

传统泡菜中高产酸乳酸菌的筛选与鉴定

郑琦锴, 蔡常宇, 王临好, 廖振林*

(华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

摘要: 以湖南地区家庭自制 50 余年泡菜液为样品, 采用纯培养方法分离纯化得到乳酸菌。对分离得到的乳酸菌进行溶血活性检验, 产酸性能测定, 并研究高产酸菌株的耐酸耐胆盐、自聚集疏水性、抗氧化、降解亚硝酸盐、生长特性及生物安全性研究。结果表明, 从泡菜样品中分离出来 70 株乳酸菌, 检验出完全无溶血活性乳酸菌 42 株; 筛选出高产酸性能乳酸菌 9 株, 编号为 JT1-31、JT1-21、JT1-12、JT1-25、JT1-6、JT1-16、JT1-34、JT3-23、JT3-10, 通过 16S rDNA 鉴定, 均为植物乳植杆菌 (*Lactiplantibacillus plantarum*), 菌株 JT1-12 耐酸性最好, pH 值 3.0 时存活率为 156.85%; 菌株 JT3-10 耐胆盐能力最好, 0.3%胆盐浓度存活率为 145.04%; 菌株 JT1-16 自聚集和疏水性最高, 分别为 66.13%和 44.19%; 菌株 JT1-21 的 DPPH 清除率最高, 为 51.93%; 菌株 JT1-25 的 α -葡萄糖苷酶抑制率最高, 为 20.36%; 9 株菌株亚硝酸盐降解率都较高, 在 90%以上, 清除率最高的菌株是 JT1-12, 清除率为 94.98%, 通过产生生物胺鉴定, 9 株菌株均不产生生物胺。该研究表明, 从传统泡菜中分离的 9 株植物乳植杆菌具有良好的益生潜能, 为发掘食品源乳酸菌提供参考和依据。

关键词: 乳酸菌; 泡菜; 产酸; 植物乳植杆菌; 筛选

文章编号: 1673-9078(2023)09-96-105

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.9.1092

Screening and Identification of High Acid-producing Lactic Acid Bacteria in Traditional Kimchi

ZHENG Qikai, CAI Changyu, WANG Linhao, LIAO Zhenlin*

(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Hunan homemade kimchi water that had been stored for more than 50 years was used for screening and isolating strains of lactic acid bacteria using the culture-dependent method. The isolated strains were examined for their hemolytic activity and acid generation ability, whereas the high acid-producing strains were assessed for their tolerance to acid and bile salts, self-aggregation and hydrophobicity, antioxidant properties, nitrite degradation ability, growth properties, and biosafety. In total, 70 lactic acid bacterial strains were isolated from the kimchi samples, of which 42 did not exhibit hemolytic activity. Additionally, 16S rDNA sequence was used to screen and identify nine high acid-producing strains, which were designated JT1-31, JT1-21, JT1-12, JT1-25, JT1-6, JT1-16, JT1-34, JT3-23, and JT3-10. They all belonged to *Lactiplantibacillus plantarum*; strain JT1-12 showed the best acid resistance, with a survival rate of 156.85% at pH 3.0; strain JT3-10 exhibited the best bile salt tolerance, with a survival rate of 145.04% at 0.3% bile salt concentration; strain JT1-16 showed the highest self-aggregation and hydrophobicity at 66.13% and 44.19%, respectively; and strain JT1-21 exhibited the highest DPPH scavenging rate at 51.93%. The α -glucosidase inhibition rate of strain JT1-25 was the highest at 20.36%. The nitrite degradation rate of all nine strains was >90%, with JT1-12 exhibiting the highest removal rate at 94.98%. Evaluation of biogenic amine production indicated that none of the nine strains produced biogenic amines. This study identified nine strains of lactic acid bacteria isolated from traditional kimchi that exhibited good probiotic potential, providing a valuable reference and foundation for further investigation into lactic acid bacteria derived from food sources.

Key words: lactic acid bacteria; kimchi; acid production; *Lactiplantibacillus plantarum*; screening

引文格式:

郑琦锴, 蔡常宇, 王临好, 等. 传统泡菜中高产酸乳酸菌的筛选与鉴定[J]. 现代食品科技, 2023, 39(9): 96-105

ZHENG Qikai, CAI Changyu, WANG Linhao, et al. Screening and identification of high acid-producing lactic acid bacteria in traditional kimchi [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(9): 96-105

收稿日期: 2022-08-31

基金项目: 广东省重点研发计划项目 (2020B020226008; 2018B020206001)

作者简介: 郑琦锴 (1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 益生菌, E-mail: 2437849473@qq.com

通讯作者: 廖振林 (1968-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 益生菌、菌群与健康, E-mail: larryliao@scau.edu.cn

泡菜是一种中国传统的发酵蔬菜食品,富含维生素、矿物质、有机酸和乳酸菌^[1],乳酸菌的作用包括抑制有害微生物的生长繁殖及产生独特的风味物质,对发酵泡菜的品质有着重要影响^[2]。蔬菜发酵后风味会得到改善,保藏期会延长^[3]。任亨等^[4]通过从涪陵本地传统泡菜中分离筛选出1株魏斯氏菌(*Weissella*),与植物乳植杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)结合纯种发酵麻竹笋泡菜,发现纯种发酵总酸含量明显高于自然发酵,风味评定发现纯种发酵分为评分明显高于自然发酵组,改善了酸菜的口感。

乳酸菌除了对泡菜的风味有重要影响外,在发酵中也有着各种益生作用,产生多种有益物质,如高产酸能力^[5]、抗氧化^[6]、降解亚硝酸盐^[7]、产 γ -氨基丁酸^[8]和降解生物胺^[9]。许多学者从泡菜中分离出各种功能的乳酸菌。赵鑫等^[10]从泡菜中分离出两株高抗氧化性能的乳酸菌,分别为发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)(Z2)、植物乳植杆菌(Z5)。刘义等^[11]从泡菜中分离出一株产细菌素乳酸菌QH 18-4,对大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*)、单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、绿脓假单胞杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)有不同程度的抑制作用。吕嘉彬等^[12]从发酵果蔬中分离了18株抑制 α -葡萄糖苷酶的乳酸菌,最高抑制率为37.48%。所以,泡菜中有许多优良功能的乳酸菌,对泡菜中乳酸菌进行研究,有巨大前景。

以传统发酵食品为研究对象,筛选出有益乳酸菌能控制食品发酵中的有益物质成分,了解发酵过程中的动态变化,对食品发酵工业的未来发展有重要意义^[13-15]。本研究以湖南省地区家庭自制有50余年历史的泡菜液为样品,采用分离培养方法鉴定乳酸菌,再对分离得到的乳酸菌进行溶血活性检验,产酸性能测定,并研究高产酸菌株的生长特性、耐酸耐胆盐、自聚集能力、疏水性、抗氧化、降解亚硝酸盐及生物安全性等,为挖掘传统发酵食品中乳酸菌资源奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料

