

传统泡菜中两株耐酸性乳酸菌的分离与鉴定

Isolation and identification of two acid resistant lactic acid bacteria from traditional pickles

冯金晓 李明珠 李翠萍 燕文迪

FENG Jin-xiao LI Ming-zhu LI Cui-ping YAN Wen-di

(青岛工学院食品工程学院, 山东 青岛 266300)

(College of Food Engineering, Qingdao Institute of Technology, Qingdao, Shandong 266300, China)

摘要:从东北、山东、贵州、四川等地 6 个泡菜样品中共分离出 8 株菌,通过形态学观察、生理生化试验、乳酸菌定性试验、胃酸模拟试验,得到了 2 株在 pH 2.5 条件下存活率较高的乳酸菌,经 16S rDNA 测序鉴定,确定 2 株耐酸性乳酸菌分别为:从山东糖蒜泡菜中分离得到编号为山东 SRB 的短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)及从东北酸菜中分离得到编号为东北 HS 的干酪乳酸菌(*Lactobacillus casei*)。

关键词:乳酸菌;泡菜;耐酸性;分离;鉴定

Abstract: A total of 8 strains of bacteria were isolated from 6 pickle samples in Northeast, Shandong, Guizhou, Sichuan and other places. Using simulated gastric acid experiments, morphological observations, physiological and biochemical experiments, lactic acid bacteria qualitative experiments, two strains of lactic acid bacteria with high survival rate under pH 2.5 conditions were obtained by simulation experiment. After 16S rDNA sequencing, it was determined that the two acid-resistant lactic acid bacteria were *Lactobacillus brevis* isolated from Shandong sugar garlic pickles numbered Shandong SRB and *Lactobacillus casei* isolated from Northeast sauerkraut numbered Northeast HS.

Keywords: *Lactobacillus*; pickle; acid resistance; isolation; identification

乳酸菌作为一类典型的益生菌群,具有调节肠道菌群、促进肠道消化吸收^[1-2]、降低血清胆固醇^[3-4]、抗氧化^[5]等作用,还能减轻体重、调节体脂^[6]、改善糖尿病^[7]等慢性疾病及抑郁症^[8]、老年痴呆^[9]等精神性疾病。人体摄入的乳酸菌需经过胃部并定植于肠道壁上才能发挥

其生理活性,但胃部高酸环境会使乳酸菌活性大幅降低。孟祥晨等^[10]研究表明在 pH 1.5 的环境条件下作用 3 h 后,短双歧杆菌存活率仅为 0.05%。其原因可能是胃部高酸环境改变了乳酸菌细胞膜所带的电荷及细胞蛋白结构,从而使乳酸菌活性下降^[11];另外人体消化系统分泌的胃液、胆汁、胰液等对乳酸菌的活性也有一定影响^[12-13]。李洋等^[14]从青海地区的牦牛酸乳中分离得到 6 株在 pH 3.0 条件下存活的乳酸菌;吕源玲^[15]从婴儿粪便中筛选出 3 株对 pH 3.5 的酸性条件具有一定耐受能力的乳酸菌。筛选耐胃酸性乳酸菌,对乳酸菌顺利通过胃部进入人体肠道,并充分发挥益生作用具有重要意义。

泡菜是以乳酸菌进行厌氧发酵的一类传统发酵食品^[16],富含乳酸菌^[17-18],在中国有着悠久的历史。试验拟以泡菜为研究对象,采用传统分离培养技术对其中的乳酸菌进行分离,并模拟胃酸条件筛选出耐胃酸能力较强的菌株,采用 16S rDNA 测序技术对其进行鉴定以确定种属。旨在为耐胃酸性菌株应用于食品加工,充分发挥其生理功效提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

吉林的家腌酸菜:吉林白山市抚松县天池圣景农贸市场;

山东的腌萝卜:山东青岛市胶州西路农贸市场;

山东的糖蒜:山东菏泽银田农贸市场;

成都的家腌混合泡菜:成都农产品中心批发市场;

贵州的酸菜及酸萝卜:贵州盘州市杜鹃路菜市场;

营养培养基、MRS 固体培养基:青岛海博生物技术有限公司;

过氧化氢酶: 2.0×10^4 U/mg, 广东环凯微生物科技有限公司;

基金项目:山东省高等学校科技计划项目(编号:J18KB078)

