

高盐辣椒坯中一株耐盐乳杆菌的分离及鉴定

李梓铭^{1,2}, 谢 靓^{1,2}, 蒋立文^{2,3*}, 李云倩¹

(1. 湖南农业大学食品科学技术学院, 长沙 410128; 2. 食品科学与生物技术湖南省重点实验室, 长沙 410128; 3. 湖南省发酵食品工程技术研究中心, 长沙 410128)

摘要: **目的** 采用选择性的 MRS 培养基, 从湖南地区特色的盐坯辣椒中分离筛选出耐盐优势菌。**方法** 得到一株能在 18% NaCl 培养基中生长的耐盐菌进行了生理生化实验, 通过菌落 PCR 扩增其 16S rDNA 基因序列并测序, 经过序列比对构建系统发育树。**结果** 这株菌有较好的产乳酸、耐盐的能力, 经过形态观察和生理生化试验验证, 属于乳酸杆菌。**结论** 经过 16S rDNA 进一步鉴定为植物乳杆菌。

关键词: 剁辣椒; 乳酸菌; 耐盐

Isolation and identification of salt-tolerance lactic acid bacterium from high-salt chili

LI Zi-Ming^{1,2}, XIE Jing^{1,2}, JIANG Li-Wen^{2,3*}, LI Yun-Qian¹

(1. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;
2. Hunan Provincial Key Laboratory of Food Science and Biotechnology, Changsha 410128, China;
3. Hunan Provincial Research Center of Engineering and Technology for Fermented Food, Changsha 410128, China)

ABSTRACT: Objective To isolate some salt-tolerance strains with different colony morphologies from Hunan characteristic fermented chilli samples using selected MRS medium. **Methods** One isolated strain which could grow on an 18% NaCl salt tolerant bacteria medium was identified base on the physiological and biochemical experiments with 16S rDNA sequencing and phylogenetic tree analyses. **Results** This strain had a good ability of producing lactic acid and high tolerance to salt. **Conclusion** This strain was identified as *Lactobacillus plantarum* through 16S rDNA sequence analysis.

KEY WORDS: fermented chili; lactic acid bacteria; salt-tolerance

1 引言

剁辣椒, 是湖南地区特色发酵辣椒制品, 随着辣椒保健功能研究的进一步深入以及消费者嗜辣的特性, 剁辣椒产品很受消费者喜爱。其加工方式是将辣椒原料预处理后先高盐腌制, 再通过脱盐、接种发

酵、调味、灭菌等工艺过程, 从而变成具有一定保质期的产品。NaCl 能够抑制微生物的生长, 但有些细菌却可以适应高浓度 NaCl 并快速生长繁殖, 一般能在 NaCl 浓度高于 10%~15% 的环境下生存。乳酸菌是一种安全优质高效的益生菌, 乳杆菌是乳酸菌家族的一个重要分支, 属于革兰氏阳性、无芽孢杆菌, 包

基金项目: 国家大学生创新项目(SCX1220)

Fund: Supported by National Undergraduate Innovation Project (SCX1220)

*通讯作者: 蒋立文, 博士, 教授, 主要研究方向为食品生物技术。E-mail: hndjllw@163.com

*Corresponding author: JIANG Li-Wen, Ph.D, Professor, Hunan Provincial Key Laboratory of Food Science and Biotechnology, Changsha 410128, China. E-mail: hndjllw@163.com

括如罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)、干酪/副干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei/paracasei*)、类植物/戊糖乳杆菌(*Lactobacillus paraplantarum/ pentosus*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)、双歧杆菌(*Bifidobacterium*)等一些菌株^[1]。乳酸菌的某些菌株对有害微生物如沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、李斯特菌和蜡样芽孢杆菌具有抑制作用,对人体肠道菌丛的平衡起到关键作用^[2]。植物乳杆菌、戊糖乳杆菌、干酪乳杆菌、片球菌等已经作为益生菌广泛用于发酵乳制品、微生物制剂、药物制剂、功能性食品配料和食品添加剂、膳食补充剂(片剂、胶囊等)^[3,4]。

