

低盐泡菜中耐酸性乳酸菌的筛选、鉴定及特性研究

Screening, identification and characteristics of acid-tolerant lactic acid bacteria in low-salt pickles

孙熙洽¹ 崔承弼^{1,2} 齐仕博¹ 齐欣²

SUN Xi-han¹ CUI Cheng-bi^{1,2} QI Shi-bo¹ QI Xin²

(1. 延边大学农学院, 吉林 延吉 133002; 2. 延边大学药学院, 吉林 延吉 133002)

(1. College of Agriculture, Yanbian University, Yanji, Jilin 133002, China;

2. College of Pharmacy, Yanbian University, Yanji, Jilin 133002, China)

摘要:目的:筛选出具有潜在益生特性的乳酸菌菌株。方法:从含盐量 $\leq 6\%$ 的 12 份低盐泡菜中筛选出 5 株耐酸性乳酸菌,进行 16S rDNA 分子鉴定,并对其益生特性进行研究。结果:5 株耐酸性乳酸菌分别为肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)J2、副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)N6、类植物乳杆菌(*Lactobacillus paraplantarum*)F8、食蜜魏斯氏菌(*Weissella cibaria*)M1 和食蜜魏斯氏菌(*Weissella cibaria*)M12。其中,*L. paracasei* N6、*W. cibaria* M1 和 *W. cibaria* M12 在 pH 4.0 培养基中相对生长率分别为 84.23%、78.32%、76.29%,具有较强的耐酸能力;经 pH 3.0 胃液和 pH 8.0 肠液消化后,其存活率分别为 79.26%、50.65%、53.37%,具有较强的耐受胃肠液能力;在 0.3%胆盐中培养 8 h 后,其存活率均在 30%以上,具有较强的耐胆盐能力;疏水率及自凝集率均在 60%以上,具有较强的疏水及自凝集能力。结论:试验筛选得到 3 株具有益生特性的耐酸性乳酸菌菌株 *L. paracasei* N6、*W. cibaria* M1 和 *W. cibaria* M12,可用于复合益生菌菌剂的研究。

关键词:低盐泡菜;耐酸性;乳酸菌;16S rDNA;体外益生特性

Abstract: Objective: This study focused on screening lactic acid bacteria strains with potential probiotic properties. Methods: Five strains of acid-tolerant lactic acid bacteria were screened from twelve low-salt pickles with salt content $\leq 6\%$, identified by 16S rDNA, and their probiotic properties were studied. Results: The five strains were *Leuconostoc mesenteroides* J2, *Lactobacillus paracasei* N6, *Lactobacillus paraplantarum* F8, *Weissella*

cibaria M1 and *Weissella cibaria* M12. Among them, the relative growth rates of *L. paracasei* N6, *W. cibaria* M1 and *W. cibaria* M12 in pH 4.0 medium were 84.23%, 78.32% and 76.29%, respectively, which had strong acid-tolerant capacity. After digestion with gastric fluid at pH 3.0 and intestinal fluid at pH 8.0, the survival rates were 79.26%, 50.65% and 53.37%, respectively, which had strong tolerance to both artificial gastric fluid and intestinal fluid environments. After cultured in 0.3% bile salt for 8 h, the survival rates were more than 30%, and they had strong bile salt tolerance. The hydrophobic rates and self-aggregation rates were both above 60%, and they had strong hydrophobic and self-aggregating capacity. Conclusion: In this study, three strains of acid-tolerant lactic acid bacteria *L. paracasei* N6, *W. cibaria* M1 and *W. cibaria* M12 with probiotic properties were screened, which could be used in the study of compound probiotics.

Keywords: low-salt pickles; acid tolerance; lactic acid bacteria; 16S rDNA; in-vitro probiotic properties

泡菜又名发酵蔬菜、腌渍菜,是将新鲜蔬菜经低浓度盐水或少量盐腌渍而成,其优势益生菌群主要以乳酸菌为主^[1-2]。高盐饮食是导致死亡的危险因素^[3],因此,减少盐分摄入是维护身体预防慢性病的重要手段。

乳酸菌(Lactic acid bacteria, LAB)是一类能利用可发酵碳水化合物产生大量乳酸的细菌的统称^[4]。泡菜发酵期间,微生物菌群不断更替,乳酸菌会伴随原辅料、盐浓度和发酵条件等因素的变化而不同。只有耐受低 pH、酸性强的环境且数量多、活力强的乳酸菌才能在肠道中发挥生物功效,进而在人体内发挥益生作用^[5]。赵山山等^[6]从贵州遵义市自制泡菜中筛选得到 11 株产酸量较高、耐酸性能优良的乳酸菌,具有潜在的益生特性。冯金晓等^[7]从 6 个泡菜样品中,筛选得到 2 株耐酸性较强的乳酸菌。此外,乳酸菌还能够保护肠道健康,提高绒毛

基金项目:国家重点研发计划项目(编号:2018YFD0400404)

作者简介:孙熙洽,女,延边大学在读硕士研究生。

通信作者:崔承弼(1968—),男,延边大学教授,博士。

E-mail: cuichengbi@ybu.edu.cn

收稿日期:2021-10-11

密度^[8]。

研究拟选取四川、河北和东北地区的低盐泡菜,筛选出耐酸性优良的菌株,进行形态学、生理生化鉴定及16S rDNA 分子种属鉴定并将其命名,测定菌株的生长曲线、耐酸产酸能力、耐受胃肠液能力、耐胆盐能力、疏水及自凝集能力,通过综合比对,筛选出具有益生特性的耐酸性乳酸菌菌株,为益生菌制剂的研发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

14 份泡菜样品:分别为萝卜泡菜、洋姜泡菜、白菜泡菜、红椒泡菜、东北酸菜,来自于四川、河北和东北地区,市售;