作者简介:冯金晓,女,青岛工学院讲师,硕士。

通信作者:李明珠(1987—),男,青岛工学院副教授,硕士。

E-mail: limingzhu392@163.com

收稿日期:2020-12-11

牛肉浸膏、蛋白胨、琼脂、明胶、木糖、果糖、半乳糖:生化试剂,国药集团化学试剂有限公司;

吡啶试剂、甲基红、柠檬酸三钠、磷酸氢二钾、磷酸二氢铵、硫酸镁、硫酸亚铁、氯化钠、硫代硫酸钠、葡萄糖:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

乳酸菌成套生化鉴定管:生化试剂,青岛海博生物技术有限公司。

1.1.2 仪器与设备

高压灭菌锅:BKQ-B7511型,山东博科生物产业有限公司;

恒温培养箱:DH4000BII型,天津市泰斯特仪器有限公司;

净化工作台:SW-CJ-1D型,苏州净化设备有限公司;

显微镜:CX31型,宁波天宇光电科技有限公司;

二氧化碳厌氧培养箱:WJ-3-160型,上海跃进医疗器械有限公司;

高速冷冻离心机:H1650-W型,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 微生物分离纯化

(1) 样品稀释:用移液枪分别吸取1 mL样品汁液于9 mL无菌生理盐水试管中,经涡旋振荡器混匀后制成 10^{-1} 泡菜样品稀释液;按照梯度稀释法依次将泡菜样品稀释至 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 。

(2) 分离培养:无菌条件下用移液枪分别移取0.2 mL样品稀释液涂布于MRS固体培养基中,倒置于 37°C 二氧化碳厌氧箱中培养36~48 h。

(3) 纯化培养:根据菌落的生长情况,挑选菌落形态不同的微生物进行划线纯化,于 37°C 条件下恒温培养48 h,选取培养后的菌株进行纯度检验,将混合菌株继续划线分离纯化,直至平板内为单一菌落。

1.2.2 菌株的初步鉴定

(1) 菌落形态特征观察:观察纯化后固体平板中微生物菌落形态(菌落颜色、边缘整齐度、表面光滑度、透明度、湿润度等)^[19]。

(2) 菌体形态特征观察:革兰氏染色法。

(3) 生理生化试验:产过氧化氢酶试验、运动性试验、V-P试验、甲基红试验、吡啶试验、明胶液化试验、柠檬酸盐分解试验、硫化氢试验、淀粉水解试验、糖(麦芽糖、葡萄糖、乳糖、半乳糖、果糖等)发酵试验^{[20][21]370-379}。

1.2.3 乳酸菌定性试验 将10%的硫酸与2%的高锰酸钾按 $V_{\text{硫酸}}:V_{\text{高锰酸钾}}=1:1$ 混合后滴入菌种发酵液中,将含硝酸银溶液的滤纸条搭于试管口,加热试管,发酵液中若有乳酸生成则与硫酸和高锰酸钾反应生成乙醛,加热后的乙醛蒸气在管口处遇硝酸银会使试纸变黑。

1.2.4 乳酸菌耐酸性试验 将乳酸菌用营养培养基菌

培养48 h后,用8 000 r/min高速冷冻离心机离心15 min,将沉淀物菌体用无菌生理盐水洗涤并稀释定容至10 mL,分别吸取1 mL菌液至9 mL模拟胃液中(另取1 mL菌液至9 mL蒸馏水中对照), 37°C 恒温振荡处理2.0 h,平板涂布计数,按式(1)计算耐酸性乳酸菌存活率^[22]。

$$S = \frac{N_1}{N_2} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

S——存活率,%;

N_1 ——胃酸处理后的活菌数,CFU/mL;

N_2 ——胃酸处理前的活菌数,CFU/mL。

1.2.5 乳酸菌16S rDNA基因序列测定及同源性分析

使用引物序列27F:AGAGTTTGATCCTGGCTC-AG;1492R:GGTTACCTTGTTACGACTT进行PCR扩增,测序由上海美吉生物工程有限公司完成。将基因序列在NCBI上通过BLAST进行比较分析,利用CLUSTAL X软件和MEGA3.1软件进行多序列比对及构建目标菌株与参比菌株之间的系统进化树^[23]。

