

刘建利, 何旭, 孙钦飞. 降解草酸盐乳酸菌株的筛选及其酸乳发酵特性 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(12): 111-118. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020090129

LIU Jianli, HE Xu, SUN Qinfei. Screening of High Oxalate-degrading Lactic Acid Bacterial Strains and Its Characteristics in Yogurt Fermentation [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(12): 111-118. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020090129

· 生物工程 ·

降解草酸盐乳酸菌株的筛选及其 酸乳发酵特性

刘建利, 何旭, 孙钦飞

(北方民族大学生物科学与工程学院, 宁夏银川 750021)

摘要: 本实验以来源于自制酸奶、泡菜、酵头等特色发酵食品的 49 株乳酸菌为候选菌株, 分光光度法测定菌株体外降解草酸盐能力和模拟胃肠道耐受性, 主成分分析法评价各菌株发酵酸乳特性。结果表明, 9 株菌草酸盐降解率在 70% 以上, 最高达 86.96%; 其中, 菌株“四川郫县 A1”、菌株“鄂温克”、菌株“鲁青 6”在 pH3.0 酸溶液、人工模拟胃液、胆盐溶液、人工模拟肠液存活率均在 50% 以上; 菌株“鲁青 6”和菌株“鄂温克”发酵酸乳的感官评价、持水力、酸度、后酸度、破裂力、硬度、胶粘性、内聚力、咀嚼性、弹性等特性均较优; 16S rDNA 序列分析表明, 菌株“鲁青 6”为食窦魏斯氏菌, 菌株“鄂温克”为副干酪乳杆菌。菌株“鲁青 6”和菌株“鄂温克”既能高效降解草酸盐, 又能耐受胃肠道环境, 同时在酸乳中发酵特性优良, 可作为功能酸乳开发候选菌株。

关键词: 降解草酸盐, 乳酸菌, 胃肠道耐受性, 酸乳发酵

中图分类号: TS252.54

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)12-0111-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020090129

Screening of High Oxalate-degrading Lactic Acid Bacterial Strains and Its Characteristics in Yogurt Fermentation

LIU Jianli, HE Xu, SUN Qinfei

(College of Biological Sciences and Engineering, North Minzu University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: In this paper, 49 strains of lactic acid bacteria from self-made yogurt, pickles, fermented head and other characteristic fermented food were selected as candidate strains. The oxalate degradation ability and tolerance of simulated gastrointestinal tract *in vitro* were determined by spectrophotometry, and the characteristics of fermented yogurt were evaluated by principal component analysis. The result showed that the oxalate-degradation rate of 9 strains was more than 70%, the highest was 86.96%. Among them, the survival rate of the strains “Sichuan Pixian A1”, “Ewenki”, “Luqing6” in pH3.0 acid solution, artificial simulated gastric juice, bile salt solution and artificial simulated intestinal juice was more than 50%. The sensory evaluation, holding water capacity, titratable acidity, post-acidity, rupture force, hardness, gumminess, cohesiveness, chewiness and springiness of yoghurt fermented with the strains “Ewenki” and “Luqing6” were better. The strains “Ewenki” and “Luqing6” were *Weissella cibaria* and *Lactobacillus paracasei*. They could efficiently degrade oxalate and tolerate gastrointestinal environment, and at the same time, they had good fermentation characteristics in yoghurt and would be used as candidate strains for the development of functional yoghurt.

Key words: oxalate-degrading; lactic acid bacteria; gastrointestinal tolerance; yoghurt fermentation

食源性草酸在肠道的吸收和分解与高草酸尿症导致的草酸钙肾结石有密切关系^[1-2], 虽然理论上可以通过控制食源草酸的摄入来减少肠道对草酸的吸

收, 进而降低尿液中草酸的浓度, 但许多常见的食物均含草酸, 导致控制草酸摄入量这一途径难以实现。因此, 加强肠道微生物对草酸的分解, 是预防草酸钙

收稿日期: 2020-09-14

基金项目: 宁夏自然科学基金(2018AAC03247)。

作者简介: 刘建利(1973-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 微生物学, E-mail: LJL7523@126.com。

结石较为理想的方法^[3-4]。

对于草酸盐降解菌,目前研究最深入的是食草杆菌(*Oxalobacter formigenes*),该菌能以草酸盐作为其生长代谢的唯一或主要碳源,降解草酸效果显著^[5-7]。但草酸杆菌不能很好地适应胃肠道环境,并且其生长必须有高浓度草酸,致使其胃肠道长期定植的难度大大增加。因此,只能在高草酸尿症治疗中使用^[5,8]。

近年来,有研究表明乳酸菌能分解草酸盐作为碳源,但其生长不依赖草酸盐浓度,不以草酸盐作为唯一可利用碳源,是典型的兼性草酸营养型细菌,再加之乳酸菌在肠道内定植方面的天然优势,使其在预防高草酸尿症方面具有独特的优势^[9-10]。已报道的能降解草酸盐的乳酸菌包括乳杆菌属(*Lactobacillus*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)、乳球菌属(*Lactococcus*)等^[10-11]。通过酸乳摄入能定植于人体胃肠道的高效降解草酸盐乳酸菌是一种预防草酸钙肾结石的新途径,以往的研究只关注乳酸菌的草酸盐降解性能,鲜有涉及高效降解草酸盐菌株的酸乳发酵性能。因此,将这些高效降解草酸盐菌株应用于酸乳发酵,需要明确其酸乳发酵特性。

本实验通过检测从牧区自制酸奶、家庭自制泡菜、酵头等特色发酵食品分离的乳酸菌降解草酸盐能力、体外胃肠道耐受能力、发酵酸乳能力,以期获得既能高效降解草酸盐,又能耐受胃肠道环境,同时