取自湖南洞口两个家庭自制泡菜液,发酵起始于1968年,用无菌瓶包装,于4℃保藏。

1.1.2 培养基

MRS 液体培养基:蛋白胨 10 g/L,牛肉膏 10 g/L,酵母粉 5 g/L,葡萄糖 20 g/L,硫酸镁 0.1 g/L,硫酸锰 0.05 g/L,柠檬酸三铵 2 g/L,无水乙酸钠 5 g/L,磷酸氢二钾 2 g/L,吐温 80 1 g/L,用三级水溶解。

MRS 固体培养基:蛋白胨 10 g/L,牛肉膏 10 g/L,酵母粉 5 g/L,葡萄糖 20 g/L,硫酸镁 0.1 g/L,硫酸锰 0.05 g/L,柠檬酸三铵 2 g/L,无水乙酸钠 5 g/L,磷酸氢二钾 2 g/L,吐温 80 1 g/L,琼脂 15 g/L,用三级水溶解。

CaCO₃-MRS 固体培养基:蛋白胨 10 g/L,牛肉膏 10 g/L,酵母粉 5 g/L,葡萄糖 20 g/L,硫酸镁 0.1 g/L,硫酸锰 0.05 g/L,柠檬酸三铵 2 g/L,无水乙酸钠 5 g/L,磷酸氢二钾 2 g/L,吐温 80 1 g/L, CaCO₃ 10 g/L,用三级水溶解。

1.1.3 主要试剂

NaOH、DPPH、盐酸萘乙二胺、硼砂、乙酸锌、亚铁氰化钾、对氨基磺酸、亚硝酸钠、NaCl、HCl、DPPH:国药集团化学试剂有限公司。所用试剂均为分析纯或生化试剂。

1.1.4 仪器与设备

XMTD-204 数显式电热恒温水浴锅,欧诺仪器仪表有限公司;电子天平 ME204E,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;Centrifuge 5810R 高速离心机:Eppendorf AG;SPX-250BIII 生化培养箱,广州市叁科仪器有限公司;SW-CJ-2FD 型双人单面净化工作台,苏州净化设备有限公司;Sartorius 普及型 pH 计(PB-10),赛多利斯科学仪器(北京)有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 乳酸菌分离与鉴定

(1) 菌株分离:取4种泡菜发酵液样品各1 mL,用无菌生理盐水进行10倍梯度稀释,取各梯度100 μ L 稀释液均匀涂布于CaCO₃-MRS 固体培养基上,每个梯度做三个平行,置于37℃恒温箱中培养48 h。选取有溶钙圈的单菌落,观察菌落形态并从平板上挑选形态、大小、颜色不同的菌落,在MRS 固体平板上纯化直至单菌落。把筛选得到的单一菌株用20%甘油保存,存放于-80℃备用。

(2) 形态观察:观察分离菌株的菌落形态,并按照革兰氏染色法进行染色,然后调节双目显微镜于100倍的油镜下观察其形态。

(3) 分子鉴定:纯化得到的单菌落进行16S rDNA 鉴定,使用SDS法提取菌株DNA。吸取1 mL 培养12 h的菌液,10 000 r/min 离心5 min,倒掉上清液,加入1 mL 无菌水吹打均匀,继续用10 000 r/min 离心5 min,去掉上清液;往菌体中加入10 μ L 的1% (m/V)

SDS, 震荡 8 min, 加入 490 μL 无菌水, 手动摇匀, 作为 PCR 扩增模板备用, 之后用引物 27F(5'-AGAGT TTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGY TACCTTGTTAYGACTT-3') 进行 PCR 扩增。琼脂糖凝胶电泳法检测 PCR 产物。对在 1 400 bp 附近有明亮条带的扩增 DNA 样品送至广州擎科生物技术有限公司进行测序, 将测序结果提交至 NCBI(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行 BLAST 同源性比对, 选取同源性较高的模式菌株 16S rDNA 序列, 采用 MEGA 10.0 软件中的邻接法 (Neighbor Joining, NJ) 构建系统发育树。

1.2.2 乳酸菌生长曲线测定

将乳酸菌活化三代, 按 2% (V/V) 的接种量接种到装有 MRS 培养基的生长曲线仪微孔板中, 放在生长曲线仪中 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, 每隔 30 min 测一次吸光度, 每株菌三个平行。

1.2.3 无溶血活性乳酸菌的筛选

取初筛得到的保存于甘油管中的乳酸菌, 进行培养, 培养三代以上, 吸取培养的菌液 10 μL 在血平板上点样, 每株菌点样 3 次, 观察有无溶血圈。

1.2.4 乳酸菌产酸能力

取筛选得到的无溶血活性的乳酸菌进行产酸性能试验。取保藏于甘油管中的乳酸菌按 2% (V/V) 的接种量接种到 MRS 液体中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, 总共活化三代。取活化三次的乳酸菌液体按 2% 接种量接种到 MRS 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h, 取培养 48 h 的菌液离心, 用上清液通过酸碱滴定法测乳酸菌产酸量并测定 pH 值, 每株菌做 3 个平行。通过酸碱滴定结果和 pH 值选出产酸多的菌株。

酸度值测定: 取 1 mL 发酵好的上清液稀释 6 倍, 加入 1~2 滴 (10 g/L) 酚酞指示液, 用 0.1 mol/L 的氢氧化钠标准溶液滴定, 滴定至为红色, 且 30 s 不褪色, 即为滴定终点, 记录下消耗的氢氧化钠体积, 以消耗的氢氧化钠体积来计算酸度值 (酸度值以乳酸计), 以未接种的 MRS 液态培养基为空白, 总酸的含量按下式计算:

$$X = \frac{[c \times (V_1 - V_2)] \times K \times F}{m} \times 1000 \quad (1)$$

式中:

X ——总酸的含量, g/kg 或 g/L;

c ——氢氧化钠标准滴定溶液的浓度, mol/L;

V_1 ——滴定试液时消耗氢氧化钠标准滴定溶液的体积, mL;

V_2 ——空白试验时消耗氢氧化钠标准滴定溶液的体积, mL;

K ——酸的换算系数: 乳酸, 0.09;

F ——试液的稀释倍数;

m ——试样的质量, g; 或吸取试样的体积, mL。

1.2.5 乳酸菌耐酸耐胆盐性能

(1) 耐酸: 综合参考张会生等^[16]和 Abolfazl 等^[17]的方法。将乳酸菌接种于 5 mL MRS 液体培养基中, 放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱, 培养 12 h, 活化三代。将该培养液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 r/min 条件下离心 5 min, 弃上清, 用无菌生理盐水洗涤 2 到 3 次, 取对应 pH 浓度 (pH 值 2.5 和 3.0) 的 5 mL 液体培养基重新悬浮, 震荡均匀, 放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养, 分别在 0、4 h 取培养液稀释涂布于 MRS 固体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, 计数菌落生长情况, 每株菌做 3 个平行, 检测菌株耐酸情况, 耐酸率按下式计算。

$$X = \frac{B}{A} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

X ——酸耐受性能;

