

## 哈萨克传统发酵食品中乳酸菌的分离鉴定及代谢特性研究

翟磊<sup>1,2</sup>, 凌空<sup>2</sup>, 宋振<sup>1</sup>, 姚粟<sup>2</sup>, 程池<sup>2</sup>, 杨玉新<sup>1\*</sup>

1(新疆中亚食品研发中心(有限公司),新疆乌鲁木齐,830001)

2(中国食品发酵工业研究院,北京,100027)

**摘要** 采用纯培养方法从哈萨克传统发酵骆驼奶、马奶子和奶酪中分离得到 11 株乳酸菌。通过 16S rRNA 基因序列和 *pheS* 基因序列系统发育学分析,并结合形态特征和生理生化特性,确定这些乳酸菌的分类学地位。通过测定乳酸菌的耐酸耐盐特性、产酸特性、降解亚硝酸盐能力、氨基酸脱羧酶活力及抑菌能力,筛选得到了 3 株具有潜在生产应用价值的乳酸菌,即 *Lactobacillus paracasei* KCH3 (CICC 6277), *Lactobacillus fermentum* KM1 (CICC 6278) 和 *Lactobacillus fermentum* KC3 (CICC 6290),为果蔬发酵应用奠定了菌种基础。

**关键词** 哈萨克传统发酵食品;乳酸菌;多相分类学鉴定;代谢特性

哈萨克传统发酵食品的制作和食用历史悠久,风味独特,营养丰富,而经过长时间的自然驯化,这些传统发酵食品中一些具有优良特性的乳酸菌保留了下来,在发酵食品过程中起到了重要作用<sup>[1]</sup>。乳酸菌主要包括乳杆菌属(*Lactobacillus* sp.)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium* sp.)、链球菌属(*Streptococcus* sp.)、乳球菌属(*Lactococcus* sp.)以及肠球菌属(*Enterococcus* sp.)等<sup>[2]</sup>。目前研究表明,乳酸菌可以对人体产生健康的功效,摄入一定量的乳酸菌可以促进有益微生物的生存,抑制有害微生物的生长,从而保持肠道内菌群的平衡,减少肠道疾病的发生<sup>[3-4]</sup>,同时由于乳酸菌在生长过程中会合成维生素、产生有机酸、胆盐水解酶(BSH)、胞外蛋白水解酶、肽水解酶、细菌素等多种物质,还具有减缓乳糖不耐症、降胆固醇、抑制和预防肿瘤、延缓人体衰老等有益功能<sup>[5-7]</sup>。

本研究采用多相分类技术对分离于哈萨克传统发酵骆驼奶、马奶子和奶酪中的乳酸菌进行了鉴定,明确其分类学地位。在此基础上,从耐酸耐盐特性、产酸能力、抑菌能力、降解亚硝酸盐能力和氨基酸脱羧酶能力等方面对乳酸菌的生长代谢特征进行测定分析,筛选得到了 3 株具有潜在生产应用价值的乳酸菌,为乳酸菌在果蔬发酵中的应用奠定了基础。

第一作者:博士(杨玉新工程师为通讯作者,E-mail: zhailei@china-cicc.org)。

基金项目:“十三五”科技计划国家重点研发计划(No. 2016-YFD0400502);国家微生物资源平台专项(No. NIMR-2016-4);自治区科技援疆项目(No. 2016E02021)

收稿日期:2016-11-20,改回日期:2017-04-25

## 1 材料与方法

## 1.1 材料与试剂

## 1.1.1 实验材料

哈萨克传统发酵食品包括发酵骆驼奶、马奶子和奶酪,购买于哈萨克市场。

## 1.1.2 实验菌株

大肠杆菌 O157:H7 (*Escherichia coli*, CICC 10907), 肠沙门氏菌 (*Salmonella enteric*, CICC 10871), 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, CICC 10790) 和单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, CICC 21635) 均来自中国工业微生物菌种保藏管理中心。

## 1.1.3 实验试剂

MRS 培养基、胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)、胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)、革兰氏染色试剂盒和生理生化鉴定管,北京陆桥技术有限公司;API 试剂条,生物梅里埃公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒,OMEGA 公司;GoldView,北京赛百盛基因技术有限公司;溶菌酶, Sigma 公司、蛋白酶, Merk 公司; *Taq* DNA 聚合酶、dNTP、DL2000 marker,天为时代生物有限公司。

