DOI:10.12161/j.issn.1005-6521.2019.16.028

保康鲊广椒中乳酸菌的分离鉴定及其发酵特性的评价

张逸舒,王玉荣 ,陈芸曼,张傲然,张振东,郭壮*
(湖北文理学院 食品科学技术学院 鄂西北传统发酵食品研究所,湖北 襄阳 441053)

摘　要:对湖北保康地区鲊广椒中的乳酸菌进行分离鉴定,并对其在玉米碴和红辣椒为原料的基质中的发酵特性进行评价。结果表明:分离出的20株乳酸菌菌株,共鉴定为短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)、食品乳杆菌(*L. alimentarius*)、面包乳杆菌(*L. crustorum*)和植物乳杆菌(*L. plantarum*)4个种,其中15株为植物乳杆菌。对比自然发酵的鲊广椒,电子鼻传感器W1C、W3C和W5C对多数植物乳杆菌制备样品的响应值明显偏大,同时酸味、鲜味和丰度亦有明显的提升。通过主成分分析发现,使用*L. plantarum* HBUAS52327和*L. plantarum* HBUAS52332纯种发酵的鲊广椒具有优良的品质。由此可见,保康地区鲊广椒中乳酸菌以植物乳杆菌为主,且添加植物乳杆菌进行纯种发酵可提升鲊广椒的品质。

关键词:鲊广椒;乳酸菌;电子鼻;电子舌;有机酸

Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Zhaguangjiao in Baokang and Evaluation of Fermentation Properties of These Isolates

ZHANG Yi-shu, WANG Yu-rong, CHEN Yun-man, ZHANG Ao-ran, ZHANG Zhen-dong, GUO Zhuang*
(Northwest Hubei Research Institute of Traditional Fermented Food, College of Food Science and Technology, Hu Bei University of Arts and Science, Xiangyang 441053, Hubei, China)

Abstract: The lactic acid bacterial strains were isolated and identified from Zhaguangjiao samples collected from Baokang Hubei province, and fermentation properties of these isolates were evaluated with cornmeal and cayenne pepper as the raw materials. The results indicated that 20 lactic acid bacteria strains, were identified as *Lactobacillus brevis*, *L. alimentarius*, *L. crustorum* and *L. plantarum*, respectively. It was worth mentioning that 15 isolates were identified as L. plantarum. Compared with natural fermentation, the testing of electronic nose indicated that the response value of sensor W1C, W3C and W5C were higher in major Zhaguangjiao samples fermented by *L. plantarum*, and the relative intensity of sourness, umami and richness had same trends. The result of principal component analysis indicated that the Zhaguangjiao samples fermented by *L. plantarum* HBUAS52327 and *L. plantarum* HBUAS52332 with better quality. Thus, *L. plantarum* was domain bacterial species in Zhaguangjiao samples collected from Baokang aerea and the Zhaguangjiao samples fermented by *L. plantarum* strains with better quality.

Key words: Zhaguangjiao; lactic acid bacteria; electronic nose; electronic tongue; organic acid

引文格式:
张逸舒,王玉荣 ,陈芸曼,等.保康鲊广椒中乳酸菌的分离鉴定及其发酵特性的评价[J].食品研究与开发,2019,40(16):159-165
ZHANG Yishu, WANG Yurong, CHEN Yunman, et al. Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Zhaguangjiao in Baokang and Evaluation of Fermentation Properties of These Isolates [J]. Food Research and Development,2019,40(16):159-165

基金项目:湖北文理学院教师科研能力培育基金(2017kypy051)

作者简介:张逸舒(1999—),女(汉),本科,研究方向:食品生物技术。
* 通信作者:郭壮(1984—),男,副教授,博士,研究方向:食品生物技术。

保康县位于秦巴山区深处,隶属湖北省襄阳市,西连神龙架,北交武当山,境内山峦重叠森林覆盖率达66.8%,生活着汉族、畲族、回族和土家族等多个民族[1]。特殊的地理环境及多民族杂居的现状赋予了其独特的饮食文化,保康地区居民历来有制作和食用鲊广椒、臭豇豆、臭豆渣和臭酱巴的习俗。保康地区鲊广椒以鲜红辣椒和苞谷面(玉米碴)为主要原料,采用厌氧发酵制作而成,具有酸辣可口和味道鲜香的特点,常作为辅料用于腊肉、鸡蛋和鱼类的烹饪中。传统发酵食品的风味品质与其微生物多样性息息相关,而发酵食品制作地的生态环境在很大程度上影响了其蕴含的微生物群系[2]。曾有研究对湖北当阳地区鲊广椒的微生物多样性进行解析,结果发现鲊广椒中的细菌主要以乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)为主[3-4]。然而目前关于保康地区鲊广椒乳酸菌多样性研究的报道尚少。

