

自然发酵酸菜汁中乳杆菌的分离鉴定

武俊瑞, 李欣, 张苗, 李晓忱, 杨臣辰, 岳喜庆*

(沈阳农业大学食品学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘要: 通过选择性培养和形态学观察, 从分别采自辽宁省阜新、葫芦岛、兴城、营口、锦州的 5 份传统发酵酸菜汁中, 分离纯化和筛选出 4 株具有耐酸特性的乳杆菌疑似菌株(HLD1-3、YK1-2、JZ6-3、XC4-4), 并对其运动性、过氧化氢酶、石蕊牛乳、明胶液化、不同温度生长、不同 NaCl 质量浓度生长、糖发酵实验等传统生理生化鉴定和 16S rDNA 序列分析, 进一步鉴定其属种。二者结果均表明: 4 株耐酸乳酸菌均属于乳杆菌属, 其中, HLD1-3 和 YK1-2 属于乳杆菌属的清酒乳杆菌种, 而 JZ6-3 和 XC4-4 属于乳杆菌属的植物乳杆菌种。由此可以推断, 东北自然发酵酸菜可作为潜在益生乳酸菌分离筛选的资源库。

关键词: 酸菜; 耐酸; 乳杆菌; 分离鉴定

Isolation and Identification of *Lactobacillus* Strains from Naturally Fermented Pickle Juice

WU Jun-ruì, LI Xin, ZHANG Miao, LI Xiao-chen, YANG Chen-chen, YUE Xi-qing*

(College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: Four acid-tolerant suspected *Lactobacillus* strains (HLD1-3, YK1-2, JZ6-3 and XC4-4) were isolated from five traditional pickle juices respectively collected from five regions of Liaoning province by selective cultivation and morphological observation. The four strains were identified based on physicochemical properties such as motility, catalase activity, litmus milk test, gelatin liquefaction test, growth under varying conditions of temperature NaCl concentration and carbohydrate fermentation tests and 16 S rDNA sequence analysis. The results indicated that all the strains belonged to the *Lactobacillus* genus. HLD1-3 and YK1-2 strains were identified as *Lactobacillus sakei*, while JZ6-3 and XC4-4 were identified as *Lactobacillus plantarum*. From these results, it can be speculated that naturally fermented pickle from Northeast China is a potential source of probiotic lactic acid bacteria.

Key words: pickle; acid tolerance; *Lactobacillus*; isolation

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)15-0191-04

酸菜是将新鲜蔬菜经乳酸菌发酵等一系列的加工方法赋予其一定酸味口感和香气的发酵制品, 有着悠久的历史 and 食用历史。自然发酵酸菜以酸鲜纯正、脆嫩芳香、清爽可口、解腻开胃、增进食欲等特点和功效深受人们的喜好, 在我国, 东北传统发酵酸菜闻名遐迩^[1-2]。其中蕴藏着丰富的乳酸菌资源, 近年来受到了食品行业的广泛关注^[1-4]。

本实验拟通过选择性培养和形态学观察, 从采自辽宁省阜新、葫芦岛、兴城、营口、锦州等地的 5 份传统发酵酸菜汁中, 分离纯化和筛选出 4 株具有耐酸特性的乳杆菌疑似菌株, 并对其进行生理生化鉴定和 16S rDNA 序列分析, 进一步鉴定其属种, 为进一步进

行深入研究和开发利用提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

采自阜新、葫芦岛、兴城、营口和锦州农家自制传统发酵酸菜汁样品各 1 份, 共 5 份。

培养基: MRS 培养基、PY 培养基、PYG 培养基、明胶基础培养基。

细菌基因组 DNA 小量制备试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、Taq DNA 聚合酶、DNA Marker 上海桑尼生物科技有限公司; 革兰氏染色液、过氧化氢、葡萄糖、琼脂、石蕊、明胶等。

收稿日期: 2011-07-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(31000805); 国家“863”计划项目(2011AA100902); 辽宁省教育厅科学技术研究项目(L2012249)

作者简介: 武俊瑞(1977—), 男, 讲师, 博士, 研究方向为动物性食品加工。E-mail: junruiwu@126.com

*通信作者: 岳喜庆(1966—), 男, 教授, 博士, 研究方向为动物性食品加工。E-mail: yxqsyau@126.com

1.2 仪器与设备

2720 型 Thermal cycler PCR 仪、3730-XL 型测序仪 美国 ABI 公司; 5804R 型离心机 德国 Eppendorf 公司; Tanon 2500 凝胶成像系统 中国天能公司; ZMB-300E 显微镜 上海宙山精密光学仪器有限公司; TGL-16C 离心机 上海安亭科学仪器厂; 电热手提式高压杀菌锅 上海医用核子仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 采样