在酸乳中发酵特性优良菌株,为功能酸乳奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

49株乳酸菌(见表1) 北方民族大学生物科学实验示范中心保存;德氏乳杆菌保加利亚亚种(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 1805) 宁夏夏进乳业股份有限公司;胃蛋白酶(500 U/mg)、牛胆盐 Biotopped 公司;胰蛋白酶(250 U/mg) 北京拜耳迪生物公司;酵母提取物 英国 Oxoid 公司;牛肉浸粉 青岛海博生物技术有限公司;纯牛奶 伊利利乐枕纯牛奶;葡萄糖、草酸钠、氯化钠、碳酸氢钠、酸氢二钾、无水乙酸钠、柠檬酸二铵、硫酸镁、硫酸钙、硫酸锰、吐温 80 天津市大茂化学试剂厂;酸溶液参考鲍雅静等^[12]、胆盐溶液等参考张丽^[13]、人工模拟胃液参考杨续金^[14]、人工模拟肠液参考张磊^[15]和王立平^[16]文献配制;草酸盐培养基:MRS 培养基^[16]经高压蒸汽灭菌后,待温度冷却到约 60 ℃ 时,在 500 mL MRS 培养基中加入 500 mL 使用 0.22 μm 滤膜过滤的 20 mmol/L 草酸钠溶液,使其最终浓度为 10 mmol/L。

SC-30 型恒温水浴锅 上海汉诺有限公司;UV765 型分光光度计 上海精科有限公司;TMS-PRO 质构仪 配有不同规格的圆柱探头 P/75,美国 FTC 公司;UV-5500 紫外分光光度计 上海精密仪器仪表有限公司。

表 1 菌株编号及来源

Table 1 Name and source of strains

| 菌株名称 | 来源 | 菌株名称 | 来源 | 菌株名称 | 来源 | 菌株名称 | 来源 |
|--------|---------------|--------|-----------------|---------|------------|--------|--------------|
| 天水A1 | 甘肃天水农户自制芹菜浆水 | 鲜豆腐1 | 内蒙古通辽农户自制鲜奶豆腐 | 定西BIII1 | 甘肃定西农户自制浆水 | 云南昆明A | 云南昆明农户自制泡菜 |
| 天水A3 | 甘肃天水农户自制芹菜浆水 | 新乌1 | 新疆乌鲁木齐天山区农户自制酸奶 | 定西BII | 甘肃定西农户自制浆水 | 云大陈8 | 云南大理农户自制泡菜 |
| 武都AVII | 甘肃武都农户自制芹菜浆水 | 酸豆腐A2 | 内蒙古通辽农户自制酸奶豆腐 | 江西南昌A2 | 江西南昌农户自制泡菜 | 鲁青2 | 山东青岛农户发面引子 |
| 山东菏泽1 | 山东菏泽农户发面引子 | 山南奶圈1 | 西藏山南牧民自制奶圈 | 江西南昌A5 | 江西南昌农户自制泡菜 | 云大段2 | 云南大理农户自制乳扇 |
| 山东菏泽7 | 山东菏泽农户发面引子 | 藏嘎圈3 | 西藏贡嘎牧民自制奶圈 | 四川郫县A1 | 四川郫县农户自制泡菜 | 冀承1 | 河北省承德农户发面引子 |
| 贵腌10 | 贵州六盘水农户自制腌肉 | 青黄南5 | 青海黄南牧民自制曲拉 | 四川郫县A8 | 四川郫县农户自制泡菜 | 北海2-11 | 广西北海农户自制泡菜 |
| 甘醇10 | 甘肃平凉农户发面酵头 | 拉丝酸奶1 | 新疆阿克苏农户自制拉丝酸奶 | 鲁青6 | 山东青岛农户发面引子 | 晋太1-5 | 山西太谷农户发面引子 |
| 酸奶五1 | 宁夏银川平吉堡农户自制酸奶 | 山南酸奶1 | 西藏山南农户自制酸奶 | 鲁青7 | 山东青岛农户发面引子 | 北海2-4 | 广西北海农户自制泡菜 |
| 驼奶9 | 新疆阿勒泰市农户鲜骆驼奶 | 新D9 | 新疆富蕴县阿勒泰农户自制酸奶 | 鲁宾1 | 山东滨州农户发面引子 | 鲁济19 | 山东济南农户发面引子 |
| 山羊奶3 | 新疆阿勒泰市农户鲜山羊奶 | 新E5 | 新疆喀什农户自制酸奶 | 鲁宾4 | 山东滨州农户发面引子 | 荷A11 | 山东省菏泽市农户发面引子 |
| 酸奶二5 | 宁夏银川吴忠农户自制酸奶 | 定西BII2 | 甘肃定西农户自制浆水 | 湖北A | 湖北孝感农户自制泡菜 | 定西BII2 | 甘肃定西农户自制浆水 |
| 宁奶 | 宁夏银川平吉堡鲜奶 | 定西BII4 | 甘肃定西农户自制浆水 | 甘庆10 | 甘肃庆阳农户发面酵头 | 安A | 安徽合肥农户自制泡菜 |
| 鄂温克 | 内蒙古鄂温克旗农户自制酸奶 | | | | | | |

1.2 实验方法

1.2.1 高效降解草酸盐菌株的筛选

1.2.1.1 草酸盐标准曲线的制备 以草酸能催化铬酸钾氧化甲基红的原理,用分光光度法测量草酸盐浓度^[17-18]。取 7 个 10 mL 的容量瓶分别加入 0、0.8、1.6、2.4、3.2、4.0、4.8 mL 用 1 mmol/L 草酸钠储备液稀释成为 50 mol/L 草酸钠工作液,用蒸馏水定容到刻度后加入 2.0 mL 0.4 mol/L 盐酸,2.0 mL 0.1 mmol/L 甲基红溶液,4 mL 1.0 mmol/L 铬酸钾溶液,摇匀反应 15 min,加入 1 mL 1.0 mmol/L Zr(IV)摇匀终止反应。以蒸馏水做参比在 515 nm 处测其硫酸钙吸光度值。以草酸钠浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标,在 Excel 中绘制标准曲线,回归方程 $y = -0.0189x + 0.7701$, 决定系数 $R^2 = 0.9912$ 。

1.2.1.2 回收率实验 参考金朝霞^[19]、董婷婷^[20]的方法,取 5 mL 含 10 mmol/L 草酸钠的 MRS 培养基,37 °C 100 r/min 摇床培养 48 h,取 1.5 mL 培养液,2500 r/min 离心 10 min,取 1 mL 上清液于 10 mL 的刻度试管中,加 5 mL 蒸馏水,用少量 0.25 mol/L NaOH 或者 0.1 mol/L 盐酸调 pH 至中性,蒸馏水定容至 10 mL 再进行 50 倍稀释,取 10 mL 稀释液于离心管中,加 2.0 mL 饱和硫酸钙和 20 mL 95% 乙醇混匀。室温加盖静置 3 h,2500 r/min 离心 10 min,倒出上清液,沉淀即为草酸盐待测物。同标曲的方法,加入 2.0 mL 0.4 mol/L 盐酸后做相同处理,以蒸馏水做参比在 515 nm 处测吸光度值,代入标曲中计算获得检测液中草酸钠的浓度。