研究表明,在传统工艺中存在的优势有益菌,往往能加速促进食品风味的形成,缩短发酵时间,弥补生产中不易控制的缺陷,克服对环境污染和发酵周期长所带来的问题,使产品更具有竞争力^[5,6],这在酱油酿造中分离得到的乳酸菌和酵母菌的作用得到验证。筛选优势耐盐乳酸菌菌株,有利于对乳酸菌资源的搜集、保存及资源库和基因库的建立,为乳酸菌资源的开发利用奠定基础。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 材料

辣椒样品取自长沙某调料食品有限公司含盐量超过20%的盐坯辣椒。

2.1.2 试剂与仪器

试剂:氯化钠、氯化钙、过氧化氢、无水乳糖、乙醇(95%)、硝酸银、无水葡萄糖,试剂均为分析纯试剂,购自上海国药公司;

仪器:GZ-250-S型生化培养箱(韶关市广智科技设备发展有限公司);雷磁PHS-3C型pH计(上海精密科学仪器有限公司);5417R型离心机(德国Eppendorf);净化工作台(上海新苗医疗器械制造有限公司);WS2-84-64型高压灭菌锅(上海医用核子仪器厂)。

2.1.3 培养基

改良MRS培养基^[7,8](筛选乳酸菌):

乳酸菌分离培养基 蛋白胨 10 g、牛肉膏粉 5 g、酵母膏粉 4 g、葡萄糖 20 g、吐温-801 ml、磷酸氢二钾 2 g、乙酸钠 5 g、柠檬酸氢二铵 2 g、硫酸镁 0.2 g、

硫酸锰 0.05 g、琼脂 15 g、氯化钙 2%、蒸馏水 1000 ml、pH值 6;

耐盐乳酸菌筛选培养基 蛋白胨 10 g、牛肉膏粉 5 g、酵母膏粉 4 g、葡萄糖 20 g、吐温-801 ml、磷酸氢二钾 2 g、乙酸钠 5 g、柠檬酸氢二铵 2 g、硫酸镁 0.2 g、硫酸锰 0.05 g、琼脂 25 g、氯化钙 2%、氯化钠 10%、蒸馏水 1000 ml、pH值 6;

MC培养基、碳源利用培养基、糖发酵培养基、葡萄糖蛋白胨水培养基、淀粉培养基、明胶培养基^[9,10]。

2.2 试验方法

2.2.1 耐盐菌株的分离

称取盐坯辣椒 25 g,加进装有 225 mL 无菌生理盐水的锥形瓶里,用无菌生理盐水稀释成不同的梯度。选取了 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 三个梯度进行试验,每个梯度取 0.1 mL。采用倾注法接种在乳酸菌筛选培养基平板,完成后置于 37 °C 恒温培养箱中 48~72 h,根据菌落形状、大小、颜色挑取明显形态有“钙圈”的单菌落,进行革兰氏染色镜检观察,并同时接触酶试验。从中挑选出 G(+),接触酶阴性的单个菌落,在乳酸菌筛选培养基中划线纯化。在 NaCl 质量分数分别为六个不同梯度(5%、10%、12%、15%、18%、20%)的耐盐乳酸菌分离筛选培养基中,划线接种分离出的纯化菌株,选取在 NaCl 质量分数最高梯度中有“钙圈”的单个菌落,耐盐乳酸菌筛选培养基斜面保种,将耐盐菌株接种于 MRS 液体培养基中,静置在 37 °C 培养箱中 24 h,为理化特性试验使用。

2.2.2 耐盐菌株的生理生化特性^[11]

(1) 淀粉水解试验

取 0.1 mL 菌悬液涂布到淀粉培养基上,37 °C 静止培养 24 h,加碘液于菌落上,观察颜色变化,呈蓝黑色为阴性,无蓝色为阳性。

(2) 明胶液化试验

以较大量挑取耐盐菌株穿刺接种于明胶培养基,分别于 22 °C 和 37 °C 培养 7~14 d,平板试验结果的观察为在培养基平板点种的菌落上滴加试剂,若为阳性,10~20 min 后,菌落周围应出现清晰带环,否则为阴性。