在辽宁省阜新、葫芦岛、兴城、营口、锦州等地的农家, 采集采用传统方法发酵的酸菜汁 250mL, 同时测定样品 pH 值和温度, 并记录发酵过程及时间等信息, 置于冰盒中运回实验室, 于 -60°C 超低温冰箱中贮存备用。

1.3.2 样品的分离纯化

采用倾注培养法, 对样品中的乳酸菌进行分离纯化。吸取 1mL 酸菜汁样品, 接种于 20mL 添加了 CaCO_3 的灭菌 MRS 固体培养基中, 灭菌后 MRS 固体培养基在接种前要提前降温至 55°C 并保持恒定, 待琼脂冷却凝固后, 放入厌氧发生器中, 于 30°C 培养 24~48h。挑取有 Ca 圈并且直径在 1~2mm 的单菌落, 在灭菌后 MRS 固体培养基上划线分离, 于 30°C 培养 24~48h, 如此反复划线分离 2~3 次, 直到确定为单菌落后编号, 分别于 10 倍放大镜下进行菌落形态学观察, 再挑取单个菌落, 进行革兰氏染色, 于 100 倍光学显微镜下进行菌体形态学观察, 并记录。

1.3.3 耐酸菌株的初步筛选^[5-6]

分别将分离纯化的 12 株待测菌株接种于 pH 值为 3.0 的 MRS 液体培养基中, 于 37°C 的恒温培养箱中培养 24~48h, 观察菌株生长情况, 能够生长的初步判定为耐酸菌株。

1.3.4 生理生化鉴定^[7-9]

1.3.4.1 过氧化氢酶实验

用接种环挑取单个菌落, 涂抹于已滴有 15g/100mL H_2O_2 的干净载玻片上, 观察有无气泡产生, 如无气泡产生即为 H_2O_2 酶阴性反应。

1.3.4.2 葡萄糖产气实验

将耐酸菌株分别用接种于装有倒置杜氏小管的 PYG 液体培养基中, 于 37°C 的恒温条件下培养 24~48h, 每天用肉眼观察杜氏小管中是否有气泡产生, 如果有气泡产生则判定菌株为异型发酵阳性反应。

1.3.4.3 运动性实验

将耐酸菌株分别用接种针穿刺接种于 MRS 半固体培养基中, 以不接种试管作空白对照, 于 37°C 培养 24~48h, 观察菌落分布状况, 如果只是沿穿刺线生长, 而不向外扩散, 则判定该菌株无运动性, 反之则判定为有运动性。

1.3.4.4 石蕊牛乳实验

向脱脂牛奶中加入 40mL 质量浓度为 25g/L 的石蕊, 混合均匀后分装试管, 115°C 高压蒸汽灭菌 7min。最后在 37°C 培养 24~48h, 观察石蕊牛乳的凝固反应。

1.3.4.5 明胶液化实验

将供试菌株接种于灭菌的明胶基础培养基中, 以不接种试管作空白对照, 于 37°C 培养 24~48h, 在低温条件下观察结果。当对照管凝固、接种管液化时, 为阳性。

1.3.4.6 不同温度生长实验

将供试菌株接种于 MRS 液体培养基中, 以不接种试管作空白对照, 分别置于 15°C 和 45°C 培养箱中培养 2~4d, 观察菌株生长情况。

1.3.4.7 不同 NaCl 质量浓度生长实验

将供试菌株接种于灭菌的且分别含有 4、65、15g/100mL 的 NaCl 的 MRS 液体培养基中, 以不接种试管作空白对照, 于 37°C 培养 24~48h, 观察菌株生长情况。

1.3.4.8 糖发酵实验

将供试菌株分别接种于含葡萄糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、果糖、甘露醇、半乳糖和海藻糖的 PY 基础培养基中, 分别以不接种的作空白对照, 于 37°C 培养 24~48h, 观察各试管颜色是否变黄。

1.3.4.9 利用 16S rDNA 序列分析进行鉴定^[10-13]

