

# 西藏灵菇发酵乳抑菌活性的动态研究

杨希娟,樊明涛,师俊玲

(西北农林科技大学 食品科学与工程学院,陕西,杨凌,712100)

**[摘要]** 为了了解西藏灵菇发酵乳的抑菌活性,对西藏灵菇发酵乳发酵过程中的抑菌活性进行了跟踪检测,并对其有效剂量和耐热性能进行了研究。结果表明,含菌体发酵乳的抑菌作用大于无菌体发酵乳,其抑菌圈直径分别为13.1~18.0 mm和12.5~16.0 mm;发酵乳对金黄色葡萄球菌的抑菌效果最强,大肠杆菌次之,对沙门氏菌的抑菌效果最差;发酵21 h时所得发酵乳对几种指示菌的抑菌活性均达较高水平;西藏灵菇发酵乳的抑菌活性随其浓度的减小而降低;加热处理会降低无菌体发酵乳的抑菌效果,但对不同菌抑菌活性的降低幅度不同,发酵前期所得无菌体发酵乳抑制大肠杆菌的活性物质的耐热性较好,发酵15 h后所得无菌体发酵乳经加热处理后,对3种病原菌的抑菌效果相近。由此可见,西藏灵菇发酵乳对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和沙门氏菌的生长均有一定的抑制作用,但更适宜于肠道疾病的预防和治疗。

**[关键词]** 西藏灵菇;抑菌活性;发酵过程;热稳定性

**[中图分类号]** TS252.54;TS252.1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2007)08-0131-04

## Dynamic study on bacteriostatic action of fermented milk of Tibetan linggu

YANG Xi-juan, FAN Ming-tao, SHI Jun-ling

(College of Food Science and Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** In order to understand the bacteriostatic action of fermented milk of Tibetan linggu, the bacteriostatic action of fermented milk of Tibetan linggu in fermentation process was examined, and its effective dose and the heat-resisting performance were also studied. The result indicated that the inhibitory effect of the mycelium containing fermented milk was stronger than fermented milk without mycelium, and their bacteriostatic diameters are 13.1~18.0 mm and 12.5~16.0 mm, respectively; fermented milk has the strongest bacteriostatic activity to *Staphylococcus aureus*, next is the EPEC, and least resistance is *salmonella*; at the 21 h, the bacteriostasis activities of fermented milk on several kinds of pathogens reached the higher level; the bacteriostatic action of fermented milk with Tibetan linggu was reduced with the decrease of its concentration; heat-treatment is able to reduce bacteriostatic capability of fermented milk without mycelium; but it has different reduced extent to bacteriostatic action of different bacterium, and heat resistance of active material of no mycelium fermented milk inhibited EPEC in earlier fermentation was preferable. No mycelium fermented milk after fermentation 15 h by heating treatment had close bacteriostatic effect on three pathogenic bacteria. The Tibetan linggu had a certain inhibitory effect on the growth of EPEC, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, it suitable for prevention and treatment of intestinal diseases.

**Key words:** Tibetan linggu; anti-bacteria activity; fermentation process; heat-stability

收稿日期] 2006-06-23

[作者简介] 杨希娟(1980-),女,陕西户县人,在读硕士,主要从事食品生物技术与发酵工程研究。

[通讯作者] 樊明涛(1963-),男,陕西富平人,教授,博士生导师,主要从事食品微生物研究。E-mail: mingtaofan@tom.com

“西藏灵菇”(简称藏灵菇)是一种乳白色、胶质状的块状物,外形酷似米粒,上面栖息着多种微生物。能在乳中快速生长,并集结成块,看起来很像雪莲,因此也称“西藏雪莲”<sup>[1]</sup>。

传说长期饮用由西藏灵菇发酵的乳液能治多种疾病<sup>[2]</sup>,近年来的一些研究结果也验证了这一点。李永奇等<sup>[3]</sup>研究表明,饮用藏灵菇发酵乳对各类肠道疾病患者及多病种、各年龄段患者都能发挥治疗作用,且无明显的毒副作用;李丽秋等<sup>[4]</sup>证实,藏灵菇发酵乳液对抗生素相关的腹泻小鼠肠道菌群有调整作用,且能使发生病理变化的肠黏膜及绒毛修复完好,并能增强机体非特异性免疫功能;肖琳琳等<sup>[5]</sup>报道,藏灵菇发酵乳液具有明显的降胆固醇和治疗高血脂的作用;刘宇峰等<sup>[6]</sup>发现,藏灵菇发酵乳具有一定的抗肿瘤效果;最近有人称饮用藏灵菇发酵乳可以调整面部菌群失调,对异常性痤疮有一定的治疗作用<sup>[7]</sup>。另外,也有关于藏灵菇发酵乳消炎功能的报道<sup>[8]</sup>。