作为现代食品加工业常用的发酵剂,乳酸菌广泛存在于泡菜[5]、发酵肉制品[6]、发酵乳制品[7]、发酵酒[8]和人体肠道[9]中,长期食用乳酸益生菌具有调节肠道菌群[10]和改善代谢综合症[11]的功效。鲊广椒的发酵原料为蔬菜和淀粉质食材,发酵方式为厌氧固态发酵,制作方法亦与酸奶、泡菜及腊肉制品均存在较大的差异,因而其乳酸菌群系可能存在一定的特殊性,所以在解析乳酸菌多样性的基础上开展菌株收集工作具有积极的意义。在实地调研过程中,本研究团队发现鲊广椒虽然广泛分布于我国云南、四川、重庆、湖北、湖南和贵州等华中和西南地区,但其产业化程度较低,多以百姓自制为主,且制作的鲊广椒产品风味品质相对较差,存在轻微臭味等产品缺陷问题。由此可见,积极开展具有优良发酵特性鲊广椒来源乳酸菌的筛选,以乳酸菌纯种发酵代替自然发酵,对鲊广椒风味品质和食用安全性的提升均具有积极意义。

本研究采用纯培养和16S rRNA鉴定技术对7份采集自保康地区的鲊广椒中乳酸菌多样性进行了解析,在对其乳酸菌分离株进行分离鉴定的基础上,采用电子鼻和电子舌从风味和滋味两个维度对具有优良发酵特性的菌株进行筛选,以期对后续鲊广椒风味品质的提升提供一定的理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鲊广椒样品:采自湖北省保康地区的农户家,所有样品均以玉米和二荆条红辣椒为原料,样品采集后装入经紫外线照射的采样瓶,并置于含有冰袋的采样箱中,运回鄂西北传统发酵食品研究所进行样品处理。

玉米碴和二荆条红辣椒:市购;石蕊牛乳培养基、MRS培养基:青岛海博生物技术有限公司;氯化钠、碳酸钙、甘油、草酸铵结晶紫、碘、95%乙醇、番红、过氧化氢、磷酸二氢钾、三羟甲基氨基甲烷、十二烷基硫酸钠、氯仿、异戊醇、十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyl trimethylammonium bromide,CTAB)(均为分析纯):国药集团化学试剂有限公司;10×PCR Buffer、dNTP、Taq酶:北京全式金生物技术有限公司;琼脂糖:西班牙Biowest公司;27F、1495R通用引物:武汉天一辉远有限公司;阴离子溶液、阳离子溶液:日本INSENT公司;草酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、乙酸、柠檬酸、琥珀酸:西陇科学股份有限公司。

1.2 仪器与设备

YL90-2磨面机:上海捷朗机电有限公司;BS224S电子天平:北京赛多利斯仪器系统有限公司;ECLIPSE Ci生物显微镜:日本Nikon公司;XFS-280手提式压力蒸汽灭菌锅:浙江新丰医疗器械有限公司;DG250厌氧工作站:英国Don Whitley公司;vetiri梯度基因扩增仪:美国AB公司;UVPCDS8000凝胶成像分析系统:美国ProteinSimple公司;LRH-150生化培养箱:上海一恒科学仪器有限公司;PGJ-10-AS纯水仪:武汉品冠仪器设备有限公司;DYY-12电泳仪:北京六一仪器厂;SA402B味觉分析系统:日本Insent公司;PEN3便携式电子鼻:德国Airsense公司;LC-20ADXR高效液相色谱仪:日本岛津公司。

1.3 试验方法

1.3.1 乳酸菌的分离纯化

每份鲊广椒样品取5 g于150 mL石蕊牛乳培养基中37 ℃增殖培养24 h后,选10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}、10^{-6} 6个梯度进行倍比稀释,继而用移液器吸取200 μL各梯度稀释液分别涂布于含有碳酸钙的MRS固体培养基上,并于厌氧工作站中37 ℃培养48 h,厌氧工作站通入体积比为85∶10∶5的氮气、氢气和二氧化碳混合气体[12]。挑选平板上有溶解圈且形态、大小和颜色等均不相同的菌落进行2次划线,并将得到的单一菌株进行革兰氏染色和过氧化氢酶试验,选择革兰氏阳性和过氧氢酶阴性的菌株定义为疑似乳酸菌菌株,并用甘油管冷冻保藏法保藏后置于-80 ℃备用。