## 1.1.4 实验设备

光学显微镜 Olympus BH-2,奥林巴斯有限公司; pH 计 FE20,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;紫外分光光度计 7200,尤尼科(上海)仪器有限公司;温度梯度 PCR 仪, Biometra 公司;恒温培养箱 BHG-8082 型,上海一恒科学仪器有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 乳酸菌的分离纯化

利用梯度稀释涂布和平板划线法对哈萨克骆驼奶、马奶子和奶酪中的乳酸菌进行分离纯化<sup>[8-9]</sup>,3次分离纯化后的乳酸菌于-80℃冰箱甘油冷冻保藏。

### 1.2.2 乳酸菌多相分类学鉴定

通过分子生物学(16S rRNA 基因序列测定及 *pheS* 基因序列分析),结合表型特征(革兰氏染色、接触酶试验和 API 50 CHL 试验),对分离筛选的乳酸菌进行多相分类学鉴定。其中利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(Tiagen 公司)提取上述菌株的基因组 DNA,操作步骤参见试剂盒说明书,API 50 CHL 试验按照梅里埃产品操作说明进行操作。

使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取乳酸菌的基因组。利用引物 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCT-CAG-3') 和 1492r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 对 16S rRNA 基因进行扩增。PCR 反应体系为:模板 10 × PCR buffer 5 μL、dNTP (2.5 mmol/L) 4 μL、模板 2 μL、Taq DNA 聚合酶 1 μL、引物各 1 μL,补充去离子水至 50 μL。反应条件<sup>[10]</sup>: 94℃ 5 min, 94℃ 50 s, 52℃ 50 s, 72℃ 50 s, 33 个循环, 72℃ 7 min。PCR 产物送交北京诺赛基因组研究中心有限公司进行测序。利用引物 21f (5'-CAYCCNGCHCGYGAYATGC-3') 和 23r (5'-GGRTGRACCATVCC-NGCHCC-3') 对 *pheS* 基因序列进行扩增。PCR 反应体系同上,反应条件: 95℃ 5 min, 95℃ 1 min, 46℃ 2 min 15 s, 72℃ 1 min 15 s, 3 个循环; 95℃ 1 min 15 s, 46℃ 1 min 15 s, 72℃ 1 min 15 s, 30 个循环; 72℃ 7 min。

将测序结果在 GenBank 数据库中进行比对分析,以确定其与模式菌种的同源关系。确定并下载各模式菌种的有效序列后,采用 ClustalX 1.83 进行多序列比对后,使用 MEGA 5.0 软件中的邻接法(Neighbor-joining)进行系统发育分析<sup>[11]</sup>。

### 1.2.3 乳酸菌耐酸试验

挑取 MRS 培养基上生长的单菌落于 4 mL MRS 液体培养基中,37℃ 静置培养 18 h 后,按 1% 接种量分别接入 pH2、3、4、5、6 和 7 的 MRS 液体培养基中,37℃ 静置培养 48 h,测定 620 nm 下吸光值(OD<sub>620</sub>),并记录结果<sup>[12]</sup>。

### 1.2.4 乳酸菌耐盐试验

挑取 MRS 培养基上生长的单菌落于 4 mL MRS 液体培养基中,37℃ 静置培养 18 h 后,按 1% 接种量

接入分别含 20%、40%、60%、80% 和 100 g/L NaCl 的 MRS 液体培养基中,37℃ 静置培养 48 h,测定 620 nm 下吸光值(OD<sub>620</sub>),并记录结果<sup>[13]</sup>。

### 1.2.5 乳酸菌生长曲线及产酸能力测定

挑取 MRS 培养基上生长的单菌落于 4 mL MRS 液体培养基中,37℃ 静置培养 18 h 后,按 1% 接种量接种于 MRS 液体培养基中培养,以不接种培养基作为对照,每隔 2 h 取样测定 620 nm 下吸光值(OD<sub>620</sub>)。同时每隔 4 h 取出部分发酵液通过 pH 计直接测定 pH 值<sup>[7, 14]</sup>。