培养基中草酸钠浓度(mmol/L)=检测液中草酸钠浓度($\mu\text{mol/L}$) $\times 500/1000$

式中:500 表示培养液到测定液的稀释倍数。

回收率(%)=对照培养基中草酸钠浓度 $\times 100/10$

式中:10 表示培养基配制时加入的草酸钠浓度 10 mmol/L。

1.2.1.3 菌株降解草酸盐能力测定 将保存在-80 °C 的乳酸菌菌种在常温中融化后,按接种量为 2% 的比例接种于 5 mL MRS 培养基中、37 °C 100 r/min 摇床培养 18~24 h 进行活化。取 0.2 mL 活化菌液接种于 5 mL 含 10 mmol/L 草酸钠的 MRS 培养基,37 °C 100 r/min 摇床培养 48 h。以不接种乳酸菌,同样培养的空白草酸钠培养基为对照。当方法回收率在 90%~110% 时,测定试验菌株培养液和对照培养液的草酸钠浓度,计算各菌株草酸钠降解率。

降解率(%)=(1-菌株培养液草酸钠浓度/对照培养液草酸钠浓度) $\times 100$

1.2.2 菌株体外肠胃道耐受性测定 参考孙敏等^[21]、赵瑞香等^[22]、柏建玲等^[23]和朱宏等^[24]方法,稍作改动。将活化后的菌株按 2% 的比例接种于 5 mL MRS 液体培养基中,37 °C 100 r/min 摇床培养 24 h 后,取培养液 2 mL,12000 r/min 离心 2 min 收集菌

体,在超净工作台中倒掉上清液并加 2 mL 灭菌生理盐水进行重悬;吸取菌悬液 0.5 mL 分别加入到 4.5 mL pH3.0 盐酸溶液、人工模拟胃液、胆盐溶液、人工模拟肠液和灭菌生理盐水中,37 °C 100 r/min 摇床培养 4 h,取 500 μL 上述处理液到 5 mL 的 MRS 培养基中,37 °C 100 r/min 摇床培养 8 h 后,在 600 nm 处测吸光度值,用以下公式计算菌株存活率,以保加利亚乳杆菌为对照(CK)。

存活率(%)=(B/A) $\times 100$

式中:A 表示生理盐水中培养吸光度值;B 表示各处理液中培养吸光度值。

1.2.3 菌株酸乳发酵特性评价

1.2.3.1 菌悬液的制备 将筛选出的乳酸菌按 2% 的比例接种到 MRS 液体培养基中,37 °C 100 r/min 摇床培养 24 h,12000 r/min 离心 2 min 收集菌体并调整菌悬液波长 600 nm 出的吸光度值为 2.5,用无菌蒸馏水清洗 3 遍。

1.2.3.2 菌株发酵酸乳 参考袁凤霞等^[25]方法,在纯牛奶中按 15% 的比例加入白砂糖,搅拌溶解后,在高压灭菌锅中 95 °C、120 Pa 灭菌 5 min。准确量 4 mL 菌悬液加到灭菌的牛奶混合液中摇匀。在培养箱中 40 °C 发酵 8~12 h。以保加利亚乳杆菌发酵酸乳为对照(CK)。

1.2.3.3 酸乳品质感官评价 参照生庆海等^[26]制作的感官评价表,随机选 10 名 16 级食品科学与工程班的学生对 4 °C 冷藏 12 h 后熟的酸乳,按感官评价标准从气味、质地、口感三个方面进行评价,计算平均值(表 2)。

表 2 酸乳感官评定标准表

Table 2 Sensory evaluation standard of yoghurt

| 评价指标 | 得分标准 |
|---------|-----------------------|
| 气味(20分) | 有浓烈的奶香味(20~15分) |
| | 奶香味淡或不明显(14~4分) |
| | 出现臭味等异味(3~0分) |
| | 丝状粘稠或非常硬(40~35分) |
| 质地(40分) | 光滑均匀且无乳清析出(34~25分) |
| | 比较均匀或有少量乳清析出(24~16分) |
| | 粗糙,有乳清析出(15~6分) |
| | 粗糙且颗粒感明显,乳清析出严重(5~0分) |
| 口感(40分) | 酸甜充分融合(40~30分) |
| | 酸甜分明有层次感(29~20分) |
| | 过酸(19~10分) |
| | 过甜(9~6分) |
| | 有苦味(5~0分) |

1.2.3.4 酸乳质构特性的测定 参考杨莹莹等^[27]、徐鑫等^[28]方法,选择 TMS-75 mm 型号的测试探头测量酸乳的破裂力、硬度、内聚性、胶黏性、咀嚼性和弹性等质构指标。条件如下:最小触发力设置为 0.3 N、采样速度 10 Hz、两次压缩停留间隔为 0 s、测前和测后速率为 30 mm/min。

1.2.3.5 酸乳持水力测定 参考孙敏等^[21]、袁凤霞等^[25]方法,准确称取发酵后的酸乳 15 g, 4500 r/min 离心 10 min 后称取上清液的质量,并记录数据。持水力的计算公式如下所示:

$$X(\%)=(A-B)\times 100/A$$

式中: X 表示持水力, %; A 表示样品质量, g; B 表示上清液质量, g。

1.2.3.6 酸乳滴定酸度和后酸度测定 参考孙敏等^[21]、袁凤霞等^[25]方法,取 5 g 4 ℃ 贮存 0、3、6 d 的酸乳、40 mL 冷却煮沸水和 5 滴 5 g/L 酚酞酒精溶液,于三角瓶摇匀后,用已标定的 NaOH 标准溶液滴定到微红色,且颜色在 30 s 内不消失即为滴定终点,记录消耗的 NaOH 标准溶液所用的毫升数。后酸度为第 6 和第 0 d 的酸度差。

