浙东腌冬瓜优势乳酸菌的分离及产酶特性分析

张庆峰，吴祖芳，翁佩芳，张鑫

（宁波大学海洋学院，应用海洋生物技术教育部重点实验室，浙江宁波 315211）

摘要：通过微生物分离和鉴定从浙东传统腌冬瓜中得到 4 株优势菌，分别为植物乳杆菌（Lz151）、发酵乳杆菌（Lz152）、棒状乳杆菌（Lz153）和戊糖乳杆菌（Lz154），通过酶学分析方法对 4 株乳酸菌的产生乳酸脱氢酶、亚硝酸盐还原酶、酯酶和转氨酶的特性进行研究。实验表明，4 株乳酸菌都有乳酸脱氢酶、亚硝酸盐还原酶、酯酶和转氨酶活性，植物乳杆菌和发酵乳杆菌有较高的乳酸脱氢酶活力，分别达到 122.34 U/mL 和 113.56 U/mL；发酵乳杆菌和戊糖乳杆菌有较高的亚硝酸盐还原酶活性，分别为 17.62 U/mL 和 13.42 U/mL，而棒状乳杆菌具有最低的亚硝酸盐还原酶活力，为 4.74 U/mL；植物乳杆菌和棒状乳杆菌比其他两种乳酸菌有较高的酯酶活性，达到 11.53 U/mL 和 13.78 U/mL。此外，植物乳杆菌和戊糖乳杆菌有较高的转氨酶活性，分别为 25.37 U/mL 和 23.19 U/mL。4 株乳酸菌产酶的最适温度和 pH 存在菌种间差异，而且同一株菌产生各种酶的最适条件也不同，分离乳酸菌分别在 30 ℃、35 ℃、40 ℃产各种酶的能力最高，而发酵乳杆菌、植物乳杆菌的最适产酶 pH 分别为 6.0、7.0。

关键词：冬瓜；乳酸菌；分离；鉴定；酶活性

文章篇号：1673-9078(2016)3-119-125 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.3.020

Isolation of Dominant Lactic Acid Bacteria Strains in Pickled Wax Gourd from Eastern Zhejiang and Analysis of Its Enzyme-producing Characteristics

ZHANG Qing-feng, WU Zu-fang, WENG Pei-fang, ZHANG Xin

(Key laboratory of applied marine biotechnology, School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: By isolation and identification of microorganisms in traditional pickled wax gourd from eastern Zhejiang, four dominant lactic acid bacteria (LAB) strains were obtained which were *Lactobacillus plantarum* (Lz151), *Lactobacillus fermentum* (Lz152), *Lactobacillus coryniformis* (Lz153), and *Lactobacillus pentosus* (Lz154). The characteristics of all strains to produce lactate dehydrogenase, nitrite reductase, esterase, and aminotransferase were analyzed by enzymological methods. The results showed that the four strains presented the lactic dehydrogenase, nitrite reductase, esterase, and aminotransferase activities. *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* showed relatively high lactic dehydrogenase activity. The values reached 122.34 U/mL and 113.56 U/mL, respectively. *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus pentosus* presented relatively high nitrite reductase activity. The values reached 17.62 U/mL and 13.42 U/mL, respectively. *Lactobacillus coryniformis* possessed the lowest nitrite reductase activity (4.74 U/mL). Compared with the other two strains, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus coryniformis* displayed higher esterase activity. The values reached 11.53 U/mL and 13.78 U/mL, respectively. Moreover, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus pentosus* exhibited higher aminotransferase activity, whose values were 25.37 U/mL and 23.19 U/mL, respectively. Inter-strain differences were presented in the optimal enzyme-producing temperature and pH among the four strains and the optimum conditions for the same strain to produce various enzymes were different. The optimum temperatures for the isolated LAB strains to produce various enzymes were 30°C, 35°C, and 40°C, respectively. The optimal enzyme-producing pH values of *Lactobacillus fermentum and Lactobacillus plantarum* were 6.0 and 7.0, respectively.

Key words: enzymatic activity; identification; isolation; lactic acid bacteria; wax gourd

收稿日期：2015-05-18

基金项目：国家自然科学基金（31171735）；宁波市农业择优委托项目（2012C10016）

作者简介：张庆峰（1989-），男，硕士研究生，主要从事食品生物技术研究

通讯作者：吴祖芳（1963-），男，博士，教授，博士生导师

腌冬瓜，又称为臭冬瓜，是浙江东部一带倍受人们喜爱的一种传统腌制发酵食品，其加工机理是利用一定浓度的食盐溶液产生的高渗透压来抑制不耐盐有害微生物的生长，并借助于耐盐性有益微生物（主要是乳酸菌）进行缓慢的自然发酵，以形成腌冬瓜独特

