

自然发酵甘薯酸浆中乳酸菌的筛选与鉴定

张莉力², 许云贺, 李新华*

(1. 辽宁医学院, 辽宁锦州 121001; 2. 沈阳农业大学食品学院, 辽宁沈阳 110161)

摘要 [目的] 从天然乳酸菌菌株中筛选出对甘薯淀粉分离起主要作用的菌种。[方法] 利用 MRS 培养基从自然发酵的甘薯酸浆中分离出 13 株乳酸菌菌株, 通过发酵试验筛选出 1 株分离效果良好的乳酸菌菌株, 并对其进行初步鉴定。[结果] 根据菌落形态、个体形态及生理生化反应结果, 初步鉴定筛选出的沉淀淀粉能力较好的菌株为乳杆菌, 表明乳杆菌菌体本身或其产生的代谢产物对淀粉具有絮凝作用。从发酵液的乳酸菌总数、pH 值来看, 乳酸菌总数偏高的发酵液, pH 值一般较低, 分离效果也较好, 表明分离效果与乳酸菌总数及酸浆的 pH 值有关。[结论] 该研究为实现甘薯酸浆的人工发酵生产奠定了基础。

关键词 甘薯酸浆; 淀粉; 乳酸菌; 分离

中图分类号 S182 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)01-0009-02

Screening and Preliminary Identification of Lactic Acid Bacteria from Ipomoea batatas Acid Liquor during Natural Fermentation

ZHANG Li-li et al. (Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001)

Abstract [Objective] The aim was to screen the strain that played an important role in the separation of Ipomoea batatas starch from the natural lactic acid bacteria strains. [Method] 13 lactic acid bacteria strains were separated from I. batatas acid liquor during natural fermentation with MRS medium. A strain of lactic acid bacteria with good separation effect was screened by the fermentation test and identified preliminarily. [Result] The screened strain with better starch precipitating ability was identified preliminarily as lactobacillus according to the results of the colony morphology, the individual morphology and the physiological and biochemical responses, which showed that lactobacillus itself or its metabolites had flocculation on starch. From the total number of lactic acid bacteria in the fermentation broth and the pH value, the pH value of the fermentation broth with higher total number of lactic acid bacteria was usually lower and its separation effect was better, which showed that the separation effect had relationship with the total number of lactic acid bacteria and the pH value of the acid liquor. [Conclusion] The research laid the foundation for the realization of the artificial fermentation production of I. batatas acid liquor.

Key words Ipomoea batatas acid liquor; Starch; Lactic acid bacteria; Separation

目前, 我国农村生产甘薯淀粉普遍采用传统工艺酸浆法。但目前酸浆的生产仍采用的是自然发酵法, 这就使得酸浆的生产存在生产规模小、产品质量稳定性差等缺点^[1-2]。关于酸浆的作用机理, 在豆类粉丝生产中一般认为是乳链球菌的变种在起作用^[3-4]。因此, 笔者从自然发酵的甘薯酸浆入手, 对其中的天然乳酸菌菌株进行筛选, 目的是从中筛选出对甘薯淀粉分离起主要作用的菌种, 实现甘薯酸浆的人工发酵生产。

1 材料与方 法

1.1 试验材料 酸浆, 来源于甘薯淀粉加工厂; 分离培养基, MRS 培养基灭菌后, 加入 3% 灭过菌的 CaCO₃, 混合; 发酵培养基, 新鲜甘薯洗净后, 按不同比例加水, 在组织捣碎机内打浆, 双层纱布过滤除渣, 滤液中加入 0.3% 酵母粉, 作为发酵培养基, 115℃, 灭菌 20 min。

1.2 仪器设备 SG3045 型组织捣碎机; PHS-3C 酸度计; 全自动新型生化培养箱, 上海智城分析仪器制造有限公司; 超净工作台, 上海智城净化设备制造有限公司; 高压蒸汽灭菌锅, 上海之信仪器有限公司; 显微镜, OLYMPUS。

1.3 试验方法

1.3.1 乳酸菌的分离纯化。以无菌生理盐水进行梯度稀释, 将稀释液涂布于分离培养基平板上, 30℃ 下培养 48 h, 挑选有碳酸钙溶解圈的单个菌落, 接入由 MRS 培养基做成的试管斜面。用同样的方法将斜面上的菌体再进行第 2 次平板划线分离、纯化, 斜面菌种冰箱保存、待用。

1.3.2 菌株的筛选。在经过上述 2 次分离纯化的斜面中, 各加入 2 ml 无菌水, 制成菌体悬浮液, 然后无菌接入由新鲜薯汁(加入 0.3% 酵母粉)制成的发酵培养基中, 30℃ 培养 48 h,

