

自制酸菜中植物乳杆菌的分离与鉴定

程秀玉¹, 王炎松² (1. 海南省疾病预防控制中心, 海南海口 570203; 2. 海口维琨瑗生物研究院, 海南海口 570312)

摘要 [目的]了解自制酸菜中的有益菌种,为分析其营养价值提供依据。[方法]采用涂布分离和烛缸厌氧法对自制酸菜中的有益菌种进行培养,并对得到的细菌菌落形态特征及生化特征进行分析。[结果]经筛选,得到3株乳酸杆菌,其中2株为植物乳杆菌,1株为短乳杆菌。[结论]自制酸菜中含有多种植物乳酸杆菌,具有较高的营养价值。

关键词 自制酸菜;植物乳杆菌;分离与鉴定

中图分类号 TS201.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)25-039-02

Isolation and Identification of *Lactobacillus plantarum* in Homemade Pickle

CHENG Xiu-yu¹, WANG Yan-song² (1. Hainan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Haikou, Hainan 570203; 2. Haikou VTI Biological Institute, Haikou, Hainan 570312)

Abstract [Objective] The aim was to understand the beneficial bacteria in homemade pickle, and provide a basis for analysis of its nutritional value. [Method] The beneficial bacteria in homemade pickle were cultured by spread plate method and candle jar anaerobic method, the morphological characteristics and biochemical characteristics of obtained bacterial colony were analyzed. [Result] 3 strains of lactic acid bacteria were screened successfully, including 2 strains of *Lactobacillus plantarum* and 1 strain of *Lactobacillus brevis*. [Conclusion] Homemade pickle contains a variety of *Lactobacillus plantarum*, which has the high nutritive value.

Key words Homemade pickle; *Lactobacillus plantarum*; Isolation and identification

乳酸菌是指一群通过发酵糖类,产生大量乳酸的细菌总称,是一类革兰氏染色阳性的厌氧性细菌。由于乳酸菌本身的生理特性,在发酵食品行业中常作为发酵剂以改善食品的风味和质地等。植物乳杆菌是一种有益乳酸菌,能对食品产生独特的风味,在人体内具有维持肠道内菌平衡、降低胆固醇^[1]、提高人体免疫和促进营养物质吸收等多种功能。因此,植物乳杆菌被广泛应用于多种领域中。笔者采用涂布分离和烛缸厌氧法对自制酸菜中的有益菌种进行培养,并对得到的细菌菌落形态特征及生化特性进行分析。

1 材料与方 法

1.1 材料 自制酸菜, MRS培养基:蛋白胨 10.0 g,牛肉粉 5.0 g,酵母粉 4.0 g,葡萄糖 20.0 g,吐温 80 1.0 mL, K₂HPO₄·7H₂O 2.0 g,醋酸钠·3H₂O 5.0 g,柠檬酸三铵 2.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, MnSO₄·4H₂O 0.05 g,琼脂粉 15.0 g, pH 调节为 6.2。细菌生化微量鉴定管来源于杭州滨和微生物试剂有限公司。

1.2 主要仪器 生物显微镜、培养箱、恒温干燥箱、电子分析天平、超净台、培养皿、锥形瓶、玻璃棒、接种环、接种针、酒精灯、载玻片、无菌试管、移液器。

1.3 方 法

1.3.1 酸菜的制作^[2]。选用新鲜成熟的大芥菜,去除头部、根部,清水洗净后晾干,切成小块,放入酸菜坛,压实,加适量黄酒、食醋等调料,再注入浓度 3% 左右的盐水,至离坛口约 2 cm 处,用坛盖密封发酵,室温 18 ℃ 左右,发酵时间 5 d,发酵成熟后及时用于试验。

1.3.2 菌落培养与鉴定。

1.3.2.1 涂布分离。以无菌操作将经过充分摇匀的 25 g 检样放入装有 225 mL 灭菌生理盐水的灭菌锥形瓶内制成 10⁻¹

的均匀稀释液。

用 1 mL 无菌吸管吸取 10⁻¹ 稀释液 1 mL,沿管壁缓慢注入装有 9 mL 灭菌生理盐水的试管中,将试管中的液体混合振荡均匀。

另吸取 1 mL 无菌吸管按上述操作顺序,配制 10 倍递增稀释匀液,每递增稀释液 1 次,即换 1 支 1 mL 灭菌吸管,这样按 10 倍递增将稀释液稀释至 10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶。

选择 10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 稀释液,每个稀释度吸取 0.1 mL 样品匀液分别涂布于 MRS 培养基的平皿,并作好标记。采用烛缸厌氧法 37 ℃ 培养 48 h。