(3) 酪素水解试验

将测试菌接种于平皿上,37 °C 培养 7~14 d,记录酪氨酸结晶是否被水解而变透明。

(4) 马尿酸钠水解试验

将待检菌接种于马尿酸钠培养液中,置 37 °C 培

养 48 h, 加入三氯化铁试剂 0.2 mL, 立即混匀, 经 10~15 min 观察结果。

(5) 糖发酵试验

可根据不同细菌分解利用糖能力的差异, 表现出是否产酸产气作为鉴定菌种的依据。是否产酸, 可在糖发酵培养基中加入指示剂(通常为溴甲酚紫, 即 B.C.P, 其 pH 值在 5.2 以下呈黄色, pH 值在 6.8 以上呈紫色), 经培养后根据指示剂的颜色变化来判断。是否产气可在发酵培养基中放入倒置杜氏小管观察。试验选择葡萄糖和乳糖做为糖发酵的试验对象。

(6) 乳酸定性试验

取菌悬液上清液 5 mL 于试管中, 加入 10% H₂SO₄ 0.5 mL, 再加入 2% KMNO₄ 0.5 mL, 此时乳酸转化成乙醛, 把在银氨溶液中浸泡的滤纸条搭在试管口上, 用酒精灯微火加热试管至沸腾, 若滤纸变黑, 证明有乳酸存在。

(7) 碳源利用试验

本试验分别用七叶苷、纤维二糖、麦芽糖、甘露醇、水杨苷、山梨醇、蔗糖、棉子糖、菊糖、乳糖等作为碳源, 进行碳源利用试验。

2.2.3 16S rDNA 的扩增与序列分析

细菌基因组总 DNA 的提取采用异丙醇沉淀法^[12,13], 菌株的 16S rDNA 采用通用引物, 通用引物为 primer1 序列: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG; primer2 序列: AAGGAGGTGATCCAGCCGCA, PCR 反应程序如下: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 45 s, 52 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 进行 35 个循环后 72 °C 延伸 10 min, 送至华大基因测序, 测序结果在 NCBI 上进行 BLAST 在线比对。

3 结果与分析

3.1 菌株的分离筛选

从乳酸菌分离培养基分离出生产酸, 与培养基中的碳酸钙中和反应, 生成溶钙圈较大的 G(+) 单个菌落四株 ly-1、Y-2、Y-3、ly-4。

将分离的四株菌株接种在 NaCl 质量分数为 5%、10%、12%、15%、18%、20% 六个梯度的耐盐乳酸菌筛选培养基平板上, 选取在浓度最高梯度中有“钙圈”的单个菌落, 最后证明 ly-4 生存的梯度最高, 能在 NaCl 质量分数为 18% 的培养基中正常生长。固体培养基中 ly-4 菌落呈圆形、乳白色、边缘整齐并且表面光滑、隆起。在液体培养基中, 表面澄清、浑

浊均匀, 并且底部有絮状沉淀, 菌种逐渐沉淀到培养基的底部, 表现出兼性厌氧的现象。使用革兰氏染色法进行染色, 结果表明该菌株为革兰氏阳性菌, 菌体呈杆状, 无鞭毛和芽孢。

3.2 菌株生理生化性质试验结果

淀粉水解试验呈蓝黑色, 明胶液化试验无明显清晰带环, 酪素水解试验没有出现透明现象, 马尿酸钠水解未出现沉淀, 乳酸定性试验滤纸变黑。糖发酵试验中, 葡萄糖和乳糖做为碳源均可以产酸产气。耐盐菌株的生理生化试验鉴定结果如表 1。