的品质。Zhao 等[1]采用 16S rDNA 技术对腌冬瓜过程中的微生态进行了分析研究，发现在不同腌制时期起发酵作用的优势菌有所不同。在制作过程中，主要是由于乳酸菌发酵产生的有益物质，降低 pH 值，抑制有害微生物的生长，加上盐腌调味，使其颇具独特香味品质，而这些传统腌制菜理化品质及特独风味等的形成机制长期以来一直没有系统深入的研究。

在蔬菜腌制过程中，微生物的生长活动及其代谢离不开酶的作用，由微生物分泌的酶类主要有蛋白酶、淀粉酶、酯酶、亚硝酸盐还原酶等。乳酸脱氢酶是生物体内糖酵解过程中重要的氧化还原酶，在乳酸菌发酵过程中，乳酸脱氢酶在辅酶Ⅰ（NAD^+，NADH）存在下催化乳酸脱氢形成丙酮酸或使丙酮酸还原为乳酸。由文献报道[2-4]，从发酵黄瓜中分离得到布氏乳杆菌可利用乳酸并降低乳酸浓度，增加 pH、乙酸和丙酸的浓度，这可能与乳酸脱氢酶催化乳酸脱氢形成丙酮酸有关。亚硝酸盐是蔬菜腌制加工产品的主要危害因素，亚硝酸盐还原酶是一种可催化亚硝酸盐还原，将 NO_2^-还原成 NO 或 NH_4^+并有效降解亚硝酸盐的酶类，大多为胞内酶，张馨月等研究发现[5]，在 MRS（乳酸菌专用培养基）体系中，*LCR* 6013 能有效降解亚硝酸盐是源于细胞内亚硝酸盐还原酶的作用；在食品中通常利用乳酸菌来降解亚硝酸盐，有研究学者通过引入纯种乳酸菌或混合乳酸菌对酱腌菜中的亚硝酸盐进行降解[6]。酯酶是可以水解羧酯键的酶，但该酶也能催化合成低级脂肪酸酯，与酯相关的香味状况不仅依赖于相关联的酯类，还依赖于通过酯酶释放出来的化合物如脂肪酸和高级醇[7]，发酵产生的简单有机酸和醇类在酯酶作用下形成酯类，对腌制食品风味等品质产生重要影响。由蛋白质及多肽催化水解产生的氨基酸在氨基酸转化酶作用下转化为各种风味化合物，增加腌制食品的品质。对野生型乳酸菌中氨基酸转化酶活性研究分析[8]，结果表明，乳酸菌氨基酸转化酶活性具有很大的差异性，具有较高风味形成能力的菌株在乳品工业中的利用，对于乳制品芳香风味形成有重要作用。

本文从浙东特色腌制冬瓜中分离获得几株优势乳酸细菌，并进行了生理生化鉴定；对其产乳酸脱氢酶、亚硝酸盐还原酶、酯酶和转氨酶的特性进行了分析，对于分析腌冬瓜中酶系的形成及其作用机理奠定了基础。研究结果对于浙东传统腌冬瓜等产品的品质变化产生影响的乳酸菌资源挖掘及腌制品质量变化的生化机制解明具有重要的意义和提供一定的基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验原料及药品

冬瓜卤水样品：本实验室提供；MRS 固体培养基、MRS 肉汤培养基：购于杭州微生物试剂有限公司；改良 MRS 固体培养基：在 MRS 固体培养基基础上添加碳酸钙 2%；API50 CHL 试剂盒：购于法国生物梅里埃（bioMerieux,sa）公司；还原型辅酶Ⅰ（NADH）、甲基紫精、α-酮戊二酸、5'-磷酸吡哆醛、对硝基苯酸酯，国药集团化学试剂有限公司；NaCl、$NaNO_2$ 等均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

LDZX-40BⅠ型立式蒸汽灭菌器，上海申安医疗器械厂；XPX 智能型生化培养箱，宁波江南仪器厂；高速冷冻离心机，德国 Eppendorf 公司；紫外可见分光光度计，上海美谱达仪器有限公司；超净工作台，苏州净化设备有限公司；PHS-3C pH 计，上海精密科学仪器有限公司；电子天平，上海民桥精密科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 优势乳酸菌的分离纯化

将不同时期（5、10、15、20 d）的冬瓜卤水进行梯度稀释，取 10^{-4}、10^{-5}、10^{-6} 梯度稀释液涂布在改良 MRS 固体培养基上，培养 24~48 h，挑取有明显溶钙圈、形态相似且数量较多的菌落在 MRS 固体培养基上划线，直到得到纯菌株。将纯菌种接种到 MRS 斜面培养基，于 4 ℃储藏备用。

1.2.2 优势乳酸菌的鉴定[9]

