

海南发酵食品鱼茶中 乳杆菌发酵特性的研究

徐传标 霍冬雪 胡淇淞 李从发 张家超*
(海南大学食品学院 海南海口 570228)

摘要: 在前期研究中,从海南省传统发酵食品鱼茶中分离获得 144 株乳杆菌,主要隶属于植物乳杆菌、戊糖片球菌、香肠乳杆菌、短乳杆菌、棒状乳杆菌、鼠李糖乳杆菌及干酪乳杆菌等。本文从发酵应用的角度出发,对分离得到的乳杆菌进行了一系列的鱼肉发酵特性实验,包括 pH 变化率实验、耐食盐、耐亚硝酸盐实验、氨基酸脱羧酶实验等。实验结果表明: R19-5, M1-4, R21-3, R21-4 和 RD-1 五株菌具有快速产酸能力,经过 12~16 h 发酵后, pH 分别能达到 3.75、3.89、3.86、3.73 和 3.74,同时都能耐受 150 mg/kg NaNO₂ 溶液和 8% 盐浓度;菌株在发酵时都不产氨基酸脱羧酶。综合实验结果,筛选出具有优良发酵特性的植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) 3 株,香肠乳杆菌(*Lactobacillus farciminis*) 1 株和短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*) 1 株。本研究将对寻找优良的肉制品发酵剂和合理利用新的生物资源具有一定的理论指导作用。

关键词: 鱼茶 乳杆菌 发酵性能

Fermentation characteristics of *Lactobacillus* isolated in Hainan fermented food Yucha

XU Chuan-biao, HUO Dong-xue, HU Qi-song, LI Cong-fa, ZHANG Jia-chao*

(College of Food Science, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: In previous study, a total of 144 strains of *Lactobacillus* were isolated from Yucha, a traditional fermented food of Hainan province. After identification, these strains mainly belonged to the *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus coryniformis* and *Lactobacillus rhamnosus*. From the perspective of fermentation application, we had made a series of *Lactobacillus* fermentation characteristic test, including acidification rate test, resistance to salt and the nitrate test, amino acid decarboxylase test. Experimental results showed that: R19-5, M1-4, R21-3, RD-1 and R21-4 had fast capacity of acid, after 12~14 h after fermentation, pH can reach 3.75, 3.89, 3.86, 3.89 and 3.86, both tolerated concentration of 150 mg/kg NaNO₂ and 8% NaCl. Strains in the fermentation did not produce amino acid decarboxylase. The results showed that 3 *Lactobacillus plantarum* strains, 1 *Lactobacillus farciminis* strain and 1 *Lactobacillus brevis* with excellent fermentation characteristics were selected based on the comprehensive test. This research had certain theoretical guidance for looking for excellent meat starter cultures and rational utilization of biological resources.

Key words: Yucha; *Lactobacillus*; fermentation; performance

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2017)07-0117-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2017.07.014

海南鱼茶是我国海南黎族和苗族的一种传统淡水全鱼发酵制品,产品具有回甜咸鲜、香气独特、回味醇厚、保质期长等特点,其是一种高蛋白、低脂肪、富含多种游离氨基酸的风味食品。本课题组对鱼茶制品进行了菌相分析,分离出制品中乳酸菌同时对可培养部分的菌进行分离纯化后测序鉴定出其种属关系。其中乳酸菌包括植物乳杆菌、戊糖片球菌、香

肠乳杆菌、短乳杆菌、棒状乳杆菌、鼠李糖乳杆菌及干酪乳杆菌等 144 株^[1]。

在热带或亚热带地区,人们为了在高温、高湿度条件下保存鱼肉,采用发酵的方式加工传统发酵鱼制品。发酵鱼制品具有浓郁的发酵风味,还具有独特的保健作用,深受当地人民的喜爱。国内外学者对发酵鱼制品进行研究,其中东南亚地区的 Nampla、

收稿日期: 2016-10-24

作者简介: 徐传标(1990-),男,硕士研究生,研究方向:食品微生物, E-mail: myyou163@163.com。

* 通讯作者: 张家超(1986-),男,博士,教授,研究方向:食品微生物, E-mail: zhjch321123@163.com。

基金项目: 海南省高等学校科学研究项目(Hnky2016-12);海南大学科研启动基金(KYQD1548)。

Bakasang^[2-3]等传统发酵鱼制品进行了菌相分析和优势菌种的筛选,发现乳酸菌为重要的优势菌群,且与产品品质有着密切的关联性。乳酸菌产生的细菌素能抑制或杀死食源性致病菌,应用生物发酵方法来保持和改善肉类制品的品质或抑制腐败菌的生长是一种很好的食品加工保藏方法^[4],同时乳酸菌还有重要的益生功效,如抗癌、降胆固醇、抗氧化、抑菌抗病等^[5-8]。但海南鱼茶发酵制品自然发酵方法进行手工作坊式生产,存在着发酵时间长、产品质量稳定性差、安全性低等问题。在自然发酵的情况下存在着其他杂菌生长代谢影响产品的安全性及稳定,并且不同型乳酸菌代谢也会极大的影响产品的风味。发酵剂的选择对发酵制品后期成品的组织结构、安全、风味等特性起关键性作用。