作空白对照,吸取 0.1 mL 生理盐水分别涂布于同一批 MRS 培养基平皿中。

1.3.2.2 初筛。在超净工作台上将各平板中具有乳酸菌菌落特征的菌落进行多次划线分离,直到分离到疑为乳酸菌的单菌落,再将单菌落进行纯培养,留待下一步检测鉴定。

1.3.2.3 鉴定。①革兰氏染色。将培养好的菌种,刮取菌苔,先进行革兰氏染色,革兰氏染色为阳性的,留待下一步检测。②过氧化氢酶试验。用接种环挑取菌落,置于洁净试管内,滴加 3% 过氧化氢溶液 2 mL,观察结果,有气泡的为阳性,无气泡的为阴性。试验菌为阴性的,并且镜检为杆菌的,则可留待下一步试验。③葡萄糖发酵产酸试验。用接种针挑取菌种接入放有葡萄糖发酵培养基的葡萄发酵管中,37 ℃ 培养 24 h,若溶液变浑浊,说明产酸,为阳性,否则为阴性^[3]。④明胶液化试验。用接种针挑取菌落穿刺于明胶中,37 ℃ 培养 7 d,然后置于冰箱中 0.3~1.0 h,若不再凝固,说明此菌已液化明胶,不是乳酸菌,不液化明胶的则为乳酸菌。⑤淀粉水解试验。将菌种接种于淀粉生化管中,37 ℃ 培养 24 h 后,在生化管中滴加革兰氏碘液,观察颜色变化。若呈蓝黑色或蓝紫色,表示未水解或不完全水解淀粉酶,显阴性;若不显色表示不水解淀粉酶,显阳性。⑥碳水化合物糖醇发酵试验。将菌种分别接种于各生化管中,

37 ℃ 培养 24 h, 观察颜色变化。⑦动力试验。用接种针挑取菌落穿刺于半固体琼脂培养基中, 37 ℃ 培养 48 h, 然后观察。若培养物只生长在接种的穿刺线上, 边缘十分清晰, 说明试验菌无运动性; 若培养物生长由穿刺线向四周呈云雾状扩散, 其边缘模糊呈云雾状, 表示试验菌有运动性^[3], 则为植物乳杆菌。

2 结果与分析

2.1 筛选结果 从平皿培养基挑取单菌培养菌种, 根据乳杆菌及植物乳杆菌的形态特征, 将各菌种进行革兰氏染色为阳性, 过氧化氢酶阴性, 镜检为杆状形的, 共选出 3 株菌, 标记为 L₁、L₂、L₃。

2.2 鉴定结果 对 3 株菌种的细菌形态特征、菌落形态特征和生化反应特征进行鉴定, 结果见表 1、2。

根据菌种的细菌形态、菌落形态特征和生化反应特征,

依据《伯杰细菌手册》(第 8 版)^[4]、《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》^[3] 和 GB 4789. 35—2010《食品微生物学检验 乳酸菌检验》^[5], 鉴定 L₁ 和 L₂ 为植物乳杆菌, L₃ 为短乳杆菌。

表 1 酸菜中分离得到的乳酸菌及菌落形态特征
Table 1 The morphological characters of the lactic acid bacteria and colony isolated from pickle

菌株 Strains	细菌形态 Bacterial morphology	菌落形态 Colony morphology
L ₁	圆端直杆状, 两端圆形, 革兰氏染色阳性, 无芽孢, 无鞭毛, 单个或成短链状存在, 能运动	白色, 中央凸起, 表面光滑, 圆形, 边缘整齐, 有光泽
L ₂	圆端直杆状, 两端圆形, 革兰氏染色阳性, 无芽孢, 无鞭毛, 单个或成短链状存在, 能运动	白色, 中央凸起, 表面光滑, 圆形, 边缘整齐, 有光泽
L ₃	圆端短杆状, 革兰氏染色阳性, 成对或成链存在, 无芽孢, 无鞭毛, 不运动	乳白微黄, 低凸, 表面光滑, 边缘整齐, 有光泽

表 2 从酸菜中分离得到的乳酸菌生化特征
Table 2 The biochemical characteristics of the lactic acid bacteria isolated from pickle

菌株 Strains	过氧化酶 试验 Peroxidase test	葡萄糖发酵 产酸试验 Glucose fermentation acid test	明胶液化 试验 Gelatin liquefaction test	淀粉水解 试验 Starch hydrolysis test	七叶苷 Esculin	纤维二糖 Cellobiose	麦芽糖 Maltose	甘露醇 Mannitol	水杨苷 Salicin	山梨醇 Sorbitol	蔗糖 Sucrose	棉籽糖 Raffinose
L ₁	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L ₂	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L ₃	-	-	+	d	-	+	-	-	-	d	d	d

注: “+”表示 90% 以上菌株阳性; “-”表示 90% 以上菌株阴性; “d”表示 11% ~ 89% 菌株阳性。
Note: “+”stands for more than 90% of the strains were positive; “-”stands for more than 90% of the strains were negative; “d”stands for 11% ~ 89% of the stains were positive.

