

研究报告

鄂尔多斯地区自然发酵苦菜中优良特性乳酸菌的筛选

任沛东 李少英* 王宝丽 李甜甜

(内蒙古农业大学食品科学与工程学院 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要:【背景】鄂尔多斯地区传统自然发酵苦菜风味和作用独特,但目前尚无关于发酵苦菜中乳酸菌种类及其生物学特性研究的报道。【目的】获得适用于工业化生产特性优良的乳酸菌。

【方法】通过测定总酸度筛选高产酸菌株,并进行形态学鉴定、生理生化特性研究,以及16S rRNA基因片段分析。【结果】经鉴定5株高产酸的菌株均为植物乳杆菌,生长温度范围宽,并且具有耐酸、耐碱、耐盐、耐热的特性。【结论】试验菌株具有优良的生理特性和潜在的益生特性,可用于食品工业的生产。

关键词: 发酵苦菜, 乳酸菌, 高产酸, 鉴定, 生理生化特性

Screening of lactic acid bacteria with good characteristics in natural fermented sowthistle from Ordos

REN Pei-Dong LI Shao-Ying* WANG Bao-Li LI Tian-Tian

(College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China)

Abstract: [Background] The flavor and effect of traditional natural fermented sowthistle in Ordos are unique, but little is known about the species and biological study on lactic acid bacteria in fermented sowthistle. [Objective] In order to obtain lactic acid bacteria used in industrial production. [Methods] Through the determination of the total acidity, the high-yield acid strains were screened. The morphology, physiological and biochemical characteristics, and 16S rRNA genes were studied. [Results] All of these five strains are *Lactobacillus plantarum*, and the temperature range of growth is wide, and they had the characteristics of acid resistance, alkali resistance, salt tolerance and heat resistance. [Conclusion] The experimental strains have good physiological characteristics to be used in the food industry.

Keywords: Fermented sowthistle, Lactic acid bacteria, High-yield acid, Identification, Physiological and biochemical characteristics

苦菜是菊科苦苣菜属草本植物,在我国分布广泛,具有清热解毒、消炎抑菌、提高免疫力等食药功效^[1]。在内蒙古中西部及山西的许多地域,民

间流传着食用苦菜的习俗,而且在鄂尔多斯地区农牧民在夏季将苦菜通过微生物作用酸渍保藏,可一直食用到冬季。这种发酵苦菜除了苦菜本身的作

*Corresponding author: Tel: 86-471-4308034; E-mail: nmglshy@126.com

Received: January 31, 2018; Accepted: May 31, 2018; Published online (www.cnki.net): June 12, 2018

*通信作者: Tel: 86-471-4308034; E-mail: nmglshy@126.com

收稿日期: 2018-01-31; 接受日期: 2018-05-31; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-06-12

用, 细菌的作用如何、细菌与苦菜的关系如何? 在以苦菜为主料基质中的乳酸菌又有什么特殊性? 这些问题一直备受研究者关注。但目前国内尚未有针对自然发酵苦菜中优势菌的分离及特性研究的报道。有研究报道自然酸渍蔬菜中的优势菌为乳酸菌, 它具有抑制肠道病原菌、调节肠道菌群平衡等益生特性^[2-3]。针对乳酸菌酸渍菜而言, 乳酸菌的产酸量以及产酸条件直接影响酸渍产品的品质和生产, 所以高产酸乳酸菌的筛选以及特性研究对乳酸菌在酸渍蔬菜中的应用有重要意义。鉴于此, 本研究从鄂尔多斯市白泥井镇地区农户自然发酵腌制的苦菜汁中筛选出 5 株高产酸的乳酸菌, 并对其进行了鉴定和生理特性的研究, 这将为发酵蔬菜提供优良菌种资源, 并且为发酵蔬菜的工业化生产提供试验数据, 也为当地特色发酵食品有益作用的进一步研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

采集自内蒙古鄂尔多斯市达拉特旗白泥井镇地区 5 户农户家中的夏季腌制苦菜汤, 共 9 个样品。

1.1.2 标准菌株

植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) CICC 6238, 代号为 ZB, 来自中国工业微生物菌种保藏管理中心。

1.1.3 培养基、主要试剂及仪器

TPY、MRS、GYP 培养基及产酸菌株筛选培养基等均按照参考文献[4-6]的方法配制。所用试剂均为分析纯, 购于天津市风船化学试剂科技有限公司; 生化特性鉴定及糖发酵试验所用试剂均购于广东环凯微生物科技有限公司和杭州滨和微生物试剂有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)购于北京天根生物科技有限公司; DNA marker DL2000、6×Loading buffer 和 2×EasyTaq SuperMix 购于 TaKaRa 生物工程(大连)有限公司。

