

东北传统腌渍蔬菜中产 γ -氨基丁酸乳酸菌的筛选及其生物特性研究

吕欣然¹, 李叙波¹, 佟鑫瑶¹, 白凤翎¹, 励建荣^{1*}, 檀茜倩¹, 崔方超¹, 俞张富², 沈荣虎²

(¹渤海大学食品科学与工程学院 生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心

辽宁省食品安全重点实验室 辽宁锦州 121013

²杭州萧山农业发展有限公司 杭州 311215)

摘要 采用薄层层析色谱法结合 Berthelot 比色法,从东北传统腌渍蔬菜中筛选产 γ -氨基丁酸(GABA)乳酸菌。采用生理生化测定及 16S rRNA 测序鉴定乳酸菌。通过主成分分析法对其耐酸、耐胆盐、抗氧化、抑菌性及产酸速率等生物特性进行综合评价,筛选具有良好生物特性的乳酸菌。结果表明:从源于传统腌渍蔬菜的 40 株乳酸菌中获得 5 株典型产 GABA 乳酸菌菌株,经鉴定 1 株为坎氏魏斯氏菌 HJL2,另 4 株均为植物乳杆菌,分别是菌株 PJ-7、HJG1-3、L-9、L-11。其中,分离自发酵萝卜的植物乳杆菌 PJ-7 合成 GABA 的能力较好,产量达 0.48 mg/mL。5 株乳酸菌的耐酸、耐胆盐、抗氧化等生物特性存在显著性差异,通过主成分分析确定植物乳杆菌 PJ-7 的生物特性综合评分位列第一。植物乳杆菌 PJ-7 优良的 GABA 合成能力以及良好的生物特性可为研发富含 GABA 的腌渍蔬菜提供理论参考。

关键词 乳酸菌; γ -氨基丁酸; 生物特性; 筛选

文章编号 1009-7848(2023)12-0061-09 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2023.12.007

γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 别称 4-氨基丁酸^[1], 是谷氨酸在谷氨酸脱羧酶 (glutamic acid decarboxylase, GAD) 的作用下发生脱羧反应形成的一种非蛋白类氨基酸^[2], 广泛存在于动、植物和微生物体内。研究表明, GABA 是一种中枢神经抑制性递质, 具有降血压, 治疗癫痫, 健肝利肾, 治疗哮喘, 平衡激素分泌, 镇定安神等多种生理功能^[3]。人类在不断发育成长的过程中, 体内谷氨酸向 GABA 的转化率逐渐降低, 同时伴随焦虑、疲惫等症状的发生。此时, 膳食补充 GABA 成为一种有效的解决手段。GABA 在食品领域具有广泛的应用前景。

GABA 可通过化学合成法、植物富集法以及微生物发酵法获得^[4-6], 其中微生物发酵法具有安全、高效、无污染等特点^[7], 如乳酸菌、酵母菌、芽孢杆菌可通过发酵合成 GABA^[8-10]。乳酸菌 (Lactic acid bacteria, LAB) 作为一种常见的益生菌, 具有谷氨酸脱羧酶活性, 可使谷氨酸脱羧生成 GABA^[11], 因此, 乳酸菌是发酵合成 GABA 的一类重要微生物。

刘璐等^[12]在发酵鱼酱酸中获得产 GABA 的植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) Y279 和食窦魏斯氏菌 (*Weissella sinusoids*) Y113, 均具有优良的环境适应性、发酵性和益生特性, 对产品风味、营养物质的形成具有较好的作用。Vichitphan 等^[13]也从传统发酵肉制品中筛选出 7 株产 GABA 的乳酸菌, 包括 5 株植物乳杆菌以及 2 株戊糖乳杆菌 (*Lactobacillus pentosus*), 说明不同传统发酵食品中存在多种优良的产 GABA 乳酸菌。我国东北地区腌渍蔬菜种类多样, 包括腌渍萝卜、黄瓜、白菜等, 气候环境差异明显, 乳酸菌资源丰富, 成为产 GABA 乳酸菌关键的来源, 然而许多潜在的高产 GABA 乳酸菌菌株及其生物特性未被完全挖掘。

本研究从东北传统腌渍蔬菜中筛选产 GABA 乳酸菌, 测定其耐酸、耐胆盐、抑菌、抗氧化等生物特性, 采用主成分分析法综合评价菌株的整体生物特性, 获得高产 GABA 且具有良好的生物特性的乳酸菌菌株, 以期为开发富含 GABA 的腌渍菜产品提供一定的理论参考。

收稿日期: 2022-12-06

基金项目: 辽宁省教育厅面上项目 (JYTMS20231621); 辽宁省锦州市科技指导性计划项目 (JZ2022B031)

第一作者: 吕欣然, 女, 博士, 讲师

通信作者: 励建荣 E-mail: lijr6491@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株 乳酸菌: 分离自辽宁锦州萝卜、辽宁锦州酸菜、辽宁锦州腌芥菜、辽宁锦州酸黄瓜、辽

宁朝阳咸菜、辽宁葫芦岛酸菜、辽宁阜新酸菜、辽宁彰武酸黄瓜;大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*),均保藏于本学院微生物学与分子生物学实验室;鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG) ATCC53103, 购买于北纳创联生物技术有限公司。