1.3 数据处理

测序结果利用CLUSTAL X软件和MEGA3.1软件对菌株的序列进行亲缘性分析。

2 结果与分析

2.1 微生物的分离纯化

将4个地区的6个泡菜样品稀释后,取 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 稀释液0.2 mL涂布于MRS琼脂平板培养基中, 37°C 厌氧培养48 h,挑取不同菌落形态的菌落采用划线法分离纯化,观察菌落形态结果如图1所示。将分离纯化得到的菌落从形状、光滑度、黏稠度、菌落颜色、透明度、表面凸起等方面对菌落进行形态学描述,结果如表1所示。对8株菌进行革兰氏染色观察菌体形态,结果如图2所示。

由图2可知,8株菌均为革兰氏阳性菌,菌体呈长杆或短杆状,排列方式为单个和短链排列、长链排列或分散排列,根据伯杰细菌鉴定手册^{[21]289}可知这8株菌符合乳酸菌的形态特征。

2.2 乳酸菌菌株的生理生化鉴定

对分离得到的8株菌进行生理生化鉴定,结果如表2所示。

根据形态学观察结合表2生理生化试验结果,对照伯杰细菌学鉴定手册^{[21]290-294},8株菌符合乳酸菌相关特征,需结合乳酸菌定性试验及分子生物学进一步确定。

2.3 乳酸菌定性试验结果

吸取各菌种发酵液10 mL,分别加入1 mL H_2SO_4 溶液和 KMnO_4 溶液,加热发酵液至沸腾后,取湿润的含氮

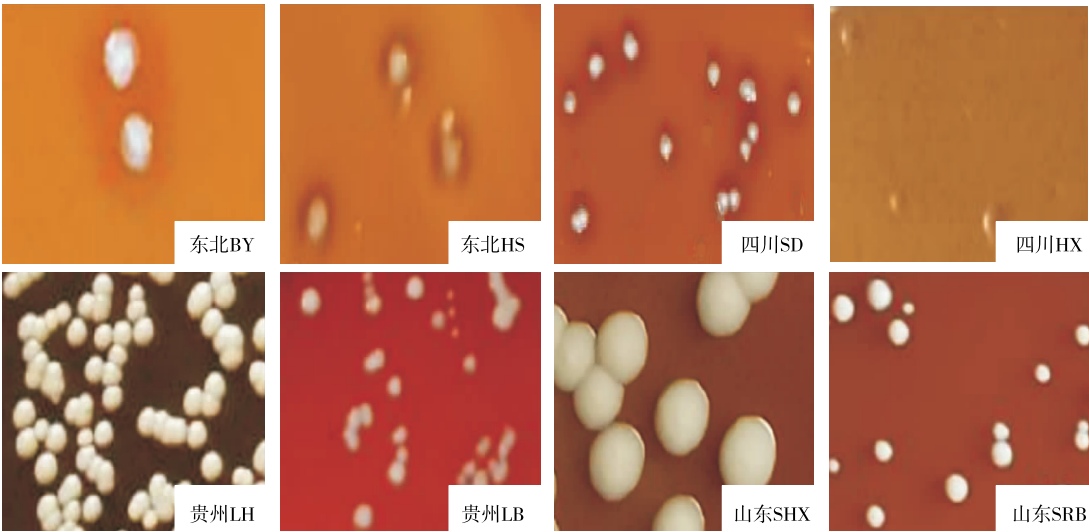


图 1 微生物初步分离菌落形态特征

Figure 1 Morphological characteristics of colonies isolated from microorganisms

表 1 微生物菌落形态特征
Table 1 Morphological characteristics of microbial colonies

菌种编号	边缘整齐度	光滑度	黏稠度	菌落颜色	透明度	表面凸起
东北 BY	整齐	光滑	不黏稠	乳白色	不透明	凸起
东北 HS	整齐	光滑	不黏稠	白色	微透明	凸起
四川 SD	不规则	光滑	不黏稠	乳白色	微透明	凸起
四川 HX	整齐	光滑	不黏稠	无色	透明	凸起
贵州 LH	整齐	不光滑	不黏稠	白色	不透明	凸起
贵州 LB	不规则	不光滑	不黏稠	白色	半透明	凸起
山东 SRB	整齐	光滑	不黏稠	白色	不透明	凸起
山东 SHX	整齐	光滑	不黏稠	白色	不透明	凸起