紫外可见分光光度计, 上海美普达仪器有限公司; 生化培养箱, 上海恒科技有限公司; 电热恒温水浴锅, 北京长安科学仪器厂; 电泳仪, 北京百晶生物技术有限公司; 光学显微镜, Olympus 公司; PCR 仪, Applied Biosystems 公司。

1.2 方法

1.2.1 酸性样品乳酸菌的分离与纯化

将酸苦菜汤样品分别接种到 TPY 培养基中, 37 °C 培养 24 h, 将一代菌液接种到 MRS 液体培养基中, 37 °C 培养 24 h, 得到的第 2 代菌液继续接入 MRS 液体培养基, 37 °C 培养 24 h 得到活性较高的第 3 代菌液。将第 3 代菌液在产酸菌株筛选培养基上进行划线分离, 在 37 °C、7% CO₂ 浓度条件下厌氧培养 24-48 h, 挑取有明显溶钙圈的菌落, 然后在 MRS 平板上继续划线分离纯化, 挑选革兰氏染色阳性、H₂O₂ 酶阴性、无芽孢符合乳酸菌特征的单菌落, 并油镜镜检、保存, 以备筛选、鉴定使用。

1.2.2 供试菌液的制备

将保存的菌株活化 3 代, 第 3 代菌液 3 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 收集菌体加入等量的无菌生理盐水洗涤 3 次后, 加入等量无菌生理盐水混匀, 待用。

1.2.3 高产酸菌株的筛选

将保存的菌株活化 3 代, 按 1.2.2 所示的方法制备供试菌液并接种到 100 mL 的 MRS 液体培养基中, 37 °C 培养 72 h 取发酵液 1 mL 置于三角瓶中, 用 50 mL 蒸馏水稀释, 滴加 2 滴 0.1% 酚酞为指示剂, 用 0.1 mol/L 的 NaOH 标准溶液滴定溶液至微红色, 记录消耗的 NaOH 标准溶液体积, 每个菌株平行测定 3 次, 酸度以 100 mL 发酵液中的产酸量计^[7]。

1.2.4 高产酸菌株的特性试验

(1) 乳酸定性试验: 对筛选出的高产酸菌株进行薄层层析实验, 以 2% 的乳酸标准溶液作为对照。展开剂为水: 苯甲醇: 正丁醇=1:5:5 (体积比), 并加入 1% 的甲酸。以 0.04% 的溴甲酚紫酒精溶液为显色剂, 待层析液挥发之后, 向层析板喷洒并计算

R_f 值^[8]。

(2) 形态特征观察: 将筛选到的高产酸菌株接种到 MRS 固体培养基, 37 °C 培养 24 h, 观察菌落特征, 挑取典型单菌落, 涂片进行革兰氏染色, 在油镜下观察菌体的形态。

(3) 生化特性试验: 按照参考文献[4-5,9]进行 H_2O_2 酶试验、硫化氢试验、硝酸盐还原试验、尿素酶试验、V-P 试验、枸橼酸盐利用试验、糖发酵试验、运动性检查、葡萄糖产气试验。以上试验均使用植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) CICC6238 作为对照。

(4) 16S rRNA 基因片段序列分析: 将活化好的 3 代菌液, 按试剂盒说明提取各试验菌株的全基因组 DNA, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检验 DNA 纯度。PCR 扩增的引物为 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1495R (5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3'), 扩增片段长约 1 500 bp。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 反应体系(50 μ L): 模板 DNA 2 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 2 μ L, 2×EasyTaq SuperMix 25 μ L, ddH₂O 补足至 50 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 65 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 5 min。PCR 扩增产物由 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后, 送生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定。

1.2.5 生理特性研究

(1) 生长曲线的测定: 将菌株按 2% 的接种量接种于 MRS 液体培养基中 37 °C 培养, 分别在 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、28、32、40、48、60、72 h 取样测定 OD_{600} 值; 在 0、2、4、8、12、16、20、24、28、32、40、48、60、72 h 取样测定活菌数, 绘制生长曲线。

(2) 耐盐试验: 将菌株分别接种于 NaCl 浓度为 0、2%、6%、10% (质量体积比) 的 MRS 液体培养基中, 37 °C 培养 24 h, 测定 OD_{600} 值。

(3) pH 试验: 将菌株分别接种于 pH 为 3.0、3.5、

4.0、4.5、5.0、9.0 的 MRS 液体培养基中, 37 °C 培养 24 h, 测定 OD_{600} 值。

(4) 温度试验: 将菌株接种于 MRS 液体培养基中, 分别在 15、25、45 °C 培养 24 h, 测定 OD_{600} 值。

(5) 耐热试验: 将菌株接种于 MRS 液体培养基中, 放置于 60 °C 水浴锅加热处理 30 min, 37 °C 培养 24 h, 测定 OD_{600} 值。以上试验均以不接菌的空白 MRS 培养基为对照。