1.2.2.1 形态观察

将分离后的菌株涂布在 MRS 固体培养基上，在 37 ℃下培养 24~48 h，观察菌落形态，再进行革兰氏染色以观察菌株个体形态。

1.2.2.2 生理生化实验

对分离得到的菌株进行接触酶实验、葡萄糖发酵产气实验、明胶液化实验、甲基红（M-R）试验、吲哚试验、乙酰甲基甲醇试验（V-P 试验）、产硫化氢试验。

1.2.2.3 糖醇发酵实验

依据 API50 CHL 说明书，采用 API50 CHL 试剂盒对分离到的菌株进行 49 种不同碳源的糖醇发酵实验。

1.2.3 粗酶液的制备

将斜面保藏菌种接种到 MRS 液体培养基进行活化，将活化的种子液以 100 μL 的量分别接种到 MRS

肉汤培养基及添加亚硝酸盐、酯、苯丙氨酸的 MRS 肉汤培养基中，在 37 ℃培养 2~3 d。培养结束后，发酵液在 4 ℃下冷冻离心 10 min（8000×g），用磷酸缓冲液将沉淀菌体重新悬浮，然后再次离心得到菌体。将离心后的菌体细胞在-20 ℃下冷冻 10 min，在 4 ℃下将菌体转入研钵中并添加适量石英砂，在 4℃下研磨破碎 10 min，再用 8 mL 磷酸缓冲液将研磨样品吸入离心管中，在 4 ℃下冷冻离心 15 min（10000×g），取上清液即为粗酶液。

1.2.4 优势乳酸菌产酶特性分析

1.2.4.1 乳酸脱氢酶活性的分析

依据文献[10]方法进行测定，在辅酶 NADH 存在下，乳酸脱氢酶催化丙酮酸转化为乳酸盐，同时 NADH 氧化为 NAD，NADH 在 340 nm 处的吸光值不断减少，因此连续测定反应体系在 340 nm 处的吸光值。反应体系：磷酸盐缓冲液（0.1 mol/L、pH 7.4）2.8 mL，NADH（6 mmol/L） 0.1 mL，丙酮酸钠（30 mmol/L）0.1 mL,酶液 20 μL，25 ℃水浴 5 min。酶活力单位定义，在本实验条件下，每分钟氧化分解 1 μmol NADH 所需的酶液为一个酶活力单位。

1.2.4.2 亚硝酸盐还原酶活性的分析

参考文献[11]方法并略做改进。0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液（pH 7.4）1 mL，0.1 mol/L NaCl 100 μL，0.1 mol/L $NaNO_2$ 100 μL，0.1 mol/L MV（甲基紫精）100 μL，0.1 mol/L$Na_2S_2O_4$ 100 μL，酶液 20 μL。37 ℃水浴中反应 10 min，剧烈振荡终止反应（以磷酸缓冲液为空白）。加入 100 μL 4 g/L 对氨基苯磺酸、100 μL 2 g/L 盐酸奈乙二胺溶液，待显色稳定后，取 100 μL 稀释至 25 mL，在 538 nm 处比色测定亚硝酸盐的变化。酶活力单位定义为：在本实验条件下，每分钟还原 1 μg 亚硝酸盐所需要的酶液定义为一个酶活力单位。

1.2.4.3 酯酶活性的分析

根据文献[12]方法并做修改。反应体系为：860 μL 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液（pH 7.4），100 μL 酶液，40 μL 25 mmol/L 对硝基苯乙酸酯，在 37 ℃下反应 1 h，加入 100 μL 0.5 mol/L NaOH 终止反应。加入 4 mL 蒸馏水进行稀释并在 400 nm 处测吸光值变化。酶活力单位定义，在本实验条件下，每分钟还原 1 μol 对硝基苯酚所需要的酶液为一个酶活力单位。

1.2.4.4 转氨酶活性的分析

依据文献[8]方法测定转氨酶活性。反应液体系体积为 1 mL，其构成为 70 mM Tris-HCl，pH 为 7.8，10 mM 苯丙氨酸，10 mM α-酮戊二酸，0.1 mM 磷酸吡哆醛，滴加 100 μL 酶液，在 37 ℃水浴中保温 1 h，滴加 14% H_3PO_4 终止反应。混合液在 12000 r/min 离心 5 min，取上清液分析苯丙酮酸的含量。酶活力单位定义，在本实验条件下，每分钟催化产生 1 μmol 苯丙酮酸所需要的酶液为一个酶活力单位。

1.2.4.5 温度对乳酸菌产酶特性的影响

将活化菌株分别接种到不同的产酶培养基中，分别在 25 ℃、30 ℃、35 ℃、40 ℃、45 ℃温度下培养 2-3 d。然后测定乳酸脱氢酶、亚硝酸盐还原酶等在不同温度下的酶活性。