1.1.2 培养基与试剂 MRS 液体培养基、LB 固体培养基、琼脂粉, 青岛海博生物; L-谷氨酸、邻苯三酚, 瑞思试剂; γ -氨基丁酸标准品, 源叶生物; 猪胆盐, 西亚试剂; Tris-HCl, 贝博生物; 茚三酮、次氯酸钠, 北京万佳标准物质研发中心; 四硼酸钠, 九鼎试剂; 细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒、PCR 扩增引物、DNA marker-D、Taq PCR Master mix, 上海生工生物工程有限公司; DPPH, 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; 无水乙醇, 天津大茂化学试剂厂。

1.2 仪器与设备

SW-CJ-1D 型超净工作台, 苏州博莱尔净化设备; KS50R 台式高速冷冻离心机, 盐城市凯特实验仪器有限公司; LRH-250F 生化培养箱, 精其仪器; 美国 OHAUS 奥豪斯 pH 检测仪 AB33, 深圳市怡华新电子有限公司; SARTORIUS 赛多利斯普及型精密天平 GL2201-1SCN, 季尔国际贸易(上海)有限公司; 全自动立式高压蒸汽灭菌器, 山东博科灭菌技术有限公司; DZF-6020A 型真空干燥箱, 力辰科技; HT-ECP3000 高压电泳仪电源、HT8300/8500 全自动凝胶成像分析系统, 北京鸿涛基业科技发展有限公司; VOSHIN96-III 超声细胞破碎机, 无锡沃信仪器制造有限公司。

1.3 方法

1.3.1 乳酸菌菌株的活化 将-80℃保藏的乳酸菌接种于 MRS 肉汤中, 37℃培养 24 h 后, 以 3% (体积分数) 的接种量接入含 1% L-谷氨酸的 MRS 液体培养基中, 置于 37℃培养 48 h。

1.3.2 产 GABA 菌株定性试验 薄层色谱层析法^[14]: 将 1 mL 乳酸菌培养液于 12 000 r/min 下离心 15 min, 弃掉菌体沉淀, 用毛细管吸取适量上清液, 点在 G 型薄层硅胶板上。按照 $V_{\text{正丁醇}}:V_{\text{冰醋酸}}:V_{\text{水}}=4:1:3$ 配制展开剂, 同时, 在展开剂中添加质量分

数为 0.4% 的茚三酮-乙醇混合溶液作为显色剂, 在密闭空间进行展开, 后于 90℃烘箱中显色 15 min。同时, 以稀释后的 GABA 标准溶液作为对照。显色后, 若样品一栏出现斑点, 且斑点位置与 GABA 标品处于同一水平线上, 则证明乳酸菌菌株的上清液中含有 GABA。

1.3.3 产 GABA 菌株定量试验 Berthelot 比色法^[15]: 将 600 μ L 乳酸菌上清液添加到 2 mL 四硼酸钠缓冲液(0.1 mol/L)中, 再加入 6% 的苯酚溶液 800 μ L 以及 10% 的次氯酸钠溶液 900 μ L, 涡旋混匀后, 置于沸水中 10 min, 然后立刻放入碎冰中, 20 min 后取出, 置于室温下冷却至出现蓝绿色, 再加入 60% 乙醇 4 mL, 摇匀静置后, 在 645 nm 下测定其 OD 值。

1.3.4 乳酸菌菌株鉴定 参照东秀珠等^[16]和凌代文等^[17]方法对乳酸菌菌株进行生理生化鉴定; 参照高永悦等^[18]方法对菌株进行 16S rRNA 测序。

1.3.5 耐酸性 利用 1 mol/L HCl 调节 MRS 肉汤 pH 值为 3.0, 以未处理的 MRS 肉汤为对照组。将活化后的乳酸菌以 5% (体积分数) 接种于 MRS 肉汤中, 37℃培养 24 h 后, 在 600 nm 下测定其吸光度值, 并计算菌株的耐酸性。

1.3.6 耐胆盐性 参考黄燕燕等^[19]方法, 在含 0.3% 猪胆盐及不含猪胆盐的 MRS 肉汤中均加入 2% 的乳酸菌菌悬液(10^8 CFU/mL), 37℃培养 24 h 后, 在 600 nm 处测定其吸光度值, 并计算菌株胆盐的耐受性。

1.3.7 抗氧化活性 DPPH 清除率: 乳酸菌培养液在 15 min, 6 000 r/min 的条件下进行离心, 离心后倒出上清液, 用 PBS 缓冲液冲洗剩余菌体 2 次后, 再利用 PBS 缓冲液将菌悬液浓度调至 10^8 CFU/mL, 最后分成 2 份, 一部分作为完整细胞试验, 另一部分菌悬液置于 0℃下超声破碎后, 于 4℃下 6 000 r/min 离心 15 min, 收集上清为乳酸菌无细胞提取物。

取 1.0 mL 待测样品加入 1.0 mL 0.2 mmol/L DPPH-无水乙醇溶液, 在室温条件下避光 30 min, 3 500 r/min 离心 10 min, 在 517 nm 下测定 OD 值, 同时以 LGG 为阳性对照^[20]。清除率按公式(1)计算, 其中 A_i 为 1.0 mL 样品加 1.0 mL DPPH-无水乙醇, A_j 为 1.0 mL 样品加 1 mL PBS, A_0 为

1.0 mL PBS 加 1.0 mL DPPH-无水乙醇。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = (1 - \frac{A_c - A_i}{A_c}) \times 100 \quad (1)$$