2 结果与分析

2.1 酸性苦菜样中乳酸菌的分离

从 9 个发酵苦菜样品中分离得到了 18 株符合乳酸菌特性的菌, 编号分别为 1-1、1-2、2-11、2-17、3-1、3-2、3-3、5-3、5-4、6-5、6-6、7-1、7-4、7-5、7-9、9-3、9-5、9-8。

2.2 高产酸菌株的筛选结果

测定 18 株菌的最终发酵酸度结果如图 1 所示, 在相同培养条件下, 各菌株最终发酵酸度不同, 筛选出 5-4、7-5、1-2、1-1、6-6 这 5 株产酸量较高的菌, 其中 5-4 的酸度为 2.479×10^{-2} mol, 7-5 的酸度为 2.447×10^{-2} mol, 1-2 的酸度为 2.436×10^{-2} mol, 1-1 的酸度为 2.424×10^{-2} mol, 6-6 的酸度为 2.427×10^{-2} mol, 而空白培养基的酸度为 0.530×10^{-2} mol, 5 株菌均比空白培养基的酸度提高近 5 倍, 将所有平行测定的数据进行显著性分析, 差异性显著($P < 0.05$)。

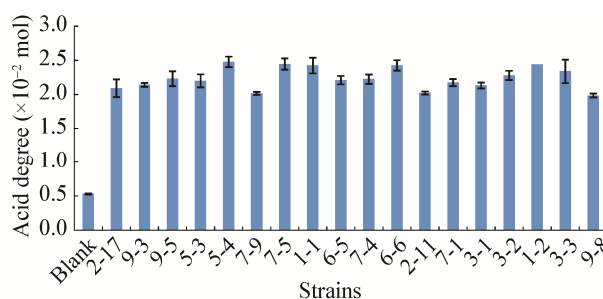


图 1 各菌株产酸量柱状图

Figure 1 Acid production of each strain

2.3 高产酸菌株鉴定结果

2.3.1 乳酸薄层层析定性结果

乳酸薄层层析定性实验结果为样品的斑点与乳酸标准品的斑点处于同一位置,测定乳酸标准溶液和筛选出的 5 株乳酸菌的 R_f 值并进行比较,结果见表 1。 R_f 值为 0.3–0.8, 结果可信。

2.3.2 形态特征鉴定结果

筛选的 5 株菌的菌落形态以及镜检结果如图 2 和表 2 所示, 5 株菌的菌落均为圆形, 但其直径有较大差异, 其中 5-4 的菌落为小菌落, 1-2 的菌落为大菌落, 颜色均为乳白色, 表面均光滑, 边缘整齐, 镜检结果均为革兰氏阳性, 无芽孢的短杆菌, 符合乳酸菌的特征。

2.3.3 生化特性鉴定结果

由表 3 结果可以看出, 筛选出的 5 株菌过氧化氢酶试验、V-P 试验、尿素酶试验和枸橼酸盐利用试验均为阴性, 无运动性, 可以利用葡萄糖但不产气, 因此可判定为同型发酵乳杆菌。

表 1 发酵液 R_f 值测定结果

Table 1 R_f value of the fermentation broth

Samples	R_f value
Lactic acid	0.725
1-1	0.723
1-2	0.730
5-4	0.721
6-6	0.729
7-5	0.720

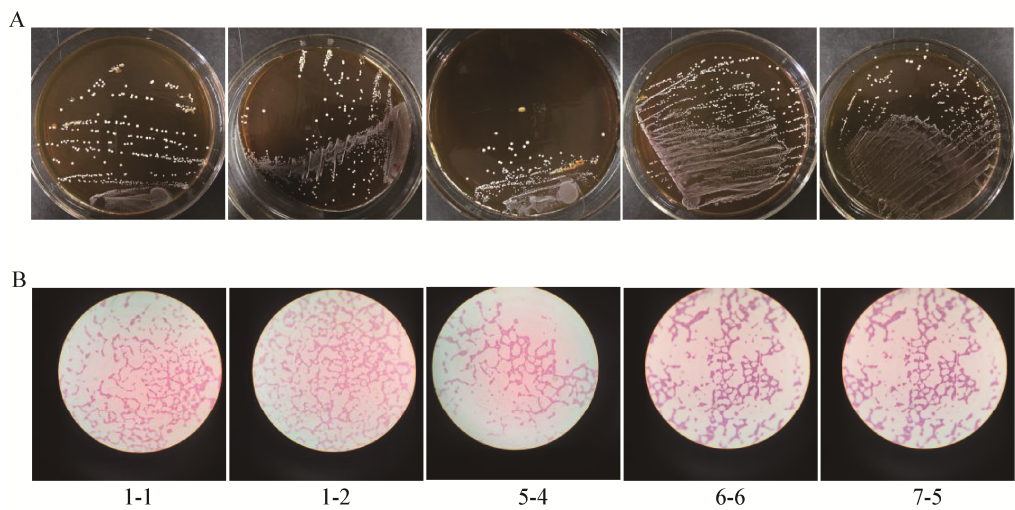


图 2 菌落形态(A)和革兰氏染色(B)观察结果

Figure 2 Results of colony morphology observation (A) and Gram stain (B)

