 培养基^[5]:用于乳酸菌的分离活化及计数。MRS-S 培养基:MRS 培养基中葡萄糖改为蔗糖。溶钙

圈培养基:MRS 培养基中加入 2% CaCO₃。溴甲酚紫培养基:MRS 培养基中加入 1.6% 溴甲酚紫乙醇溶液。

1.3 竹笋壳自然发酵物中乳酸菌的分离、筛选及鉴定

1.3.1 乳酸菌的分离与筛选。将 MRS 培养液和 MRS-S 培养液装至 50 mL 螺口瓶,装液量 90%,加入 5.5 g 鲜重的发酵物,30 °C 下静止培养。

72 h 后,以 5% 接种量连续定向继代培养,保留 pH 下降迅速、产乳酸量较多、对外界环境变化比较稳定的培养物,直到最终获得稳定的培养物。

取发酵液梯度稀释后涂至 MRS 平板并在培养箱中 30 °C 静止培养 48 h,挑取溴甲酚紫平板变黄和有溶钙圈的单菌落在平板上划线分离反复纯化,将革兰氏染色^[6]阳性菌株保存。

再将这些菌株按 5% 的接种量接种到竹笋壳中 30 °C 发酵,筛选出 pH 下降速度快、产乳酸量多的菌株保存。

1.3.2 乳酸定性测定。气相色谱-质谱联用法:将待测乳酸菌株在 MRS-S 液体培养基内 30 °C 下培养 72 h 离心取上清液稀释适当倍数,用 0.25 μm 的微孔滤膜过滤后进行 GC-MS,以标准乳酸液作为对照进行定性分析。GC-MS 条件如下:50 °C 2 min 后以 5 °C/min 的速度升至 100 °C,再以 15 °C/min 的速度升至 190 °C,保持 2 min,共 18 min;汽化温度为 190 °C;检测器温度为 230 °C;检测器电压为 1.5 kV;载气为氦气(64 kPa),流量为 30 mL/min;进样器分流,分流比 1:22。

1.3.3 菌种鉴定^[7]。用变性梯度凝胶电泳、平板分离及建立 16S rDNA 克隆文库 3 种手段相结合进行菌种的鉴定。

1.4 菌株性能测定

1.4.1 乳酸定量测定。以乳酸标准品为外标,建立标准曲线,采用外标法定量,测定条件同“1.3.2”。

作者简介 李巧亮(1989-),女,宁夏西吉人,硕士研究生,研究方向:菌种选育。*通讯作者,工程师,从事抗生素菌种选育、改造和发酵研究。

收稿日期 2016-10-26

1.4.2 竹笋壳接种效果。将竹笋壳粉碎成1~2 cm长,加纯水至含水量为70%(质量浓度),用MRS-S培养液培养24 h的复合菌株按 1.0×10^6 CFU/g(湿重)喷洒,均匀搅拌,装满100 mL的螺口瓶密封,30 ℃培养。以加等量无菌培养基的处理为对照,发酵30 d后各取3组样品进行重复测定。

取发酵料0.5 g,置于4.5 mL无菌水中,振荡后静置20 min,取汁液,测定pH。

取发酵料1.0 g,加2.0 mL纯化水,充分振荡静置后挤汁液过0.25 μ m滤膜,测定乳酸,方法同“1.3.2”。

经60 ℃、48 h烘干后粉碎,过40目筛,粗蛋白的测定采用凯氏定氮法,粗纤维的测定用酸碱洗涤法,粗脂肪的测定采用索氏提取法,具体方法参考文献[8]。

1.4.3 复合菌株24 h生长曲线和pH的变化。使用紫外分光光度计在可见光600 nm处每隔2 h测定MRS-S培养液的OD值,以空白培养基为对照。

1.4.4 菌株对pH和温度的稳定性。将MRS-S液体培养基调至不同pH,将培养24 h的菌株接种于其中,培养24 h后于波长600 nm处测定培养液OD值。将不同温度下培养24 h的菌株于波长600 nm处测定培养液OD值。

2 结果与分析

2.1 菌种分离与筛选 从图1可以看出,通过连续定向继代培养,直到复合菌株的pH稳定,发现MRS-S培养的菌株pH变化更稳定,第23代pH达到3.18,以此为样品来源进行菌株筛选。