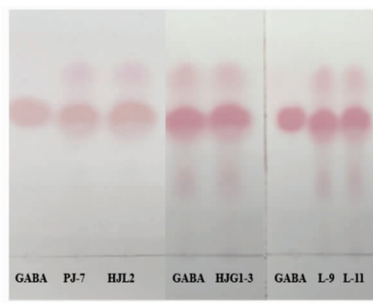
超氧阴离子清除率:在 0.6 mL 待测样品中加入 2.0 mL Tris-HCl 缓冲液(150 mmol/L, pH=8.0),置于水浴锅内反应 20 min, 设置温度为 25 °C, 再加入 0.4 mL 同等水浴条件下的邻苯三酚。反应完成后,在 325 nm 下测定 OD 值,同时以 LGG 为阳性对照^[21]。清除率按公式(2)计算,其中 A_{11} 含样品和邻苯三酚, A_{10} 含样品,邻苯三酚以蒸馏水代替, A_{01} 只含邻苯三酚, A_{00} 不含样品不含邻苯三酚。

$$\text{超氧阴离子清除率}(\%) = \frac{A_{11} - A_{10}}{A_{01} - A_{00}} \times 100 \quad (2)$$

1.3.8 抑菌活性 利用牛津杯打孔法检测乳酸菌的抑菌能力^[22],在无菌平皿中倒入 1.5% 琼脂 10 mL,待其凝固后,将牛津杯摆放在培养基表面,然后将含有指示菌的 LB 固体培养基 25 mL 缓慢倒入平皿中,凝固后拔出牛津杯,孔中加入 180 μ L 的乳酸菌培养液,37 °C 培养 12 h 后,利用菌落计数器记录抑菌圈直径。

1.4 数据处理

试验结果均平行测定 3 次,结果用平均值 \pm 标准差表示,并使用 IBM SPSS 19 以及 Origin 2018 软件对数据进行分析处理。



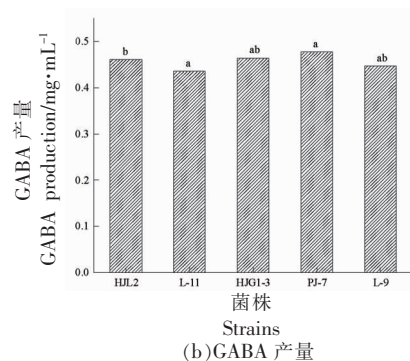
(a) 薄层色谱图

2 结果与分析

2.1 产 GABA 乳酸菌的筛选

乳酸菌是一类公认安全(generally recognized as safe, GRAS)的微生物^[23],能够合成谷氨酸脱羧酶,将外源添加的谷氨酸转化生成 GABA^[24]。本研究从 40 株传统腌渍菜来源的乳酸菌中筛选获得 5 株明显产 GABA 的菌株,如图 1a 所示,5 株乳酸菌的比移值(Rf)均与 GABA 标准品的 Rf 值相同,且颜色较深。因此,选择菌株 HJL2(辽宁阜新酸菜)、PJ-7(辽宁锦州萝卜)、HJG1-3(辽宁阜新酸菜)、L-9(辽宁葫芦岛酸菜)、L-11(辽宁朝阳咸菜)5 株乳酸菌进行后续试验研究。

图 1b 是 5 株乳酸菌合成 GABA 定量分析结果。由图可知,来源于发酵萝卜菌株 PJ-7 的 GABA 产量较高,为 0.48 mg/mL,与菌株 HJG1-3 和 L-9 无显著性差异 ($P > 0.05$),但显著高于菌株 HJL2 ($P < 0.05$)。说明不同来源传统腌渍菜中的乳酸菌合成 GABA 存在一定差异。本研究结果与刘璐等^[12]研究结果相似,其从发酵鱼酱酸中分离出 15 株产 GABA 的乳酸菌,其中,食蜜魏斯氏菌 Y113 合成 GABA 能力较好,产量为 0.24 mg/mL。



(b) GABA 产量

注:图中小写字母表示不同菌株间显著性分析($P < 0.05$),下文同理。

图 1 乳酸菌合成 GABA 的能力

Fig.1 The ability of LAB to synthesize GABA

2.2 乳酸菌菌株鉴定

2.2.1 生理生化鉴定 5 株乳酸菌的生理生化鉴定结果如表 1。参照东秀珠等和凌代文等^[16-17]文献可初步推断菌株 L-9、L-11、PJ-7 和 HJG1-3 为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*),而菌株 HJL2 为魏斯氏菌(*Weissella* sp.)。

图 2 为 5 株乳酸菌的 16S rRNA 扩增测序结

果。由图可知,5 株乳酸菌的目标片段均被成功扩增,长度均在 1500 bp 左右(图 2a)。将 16S rRNA 基因序列在 NCBI 数据库中比对并建立系统发育树(图 2b),最终确定菌株 HJL2 为坎氏魏斯氏菌(*Weissella kandleri*),其余 4 株均为植物乳杆菌,5 株乳酸菌与其参考菌株同源性均在 99% 以上。

表 1 5株乳酸菌的生理生化结果

Table 1 Physiological and biochemical test results of five strains LAB

项目	菌株				
	HJL2	L-11	HJG1-3	PJ-7	L-9
阿拉伯糖	-	-	-	-	-
纤维二糖	+	+	+	+	+
七叶苷	+	+	+	+	+
果糖	+	+	+	+	+
半乳糖	+	+	+	+	+
葡萄糖	+	+	+	+	+
葡萄糖酸盐	-	-	-	-	-
乳糖	-	+	+	+	+
麦芽糖	+	+	+	+	+
甘露醇	+	+	+	+	+
甘露糖	+	+	+	+	+
松三糖肉汤	+	+	+	+	+
密二糖肉汤	+	+	+	+	+
棉籽糖	-	-	-	-	-
鼠李糖	+	-	-	-	-
山梨醇	-	-	-	-	-
蔗糖	+	+	+	+	+
水糖	-	-	-	-	-