由此可见,藏灵菇发酵乳是一种具有多种保健功能,且营养价值较高的活性保健饮料,其发酵机理是由乳酸菌和酵母菌对乳糖进行的乳酸发酵及酒精发酵<sup>[9]</sup>。发酵过程中除生成大量的有机酸和少量乙醇外,还有其他多种代谢产物的生成,形成灵菇乳较强的酸度和丰富的生物活性物质,这些成分在灵菇酸乳中的含量多少与发酵液中微生物的菌群分布、发酵时间、发酵温度等关系密切<sup>[10]</sup>。但是有关其中功能成分的生成过程及生成条件的系统研究还较为少见。为此,本研究重点考察了发酵乳中抑菌活性物质的生成过程及其耐热性能,以期为进一步了解其功能、生产过程及其实际应用提供理论和实践依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种 西藏灵菇收集于杨凌华秦饲料厂一工人家中,其外观形态如图 1 所示。

1.1.2 病原菌 大肠杆菌、金黄葡萄球菌由本实验室提供,沙门氏菌由西北农林科技大学动物科技学院提供。

1.1.3 鲜牛乳 鲜牛乳采自西北农林科技大学畜牧养殖厂;脱脂乳由鲜牛乳经 4 000 r/min 离心 10 min 所得。

1.1.4 培养基 营养琼脂培养基和营养肉汤培养基,均按文献[11]配制。

1.1.5 仪器 全自动高压灭菌锅(ES-315)、SPX-300B-生化培养箱(上海跃进医疗器械厂)、CO<sub>2</sub>培养箱(Galaxy B)、超净工作台 AIR TECH(苏宁集团安泰公司制造)、TDL-5-A 低速台式离心机(上海安亭科学仪器厂制造)、HWS-380 智能恒温恒湿箱(宁波海曙塞福实验仪器厂)。

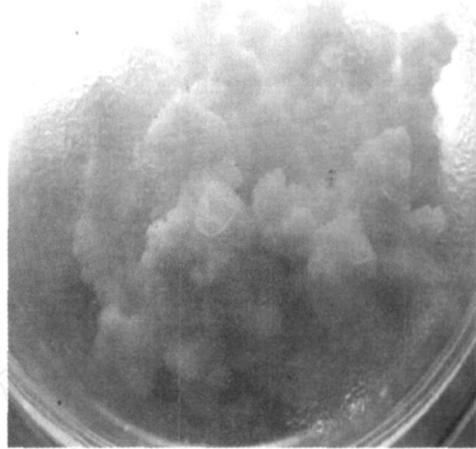


图 1 西藏灵菇的外观形态

Fig. 1 Morphology of Tibetan linggu

### 1.2 菌种的活化

取一定量的西藏灵菇菌块,按 50 mg/L 的接种比例接种于灭菌的脱脂乳中,25 ℃ 培养 24 h,直到形成新粒、活力恢复为止。

### 1.3 菌种的培养

将活化后的菌块,按 50 mg/L 的比例接种在灭菌的脱脂乳中,于 25 ℃ 下静置培养,每 3 h 取样 1 次分析其抑菌活性。

### 1.4 抑菌试验

以大肠杆菌(EPEC)、金黄葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、沙门氏菌(*Salmonella*)为指示菌,采用滤纸片法在营养琼脂平板上进行测定,对照为未接种发酵的脱脂乳。所有样品均设 4 个重复,取其平均值为最终结果。