总 DNA 的提取及纯度的检测: 采用 CTAB 法提取供试菌株基因组 DNA。使用 ND-1000 型微量紫外分光光度计检测基因组 DNA 的浓度以及 $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ 比值, 再用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测。

16S rDNA 序列的 PCR 扩增: 16S rDNA 扩增引物: 采用细菌通用引物, 正向引物为 27f(对应于 *Escherichia coli* 8~27 位碱基): 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 反向引物为 1495r(对应于 *Escherichia coli* 1495~1515 位碱基): 5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'。

PCR 扩增反应体系(25 μL): 上下游引物各 1 μL (10pmol/ μL), 模板 DNA (100ng/ μL) 1 μL , 10 \times PCR Buffer 2.5 μL , dNTP MIX 2 μL , 超纯水 17.2 μL , rTaq 酶 0.3 μL 。

PCR 扩增反应程序为: 94°C 预变性 5min; 94°C 变性 1min, 58°C 退火 1min, 72°C 延伸 2min, 循环 30 次; 72°C 延伸 10min, 4°C 保温。

检测 16S rDNA 扩增片段: 扩增反应完毕后, 利用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

16S rDNA 序列测定和构建系统发育树: 供试菌株 PCR 扩增产物测序由上海桑尼生物技术有限公司完成。得到的序列运用 Clust X 软件校准 排齐后, 在 GenBank/EMBL/DBJ 数据库中进行 BLAST(<http://www.ncbi.nlm>).

nih.gov/blast/) 同源性比对分析。以 16S rDNA 的序列同源性大于 99% 为标准进行属种归类。然后再对待测菌株与模式菌株 16S rDNA 序列利用程序 MEGA 5.0 中的 Neighbor-Joining 法构建系统发育树, 进一步进行种属鉴定。

2 结果与分析

2.1 样品采集

表 1 样品采集情况

Table 1 Information about pickle samples collected from 5 different regions

编号	地点	温度/℃	pH	发酵时间/d
FX1	阜新	9.7	5.1	90
HLD1	葫芦岛	14.5	5.1	75
XC4	兴城	1.5	3.8	120
YK1	营口	7.7	4.5	70
JZ6	锦州	10.0	5.8	80

由表 1 可知, 采集的 5 份样品采集时的地点、温度、pH 值和发酵时间各不相同, 样品温度在 1.5~14.5℃ 之间, 差异较大。样品 pH 值在 3.8~5.8 之间, 属于偏酸性, 发酵时间在 70~120d 之间, 腌制的时间也不完全相同。

2.2 乳酸菌的分离及耐酸菌株初步筛选

通过选择性培养和菌落及菌体形态学观察, 从 5 份自然发酵的酸菜汁中共分离得到 12 株革兰氏染色阳性的乳酸菌疑似菌株。进一步通过观察 12 株乳酸菌疑似菌株在 pH 值为 3.0 的 MRS 培养基中的生长情况, 初步判定其是否耐酸, 结果如表 2 所示。

表 2 各菌株在 pH 值为 3.0 条件下的生长情况

Table 2 Growth of 12 suspected *Lactobacillus* strains at pH 3.0

菌株	生长情况	菌株	生长情况
FX1-1	—	XC4-2	—
FX1-2	—	XC4-3	—
FX1-3	—	XC4-4	+
HLD1-1	—	YK1-1	—
HLD1-3	+	YK1-2	+
HLD1-4	—	JZ6-3	+

注: +. 生长; -. 不能生长。

表 3 供试菌株部分生理生化实验结果

Table 3 Physiological and biochemical characteristics of 4 screened strains

菌株编号	过氧化氢酶实验	葡萄糖产气实验	石蕊牛乳实验	明胶液化实验	运动性实验	生长实验		NaCl 生长实验		
						15℃	45℃	4g/100mL	6.5g/100mL	15g/100mL
HLD1-3	—	—	+	—	—	—	+	+	—	—
XC4-4	—	—	+	—	—	—	+	+	+	—
YK1-2	—	—	+	—	—	—	+	+	—	—
JZ6-3	—	—	+	—	—	—	+	+	+	—

注: +. 阳性反应; -. 阴性反应; 石蕊牛乳实验中, + 表示产酸; 运动性实验中, - 表示不运动。

由表 2 可知, 在 pH 值为 3.0 的 MRS 培养基中, 只有菌株 HLD1-3、XC4-4、YK1-2 和 JZ6-3 能够生长, 其余菌株均不能生长, 因此可以初步推断出 HLD1-3、XC4-4、YK1-2 和 JZ6-3 等 4 株菌对酸性环境具有较强的耐受性。