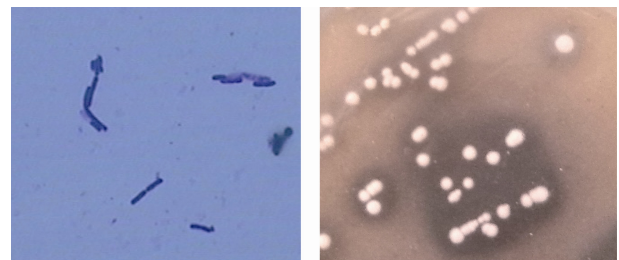


图 1 ly-4 菌落和菌体形态(×1000)

Fig. 1 Colonial morphology and thallus appearance of ly-4 (×1000)

表 1 耐盐菌株生理生化特性
Table 1 The salt-tolerance strains of physiological and biochemical characteristics

试验项目	试验项目	试验项目	试验项目
淀粉水解	—	麦芽糖	—
明胶液化	—	甘露醇	—
酪素水解	—	水杨苷	+
马尿酸钠水解	—	山梨醇	—
乳酸定性试验	+	蔗糖	+
过氧化氢酶	—	棉子糖	—
七叶苷	+	乳糖	+
纤维二糖	+	菊糖	—
葡萄糖产气	—	乳糖产气	+

注: “+” 和 “—” 分别表示阳性和阴性。

综合上述菌落形态特征和生理生化特性并参考《伯杰氏细菌分类手册》(第八版), 本试验中分离得到的菌株 ly-4 与乳杆菌属乳杆菌(*Lactobacillus*) 基本相同, 因此将该菌株初步鉴定为乳杆菌属乳杆菌(*Lactobacillus*)^[14]。

3.3 16S rDNA 序列鉴定

菌株 ly-4 的 16S rDNA PCR 电泳图如图 3 所示, 条带在 1000 ~ 2000 bp 之间, 约为 1500 bp。

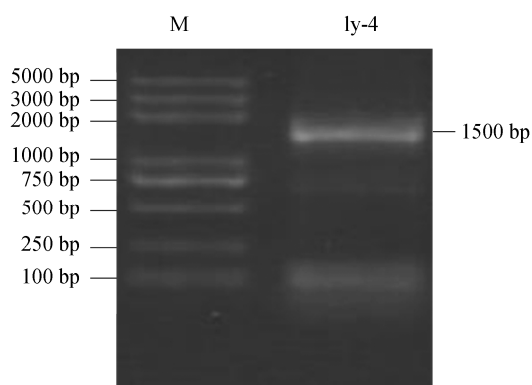


图 2 菌株 ly-4 PCR 扩增产物琼脂凝胶电泳结果
Fig. 2 Electrophoresis patterns of purified PCR products

由图 2 可知, 经过 1%琼脂糖电泳检测后, 在 1500 bp 左右具有阳性条带样品, 经过胶回收试剂盒纯化被测序, 在测序结果确定以后, 将该数据提交 GenBank(注册号为 KJ636841), 测序结果在 NCBI 基因测序列数据库上通过 BLAST 进行序列比对, 将同源性较强的典型菌株序列构建系统发育树。

将菌株 ly-4 的 16S rDNA 序列在 NCBI 中进行 BLAST 比对分析后发现其 *Lactobacillus plantarum* WCFS1 strain WCFS1 相似性高达 99%, 从 GenBank 中调取并下载相似性最大和该属内其他种相关的 16S rDNA, 利用 MEGA5.02 软件的 Neighboring-joining 方法构建系统发育树如图 3。

由图 3 可知, 菌株 ly-4 与 *Lactobacillus plantarum* 自然聚为一支, 经过同源性比对发现菌株 ly-4 与 *Lactobacillus plantarum* 的 16S rDNA 序列同源性超过 99%^[14]。综合菌株的菌落形态、生理生化特点及 16S rDNA 系统进化分析, 确定该菌株为乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 的植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)。

4 讨论

本研究分离筛选的菌株 ly-4 已鉴定出为植物乳杆菌, 在 18%NaCl 培养基中能够正常生长, 说明该植物乳杆菌菌株具有较强的耐盐能力。本研究所筛选到的 ly-4 植物乳杆菌与酱醪中耐盐菌株相比, 目前用于耐盐微生物的工业化生产研究较少, 下一步将研究最适生长及培养条件, 并对其在发酵辣椒中物质转化和风味形成相关性进行研究, 为应用到工业化生产提供依据。