本课题组对鱼茶制品菌相分析,发现乳酸菌是重要的优势菌,而迄今为止,对海南鱼茶制品中乳酸菌的菌种特性尚无相关报道。本研究也是首次对海南传统发酵鱼茶制品中存在的乳酸菌菌株特性的考查,对改进我国鱼发酵制品传统发酵工艺、实现其工业化生产具有理论指导意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

于鱼茶制品中分离出的 144 株乳杆菌(已完成分离鉴定见表 1)。

表 1 鱼茶中微生物分离鉴定结果

Table 1 Results of isolation and identification of microorganisms in Yucha

菌株名	准确率 (%)	菌株数
植物乳杆菌(<i>Lactobacillus plantarum</i>)	99	60
戊糖乳杆菌(<i>Lactobacillus pentosus</i>)	99	34
香肠乳杆菌(<i>Lactobacillus farciminis</i>)	99	18
短乳杆菌(<i>Lactobacillus brevis</i>)	99	10
干酪乳杆菌(<i>Lactobacillus casei</i>)	99	6
棒状乳杆菌(<i>Lactobacillus coryniformis</i>)	99	5
鼠李糖乳杆菌(<i>Lactobacillus rhamnosus</i>)	99	5
其他	99	6

蛋白胨、牛肉膏、葡萄糖、琼脂、酵母膏、溴甲酚紫、精氨酸、半胱氨酸等 BR 级;胆盐、NaCl、柠檬酸二铵、 KH_2PO_4 、NaOH、HCl、 NaNO_2 等试剂 AR 级;MRS 培养基 广东环凯微生物科技有限公司。

表 2 海南鱼茶中分离出的乳酸菌的耐盐实验

Table 2 Salt tolerance test of lactic acid bacteria isolated from Hainan Yucha

菌株特性 盐浓度 (%)	植物乳杆菌 (60) ¹	戊糖乳杆菌 (34)	香肠乳杆菌 (18)	短乳杆菌 (10)	干酪乳杆菌 (6)	棒状乳杆菌 (5)	鼠李糖乳杆菌 (5)	其他 (6)
0	100 ²	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100	100
8	31.7	23.5	33.3	10	33.3	0	20	50
10	0	0	0	0	0	0	0	0

注: 1: 分离的菌株数 2: 实验存活百分含量 (%) 是指占该类菌株的百分含量。表 3、表 4 同。

PB303-N 型电子精密天平 梅特勒-托利多仪; RE-5203AA 型立式旋转蒸发仪 上海亚荣仪器设备有限公司; YXQ SG41.280 型高压蒸汽灭菌锅 上海医用核子仪器厂; CSY-2 型超净工作台 上海净化设备厂; TD5M 型台式低速离心机 长沙湘智离心机仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 乳酸菌的生长性能及 pH 变化率 采取 Ammor 等人^[9]的方法并做修改。将分离得到的不同乳酸菌株接种到 MRS 液体培养基中培养,同时以未接种的 MRS 液体培养基作空白对照,37 °C 培养 0 h 开始每隔 2 h 后分别测定其 pH。

1.2.2 耐盐性实验、耐亚硝酸盐测定 采用胡永金等人^[10]和赵亚娟等人^[11]方法并做修改。将活化后待测乳酸菌株以 1% (v/v) 接种至含有 2%、4%、8%、10% 的 NaCl 浓度 0、50、100、150 mg/kg 的 NaNO_2 浓度液体 MRS 培养基中,分别在 37 °C 厌氧培养 36 h 和 24 h,同时做空白对照,于 $\lambda = 600 \text{ nm}$ 处测定其 OD 值。

1.2.3 氨基酸脱羧酶实验方法 采用 Ammor 等人^[9]的并做修改。将活化后的待测菌株分别按 1% (v/v) 接入添加有 1% (m/v) 组氨酸、酪氨酸、赖氨酸及鸟氨酸的含 0.06% 溴甲酚紫作为指示剂的 MRS 培养液中,37 °C 厌氧培养 7 d 后观察培养液颜色变化,颜色由黄变紫表示菌株氨基酸脱羧酶活性阳性。