硝酸银溶液滤纸条横搭在试管口上,观察滤纸颜色变化,结果如表 3 所示。

由表 3 可知,测试东北 HS、山东 SRB、贵州 LB 菌株的滤纸变为黑色,说明这 3 株菌在培养过程中能够代谢产生乳酸,具备乳酸菌发酵糖产生乳酸的特性。

2.4 乳酸菌耐酸性试验结果

将菌种接种于 pH 2.5 的模拟胃液中 37 ℃ 恒温震荡处理 2.0 h,接种至 MRS 固体培养基中培养计数,结果如表 4 所示。

由表 4 可知,经过 pH 2.5 模拟胃酸性试验山东 SRB 菌、东北 HS 菌的存活率超过 10%,说明这两株菌具有较强的耐受高酸性环境能力,具备通过胃部达到肠道的条件。试验结果与其他研究结果较为一致,如:李洋等^[14]对牦牛酸乳中乳酸菌的耐酸性能进行了研究,结果表明在

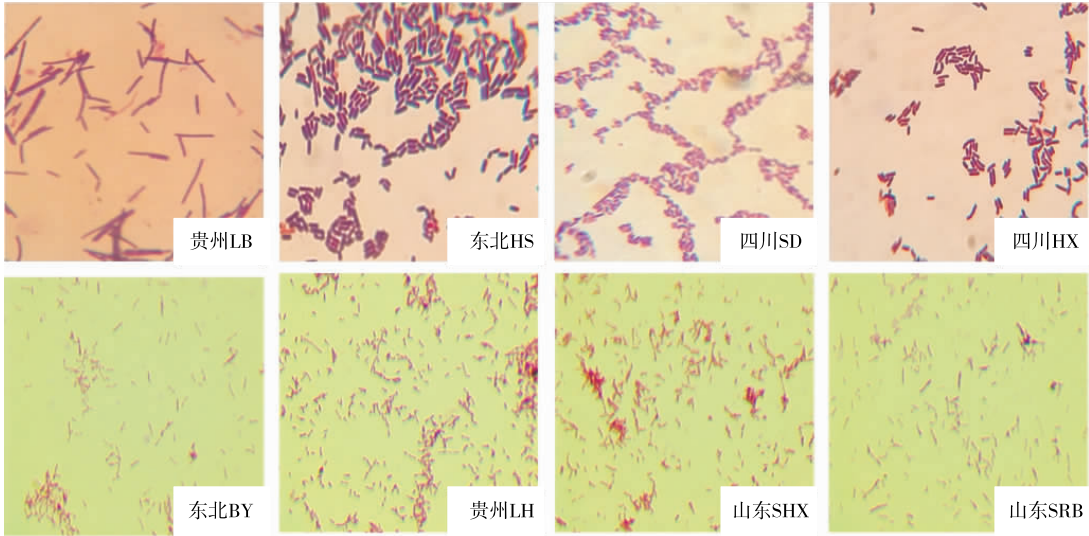


图 2 8 株微生物菌体形态图

Figure 2 Morphology of 8 strains of microorganisms

表 2 8 株细菌生理生化试验结果[†]

Table 2 Physiological and biochemical test results of 8 strains of bacteria

项目	贵州 LB	东北 HS	四川 SD	四川 HX	东北 BY	贵州 LH	山东 SHX	山东 SRB
过氧化氢酶试验	—	—	—	—	—	—	—	—
吲哚试验	—	—	—	—	—	—	—	—
甲基红试验	+	+	—	—	—	—	—	+
V-P 试验	—	—	—	—	+	+	—	—
明胶水解试验	—	—	—	—	—	—	—	—
运动性试验	—	—	—	+	+	—	+	—
柠檬酸盐试验	—	—	—	+	+	—	+	—
硫化氢试验	—	—	—	—	—	—	—	—
麦芽糖发酵试验	+	+	+	+	+	—	+	+
葡萄糖发酵试验	+	+	+	+	+	+	+	+
乳糖发酵试验	+	+	—	+	+	—	+	+
半乳糖发酵试验	+	+	—	+	+	—	+	+
果糖发酵试验	+	+	—	+	+	—	+	+
木糖发酵试验	+	+	—	—	+	—	—	—
蔗糖发酵试验	+	+	+	—	+	—	—	—
甘露醇发酵试验	+	+	+	+	—	—	+	+
山梨醇发酵试验	—	—	—	—	—	—	—	—