B ——4 h 的菌落数, CFU/mL;

A ——0 h 的菌落数, CFU/mL。

(2) 耐胆盐: 综合参考张会生等^[16]和 Abolfazl 等^[17]的方法, 略作修改。乳酸菌接种于 5 mL MRS 液体培养基中, 放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱, 培养 12 h, 活化三代。将该培养液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 r/min 条件下离心 5 min, 弃上清, 用生理盐水洗涤 2 到 3 次, 取对应胆盐浓度 (0.30% 和 0.10%) 的 5 mL 液体培养基重新悬浮, 震荡均匀, 放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养, 分别在 0、4 h 取培养液稀释涂布于 MRS 固体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, 计数菌落生长情况, 每株菌做 3 个平行, 检测菌株耐胆盐情况, 耐胆盐率按下式计算。

$$X = \frac{B}{A} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

X ——胆盐耐受性能;

B ——4 h 的菌落数, CFU/mL;

A ——0 h 的菌落数, CFU/mL。

1.2.6 乳酸菌自聚集能力测定

取培养三代的乳酸菌发酵液分装于离心管中, 在 4 000 r/min 条件下离心 8 min, 弃去上清液, 收集菌体沉淀, 再加入等量无菌 PBS 缓冲溶液洗涤, 反复洗涤两次, 弃去上清液, 加入无菌 PBS 缓冲溶液调整 OD_{600 nm} 至 0.60。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 24 h, 并在第 0、2、4、6、12、24 小时吸取培养液, 于 OD_{600 nm} 下测定吸光值, 自聚集率按下式计算:

$$X = \left(1 - \frac{B}{A}\right) \times 100\% \quad (4)$$

式中:

X ——自聚集率;

B—2 h、4 h、6 h、12 h、24 h 的吸光度;

A—0 h 时的吸光度。

1.2.7 疏水性测定

取培养三代的乳酸菌发酵液分装于离心管中, 在 4 000 r/min 条件下离心 8 min, 弃去上清液, 收集菌体沉淀, 再加入等量无菌 PBS 缓冲溶液洗涤, 反复洗涤两次, 弃去上清液, 加入无菌 PBS 缓冲溶液调整 OD_{600 nm} 至 0.60。吸取 3 mL 菌悬浮液至离心管中, 然后取 1 mL 的二甲苯加入离心管与菌液混合, 混匀后室温培养 10 min, 漩涡震荡 3 min 后, 放置通风处保持静止 30 min 使之分层。分层后小心吸取下层水相, 以无菌 PBS 缓冲溶液为空白对照测定。

1.2.8 生物胺检测

配制含氨基酸 (酪氨酸、组氨酸和赖氨酸, 10.00 g/L) 的营养肉汤固体培养基, 加入溴甲酚紫 (0.06 g/L), 调节培养基 pH 值为 5.80。取培养三代的乳酸菌在含氨基酸的营养肉汤固体培养基上划线培养, 37 °C 下培养 48 h, 每种做 3 次平行, 同时做阳性对照。溴甲酚紫在碱性环境中显紫色, 在酸性环境中显黄色。由于生物胺是碱性物质, 因此, 黄色为阴性, 红或紫色为阳性。

1.2.9 抗氧化活性测定

(1) 菌株悬浮液制备: 吸取培养 12 h 的乳酸菌液体, 用无菌 PBS 冲洗两遍, 制作成 OD_{600 nm}=0.6 的悬浮液。

(2) DPPH 清除能力的测定: 参考 Chen 等^[18]方法。取 0.5 mL 菌悬浮液, 加入浓度为 0.2 mmol/L 的 DPPH 无水乙醇溶液 0.5 mL, 混匀后避光反应 30 min 后, 8 000 r/min 离心 10 min, 在 517 nm 下测定上清液的吸光度。以上每组做三次平行实验。根据以下公式计算 DPPH 清除率。

$$X = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0} \right) \times 100\% \quad (5)$$

式中:

X—DPPH 清除率, %;

A_i—为样品组吸光度;

A_j—对照组 (乙醇+样品) 吸光度;

A₀—对照组 (乙醇+DPPH) 吸光度。

1.2.10 α-葡萄糖苷酶抑制率菌株筛选

参考 Chen 等^[19]的方法, 将活化三代的乳酸菌用无菌 PBS 缓冲液冲洗两遍, 制作成 OD_{600 nm}=1.00 的悬浮液。将 100 μL 乳酸菌悬浮液与 100 μL 的 α-葡萄糖苷酶溶液 (1 U/mL) 混合, 在 37 °C 下培养 10 min, 再进一步加入 100 μL 浓度为 5 mmol/L 的对硝基苯基

-α-D-吡喃葡萄糖苷, 再在 37 °C 培养 30 min。加入浓度为 1 mL 碳酸钠终止反应, 在 405 nm 处测定吸光度, 作为样品组 A。把不含乳酸菌菌液的等体积溶液作为对照组 B; 不含 α-葡萄糖苷酶溶液的等体积溶液作为空白组 C; 不含菌液和不含 α-葡萄糖苷酶溶液的等体积溶液作为空白组 D。以上每组做三个平行试验。α-葡萄糖苷酶抑制率计算如下:

$$X = \left(1 - \frac{A - B}{C - D} \right) \times 100\% \quad (6)$$

1.2.11 降解亚硝酸盐菌株筛选

将活化三代的乳酸菌用无菌 PBS 缓冲液冲洗两遍, 制作成 OD_{600 nm}=1.00 的悬浮液。按 2% 接种量, 接种到 NaNO₂ 质量浓度为 125 mg/L 的 MRS 液体培养基中, 37 °C 培养 24 h, 计算亚硝酸盐含量。NaNO₂ 含量的测定采用 GB/T 5009.33-2016《食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定》中盐酸萘乙二胺分光光度法。

$$X = \frac{A - B}{A} \times 100\% \quad (7)$$

式中:

X—亚硝酸盐降解率;

A—初始 NaNO₂ 含量;

B—发酵后 NaNO₂ 含量。

1.2.12 数据分析

采用 SPSS 22.0 软件对实验结果进行单因素方差分析显著性差异; 采用 OriginPro 2018、GraphPad Prism 8.3.0 软件统计分析与制作图表。