1.4.1 含菌体发酵乳的抑菌效果 发酵进行一定时间时,吸取 10 mL 摇匀后的发酵液,将无菌滤纸片(直径 8 mm)放入其中,浸泡 20 min;分别在接种不同病原菌的 20 mL 营养肉汤琼脂培养基(直径 90 mm)上打取直径 8 mm 的小孔,在每孔内注入 100 μL 发酵液,并在其上覆盖 1 片浸泡好的滤纸片,于 37 ℃ 下培养 24 h 后,用直尺测定其抑菌圈的直径。其中病原菌于接种前均在营养肉汤琼脂平板上进行活化。

1.4.2 不含菌体发酵乳的抑菌效果 将带菌体的发酵液在 1 500 r/min 下离心 10 min, 取其上清液, 按 1.4.1 所述方法测定其抑菌活性。

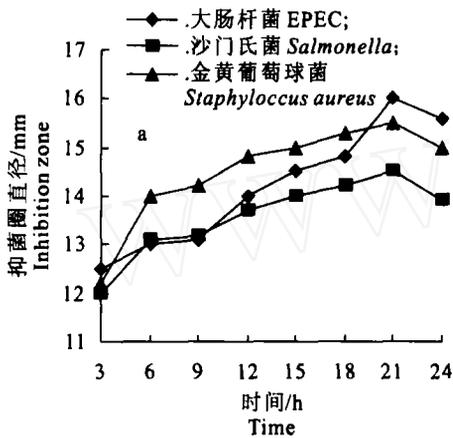
1.4.3 发酵乳浓度对抑菌效果的影响 取发酵 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 和 24 h 的含菌体发酵乳液, 用无菌水将其分别稀释为 200, 500, 800 mL/L 菌液, 再按 1.4.1 所述方法测定其抑菌活性。

1.4.4 发酵乳中抑菌活性物质的耐热特性 将离心所得的发酵乳上清液在 121 °C 下湿热灭菌 30 min 后, 按 1.4.1 所述方法测定其抑菌活性。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵乳的抑菌作用

抑菌试验结果(图 2)表明, 鲜牛乳没有抑菌活性(数据未给出), 西藏灵菇发酵乳具有一定活性。



对每种病原菌而言, 含菌体发酵乳的抑菌活性(抑菌圈直径为 13.1 ~ 18.0 mm) 均大于无菌体发酵乳(12.5 ~ 16.0 mm)。这可能是因为在发酵乳液中残留菌体对指示菌也有一定的抑菌作用。含菌体发酵乳液对金黄色葡萄球菌的抑菌作用最强, 其次为大肠杆菌, 对沙门氏菌的抑菌作用最弱; 无菌体发酵乳液对不同病原菌的抑菌活性相差不大。

分析不同发酵时期所得发酵液的抑菌活性(图 2)可以看出, 除含菌体发酵液对金黄色葡萄球菌的抑菌效果在发酵 18 h 时达最大值以外, 发酵乳(包括含菌体发酵乳和无菌体发酵乳)对其他菌的抑菌作用均在发酵 21 h 时达到最大。由此可以初步确定, 西藏灵菇发酵乳的最佳终止期为发酵 21 h, 此时所得的发酵液对几种病原菌的抑菌效果均较高。

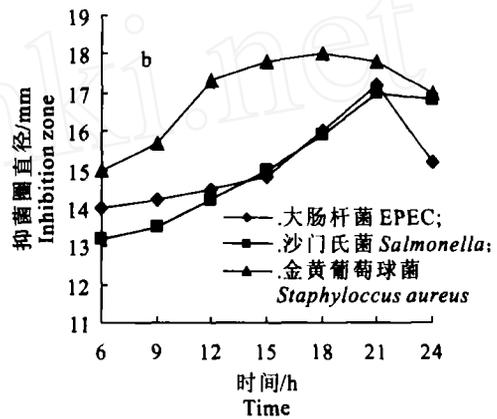


图 2 不同发酵时期不同发酵乳的抑菌活性  
a. 无菌体发酵乳; b. 含菌体发酵乳

Fig. 2 Anti-bacteria activities of fermented milk in different fermentation periods  
a. Fermented milk without mycelium; b. Fermented milk with mycelium