1.2.4.6 pH 对乳酸菌产酶特性的影响

将活化菌株分别接种到不同初始 pH 的产酶培养基中，在 37 ℃下培养 2~3 d，然后测定乳酸脱氢酶、亚硝酸盐还原酶等在不同 pH 下的酶活性。

1.2.5 数据处理

所有试验平行进行三次，利用 SAS8.1 软件进行统计分析，$p<0.05$ 为显著性差异。

2 结果与分析

2.1 优势乳酸菌分离鉴定

经 3 次重复试验，从腌冬瓜卤水中分离并鉴定得到 4 株乳酸菌，编号分别为 Lz151、Lz152、Lz153 和 Lz154。4 株菌株的菌落特征及细胞形态观察结果如表 1 所示。

表 1 各菌株的形态特征

Table 1 Morphological characteristics of each strain

菌株	菌落形态	革兰氏染色	菌体形态
Lz151	白色，圆形，中央隆起光滑，边缘整齐	G^+	杆状，单生或成对
Lz152	白色，圆形，边缘整齐	G^+	菌体短杆状，单生或成对
Lz153	白色，圆形，光滑，边缘整齐	G^+	球杆状，单生，成对或短链
Lz154	表面光滑，，边缘整齐有光泽	G^+	杆状，单个

各菌株生理生化试验结果如表 2 所示。从表 2 可以看出各菌株发酵葡萄糖产酸不产气，接触酶阴性，不能使明胶发生液化，在发酵中也不产生乙酰甲基甲醇、吲哚和 H_2S 等物质。相比而言，Lz151 和 Lz153 耐盐性较强于 Lz152 和 Lz154。

依据 API50 CHL 说明书，采用 API50 CHL 试剂盒对 4 株菌进行碳源发酵鉴定，其结果如表 3 所示。由表 3 结果与已鉴定的种比较，并结合文献[13]对菌

株进行鉴定分析，得到鉴定结果 Lz151 为植物乳杆菌，Lz152 为发酵乳杆菌，Lz153 为棒状乳杆菌，Lz154 为戊糖乳杆菌。

表 2 各菌株的生理生化特性

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of each strain

实验项目	Lz151	Lz152	Lz153	Lz154
接触酶	-	-	-	-
葡萄糖产气	-	-	-	-
明胶液化	-	-	-	-
甲基红实验	+	+	+	+
V-P 实验	-	-	-	-
吲哚实验	-	-	-	-
产硫化氢实验	-	-	-	-
耐 6%NaCl	+	+	+	+
耐 9%NaCl	d	-	d	-
耐 12%NaCl	-	-	-	-

注：+：90%为阳性，-：90%为阴性，d：弱阳性。

2.2 乳酸菌产酶特性分析

经过鉴定的 4 株菌在 37 ℃下进行液体培养 2~3 d，进行产乳酸脱氢酶、亚硝酸盐还原酶、酯酶和转氨酶酶活力分析，结果如表 4 所示。

结果表明，4 株菌的乳酸脱氢酶活性都较高，相比而言，Lz151 和 Lz152 比 Lz153、Lz154 有较高活性，分别为 122.34 U/mL 和 113.56 U/mL。依据 Lz151 和 Lz152 具有较高的乳酸脱氢酶活性，说明其具有较高的产乳酸能力，在蔬菜腌制前期通过产生乳酸以降低腌制体系的 pH，不仅能抑制有害微生物，还能增加腌制品的风味品质。除了 Lz153，其他 3 株乳酸菌都有较高的亚硝酸盐还原酶活力，其中 Lz152 亚硝酸盐还原酶活力最高，为 17.62 U/mL，说明具有亚硝酸盐还原酶活性的优势乳酸菌可降低冬瓜腌制过程中产生的亚硝酸盐含量，表明亚硝酸盐含量的下降不仅仅是由于在酸性环境下的降解，还与具有较高亚硝酸盐还原酶活性的优势菌有关，或者是两者共同作用的结果。据文献报道[14]，在相同条件下发酵乳杆菌对亚硝酸盐的降解效果优于戊糖乳杆菌，有研究者利用发酵乳杆菌和戊糖乳杆菌代替亚硝酸盐作为发色剂用于发酵香肠[15]，实验表明发酵乳杆菌和戊糖乳杆菌能有效促进肉品发色、降低亚硝酸盐的含量，并改善香肠品质。

表 3 各菌株碳源发酵结果

Table 3 Fermentation results on carbon source for each strain

菌株	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Lz151	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
Lz152	-	-	-	d	+	d	-	-	-	+	+	+	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lz153	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Lz154	d	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	d	+	+	+
25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-
+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	+	+	+	+	-	d	d	-	-	-	d	d	-	-	-	-	-	-	+	-	-