### 1.2.6 乳酸菌亚硝酸盐降解能力测定

挑取 MRS 培养基上生长的单菌落于 4 mL MRS 液体培养基中,37℃ 静置培养 18 h 后,按 1% 接种量接种于含 125 μg/mL NaNO<sub>2</sub> 的 200 mL MRS 液体培养基中 37℃ 培养,每隔 24 h 定时取样测定 NaNO<sub>2</sub> 含量。参考 GB/T 5009.33—2003 中的盐酸萘乙二胺法进行测定,不接种的 MRS 培养基(含 125 μg/mL NaNO<sub>2</sub>)作为空白对照<sup>[15]</sup>。

### 1.2.7 乳酸菌氨基酸脱羧酶试验

挑取 MRS 培养基上生长的单菌落于 3 mL 无菌生理盐水中研磨,制备成 0.5 麦氏浊度悬液,分别滴入氨基酸脱羧酶试验的安培瓶中,每瓶 3 滴,并加无菌液体石蜡覆盖培养基表面,培养 24 h 后,观察试验管与对照管颜色变化,试验管为紫色,对照管为黄色,结果为阳性;试验管与对照管均为黄色,结果为阴性。

### 1.2.8 乳酸菌抑菌性研究

采用滤纸片法测定目标菌株的抑菌性能。挑取新鲜培养的指示菌株大肠杆菌 O157:H7 (*Escherichia coli*, CICC 10907), 肠沙门氏菌 (*Salmonella enteric*, CICC 10871), 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, CICC 10790) 和单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, CICC 21635), 将菌悬液浓度调至 0.5 麦氏浊度并均匀涂布在 TSA 培养基上,然后将滤纸片浸泡在 200 μL 培养 24 h 的乳酸菌发酵液中,置于上述培养基中,37℃ 培养箱中培养 48 h,记录结果<sup>[8, 16]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 乳酸菌的分离纯化

从 MRS 平板上挑取 11 个形态有差异的菌落进行划线纯化菌种,命名为 KM1、KM2、KM3、KM4、KC1、KC2、KC3、KC4、KCH1、KCH2 和 KCH3 (表 1),经 3 次分离纯化后加到 20% 甘油中,保藏于 -80℃ 冰箱供后续实验使用。

## 2.2 乳酸菌多相分类学鉴定

革兰氏染色以及接触酶试验表明 11 株菌株均为革兰氏阳性,接触酶阴性菌株,符合乳酸菌的特征(表 1)。16S rRNA 基因系统发育分析表明 11 株菌株均属于乳酸菌,其中菌株 KC2、KM2 和 KM3 与德氏乳杆菌的同源性均在 99.37% 以上,且与其他近种的同源性均在 98.65% 以下,鉴定为德氏乳杆菌(*Lactobacillus delbrueckii*)。菌株 KC3、KC4 和 KM1 与发酵乳杆菌的同源性为 99.85%,且与其他近种的同源性均在 98.65% 以下,鉴定为发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)。菌株 KCH1 和 KCH2 与乳酸乳球菌的同源性均在 99.42% 以上,且与其他近种的同源性均在

98.65% 以下,鉴定为乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)。其余 3 株菌株只能鉴定到属水平(图 1A)。对于 16S rRNA 基因序列只能鉴定到属水平的菌株进行 *pheS* 基因序列系统发育分析。结果表明,菌株 KC1 和 KM4 与唾液链球菌嗜热亚种的同源性为 99%,可鉴定为唾液链球菌嗜热亚种(*Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*)。菌株 KCH3 与干酪乳杆菌和类干酪乳杆菌的同源性较近,只能鉴定到乳杆菌属(图 1B),对其进行 API 50 CHL 试验,鉴定结果表明菌株 KCH3 鉴定为类干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*) (表 2)。分离鉴定的 11 株乳酸菌均已保藏于中国工业菌种保藏管理中心(表 1)。