### 2.2 发酵乳浓度对抑菌效果的影响

由图 3 可以看出, 西藏灵菇发酵乳对 3 种病原菌的抑菌活性均随其浓度的减小而降低: 当浓度降低至 200 mL/L 时, 其对 3 种病原菌均无抑菌效果; 500 mL/L 的发酵乳液对 3 种病原菌均有一定抑菌作用(抑菌圈直径为 11.0 ~ 14.8 mm); 800 mL/L 发酵乳液的抑菌作用较强(抑菌圈直径为 11.9 ~ 15.8 mm), 但仍低于原发酵液的抑菌作用(13.1 ~ 18.0 mm)。对 3 种指示菌而言, 不同浓度含菌体发酵乳对金黄色葡萄球菌的抑菌活性最大, 大肠杆菌次之, 沙门氏菌最小, 这种规律与原发酵液相同, 但不同发酵时期所得发酵液的抑菌活性相差幅度减小。

### 2.3 发酵乳抑菌活性物质的耐热性能

由图 4 可见, 除去菌体的发酵乳经热处理后, 抑

菌活性有所下降, 但对不同菌其抑菌活性下降幅度不同。发酵前 3 h 所得发酵乳经加热处理后, 其抑菌活性基本全部丧失; 发酵 3 ~ 12 h 所得发酵乳经加热处理后, 除对大肠杆菌仍有抑菌作用(抑菌圈直径 10.0 ~ 12.0 mm) 外, 对沙门氏菌和金黄色葡萄球菌均无抑菌作用; 发酵 15 h 后所得发酵乳经加热处理后, 对 3 种病原菌的抑菌效果基本相同, 抑菌圈直径为 11.8 ~ 14.0 mm。相比较而言, 加热处理的发酵乳对大肠杆菌的抑菌效果略强, 金黄色葡萄球菌次之, 对沙门氏菌的抑菌效果最差, 这与未经加热的发酵乳有所不同。由此说明, 发酵乳中抑制大肠杆菌的活性物质的耐热性最强, 而抑制其他 2 种病原菌的活性物质的耐热性较差。大肠杆菌是最常见的肠道病原菌, 因此西藏灵菇发酵乳更适宜于

肠道疾病的预防与治疗。

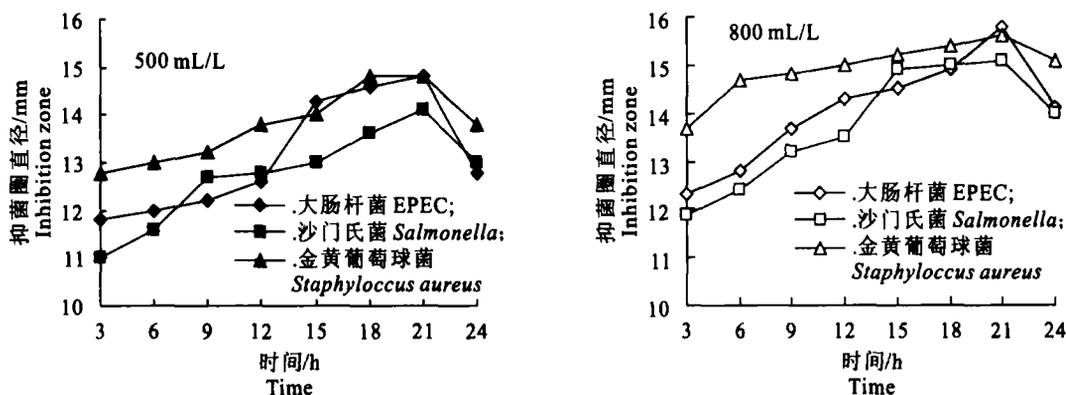


图 3 发酵液浓度对抑菌活性的影响

Fig. 3 Effect of concentration of fermented milk on anti-bacteria activities

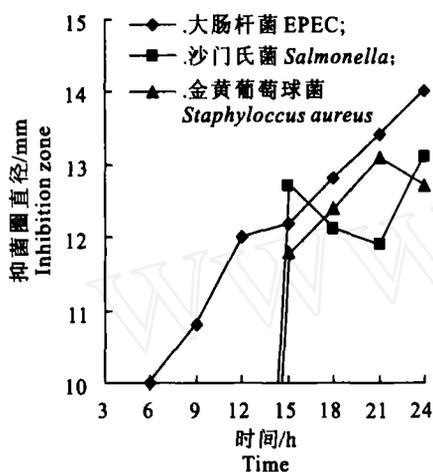


图 4 热处理对西藏灵菇发酵乳抑菌活性的影响

Fig. 4 Effect of heating on anti-bacteria activities of Tibetan linggu fermented milk