MRS 琼脂培养基、MRS 肉汤培养基:青岛高科园海博生物技术有限公司;

胃蛋白酶:北京奥博星生物技术有限责任公司;

胰蛋白酶:MYM Biological Technology Company, USA;

牛胆盐:广东环凯威微生物科技有限公司;

碳酸钙、丙三醇、氯化钠:分析纯,天津科密欧化学试剂有限公司;

革兰氏试剂盒:青岛青药生物工程有限公司。

1.1.2 仪器与设备

台式离心机:TGL-16M 型,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;

分析天平:PWC124 型,上海民桥精密科学仪器有限公司;

立式压力蒸汽灭菌:BXM-30R 型,重庆雅马拓科技有限公司;

雷磁 pH 计:PHS-25 型,上海仪电科学仪器股份有限公司;

电热恒温培养箱:YM-666 型,上海新苗医疗设备有限公司;

多功能荧光酶标仪:SP-Max 3500FL 型,上海闪谱生物科技有限公司;

显微镜:GX53 型,德国 Leica 公司。

1.2 方法

1.2.1 泡菜盐度及 pH 值的测定

(1) 盐度:参照彭易涛^[9]的方法。

(2) pH 值:按:GB 5009.237—2016 执行。

1.2.2 菌株的分离与纯化 选取含盐量 $\leq 6\%$ 的泡菜,用生理盐水按倍比稀释法,将菌液涂布至 2% CaCO_3 -MRS 琼脂平板上,37 °C 厌氧培养 48 h,根据呈现的形态特征挑选菌落,反复进行平板划线分离与纯化,直至出现纯菌落。

1.2.3 耐酸性菌株的筛选与初步鉴定 在 pH 4.0 的 MRS 液体培养基中接种 2% 的供试菌悬液,37 °C 恒温培

养 24 h,选取产生菌体沉淀生长状况良好的菌株放入 pH 3.0,2.0 的液体培养基中进行重复筛选。将生长较为旺盛的菌株通过梯度稀释后涂布于 MRS 琼脂培养基上,37 °C 恒温培养 24 h,观察菌落形状、大小、颜色等特征并进行革兰氏染色和过氧化氢酶试验。

1.2.4 16S rDNA 分子鉴定 将分离纯化的菌株送检至生工生物工程(上海)股份有限公司,采用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取鉴定菌株基因组 DNA,得到 16S rDNA 基因组片段序列后,进行 BLAST 序列比对。将获得的基因组 DNA 进行核酸电泳验证,加入通用引物进行 PCR 扩增,正向引物为 27f:5'-AGTTTGATC-MTGGCTCAG-3';反向引物为 1492R:5'-GGTTACCTT-GTTACGACTT-3'。PCR 扩增条件:94 °C 预变性 4 min;94 °C 变性 45 s,55 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 1 min,共 30 个循环;72 °C 延伸 10 min,4 °C 保存。将 PCR 扩增产物测序、双向拼接后,用 BLAST 模块在 NCBI 上对比同源性,使用 Megalign 程序绘制系统发育树并进行分析。

1.2.5 耐酸性菌株的生物学性质测定

(1) 生长曲线:在 MRS 液体培养基中按 2% 接种待测菌株,37 °C 静置培养,隔 2 h 取样,共培养 24 h,用空白培养基作为对照组,测定 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 值,绘制 5 株菌株的生长曲线。

(2) 酸耐受能力:在 10 mL pH 值分别为 4.0,3.0,2.0 的 MRS 肉汤培养基中,以 2% 接种量接入待测菌株,37 °C 恒温培养,测定 0,24 h 的 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 值,用空白培养基作对照,按式(1)计算相对生长率。

$$R = \frac{c-d}{a-b} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

R ——相对生长率,%;

a ——培养 24 h 后菌株在 pH 6.3 培养基中的 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 值;

b ——培养 0 h 后菌株在 pH 6.3 培养基中的 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 值;

c ——培养 24 h 后菌株在不同 pH 培养基中的 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 值;

d ——培养 0 h 后菌株在不同 pH 培养基中的 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 值。

(3) 产酸活力:将菌株以 2% 的接种量接至 MRS 液体培养基中,37 °C 培养,向 10 mL 菌液中滴加酚酞指示剂,以 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液进行滴定,直至出现微红色,静止 30 s,观察有无褪色现象,记录消耗 NaOH 的体积^[10]。产酸活力以每 1×10^7 个细胞,发酵 1 mL MRS 肉汤培养基得到 1 μg 乳酸为 1 个活力单位(U)。

1.2.6 耐酸性菌株的体外益生特性测定

(1) 模拟胃液耐受能力:取待测菌液,4 °C、7 000 r/min 离心 8 min,用 $1 \times \text{PBS}$ 缓冲液洗涤后悬浮菌体。取供试

菌悬液各 1 mL 分别接种于 9 mL pH 值分别为 4.0、3.0、2.0 的人工胃液中,37 ℃ 恒温培养 3 h,测其活菌数,按式(2) 计算存活率^[11]。

$$S = \frac{N_1}{N_0} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

S——菌株存活率,%;

N_0 ——菌株初始的活菌数,CFU/mL;

N_1 ——菌株处理后的活菌数,CFU/mL。

(2) 模拟肠液耐受能力:取 1 mL 经人工胃液消化 3 h 的菌液,接种至 9 mL pH 值为 8.0 的人工模拟肠液中,恒温水浴培养 8 h,测其活菌数,按式(2)计算存活率。