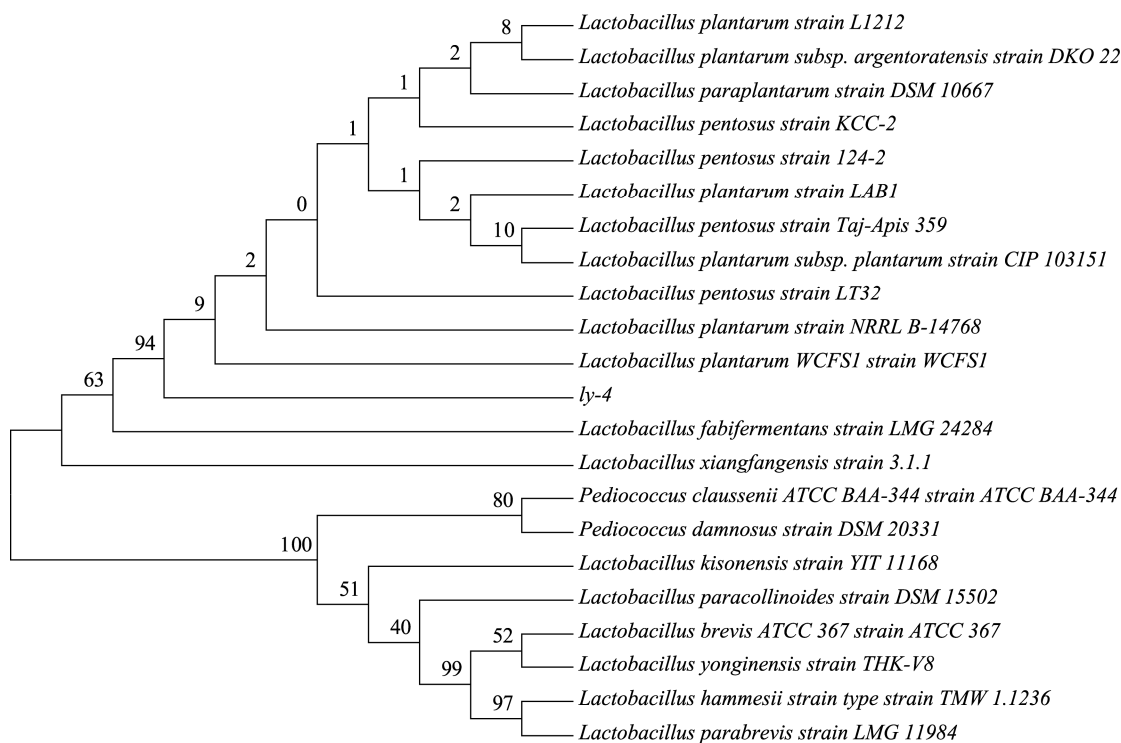


图 3 供试菌株 ly-4 的 16S rDNA 序列系统发育树
Fig. 3 Phylogenetic tree based on 16S rDNA gene sequences for ly-4 strain