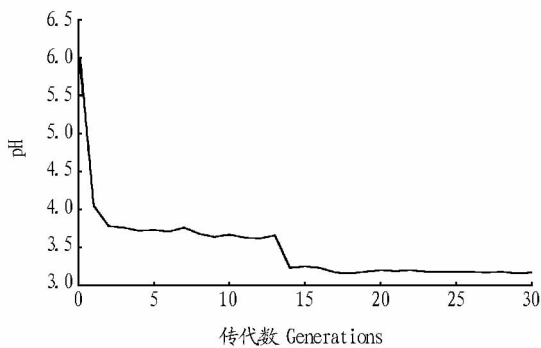


图1 传代过程中复合菌系pH的变化

Fig.1 Changes of pH value of compound bacteria during passage

对样品进行系列稀释后在MRS-S培养基平板上进行菌种分离,经革兰氏染色镜检、溴甲酚紫显色、融钙圈反应、30 ℃下培养液中发酵产酸比较、接种到竹笋壳中30 ℃下发酵产酸比较,最终筛选出4株产酸较快的菌株1、2、3、4,其菌落形态如表1所示。

2.2 菌种鉴定

2.2.1 形态学特征。根据菌落形态、革兰氏反应及菌体形态,从第23代培养物分离到4株单菌,它们具有乳酸菌的特性。

2.2.2 乳酸定性测定结果。通过GC-MS分析4株菌的培养液中均有与乳酸标准液相同的色谱峰,出峰时间为14.899 min,由此初步确定该4株菌为乳酸菌。

表1 筛选菌株的形态学特征

Table 1 Morphological characteristics of selected strains

菌株 Strain	菌落形态(48 h) Colonial morphology	菌体形态 Microbial morphology
1	乳白色,较凸,光滑圆整,直径0.5~2.0 mm	直或弯的杆状,单个、成对或成链状
2	乳白色,较凸,光滑圆整,直径0.5~2.0 mm	直或弯的杆状,单个、成对或成链状
3	微白色,凸起,圆形,边缘整齐,湿润,直径1.0~2.5 mm	杆状或球状
4	微微隆起,圆形,乳白色,光滑,有光泽,直径1.0~2.0 mm	杆状或球状

2.2.3 16S rDNA序列分析。用16S rDNA克隆文库的方法对这4株菌进行了序列分析。由表2可知,这4株菌均属于乳杆菌,且相似度均为99%。

表2 克隆文库的16S rDNA序列分析

Table 2 16S rDNA sequence analysis of the clone library

菌株 Strain No.	菌株名称 Strain name	相似度 Similarity//%	登录号 Accession No.
1	植物乳杆菌亚种 <i>Lactobacillus plantarum</i> subsp	99	AB601168.1
2	植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i>	99	CP006033.1
3	乳酸杆菌 <i>Lactobacillus</i> sp.	99	JX193619.1
4	戊糖乳杆菌 <i>Lactobacillus pentosus</i>	99	FJ386571.1

2.3 菌株性能测定

2.3.1 复合菌株及其分离菌的第23代发酵产物。采用GC-MS方法,并用乳酸标品作为外标定量,测定了复合菌株第23代及其4株单菌MRS-S培养液的发酵产物乳酸含量。从图2可以看出,复合系在培养开始至72 h的培养期间始终检测到乳酸和乙酸(少量)还有醇类(微量)。乳酸和乙酸多有利于降低pH,微量出现的醇类则有利于增加发酵饲料的风味,可提高饲料的嗜口性。因此,复合菌株的发酵产物均有利于提高发酵饲料品质,增加饲料的嗜口性,没有发现影响饲料品质的成分。复合菌株的乳酸产量明显高于单个菌株,具有更好的发酵优势。

2.3.2 接种复合菌剂和自然发酵产物的化学成分比较。从图3可以看出,相对于原材料,发酵45d后的发酵料其pH均有降低,且增加了乳酸含量,其中接种发酵料中乳酸含量较未接种的对照有所增加,粗蛋白含量也有所提高,粗纤维含量有所降低。由此可见,接种后大大提高了乳酸含量,增加了饲料的嗜口性,同时使竹笋壳得到一定软化,改善了饲料的发酵品质。

2.3.3 复合菌株24 h生长曲线、pH变化及其对温度和酸碱的稳定性。从图4可以看出,复合菌株适应期为前6 h,6 h以后进入对数期,其生长周期较短,培养16 h后即进入稳定期,OD₆₀₀值达到2.000。