2 结果与讨论

2.1 菌株形态学和分子生物学鉴定

菌株形态为乳白色光滑不透明菌落, 菌株表面光滑湿润, 边缘整齐, 9 株菌的菌落形态类似, 有典型的乳酸菌特征。9 株菌均呈现革兰氏阳性反应。经 16S rDNA 鉴定, 在 NCBI 上进行同源性比对, 构建系统进化树。如图 1, 为菌株系统进化树, 发现 9 株乳酸菌均为植物乳植杆菌。

2.2 菌株生长曲线

9 株菌株乳酸菌的生长曲线如图 2, 从图 2 可以看出 9 株乳酸菌的生长曲线是典型“S”形, 有着明显的三个时期, 0~2 h 为延滞期, 菌落变化不明显, 2~14 h 进入对数生长期, 乳酸菌生长迅速, 呈对数生长; 14~24 h 为稳定期, 总细菌数达到最高水平。

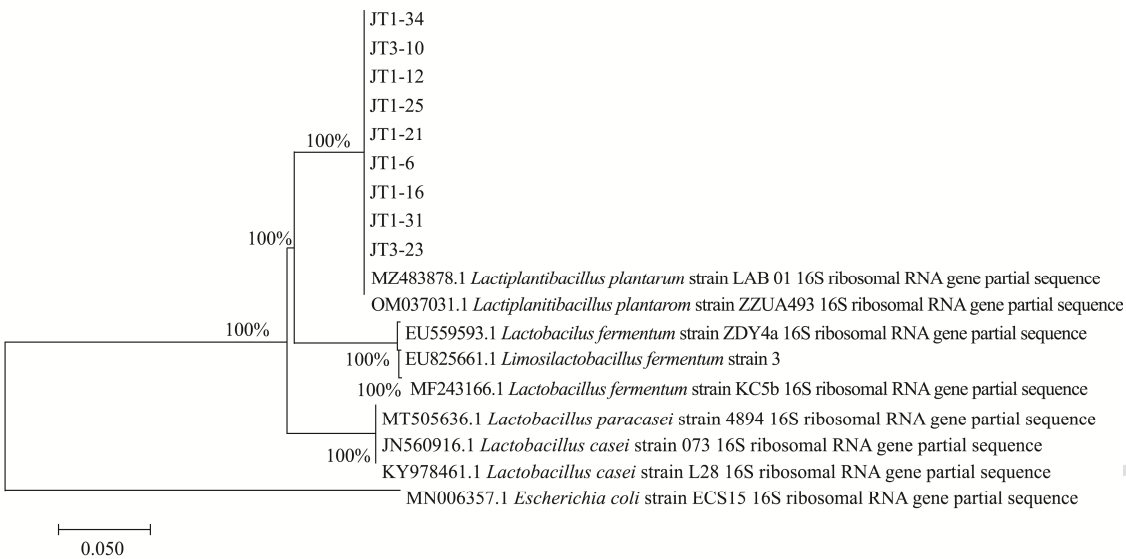


图 1 基于 16S rDNA 基因序列的筛选菌株系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree of screening strains based on 16S rDNA gene sequences

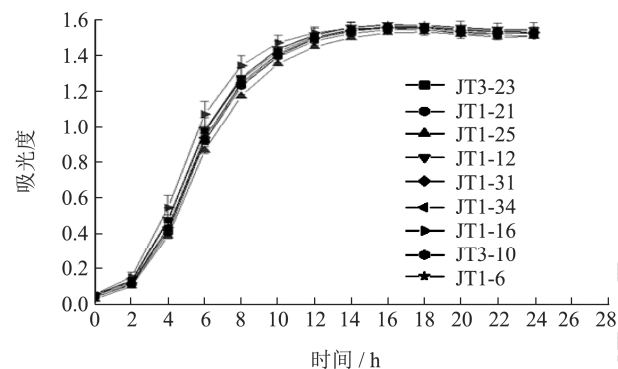


图 2 菌株的生长曲线

Fig.2 Growth curve of the strain

2.3 无溶血活性乳酸菌

溶血是指细菌分泌的溶血素使细胞溶解的现象，溶血素作为细菌致病的重要毒力因子，在动物细菌性疾病的发病过程中起着不容忽视的作用^[20]，也是评价乳酸菌安全性的重要指标之一^[21]。溶血现象可分为：完全溶血、不完全溶血和不溶血。完全溶血也称为β-溶血，使平板中菌落周围出现透明色圈，有致病性；不完全溶血也称为α-溶血，使平板中菌落周围出现草绿色圈，为条件致病菌；不溶血，平板中菌落周围不会有任何变化，无致病性^[22]。

将分离得出的 70 株乳酸菌点样于哥伦比亚血平板上，共得出 42 株不溶血乳酸菌，即无溶血活性的乳酸菌。对分离出来的无溶血活性乳酸菌进行后续试验。溶血现象如图 3 所示，1 为典型的β-溶血，周边有透

明圈；2 为α-溶血，周边是草绿色；3、4、5、6 为部分不溶血菌株在血平板上的表现。

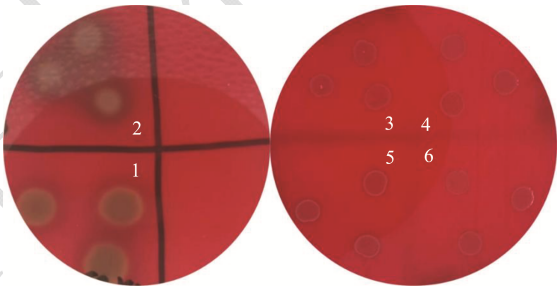


图 3 溶血现象

Fig.3 Hemolysis phenomenon

注：1 为β-溶血，2 为α-溶血；3、4、5、6 为部分乳酸菌溶血图，为不溶血。

2.4 高产酸乳酸菌

不溶血分离菌株的产酸能力如表 1 所示。对筛选得到的无溶血活性的 42 株乳酸菌进行产酸能力的测定，不同菌株之间的产酸能力差异较明显，其中乳酸菌 JT3-23、JT1-25、JT1-12、JT1-34、JT1-16、JT1-6、JT3-10、JT1-21、JT1-31 的产酸能力较其他菌株更强，测定的 pH 值都小于 4.0，产酸总量在 80 g/L 以上。其中产酸能力最高的是菌株 JT1-21，产酸总量高达 23.22 g/L；其次是菌株 JT1-31，产酸总量高达 23.07 g/L。王子靖海等^[23]从 7 种豆腐酸浆老汤中分离出筛选出 7 株高产酸乳酸菌，产酸量最高为 25.69 g/L。本实验分离的乳酸菌产酸量与之接近。