表 2 菌落形态观察结果

Table 2 Results of colony morphology observation

菌株编号 Strains No.	菌落形态特征 Strains morphology	镜检结果 The result of microscopic examination
1-1	菌落较大, 乳白色, 边缘整齐, 表面光滑湿润 Large, Milky white, Edge entire, Smooth surface, Moist	革兰氏阳性, 短杆菌, 无芽孢 Gram-positive, Short stick shaped, No endospore
1-2	菌落较大, 乳白色, 边缘整齐, 表面光滑湿润 Large, Milky white, Edge entire, Smooth surface, Moist	革兰氏阳性, 短杆菌, 无芽孢 Gram-positive, Short stick shaped, No endospore
5-4	菌落小, 乳白色, 边缘整齐, 表面光滑湿润 Small, Milky white, Edge entire, Smooth surface, Moist	革兰氏阳性, 短杆菌, 无芽孢 Gram-positive, Short stick shaped, No endospore
6-6	菌落较小, 乳白色, 边缘整齐, 表面光滑湿润 Pin point, Milky white, Edge entire, Smooth surface, Moist	革兰氏阳性, 短杆菌, 无芽孢 Gram-positive, Short stick shaped, No endospore
7-5	菌落较大, 乳白色, 边缘整齐, 表面光滑较干 Large, Milky white, Edge entire, Smooth surface, Dry	革兰氏阳性, 短杆菌, 无芽孢 Gram-positive, Short stick shaped, No endospore

表 3 菌株的生化特性结果

Table 3 Biochemical characteristics of strains

Items	Strains No.					
	1-1	1-2	5-4	6-6	7-5	ZB
Catalase test	—	—	—	—	—	—
V-P test	—	—	—	—	—	—
H ₂ S test	—	—	—	—	—	—
Urease test	—	—	—	—	—	+
Citrate test	—	—	—	—	—	—
Nitrate reduction test	—	—	—	—	—	—
Glucose aerosis	—	—	—	—	—	—
Motility test	—	—	—	—	—	—

注：+：阳性；—：阴性。
Note：+：Positive；—：Negative.

由表 4 糖发酵试验可见，筛选出的 5 株菌均可以利用 D-核糖、阿拉伯糖、半乳糖、纤维二糖、果糖、水杨苷、蜜二糖、葡萄糖、麦芽糖、蔗糖和乳糖，均不能利用棉籽糖和木糖，对山梨醇、甘露醇和鼠李糖的发酵特性各不相同，其中菌株 5-4 可以利用山梨醇和鼠李糖，菌株 1-1 和 7-5 可以利用甘露醇。

分析上述试验结果，根据《伯杰细菌鉴定手册》^[10]和《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》^[11]对菌株进行种内鉴定，菌株 5-4 与鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)特性相似，但是不利用甘露醇，菌株 7-5 和 1-1 与小鼠乳杆菌(*Lactobacillus murinus*)特性相似，但不利用棉籽糖，菌株 6-6 和 1-2 的特性与米酒乳杆菌(*Lactobacillus sake*)特性相似，但不利用山梨醇。由于传统的发酵特性不稳定因素较多，部分菌株亲缘关系较近造成结果不容易区分^[12]，所以需要进一步通过 16S rRNA 基因片段序列分析来鉴定。

2.3.4 16S rRNA 基因片段序列分析结果

用 1.0%琼脂糖凝胶电泳分析 16S rRNA 基因的 PCR 产物，如图 3 所示，试验菌株和标准菌株均在 1 500 bp 处出现特异性目的条带，与预期大小符合，而且产物条带单一，满足测序要求。

表 4 试验菌株的糖发酵结果

Table 4 Fermentation of carbohydrate of strains

Items	Strains number					
	1-1	1-2	5-4	6-6	7-5	ZB
D-ribose	+	+	+	+	+	+
Arabinose	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	—	—	+	—	—	—
Fructose	+	+	+	+	+	+
Raffinose	—	—	—	—	—	—
Salicin	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	—	—	+	—	—	—
Xylose	—	—	—	—	—	—
Manitol	+	—	—	—	+	—
Sucrose	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+

注：+：阳性；—：阴性。
Note：+：Positive；—：Negative.