注：1至49代表49种碳源化合物，+：90%为阳性，-：90%为阴性，d：弱阳性。

表 4 4 株菌的各种酶的酶活力（单位：U/mL）

Table 4 Activities of various enzymes for each strain

菌株	乳酸脱氢酶	亚硝酸盐还原酶	酯酶	转氨酶
Lz151	122.34 ± 0.89^{a}	10.55 ± 1.65^{c}	11.53 ± 1.96^{ab}	25.37 ± 2.02^{a}
Lz152	113.56 ± 1.62^{b}	17.62 ± 0.89^{a}	6.85 ± 1.58^{c}	17.83 ± 1.21^{b}
Lz153	89.09 ± 3.68^{d}	4.74 ± 1.08^{d}	13.78 ± 1.46^{a}	14.75 ± 2.38^{b}
Lz154	94.92 ± 1.96^{c}	13.42 ± 1.52^{b}	9.67 ± 1.68^{bc}	23.19 ± 2.42^{a}

注：同一栏中字母不同者表示有显著性差异（$p<0.05$）。

酯酶与发酵食品的风味品质密切相关，试验菌 Lz151 和 Lz153 有较高的酯酶活力，分别为 11.53 U/mL 和 13.78 U/mL，其中 Lz153 酯酶活力最高，达到 13.78 U/mL，而 Lz152 酯酶活力最低，为 6.85 U/mL。此外，Lz151（25.37 U/mL）有最高的转氨酶活力，其次为 Lz154（23.19 U/mL）和 Lz152（17.83 U/mL）转氨酶

活力较高，而 Lz153（14.75 U/mL）转氨酶活力最低，转氨酶是氨基酸和 α-酮酸转化过程中一种关键的酶，在氨基酸转氨过程中伴有 α-酮酸到羟基酸或风味化合物如羧酸、醛类、醇类的可逆转化，据报道[16]，乳酸菌可利用 α-酮酸产生羧酸，但转化机理尚不明确。因此，冬瓜等腌制过程中，具有较高的酯酶和转氨酶活性的优势菌可促进腌制品风味的形成，与 Pérez-Martín[12]和 Fernández de Palencia[8]的结果相似，酯酶和转氨酶在发酵腌制品风味形成中起着至关重要的作用。由于乳酸菌在不同的发酵条件下产酶能力不同，以下进一步分析确定其最适的产酶条件。

2.2.1 温度对乳酸菌产酶特性的影响

温度是影响乳酸菌生长与代谢的重要因素之一。设计了不同温度（25 ℃、30 ℃、35 ℃、40 ℃、45 ℃）条件下对 4 株试验菌产酶特性的影响，结果如图 1 所示。

由图 1 可知，4 株乳酸菌在不同温度下呈现出不同的产酶能力，且 4 株菌最适产酶温度有所差异。对于同一种乳酸菌，其产生 4 种酶的最适温度也有所差异。Lz151 在 30 ℃有最高的乳酸脱氢酶活性（为 139.38 U/mL），在 35 ℃时具有最高的亚硝酸盐还原酶和转氨酶活性，而酯酶活力在 40 ℃时具有最高值（10.91 U/mL）；Lz152 在 30 ℃有最大酯酶活性（8.03 U/mL），而乳酸脱氢酶、亚硝酸盐还原酶、转氨酶活力在 35 ℃最高；Lz153 亚硝酸盐还原酶活力在 30 ℃下最高（为 9.19 U/mL），在 35 ℃时其他 3 种酶的活性最高；在 40 ℃下，Lz154 的乳酸脱氢酶和转氨酶活性最高，在 30 ℃时亚硝酸盐还原酶活性最高（为 21.69 U/mL），而酯酶活力在 35 ℃时有最高值（7.00 U/mL）。综上所述，4 株菌在 30~40 ℃下产酶能力强，过低或过高的温度呈现出弱的酶活性，这可保证其产酶温度的可控性。因此，在常温腌制过程中，存在的优势乳酸菌产生的几种酶的相互协同影响，对促进腌制品独特品质的形成具有重要的作用。

2.2.2 初始 pH 对乳酸菌产酶特性的影响

与温度相比，pH 是影响乳酸菌生长代谢的另一重要因素。过低或过高的 pH 都会抑制发酵过程乳酸菌的生长及其产酶的能力。因此，通过 HCl 和 NaOH 调节培养基溶液的 pH，分析不同 pH 下 4 株试验菌的产酶特性，结果如图 2 所示。

由图 2 可得，由 pH 引起的 4 株乳酸菌产酶特性变化趋势与温度引起的变化相似。各菌株产生 4 种酶的最适初始 pH 在 5.0~7.0 之间，在图 2a 中，Lz151 和 Lz154 在 pH 7.0 时有最高乳酸脱氢酶活性，分别为 74.50 U/mL 和 57.86 U/mL，而 Lz152 和 Lz153 乳酸脱氢酶活力在 pH 6.0 有最大值。由此可见，在腌制初期，体系 pH 值接近于乳酸菌最适生长和产酶的 pH，而乳酸菌迅速生长并产生乳酸，降低腌制体系酸度。