(3) 模拟胆盐耐受能力:取 2% 培养至对数生长中后期的菌液,接种至含 0.3% 胆盐的 MRS-THIO 培养基中,120 r/min,37 ℃ 摇床培养 0、2、4、6、8 h,设置未添加胆盐的 MRS-THIO 培养基作为空白对照组,测定 $OD_{600\text{ nm}}$ 值,按式(3)计算菌株存活率^[12]。

$$S = \frac{A_1}{A_0} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

S——菌株存活率,%;

A_0 ——不含胆盐培养基的 $OD_{600\text{ nm}}$ 值;

A_1 ——含胆盐培养基的 $OD_{600\text{ nm}}$ 值。

(4) 疏水能力:取待测菌液,4 ℃、7 000 r/min 离心 8 min,收集菌泥,用 1×PBS 缓冲液洗涤,使菌体 $OD_{600\text{ nm}}$ 值为 0.25 ± 0.05 ,向试管中加入 2 mL 菌悬液、二甲苯并充分振荡,涡旋振荡 2 min,于通风橱静置待其分层,分别测水相 $OD_{600\text{ nm}}$ 值,以不添加二甲苯的菌液作为空白对照组,按式(4)计算菌株的疏水率^[13]。

$$H = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\%, \quad (4)$$

式中:

H——疏水率,%;

A_0 ——二甲苯混合前菌液的 $OD_{600\text{ nm}}$ 值;

A——二甲苯混合后菌液的 $OD_{600\text{ nm}}$ 值。

(5) 自凝集能力:取待测菌液,4 ℃、4 000 r/min 离心 8 min,收集菌泥,用 1×PBS 缓冲液洗涤,使其菌体 $OD_{600\text{ nm}}$ 值为 0.25 ± 0.05 ,37 ℃ 静止后吸取上清液,设置 1×PBS 缓冲液作为空白对照组,测定时间分别为 0、2、4、6、8、12、16、24 h,测定 $OD_{600\text{ nm}}$ 值,按式(5)计算菌株的自凝集率^[13]。

$$A = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100\%, \quad (5)$$

式中:

A——自凝集率,%;

A_0 ——0 h 的 $OD_{600\text{ nm}}$ 值;

A_t —— t 时刻的 $OD_{600\text{ nm}}$ 值。

1.2.7 数据处理 所有试验重复 3 次,以平均值±标准差表示,利用 Origin 8.5 软件作图,运用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 理化指标检测

由表 1 可知,14 份样品的含盐量为 0.87%~9.48%,符合行业标准。陈功^[14]研究表明,按盐度不同可将泡菜分为超低盐泡菜(食盐量≤3%)、低盐泡菜(食盐量≤6%)和中盐泡菜(食盐量≤10%)。因此,A、D 是中盐泡菜,B 是低盐泡菜,其他均为超低盐泡菜,是因为不同地区泡菜的原材料和制作方式不同。泡菜的 pH 值为 2.80~5.31,其盐度和 pH 值无相关性。

2.2 耐酸性菌株的筛选

由表 2 可知,从含盐量≤6% 的 12 份泡菜样品中共分离得到 126 株产生溶钙圈的菌株,将其接种至 pH 4.0 的培养基中进行初次耐酸性筛选,结果见表 3,共有 35 株菌株生长,其中 18 株生长情况良好;将 18 株优良菌株于 pH 3.0 的培养基中进行第 2 次耐酸性筛选,仍有 13 株菌株生长性能良好;于 pH 2.0 的培养基中进行第 3 次筛选,只有 5 株菌株生长情况良好。因此,选择 J2、N6、F8、M1、M12 5 株菌株进行后续试验。

2.3 耐酸性乳酸菌的鉴定

2.3.1 形态学鉴定及生理生化鉴定 由图 1 可知,菌株 J2 为圆形的白色不透明菌落,菌落光滑湿润、边缘整齐;菌株 N6 为乳白色的光滑菌落,中央凸起、边缘整齐;菌株 F8 为圆形的乳白色菌落,表面光滑、中央凸起;菌株 M1 为圆形的乳白色黏稠菌落,表面湿润;菌株 M12 为白色不透明菌落,表面呈黏稠光滑的圆形。5 株菌株的菌落形态相似,具有乳酸菌的典型特征。

表 1 泡菜样品的理化指标

Table 1 Physical and chemical indexes of pickles

样品编号	种类	产地	含盐量/%	pH
A	萝卜泡菜	四川省	9.48 ± 0.04	3.46
B	洋姜泡菜	四川省	5.20 ± 0.05	3.97
C	白菜泡菜	四川省	1.52 ± 0.05	3.63
D	红椒泡菜	四川省	6.42 ± 0.09	2.80
E	白菜泡菜	四川省	1.97 ± 0.02	4.35
F	东北酸菜	吉林省	2.48 ± 0.05	3.34
G	东北酸菜	黑龙江省	1.55 ± 0.05	3.51
H	东北酸菜	吉林省	0.87 ± 0.03	3.47
I	白菜泡菜	河北省	2.93 ± 0.05	5.26
J	白菜泡菜	河北省	2.14 ± 0.08	4.52
K	萝卜泡菜	河北省	1.11 ± 0.07	5.31
L	白菜泡菜	吉林省	2.03 ± 0.07	4.77
M	白菜泡菜	吉林省	2.34 ± 0.08	4.67
N	白菜泡菜	吉林省	1.78 ± 0.06	4.34

由图 2 可知,菌株 J2 菌体细胞呈卵圆形或球形,成对、单个或链状排列;菌株 N6 菌体细胞呈杆状排列;菌株 F8 为短杆菌,呈单个或两个生长,无芽孢产生;菌株 M1 为短杆菌,短链或呈链排列;菌株 M12 为不规则短棒状细