从图5可以看出,复合菌株pH降低较快,培养10 h后pH达到3.82,进入稳定期后pH在3.16左右。

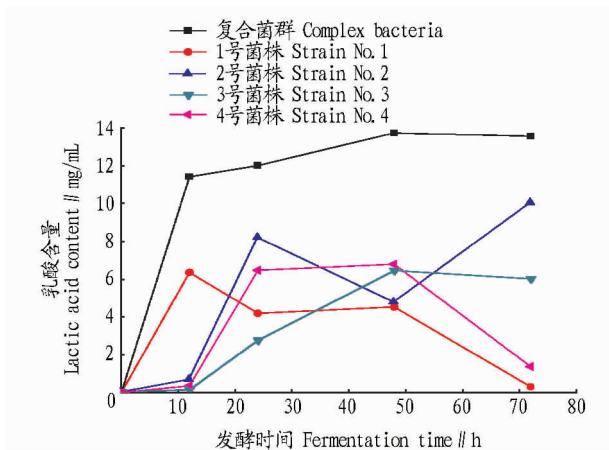


图2 复合菌株及其分离菌的第23代发酵产物中的乳酸含量
Fig.2 Lactic acid content in composite strain and twenty-third generation fermentation products of isolated bacteria

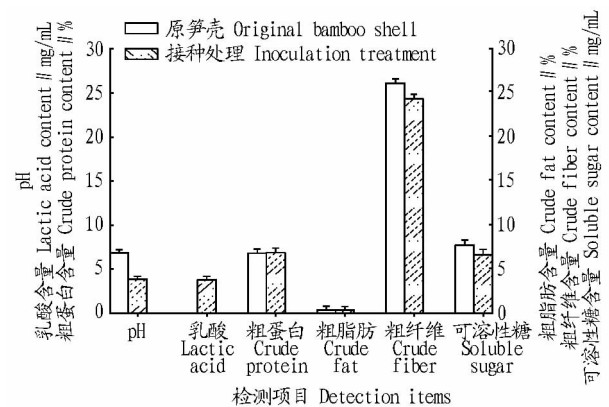


图3 接种复合菌剂和自然发酵产物的化学成分比较
Fig.3 Comparison of chemical constituents of products with composite agents and natural fermentation

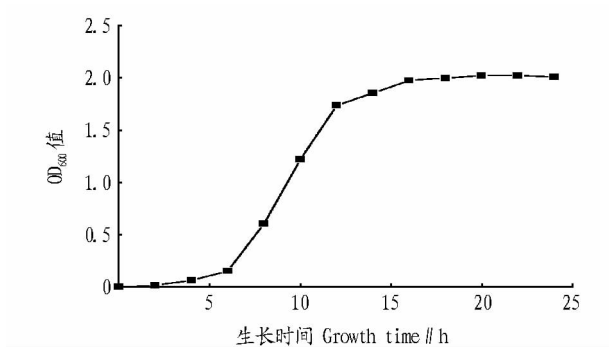


图4 菌株24 h 生长曲线
Fig.4 The growth curve of strain within 24 h

从图6可以看出,复合菌株在pH 4~8、24 h的生长量OD₆₀₀值均超过1.121,而在pH为3和9时生长较慢,OD₆₀₀值分别为0.223和0.112。

从图7可以看出,复合菌株能在温度10~45℃内生长,其中在37℃生长最活跃,培养24 h时,其OD₆₀₀值为1.959,23℃和30℃培养时仍保持较好的生长,而10℃和45℃培养时生长缓慢。