1.3.2 乳酸菌基因组DNA提取、16S rRNA聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)扩增和菌株鉴定

使用CTAB法进行DNA提取[13],提取后的DNA样品置-20 ℃暂存备用。以此DNA为模板,利用PCR扩增其16S rRNA基因片断。PCR扩增体系(50 μL)的配制:27F和1495R各1 μL、模板1 μL、10×PCR Buffer

5 μL、dNTP 4 μL、Taq 酶 0.4 μL，最后加无菌超纯水 37.6 μL 至 50 μL。PCR 扩增程序：94 ℃预变性 4 min，94 ℃变性 45 s，55 ℃退火 45 s，72 ℃延伸 1 min30 s 循环 30 次，72 ℃延伸 10 min，4 ℃保温[12]。

取上述 PCR 产物 2.5 μL 进行琼脂糖凝胶电泳，胶的浓度为 1 %，电泳后染色观察，用凝胶成像仪照相。将扩增成功的 PCR 产物用 PCR 清洁试剂盒清洁，清洁后 PCR 产物进行连接、转化、鉴定后送武汉天一辉远有限公司测序。序列测序结束后用 DNAMAN 对序列结果进行拼接及引物序列校准，然后用于同源性比对和构建系统发育树。所得序列在美国国立生物技术信息中心（National Center for Biotechnology Information，NCBI）数据库中进行 BLAST（Basic Local Alignment Search Tool）同源性比对，以同源性大于等于 99 %为分界阈值鉴定待测菌株[14]，将菌株序列提交至 GeneBank，获得登录号（MH656804–MH656824）。利用 MEGA7 与模式菌株进行系统进化亲缘关系研究并构建系统发育树。

1.3.3　植物乳杆菌纯种发酵鲊广椒样品的制备

取 750 g 玉米碴、225 g 切碎的二荆条红辣椒（保留其汁液和水分）、3.15 g 花椒粉、3.15 g 胡椒粉、75 g 食盐混合均匀备用。1.3.2 中分离鉴定的 13 株植物乳杆菌使用 MRS 液体培养基活化 3 代，离心收集菌体，用 50 mL 生理盐水悬浮后，按照 5×10^6/g 原料的比例接入混合均匀的鲊广椒原料中，同时以不添加乳酸菌的样品作为对照。将 2 L 玻璃泡菜坛坛口擦拭干净，使用喷壶于坛口喷洒 3 mL 白酒，盖盖后自来水封口，30 ℃发酵 21 d，样品备用。

1.3.4　植物乳杆菌纯种发酵鲊广椒风味、滋味和有机酸构成的评价

将 10 g 鲊广椒置于样品瓶中，60 ℃保温 20 min 后室温 25 ℃平衡 10 min。参照杨成聪等[15]的方法，使用 PEN3 便携式电子鼻对其风味品质进行评价。

将 50 g 鲊广椒加入 150 mL 去离子水浸泡 30 min 后，12 000 r/min 离心 10 min 取上清，上清液置于 100 mL 量筒中 4 ℃过夜，取中间无油脂和残渣的澄清液体备用。参照王玉荣等[16]的方法，使用 SA402B 味觉分析系统对其酸味、苦味、涩味、咸味、鲜味、后味 A、后味 B（苦味的回味）和丰度（鲜味的回味）的相对强度进行测定。

将 20.00 g 鲊广椒至 100 mL 容量瓶中，用 0.01 mol/L 的磷酸二氢钾溶液定容后浸泡 30 min，浸泡液 12 000 r/min 离心 10 min 取上清液过 0.45 μm 滤膜，滤液备用。参照杨成聪等[17]的方法，使用高效液相色谱法对其乳酸、乙酸、草酸、酒石酸、琥珀酸、苹果酸和柠檬酸含量进行检测。

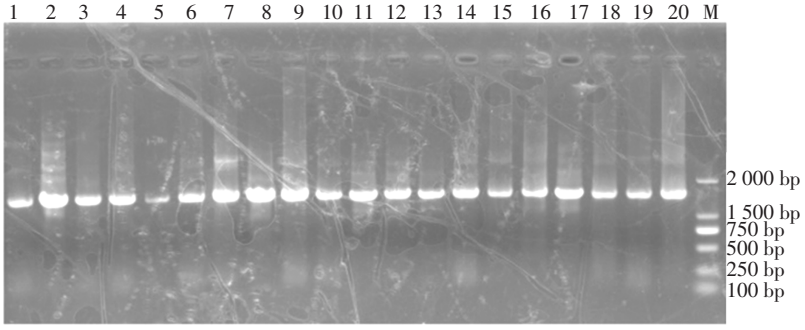
1.3.5　数据分析

基于电子鼻和电子舌数据矩阵，使用主成分分析（principal component analysis，PCA）对植物乳杆菌纯种发酵鲊广椒的品质进行评价。使用 SAS9.0 软件 PCA，使用 Origin 2017 软件绘图，使用 Mega7.0 软件进行系统发育树绘制。