胞,呈短链状或成对存在。5 株菌株的革兰氏染色均为蓝紫色,属于革兰氏阳性菌。经过氧化氢酶接触后,5 株菌株均不产生气泡,为过氧化氢酶阴性菌。

2.3.2 16S rDNA 序列同源性对比 由图 3 可知,扩增产

表 2 样品中菌株的分离结果
Table 2 Separation results of strains in samples

样品编号	种类	分离菌数	命名	样品编号	种类	分离菌数	命名
B	洋姜泡菜	1	B1	I	白菜泡菜	13	I1~I13
C	白菜泡菜	25	C1~C25	J	白菜泡菜	3	J1~J3
E	白菜泡菜	9	E1~E9	K	萝卜泡菜	0	—
F	东北酸菜	20	F1~F20	L	白菜泡菜	7	L1~L7
G	东北酸菜	12	G1~G12	M	白菜泡菜	12	M1~M12
H	东北酸菜	16	H1~H16	N	白菜泡菜	8	N1~N8

表 3 耐酸性菌株的筛选†
Table 3 Screening of acid-tolerant strains

菌株编号	pH 4	pH 3	pH 2	菌株编号	pH 4	pH 3	pH 2
C2	+	+	—	I6	+++	+++	++
C7	+++	++	—	I11	++	+	—
C11	+++	+++	+	J2	+++	+++	+++
C13	++	+	—	L1	+++	+	—
E3	+	—	—	L6	+	—	—
E5	+++	+++	+	M1	+++	+++	+++
F1	+++	+++	+	M4	+	—	—
F4	+	+	—	M5	+++	++	+
F8	+++	+++	+++	M6	+++	+++	+
F10	++	—	—	M9	+++	++	—
F15	+	—	—	M11	++	+	—
G7	+++	++	+	M12	+++	+++	+++
G8	+++	+++	+	N1	+	—	—
G9	+	—	—	N3	++	+	+
H3	++	+	—	N4	+	—	—
H14	+++	+++	++	N6	+++	+++	+++
H16	+	—	—	N7	++	+	—
I5	+	+	—				

† “—”表示菌株不能生长;“+”表示菌株能生长;“+”越多表示菌株生长越好。

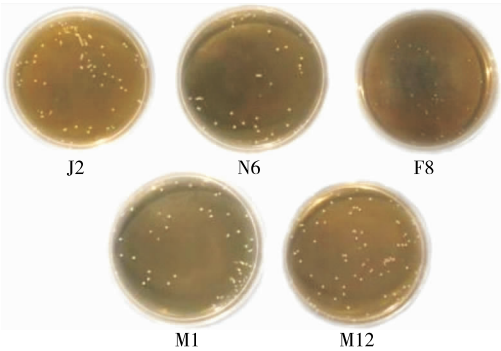


图 1 菌落形态对比图

Figure 1 Comparison of colony morphology

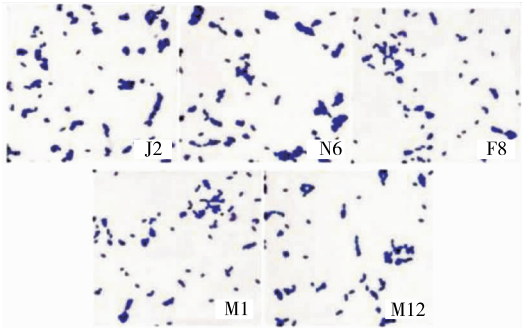


图 2 显微镜下的细胞形态对比图

Figure 2 Comparison of cell morphology under microscope (10×100)

物条带序列大小为 1 483~1 507 bp, 条带清晰可见且无杂带。由图 4 可知, 菌株 J2 和肠膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*) 的同源性为 100%, 菌株 N6 和副干酪乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei*) 的同源性为 100%, 菌株 M1、M12 和食蜜魏斯氏菌 (*Weissella cibaria*) 的同源性为 100%, 菌株 F8 和类植物乳杆菌 (*Lactobacillus paraplantarum*) 的同源性为 100%。

王璐等^[15]从果蔬发酵样品中筛选出 2 株耐酸性乳酸菌, 分别为植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) S3-10 和干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) R10; 李欣等^[16]从黑龙江大庆地区的自然发酵酸菜中筛选出 6 株耐酸性乳酸菌, 包括 3 株弯曲乳杆菌 (*Lactobacillus curvatus*), 2 株清酒乳杆菌 (*Lactobacillus sake*), 1 株植物乳杆菌。这与试验结果存在差异, 可能由于不同地区的泡菜有不同的微生物菌群和生物学特性, 泡菜的加工工艺及贮藏环境也会导致乳酸菌种类和数量不同, 但试验分离出了泡菜中较为少见的 *W. cibaria*。

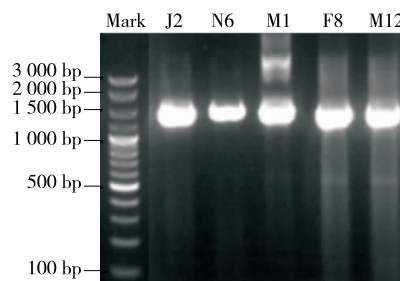


图 3 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物

Figure 3 Detection of PCR product by agarose gel electrophoresis

2.4 耐酸性乳酸菌的生物学性质

2.4.1 生长曲线 由图 5 可知, *L. mesenteroides* J2、*L. paracasei* N6、*L. paraplantarum* F8、*W. cibaria* M1 和 *W. cibaria* M12 均在 6 h 后进入对数期, 16 h 后进入稳定期。杨英歌等^[17]研究的乳酸菌 4 h 后进入对数期, 14 h 后进入稳定期, 而夏勒合特·巴克拜等^[18]研究的植物