注：“+”代表阳性；“-”代表阴性。

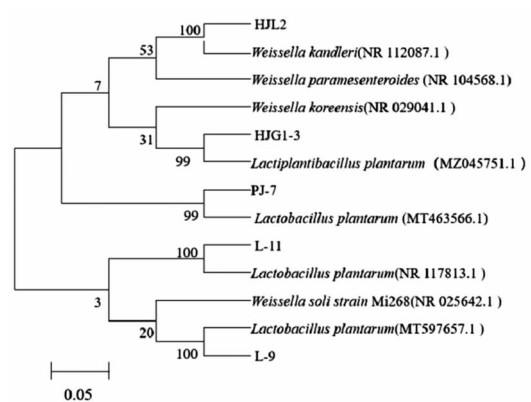
2.2.2 16S rRNA 序列分析 图 2 为 5 株乳酸菌的 16S rRNA 扩增测序结果。由图可知,5 株乳酸菌的目标片段均被成功扩增,长度均在 1 500 bp 左右(图 2a)。将 16S rRNA 基因序列在 NCBI 数据库中比对并建立系统发育树(图 2b),最终确定菌株 HJL2 为坎氏魏斯氏菌(*Weissella kandleri*),其余 4 株均为植物乳杆菌,5 株乳酸菌与其参考菌株同源性均在 99% 以上。

2.3 耐酸性及耐胆盐能力

乳酸菌对酸和胆盐的抗性是选择新益生菌候选菌株的基本特性,这种特性与菌株在胃肠道中的存活能力以及在酸性发酵环境适应能力密切相关^[25]。由于人类在进食后,胃内的 pH 值能达到 3.0 左右,因此,本研究调节培养基的 pH 值至 3.0。图 3 表示 5 株乳酸菌分别在 pH 3.0 与胆盐含量为 0.3% 的 MRS 培养基中培养 24 h 后的存活率。由图可知,在 pH 3.0 的 MRS 肉汤中培养时,菌株 L-11、HJG1-3、PJ-7、L-9 的存活率均在 20% 以上,其中菌株 L-9 的存活率较高,可达到 28.33%,菌株 HJL2 的存活率较低,仅为 10.53%,显著低于其它 4 株乳酸菌($P < 0.05$)。韦庆旭等^[26]从构树青



(a) 16S rRNA 基因扩增电泳图



(b) 系统发育树

图 2 5株乳酸菌的 16S rRNA 序列分析

Fig.2 16S rRNA sequencing analysis of five strains LAB

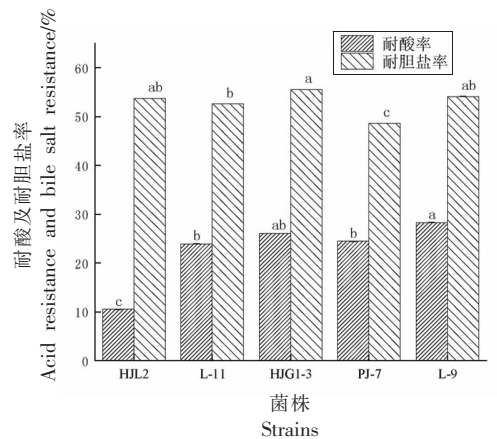


图 3 5株乳酸菌的耐酸率及耐胆盐率

Fig.3 Acid tolerance and bile salt tolerance of five strains LAB

贮、玉米青贮及饲喂构树青贮的羔羊粪便中分离得到 37 株乳酸菌,这些乳酸菌在 pH 3.0 的条件下培养 24 h 后,耐酸率最高可达 14%,显著低于本研究中除 HJL2 外的其它 4 株乳酸菌,因此,说

明本研究这 4 株乳酸菌均表现出较高的耐酸能力。

在 0.3%胆盐的 MRS 肉汤中培养时,5 株乳酸菌的生长相对较为稳定,耐胆盐率在 48%~55%之间。其中菌株 HJG1-3 耐胆盐能力较好,菌株存活率可达到 55.56%,菌株 PJ-7 耐胆盐率最低,也可达到 48.64%。

甘祥武等^[27]将乳酸菌接种于含 0.3%胆盐的 MRS 肉汤中,培养 24 h 后,菌株 LPL04、LPL05、LPL14 的耐胆盐率分别为 4.46%、6.52%与 0.07%,均低于本研究中各菌株耐胆盐率,因此说明 5 株乳酸菌的耐胆盐性较好。

2.4 抗氧化活性

2.4.1 DPPH 自由基清除率

DPPH 自由基清除率这一指标一般是用于衡量抗氧化剂清除自由基的水平,其清除率结果越高,则抗氧化能力越强^[28]。如图 4a 示,乳酸菌完整细胞组的 DPPH 自由基清除率均高于破碎细胞组,这可能因为乳酸菌的完整菌体细胞胞外含有多糖类物质,多糖具有一定的供氢能力,通过氢原子转移或电子转移方式,可与 DPPH 自由基发生中和作用^[29]。其中,在完整细胞组中,菌株 L-11 的 DPPH 自由基清除率显著优于其它 4 株乳酸菌($P<0.05$),可达到 53.91%。在破碎细胞组中,同样是菌株 L-11 的 DPPH 自由基清除率较高,可达到 24.40%,但与其与菌株 HJG1-3、HJL2 及 PJ-7 均无显著性差异。此外,5 株乳酸菌的完整细胞组及破碎细胞组的 DPPH 自由基清除能力均显著优于对照菌株 LGG,说明 5 株乳酸菌