1.2.4 菌株分子生物学鉴定 参照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书; PCR 扩增 16S rDNA, 50 μL PCR 反应体系: 25 μL 10×PCR Mix、1 μL 10 μmol/L 的上下游引物(27F/1492R^[29])、1 μL 模板 DNA、22 μL ddH₂O。PCR 反应程序为: 预变性 94 ℃ 10 min; 变性 94 ℃ 1 min; 退火 56 ℃ 1 min; 延伸 72 ℃ 1 min; 30 个循环; 后延伸 72 ℃ 10 min, 由南京金斯瑞生物公司进行测序。将测序序列在 EZBioCloud 数据库中比对鉴定。分别以 *Weissella halotolerans*(AB022926.1) 和 *Lactobacillus bifermantans*(M58809.1) 16S rDNA 序列为外群, 利用 MrBayes3.2.5 构建系统发育树。

1.3 数据处理

实验重复 3 次, 用 Excel 作图, SPSS 21 软件对试验数据进行方差分析。

主成分分析法(PCA)评价^[30]; 采用 SPSS21 软件将发酵酸乳品质指标进行主成分分析, 取累计贡献率不低于 85% 且特征值大于 1.00 的因子作为主成分。利用主成分对发酵酸乳进行综合评价, 并将各主成分得分 Fi 乘以相应权重后求和, 就能得到综合评价函数。

2 结果与分析

2.1 高效降解草酸盐菌株筛选

49 株供试乳酸菌菌株表现出不同降解的效果, 有 7 株乳酸菌的培养基中草酸的降解率小于 0, 占总数的 14.3%, 在培养的过程中不仅没有降解草酸钠, 甚至出现草酸盐含量增长的现象; 23 株菌降解率 0%~30%, 占总数 46.94%; 降解率 31%~69% 的菌有 10 株, 占 20.41%; 只有菌株“天水 A1”、“四川郫县 A1”、“驼奶 9”、“鲁青 6”、“鄂温克”、“拉丝酸奶 1”、“山南酸奶 1”、“鲁济 19”、“云南昆明 A”等 9 株菌的降解率在 70% 以上, 占 18.36%(图 1), 9 株菌中降解率最高的是菌株“拉丝酸奶 1”, 达 86.96%(图 2)。

2.2 菌株体外胃肠道耐受性

测定草酸盐降解率高于 70% 的 9 株菌体外胃肠道耐受性, 结果如图 3, 在 pH3.0 的酸溶液中, 9 株

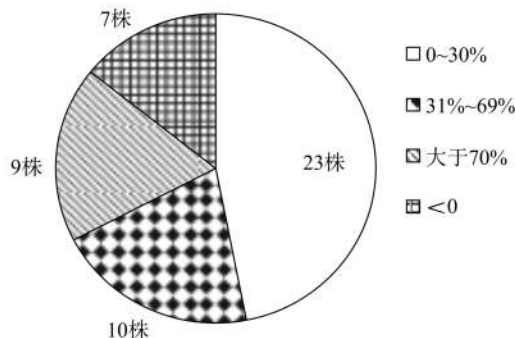


图 1 菌株草酸盐降解率

Fig.1 Oxalate-degradation rate of strains

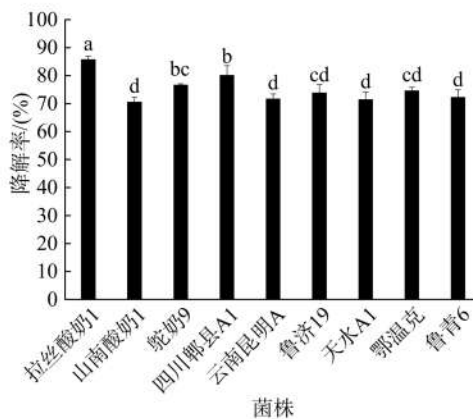


图 2 降解率高于 70% 菌株

Fig.2 Strains with oxalate-degradation rate more than 70% 注: 不同小写字母表示均值间存在显著差异 (P<0.05); 图 3~图 6 同。

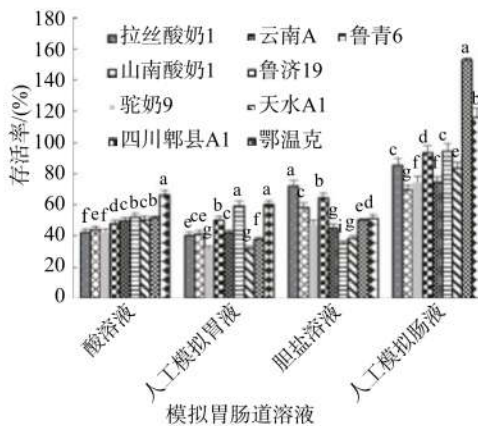


图 3 高效降解草酸盐菌株模拟胃肠道耐受性结果

Fig.3 Result of tolerance of strains with high efficient degradation oxalate in artificial simulated gastrointestinal tract environment

高降解菌的存活率在 31%~67% 之间, 其中最高的菌株是“鲁青 6”存活率为 66.36%; 在人工模拟胃液中, 9 株菌的存活率在 32%~61% 之间, 最高为菌株“鲁青 6”, 达 60.13%; 在胆盐溶液中, 9 株菌的存活率在 35%~73% 之间, 最高是菌株“拉丝酸奶 1”, 达 72.19%; 在人工模拟肠液中, 各菌株的存活率均在 69%~155% 之间, 菌株“鲁青 6”、“鄂温克”的存活率在 100% 以上, 分别为 116.12% 和 153.26%。选取

在各个溶液中的存活率耐受性均高于 50% 的 3 株菌株“四川郫县 A1”、“鄂温克”、“鲁青 6”作为在胃肠道耐受性较好菌株。

2.3 发酵酸乳特性评价

2.3.1 发酵酸乳品质感官评价 感官评价是发酵酸乳风味测评的一个重要手段,将体外胃肠道耐受性实验中筛选出的 3 株菌以及对照菌用于制作酸乳,在后熟之后对酸乳的质地、气味以及口感三个方面进行评价。结果如表 3,气味指标得分最高的是菌株对照保加利亚乳杆菌、菌株“四川郫县 A1”和菌株“鄂温克”菌株发酵酸乳;质地和口感得分最高的是对照保加利亚乳杆菌、菌株“鲁青 6”和菌株“鄂温克”菌株发酵酸乳;总计得分最高的是对照保加利亚乳杆菌和菌株“鲁青 6”发酵酸乳,最低的是菌株“四川郫县 A1”发酵酸乳。