表 1 分离鉴定的乳酸菌信息统计

Table 1 The information of the isolated and identified lactic acid bacteria

菌株编号	分离源	鉴定结果	保藏编号	表型特征
KC1	哈萨克骆驼奶	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	CICC 6275	G <sup>+</sup> ,球形,直径 0.6~0.9 μm;菌落乳白色,圆形,不透明,边缘整齐,接触酶阴性
KC2	哈萨克骆驼奶	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	CICC 6289	G <sup>+</sup> ,弯杆状,0.6~0.7 μm × 2.7~3.6 μm;菌落乳白色,近圆形,不透明,边缘不整齐,接触酶阴性
KC3	哈萨克骆驼奶	<i>Lactobacillus fermentum</i>	CICC 6290	G <sup>+</sup> ,杆状,0.3~0.4 μm × 1.2~2.3 μm;菌落乳白色,圆形扁平,不透明,边缘整齐,接触酶阴性
KC4	哈萨克骆驼奶	<i>Lactobacillus fermentum</i>	CICC 6276	G <sup>+</sup> ,杆状,0.2~0.4 μm × 1.3~2.5 μm;菌落乳白色,圆形扁平,不透明,边缘整齐,接触酶阴性
KM1	哈萨克马奶子	<i>Lactobacillus fermentum</i>	CICC 6278	G <sup>+</sup> ,杆状,0.3~0.4 μm × 1.1~2.6 μm;菌落乳白色,圆形扁平,不透明,边缘整齐,接触酶阴性
KM2	哈萨克马奶子	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	CICC 6279	G <sup>+</sup> ,杆状,0.6~0.7 μm × 3.1~5.6 μm;菌落乳白色,近圆形,不透明,边缘整齐,接触酶阴性
KM3	哈萨克马奶子	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	CICC 6293	G <sup>+</sup> ,杆状,0.6~0.7 μm × 2.8~5.4 μm;菌落乳白色,近圆形,不透明,边缘整齐,接触酶阴性
KM4	哈萨克马奶子	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	CICC 6280	G <sup>+</sup> ,球形,直径 0.5~0.8 μm;菌落乳白色,圆形,不透明,边缘整齐,接触酶阴性
KCH1	哈萨克奶酪	<i>Lactococcus lactis</i>	CICC 6291	G <sup>+</sup> ,近圆形,直径 0.6~0.9 μm;菌落白色,圆形扁平,不透明,边缘整齐,接触酶阴性
KCH2	哈萨克奶酪	<i>Lactococcus lactis</i>	CICC 6292	G <sup>+</sup> ,近圆形,直径 0.7~1.0 μm;菌落白色,圆形扁平,不透明,边缘整齐,接触酶阴性
KCH3	哈萨克奶酪	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CICC 6277	G <sup>+</sup> ,杆状,0.5~0.6 μm × 1.2~2.6 μm;菌落乳白色,近圆形,不透明,边缘整齐,接触酶阴性

## 2.3 乳酸菌耐酸耐盐实验

耐酸试验结果表明,随着 pH 值降低,乳酸菌的生长受到明显的抑制。其中菌株 KC3、KM1 和 KCH3 展现了较强的耐酸能力,其中菌株 KC3 和 KM1 在 pH 3 条件下 OD<sub>620</sub> 值能够达到 0.2 左右,而其他菌株几乎不生长,其中菌株 KC3 和 KM1 在 pH4 的条件下的 OD<sub>620</sub> 值可以达到 0.6。而菌株 KM4 和 KC1 耐酸能力最弱,不能在 pH 4 的环境下生长,在 pH 5、6 和 7 的环境中生长也较弱(图 2A)。

耐盐试验结果表明,乳酸菌的生长与 NaCl 浓度成反比,即随着 NaCl 浓度的升高,乳酸菌的生长受到明显的抑制(图 2B)。大部分菌株在 2% 的 NaCl 下可以正常生长,但 KM2、KM4、KCH1 和 KCH2 几乎不生长。而菌株 KCH3 的耐盐能力最强,在 6% NaCl 条件下,OD<sub>620</sub> 值可以达到 0.35。菌株 KM1 和 KC3 能够耐受 4% 的 NaCl。综合分析乳酸菌的耐酸和耐盐能力,选取菌株 KC3、KM1 和 KCH3 进行后续生长代谢