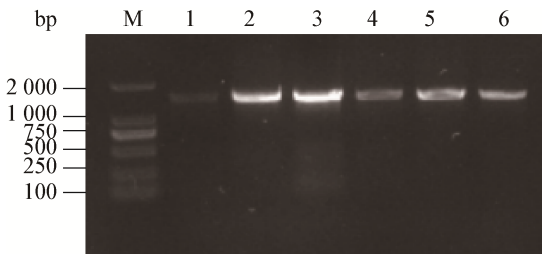


图 3 PCR 产物检测电泳图

Figure 3 Electrophoresis of PCR products

Note: M: DNA marker DL2000; 1: ZB; 2: 1-1; 3: 1-2; 4: 5-4; 5: 6-6; 6: 7-5.

利用 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)将 5 株菌的 16S rRNA 基因片段序列与 GenBank/EMBL/DDBJ 数据库中已知序列进行比对，5 株菌均与植物乳杆菌(*L. plantarum*)的相似度

最高, 可达 99%。利用 MEGA 5.0 绘制系统发育树进行同源性分析, 结果如图 4 所示, 5 株试验菌株和标准菌株 ZB 均与植物乳杆菌(*L. plantarum*)的相似性最高, 在系统发育树上处于同一分支, 与 BLAST 的分析结果相一致。可以判定 5 株菌均为植物乳杆菌(*L. plantarum*)。

2.4 高产酸菌株的生理特性

2.4.1 生长曲线

由菌株的生长曲线(图 5、6)和 pH 变化曲线(图 7)可以看出, 菌株 5-4 和 7-5 的生长情况基本相似, 延滞期较短, 约 2 h 开始进入对数期, 8 h 进入稳定期, 32 h 进入衰亡期, pH 最低分别降至 3.78 和 3.79。菌株 1-1、1-2 和 6-6 的生长情况相近, 4 h 开始进入对数期, 8 h 进入稳定期, 对数期持续时间较短, 但菌株生长较快, 1-1 和 1-2 在 28 h 进入衰亡期, 而菌株 6-6 在 40 h 进入衰亡期, 而且活菌数降低较为缓慢。3 株菌的 pH 变化曲线较为平缓, 最低 pH 分别为 3.01、3.00 和 2.98, 产酸能力较强。

2.4.2 耐盐试验结果

由图 8 可以得出, 当培养基的 NaCl 浓度为 2% 时, 所有试验菌株的生长基本不受影响; 当培养基的 NaCl 浓度为 6% 时, 各菌株均受到轻微的抑制, 而且受影响的程度相近; 当培养基的 NaCl 浓度为 10% 时, 5 株菌的生长均受到明显的抑制, 受影响的程度同样接近。

2.4.3 pH 试验结果

由图 9 可见, 培养基的初始 pH 值对菌株生长有较大的影响, 试验的 5 株菌受初始 pH 的影响接近, 在培养基 pH<3.5 时, 所有试验菌株的生长开始受到明显的影响; 当 3.5<pH<4.0 时, 各试验菌株虽然受到影响, 但是生长状况仍良好; 当处在 4.0<pH<9.0 环境中时, 所有试验菌株的生长均不受影响, 而且在 pH 9.0 时, 所有试验菌株的生长基本不受影响; 其中菌株 6-6 在 pH 4.5 时的 OD_{600} 值显著高于在其他 pH, 同样也显著高于其他试验菌株在 pH 4.5 时的 OD_{600} 值。

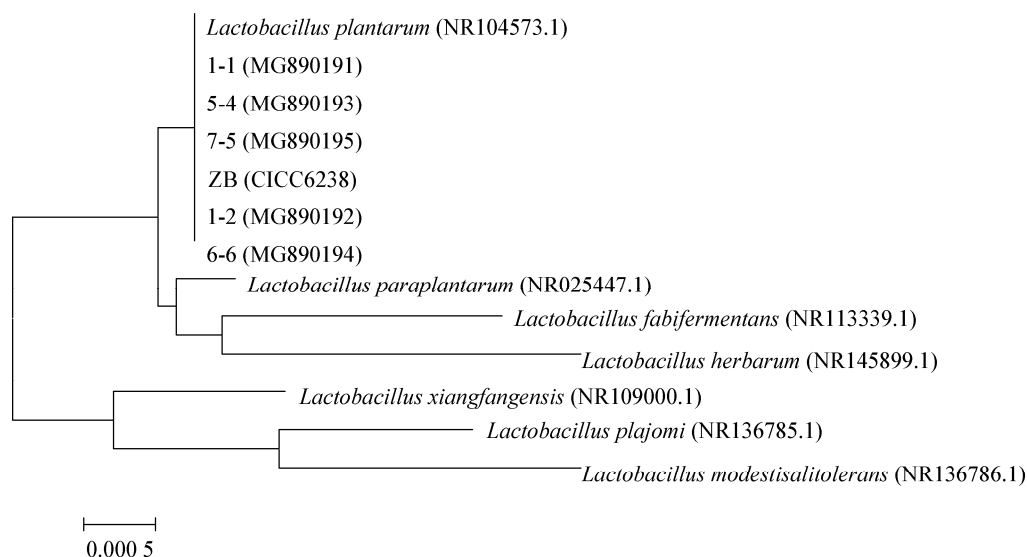


图 4 基于 16S rRNA 基因序列的试验菌株与其他乳酸菌的系统发育树

Figure 4 The phylogenetic tree of test strains and other lactic acid bacteria based on 16S rRNA gene sequence