1.2.4 数据处理与统计分析 所得数据为三次测定值的平均值,通过 Excel 2010 进行数据处理,用 origin 作图。

2 结果与分析

2.1 耐盐、耐亚硝酸盐测定

根据比浊法原理,以菌株在 MRS 液体培养基 OD 值的变化,作为微生物生长指标,研究菌株的耐盐和耐亚硝酸盐特性。实验结果如表 2 所示。

由表 2 可得出,筛出的菌株均能耐受 4% 盐浓度,8% 盐浓度下对一些菌有抑制作用但是其中 13.4% 乳杆菌,5.6% 戊糖乳杆菌,4.2% 香肠乳杆菌能耐受 8% 盐浓度,所测试菌株均不能耐受 10% 盐浓度。经过耐盐初筛出的 42 株乳酸菌进行耐盐硝酸实验,结果见表 3,筛选出的菌株在 150 mg/kg 浓度下的硝酸盐环境下生长正常,均未出现对其产生抑制作用。

2.2 乳酸菌的生长性能及 pH 变化率

2.2.1 乳酸菌生长曲线 由图 1,乳酸菌 R19-5,

表3 海南鱼茶中分离出的乳酸菌的耐亚硝酸盐实验

Table 3 Nitrite tolerance test of lactic acid bacteria isolated from Hainan Yucha

菌株特性 亚硝酸盐浓度 (mg/L)	植物乳杆菌 (19)	戊糖乳杆菌 (8)	香肠乳杆菌 (6)	短乳杆菌 (1)	干酪乳杆菌 (2)	棒状乳杆菌 (2)	鼠李糖乳杆菌 (1)	其他 (3)
0	100	100	100	100	100	100	100	100
50	100	100	100	100	100	100	100	100
100	100	100	100	100	100	100	100	100
150	100	100	100	100	100	100	100	100

表4 氨基酸脱羧酶实验结果

Table 4 Test results of amino acid decarboxylase

氨基酸	植物乳杆菌 (19)	戊糖乳杆菌 (8)	香肠乳杆菌 (6)	短乳杆菌 (1)	干酪乳杆菌 (2)	棒状乳杆菌 (2)	鼠李糖乳杆菌 (1)	其他 (3)
组氨酸	-	-	-	-	-	-	-	-
赖氨酸	-	-	-	-	-	-	-	-
精氨酸	-	-	-	-	-	-	-	-
酪氨酸	-	-	-	-	-	-	-	-

注“-”表示实验结果为阴性。

M1-4, R21-3, R21-4, RD-1 等五株菌在 2 h 后进入生长对数期, 12~14 h 后达到生长稳定期, 而其他乳酸菌进入对数期的时间较上述五株菌稍有延后, 但其进入稳定期时间相一致。

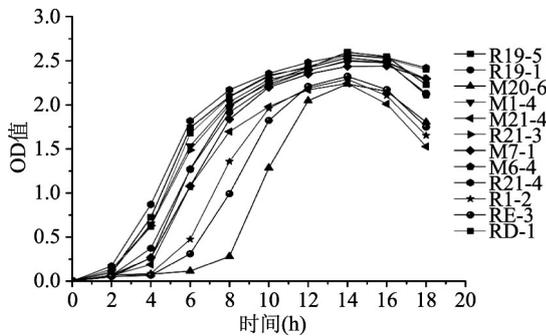


图1 生长曲线

Fig.1 Growth curve

2.2.2 pH 变化率 乳酸菌生长过程的 pH 变化率见图 2, 6 株植物乳杆菌和其他 6 株菌显示了较快的 pH 变化率, 在 37 °C, 14 h 和 16 h 内分别使 pH 迅速降至 4.0 以下。pH 变化表明, 乳酸菌 R19-5, M1-4, R21-3, R21-4, RD-1 均能快速形成乳酸, 12 h 后 pH 由起始的 pH5.87 降至 pH3.8 左右, 而后趋于缓慢下降, 在 20 h 后 pH 分别能达到 3.75、3.89、3.86、3.73、3.74。