表 1 不同乳酸菌菌株发酵后的 pH 值和产酸量

Table 1 pH value and acid production after fermentation by different lactic acid bacteria strains					
菌株编号	pH 值	总酸 (以乳酸计) /(g/L)	菌株编号	pH 值	总酸 (以乳酸计) /(g/L)
JT3-27	4.39±0.01	8.91±0.324 ^{Pq}	JT1-25	3.79±0.01	21.45±0.28 ^{bc}
JT3-19	4.80±0.19	6.48±1.36 ^f	JT1-22	4.26±0.01	11.8±0.44 ^{kl}
JT3-11	4.44±0.00	9.06±1.02 ^{Pq}	JT3-4	4.12±0.01	13.95±0.20 ^{ghi}
JT3-23	3.91±0.01	16.73±2.86 ^{1e}	GS1-1	4.39±0.01	9.87±0.26 ^{nopq}
JT1-2	4.38±0.00	10.14±1.05 ^{mnop}	JT1-12	3.85±0.01	20.37±0.26 ^{cd}
JT1-36	4.29±0.01	10.86±3.06 ^{lmno}	JT3-29	4.36±0.01	10.56±0.22 ^{mno}
JT1-13	4.41±0.00	10.11±0.34 ^{mnop}	GS1-15	4.33±0.01	10.98±0.39 ^{klmn}
JT3-3	4.40±0.01	10.26±1.13 ^{mnop}	GS1-8-1	4.23±0.02	11.46±0.11 ^{klm}
GS1-6	4.41±0.02	9.6±0.10 ^{opq}	JT1-34	3.80±0.01	22.10±0.28 ^d
GS1-2	4.34±0.02	10.65±0.226 ^{lmno}	JT1-16	3.79±0.01	20.07±0.13 ^d
JT1-13	4.32±0.04	10.26±0.31 ^{mnop}	GS1-8	4.03±0.01	15.18±0.17 ^{fg}
JT3-6	4.35±0.02	9.78±0.52 ^{nopq}	JT1-6	3.99±0.01	17.37±0.41 ^e
JT3-22	4.36±0.01	10.2±0.63 ^{mnop}	GS1-9	4.19±0.01	15.51±0.38
JT3-14	4.40±0.01	9.09±0.16 ^{Pq}	JT3-28	4.22±0.01	14.82±0.28 ^{gh}
GS1-12	4.34±0.01	9±0.55 ^{Pq}	JT3-10	3.86±0.01	21.75±0.18 ^b
GS1-7	4.38±0.01	8.94±0.38 ^{Pq}	JT1-21	3.78±0.00	23.22±0.67 ^a
JT3-25	4.17±0.03	12.18±0.10 ^k	JT1-11	4.25±0.01	14.04±0.29 ^{ghi}
JT3-30	4.40±0.01	8.7±0.45 ^q	JT1-31	3.78±0.01	23.07±0.49 ^a
JT3-7	4.36±0.00	8.52±0.63 ^q	GS1-25	4.26±0.01	13.08±0.08 ^{ij}
JT3-1	4.40±0.00	8.25±0.45 ^q	JT1-17	4.24±0.01	13.62±0.22 ^{hi}
GS1-17	4.33±0.01	10.08±0.32 ^{nop}	GS1-4	4.25±0.01	14.02±0.64 ^{ghi}

注：表中上标小写字母表示具有显著差异（ $P<0.05$ ）。

2.5 乳酸菌耐酸性能

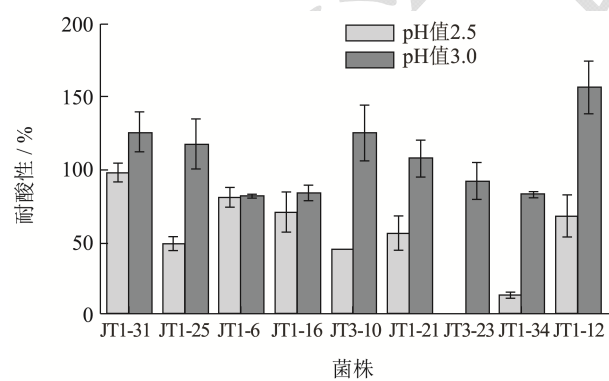


图 4 菌株在不同 pH 中的存活率 (%)

Fig.4 Survival of strains in different pH (%)

乳酸菌必须进入到人体的胃肠道中才能起到益生效果，而人体的胃内含有强酸，处于一个低 pH 的环境，空腹的 pH 值约为 2.5，当进食后，胃中 pH 值可上升至 3.0 以上^[24]。所以，就要求乳酸菌株拥有较为强劲的耐酸性能，对酸的耐受是评价益生菌株的一个重要指标。根据食品在人体胃肠道中停留的时间，确定最长培养时间为 4 h，乳酸菌耐酸性能如图 4 所示。

在 pH 值 2.5 条件下，耐酸性强弱顺序为：JT1-31>JT1-6>JT1-16>JT1-12>JT1-21>JT1-25>JT3-10>JT1-34>JT3-23，存活率最低的是 JT1-23，存活率小于 1%，存活率最高的是 JT1-31，达到 98.18%，除 JT13-23、JT1-34 外，存活率都在 50%左右或以上，耐酸性较好。在 pH 值 3.0 的环境中，耐酸性强弱顺序为：JT1-12>JT1-31>JT3-10>JT1-25>JT1-21>JT3-23>JT1-16>JT1-34>JT1-6，存活率最低的是 JT1-6，为 82.12%，存活率最高的是 JT1-12，为 156.85%。总体来看所有菌株耐酸能力都较为强劲，最好的菌株为 JT1-12。

2.6 乳酸菌耐胆盐性能

胃肠道除了是酸性环境外，十二指肠后段还含有一定浓度的胆汁酸盐。对胆盐的耐受是评价益生菌株的一个重要指标。哺乳动物肠道胆盐浓度约在 0.03%~0.30%^[25]。从图 5 可看出，9 株菌株在 0.1%和 0.3%的胆盐浓度中都能够存活，不同的菌株表现的存活率不相同。随着胆盐浓度升高，菌株的存活率也下降。胆盐浓度为 0.3%时，存活率最高的是 JT3-10，存活率为 76.04%，其次是 JT1-25，存活率为 66.85%，存活率最

低的是菌株 JT1-23, 存活率为 36.10%; 胆盐浓度为 0.1%时, 存活率最高的是 JT3-10, 存活率为 145.04%, 其次是 JT1-12, 存活率为 117.15%, 存活率最低的是菌株 JT1-23, 存活率为 65.20%。总体可以看出, 9 株菌对胆盐都有较好的耐受性, 其中耐受性最优良的菌株是 JT3-10。