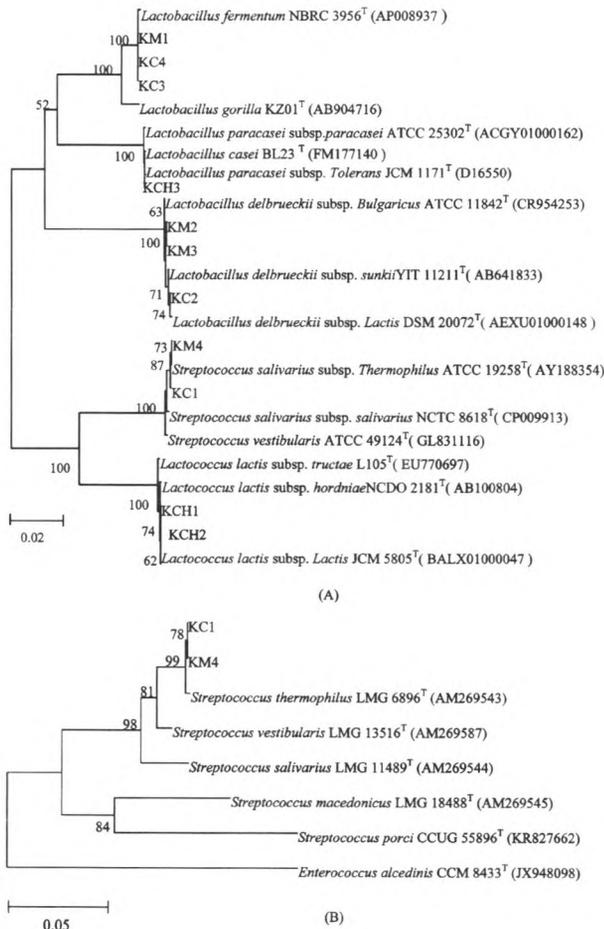
的亚硝酸盐降解率只有 43.7%。培养 48 h 后,3 株的亚硝酸盐降解率均可以达到 100% (表 3)。

表 2 菌株 KCH3 碳源利用特征

Table 2 Carbon source utilization characteristics of strain KCH3

碳源	生长	碳源	生长	碳源	生长	碳源	生长
甘油	-	L-山梨糖	-	D-纤维二糖	+	D-土伦糖	+
赤藓糖醇	-	L-鼠李糖	-	D-麦芽糖	+	D-来苏糖	-
D-阿拉伯糖	-	卫矛醇	-	D-乳糖	+	D-塔格糖	+
L-阿拉伯糖	-	肌醇	-	D-蜜二糖	-	D-岩藻糖	-
D-核糖	+	甘露醇	-	D-蔗糖	+	L-岩藻糖	-
D-木糖	-	山梨醇	+	D-海藻糖	+	D-阿拉伯醇	-
L-木糖	-	$\alpha$ -甲基-D-甘露糖	-	菊糖	-	L-阿拉伯醇	-
D-葡萄糖	+	熊果苷	-	糖原	-	D-半乳糖	+
D-果糖	+	七叶灵	+	木糖醇	-	苦杏仁苷	-
D-甘露糖	+	水杨苷	+	D-龙胆二糖	+	淀粉	-
阿东醇	-	$\alpha$ -甲基-D-葡萄糖	-	D-松三糖	+	D-棉籽糖	-
$\beta$ -甲基-D-木糖苷	-	N-乙酰葡萄糖胺	+	葡萄糖酸钾	+	2-酮基-葡萄糖酸钾	-
5-酮基-葡萄糖酸钾	-						

注：“+”，阳性；“-”，阴性。



(A):16S rRNA 基因 (B):pheS 基因  
图 1 分离鉴定的乳酸菌系统发育树

Fig. 1 The phylogenetic trees of isolated and identified

注:采用 MEGA5.0 软件,邻位连接法显示菌株与相关模式种系统发育树,进行 1000 次的相似度重复计算,图中发育树节点只显示 Bootstrap 值大于 50% 数值,上标的“T”表示模式菌株。