2.3 氨基酸脱羧酶实验

经过耐盐筛选后, 对 42 株菌进行氨基酸脱羧酶实验, 通过表 4 可确定其中所有菌株均未有产氨基酸脱羧酶的阳性反应。

3 讨论与结论

制作肉制品发酵剂所选用的菌株, 根据 Smith 和 Palumbo^[12] 的报道, 耐受 6% 的食盐和 100 mg/L 的亚硝酸盐制作肉制品发酵剂所选用的菌株是作为适合肉制品发酵剂的特性之一。筛选出的植物乳杆菌具有较高的耐盐能力, 其特性与 M. Kleerebezem, Y. Wang^[13-14] 等人研究植物乳杆菌能够利用转运甜菜碱、肉碱和脯氨酸的 QacT 系统以适应 4%~8% 高盐应激结果相吻合。经过耐盐初筛出的 42 株乳酸菌均能够耐受 150 mg/L 的亚硝酸盐且 NO₂⁻ 对菌株无抑制作用^[15], 同时也反映这类菌株具有高耐亚硝酸盐能力。

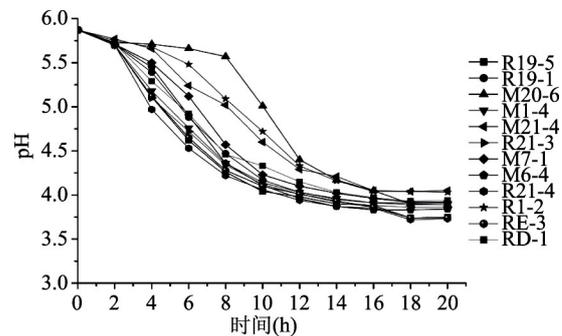


图2 pH 变化

Fig.2 pH change of the samples

乳酸菌的生长性能和产酸能力在发酵过程中起着重要的作用, 接入基质中后在经历尽可能短的停滞期后, 乳酸菌应能够迅速增殖, 快速积累乳酸, 以减少致病菌和腐败菌生长导致的危害^[15]。快速的产酸能够有效抑制致病菌的生长、加速产品风味的形成、促进产品色泽形成等作用。RingoE^[16] 等人研究了 9 株乳酸菌对鱼源致病菌抗菌活性研究发现, 其所产的乳酸等酸能抑制病原菌的生长。所测试的菌株具备快速产酸能力, 其中由生长曲线图发现 12 株菌进入稳定期后曲线很快下降的原因可能是在三角瓶中发酵受限于容积和营养物质的消耗。测试菌株在 12~16 h 能达到稳定期而文献中大多是 16~22 h 才能达到, 这可能是乳酸菌在培养时与其设置的温度相关, 文献中采用多采用 30 °C, 而本次实验选取 37 °C 培养从而使其代谢增快而导致的^[17], 其次可能是菌株的生长特性。

乳酸菌的生长性能和产酸能力在发酵过程中起着重要的作用, 接入基质中后在经历尽可能短的停滞期后, 乳酸菌应能够迅速增殖, 快速积累乳酸, 以减少致病菌和腐败菌生长导致的危害^[15]。快速的产酸能够有效抑制致病菌的生长、加速产品风味的形成、促进产品色泽形成等作用。RingoE^[16] 等人研究了 9 株乳酸菌对鱼源致病菌抗菌活性研究发现, 其所产的乳酸等酸能抑制病原菌的生长。所测试的菌株具备快速产酸能力, 其中由生长曲线图发现 12 株菌进入稳定期后曲线很快下降的原因可能是在三角瓶中发酵受限于容积和营养物质的消耗。测试菌株在 12~16 h 能达到稳定期而文献中大多是 16~22 h 才能达到, 这可能是乳酸菌在培养时与其设置的温度相关, 文献中采用多采用 30 °C, 而本次实验选取 37 °C 培养从而使其代谢增快而导致的^[17], 其次可能是菌株的生长特性。

生物胺(biogenic amines ,Bas) 是一类含氮的脂肪族、芳香族或杂环类有机化合物的总称。国外学者研究认为 BAs 在发酵肉制品中普遍存在,特别是在发酵香肠中发酵食品中的 BAs 主要是由于游离氨基酸被微生物产生的脱羧酶脱羧形成^[18-19]。发酵肉制品中的部分乳酸菌具有氨基酸脱羧酶活性,尤其在低 pH 和高水分含量的条件下,它们往往脱羧某些特定的氨基酸,生成酪胺、组胺、尸胺、腐胺及苯基乙胺。这些化合物不仅会影响发酵食品的风味而且其会对人健康产生危害。因而,研究海南传统鱼茶制品中的乳酸菌是否具有氨基酸脱羧酶活性,对了解鱼茶制品的安全品质及产品是否具备推广价值具有十分重要的意义。