均具有较强的 DPPH 自由基清除率。

2.4.2 超氧阴离子清除率

超氧阴离子自由基并不立刻参与脂类的氧化,但经铁离子催化发生芬顿反应会生成羟自由基,因此,通过检测菌液对超氧阴离子自由基清除能力,可分析其抗氧化能力^[30]。如图 4a 所示,完整细胞组中,除菌株 HJL2 和 L-11 显著低于对照菌株 LGG 外,其余 3 株菌的超氧阴离子清除率均高于 LGG,尤其菌株 PJ-7,高达 80.20%,显著高于其它试验菌株($P<0.05$)。破碎细胞组中,所有菌株的超氧阴离子清除率均显著高于 LGG。其中,菌株 L-11 的清除率达到 79.94%,显著高于其它 4 株乳酸菌($P<0.05$)。在本研究中,除菌株 PJ-7 的完整细胞组的清除率是大于破碎细胞组的,其余 4 株乳酸菌则是破碎细胞组的结果更高,因此,说明细胞的不同部位均发现了清除超氧阴离子的活性物质,而非仅存在与细胞内或细胞外。李丹丹^[31]研究了 20 株乳酸菌的超氧阴离子清除率,结果发现大多数乳酸菌的完整细胞组超氧阴离子清除率要大于无细胞提取物组,但也有部分乳酸菌的破碎细胞提取物组的超氧阴离子清除率反而更高,本研究结果与其相似。

2.5 抑菌活性

乳酸菌合成的次级代谢产物中含有有机酸、细菌素、过氧化氢等抑菌物质^[32],这些抑菌活性物质对食源性致病菌均有不同程度的抑制作用。图 4b 是 5 株乳酸菌对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、荧光假单胞菌和单增李斯特菌的抑菌活性。其中,

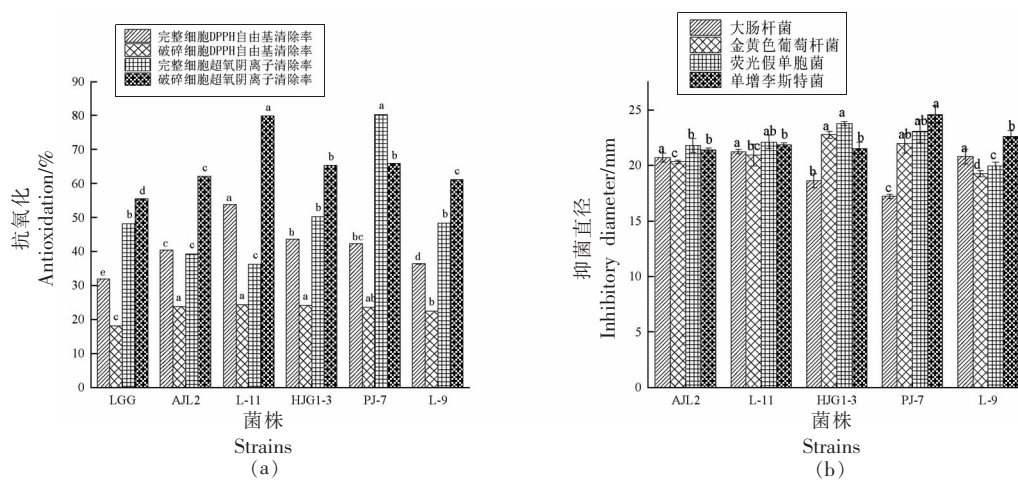


图 4 5 株乳酸菌菌株的抗氧化能力(a)和抑菌活性(b)

Fig.4 The ability of antioxidant (a) and antibacterial (b) of five strains LAB

菌株 L-11、HJL2、L-9 对大肠杆菌的抑制效果较好,抑菌直径均大于 20 mm;菌株 HJG1-3 对金黄色葡萄球菌和荧光假单胞菌的抑菌作用最好,抑菌直径大于 22 mm;5 株乳酸菌对单增李斯特菌均出现良好的抑菌作用,其中菌株 PJ-7 抑菌活性较强,抑菌直径大于 24 mm。结果表明,5 株乳酸菌对于不同的致病菌均具有一定的抑菌活性。

2.6 产酸能力及生长曲线

优良的发酵菌株除具备良好的抗氧化、耐酸及抑菌活性外,还需要具备优良的产酸能力,5 株乳酸菌的产酸情况如图 5a 所示。由图可知,在 8 h 内,菌株 L-11、HJG1-3、PJ-7 及 L-9 的 pH 值均迅速下降,此时大量产酸;在 36 h 时,4 株乳酸菌的 pH 值均降低至 4.0 以下,达到最低点,随后趋于

稳定。但菌株 HJL2 的 pH 值下降较缓慢,在 36 h 时最低值为 4.3,显著高于其它 4 株乳酸菌的最低值,证明其产酸能力较差,故可能不适用于产品应用研究。