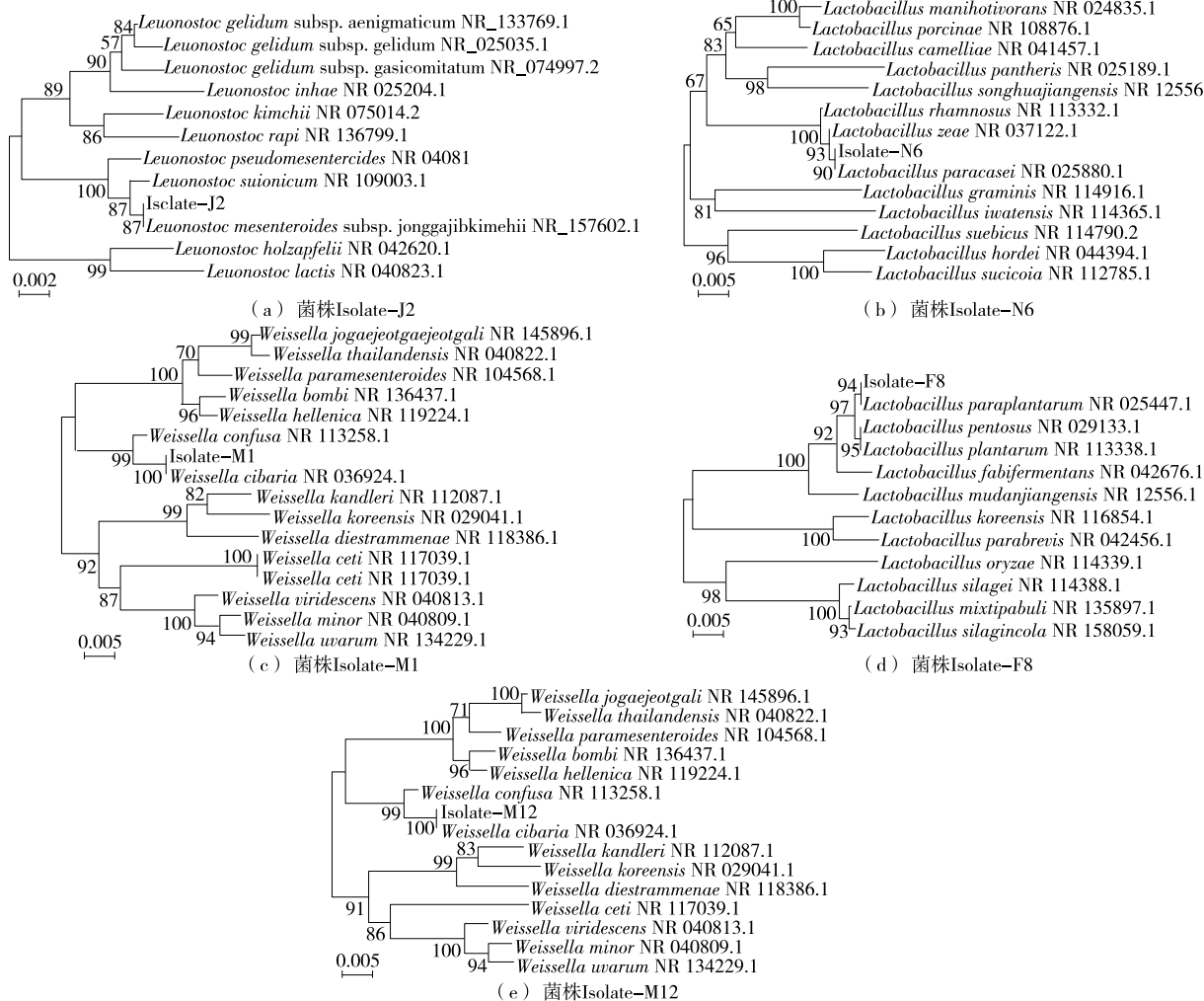


图 4 5 株菌株的 16S rDNA 序列系统进化树

Figure 4 Phylogenetic tree of 16S rDNA sequences of five strains

乳杆菌进入对数期和稳定期的时间分别为 2, 18 h。说明不同种类的乳酸菌进入对数期和稳定期的时间不同。6 h 时, *L. paracasei* N6 的生长速度最快, $OD_{600\text{ nm}}$ 值为 0.81; 16 h 时, *W. cibaria* M12 的吸光度最高为 2.41; 24 h 时, *W. cibaria* M12 的吸光度最高为 2.42。5 株菌株生长曲线排序为 *W. cibaria* M12 > *W. cibaria* M1 > *L. paracasei* N6 > *L. paraplantarum* F8 > *L. mesenteroides* J2。

2.4.2 酸耐受能力和产酸能力 由图 6 可知, *L. paracasei* N6 在 pH 为 4.0, 3.0, 2.0 时的相对生长率分别为 84.23%, 58.95%, 20.72%, 均显著高于其他菌株 ($P < 0.05$), *W. cibaria* M1 和 *W. cibaria* M12 的次之。5 株菌株的相对生长率排序为 *L. paracasei* N6 > *W. cibaria* M1 > *W. cibaria* M12 > *L. paraplantarum* F8 > *L. mesenteroides* J2。菌株之间的酸耐受性差异明显, 且同一菌种的不同菌株之间的酸耐受性也存在差异。

由图 6 可知, *L. paracasei* N6 的产酸活力为 (5.05 ± 0.09) U, 高于其他菌株; *W. cibaria* M12 的产酸活力为 (5.03 ± 0.01) U, 显著高于 *W. cibaria* M1、*L. paraplantarum* F8 和 *L. mesenteroides* J2 的 ($P < 0.05$)。罗强等^[19-20]研究表明, 菌株耐酸产酸能力的相关性有待进一