3 结论

从竹笋壳自然发酵物中分离出来的复合菌株主要组成

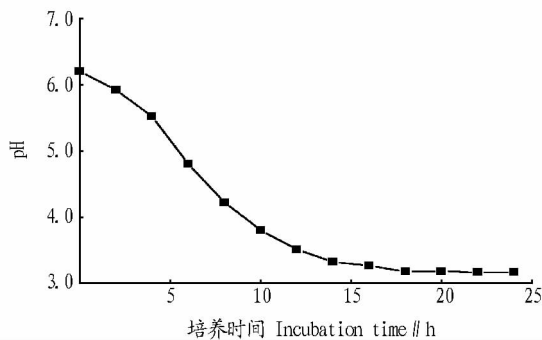


图5 菌株24 h pH的变化

Fig.5 Changes of strain pH within 24 h

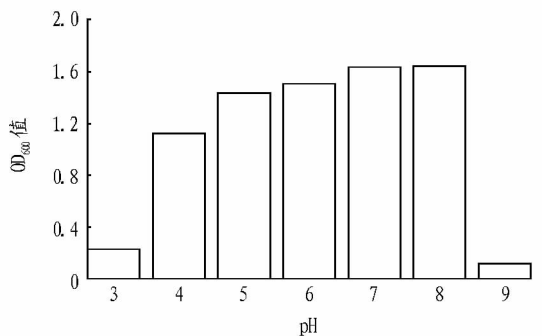


图6 pH对菌株OD₆₀₀值的影响

Fig.6 Effects of pH on strain OD₆₀₀

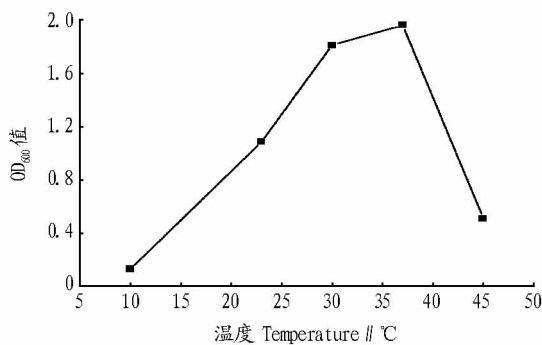


图7 温度对菌株OD₆₀₀值的影响

Fig.7 Effects of temperature on strain OD₆₀₀

为戊糖乳杆菌、乳酸杆菌、植物乳杆菌、植物乳杆菌亚种,都属于乳酸杆菌。

复合菌可在24 h内使MRS-S培养基pH降至3.16,代谢产物中乳酸的生成量很高,达到11.41 mg/mL,高于单一菌株。另外还有少量乙酸和微量醇类物质生成,可改善饲料风味,而且,没有影响饲料品质的产物生成。

接种复合菌于竹笋壳发酵可以提高乳酸含量,增加饲料嗜口性,同时使竹笋壳得到一定软化,改善了饲料的发酵品质。比竹笋壳自然发酵效果要好^[9-10]。

该复合系能在温度10~45℃和pH 3~9的酸碱环境中较好地生长,表现出对环境的耐性,适于不同地区和环境的竹笋壳青贮时广泛应用^[11-12]。

(下转第19页)

别放入 3 个培养皿内。将培养皿分别置于低温(15 ℃)、中温(25 ℃)、高温(35 ℃)的恒温箱中,观察种子发芽情况,计算发芽率,发芽率 = 发芽总粒数/试验总粒数 × 100%。

继续观察种子样本,测定发芽势,发芽势 = 从开始至发芽高峰为止的发芽数/试验种子总数 × 100%。

1.3.6 生活力。取白木通种子若干,随机分成 3 组,采用剥胚法,清水浸种 12 h,用解剖刀小心地把种子切开,取出胚,放在铺有湿润滤纸的培养皿内,每皿 50 粒,放在 25 ℃ 恒温箱中,6~8 d 即可观察胚的生长情况,凡健全有生活力的种子不腐烂,胚的一部分或各部分表现伸长或张开,饱满而有光泽;无生活力的种子很易变色腐烂,种子生活力 = 健全种子数/试验种子总数 × 100%。

2 结果与分析

2.1 果实与种子形态特征 白木通野生果实结实率低,每个花序可结 1~4 个果,大多为 1~2 个,果实为浆果,长椭圆形,微带弯曲,鲜果长 15~22 cm,直径 8~10 cm,重 200~420 g;果肉白色,柔软多汁,有黏性,味道香甜。

白木通种子卵形、长卵形、三角状肾形,长径 9~15 mm,短径 5~10 mm,表面黑色,有光泽,外种皮硬,骨质,内种皮薄膜质,胚乳半透明,含油分,胚细小,直生,胚根圆锥状,子叶 2 枚。

2.2 果实中种子数 由表 1 可知,18 个白木通的果实主要为长椭圆形,果实中种子数平均为 123 粒,种子形状有三角状肾形、卵形、长卵形,主要为三角状肾形。

2.3 种子检测

2.3.1 种子净度、千粒重、含水量、生活力。白木通种子净度平均为 98.6%,千粒重平均为 112.74 g,种子含水量平均为 29.2%,种子生活力平均为 92.7%。