为了进一步确定菌株是否可以作为发酵菌株应用于产品中,测定了菌株的生长特性。5 株乳酸菌的生长趋势同 pH 值变化基本符合。由图 5b 可知,乳酸菌 HJL2、PJ-7 及 L-9 在培养 16 h 后进入稳定期,OD 值稳定在 1.6~1.8,但菌株 L-11 和 HJG1-3 在达到 OD 值最高值后即呈现下降趋势,下降可能是由于生长环境、渗透环境以及 pH 值不符合菌株生长的条件,引起菌体本身发生自溶现象,导致植物乳杆菌 L-11 与 HJG1-3 的最高 OD 值显著低于其余 3 株菌株。

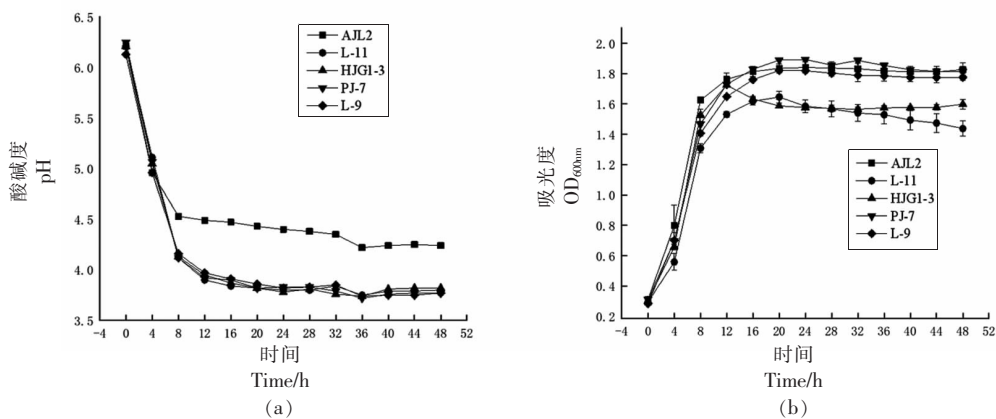


图 5 5 株乳酸菌的产酸(a)及生长(b)情况

Fig.5 Acid production (a) and growth (b) of five strains LAB

2.7 基于 PCA 的多变量分析

选择 GABA 产量、耐酸性、耐胆盐性、抗氧化能力及抑菌活性为指标,利用 PCA 主成分分析对 5 株乳酸菌菌株的数据进行技术表征。结果如图 6 所示,5 株乳酸菌菌株在不同发酵特性上有所差异,其中植物乳杆菌 PJ-7 的 GABA 产量较高,同时也具有良好的抗氧化、抑菌及耐酸性。基于主成分分析,其综合评分排名位列第一。因此,故可选择菌株 PJ-7 作为发酵菌株应用在腌渍蔬菜中。

3 结论

本研究从 40 株乳酸菌中筛选得到 5 株明显产 GABA 乳酸菌,其中包括 4 株植物乳杆菌 PJ-

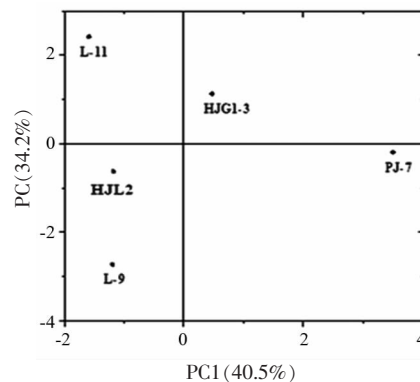


图 6 基于主成分分析(PCA)的筛选结果

Fig.6 Screening results of principal component analysis (PCA)

7、HJG1-3、L-9、L-11 和 1 株坎氏魏斯氏菌 HJL2。其中,植物乳杆菌 PJ-7 的 GABA 产量较高,达到 0.48 mg/mL。菌株生物特性研究中发现,植物乳杆菌 L-11 的耐酸率较高,为 28.33%;植物乳杆菌 HJG1-3 的耐胆盐率较高,为 55.56%;植物乳杆菌 L-11 的 DPPH 自由基清除率较高,为 53.91%;植物乳杆菌 PJ-7 完整细胞的超氧阴离子清除率较高,为 80.20%。最后,基于主成分分析,来源于发酵萝卜的植物乳杆菌 PJ-7 综合评分排名位列第一,在生物特性和产 GABA 能力上均为优良,故可将其作为发酵菌株应用于腌渍蔬菜的标准化和工业化生产,以期生产富含 GABA 的腌渍蔬菜提供一定的理论基础。