2　结果与分析

2.1　保康地区鲊广椒中乳酸菌的分离鉴定

本研究共从湖北保康地区采集以玉米和二荆条辣椒为原料制作的鲊广椒样品 7 份，采用纯培养技术共分离出 20 株疑似乳酸菌，在对其基因组 DNA 进行提取的基础上，以 16S rRNA 基因全长序列为靶点进行了 PCR 扩增，使用 1.0 %的琼脂糖凝胶电泳对产物进行了检测，结果如图 1 所示。



泳道 1~8：菌株 HBUAS52321~52328；泳道 9~20：菌株 HBUAS52330~52341；M：DL2000 marker。

图 1　16S rRNA PCR 扩增产物电泳图

Fig.1　Electrophoresis map of PCR amplification products of 16S rDNA

由图 1 可知，在凝胶成像系统下观察，20 条泳道中 PCR 扩增产物条带单一且明显，长度约在 1 500 bp。由此可见，PCR 无非特异性扩增，且扩增产物浓度较高，符合后续清洁、连接、转化和鉴定的需要。

将测序反馈回的序列信息进行比对后,与同源性比对结果≥99 %的模式菌株进行系统发育树构建,结果如图 2 所示。

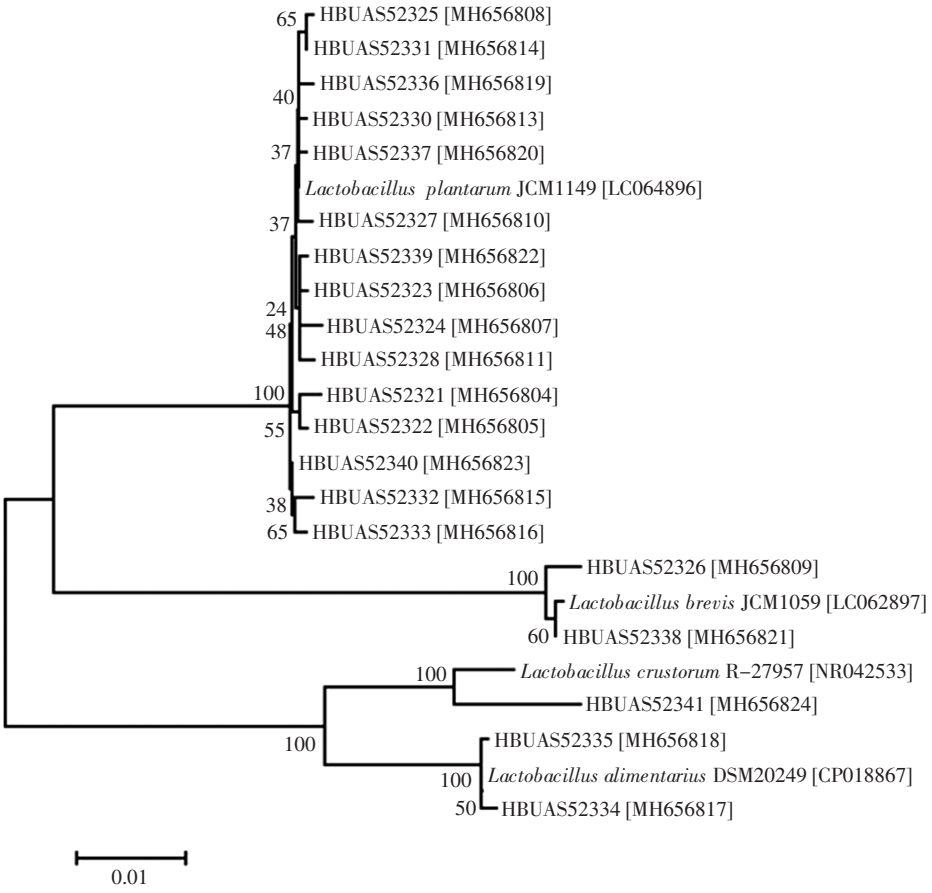


图 2 系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree

由图 2 可知,分离出的 20 株疑似乳酸菌被鉴定为 4 个种,其中菌株 HBUAS52326 和 HBUAS52338 与模式株 *Lactobacillus brevis* JCM1059 位于 1 个分支上,因而鉴定为短乳杆菌(*L. brevis*);菌株 HBUAS52335 和 HBUAS52334 与模式株 *L. alimentarius* DSM20249 位于 1 个分支上,因而鉴定为食品乳杆菌(*L. alimentarius*);菌株 HBUAS52341 与模式株 *L. crustorum* R-27957 位于 1 个分支上,因而鉴定为面包乳杆菌(*L. crustorum*);其他 15 株乳酸菌均与模式株 *L. plantarum* JCM1149 位于 1 个分支上,因而鉴定为植物乳杆菌(*L. plantarum*)。由此可见,植物乳杆菌为保康地区鲊广椒中的优势乳酸菌,占分离株总数的 75.0 %。值得一提的是,所有菌株与模式株的同源性均为 100 %,因而本研究的鉴定结果具有较高的可靠性。

2.2 植物乳杆菌纯种发酵制备鲊广椒风味品质的评价

在对保康地区鲊广椒中乳酸菌进行分离鉴定的基础上,本研究拟进一步评价植物乳杆菌纯种发酵对鲊广椒品质的影响。由于 *L. plantarum* HBUAS52330 和 *L. plantarum* HBUAS52331 在 MRS 液体培养基中生长缓慢,因而选取了其他 13 株植物乳杆菌进行了鲊广椒的制备。电子鼻各传感器对不同处理鲊广椒响应值的差异性分析如表 1 所示。