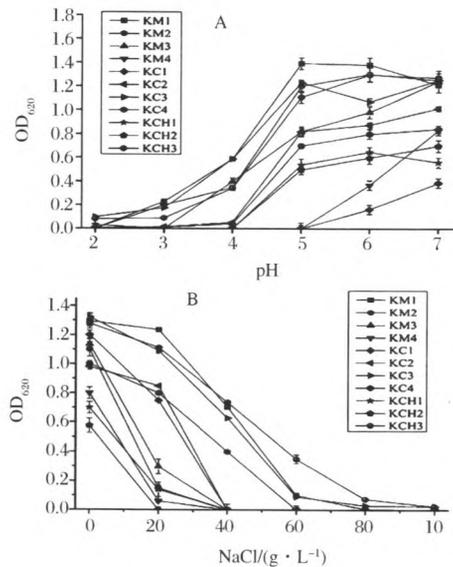
特性研究。

## 2.4 乳酸菌的生长曲线和产酸能力测定

生长曲线测定表明,菌株 KC3 和 KM1 进入对数期较快,都在 4 h 进入对数期,分别在 12 h 和 16 h 进入稳定期,而 KCH3 在 14 h 最晚进入对数期(图 3A)。产酸能力测定结果表明,菌株 KC3 产酸速度最快,pH 值可以降到 4.0,菌株 KM1 和 KCH3 产酸速度次之,pH 值可以降到 4.2 和 3.8 (图 3B)。由此可见,菌株进入对数期越快,其产酸速率也较快。

## 2.5 乳酸菌亚硝酸盐降解能力测定

试验结果表明随着培养时间的延长,菌株降解的亚硝酸盐能力越强。培养 24 h 后,KC3 和 KM1 的亚硝酸盐降解率分别可达到 85.4% 和 81.3%,而 KCH3



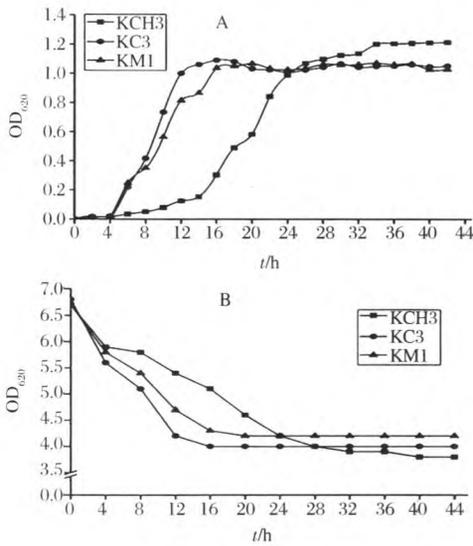
(A): 耐酸特性; (B): 耐盐特性

图 2 分离鉴定的乳酸菌耐酸耐盐特性

Fig. 2 Acid- and salt-resistance properties of isolated and identified lactic acid bacteria

## 2.6 乳酸菌氨基酸脱羧酶试验

氨基酸脱羧酶试验测定结果表明,菌株 KC3 和 KM1 对精氨酸双水解脱羧酶活性显阳性,剩余菌株对 4 种氨基酸脱羧酶活性均显阴性(表 3)。



(A): 生长特性;(B): 产酸特性

图3 分离鉴定的乳酸菌的生长和产酸特性

Fig. 3 Growth and acid production of isolated and identified lactic acid bacteria

表3 分离鉴定的乳酸菌表型特性

Table 3 Phenotypic characteristics of isolated and identified lactic acid bacteria.

特性	KCH3	KC3	KM1
亚硝酸盐降解率/% <sup>a</sup>	43.72 ± 0.31	85.45 ± 0.25	81.39 ± 0.35
亚硝酸盐降解率/% <sup>b</sup>	100	100	100
赖氨酸脱羧酶	-	-	-
鸟氨酸脱羧酶	-	-	-
色氨酸脱羧酶	-	-	-
精氨酸双水解酶	-	- +	+
抑菌能力/mm			
肠沙门氏菌	22.3 ± 0.6	17.8 ± 0.7	11.4 ± 0.2
大肠埃希氏菌	10.5 ± 0.5	5.4 ± 0.3	5.3 ± 0.3
金黄色葡萄球菌	11.1 ± 0.3	0	0
单增李斯特菌	0	0	0

注：“a”表示菌株培养24 h后的亚硝酸盐降解率，“b”表示菌株培养48 h后的亚硝酸盐降解率；“+”表示阳性；“-”表示阴性。

### 2.7 乳酸菌抑菌能力测定

由抑菌能力实验结果可知,3株乳酸菌均能够抑制肠炎沙门氏菌和大肠杆菌,其中KCH3的抑菌作用最大,对于肠炎沙门氏菌和大肠杆菌的抑菌直径可达到20 mm和10 mm,对金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌无抑菌作用(表3)。