表 3 各菌株发酵酸乳感官评价结果(分)

Table 3 Sensory evaluation scores of yoghourts fermented with different strains (scores)

| 菌株 | 气味得分 | 质地得分 | 口感得分 | 总计 |
|---------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| 四川郫县 A1 | 13.4±1.35 ^b | 26.5±1.78 ^b | 26.4±1.43 ^b | 66.3±2.71 ^c |
| 鲁青 6 | 14.7±1.25 ^{ab} | 31.4±2.50 ^a | 30.1±1.91 ^a | 76.2±3.11 ^{ab} |
| 鄂温克 | 13.8±1.54 ^b | 31.1±2.56 ^a | 29.1±1.66 ^a | 74.0±3.92 ^b |
| 对照 | 15.6±1.51 ^a | 31.8±1.69 ^a | 30.8±2.39 ^a | 78.2±2.39 ^a |

注:不同小写字母表示同列数据差异显著($P<0.05$);表 4、表 7 同。

2.3.2 发酵酸乳持水力 酸乳持水力是指经过高速离心后,酸乳凝胶体系中总固形物对水分的保持能力,在酸乳持水力越高,说明大分子物质对水分子的作用力越强,稳定性也越好。各菌株发酵的酸乳的持水力在 45%~75% 之间(图 4),其中持水力最大的是菌株“鄂温克”发酵酸乳,达到了 75.61%,菌株“鲁青 6”发酵酸乳次之,持水力最小的是菌株“四川郫县 A1”的为 47.73%。

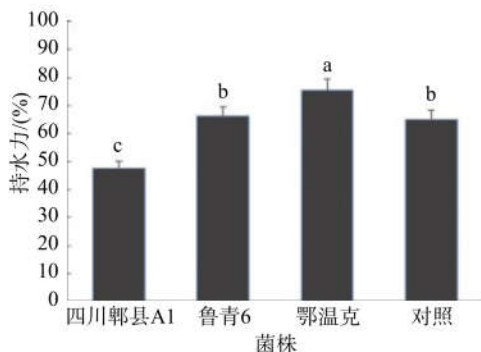


图 4 菌株发酵酸乳持水力

Fig.4 Holding water capacity of yoghourt fermented with different strains

2.3.3 发酵酸乳酸度和后酸度 酸度是影响发酵酸乳口感的重要因素之一,后酸度对发酵酸乳贮藏期间的风味和贮藏时间有直接影响^[31]。表 4 可知,菌株“鄂温克”发酵酸乳的酸度最高,但保存 6 d 后后酸度

却最大,后酸度最小的是菌株“鲁青 6”发酵酸乳,为 10.66 °T,其酸度也适宜。从发酵酸乳酸度和后酸度方面比较,菌株“鲁青 6”发酵酸乳较好。

表 4 菌株发酵酸乳酸度和后酸度(°T)

Table 4 Titratable acidity and post-acidity of yoghourt fermented with different strains (°T)

| 菌种 | 0 d 滴定酸度 | 3 d 滴定酸度 | 6 d 滴定酸度 | 后酸度 |
|---------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------|
| 四川郫县 A1 | 61.26±1.1913 ^d | 64.34±0.8159 ^d | 75.06±0.5950 ^d | 13.81 ^b |
| 鲁青 6 | 66.29±0.7905 ^c | 69.68±0.1834 ^c | 76.95±1.1012 ^c | 10.66 ^d |
| 鄂温克 | 77.70±0.5651 ^a | 84.01±0.5110 ^a | 97.52±0.5780 ^a | 19.82 ^a |
| 对照 | 67.66±0.5170 ^b | 77.41±1.2382 ^b | 78.71±0.5918 ^b | 11.04 ^c |

2.3.4 发酵酸乳质构特性 质地是评价酸乳感官质量的重要指标之一,质构仪是一种测定食品质地的现代化精密仪器,可模拟人体口腔再以具体的数据客观地测评发酵酸乳质地,使分析的结果更准确。如图 5、图 6,4 株菌发酵酸乳的破裂力、咀嚼性、弹性以菌株“鲁青 6”发酵酸乳的最高,硬度以菌株“鄂温克”发酵酸乳的最大,胶粘性以内聚力以菌株“鄂温克”和菌株“鲁青 6”发酵酸乳最高。因此,菌株“鲁青 6”发酵酸乳大多数质构指标较优。

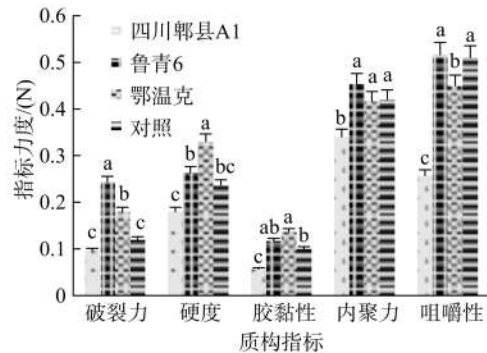


图 5 菌株发酵酸乳的破裂力、硬度、胶黏性、内聚力、咀嚼性

Fig.5 Rupture force, hardness, gumminess, cohesiveness and chewiness of yoghourt fermented with different strains