参考文献

- [1] 张和平. 我国益生乳酸菌研究与产业化现状及发展对策[J]. 乳业科学与技术, 2009(2): 51-54.
Zhang HP. Present situation and development countmeasures for probiotic lactic bacteria and fermented milk in China [J]. Dairy Sci Technol, 2009(2): 51-54.
- [2] Lanyi JK. Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria [J]. Bacteriol Rev, 1974, 38(3): 272-290.
- [3] Zahiroddini H, et al. Effect of microbial inoculants on the fermentation, nutrient retention and aerobic stability of barley silage [J]. Asian-Aust. J Anim. Sci. 2006(19): 1429-1436.
- [4] Ammor MS, Mayo B. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update [J]. Meat Sci, 2007, (01): 138-146.
- [5] 王夫杰, 鲁绯, 渠岩, 等. 酱醅中乳酸菌的分离与鉴定[J]. 中国酿造, 2010, 29 (05): 49-52.
Wang FJ, Lu F, Ju Y, et al. Separation and identification of lactic acid bacteria isolated from soy sauce mash [J]. China Brewing, 2010, 29 (05): 49-52.
- [6] 黄春振, 陈有容, 齐凤兰. 嗜酸乳杆菌生理特性的研究[J]. 食品研究与开发, 2004(02): 36-39.
Huang CZ, Chen YR, Qi FL. Studied on the biological properties of *Lactobacillus acidophilus* [J]. Food Res Dev, 2004(02): 36-39.
- [7] 辛国芹, 辛国民, 徐海燕. 一株植物乳杆菌的分离鉴定及特性研究[J]. 江西农业学报, 2012, 24(8): 77-80.
Xin GQ, Xin GM, Xu HY. Isolation and identification of *Lactobacillus plantarum* strain and studies on bio-character [J]. Acta Agric Jiangxi. 2012, 24(8): 77-80
- [8] 余水静, 彭艳平, 邓扬悟. 一株嗜酸氧化亚铁硫杆菌分离及生长特性研究[J]. 江西理工大学学报, 2011, 32(05): 1-4.
Yu SJ, Peng YP, Deng YW. Research on the isolation and growth characteristics of acidithiobacillus ferrooxidans [J]. J Jiangxi Univ Sci Technol, 2011, 32(05): 1-4.
- [9] 何玲, 唐爱均, 杨公明. 蔬菜发酵机理探讨[J]. 中国酿造, 2007(2): 26-29.
He L, Tang AJ, Yang GM. Study on fermentation mechanism of vegetable [J]. China Brewing. 2007(2): 26-29.
- [10] 沙漠, 逢焕明, 古丽娜孜, 等. 自然发酵辣椒酱中乳酸菌的分离与鉴定[J]. 食品与机械, 2012, 28(1): 35-39.
Sha M, Pang HM, Gu LNZ, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria from natural fermentation peppers [J]. Food Mach, 2012, 28(1): 35-39.
- [11] 钟燕青, 夏延斌. 自然发酵辣椒中一株乳酸菌的分离筛选及鉴定[J]. 农产品加工(学刊), 2011(11): 52-55.
Zhong YQ, Xia YB. Isolation and identification of lactic bacteria in natural fermentation pepper [J]. Acad Period Farm Products Process 2011(11): 52-55
- [12] 刘芳, 王道营, 徐为民, 等. 应用PCR-DGGE指纹图谱技术分析盐水鸭贮藏过程中的细菌多样性[J]. 南京农业大学学报, 2011(2): 135-138.
Liu F, Wang DX, Xu WM, et al. Bacterial diversity in water-boiled salted duck during storage analyzed by PCR-DGGE [J]. J Nanjing Agric Univ, 2011, 34(2): 135-138.
- [13] 徐岩, 张丽萍, 顾国贤. 聚合酶链式反应(PCR)技术鉴定啤酒腐败菌的最新进展[J]. 食品与发酵工业. 2000, 27(5): 71-73.
Xu Y, Zhang LP, Gu GX. Novel advance on polymerase Chain reaction(PCR) for identification of spoilage bacteria in beer [J]. Food Ferment Ind, 2000, 27(5): 71-73.
- [14] 商军, 钟方旭, 王亚林, 等. 几种发酵蔬菜中乳酸菌的分离与筛选[J]. 食品科学, 2007, 8(04): 195-200.
Shang J, Zhong FX, Wang YL, et al. Separation and screening of lactic acid bacterium from several traditional fermented vegetables [J]. Food Sci, 2007, 28(04): 195-200.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



李梓铭, 硕士研究生, 主要研究方向为食品生物技术。
E-mail: 375039579@qq.com



蒋立文, 教授, 博士, 主要研究方向为食品生物技术。
E-mail: hnnjdlw@163.com