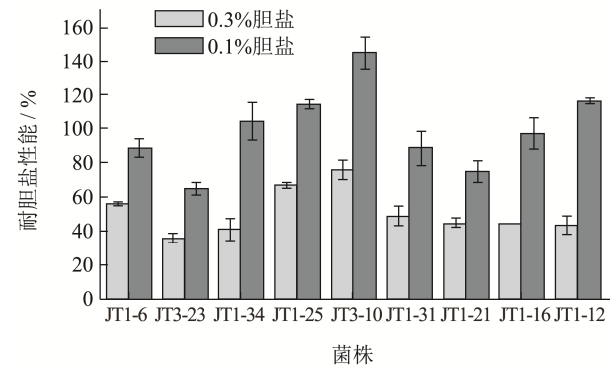


图 5 菌株在不同胆盐浓度中的存活率 (%)

Fig.5 Survival of strains in different bile salt concentrations (%)

2.7 乳酸菌自聚集能力

乳酸菌生物膜通过保护肠道内的菌种、生产抗菌化合物和刺激免疫反应而进行肠道定植, 而自聚集是生物膜形成的一个重要特性, 具有较高自聚集能力的乳酸菌倾向于形成生物膜^[26]。如图 6 所示, 共测定了 9 株菌在 37℃ 条件下, 0、4、6、12 和 24 h 的自聚集率。发现, 菌株的自聚集率随时间的增长而上升, 在 24 h 达到最大值。开始的第 4 小时, 9 株菌的自聚集率在 13%~22%之间; 在第 24 小时, 自聚集率在 50%~67%。不同菌株之间的自聚集差异较大, 对比 9 株菌发现, 菌株 JT1-16 在 24 h 时最高, 达到 66.13%, 其次是菌株 JT1-21, 自聚集率达到了 65.96%, 自聚集率最低的菌株是 JT1-34, 为 47.03%。其中 JT1-16 除了在 24 h 是的自聚集率最高外, 在 4 h 自聚集率为 21.78%, 对比其他菌株自聚集率也是最高的。综合考虑, 自聚集最好的菌株为 JT1-16。

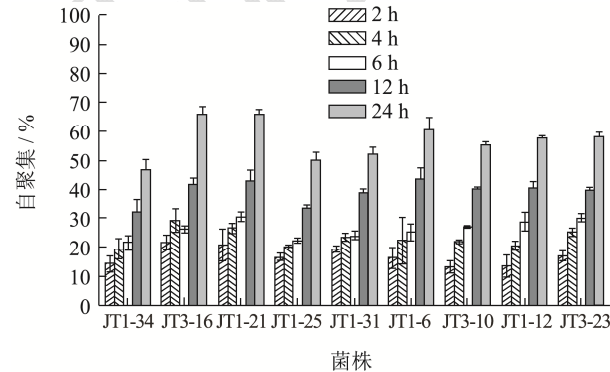


图 6 菌株自聚集测定结果

Fig.6 Results of self-aggregation assay of strains

2.8 乳酸菌疏水性

细菌表面疏水性是决定乳酸菌非特异性粘附的重要动力^[27]。菌株的疏水性如图 7 所示, 本实验测定了菌株对二甲苯的疏水率。9 株菌对二甲苯的疏水性范围在 20%~45%。对二甲苯疏水性最高的菌株为 JT1-16, 疏水率为 44.19%; 其次为 JT1-31, 疏水率为 37.04%。

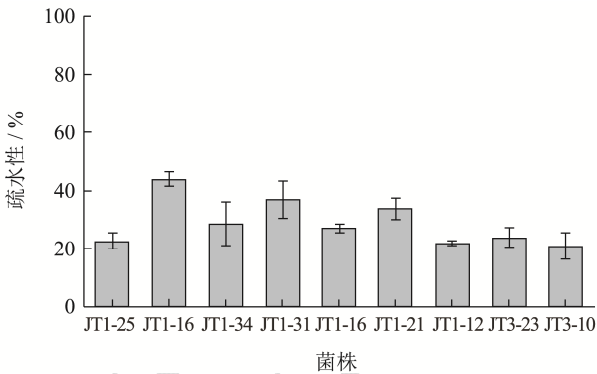


图 7 菌株疏水性能力

Fig.7 Hydrophobic ability of the strain

2.9 生物胺检测

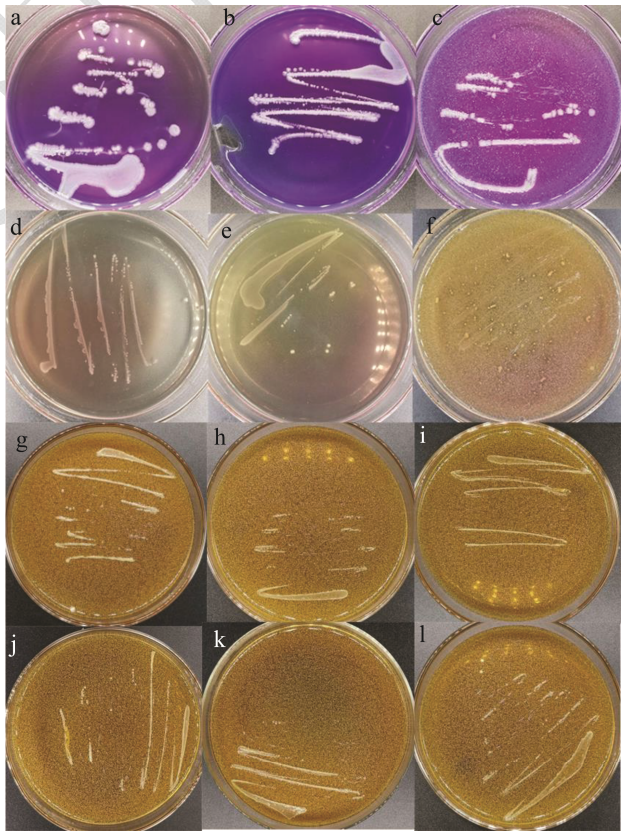


图 8 乳酸菌生物胺产生能力

Fig.8 Biogenic amine production capacity of lactic acid bacteria

生物胺是一类具有生物活性的低分子碱性含氮化合物, 过量的生物胺会对人体产生危害, 过量的组胺会导致头疼、血压异常和引起神经性毒性, 酪胺会引

起头痛和高血压,尸胺能够增加组胺和酪胺的含量^[28]。本研究检测了9株菌的产组胺、酪胺和尸氨的情况,以大肠杆菌为对照,实验结果如图8。大肠杆菌为图8a~8c,平板变为紫色,证明产生了碱性生物胺,9株菌在添加了酪氨酸、组氨酸和赖氨酸的培养基48 h后,平板上呈现黄色,证明其不产生生物胺,表明9株菌无生物胺产生能力。