2.3 生理生化实验结果

对 HLD1-3、XC4-4、YK1-2 和 JZ6-3 这 4 株具有耐酸特性菌株, 分别进行过氧化氢酶实验、石蕊牛乳实验、明胶液化实验、运动性实验、不同温度生长实验、不同 NaCl 质量质量浓度生长实验和糖发酵实验等生理生化鉴定, 结果如见 3、4。由表 3 可知, 4 株菌均表现为过氧化氢酶阴性, 可初步判断为乳酸菌, 且葡萄糖产气阴性, 可排除异型发酵乳酸菌, 其他特性分别为: 运动性实验阴性、明胶液化实验阴性、石蕊牛乳实验阳性、在 45℃ 生长良好、15℃ 条件下不能生长、在含 15g/100mL NaCl 的 MRS 培养基中无法生长、在 NaCl 质量浓度为 4g/100mL 时能正常生长, 其中 XC4-4 和 JZ6-3 两株菌株在 NaCl 质量浓度为 6.5g/100mL 时仍然能够生长。

表 4 糖发酵实验结果

Table 4 Results of carbohydrate fermentation tests for 4 screened strains

菌株编号	葡萄糖	麦芽糖	乳糖	蔗糖	果糖	甘露醇	半乳糖	海藻糖
HLD1-3	+	+	+	+	+	—	+	+
XC4-4	+	+	+	+	+	+	+	+
YK1-2	+	+	+	+	+	—	+	+
JZ6-3	+	+	+	+	+	+	+	+

注: +. 阳性反应; -. 阴性反应。

由表 4 可知, XC4-4 和 JZ6-3 均能利用选用的所有碳源; 而 HLD1-3 和 YK1-2 则均不能利用甘露醇。

综合以上生理生化实验结果, 根据《Bergey's Manual of Systematic Bacteriology》^[8]、《乳酸菌——生物学基础及试验方法》^[9], 4 株菌均为乳杆菌, 其中, XC4-4 和 JZ6-3 符合文献中描述植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)的特征, 而 HLD1-3 和 YK1-2 则符合文献中描述清酒乳杆菌(*Lactobacillus sakei*)。

2.4 利用 16S rDNA 序列分析进行鉴定

用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 16S rDNA 扩增产物, 溴乙锭染色观察发现在 1500bp 处有荧光条带。经过序列测定, 4 株乳杆菌 XC4-4、JZ6-3、HLD1-3 和 YK1-2 的 16S rDNA 基因序列, 长度分别为 1447、1443、1450bp 和 1444bp。

利用 BLAST 软件, 将菌株的 16S rDNA 序列与 GenBank/EMBL/DDBJ 数据库中已知的 16S rDNA 基因序列进行比对, 菌株 XC4-4 和 JZ6-3 的 16S rDNA 序列与植物乳杆菌的 16S rRNA/rDNA 序列相似性为 100%, 菌株 HLD1-3 和 YK1-2 与清酒乳杆菌的同源性为 100%。利用 Mega 5.0 软件构建系统发育树, 结果如图 1 所示。菌株 XC4-4 和 JZ6-3 与植物乳杆菌的系统位置最接近, 菌株 HLD1-3 和 YK1-2 则与清酒乳杆菌的系统位置最近, 与干酪乳杆菌、短乳杆菌、开菲尔乳杆菌等在同一分支, 同属于高温型乳酸菌, 与嗜酸乳杆菌和保加利亚乳杆菌形成的同源簇有明显差异。综上, 4 株耐酸菌株均属于乳杆菌属, 其中 JZ6-3 和 XC4-4 鉴定为乳杆菌属的植物乳杆菌种, HLD1-3 和 YK1-2 则为乳杆菌属的清酒乳杆菌种。