表 1 电子鼻各传感器对不同处理鲊广椒响应值的差异性分析

Table 1 Difference analysis of response value of Zhaguangjiao samples with different treatment by electronic nose

金属传感器	性能描述	自然发酵	植物乳杆菌纯种发酵
W1C	对芳香类物质灵敏	0.30	0.32(0.32,0.29~0.37)
W5S	对氢氧化物灵敏	9.50	8.97(9.22,5.98~10.97)
W3C	对芳香类物质灵敏	0.40	0.42(0.41,0.39~0.48)
W6S	对氢气有选择性	1.00	1.00(0.99,0.98~1.08)

续表 1　电子鼻各传感器对不同处理鲊广椒响应值的差异性分析

Continue table 1　Difference analysis of response value of Zhaguangjiao samples with different treatment by electronic nose

金属传感器	性能描述	自然发酵	植物乳杆菌纯种发酵
W5C	对烷烃、芳香类物质灵敏	0.46	0.49(0.48,0.46~0.57)
W1S	对甲烷灵敏	18.44	16.74(17.23,12.27~19.43)
W1W	对有机硫化物灵敏	16.40	15.36(15.25,10.75~18.83)
W2S	对乙醇灵敏	5.97	5.77(5.79,4.69~6.76)
W2W	对有机硫化物灵敏	8.30	8.08(8.10,6.85~8.84)
W3S	对烷烃类物质灵敏	0.96	0.97(0.97,0.95~1.00)

注:0.32(0.32 ,0.29~0.37)表示平均值(中位数,最小值~最大值)。

由表 1 数据可知，植物乳杆菌纯种发酵的多数鲊广椒挥发性风味物质中芳香类物质和烷烃类物质明显增多,而氢氧化物、甲烷、乙醇和有机硫化物含量明显下降。因芳香类物质为鲊广椒特征性风味指标的重要组成部分,而乙醇和有机硫化物为缺陷型指标的组成部分,因而多数植物乳杆菌进行纯种发酵可明显提升鲊广椒的风味品质。

2.3　植物乳杆菌纯种发酵制备鲊广椒滋味品质的评价

在使用电子鼻对植物乳杆菌纯种发酵鲊广椒风味品质进行评价的同时,进一步使用电子舌对其滋味品质进行评价。在进行数据处理时,将自然发酵的鲊广椒各滋味品质均设置为 0，各植物乳杆菌纯种发酵鲊广椒样品减去自然发酵鲊广椒各滋味指标的原始强度值即为其相对强度值。植物乳杆菌纯种发酵鲊广椒各滋味指标相对强度的箱形图如图 3 所示。