## 3 讨论

通过多相分类学鉴定,从哈萨克传统发酵食品中共筛选到3个属,11株乳酸菌。其中发酵乳杆菌和德氏乳杆菌各3株,嗜热链球菌和乳酸乳球菌各2

株,副干酪乳杆菌1株。从菌株来源看,哈萨克骆驼奶中和马奶子中含有相同种类的乳酸菌,有发酵乳杆菌、德氏乳杆菌和嗜热链球菌。而奶酪中含有乳酸乳球菌和副干酪乳杆菌。由此可见,不同来源的哈萨克传统发酵食品中既含有相同乳酸菌又各具特色(图4)。

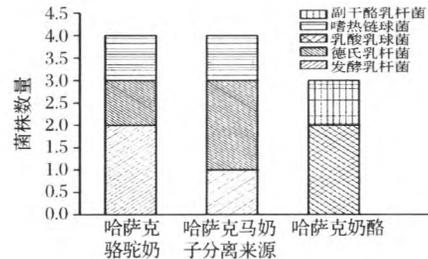


图4 分离鉴定的乳酸菌的种类和来源

Fig. 4 Classification and origin of isolated and identified lactic acid bacteria

ARGYRI<sup>[2]</sup>等认为乳酸菌对低酸环境和渗透压的耐受性也是作为发酵剂和潜在益生菌的必要条件。BEGANOVIC<sup>[11]</sup>对筛选到的菌株进行4%~6% NaCl的耐盐试验,优良菌株的OD<sub>600</sub>值在0.4到0.6之间。HWANHLEM<sup>[17]</sup>中通过实验得到菌株产酸可以使pH值降至4.3~4.6,认为乳酸可以导致革兰氏阴性病原菌外膜的损伤,引起病原菌LPS层的破坏从而导致的亚致死损伤。AMMOR<sup>[18]</sup>等认为乳酸菌快速产酸形成的低酸环境可以抑制有害菌群的繁殖从而提升产品的安全性及货架期。本研究中筛选得到的菌株KC3和KM1在pH4的条件下的OD<sub>620</sub>值可以达到0.6,菌株KCH3在6% NaCl条件下的OD<sub>620</sub>值可以达到0.35,展现了良好的耐酸和耐盐能力,为后续的果蔬发酵试验奠定了菌种基础。

亚硝酸盐及生物胺的含量也是乳酸菌进行果蔬发酵考虑的因素。摄取过量的亚硝酸盐会引起致癌、抵抗甲状腺素和引起智障等危害<sup>[19]</sup>。菌株KCH3、KC3和KM1培养48 h后亚硝酸盐的降解率分别可达100%,高于目前报道的乳酸菌<sup>[20]</sup>。

生物胺是一种有害物质,如果健康人群摄入大量生物胺,或易感人群摄入少量生物胺,生物胺能进入机体各组织系统,导致肾上腺素和胃酸过量分泌、心跳加快、血糖含量增加或血压升高等症状<sup>[21]</sup>。筛选氨基酸脱羧酶阴性的乳酸菌能够大大降低果蔬发酵中生物胺的含量,进一步提高产品的安全性。菌株KCH3的4种氨基酸脱羧酶均为阴性,并且对3种有害菌的均有抑菌作用,将其应用于果蔬发酵,能够进

一步提高产品的安全性。

通过功能筛选,获得了3株具有潜在生产价值的乳酸菌,即 *Lactobacillus paracasei* KCH3 (CICC 6277), *Lactobacillus fermentum* KM1 (CICC 6278) 和 *Lactobacillus fermentum* KC3 (CICC 6290),为果蔬发酵应用奠定了菌种基础。