3 结论

试验结果表明, 自制酸菜中是含有植物乳杆菌的, 说明酸菜具有较高的营养价值, 加上其口感清爽又开胃, 因此可将从酸菜中分离纯化得到的有益乳酸菌, 应用到食品、农业和医药等行业中, 对提高人民健康水平起到积极意义。

参考文献

[1] 李常营, 卢晓霞, 于志会, 等. 酸菜来源植物乳杆菌 S4-5 的降胆固醇作

用[J]. 食品科学, 2011, 32(7): 69-72.
[2] 李文斌, 唐中伟, 宋敏丽, 等. 农家泡菜发酵液中乳酸菌的研究[J]. 食品工程, 2009(3): 38-41.
[3] 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.
[4] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.
[5] 中华人民共和国卫生部. 食品微生物学检验乳酸菌检验: GB 4789. 35—2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.

(上接第 32 页)

含量分别增加 5.8 mg/kg、0.2%、11.6 mg/kg。由此可见, 由于供试生物有机肥中活性菌能够产生植物生长刺激素和抑制植物病原菌活动的菌株, 无机肥结合生物有机肥的施用将有效提升黄瓜产量、品质及抗病防虫能力^[16], 建议在仪征地区黄瓜种植中加大生物有机肥的推广应用。

参考文献

[1] 禹宙. 生物有机肥对我国农业可持续发展的影响[J]. 中国农学通报, 2008(51): 281-284.
[2] 中国科学院红壤生态实验站. 红壤生态系统研究: 第一集[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 1992: 16-17.
[3] 侯云鹏, 秦裕波, 尹彩侠, 等. 生物有机肥在农业生产中的作用及发展趋势[J]. 吉林农业科学, 2009, 34(3): 28-29.
[4] 孟瑶, 徐凤花, 孟庆有, 等. 中国微生物肥料研究及应用进展[J]. 中国农学通报, 2008, 24(6): 276-283.
[5] 龙明华, 于文进, 唐小付, 等. 复合微生物肥料在无公害蔬菜上的效应初报[J]. 中国蔬菜, 2002(5): 4-6.
[6] 宋志伟, 杨首乐, 王庄安, 等. 复合微生物肥料在茄果类蔬菜上应用效

果研究[J]. 河南职业技术师范学院学报, 2002, 30(4): 33-35.
[7] 魏峰, 侯祥保, 魏林娜. 几种微生物肥料在小麦上的施用效果[J]. 安徽农业科学, 2002, 30(1): 90, 112.
[8] 王宝档, 黄寿煦, 苏苗富, 等. 微生物肥料对土壤肥力的影响[J]. 长江蔬菜, 2003(11): 38-39.
[9] 苗在田. 微生物肥料在果树上应用[J]. 西北园艺, 2007(8): 31-32.
[10] 王明, 刘丹, 梁文举, 等. 微生物肥料对绿色食品蔬菜品质的影响[J]. 农业环境保护, 2002, 21(6): 562-563.
[11] 陈龙娟, 王坚, 陶宏. 生物有机肥在水稻上的应用效果研究[J]. 上海农业科技, 2014(6): 112, 135.
[12] 刘小娇. 番茄施用金农惠民生物有机肥料效果研究[J]. 土肥植保, 2014(9): 73, 81.
[13] 高俊杨. 生物有机肥在菠菜上的应用效果研究[J]. 现代农业科技, 2010(1): 112, 114.
[14] 李红丽, 于贤昌, 高俊杰, 等. 嫁接和自根黄瓜果实感官评价与营养品质的相关性[J]. 中国蔬菜, 2008(3): 23-26.
[15] 沈楠. 浅谈营养液栽培下影响黄瓜品质的因素[J]. 现代园艺, 2009(4): 60-61.
[16] 李晓辉, 吴皓琨, 臧海波, 等. 生物有机肥料中微生物活菌有效性的研究[J]. 生物技术, 1999(9): 44-46.