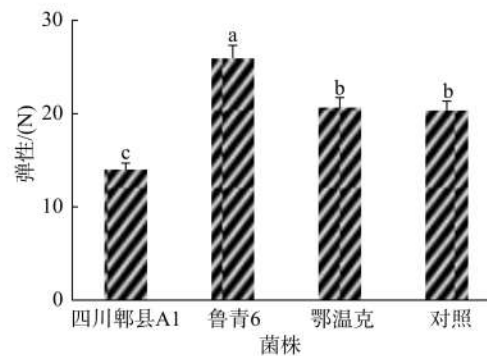


图 6 高效降解菌株发酵酸乳弹性

Fig.6 Springiness of yoghourt fermented with different strains

2.3.5 主成分分析法综合评价发酵酸乳品质 对酸乳的酸度、后酸度、持水力以及各质构指标进行主成分分析,根据特征值大于 1、积累贡献率大于 85% 为

表5 总方差分解结果
Table 5 Total variance explained

| 成分 | 初始特征值 | | | 提取特征值 | | |
|-----------|-------|--------------|------------|-------|------------|------------|
| | 特征值 | 各特征值方差贡献率(%) | 累积方差贡献率(%) | 特征值 | 各特征值贡献率(%) | 累积方差贡献率(%) |
| 酸度 X_1 | 5.690 | 63.224 | 63.224 | 5.690 | 63.224 | 63.224 |
| 后酸度 X_2 | 2.008 | 22.314 | 85.538 | 2.008 | 22.314 | 85.538 |
| 持水力 X_3 | 0.680 | 7.559 | 93.098 | | | |
| 破裂力 X_4 | 0.346 | 3.842 | 96.940 | | | |
| 硬度 X_5 | 0.113 | 1.258 | 98.198 | | | |
| 胶粘性 X_6 | 0.106 | 1.176 | 99.373 | | | |
| 内聚力 X_7 | 0.042 | 0.472 | 99.845 | | | |
| 咀嚼性 X_8 | 0.012 | 0.133 | 99.978 | | | |
| 弹性 X_9 | 0.002 | 0.022 | 100.000 | | | |

标准能提取出两个主成分,如表5,这两个主成分的累计贡献率达到了85.538%,说明用这两个主成分能够反应原有变量的大多数数据的信息,其中,第一主成分的贡献率为63.224%,特征值为5.690;第二主成分的贡献率为22.314%,特征值为2.008。

主成分旋转矩阵(表6),第一主成分里的高载荷指标有破裂力 X_4 (因子载荷值为0.797)、内聚力 X_7 (因子载荷值为0.882)、咀嚼性 X_8 (因子载荷值为0.892)、弹性 X_9 (因子载荷值为0.909);第二主成分包含的高载荷指标有酸度 X_1 (因子载荷值为0.923)、后酸度 X_2 (因子载荷值为0.879)、持水力 X_3 (因子载荷值为0.736)、硬度 X_5 (因子载荷值为0.807)、胶粘性 X_6 (因子载荷值为0.667)。

表6 主成分载荷矩阵
Table 6 Principal component loading matrix of PCA

| 指标 | 主成分1 | 主成分2 |
|-----------|--------|-------|
| 酸度 X_1 | 0.301 | 0.923 |
| 后酸度 X_2 | -0.373 | 0.879 |
| 持水力 X_3 | 0.646 | 0.736 |
| 破裂力 X_4 | 0.797 | 0.180 |
| 硬度 X_5 | 0.469 | 0.807 |
| 胶粘性 X_6 | 0.656 | 0.667 |
| 内聚力 X_7 | 0.882 | 0.194 |
| 咀嚼性 X_8 | 0.892 | 0.177 |
| 弹性 X_9 | 0.909 | |

由表6可得出各主成分的表达式:

$$F_1=0.301X_1-0.373X_2+0.646X_3+0.797X_4+0.469X_5+0.656X_6+0.882X_7+0.892X_8+0.909X_9$$

$$F_2=0.923X_1+0.879X_2+0.736X_3+0.180X_4+0.667X_5+0.194X_6+0.194X_7+0.177X_8$$

通过以上2个主成分可构建出酸乳的综合品质评价模型F:

$$F=5.690F_1+2.008F_2$$

根据的综合品质评价模型可得各菌株发酵酸乳综合得分,如表7,菌株“鲁青6”和菌株“鄂温克”发酵酸乳得分较高,表明菌株“鄂温克”和菌株“鲁青6”

表7 高效降解菌株发酵酸乳的主成分得分和综合得分
Table 7 Principal component scores and comprehensive scores of yoghurt fermented efficient degradation strains

| 菌株 | F_1 | F_2 | F | 菌株平均综合得分 |
|--------|-------|-------|--------|---------------------------|
| 四川郫县A1 | 29.04 | 68.79 | 303.39 | 319.01±14.89 ^c |
| | 33.84 | 69.97 | 333.05 | |
| | 31.91 | 69.24 | 320.59 | |
| 鲁青6 | 46.30 | 70.79 | 405.59 | 404.52±7.41 ^{ab} |
| | 47.16 | 71.23 | 411.34 | |
| | 44.06 | 72.67 | 396.64 | |
| 鄂温克 | 44.59 | 89.87 | 434.20 | 414.34±17.46 ^a |
| | 39.53 | 90.89 | 407.44 | |
| | 38.78 | 89.99 | 401.39 | |
| 对照 | 42.86 | 72.78 | 389.99 | 382.8±7.61 ^b |
| | 39.85 | 73.75 | 374.82 | |
| | 41.70 | 72.88 | 383.59 | |

发酵酸乳品质最好。

2.4 菌株分子鉴定

菌株“鲁青6”和“鄂温克”既能高效降解草酸盐,又能耐受胃肠道,同时酸乳发酵特性优良。提取菌株基因组DNA,采用PCR扩增16S rDNA序列,获得约1500 bp序列,测序后将序列在Ezbiocloud中比对,结果显示菌株“鲁青6”的16S rDNA序列与*Weissella cibaria* KACC11862(Type)的16S rDNA序列(AEKT01000037)相似度高达100%,菌株“鄂温克”的16S rDNA序列与*Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* JCM 1171(Type)的16S rDNA序列(D16550)相似度高达100%,将序列和属其他种的16S rDNA用Bayes法构建系统发育树上,显示“鲁青6”与食窦魏斯氏菌(*Weissella cibaria*)聚在一起(图7),“鄂温克”与副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)聚在一起(图8)。因此,菌株“鲁青6”为食窦魏斯氏菌,菌株“鄂温克”为副干酪乳杆菌。