### 3 讨论与结论

本世纪以来,国内外的乳制品尤其是发酵乳制品的开发、应用和研究不断升温。特别是近几十年来,由于临床医学、微生物学、微生物学和食品科学的相互渗透,使有关方面的研究有了更加深入的发展<sup>[12]</sup>。西藏灵菇发酵乳是乳酸菌、酵母菌和醋酸菌共同发酵的结果,是一种含酒精的乳饮料。近年来,国外对牛奶酒的开发和研究已形成产业化,如开菲尔粒。但国内对这方面的研究则较为滞缓,尤其是对其生物活性及安全性的研究较少,以至于很多人对其安全性及功能仍持观望、甚至怀疑态度。本研究以进一步了解西藏灵菇发酵乳中功能因子的动态变化为切入点,着重研究与分析了不同发酵期所得的发酵乳对病原菌的抑制作用。

西藏灵菇发酵乳的抑菌作用除乳酸菌的益生作

用以外<sup>[13]</sup>,还与各菌种在发酵过程中产生的代谢物质有关。其中起主要作用的是由乳酸菌引起的有关细菌素与酵母菌产生的抑菌化合物之间的协调作用,其次是发酵产生的乳酸与乙酸抑制病原菌的协同作用<sup>[14]</sup>。此外,在发酵过程中产生的 CO<sub>2</sub>、乙醇和醋酸增强了乳酸的抑菌效果,起到了增效作用。

本研究发现,西藏灵菇发酵乳对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和沙门氏菌均有一定的抑菌作用;含菌体发酵乳的抑菌作用大于无菌体发酵乳,其抑菌圈直径分别为 13.1~18.0 mm 和 12.5~16.0 mm;发酵乳对金黄色葡萄球菌的抑菌效果最强,大肠杆菌次之,对沙门氏菌的抑菌效果最差;发酵 21 h 时所得发酵乳对几种指示菌的抑菌活性均达较高水平。发酵乳的抑菌活性随其浓度的减小而降低,800 mL/L 发酵乳的抑菌圈直径仍能达到 11.9~15.8 mm;加热处理会降低无菌体发酵乳的抑菌效果,但对不同菌抑菌活性的降低幅度不同,发酵前期所得无菌体发酵乳抑制大肠杆菌活性物质的耐热性较好,发酵 15 h 后所得的无菌体发酵乳经加热处理后,对 3 种病原菌的抑菌效果相近。

#### [参考文献]

- [1] 刘变芳,孔庆学,郭谡光.自然发酵剂“西藏雪莲”的初步研究与菌种鉴定[J].中国酿造,2004,11(11):11-15.
- [2] 刘宇峰,王金英,曲小军,等.西藏灵菇菌的菌相菌学的研究[J].中国乳品工业,2005,33(9):35-39.
- [3] 李永奇.藏灵菇奶对慢性肠道疾病的功能调节作用[J].河南中医,2005,25(3):41-42.
- [4] 李丽秋,王春敏,宋淑贤,等.西藏灵菇奶对抗生素相关性腹泻小鼠肠道菌群的调整作用[J].中国微生物学杂志,2004,8(4):199-200.

(下转第 138 页)

本研究样本主要采集于大棚温室中,其气候条件特殊,常年都有作物生长,温度湿度都较大,温度成为影响根结线虫发生的最主要因素。这样的环境非常适合需要较高温度的南方根结线虫,因而南方根结线虫成为危害大棚蔬菜的最主要的根结线虫种类。因此,在大棚温室根结线虫的防治中可以将其作为主要防治对象。本研究还发现了一个混合侵染群体,其由两种不同种类的根结线虫侵染所引起,周银丽等<sup>[12]</sup>曾报道过该种侵染类型。这表明本地区还有花生根结线虫危害,因此,在防治和选择种植品种的过程中也要考虑这一因素。