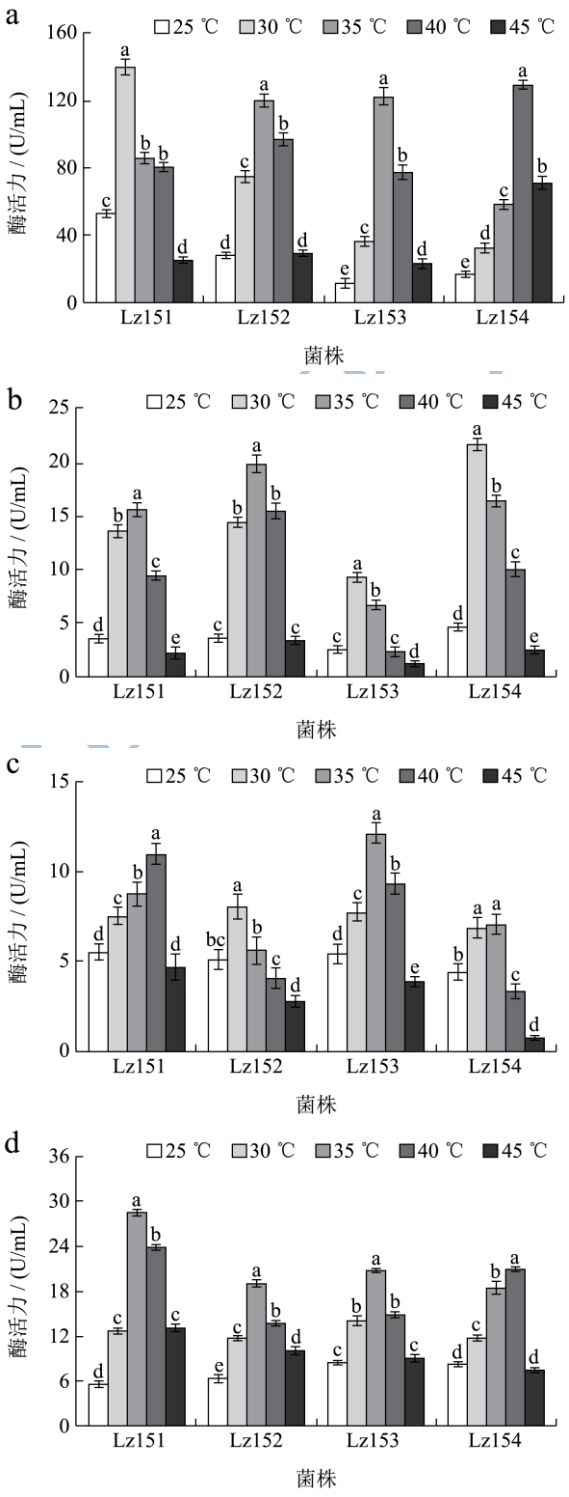


图 1 温度对 4 株菌产酶特性的影响

Fig.1 Effect of temperature on the enzymatic properties of four strains

注：a：乳酸脱氢酶，b：亚硝酸盐还原酶，c：酯酶，d：转氨酶）；图中不同字母表示差异显著（$p<0.05$）。

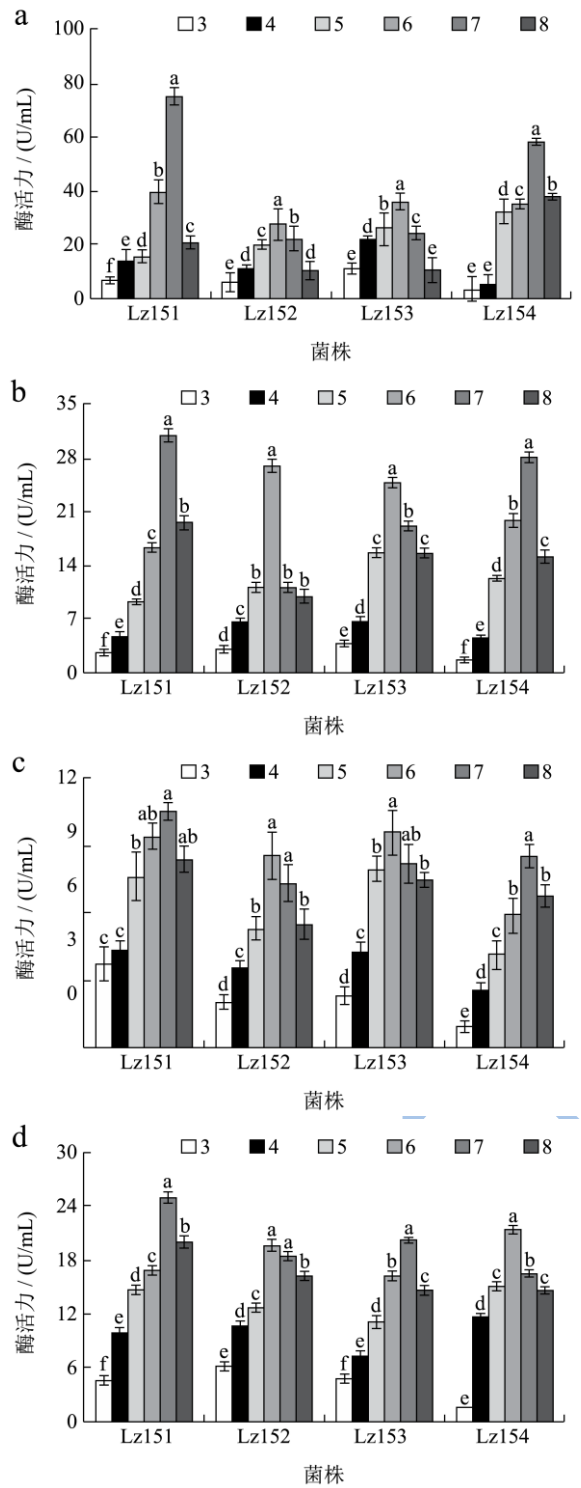


图 2 pH 对 4 株菌产酶特性的影响

Fig.2 Effect of pH on the enzymatic properties of four strains

注：a：乳酸脱氢酶，b：亚硝酸盐还原酶，c：酯酶，d：转氨酶；图中不同字母表示差异显著（$p<0.05$）。

从图 2b 可知，在 pH 7.0 时，Lz151 和 Lz154 具有最高亚硝酸盐还原酶活性，而 Lz152 和 Lz153 在 pH 6.0 有最高亚硝酸盐还原酶活力。在腌制第 5 d 开始，亚硝酸盐含量迅速下，同时 pH 也逐渐下降[17]，而腌制体系 pH 4.6 低于乳酸菌亚硝酸盐还原酶最适 pH 6.0 或 7.0，亚硝酸盐含量迅速降低，可能由于亚硝酸盐还原酶和酸共同作用的结果。由图 2c 知，Lz151 和 Lz154 的酯酶活力在 pH 7.0 时取最大值，分别为 10.45 U/mL 和 8.54 U/mL，而 Lz152 和 Lz153 在 pH6.0 具有最高酯酶活性。在图 2d 中，pH 7.0 时，Lz151 和 Lz153 产转氨酶能力最大，而 Lz152 和 Lz154 转氨酶活力在 pH 6.0 时最高。在初始 pH 4 时，4 株菌有较高的转氨酶活性，可增加腌制体系中氨基酸的种类及含量，有助于提高腌制品的风味。其原因可能是蛋白质或多肽的水解；或者氨基酸和酮酸共同存在，在转氨酶作用下，氨基酸之间相互转化导致其多样性的发生；或者是前后两者共同作用导致的。