参 考 文 献

- [1] 王凯凯,孙滕,宋佳敏,等. γ -氨基丁酸(GABA)形成机理及富集方法的研究进展[J]. 食品工业科技, 2018, 39(14): 323-329.
WANG K K, SUN M, SONG J M, et al. Research progress in the formation mechanism and accumulation methods of γ -aminobutyric acid(GABA)[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(14): 323-329.
- [2] ZHANG X T, LI L N, WANG Q, et al. Effect of xylazine anesthesia on Glu and GABA amino acid neurotransmitters in rat[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2019, 26(1): 46-52.
- [3] 郭瑞成. 赛里木酸奶高产 γ -氨基丁酸菌株高密度培养条件优化及其发酵剂的制备 [D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2021.
GUO R C. High-density cultivation of high-yield γ -aminobutyric acid strains in Sayram yogurt optimization of conditions and preparation of starter[D]. Alar: Tarim University, 2021.
- [4] BHANWAR S, BAMNIAA M, GHOSH M, et al. Use of *Lactococcus lactis* to enrich sourdough bread with γ -aminobutyric acid[J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2013, 64(1): 77-81.
- [5] CHO Y R, CHANG J Y, CHANG H C. Production of gamma - aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* isolated from Kimchi and its neuroprotective effect on neuronal cells[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 17(1): 104-109.
- [6] 曾林,谭霄,张庆,等. 四川泡菜中产 γ -氨基丁酸植物乳杆菌 BC114 发酵条件优化[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(3): 116-122.
ZENG L, TAN X, ZHANG Q, et al. Optimization of γ -aminobutyric acid production by *Lactobacillus plantarum* BC114 from Sichuan pickle[J]. Food and Fermentation Industries, 2017, 43(3): 116-122.
- [7] 林杨,唐琦勇,楚敏,等. γ -氨基丁酸的功能、生产及食品应用研究进展[J]. 中国调味品, 2021, 46(6): 173-179.
LIN Y, TANG Q Y, CHU M, et al. Research progress function, production and food application of γ -aminobutyric acid[J]. China Condiment, 2021, 46(6): 173-179.
- [8] 李亚莉,秘鸣,魏珍珍,等. 1 株酵母菌产 GABA 发酵条件的优化[J]. 中国农学通报, 2013, 29(33): 389-393.
LI Y L, MI M, WEI Z Z, et al. Optimization of fermentation conditions for producing γ -aminobutyric acid (GABA) by *candida parapsilosis* GPT-5-11[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, 29(33): 389-393.
- [9] LI Y D, WANG T, LI S, et al. Influence of GABA-producing yeasts on cheese quality, GABA content, and the volatilome[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 154: 112766.
- [10] 孙磊,周成,张琇,等. 高产谷氨酸脱羧酶的菌株筛选及鉴定[J]. 饲料工业, 2021, 42(19): 49-55.
SUN L, ZHOU C, ZHANG X, et al. Screening and identification of strains with high production of glutamate decarboxylase[J]. Feed Industry, 2021, 42(19): 49-55.
- [11] 宁亚维,马梦戈,杨正,等. γ -氨基丁酸的制备方法及其功能食品研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(23): 238-247.
NING Y W, MA M G, YANG Z, et al. Analysis of free radical changes of four vegetable oils during oxidation at room temperature[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(23): 238-247.
- [12] 刘璐,吴江丽,杨金桃,等. 发酵鱼酱酸产 GABA 乳酸菌的分离筛选及发酵特性[J]. 食品科学, 2021, 42(18): 73-79.
LIU L, WU J L, YANG J T, et al. Isolation and fermentation characteristics of γ -aminobutyric acid-

- producing lactic acid bacteria from Yujiangsuān, a traditional Miao ethnic fermented condiment[J]. Food Science, 2021, 42(18): 73-79.
- [13] VICHITPHAN S, VICHITPHAN K, WONGHAN W. Isolation and identification of gamma-aminobutyric acid (GABA)-producing lactic acid bacteria for using as starter cultures in Thai fermented sausage 'Sai Krok Esan'[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2013, 24(1): S82.
- [14] 贤乾隆. 产 γ -氨基丁酸乳酸菌的筛选及其功能性发酵酸奶的研制[D]. 柳州: 广西科技大学, 2013.
XIAN Q L. Selection of γ -aminobutyric acid-producing lactic acid bacteria and the development of functional yoghurt[D]. Liuzhou: Guangxi University of Science and Technology, 2013.
- [15] 肖君荣. 发芽处理对糙米中GABA含量影响及其蒸煮食品品质研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2016.
XIAO J R. Study on Effects of germination on the content of GABA and edible quality of brown rice [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2016.
- [16] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 289-294.
DONG X Z, CAI M Y. Handbook of systematic identification of common bacteria[M]. Beijing: Science Press, 2001: 289-294.
- [17] 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: 6-15.
LING D W, DONG X Z. Classification and identification of lactic acid bacteria and experimental methods[M]. Beijing: China Light Industry Press, 1999: 6-15.
- [18] 高永悦, 吕欣然, 杜宏, 等. 降解温和气单胞菌 AHLs 乳酸菌的筛选及在三文鱼保鲜中的应用[J]. 食品科学, 2022, 43(14): 1-10.
GAO Y Y, LÜ X R, DU H, et al. Screening of lactic acid bacteria degrading *Aeromonas sobria* AHLs and its application in salmon preservation[J]. Food Science, 2022, 43(14): 1-10.
- [19] 黄燕燕, 郭均, 黎恒希, 等. 降胆固醇乳酸菌的体外筛选及其降胆固醇机理探讨[J]. 食品科学, 2018, 39(6): 88-94.
HUANG Y Y, GUO J, LI H X, et al. *In vitro* screening of lactic acid bacteria for cholesterol-lowering activity and the underlying mechanism[J]. Food Science, 2018, 39(6): 88-94.
- [20] ELFAHRI K R, VASILJEVIC T, YEAGER T, et al. Anti-colon cancer and antioxidant activities of bovine skim milk fermented by selected *Lactobacillus helveticus* strains[J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(1): 31-40.
- [21] HE Z, WANG X, Li G, et al. Antioxidant activity of prebiotic ginseng polysaccharides combined with potential probiotic *Lactobacillus plantarum* C88 [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2015, 50(7): 1673-1682.
- [22] 贾丽艳, 高娟娟, 荆旭, 等. 一株产细菌素细菌 CGMCC 6624 分离鉴定及其生物学特性[J]. 中国食品学报, 2019, 19(12): 243-249.
JIA L Y, GAO J J, JING X, et al. The screening and identification of CGMCC 6624 producing bacteriocine and its biological characteristics[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(12): 243-249.
- [23] 高鹏, 韩金志, 陆兆新. 广谱抗菌乳酸菌的分离鉴定及细菌素的提取和纯化[J]. 食品科学, 2016, 37(11): 160-166.
GAO P, HAN J Z, LU Z X. Isolation and identification of lactic acid bacterial strain with broad-spectrum antibacterial activity and extraction and purification of bacteriocin produced by it[J]. Food Science, 2016, 37(11): 160-166.
- [24] 倪琳钰, 叶朋飞, 刘静, 等. γ -氨基丁酸的乳酸菌转化及在食品中的应用[J]. 现代食品, 2022, 28(3): 22-26.
NI L Y, YE P F, LIU J. The transformation of γ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria and its application in food[J]. Modern Food, 2022, 28(3): 22-26.
- [25] 王祎然, 韦明明, 张涵, 等. 酸汤中乳酸菌的鉴定及其耐酸、耐胆盐和抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2020, 41(16): 121-126, 139.
WANG Y R, WEI M M, ZHANG H, et al. Identification acid and bile salt tolerance, and antioxidant ability of lactic acid bacteria isolated from sour soup [J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(16): 121-126, 139.
- [26] 韦庆旭, 张建鹏, 梁煜晨, 等. 青贮用乳酸菌的分离鉴定及生物学特性评价[J]. 动物营养学报, 2022, 34(7): 1-13.
WEI Q X, ZHANG J P, LIANG Y C, et al. Isolation, identification and biological characteristics e-