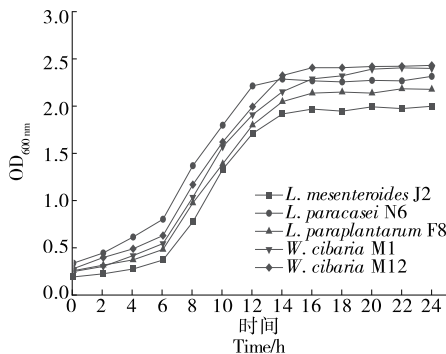
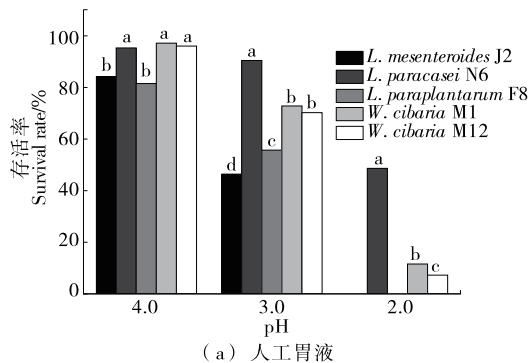


图 5 菌株的生长曲线

Figure 5 Growth curves of the strains



字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

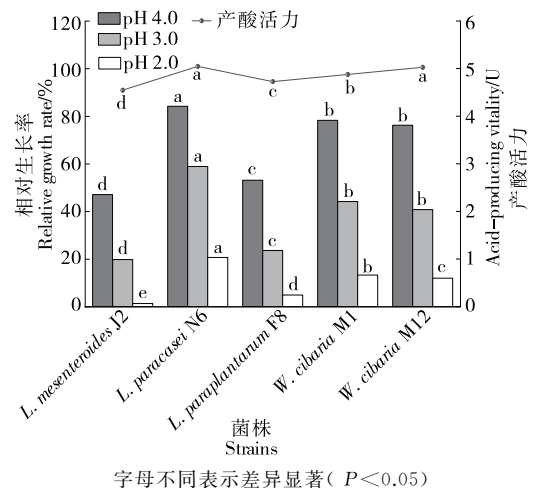
图 7 菌株在人工胃液和人工肠液中的存活率

Figure 7 The survival rate of the strains in artificial gastric fluid for 3 h and artificial intestinal fluid for 8 h with different pH values

步研究。样品发酵过程中产酸量与乳酸菌发酵过程中产乳酸的量呈正相关, 对杂菌具有较好的抑制作用。

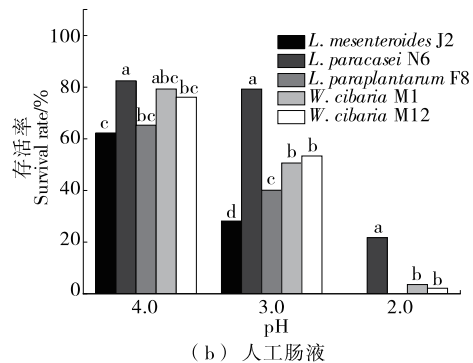
2.5 耐酸性乳酸菌的体外益生特性

2.5.1 体外模拟胃液、肠液耐受能力 由图 7(a)可知, 当 pH 为 4.0 时, 5 株菌存活率均在 81% 以上; 当 pH 为 3.0 时, *L. paracasei* N6 的存活率为 90.49%, 显著高于其他菌株 ($P < 0.05$), *W. cibaria* M1 和 *W. cibaria* M12 的存活率分别为 72.80%, 70.25%, 均显著高于 *L. paraplantarum* F8 和 *L. mesenteroides* J2 ($P < 0.05$); 当 pH 为 2.0 时, *L. paracasei* N6 仍能达到 48.65% 的存活率, 且存活率显著高于其他菌株 ($P < 0.05$), *L. paraplantarum* F8 和 *L. mesenteroides* J2 均不耐受 pH 2.0 的强酸环境。熊强等^[21]从自制泡菜中分离出的 6 株植物乳杆菌中, 其中有 4 株在人工胃液中的存活率在 80% 以上。赵芳等^[22]



字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

Figure 6 The relative growth rate of the strains in the medium with different pH values and acid-producing activity of the strains



字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 7 菌株在人工胃液和人工肠液中的存活率

Figure 7 The survival rate of the strains in artificial gastric fluid for 3 h and artificial intestinal fluid for 8 h with different pH values

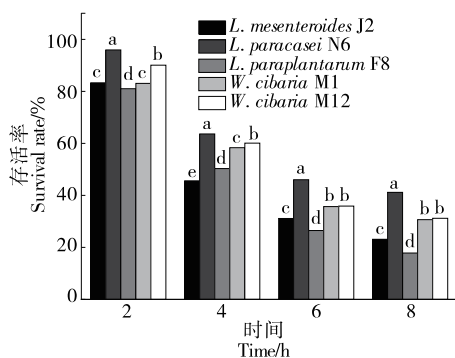
研究显示,菌株在 pH 2.0 的人工胃液中处理 2 h 后几乎都无法存活。

由图 7(b)可知,经 pH 4.0 胃液和 pH 8.0 肠液消化后菌株的存活状况良好,存活率 $>62.44\%$;经 pH 3.0 胃液和 pH 8.0 肠液消化后,*L. paracasei* N6 存活率为 79.26%,显著高于其他菌株($P<0.05$),*W. cibaria* M1 和 *W. cibaria* M12 的存活率分别为 50.65%,53.37%,差距相对较小,说明同种乳酸菌的益生特性差异不大;经 pH 2.0 胃液和 pH 8.0 肠液消化后,*L. paraplantarum* F8 和 *L. mesenteroides* J2 的存活率几乎为零。综上,*L. paracasei* N6、*W. cibaria* M1 和 *W. cibaria* M12 对人工胃液、肠液环境均具有较强的耐受性。