然后取该发酵液 15 ml, 倒入到 50 ml 甘薯淀粉乳中, 测定沉淀 3 ml 淀粉所需要的时间。根据沉淀时间选出分离效果最好的菌株, 进行初步鉴定。

1.3.3 筛选出来的菌种的初步鉴定。菌落特征的观察, 肉眼直接观察。个体形态的观察, 光学显微镜革兰氏染色观察。生理生化特征鉴定, 明胶水解反应, 过氧化氢反应, H₂S 试验。

1.3.4 甘薯淀粉乳的制备。甘薯清洗 切成 1 cm³ 左右的小块 以料液比 1:3 在组织捣碎机内粉碎 3 min 浆液过 140 目筛子 取滤液, 即为甘薯淀粉乳。

1.3.5 发酵液沉淀淀粉能力的测定。取发酵液 15 ml, 加入到装有 50 ml 甘薯淀粉乳的量筒中, 计数沉淀 3 ml 淀粉所需的时间^[5-6]。

1.3.6 发酵液中乳酸菌总数的测定。取发酵液 1 ml, 用无菌生理盐水做 10 倍梯度稀释, 选择 3 个合适的稀释度, 每个稀释度重复 2 次, 取 0.1 ml 涂布于改良 MRS 平板上, 计数。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的分离、筛选 经过 2 次分离纯化, 从自然发酵的甘薯酸浆中分离出 13 株乳酸菌, 将这些菌株接入到由鲜薯浆配制成的发酵培养基中, 经 30℃、48 h 发酵培养后, 测定 pH 值及沉淀 3 ml 淀粉所需的时间见表 1。

从表 1 可以看出, 菌株 S₅、S₆ 分离淀粉的效果较好, 与菌株 S₆ 相比, S₅ 沉淀淀粉所需的时间更低, 所以选用 S₅ 作为发酵用菌株。

2.2 S₅ 菌株的初步鉴定 对 S₅ 菌株进行初步鉴定, 在改良的 MRS 培养基中 30℃ 培养 48 h, 观察到的菌落: 形状为圆形, 质地光滑湿润、易挑取, 边缘整齐, 颜色为乳白色, 光学特性为不透明, 有光泽, 隆起, 菌落直径 1~3 mm。经革兰氏染色后在显微镜油镜下观察, 菌株个体形状为杆状, 排布方式为单个或链状, 革兰氏染色为阳性, 无鞭毛, 无芽孢, 明胶水

解、接触酶、 H_2S 试验结果均为阴性。通过菌落形态、个体形态及生理生化反应结果,初步鉴定 S_5 菌株为乳杆菌。1974 年,北京大学生物系酸浆研究小组研究认为生产绿豆淀粉用酸浆的主要作用菌是乳酸链球菌^[2];2006 年,刘文菊等对生产绿豆淀粉用的酸浆中的乳链球菌进行了研究,结果表明绿豆淀粉酸浆中的乳链球菌具有凝集作用^[3]。试验通过在实验室自然发酵生产的甘薯酸浆进行研究,利用 MRS 培养基对酸浆中的乳酸菌进行分离,并通过分离出的 11 株乳酸菌进行淀粉沉淀能力测定,得到一株沉淀淀粉能力较好的菌株,经初步鉴定为乳杆菌。这说明乳杆菌菌体本身或其产

表1 分离出的乳酸菌菌株对淀粉的沉淀能力

Table 1 The precipitation capacity of the isolated Lactobacillus strains on starch

菌株	pH 值	沉淀时间	菌株	pH 值	沉淀时间
Strain	pH value	Precipitation time	Strain	pH value	Precipitation time
S_1	6.23	53.32	S_8	3.76	30.83
S_2	5.76	35.52	S_9	5.52	76.22
S_3	5.68	31.62	S_{10}	5.39	44.31
S_4	6.13	66.35	S_{11}	5.41	36.17
S_5	5.01	11.03	S_{12}	6.12	73.29
S_6	4.12	23.16	S_{13}	5.34	57.88
S_7	5.23	56.11			

(上接第6页)

由表4可知,个别几个数据的拟合相对误差较大,达不到建模要求,可采取利用残差修正的方法。为了解能否利用稳健估计来实现该数据序列的灰色建模,采取稳健估计和灰色新陈代谢理论相结合处理,得到较好的拟合精度(表5)。

表5 稳健估计计算

Table 5 Robust estimation calculation

序号	原始数据	模拟值	残差	相对误差 %
No	Original value	Simulated value	Residuals	Relative error
2	21	18.81	2.19	10.4
3	17	17.99	-0.99	5.8
4	18	17.23	0.77	4.3
5	16	16.48	-0.48	3.0
6	17	15.77	1.23	7.2
7	15	15.09	-0.09	0.6