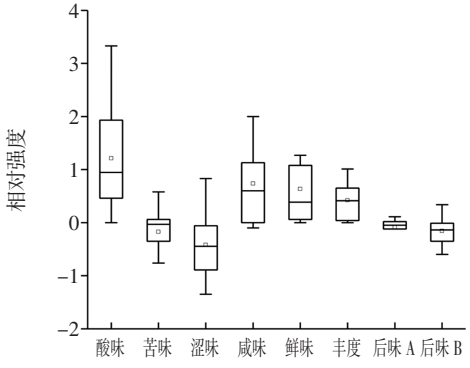


图 3　植物乳杆菌纯种发酵鲊广椒各滋味指标相对强度的箱形图

Fig.3　Box plot of response value of Zhaguangjiao samples fermented by *L. plantarum* with electronic tongue

由图 3 可知,鲊广椒样品在涩味、酸味和鲜味 3 个指标上的差异性较大，其极差值分别为 3.36、3.26 和 2.88;其次为咸味、苦味和丰度(鲜味的回味),极差值分别为 2.10、1.81 和 1.00;而在后味 B(苦味的回味)和后味 A(涩味的回味)2 个指标上的差异较小,极差值仅为 0.94 和 0.75。由图 3 亦可知,植物乳杆菌纯种发酵制备的鲊广椒酸味、咸味、鲜味和丰度(鲜味的回味)相对强度明显高于自然发酵,而多数样品的苦味和涩味呈现出相反的趋势。

由于酸味和鲜味为鲊广椒的特征性指标,而苦味和涩味为缺陷型指标,因而采用植物乳杆菌纯种发酵制备鲊广椒可明显提升产品的滋味品质。本研究进一步采用高效液相色谱法对鲊广椒中有机酸的种类和含量进行了分析,结果如图 4 所示。

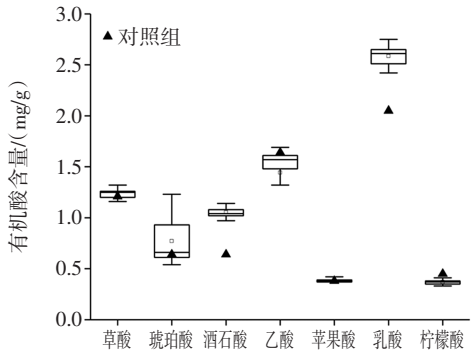


图 4　植物乳杆菌纯种发酵鲊广椒各有机酸含量的箱形图

Fig.4　The box plot of content of organic acids in Zhaguangjiao samples fermented by *L. plantarum*

由图 4 可知，乳酸和乙酸为鲊广椒中的主要有机酸,本研究制备的 14 个鲊广椒样品中其平均含量分别为 2.58 mg/g 和 1.44 mg/g;其次为草酸、酒石酸和琥珀酸,平均相对含量分别为 1.24、1.05 mg/g 和 0.77 mg/g;虽然含有苹果酸和柠檬酸，但平均相对含量仅为 0.39 mg/g 和 0.37 mg/g。由图 4 亦可知,植物乳杆菌纯种发酵制备的鲊广椒中乳酸和酒石酸含量明显偏高,这可能是导致鲊广椒样品酸味升高的主要原因。

2.4　基于 PCA 植物乳杆菌纯种发酵制备鲊广椒品质的评价

进一步采用 PCA 以电子鼻和电子舌的 18 个指标为参数,采用因子载荷图对各指标进行了分类,同时采用因子得分图对不同处理鲊广椒样品进行了空间排布。因子载荷图如图 5 所示。

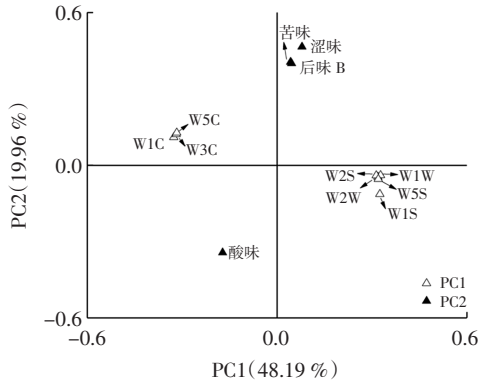


图 5 基于 PCA 的 PC1 和 PC2 因子载荷图

Fig.5 Factor loading diagram of PC1 and PC2 based on PCA

由图 5 可知,第一主成分(principal component 1,PC1)与 PC2 的贡献率分别为 48.19 %和 19.96 %,在进行 PCA 时若主成分贡献率越大则表示该主成分反映原有多指标的信息越全面[18]。由此可见,仅采用 PC1 和 PC2 信息即可反映本研究近 70 %的数据信息,因而本研究的分析结果相对可靠。由图 5 亦可知,PC1 主要由 W1C、W3C、W5C、W1W、W5S、W2W、W1S 和 W2S 构成,且 W1C、W3C、W5C 这 3 个对芳香类物质敏感的传感器均位于 X 轴负方向;PC2 主要由酸味、苦味、涩味和后味 B(苦味的回味)构成,且鲊广椒的特征性风味物质酸味主要位于 Y 轴负方向。由此可见,PC1 主要由风味指标构成,PC2 主要由滋味指标构成,且在因子得分图中空间排布越偏向左下方的鲊广椒样品其品质越好。因子得分图如图 6 所示。