2.10 DPPH 自由基清除能力

9株菌株清除DPPH的能力如图9所示,从图中可以看出,9株菌的菌株悬浮液对DPPH都有一定的清除能力,清除率在34.83%~51.93%之间,但不同菌株间的DPPH清除率差别较大。其中清除率最高的菌株是JT1-21,清除率为51.93%;其次是菌株JT1-34,清除率为51.10%;清除率最低的菌株是JT1-12,清除率为34.83%。与其它相比而言,许强等^[29]筛选出15株有抗氧化性能的乳酸菌,清除DPPH的能力最高为39.11%。黄煜等^[30]从皖北地区的腌制菜中筛选出20株具有抗氧化能力的乳酸菌,其中清除DPPH能力最高达到56.98%。本研究菌株具有一定抗氧化能力。

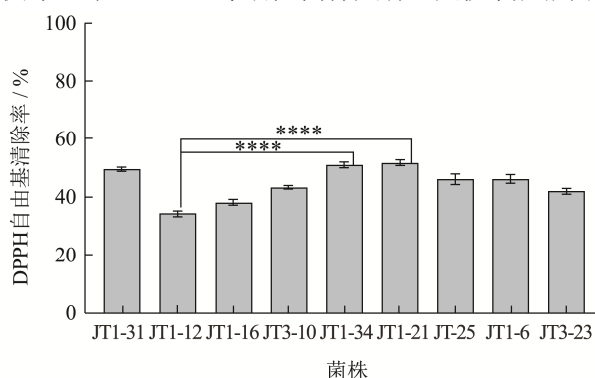


图9 菌株DPPH清除能力

Fig.9 DPPH scavenging ability of the strain

注: *表示处理间存在显著性差异(****: $P<0.0001$, $n=2$)。

2.11 α -葡萄糖苷酶抑制率

α -葡萄糖苷酶能够水解二糖为单糖,从而促进人体对碳水化合物的吸收。当 α -葡萄糖苷酶被抑制时,能够降低人体碳水化合物的吸收,从而达到降低空腹血糖的目的,防止人体血糖过高。9株菌对 α -葡萄糖苷酶的抑制率如图10,抑制率在1.25%~20.36%之间。以阿卡波糖为阳性对照,阿卡波糖的抑制率达到99.91%。9株菌对 α -葡萄糖苷酶都有一定的抑制率,其中抑制率最高的菌株是JT1-25,抑制率为20.36%,其次是JT1-34,抑制率达10.95%,抑制率最低的是菌株JT3-23,抑制率是1.25%。与之相比,有研究^[12]从发酵果蔬中分离的乳酸菌,最高抑制率为37.48%。

JT1-25对 α -葡萄糖苷酶的抑制率能达到20.36%,其在降低血糖方面有着一定潜能。

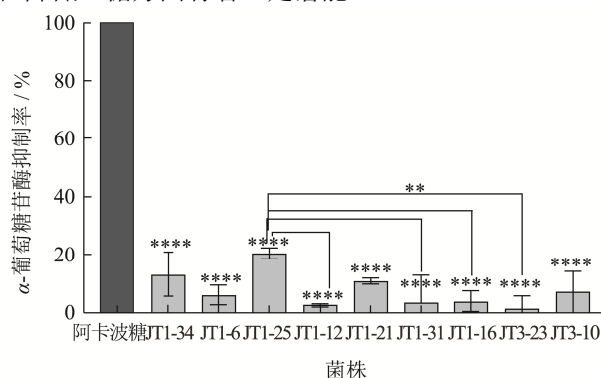


图10 菌株对 α -葡萄糖苷酶的抑制率

Fig.10 Inhibition rate of α -glucosidase by the strain

注: *表示处理间存在显著性差异(**: $P<0.01$, ****: $P<0.0001$, $n=2$)。

2.12 降解亚硝酸盐

亚硝酸盐是泡菜食品中常见的物质,也是影响食品安全的有害物质,研究降解亚硝酸盐的乳酸菌菌株对泡菜生产有着重要的意义。本实验对9株乳酸菌的亚硝酸盐降解率进行了实验,亚硝酸盐降解率如图11,通过24 h的发酵,发现9株菌对亚硝酸盐的降解率都很高,在90%以上,其中最高的是菌株JT1-12,降解率达到94.98%,最低的是菌株JT1-31,降解率为90.02%,所有菌株之间降解率无显著差异。郭志华等^[31]从红茶饮料中分离出来的乳酸菌通过24 h的发酵,其亚硝酸盐降解率均在90%以上。本实验分离的菌株降解率略高,在亚硝酸盐降解方面有着潜在的能力。

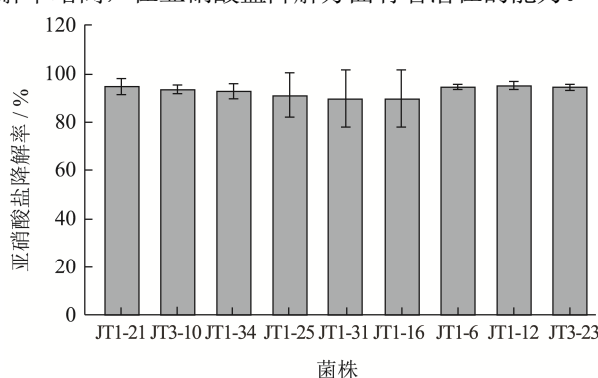


图11 菌株对亚硝酸盐的降解率

Fig.11 Degradation rate of nitrite by the strain

3 结论

乳酸菌作为泡菜中的主要菌种,也是目前益生菌研究和应用的重点对象之一。泡菜品质的好坏离不开乳酸菌的作用,而且随着生活水平的提高,人们对泡菜的要求不仅仅是口感上的需求,对其健康、安全的

需求已日益被人所重视。为改善发酵食品的风味、提高安全性、增强泡菜的功能,近年来有很多研究者从酸菜中进行筛选,筛选出了大量益生性能的乳酸菌,用于各种发酵产品中。

本研究以湖南洞口家庭自制的泡菜液为对象。先从得到的 70 株产酸菌株中筛选出 42 株无溶血活性的菌株。再从这 42 株菌株中筛选出 9 株高产酸的菌株,产酸量均在 16 g/L 以上,经过形态学观察和分子生物学鉴定,确定这 9 株菌为植物乳植杆菌,分别命名为 JT1-21、JT1-6、JT1-16、JT1-31、JT1-34、JT1-25、JT3-23、JT3-10、JT1-12。通过耐受性实验发现 9 株菌都具有较好的耐受性能,其中,菌株 JT1-12 耐酸性最好, pH 值 3.0 时存活率为 156.85%, 菌株 JT3-10 耐胆盐能力最好, 0.3%胆盐浓度存活率为 145.04%。菌株 JT1-16、JT1-21、JT1-31 有良好的自聚集和疏水性。9 株乳酸菌中, JT1-21 和 JT1-34 有良好的清除 DPPH 的能力,分别为 51.93%和 51.10%。菌株 JT1-25 和 JT1-34 有良好的抑制 α -葡萄糖苷酶的能力, JT1-25 的抑制率为 20.36%。所有菌株菌能有效降解亚硝酸盐,降解率均超过 90%。分离出来的 9 株产酸菌都有着不同的益生效果,具有很大的作为益生菌的潜能。