由表5可知,拟合精度完全满足建模要求。证明在灰色建模过程中,可以利用稳健估计来代替最小二乘估计,因为稳健估计从数据的精度出发来确定权重,充分考虑了数据的精度问题,因此拟合的精度高一些。

4 讨论

(1) 通过对稳健估计在林业灰色建模中应用的探讨,从理论和实例上说明了稳健估计在灰色建模中完全可以替代利用最小二乘法建立灰色模型,建模精度完全满足灰色建模要求。利用稳健估计来建立模型,可以替代残差修复模型的建立,减少了建模程序。

生的代谢产物对淀粉也具有絮凝作用。

从发酵液的乳酸菌总数、pH 值来看,乳酸菌总数偏高的发酵液,pH 值一般较低,分离效果也较好^[6]。这说明分离效果与乳酸菌总数及酸浆的 pH 值有关,但究竟是乳酸菌菌体本身还是 pH 值或菌体的其他代谢产物对淀粉沉淀起主要作用,试验还得不到结论,有待进一步研究。

3 结论

(1) 从自然发酵的甘薯酸浆中分离出 13 株乳酸菌,通过发酵试验筛选出一株分离效果良好的乳酸菌,并通过该菌的群体形态特征、个体形态特征观察及生理生化试验,初步鉴定该乳酸菌为乳杆菌。

(2) 试验表明乳杆菌对淀粉也具有一定的絮凝作用。

参考文献

- [1] 郑玮,沈群.化学处理对酸浆中一株淀粉凝集菌和乳酸乳球菌 As1.9 沉淀淀粉能力的影响[J].食品工业科技,2007(10):123-126.
- [2] 北京粉丝厂,北京大学生物系酸浆研究小组.酸浆为什么能沉淀淀粉[J].北京大学学报,1974(1):57-63.
- [3] 杜连起,刘绍军.酸浆作用菌对甘薯淀粉沉淀效果的研究[J].现代商贸工业,1998(8):39-41.
- [4] 曹宗巽,卢光莹,宋云,等.乳酸链球菌凝集淀粉粒机理的进一步研究[J].食品科学,1980,20(3):271-275.
- [5] 刘文菊,沈群,刘杰.酸浆法生产淀粉机理研究初探[J].食品科学,2006,27(1):79-82.
- [6] 秦礼康,江萍,张倩,等.微生物发酵酸浆用于马铃薯淀粉生产工艺研究[J].贵州农业科学,1997,25(5):42-44.

(2) 利用稳健估计来对数据列建立灰色模型,可以剔出数据序列中的粗差、提高建模的精度。

(3) 由于灰色建模是利用少数数据序列信息来建立模型,还有很多问题需要解决。稳健估计考虑了数据的精度问题,但不能解决所有的问题。应该从数据序列的实际出发来考虑问题,才可以找到解决的办法。

(4) 数据列中存在的缺失,是一个非常实际而且经常要遇到的问题。既然稳健估计可以抗击粗差,那么可以把缺失的数据按照粗差作为研究对象,这应该是一个解决缺失数据的办法。

参考文献

- [1] 邓聚龙.灰预测与灰决策[M].武汉:华中科技大学出版社,2002:71-96.
- [2] 朱坚民,王中宇.测量数据粗大误差的非统计判别[J].华中理工大学学报,2004(4):17-19.
- [3] WANG Z Y, XIA X T, ZHU J M. Research development of the grey error theory and the application in the dynamic measurement[J]. Fifth International Symposium on Instrumentation and Control Technology, SHE, 2003, 5253:447-451.
- [4] 傅立.灰色系统理论及其应用[M].北京:科学技术文献出版社,1992:79-80.
- [5] 刘思峰.灰色系统理论的产生与发展[J].南京航空航天大学学报,2004(2):267-272.
- [6] 刘大杰,陶本藻.实用测量数据处理方法[M].北京:测绘出版社,2000:51-71.
- [7] 陶本藻.稳健估计应用问题[J].地矿测绘,2000(1):1-3.
- [8] 梁长秀,冯仲科,郎南军,等.森林资源调查数据的稳健估计及分析[J].北京林业大学学报,2001(6):10-12.
- [9] 冯仲科,罗旭,石丽萍.森林生物量研究的若干问题及完善途径[J].世界林业研究,2005(3):25-28.
- [10] 郭清文,冯仲科,张彦林,等.单木生物量模型误差分析及定权方法探讨[J].中南林业调查规划,2006(1):5-9.
- [11] 姜岩,刘文生,范学理.稳健估计在岩移参数辨识中的应用[J].阜新矿业学院学报,1996(7):278-282.