注: 括号后的序号为已知菌株的 GenBank 登录号或保藏编号; 刻度尺代表 0.05% 的序列差异。

Note: The sequence number in the bracket means the GenBank accession number or preservation number of the strain; The scale means 0.05% sequence difference.

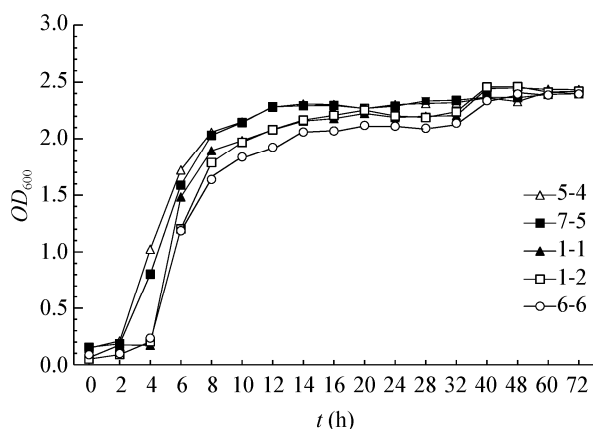


图5 菌液 OD_{600} 值随培养时间变化的曲线
Figure 5 Changes of OD_{600} values of broth with time

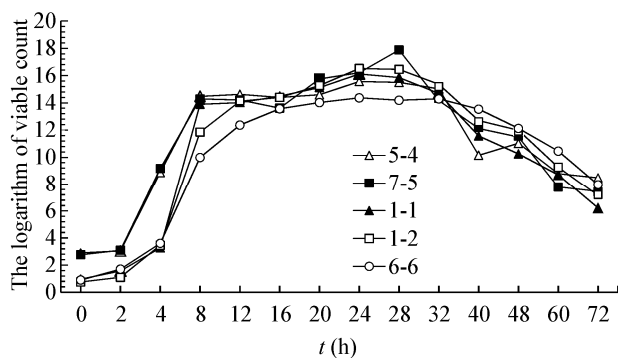


图6 活菌数随培养时间变化的曲线
Figure 6 Changes of viable count of broth with time

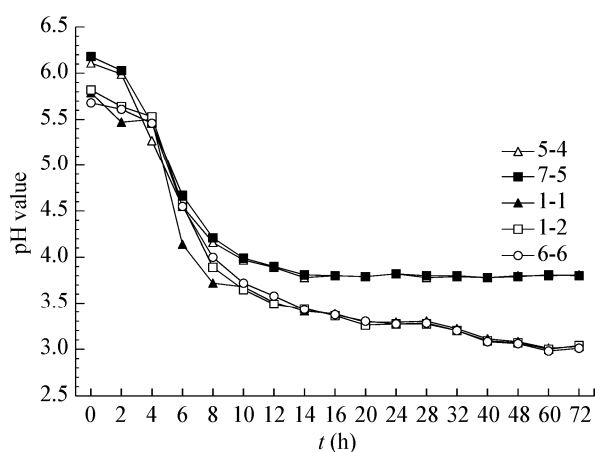


图7 菌液 pH 随培养时间变化的曲线
Figure 7 Changes of pH values of broth with time

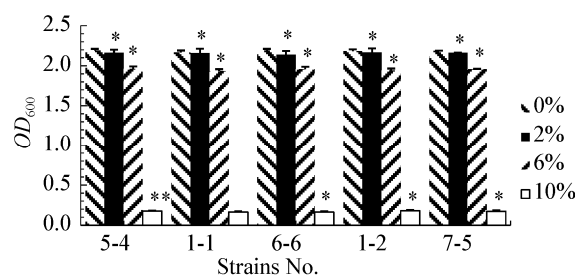


图8 不同盐浓度下菌株的生长情况

Figure 8 The growth situations of strains at different salt concentrations

注: *: 同一菌株之间差异显著 ($P < 0.05$).

Note: *: The difference between the same strain is significant ($P < 0.05$).