- valuation of lactic acid bacteria for silage[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2022, 34(7): 1-13.
- [27] 甘祥武, 黄魁英, 曹丁, 等. 3株植物乳杆菌 LPL04、LPL05、LPL14 的益生特性[J]. 食品科技, 2017, 42(12): 2-5.
- GAN X W, HUANG K Y, CAO D, et al. Probiotic properties of three *Lactobacillus plantarum* strains LPL04, LPL05 and LPL14 [J]. Food Science and Technology, 2017, 42(12): 2-5.
- [28] 丁丽丽, 吕欣然, 高永悦, 等. 鱼肠道中抗氧化活性乳酸菌的筛选及鉴定[J]. 食品科学, 2021, 42(10): 127-132.
- DING L L, LÜ X R, GAO Y Y, et al. Screening for and identification of lactic acid bacteria with antioxidant activity from the intestinal tract of fish[J]. Food Science, 2021, 42(10): 127-132.
- [29] 赵艳红. 乳酸菌抗氧化功能特性研究及其在羊肉发酵香肠中的应用[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2020.
- ZHAO Y H. Study on the antioxidative function of lactic acid bacteria and its application in mutton fermented sausage[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2020.
- [30] MA J S, LIU H, HAN C R, et al. Extraction, characterization and antioxidant activity of polysaccharide from *Pouteria campechiana* seed[J]. Carbohydrate Polymers, 2020(229): 115409.
- [31] 李丹丹. 西藏传统牦牛乳制品中抗氧化乳酸菌的筛选及发酵性能研究[D]. 拉萨: 西藏大学, 2020.
- LI D D. Study on screening of lactic acid bacteria with antioxidant and fermentation properties from traditional Yak Dairy products in Tibet[D]. Lhasa: Tibet University, 2020.
- [32] SALAS M L, MOUNIER J, VALENCE F, et al. Antifungal microbial agents for food biopreservation: a review[J]. Microorganisms, 2017, 5(3): 37.

Screening of Lactic Acid Bacteria with Production of γ -aminobutyric Acid from Traditional Pickled Vegetables in Northeast China and Their Biological Properties

Lü Xinran¹, Li Xubo¹, Tong Xinyao¹, Bai Fengling¹, Li Jianrong^{1*}, Tan Xiqian¹,
Cui Fangchao¹, Yu Zhangfu², Shen Ronghu²

¹National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, Food Safety Key Lab of Liaoning Province, Bohai University, Jinzhou 121013, Liaoning

²Hangzhou Xiaoshan Agriculture Development Co., Ltd., Hangzhou 311215

Abstract In this study, lactic acid bacteria (LAB) with producing γ -aminobutyric acid (GABA) were screened from traditional pickled vegetables in Northeast China using thin-layer chromatography (TLC) and the Berthelot colorimetric method. LAB were identified by the physiological and biochemical test and 16S rRNA sequencing analysis. And then their biological properties, including acid tolerance, bile salt tolerance, antioxidant, antibacterial activity, antioxidant activity and acid production rate, were analyzed using principal component analysis (PCA). These results showed that five strains LAB with typical GABA-producing were obtained from forty strains LAB from traditional pickled vegetables, including one strain *Weissella kandleri* HJL2 and four strains *Lactobacillus plantarum* PJ-7, HJG1-3, L-9, and L-11. Among them, *L. plantarum* PJ-7 isolated from fermented radish had better ability to synthesize GABA, and the yield reached 0.48 mg/mL. There were significant differences in acid tolerance, bile salt tolerance, antioxidant and other biological characteristics of the five strains LAB. Based on PCA, *L. plantarum* PJ-7 ranked the first in the comprehensive score of biological characteristics. Therefore, *L. plantarum* PJ-7 has excellent GABA synthesis ability and good biological characteristics, which would provide a theoretical basis for the development of GABA-rich pickled vegetables.

Keywords lactic acid bacteria; γ -aminobutyric acid; biological properties; screening