2.5.2 体外模拟胆盐耐受能力 由图 8 可知,当培养时间为 2 h 时,菌株存活率均在 80%以上,随着培养时间的增加,菌株存活率呈下降趋势;当培养时间为 4 h 时,*L. paracasei* N6 存活率为 63.64%,显著高于其他菌株($P<0.05$),与李洋等^[12,23]的结果一致;当培养时间为 8 h 时,*L. paracasei* N6 的存活能力最强,存活率为 41.16%,显著高于其他菌株($P<0.05$),*W. cibaria* M12 和 *W. cibaria* M1 的次之。

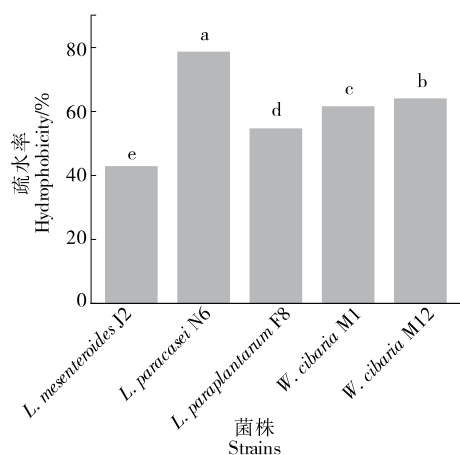
2.5.3 疏水能力 由图 9 可知, *L. paracasei* N6、*W. cibaria* M12、*W. cibaria* M1 和 *L. paraplantarum* F8 均属于高度疏水菌株,疏水率均在 60%以上,其中 *L. paracasei* N6 的疏水率达 78.72%,显著高于其他菌株($P<0.05$);*L. mesenteroides* J2 为中度疏水菌株,疏水率为 42.81%。5 株菌株的表面疏水能力为 *L. paracasei* N6 $>$ *W. cibaria* M12 $>$ *W. cibaria* M1 $>$ *L. paraplantarum* F8 $>$ *L. mesenteroides* J2。

2.5.4 自凝集能力 由图 10 可知,5 株菌株的自聚集率均呈上升趋势,与 Abushelaibi 等^[24-25]的研究结果相似。培养 24 h 时,*L. paracasei* N6 的自凝集能力最高,达 76.51%,与 Mih 等^[26]的结果一致;*W. cibaria* M12、*W. cibaria* M1、*L. paraplantarum* F8 和 *L. mesenteroides* J2 的自凝集率分别为 65.00%,62.54%,49.95%,36.31%。



字母不同表示差异显著($P<0.05$)

图 8 菌株在 0.3%胆盐环境中培养不同时间的存活率
Figure 8 The survival rate of the strains cultured in 0.3% bile salt environment for different time



字母不同差异显著($P<0.05$)

图 9 乳酸菌菌株细胞的表面疏水率

Figure 9 Bacterial cell surface hydrophobic rate

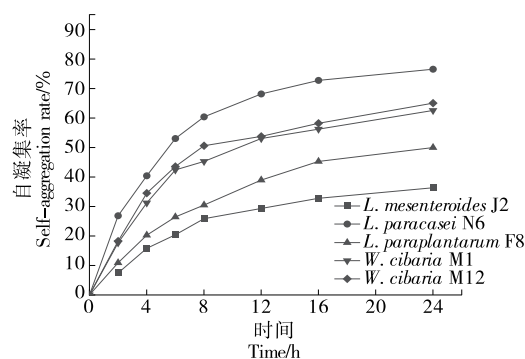


图 10 乳酸菌菌株细胞的表面自凝集率

Figure 10 Self-agglutinating rate of bacterial cell surface

3 结论

从 14 份泡菜样品中筛选出含盐量 $\leq 6\%$ 的 12 份样品,共分离纯化出 126 株产生溶钙圈的菌株,并筛选出 5 株耐酸性菌株,经 16S rDNA 分子鉴定为肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)J2、副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)N6、类植物乳杆菌(*Lactobacillus paraplantarum*)F8、食窦魏斯氏菌(*Weissella cibaria*)M1 和食窦魏斯氏菌(*Weissella cibaria*)M12。其中,*L. paracasei* N6、*W. cibaria* M1 和 *W. cibaria* M12 是具有益生特性的耐酸性乳酸菌菌株,可用于初步筛选,但还需进一步的稳定性试验和遗传稳定性研究,以鉴定适合人类或动物使用的潜在益生菌。

参考文献

- [1] XIONG Tao, LI Jun-bo, LIANG Fan, et al. Effects of salt concentration on Chinese sauerkraut fermentation[J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 69: 169-174.
- [2] 窦芳娇, 苏昊, 邓冬莲, 等. 低温长杆白菜泡菜中乳酸菌的分离