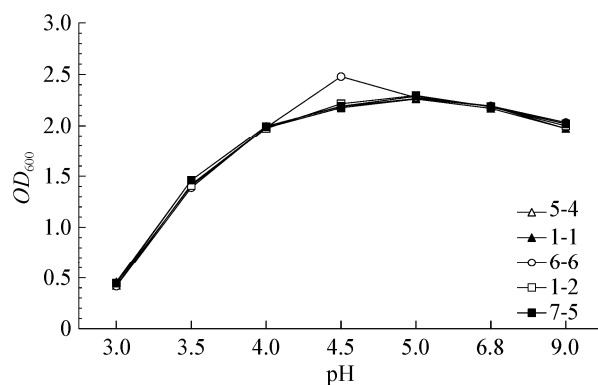


图9 培养基初始 pH 值对菌株生长的影响

Figure 9 The growth situations of strains at different pH value of medium

2.4.4 温度和耐热试验结果

由图 10 可以看出, 试验菌株在 25 °C 正常生长, 与标准 37 °C 培养环境下的生长情况相比无明显差异; 所有试验菌株在 15 °C 生长良好, 受低温影响不明显, 其中菌株 1-1 和 1-2 在 15 °C 时的 OD_{600} 值略高于其余 3 株试验菌株, 45 °C 的高温明显影响菌株 1-1 和 1-2 生长, 说明菌株 1-1 和 1-2 在低温下生长良好, 而试验菌株 5-4、6-6 和 7-5 受高温影响不明显, 在 45 °C 下的 OD_{600} 值略低于 37 °C 条件下的 OD_{600} 值, 它们适于较高温度环境中生长。

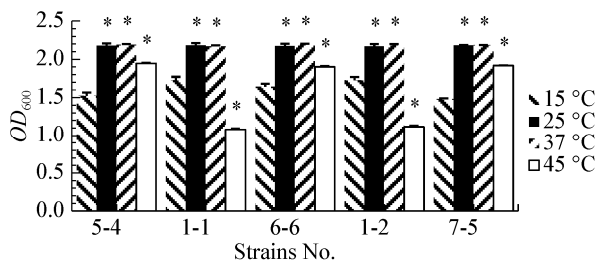


图 10 培养温度对菌株生长的影响

Figure 10 The growth situations of strains at different temperature

注: *: 同一菌株之间差异显著($P<0.01$).

Note: *: The difference between the same strain is significant ($P<0.01$).

由图 11 可见, 5 株菌经过 60 °C 水浴加热处理 30 min 后, OD_{600} 值均比对照组有一定程度的降低, 其中菌株 5-4 受影响较大, 1-1 基本不受影响, 可正常生长, 其余 3 株菌 OD_{600} 值稍有降低, 生长情况良好。

3 讨论

通常来说, 产酸是乳酸菌的一个主要特征, 本试验从酸性苦菜样品筛选出的 5 株菌产酸能力均较强, 其中菌株 6-6 的发酵液最低 pH 值为 2.98; 试验菌株的抗逆性较强, 在 15、25、45 °C 下生长状况良好, 而且经过 60 °C 水浴处理 30 min 后生长状况良好, 可见 5 株菌的应用温度范围较广, 可以在工业化生产中应用。5 株菌均有一定

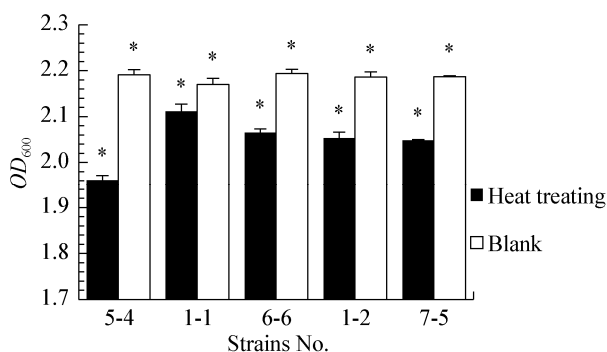


图 11 高温处理对菌株生长的影响

Figure 11 The growth situations of strains after high temperature treatment

注: *: 同一菌株之间差异性显著($P<0.05$).

Note: *: The difference between the same strain is significant ($P<0.05$).

的耐盐能力, 说明它们有应用于腌制食品和发酵香肠的潜力。在 NaCl 浓度为 6% 的培养基中, 5 株菌的生长基本不受影响, 但当 NaCl 浓度增加到 10% 时, 它们的生长受到严重抑制。本实验不足之处是未在 6%–10% 之间设置更为详细的 NaCl 浓度梯度, 因此未找到试验菌株对 NaCl 的最大耐受值。益生菌要定殖于肠道必须具有一定的耐酸和耐碱能力, 本研究的 5 株菌在耐酸耐碱方面有良好的表现, 均能在较高的酸度(pH 3.5)和较强的碱性环境(pH 9.0)中良好生长, 而且可以利用人体难以消化吸收的纤维二糖和蜜二糖, 具有作为益生菌的开发潜力。