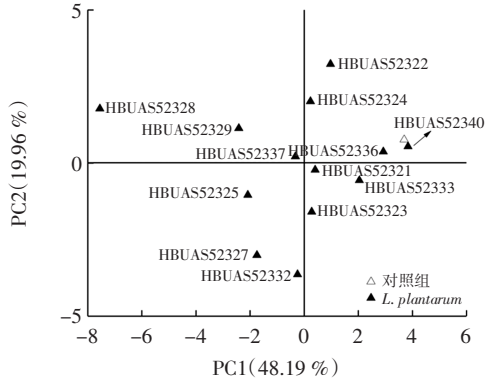


图 6 基于 PCA 的 PC1 和 PC2 因子得分图

Fig.6 Factor scores diagram of PC1 and PC2 based on PCA

由图 6 可知,植物乳杆菌纯种发酵制备的多数鲊广椒样品空间排布较之对照组偏向左下方,因而多数植物乳杆菌进行纯种发酵可明显提升鲊广椒的品质。较之其他菌株,*L. plantarum* HBUAS52332 制备的鲊广椒虽然风味品质一般,但其酸味较为浓郁,*L. plantarum* HBUAS52327 制备的鲊广椒风味和滋味品质均较佳。由此可见,*L. plantarum* HBUAS52327 和 *L. plantarum* HBUAS52332 可进一步用于后续具有优良鲊广椒发酵特性菌株的筛选。

3 结论

植物乳杆菌为保康地区鲊广椒中的优势乳酸菌,多数植物乳杆菌菌株进行纯种发酵可明显提升鲊广椒的风味和滋味品质。乳酸和乙酸为鲊广椒中的主要有机酸,植物乳杆菌纯种发酵制备的鲊广椒中乳酸和酒石酸含量明显偏高。*L. plantarum* HBUAS52327 和 *L. plantarum* HBUAS52332 纯种发酵制备的鲊广椒样品具有较好的品质,可进一步用于后续具有优良鲊广椒发酵特性乳酸菌菌株的筛选。

参考文献:

[1] 肖潇,饶坤,叶苗.论山区县域的旅游可持续发展之路——以湖北省保康县为例[J]. 学理论, 2018, 15(2): 116-118

[2] 刘毕琴,芦夏霏,柳陈坚,等.乳酸菌贡献细菌型豆豉风味的研究进展[J]. 核农学报, 2016, 30(1): 136-144

[3] 王玉荣,孙永坤,代凯文,等. 基于单分子实时测序技术的 3 个当阳广椒样品细菌多样性研究[J]. 食品工业科技, 2018, 39(2): 108-112

[4] 王玉荣,沈馨,董蕴,等.鲊广椒细菌多样性评价及其对风味的影响[J]. 食品与机械, 2018, 34(4): 25-30

[5] Liu A P, Li X Y, Pu B, et al. Use of psychrotolerant lactic acid bacteria (*Lactobacillus* spp. and *Leuconostoc* spp.) isolated from Chinese traditional paocai for the quality improvement of paocai products[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65 (12): 2580-2587

[6] Hu Y X, Liu X L, Shan C J, et al. Novel bacteriocin produced by *Lactobacillus alimentarius* FM-MM 4 from a traditional Chinese fermented meat Nanx Wudl: Purification, identification and antimicrobial characteristics[J]. Food Control, 2017, 77: 290-297

[7] DENG Y U,MAN C,FAN Y,et al. Preparation of elemental selenium-enriched fermented milk by newly isolated *Lactobacillus brevis* from kefir grains[J]. International Dairy Journal, 2015, 44(5): 31-36

[8] Berbegal C, Peña N, Russo P, et al. Technological properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from grape must fermentation[J]. Food Microbiology, 2016, 57: 187-194

[9] WANG P,LI Y,XIAO H,et al. Isolation of *Lactobacillus reuteri* from Peyer's patches and their effects on sIgA production and gut microbiota diversity[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2016, 60(9): 2020-2030