[†] 试验结果阳性用“+”表示,阴性用“—”表示。

表 3 乳酸菌定性试验结果

Table 3 Qualitative experiment of lactic acid bacteria

菌种编号	滤纸颜色	菌种编号	滤纸颜色
东北 HS	黑色	贵州 LH	不变色
东北 BY	不变色	山东 SRB	黑色
四川 SD	不变色	山东 SHX	不变色
四川 HX	不变色	贵州 LB	黑色

pH 3.0 的酸性条件下处理 3 h 后,有 8 株菌的存活率高于 13%。试验中贵州 LB 存活率低于 2%,耐受高酸性能力相对较差,即使能通过胃部环境,但存活数量较少,继续发挥生理功能效果不明显。因此将耐胃酸能力较强的山东 SRB 菌、东北 HS 菌进行分子生物学鉴定。

2.5 乳酸菌 16S rDNA 基因序列测定及同源性分析

使用通用引物扩增后,进行电泳检测。电泳条件:1%琼脂糖凝胶,120 V 电压电泳 30 min。结果如图 3 所示,耐酸性较强的两株菌在 1 500 bp 处出现特异清晰的条带,且产物条带单一,满足测序要求。

测序后利用 BLAST 将 2 株菌的基因片段序列与 GenBank/NT 数据库中已知序列进行比对,获得近源物种信息。利用 CLUSTAL X 软件和 MEGA3.1 软件构建系统进化树,菌株 HS 与 MT512165.1 *Lactobacillus brevis* strain 3379 亲缘性最近,菌株 SRB 与 MT604606.1 *Lactobacillus paracasei* strain 2013 亲缘性最近,结果如

表 4 乳酸菌耐酸性试验结果

Table 4 Acid resistance test of lactic acid bacteria

菌号	活菌数/(CFU · mL ⁻¹)			存活率/%
	处理前	模拟胃酸处理(2.0 h)	蒸馏水对照(2.0 h)	
贵州 LB	2.83×10 ⁷	3.50×10 ³	2.60×10 ⁶	1.2
山东 SRB	2.35×10 ⁷	2.94×10 ⁴	2.20×10 ⁶	12.5
东北 HS	2.17×10 ⁷	2.37×10 ⁴	2.00×10 ⁶	10.9

图 4 所示。菌株的 16S rDNA 序列比对结果确定东北 HS 为短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)、山东 SRB 为干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)。

3 结论

试验从 6 个泡菜样品中分离纯化得到 8 株菌,经形

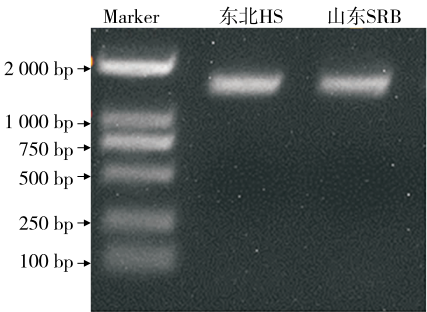


图 3 PCR 产物检测电泳图

Figure 3 Electrophoresis of PCR products

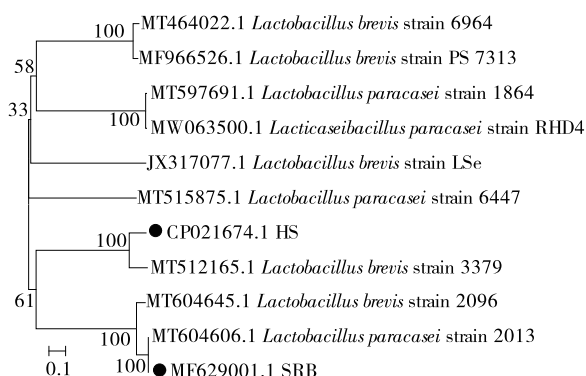


图 4 两株菌基因序列系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of gene sequences of the two strains

态学观察、生理生化试验、乳酸菌定性试验及耐胃酸模拟试验,筛选得到 2 株耐酸性较强的菌株,经分子生物学鉴定及同源性分析可知,两株菌分别为编号为东北 HS 的短乳杆菌和编号为山东 SRB 的干酪乳杆菌。

乳酸菌具有耐受胃酸能力,可保障其通过胃部高酸环境并保持活性,但还需在肠道壁上定殖并达到一定数量后才能充分发挥其生理功效。研究筛选得到的乳酸菌,具有耐受高酸性能力,来自于传统泡菜,但能否应用于食品生产,还需从以下几个方面进行更加深入的研究:首先,筛选得到的乳酸菌能否与肠黏膜上皮细胞相互作用顺利定殖于肠道壁上需要进一步研究;其次,筛选得到的乳酸菌需要经过进一步的稳定性试验及遗传特性稳定性研究后,才能实现工业化生产。