3 结论

3.1 以冬瓜卤水为研究对象，对发酵卤水中乳酸菌进行筛选，通过形态观察和生理生化实验以及碳源发酵，分离鉴定出 4 株优势乳酸菌，分别为植物乳杆菌（Lz151）、发酵乳杆菌（Lz152）、棒状乳杆菌（Lz153）和戊糖乳杆菌（Lz154）。4 株乳酸菌都有乳酸脱氢酶、亚硝酸盐还原酶、酯酶、转氨酶活性，酶活性存在菌种间差异。

3.2 温度对各种酶活力的大小有影响。植物乳杆菌（Lz151）30 ℃培养产乳酸脱氢酶活力最高，35 ℃培养产亚硝酸盐还原酶和转氨酶活力最高，而 40 ℃培养具有最高的酯酶活力。对发酵乳杆菌（Lz152），30 ℃时培养时其酯酶活力最高，而乳酸脱氢酶、亚硝酸盐还原酶和转氨酶活力在 35 ℃培养时达最高。棒状乳杆菌（Lz153）培养温度为 35 ℃时其乳酸脱氢酶、酯酶和转氨酶活力最高，而亚硝酸盐还原酶活性在 30 ℃培养时最高。戊糖乳杆菌（Lz154），产亚硝酸盐还原酶和酯酶最高活力时其培养温度分别为 30 ℃和 35 ℃；在 40 ℃培养时，具有最大的乳酸脱氢酶和转氨酶活性。

3.3 植物乳杆菌（Lz151）4 种酶酶活性、棒状乳杆菌（Lz153）的转氨酶活力以及戊糖乳杆菌（Lz154）的乳酸脱氢酶、亚硝酸盐还原酶、酯酶活性在 pH 7.0 时最高；棒状乳杆菌（Lz153）的乳酸脱氢酶、亚硝酸盐还原酶、酯酶活性，戊糖乳杆菌（Lz154）的转氨酶活力及发酵乳杆菌（Lz152）的乳酸脱氢酶、亚硝酸盐还原酶、酯酶和转氨酶活力在 pH 6.0 时最高。