[10] SHIDA K, SATO T, IIZUKA R, et al. Daily intake of fermented milk with *Lactobacillus casei* strain Shirota reduces the incidence and duration of upper respiratory tract infections in healthy middle-aged office workers[J]. European Journal of Nutrition, 2017, 56(1): 45-53

[11] CANI P D,VAN HUL M. Novel opportunities for next-generation probiotics targeting metabolic syndrome[J]. Current Opinion in Bio-

DOI:10.12161/j.issn.1005-6521.2019.16.029

自然发酵腐乳中细菌多样性评价

李娜[1],崔梦君[1],马佳佳[1],余海忠[1],张振东[1],郭壮[1,2],赵慧君[1,*]
(1.湖北文理学院 食品科学技术学院 鄂西北传统发酵食品研究所,湖北 襄阳 441053;2.恩施市公共检验检测中心,湖北 恩施 445000)

摘　要:以腐乳为研究对象,利用变性梯度凝胶电泳(polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis,PCR-DGGE)技术与Miseq高通量测序技术相结合的手段解析及评价细菌多样性,同时利用传统纯培养的方法对乳酸菌进行分离、纯化与鉴定。结果显示:腐乳中主要微生物为变形菌门(Proteobacteria,80.45%),其中绿脓杆菌属、不动杆菌属、鞘氨醇杆菌属、布丘氏菌属和草螺菌属细菌为优势细菌属。同时通过PCR-DGGE和纯培养发现腐乳中鉴定出7株乳酸菌,其中2株为戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*),1株为乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*),4株为屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)。由此可知腐乳中蕴含着丰富的微生物资源,同时屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)为优势乳酸菌。

关键词:腐乳;变性梯度凝胶电泳;Miseq高通量测序;细菌多样性;乳酸菌

Evaluation of Bacterial Diversity in Natural Fermented Sufu

LI Na[1], CUI Meng-jun[1], MA Jia-jia[1], YU Hai-zhong[1], ZHANG Zhen-dong[1], GUO Zhuang[1,2], ZHAO Hui-jun[1,*]
(1. Northwest Hubei Research Institute of Traditional Fermented Food, College of Food Science and Technology, Hubei University of Arts and Science, Xiangyang 441053, Hubei, China; 2. Enshi Public Inspection and Testing Center, Enshi 445000, Hubei, China)

Abstract: The bacterial diversity of sufu in Enshi was analyzed and evaluated by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) technologies and Miseq high throughput sequencing. The results showed that Proteobacteria(80.45%) was main microbial in sufu and the dominant bacteria generas were *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Sphingobacterium*, *Buttiauxella* and *Herbaspirillum*. Furthermore, by using of PCR-DGGE and pure culture methods turned out that there were 7 strains of Lactic acid bacteria were isolated from sufo and 2 strains were *Pediococcus pentosaceus*, one strain was *Pediococcus acidilactici* and 4 strains

基金项目:湖北省荆楚卓越工程师协同育人计划(201657);湖北文理学院2018年度学科开放基金项目(931102)
作者简介:李娜(1998—),女(汉),学士,研究方向:食品生物技术。
*通信作者:赵慧君(1979—),女(汉),副教授,博士,研究方向:食品生物技术。

technology, 2015, 32(4): 21-27
[12] 郭壮,蔡宏宇,杨成聪,等. 六名襄阳地区青年志愿者肠道菌群多样性的研究[J]. 中国微生态学杂志, 2017, 29(9): 998-1004
[13] 王笋,吕嘉枥,辛博,等. 西北地区泡菜中乳酸杆菌的生物学特性[J]. 中国调味品, 2014, 39(3): 15-18
[14] 王炜宏,杜晓华,张家超,等. 内蒙古鄂尔多斯地区酸粥发酵液中乳酸菌的分离鉴定[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(2): 265-270
[15] 杨成聪,刘丹丹,葛东颖,等. 基于气相色谱-质谱联用技术结合电子鼻评价浸米时间对黄酒风味品质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(8): 265-270
[16] 王玉荣,张俊英,潘婷,等.籼米米酒和糯米米酒品质的评价[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(1): 186-191
[17] 杨成聪,沈馨,马雪伟,等.高效液相色谱法测定米酒中有机酸的含量[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(10): 116-123
[18] 徐亚丹,王俊,赵国军.基于电子鼻的对掺假的"伊利"牛奶的检测[J]. 中国食品学报, 2006, 19(5): 111-118

收稿日期:2018-10-19