参考文献

- [1] 曹振辉,刘永仕,潘洪彬,等. 乳酸菌的益生功能及作用机制研究进展[J]. 食品工业科技, 2015, 36(24): 366-370, 377.
- [2] 李湘丽,袁廷香,闫吉美. 乳酸菌在发酵香肠生产过程中的应用研究进展[J]. 食品与机械, 2014, 30(6): 233-237.
- [3] 严玉婷,潘道东. 发酵乳杆菌 SM-7 的筛选及对小鼠降胆固醇作用[J]. 食品科学, 2010, 31(9): 224-228.
- [4] 郭晶晶,张鹏飞,曹承旭,等. 自然发酵豆酱中降胆固醇乳酸菌的筛选鉴定及对大鼠血清胆固醇的影响[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(2): 15-24.
- [5] 郑金熊,游丽君. 4 种富锌乳酸菌抗氧化活性及体外消化稳定性研究[J]. 食品与机械, 2020, 36(4): 170-175.
- [6] 刘尧尧,李璐,柳婷婷,等. 植物乳杆菌菌粉对肥胖大鼠肠道黏膜屏障功能的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(17): 153-160.
- [7] 栾畅,王宏伟,何忠梅,等. 植物乳杆菌 Sc52 联合牛蒡低聚果糖对 2 型糖尿病模型小鼠的治疗作用[J]. 食品科学, 2015, 36(21): 214-220.
- [8] 骆鹏飞,俞兰秀,钟霞,等. 乳酸菌对精神性疾病作用的研究进展[J]. 食品工业科技, 2017, 38(16): 347-351.
- [9] 刘军莉,刘川川,李润乐,等. 青海藏区发酵乳对阿尔茨海默病

模型小鼠认知功能的影响[J]. 中国高原医学与生物学杂志, 2020, 41(2): 94-100.

- [10] 孟祥晨,霍贵成. 双歧杆菌抗消化道逆环境特性的研究[J]. 食品与发酵工业, 2003, 34(10): 6-10.
- [11] 马剑敏,靳萍,王琳,等. HRP 在模拟人体胃肠环境中的稳定性研究[J]. 生物技术, 2002, 18(5): 28-29.
- [12] 靳志强,王延祥,李平兰,等. 植物乳杆菌耐酸耐胆盐的体外试验及其降胆固醇作用[J]. 中国食品学报, 2009, 9(5): 24-28.
- [13] 赖文,刘书亮,张倩颖,等. 降胆固醇乳酸菌鉴定及其在体外模拟胃肠环境中抗性研究[J]. 中国酿造, 2011, 30(3): 90-93.
- [14] 李洋,赵欣,张玉,等. 牦牛乳中耐酸耐胆盐乳酸菌的分离筛选和鉴定[J]. 食品与机械, 2018, 34(7): 23-28, 33.
- [15] 吕源玲. 耐酸耐胆盐益生乳酸菌的筛选与鉴定[J]. 食品与机械, 2017, 33(6): 42-45.
- [16] HONG Yeun, YANG Hee-seok, LI Jing-mei, 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, 2013, 94(2): 296-300.
- [17] DING Wu-rong, SHI Chao, CHEN Ming-zhou, et al. Screening for lactic acid bacteria in traditional fermented Tibetan yak milk and evaluating their probiotic and cholesterol-lowering potentials in rats fed a high-cholesterol diet[J]. Journal of Functional Foods, 2017(32): 324-332.
- [18] MARKOWIAK P, SLIZEWSKA K. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health[J]. Nutrients, 2017, 9(9): 1021.
- [19] 谷海瀛. 形态学检查方法的标准化及其在细菌鉴定中的作用[J]. 中华检验医学杂志, 2006(10): 951-953.
- [20] 邓梅葵,孙迎,韩雯晴. 细菌鉴定方法[J]. 生物医学工程学进展, 2014(2): 84-88.
- [21] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组,译. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.
- [22] 赵芳,李艳琴,李彬春. 模拟人体胃肠道环境筛选益生乳杆菌[J]. 微生物学通报, 2016, 43(6): 1396-1403.
- [23] 董安国,高琳,赵建邦,等. 基于 DNA 序列的系统进化树构建[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2008(10): 221-226.