3 结论与讨论

不同生境、不同种属的乳酸菌降解草酸盐的能力不同。Weese等^[32]报道来自犬粪便样品的37株乳酸菌体外降解草酸盐活性最高65%。Federici

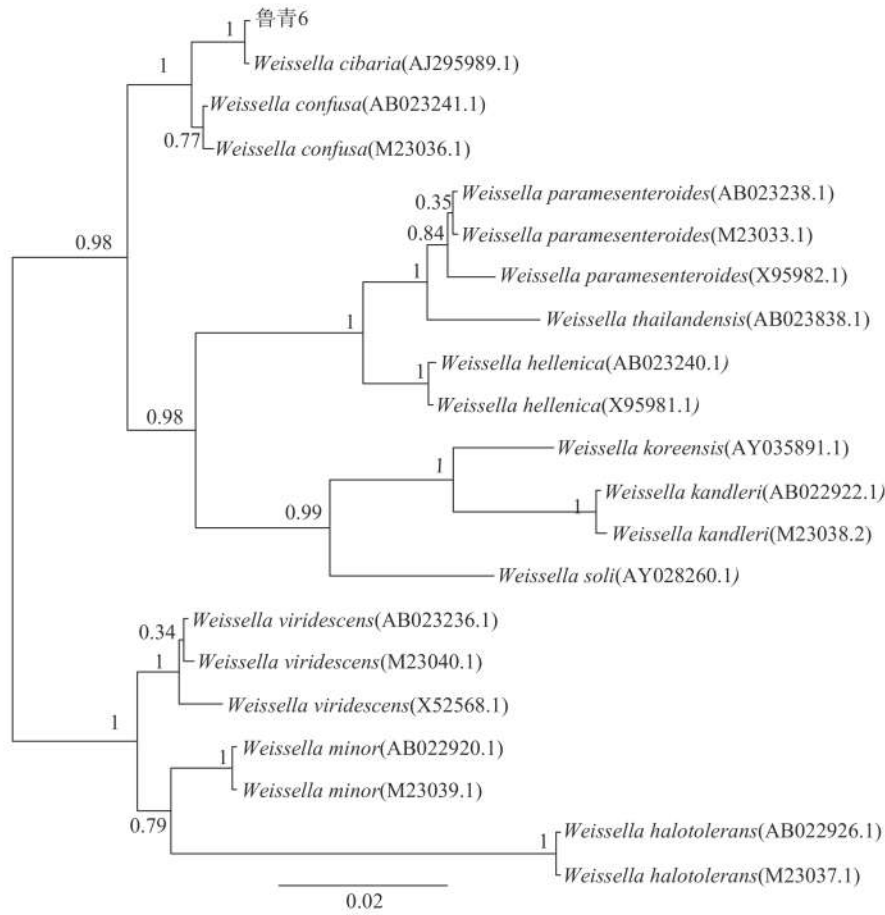


图 7 基于 16S rDNA 用 Bayes 法构建魏斯氏菌属系统发育树

Fig.7 Phylogenetic tree of the genera *Weissella* based on 16S rDNA sequences

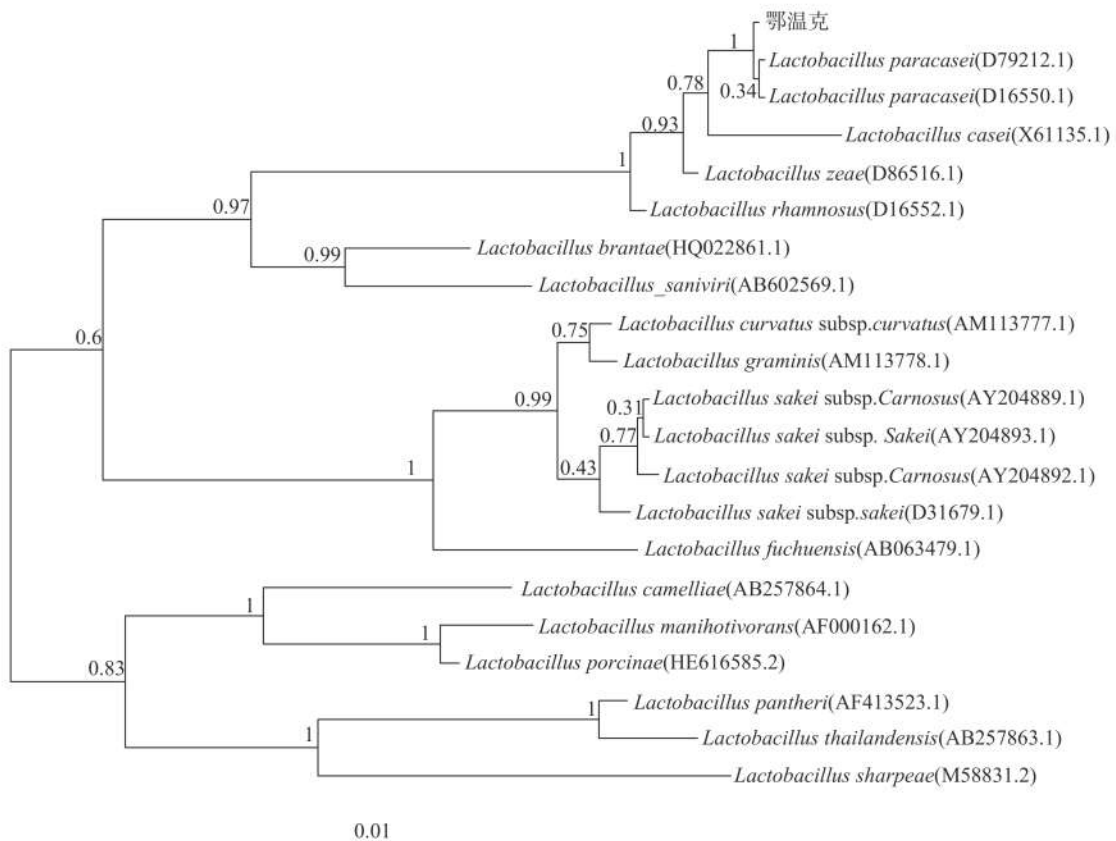


图 8 基于 16S rDNA 用 Bayes 法构建乳杆菌属系统发育树

Fig.8 Phylogenetic tree of the genera *Lactobacillus* based on 16S rDNA sequences

等^[33]报道动物双歧杆菌菌株(*Bifidobacterium animalis*)DSM10104降解率为61%,而长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)菌株MB 282和青春双歧杆菌(*Bifidobacterium adolescentic*)菌株MB 238的降解率分别为35%和57%,短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*)菌株MB 283的降解率为38%。本实验49株供试乳酸菌中,约38.77%降解率的菌株在30%以上,18.36%降解率的菌株在70%以上,降解率最高达86.96%。不仅具有降解能力的菌株比例高,部分菌株对培养基中的草酸盐的降解率也高于报道,提示我们中国民间传统发酵食品中蕴藏着丰富而独特的微生物资源,有待于进一步发掘。