优良的肉制品发酵剂具有安全性,耐 6% 盐,耐亚硝酸,在 15~40 °C 下生长,快速产酸抑菌等特性^[18]。本文研究拟在海南的传统鱼茶制品中分离出乳酸菌并对分离出的乳酸菌进行筛选,以期筛选出具有潜在优良商业价值的肉制品发酵剂。本文在海南鱼茶制品中共分离出 144 株乳酸菌基础上,分别对各菌株进行生理生化、pH 变化率、耐盐及亚硝酸盐、氨基酸脱羧酶及生长曲线的菌株特性研究。实验发现 3 株植物乳杆菌(R19-5 M1-4 R21-3) 1 株香肠乳杆菌(R21-4) 和 1 株短乳杆菌(RD-1) 具有产酸速率快、高耐盐、无氨基酸脱羧酶活性等特性,并发现其具有开发成淡水鱼发酵制品发酵剂的潜力。

参考文献

[1] Zhang J ,Wang X ,Huo D ,et al. Metagenomic approach reveals microbial diversity and predictive microbial metabolic pathways in Yucha ,a traditional Li fermented food [J]. Scientific Reports , 2016 ,6.

[2] Ijong FG and Ohta Y. Physicochemical and microbiological changes associated with Bakasang processing—a traditional Indonesian fermented fish sauce [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture ,1996 ,71(1) : 69-74.

[3] Anihouvi V , Sakyi - Dawson E , Ayernor G , et al. Microbiological changes in naturally fermented cassava fish (*Pseudotolithus* sp.) for lanhouin production [J]. International journal of food microbiology 2007 ,116(2) :287-291.

[4] 安永福. 浅谈乳酸菌及其特点 [J]. 中国奶牛 ,1995(5) : 50-51.

[5] Ankolekar C ,Pinto M ,Greene D ,et al. *In vitro* bioassay based screening of antihyperglycemia and antihypertensive activities of *Lactobacillus acidophilus* fermented pear juice [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies 2012 ,13: 221-230.

[6] Lee B-J ,Kim J-S ,Kang YM ,et al. Antioxidant activity and γ -aminobutyric acid(GABA) content in sea tangle fermented by *Lactobacillus brevis* BJ20 isolated from traditional fermented foods [J]. Food Chemistry 2010 ,122(1) : 271-276.

[7] Kuda T ,Kaneko N ,Yano T ,et al. Induction of superoxide anion radical scavenging capacity in Japanese white radish juice and milk by *Lactobacillus plantarum* isolated from aji-narezushi and kaburazushi [J]. Food Chemistry 2010 ,120(2) :517-522.

[8] Đorđević TM ,Šiler-Marinković SS and Dimitrijević-Branković SI. Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals [J]. Food Chemistry 2010 ,119(3) :957-963.

[9] Ammor S ,Dufour E ,Zagorec M ,et al. Characterization and selection of *Lactobacillus sakei* strains isolated from traditional dry sausage for their potential use as starter cultures [J]. Food microbiology 2005 ,22(6) :529-538.

[10] 胡永金. 淡水鱼糜发酵及其凝胶形成机理研究 [D]. 江南大学 2007.

[11] 赵亚娟, 郝延军, 孙冬梅, et al. 木糖葡萄球菌和肉糖葡萄球菌的生理特性及其转化硝酸盐影响因素的研究 [J]. 食品工业科技 2012 ,33(5) :63-66.

[12] Smith JL ,Palumbo SA. Use of starter cultures in meats [J]. Journal of Food Protection ® ,1983 ,46(11) :997-1006.

[13] Wang Y ,Chen C ,Ai L ,et al. Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus plantarum* ST - III [J]. Journal of bacteriology 2011 ,193(1) :313-314.

[14] Kleerebezem M ,Boekhorst J ,van Kranenburg R ,et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences ,2003 ,100(4) :1990-1995.

[15] Salminen S , Von Wright A. Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects [M]. CRC Press 2004.

[16] Ringø E ,Olsen RE ,Mayhew TM ,et al. Electron microscopy of the intestinal microflora of fish [J]. Aquaculture ,2003 ,227(1) :395-415.

[17] Shalaby AR. Significance of biogenic amines to food safety and human health [J]. Food Research International ,1996 ,29(7) : 675-690.

[18] Luxanil P ,Promchai R ,Wanasen S ,et al. Monitoring *Lactobacillus plantarum* BCC 9546 starter culture during fermentation of Nham ,a traditional Thai pork sausage [J]. International journal of food microbiology ,2009 ,129(3) : 312-315.

[19] Houle JF ,Lafrance M ,Julien JP ,et al. Selection of mixed cultures for meat fermentation [J]. Journal of Food Science ,1989 ,54(4) :839-842.