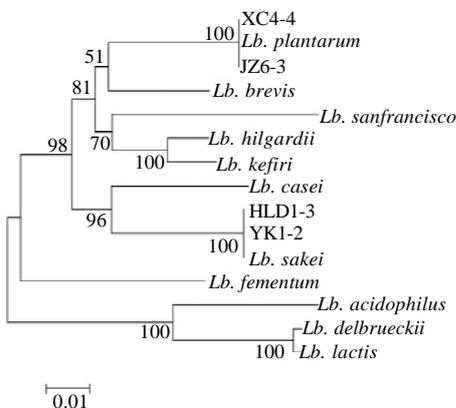


图 1 利用 16S rDNA 序列进行构建系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence

3 结 论

近年来, 一些针对酸菜中乳酸菌的研究也日趋成熟。张鲁冀^[1]、张杨^[13]等从自然发酵酸菜汁中分离出 10 株乳杆菌, 分别鉴定为短乳杆菌 4 株、植物乳杆菌 3 株、棒状乳杆菌 1 株、干酪乳杆菌 1 株和米酒乳杆菌 1 株。

部分学者^[2,13-16]则从自然发酵的酸菜汁中分离出 3 株高产酸菌株, 分别鉴定为肠膜明串珠菌、短乳杆菌和植物乳杆菌, 结果显示, 植物乳杆菌可能是发酵酸菜的优势菌种, 而从发酵酸菜汁中分离纯化清酒乳杆菌目前国内还未见报道。本研究从辽宁 5 个地区采集的 5 份传统发酵酸菜汁中分离纯化出 12 株乳酸菌疑似菌株, 筛选出 YK1-2、HLD1-3、XC4-4 和 JZ6-3 共 4 株耐酸菌株, 通过生理生化实验及 16S rDNA 序列分析, 确定 4 株耐酸菌株均属于乳杆菌属, 其中, HLD1-3 和 YK1-2 属于乳杆菌属的清酒乳杆菌, 而 JZ6-3 和 XC4-4 属于乳杆菌属的植物乳杆菌, 可作为潜在益生菌株作进一步系统研究。该研究将为东北自然发酵酸菜中益生乳酸菌的分离筛选和进一步开发利用提供参考。

参 考 文 献:

- [1] 张鲁冀, 孟祥晨. 自然发酵东北酸菜中乳杆菌的分离与鉴定[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(11): 125-131.
- [2] 陈晓平, 刘华英, 魏小川, 等. 自然发酵酸菜汁中乳酸菌的分离筛选与鉴定研究[J]. 食品科学, 2006, 27(2): 91-93.
- [3] 杨晓晖, 籍保平, 李博, 等. 泡菜中优良乳酸菌的分离鉴定及其发酵性能的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(5): 130-134.
- [4] 李红印, 崔焕成, 杜鹃, 等. 乳酸菌发酵在食品加工中的应用[J]. 郑州牧业工程高等专科学校学报, 2003, 3(1): 25-29.
- [5] 武俊瑞. 新疆部分地区酸马奶的化学与微生物组成分析及其中乳杆菌的分离鉴定[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2005.
- [6] WURINA, WANG Liping, MRNGHE Bilige, et al. Isolation and preliminary probiotic selection of lactobacilli from koumiss in Inner Mongolia [J]. J Basic Microbiol, 2009, 49(6): 1-9.
- [7] 凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及试验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [8] KANDLER O, WEISS N. Bergey's manual of systematic bacteriology: Vol 2[M]. Williams & Wilkins, Baltimore, 1986: 1209-1245.
- [9] 杨洁彬, 郭兴华, 张旻, 等. 乳酸菌: 生物学基础及应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1996.
- [10] 东秀珠, 沈德龙, 辛玉华. 16S rDNA 同源性所揭示的双歧杆菌与有关细菌的亲缘关系[J]. 生物多样性, 2000, 8(2): 146-152.
- [11] 乌日娜. 内蒙古传统酸马奶中乳杆菌的分离鉴定及 16S rDNA 序列同源性分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2005.
- [12] 周煜. 16S rRNA 序列分析法在医学微生物鉴定中的应用[J]. 生物技术通报, 1999, 10(4): 297-305.
- [13] 张杨, 孟祥晨. 自然发酵酸菜中乳杆菌的分离鉴定与多态性分析[J]. 中国乳品工业, 2009, 37(2): 19-23.
- [14] 陈静. 国内外泡菜生产的研究进展[J]. 江苏食品与发酵, 2007(1): 17-20.
- [15] 陈功, 夏有书, 张其圣, 等. 从中国泡菜看四川泡菜及泡菜坛[J]. 中国酿造, 2010(8): 5-7.
- [16] 钟之绚, 郭剑. 酸白菜发酵中乳酸菌群的分布[J]. 微生物学报, 1995, 31(1): 74-76.