本实验获得食窦魏斯氏菌菌株“鲁青6”和副干酪乳杆菌菌株“鄂温克”既能高效降解草酸盐,又能耐受胃肠道,同时酸乳发酵特性优良,但本实验仅进行了菌株体外降解草酸盐实验,后续开展2株菌体内降解实验和菌株安全性评价实验取得较好结果后,2株菌可作为功能酸乳开发候选发酵菌株。

参考文献

- [1] Bhasin B, Ürekli H M, Atta M G. Primary and secondary hyperoxaluria: Understanding the enigma[J]. *World Journal of Nephrology*, 2015, 4(2): 235-244.
- [2] 赵宇, 陈忠敏. 草酸钙结石的研究进展[J]. *医学研究生学报*, 2018, 31(5): 555-560.
- [3] Khodor S A, Shatat I F. Gut microbiome and kidney disease: A bidirectional relationship[J]. *Pediatric Nephrology*, 2016, 32(6): 921-931.
- [4] 火玮, 米军. 肠道菌群对草酸钙结石形成影响进展[J]. *国际泌尿系统杂志*, 2019, 39(5): 924-926.
- [5] 张帝, 汤晓静, 宋书伟, 等. 益生菌治疗草酸钙结石的研究进展[J]. *解放军医学杂志*, 41(8): 694-698.
- [6] Jairath A, Parekh N, Otano N, et al. Oxalobacter formigenes: opening the door to probiotic therapy for the treatment of hyperoxaluria[J]. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, 2015, 49(4): 334-337.
- [7] Ellis M L, Shaw K J, Jackson S B, et al. Analysis of commercial kidney stone probiotic supplements[J]. *Urology*, 2015, 85(3): 517-521.
- [8] Li X S, Ellis M L, Knight J. Oxalobacter formigenes colonization and oxalate dynamics in a mouse model[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(15): 5048-5054.
- [9] Campieri C, Campieri M, Bertuzzi V, et al. Reduction of oxaluria after an oral course of lactic acid bacteria at high concentration[J]. *Kidney International*, 2001, 60(3): 1097-1105.
- [10] 董婷婷, 袁杰利. 利用乳酸菌降解草酸预防结石的研究进展[J]. *中国微生态学杂志*, 2011, 23(3): 266-267, 271.
- [11] 国立东, 王丽群, 于纯森, 等. 乳酸菌降解草酸盐活性及机制研究进展[J]. *食品科学*, 2018, 39(3): 324-329.
- [12] 鲍雅静, 王玉泉, 何秋雯, 等. 具有潜在益生特性发酵乳杆菌的筛选[J]. *中国食品学报*, 2013, 13(5): 17-23.
- [13] 张丽. 传统发酵牦牛奶中益生乳杆菌筛选及其免疫调节功能研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2011: 46-47.
- [14] 杨续金. 酸马奶中潜在益生菌的分离筛选[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2005: 12-13.
- [15] 张磊. 具有潜在益生特性芽孢杆菌的筛选及其发酵工艺的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2009: 13-15.
- [16] 王立平. 内蒙古传统酸马奶酒中乳杆菌潜在益生特性的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2005: 11-13.
- [17] 顾欣, 张士青, 李文峰. 乳酸菌分解草酸体外试验与影响因素[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2006, 26(4): 423-426.
- [18] 陈贞. 草酸盐降解菌 *Salmonella* 的分离纯化及降解酶性质的研究[D]. 大连: 大连轻工业学院, 2004: 19-22.
- [19] 金朝霞. 草酸盐高效降解菌的筛选及其酶学性质研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2008: 49.
- [20] 董婷婷. 降解草酸益生菌的筛选及其对实验动物的功效研究[D]. 大连: 大连医科大学, 2012: 9.
- [21] 孙敏, 袁凤霞, 曹晓虹, 等. 传统发酵食品中耐胃肠道环境乳酸菌的筛选及其在酸奶发酵中的应用[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(3): 14-20.
- [22] 赵瑞香, 孙俊良, 李元瑞, 等. 嗜酸乳杆菌抗酸抗胆汁盐能力的研究[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2004, 32(2): 57-60.
- [23] 柏建玲, 吴清平, 张菊梅, 等. 耐胃液乳酸菌的筛选、鉴定与驯化[J]. *食品工业科技*, 2010, 31(11): 190-192.
- [24] 朱宏, 陆淳, 冯丽莉, 等. 高生存性乳酸菌的筛选[J]. *中国乳品工业*, 2011, 39(4): 20-22.
- [25] 袁凤霞, 田莎, 曹晓虹, 等. 酸乳发酵中优良共生酵母菌的筛选[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(7): 76-83.
- [26] 生庆海, 张爱霞, 马蕊. 乳与乳制品感官品评价[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2009: 186-188.
- [27] 杨莹莹, 贺红军, 郭萌萌, 等. 响应面法分析 TPA 测试参数对酸乳质构的影响[J]. *现代食品科技*, 2013(6): 1281-1284.
- [28] 徐鑫, 赫君菲, 何佳易, 等. 测试条件对凝固型酸乳质构实验参数的影响[J]. *食品科学*, 2013, 34(24): 263-267.
- [29] 吴悦妮, 冯凯, 厉舒祯, 等. 16S/18S/ITS 扩增子高通量测序引物的生物信息学评估和改进[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(9): 2897-2912.
- [30] 焦扬, 折发文, 张娟娟, 等. 基于主成分与聚类分析的甘肃地区产地木耳品质综合评价[J]. *食品科学*, 2019, 40(8): 130-135.
- [31] 曹风波, 王晓明, 周晶, 等. 两株弱后酸化保加利亚乳杆菌发酵性能的研究[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(21): 131-134.
- [32] Weese J S, Weese H E, Yuricek L, et al. Oxalate degradation by intestinal lactic acid bacteria in dogs and cats[J]. *Veterinary Microbiology*, 2004, 101(3): 161-166.
- [33] Federici F, Vitali B, Gotti R, et al. Characterization and heterologous expression of the oxalyl coenzyme A decarboxylase gene from *Bifidobacterium lactis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(9): 5066-5073.