- 鉴定与应用[J]. 食品工业科技, 2021, 42(5): 113-118, 125.
- DOU Fang-jiao, SU Hao, DENG Dong-lian, et al. Isolation, identification and application of lactic acid bacteria in low temperature long-stemmed cabbage pickle[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(5): 113-118, 125.
- [3] 李丽, 杜文雯, 张继国, 等. 中国 6 省餐馆减盐环境及含钠调味品使用情况调查[J]. 实用预防医学, 2020, 27(6): 663-666.
- LI Li, DU Wen-wen, ZHANG Ji-guo, et al. Salt reduction environment and use of sodium-containing condiments in restaurants in 6 provinces in China [J]. Practical Preventive Medicine, 2020, 27: 663-666.
- [4] 刘文文, 李洋, 李键, 等. 高抗氧化乳酸菌发酵剂的筛选及其最佳发酵条件[J]. 中国乳品工业, 2019, 47(2): 4-9.
- LIU Wen-wen, LI Yang, LI Jian, et al. Screening of high antioxidant lactic acid bacteria fermented milk and study on optimum fermentation conditions[J]. China Dairy Industry, 2019, 47(2): 4-9.
- [5] TAREB R, BERNARDEAU M, GUEGUEN M, et al. In vitro characterization of aggregation and adhesion properties of viable and heat-killed forms of two probiotic *Lactobacillus* strains and interaction with foodborne zoonotic bacteria, especially *Campylobacter jejuni*[J]. Journal of Medical Microbiology, 2013, 62(Pt4): 637-649.
- [6] 赵山山, 杨园园, 周玉岩, 等. 贵州泡菜中乳酸菌的分离鉴定及其在泡菜发酵中的应用[J]. 中国酿造, 2020, 39(12): 113-119.
- ZHAO Shan-shan, YANG Yuan-yuan, ZHOU Yu-yan, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Guizhou pickles and its application in pickle fermentation[J]. China Brewing, 2020, 39(12): 113-119.
- [7] 冯金晓, 李明珠, 李翠萍, 等. 传统泡菜中两株耐酸性乳酸菌的分离与鉴定[J]. 食品与机械, 2021, 37(5): 22-26.
- FENG Jin-xiao, LI Ming-zhu, LI Cui-ping, et al. Isolation and identification of two acid-resistant lactic acid bacteria in traditional pickles[J]. Food & Machinery, 2021, 37(5): 22-26.
- [8] KONG Yi-di, LI Min, CHU Guo-sheng, et al. The positive effects of single or conjoint administration of lactic acid bacteria on *Channa argus*: Digestive enzyme activity, antioxidant capacity, intestinal microbiota and morphology[J]. Aquaculture, 2021, 531: 735852.
- [9] 彭易涛. 新制泡菜水多轮发酵过程中乳酸菌及泡萝卜感官品质变化规律研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2015.
- PENG Yi-tao. New system several rounds of lactic acid bacteria fermentation process and bubble water radish pickles quality change law research[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2015.
- [10] COLLADO M C, MERILUOTO J, SALMINEN S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains[J]. European Food Research and Technology, 2008, 226(5): 1 065-1 073.
- [11] 王思琦, 张昭寰, 穆丽丽, 等. 人工模拟胃肠道模型在食源性致病菌耐受及致病机理中的应用[J]. 生物工程学报, 2018, 34(6): 839-851.
- WANG Si-qi, ZHANG Zhao-huan, MU Li-li, et al. Applications of simulated gastro-intestinal model in foodborne pathogens: Tolerance and pathogenesis[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2018, 34(6): 839-851.
- [12] 李洋, 赵欣, 张玉, 等. 牦牛酸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.
- LI Yang, ZHAO Xin, ZHANG Yu, et al. Separation and screening of lactic acid bacteria from the traditional yak yogurt resistant against of acid and bile salts[J]. Food & Machinery, 2018, 34(7): 23-28, 33.
- [13] 占萌, 李柏良, 王成凤, 等. 15 株乳酸菌的表面性质及其黏附能力[J]. 食品工业科技, 2018, 39(24): 122-127.
- ZHAN Meng, LI Bo-liang, WANG Cheng-feng, et al. Surface properties and adhesion ability of 15 lactic acid bacteria [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(24): 122-127.
- [14] 陈功. 中国泡菜的品质评定与标准探讨[J]. 食品工业科技, 2009(2): 335-338.
- CHEN Gong. Quality evaluation and standard discussion of Chinese pickle[J]. Science and Technology of Food Industry, 2009(2): 335-338.
- [15] 王璐, 王伟伟, 王艳霞, 等. 果蔬发酵乳酸菌的筛选、鉴定及发酵性能分析[J]. 食品科学, 2020, 41(10): 166-171.
- WANG Lu, WANG Wei-wei, WANG Yan-xia, et al. Screening, identification and fermentation performance analysis of lactic acid bacteria in fruit and vegetable fermentation[J]. Food Science, 2020, 41(10): 166-171.
- [16] 李欣, 武俊瑞, 田甜, 等. 大庆自然发酵酸菜中乳酸菌的分离鉴定及耐酸菌株初步筛选[J]. 食品科学, 2014, 35(1): 150-154.
- LI Xin, WU Jun-rui, TIAN Tian, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Daqing natural fermented pickles and preliminary screening of acid-resistant strains[J]. Food Science, 2014, 35(1): 150-154.
- [17] 杨英歌, 黄继翔, 李荣. 耐酸乳酸菌的筛选及生长特性研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(10): 248-251, 257.
- YANG Ying-ge, HUANG Ji-xiang, LI Rong. Study on screening and growth characteristics of lactic acid bacteria with acid resistant ability[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(10): 248-251, 257.
- [18] 夏勒合特·巴克尔拜, 刘晶晶, 贺红军, 等. 新疆传统泡菜中乳酸菌的分离鉴定及其益生性能评价[J]. 保鲜与加工, 2021, 21(11): 87-93.
- SHALLHOLT Bakerbai, LIU Jing-jing, HE Hong-jun, et al. Isolation, identification and probiotics evaluation of lactic acid bacteria from Xinjiang traditional pickles[J]. Preservation and processing, 2021, 21(11): 87-93.
- [19] 罗强, 李幸洋, 陈炼红, 等. 传统发酵泡菜中乳酸菌种群组成及优良菌株产酸耐酸特性分析[J]. 食品科学, 2021, 42(2): 158-163.
- LUO Qiang, LI Xing-yang, CHEN Lian-hong, et al. Population composition of lactic acid bacteria in traditional fermented pickles and characteristics of acid production and acid resistance of superior strains[J]. Food Science, 2021, 42(2): 158-163.

(下转第 37 页)