#### 参 考 文 献

- [1] 拉提帕·艾尔肯,唐雪,新华·那比.新疆传统发酵驼乳中分离出一株乳酸菌的分子生物学鉴定[J].新疆医科大学学报,2014,37(2):155-159. DOI: 10.3969/j.issn.1009-5551.2014.02.007.
- [2] ARGYRI A A, ZOUMPOPOULOU G, KARATZAS K A, et al. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests [J]. Food microbiology, 2013, 33 (2): 282 - 291. DOI: 10.1016/j.fm.2012.10.005.
- [3] BAO Y, ZHANG Y, ZHANG Y, et al. Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional food products [J]. Food Control, 2010, 21(5): 695 - 701.
- [4] 高娃.四川部分地区泡菜中乳酸菌的分离鉴定[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2010.
- [5] 赖婷,刘汉伟,张名位.乳酸菌发酵对果蔬中主要活性物质及其生理功能的影响研究进展[J].中国酿造,2015,34(3):1-4.
- [6] 谢明勇,熊涛,关倩倩.益生菌发酵果蔬关键技术研究进展[J].中国食品学报,2014,14(10):1-9.
- [7] 纪晓葵.优良乳酸菌的筛选及其发酵蔬菜的应用研究[D].杭州:浙江大学,2014.
- [8] 于微,马春丽,孙婷婷,等.产细菌素乳酸菌的筛选及对农家干酪保质期的影响[J].食品科学,2015,36(3):142-146.
- [9] XIONG T, LI X, GUAN Q, et al. Starter culture fermentation of Chinese sauerkraut: Growth, acidification and metabolic analyses [J]. Food Control, 2014, 41 (2): 122 - 127.
- [10] LIU W, BAO Q, JIRIMUTU, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Tarag in Eastern Inner Mongolia of China by 16S rRNA sequences and DGGE analysis [J]. Microbiological research, 2012, 167 (2): 110 - 115.
- [11] 熊素玉.酸马奶中乳酸菌的分离鉴定及其生物学特性的研究[D].乌鲁木齐:新疆农业大学,2007.
- [12] 武运,李远,王冰峰,等.新疆酸乳中细菌素乳酸菌的筛选及其抑菌性[J].食品与机械,2011,27(3):25-28.
- [13] BEGANOVIC J, KOS B, LEBOS PAVUNC A, et al. Traditionally produced sauerkraut as source of autochthonous functional starter cultures [J]. Microbiological research, 2014, 169(7-8): 623 - 632.
- [14] 胡书芳,王雁萍,洪爱俊,等.自然发酵酸菜中乳酸菌的分离鉴定及其生理特性研究[J].安徽农业科学,2009,37(15):6896-6898.
- [15] 高书锋,陈丁,贺莫许.亚硝酸盐降解菌的分离鉴定及其降解特性[J].环境科学与技术,2011,34(S2):37-41.
- [16] 于娜.具有抑菌作用乳杆菌的筛选及其抑菌物质特性的研究[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2011.
- [17] HWANHLEM N, BURADALENG S, WATTANACHANT S, et al. Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains [J]. Food Control, 2011, 22(3-4): 401 - 407.
- [18] AMMOR M S, MAYO B. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update [J]. Meat science, 2007, 76(1): 138 - 146.
- [19] 姜维.一株耐盐性高效生物胺降解新菌的筛选、分类鉴定及应用研究[D].青岛:中国海洋大学,2014.
- [20] 吴慧昊,牛锋,陈珊珊,等.高效降亚硝酸盐乳酸菌的驯化复筛及菌株鉴定[J].食品科学,2016(1):1-10.
- [21] 管世敏.降解亚硝酸盐乳酸菌的分离筛选及其在泡菜发酵中的应用研究[D].上海:上海师范大学,2009.

## Isolation, identification and characterization of lactic acid bacteria from traditional fermentation foods in Kazak

ZHAI Lei<sup>1,2</sup>, LING Kong<sup>2</sup>, SONG Zhen<sup>1</sup>, YAO Su<sup>2</sup>, CHENG Chi<sup>2</sup>, YANG Yuxin<sup>1\*</sup>

1(Xinjiang Central Asia Food Research and Development Centre, Urumchi 830001, China)

2(China National Research Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing 100027, China)

**ABSTRACT** Eleven lactic acid bacteria were isolated from traditional fermentation foods including camel milk, mare milk and cheese in Kazak by culture-dependent methods. These isolates were identified by 16S rRNA gene and *pheS* gene sequences phylogenetic analysis, combined with morphology and physiological and biochemical characteristics. The abilities of acid- and salt-resistance, acid production, nitrite degradation, amino acids decarboxylases and antimicrobial properties were detected to screen lactic acid bacteria with potential applications. As a result, three lactic acid bacteria designated as *L. paracasei* KCH3 (CICC 6277), *L. fermentum* KM1 (CICC 6278) and *L. fermentum* KC3 (CICC 6290) were obtained and laid a foundation for vegetable fermentation application.

**Key words** traditional fermentation food in Kazak; lactic acid bacteria; polyphasic taxonomy identification; metabolic properties