2.3.2 种子发芽率。白木通种子的发芽率在中温(25 ℃)时最高,达 91.3%,高温(35 ℃)时发芽率最低,仅为 75.7%,3 组种子的发芽率无显著性差异。在进行发芽率试验时,高温(35 ℃)时的发芽率最低,种子容易出现吸水胀破现象,继而长出白霉,出现腐烂,其原因不明。白木通种子萌发时的温度应控制在 25 ℃ 左右。

2.3.3 种子发芽势。白木通种子发芽势平均为 67.0%,

种子发芽势最高达 72.0%,最低为 63.0%。

表 1 白木通果实与种子形状

Table 1 Shape of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz. fruit and seed

编号 Number	果实形状 Fruit shape	种子数 Seed number//粒	种子形状 Seed shape
1	长椭圆形	126	卵形
2	纺锤形	129	卵形
2	纺锤形	120	长卵形
4	纺锤形	121	卵形
5	长椭圆形	98	三角状肾形
6	长椭圆形	101	三角状肾形
7	长椭圆形	154	三角状肾形
8	长椭圆形	122	卵形
9	长椭圆形	56	卵形
10	长椭圆形	150	长卵形
11	长椭圆形	128	长卵形
12	长椭圆形	162	三角状肾形
13	长椭圆形	133	三角状肾形
14	长椭圆形	138	三角状肾形
15	长椭圆形	124	三角状肾形
16	长椭圆形	109	长卵形
17	长椭圆形	107	长卵形
18	长椭圆形	139	卵形
平均 Mean		123	—

3 小结

通过对白木通种子果实形态、果实平均种子数、种子净度、千粒重、含水量、发芽率、发芽势、生活力等种子生物学特性测试,得到白木通种子质量检测结果。白木通果实中平均有 123 粒种子,千粒重平均为 112.74 g,其千粒重对发芽率、发芽势和种子生活力均有一定的影响,千粒重越大表明种子越饱满,其发芽率、发芽势和生活力就越强,这为生产实践中的选种和育种提供了科学依据。

参考文献

- [1] 熊大胜,曹庸,牟子平,等.三叶木通生物学特性研究[J].西南农业大学学报,1996,18(1):85-90.
- [2] 熊大胜,牟子平,雷红梅,等.三叶木通叶片生长生物学特性研究[J].华南农业大学学报,1995,16(3):98-101.
- [3] 李金光,李嘉瑞.三叶木通果实生物学特征及营养成分的研究[J].广西植物,1991,11(2):189-192.
- [7] 王小芬,高丽娟,杨洪岩,等.首蓆青贮藏用乳酸菌复合系 A12 的组成多样性[J].微生物学报,2006,46(5):767-772.
- [8] 朱燕,夏玉宇.饲料品质检验[M].北京:化学工业出版社,2003:10-30.
- [9] VAN BEEK S, PRIEST F G. Evolution of the lactic acid bacterial community during malt whisky fermentation: Apolyphasic study[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(1): 297-305.
- [10] 崔宗均,李美丹,朴哲,等.一组高效稳定纤维素分解菌复合系 MCI 的筛选及功能[J].环境科学,2002,23(3):36-39.
- [11] DANNER H, HOLZER M, MAYRHUBER E, et al. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(1): 562-567.
- [12] 冯树,张忠泽,混合菌.一类值得重视的微生物资源[J].世界科技研究与发展,2001,22(3):44-47.

(上接第 3 页)

参考文献

- [1] 周晓洁,李建强,陈延兴.竹笋壳化学成分分析[J].武汉科技学院学报,2010(1):1-3.
- [2] 周兆祥,田荆祥,赖椿根.竹笋壳的化学成分[J].浙江林学院学报,1991,8(1):54-59.
- [3] 贾燕芳,石伟勇.不同添加剂对笋壳青贮藏发酵品质的影响[J].浙江农业科学,2011(2):341-343.
- [4] HARUTA S, CUI Z J, HUANG Z, et al. Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 59(4): 529-534.
- [5] 杨洁彬,郭兴华,张箴,等.乳酸菌:生物学基础及应用[M].北京:中国轻工业出版社,1996.
- [6] 凌代文,东秀珠.乳酸菌细菌分类鉴定及实验方法[M].北京:中国轻工业出版社,1999.