近年来, 具有优良特性的乳酸菌被不断地分离、鉴定得到, 李凤梅等^[7]、赵婧等^[8]、陈晓平等^[13]筛选鉴定出的高产酸乳酸菌分别为副干酪乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、植物乳杆菌、短乳杆菌和肠膜明串珠菌。目前关于此类研究的对象多为白菜或者是实验室保藏的菌株, 而自然发酵苦菜作为内蒙古中西部及山西部分地区的特色食品却少有研究, 本课题组将鄂尔多斯地区的自然发酵苦菜作为研究对象, 对从中筛选的 5 株高产酸乳酸菌进行了生理生化特性探究, 并经 16S rRNA 基因片段序列鉴定均为植物乳杆菌(*L. plantarum*)。

4 结论

本实验从内蒙古自治区鄂尔多斯地区的自然发酵苦菜中筛选出的 5 株高产酸菌株, 经 16S rRNA 基因序列分析均鉴定为植物乳杆菌, 而且 5 株菌生长的温度范围宽泛, 还具有耐酸、耐碱、耐盐、耐热以及发酵纤维二糖和蜜二糖的优良特性, 为工业化生产提供了菌种资源和试验数据。

REFERENCES

- [1] Tian F. Functional components of sonchus oleraceus land its development[J]. Food and Nutrition in China, 2009(3): 30-31 (in Chinese)
田芳. 苦菜的功能成分及产品开[J]. 中国食物与营养, 2009(3): 30-31
- [2] Huo XY, Li SY, Guo RR. Identification and biological characteristics of lactic acid bacteria isolated from koumiss[J].

- Microbiology China, 2012, 39(7): 940-948 (in Chinese)
霍小琰, 李少英, 郭荣荣. 酸马奶中乳酸菌的鉴定及生物学特性的研究[J]. 微生物学通报, 2012, 39(7): 940-948
- [3] Gong JL, Zhao XX, Zou W, et al. Isolation and identification of a high-yield lactic acid bacterium and its probiotic property[J]. China Condiment, 2016, 41(3): 17-20,31 (in Chinese)
龚加路, 赵兴秀, 邹伟, 等. 高产酸乳酸菌的分离鉴定及其益生特性的研究[J]. 中国调味品, 2016, 41(3): 17-20,31
- [4] Uchimura T, Okada S. Lactic Acid Bacteria Test Manual[M]. Tokyo: Asakura Shoten, 1992, 6: 50-51 (in Chinese)
内村泰, 岗田早苗. 乳酸菌试验手册(日文版)[M]. 东京: 朝仓书店, 1992, 6: 50-51
- [5] Chen TS. The Manufacture and Application of Microbiological Medium[M]. Beijing: China Agricultural Publishing House, 1995: 431-433 (in Chinese)
陈天寿. 微生物培养基的制造与应用[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 431-433
- [6] Li SY, Li Z, Wei W, et al. Association of mutation patterns in GyrA and ParC genes with quinolone resistance levels in lactic acid bacteria[J]. The Journal of Antibiotics, 2014, 68(2): 81-87
- [7] Li FM, Wang X, Zhang SL, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria from natural fermented vegetable juice[J]. China Brewing, 2008(5): 33-35 (in Chinese)
李凤梅, 王晓, 张双灵, 等. 自然发酵酸菜汁中乳酸菌分离鉴定[J]. 中国酿造, 2008(5): 33-35
- [8] Zhao J, Li H, Zhang YY, et al. Screening, identification and growth characteristics of high acid-producing lactic acid bacteria[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(3): 173-176 (in Chinese)
赵婧, 李慧, 张玉玉, 等. 高产酸乳酸菌的筛选、鉴定和生长特性研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(3): 173-176
- [9] Ling DW, Dong XZ. Classification and Identification of Lactic Acid Bacteria and Experimental Methods[M]. Beijing: China Light Industry Press, 1999: 118-128 (in Chinese)
凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 118-128
- [10] Buchanan RE, Gibbons NE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984: 797-823 (in Chinese)
布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8版. 北京: 科学出版社, 1984: 797-823
- [11] Ling DW, Dong XZ. Classification and Identification of Lactic Acid Bacteria and Experimental Methods[M]. Beijing: China Light Industry Press, 1999: 6-16 (in Chinese)
凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 6-16
- [12] Li X, Wu JR, Tian T, et al. Isolation, identification and preliminary screening of acid-tolerant lactic acid bacteria from naturally fermented pickle juices from Daqing[J]. Food Science, 2014, 35(1): 150-154 (in Chinese)
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
- [13] Chen XP, Liu HY, Wei XC, et al. Study on separation and identification of lactic acid bacteria from naturally fermented sauerkraut[J]. Food Science, 2006, 27(2): 91-94 (in Chinese)
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): 91-94