3.4 各种酶在不同条件下产生量及其变化规律对于利用乳酸菌腌制蔬菜的品质变化机理解释、起动发酵菌剂开发或生产工艺模式确定以及产品质量控制等许多方面可提供重要的参考依据。

参考文献

[1] Zhao Y W, Wu Z F, Shen X Q, et al. Bacteria community analysis by quantitative real-time PCR of fermenting wax gourd and its changes of organic acids [J]. Journal of Food Processing and Preservation. 2014, 38(4): 1653-1659

[2] Franco W, Pérez-Díaz I M, Johanningsmeier S D, et al. Characteristics of spoilage-associated secondary cucumber fermentation [J]. Applied Environmental Microbiology, 2012, 78(4): 1273-1284

[3] Johanningsmeier S D, McFeeters R F. Detection of volatile spoilage metabolites in fermented cucumbers using nontargeted comprehensive two dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry (GCxGC-TOFMS) [J]. Journal of Food Science, 2012, 76(1): 168-177

[4] Johanningsmeier S D, McFeeters R F. Metabolism of lactic acid in fermented cucumbers by *Lactobacillus buchneri* and related species, potential spoilage organisms in reduced salt fermentations [J]. Food Microbiology, 2013(35): 129-135

[5] 张馨月,刘冬梅,许喜林,等. *LCR* 6013 降解亚硝酸盐的途径及其亚硝酸盐还原酶的初步定位[J].现代食品科技, 2013, 29(11):2627-2632
ZHANG Xin-yue, LIU Dong-mei, XU Xi-lin, et al. The degradation pathway of nitrite by *LCR* 6013 and the primary localization of its nitrite reductase [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(11): 2627-2632

[6] Oh C K, Oh M C, Kim S H. The depletion of sodium nitrite by lactic acid bacteria isolated from kimchi [J]. Journal of Medicinal Food, 2004, 7(1): 38-44

[7] Sumby K M, Grbin P R, Jiranek V. Microbial modulation of aromatic esters in wine: current knowledge and future prospects [J]. Food Chemistry, 2010, 121: 1-16

[8] Fernández de Palencia P, de la Plaza M, Amárita F, et al. Diversity of amino acid converting enzymes in wild lactic acid bacteria [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006(38): 88-93

[9] 赵俊仁,程水明,洪玮娣,等.风干武昌鱼中乳酸菌的分离鉴定及发酵性能研究[J].现代食品科技,2014,30(8):100-105
ZHAO Jun-ren, CHENG Shui-ming, HONG Wei-di, et al. Isolation, identification, and fermentation properties of *Lactic acid bacteria* from air dried and fermented *Megalobrama amblycephala* [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(8): 100-105

[10] Zhao R, Zheng S, Duan C C, et al. NAD-dependent lactate dehydrogenase catalyses the first step in respiratory utilization of lactate by *Lactococcus lactis* [J]. FEBS Open Bio, 2013, 3: 379-386

[11] 刘萍,罗岩,张莹,等.亚硝酸还原酶的分离纯化及其性质研究[J].中国酿造,2011,9:22-27
LIU Ping, LUO Yan, ZHANG Ying, et al. Isolation, purification and properties of nitrite reductase [J]. China Brewing, 2011, 9: 22-27

[12] Pérez-Martín F, Seseña S, Izquierdo P M, et al. Esterase activity of lactic acid bacteria isolated from malolactic fermentation of red wines [J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 163: 153-158

[13] 张刚.乳酸细菌—基础、技术和应用[M].北京:化学工业出版社,2007
ZHANG Gang. Foundation, technology and application of lactic acid bacteria [M]. Bingjing: Chemical Industry Press, 2007

[14] 朱英莲,郭丽萍.发酵乳杆菌和戊糖乳杆菌降解亚硝酸盐的效果比较研究[J].食品科技,2014,39(7):22-25
ZHU Ying-lian, GUO Li-ping. Different degradation effect to nitrite between *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus pentosus* [J]. Food Science and Technology, 2014, 39(7): 22-25

[15] 朱英莲,李沛瑶.戊糖乳杆菌替代亚硝酸盐发色效果的研究[J].食品科技,2014,39(5):120-124
ZHU Ying-lian, LI Pei-yao. The effect of curing agent of *Lactobacillus pentoeus* [J]. Food Science and Technology, 2014, 39(5): 120-124

[16] Ganesan B, Seefeldt K, Koka R C, et al. Monocarboxylic acid production by lactococci and lactobacilli [J]. International Dairy Journal, 2004, 14(3): 237-246

[17] 赵永威,吴祖芳,沈锡权,等.冬瓜腌制过程中微生物多样性的分析.中国食品学报,2014,14(6):208-1213
ZHAO Yong-wei, Wu Zu-fang, Shen Xi-quan, et al. Microbial community diversity analysis during the pickled processing of wax gourd [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14(6): 208-1213