在形态学鉴定中,会阴花纹是最主要的特征。但该方法需要研究者具备较高的技巧,而且由于同一种群个体间因寄主和环境条件等方面的差异,形态上相应也会有一些变化,必要时还应结合其他方法来确认。而采用 mtDNA-PCR-RFLP 技术可以快速准确地鉴定其具体种类,弥补了形态学鉴定的不足,但其设备要求较高,应用受到一定限制。因此,采取二者相结合的鉴定方法,还是目前比较适用的研究手段。

在调查中发现,根结线虫的初侵染源大多来自粪肥、苗木。在目前大多数地区为单一种群,个别地方存在混合侵染现象的情况下,应加大植物检疫力度,大力做好根结线虫发生、防治知识的宣传和指导工作。同时,对其种类和发生动态还需作进一步的了解,以期防治奠定基础。

## [参考文献]

- [1] 刘维志. 植物病原线虫学[M]. 北京:中国农业出版社,2000:1-438.
- [2] 刘维志,刘 晔,周国梁,等. 植物线虫学研究技术[M]. 沈阳:辽宁科学技术出版社,1995:1-242.
- [3] 泰勒 A L,萨塞 J N. 植物根结线虫(生物学、分类鉴定和防治)[M]. 杨宝君,曾大鹏,译. 北京:科学出版社,1983:1-171.
- [4] 冯志新. 植物线虫学[M]. 北京:中国农业出版社,2001:135-154.
- [5] 刘维志. 植物线虫志[M]. 北京:中国农业出版社,2004:313-459.
- [6] 刘 昊,龙 海,鄢小宁,等. 海南省番石榴根结线虫病病原的种类鉴定及其寄主范围的测试[J]. 南京农业大学学报,2005,28(4):55-59.
- [7] Ceniz J L. Identification of four major *Meloidogyne* spp. by random amplified polymorphic DNA (RAPD - PCR) [J]. Phytopathology,1993,83:76-78.
- [8] Xu Jianhua,Liu Peilei,Meng Qingpeng,et al. Characterization of *Meloidogyne* species from China using isozyme phenotypes and amplified mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism[J]. European Journal of Plant Pathology,2004,110:309-315.
- [9] Powers T O,Harris T S. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species[J]. Journal of Nematology,1993,25(1):1-6.
- [10] 孙龙华,廖金铃,李迅东,等. 根结线虫种群的线粒体 DNA 分析[J]. 植物病理学报,2005(2):134-140.
- [11] 廖金铃,蒋 寒,孙龙华,等. 中国南方地区作物根结线虫种和小种的鉴定[J]. 华中农业大学学报,2003,22(6):544-548.
- [12] 周银丽,杨 伟,余光海,等. 中国云南省石榴根结线虫的种类初报[J]. 华中农业大学学报,2005,24(4):351-354.

(上接第 134 页)

- [5] 肖琳琳,董明盛. 西藏干酪乳杆菌降胆固醇特性研究[J]. 食品科学,2003,24(10):142-145.
- [6] 刘宇峰,夏海华,孙建华,等. 藏灵菇奶对肿瘤的抑制作用[J]. 畜牧兽医科技信息,2005(6):56-58.
- [7] 王春敏,李丽秋,杨春佳,等. 西藏灵菇酸奶对寻常性痤疮的治疗作用观察[J]. 中国微生物学杂志,2005,17(2):151.
- [8] Diniz R O, Garla L K, Schneedorf J M, et al. Study of anti-inflammatory activity of Tibetan mushroom, a symbiotic culture of bacteria and fungi encapsulated into a polysaccharide matrix [J]. Pharmacological Research,2003,47:49-52.
- [9] 周传云,聂 明,万佳蓉. 古老而新型的发酵奶——开菲尔[J]. 食品与机械,2003(5):46-47.
- [10] 殷文政,刘立一,马玉玲,等. 马奶酒抑菌活性的研究[J]. 中国乳品工业,2005,33(7):15-17.
- [11] 程丽娟,薛泉宏. 微生物学实验技术[M]. 西安:世界图书出版社,2000:383.
- [12] 德赖森 F,普汉 M. 发酵乳科学与技术[M]. 顾瑞霞译. 南京:东南大学出版社,1991.
- [13] Gurr M R. Milk products, contribution to nutrition and health [J]. J of the Society of Dairy Tech,1992,45(3):61-72.
- [14] 郭本恒. 益生菌[M]. 北京:化学工业出版社,2003:11.