参考文献

- [1] Chen Anjun, Luo Wei, Niu Kaili, et al. Research on the relationship between sensory profile and physicochemical properties of paocai, a Chinese fermented vegetable [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2019, 43(12): e14237.
- [2] 张雅雯,钟源,郭爱玲,等.泡菜中功能性乳酸菌的筛选及其应用研究进展[J].中国调味品,2022,47(5):197-200.
- [3] Hong Yeun, Yang Heeseok, Li Jingmei, et al. Identification of lactic acid bacteria in salted Chinese cabbage by SDS-PAGE and PCR-DGGE [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2014, 94(2): 296-300.
- [4] 任亨,刘玉凌,彭玉梅,等.传统泡菜中乳酸菌的筛选鉴定及其在麻竹笋泡菜中的应用[J].食品科技,2021,46(8):33-37,45.
- [5] 施渺筱,洪蕴,汤鑫鑫,等.自然发酵泡菜中乳酸菌的分离鉴定及其在金刺梨汁发酵中的应用[J].中国酿造,2022,41(1): 109-115.
- [6] Son Sungho, Jeon Hyelin, Jeon Eunbi, et al. Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* Ln4 from kimchi: Evaluation of β -galactosidase and antioxidant activities [J]. LWT - Food Science and Technology, 2017, 85: 181-186.
- [7] Huang Yanyan, Jia Xiangze, Yu Jiajia, et al. Effect of different lactic acid bacteria on nitrite degradation, volatile profiles, and sensory quality in Chinese traditional paocai [J]. LWT - Food Science and Technology, 2021, 147: 111597.
- [8] Liu Wenli, Li Huamin, Liu Long, et al. Screening of gamma-aminobutyric acid producing lactic acid bacteria and the characteristic of glutamate decarboxylase from *Levilactobacillus brevis* F109-MD3 isolated from kimchi [J]. Journal of Applied Microbiology, 2021, 132(3): 1967-1977.
- [9] Lee Junsu, Jin Younghun, Pawluk Alixandermattay, et al. Reduction in biogenic amine content in baechu (napa cabbage) kimchi by biogenic amine-degrading lactic acid bacteria [J]. Microorganisms, 2021, 9(12): 2570-2570.
- [10] 赵鑫,胡蝶,张素平,等.传统泡菜中乳酸菌的筛选鉴定及抗氧化特性分析[J].中国调味品,2022,47(2):5-9.
- [11] 刘义,周火祥,曹瑜,等.一株泡菜产细菌素乳酸菌的鉴定[J].应用与环境生物学报,2020,26(6):1460-1465.
- [12] 吕嘉彬,张军蒙,余芳,等.具有 α -葡萄糖苷酶抑制性益生菌的筛选[J].陕西科技大学学报(自然科学版),2017,35(1): 129-133.
- [13] Jung Mi-Ja, Kim J, Lee S H, et al. Role of combined lactic acid bacteria in bacterial, viral, and metabolite dynamics during fermentation of vegetable food, kimchi [J]. Food Research International, 2022, 157: 111261.
- [14] Ağagündüz D, ŞAHİN T Ö, AYTEN Ş, et al. Lactic acid bacteria as pro-technological, bioprotective and health-promoting cultures in the dairy food industry [J]. Food Bioscience, 2022, 47: 101617.
- [15] Zhang Long, Yu Xiaojie, Yagoub Abu ElGasim A, et al. Effect of vacuum impregnation assisted probiotics fermentation suspension on shelf life quality of freshly cut lotus root [J]. Food Chemistry, 2022, 381: 132281.
- [16] 张会生,熊涛.三株乳酸菌的鉴定及益生性能[J].南昌大学学报(理科版),2019,43(4):336-341.
- [17] Abolfazl D, Mohammad M S D, Abbas R F, et al. Antibacterial activity of *Lactobacillus* spp. isolated from the feces of healthy infants against enteropathogenic bacteria [J]. Anaerobe, 2015, 34: 53-58.
- [18] Chen Yixuan, Liu Xiaoyan, Xiao Zheng, et al. Antioxidant activities of polysaccharides obtained from *Chlorella pyrenoidosa* via different ethanol concentrations [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 91: 505-509.
- [19] Chen P, Zhang Q, Dang H, et al. Screening for potential new probiotic based on probiotic properties and alpha-glucosidase inhibitory activity [J]. Food Control, 2014, 35(1): 65-72.
- [20] 陈希,索占伟,许剑琴,等.细菌溶血素的分类及代表性溶血

- 素研究进展[J].中国农学通报,2008,8:6-22.
- [21] 罗强,张明,刘巧,等.产细菌素屎肠球菌 SC-Y112 的体外益生性及安全性评价[J].食品科学,2021,42(11):154-160.
- [22] Jeong Yulah, Kim Hyemin, Lee Jiyeon, et al. The antioxidant, anti-diabetic, and anti-adipogenesis potential and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from human and fermented foods [J]. Fermentation, 2021, 7(3): 123-123.
- [23] 王子靖海,李家欣,朱运平,等.传统发酵豆腐酸浆中高产乳酸菌的分离鉴定及特性分析[J].中国酿造,2019,38(12):14-19.
- [24] 赵小茜,魏旭丹,陈戴玲,等.产多糖植物乳杆菌的耐酸耐胆盐能力[J].乳业科学与技术,2016,39(3):1-3.
- [25] 曹海鹏,姬邓红,黄作芳,等.一株强吸附胆固醇乳酸菌的分离鉴定及益生特性研究[J].中国酿造 2022,41(3):110-116.
- [26] Shekh S L, Dave J M, Bharatkumar R M V. Characterization of *Lactobacillus plantarum* strains for functionality, safety and γ -amino butyric acid production [J]. LWT - Food Science and Technology, 2016, 74: 234-241.
- [27] 何宇星,其其日力格,刘玮,等.潜在益生作用乳酸菌的筛选鉴定及其生物学特性[J].现代食品科技,2021,37(11):50-57,67.
- [28] 王光强,俞剑桑,胡健,等.食品中生物胺的研究进展[J].食品科学,2016,37(1):269-278.
- [29] 许强,袁乐梅,唐雪梅,等.川西彝族酸菜汁中抗氧化乳酸菌筛选及益生特性研究[J].中国调味品,2021,46(8):60-64.
- [30] 黄煜,蒋家璇,张凯迪,等.皖北地区腌制菜中具高抗氧化能力乳酸菌的筛选[J].农产品加工,2020,3:19-21,28.
- [31] 郭志华,王聪,陈红玲.红茶菌中降解亚硝酸盐乳酸菌的筛选、鉴定及其功能特性[J].中国食品学报,2021,21(8):309-316.