

耐盐乳酸菌的益生特性及其在酱油发酵中的应用

李佳莲^{1,2,3,4}, 王涛^{1,2,3,4}, 方芳^{*1,2,3,4}

(1. 江南大学 未来食品科学中心, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 食品合成生物技术教育部工程研究中心, 江苏 无锡 214122; 4. 江南大学 江苏省食品合成生物技术工程研究中心, 江苏 无锡 214122)

摘要: 食品来源的耐盐乳酸菌(LAB)具有安全性和一定的抗逆特性,研究它们的益生特性和发酵特性对寻找可用于食品发酵的功能菌株具有重要意义。作者考察了5株来源于酱油发酵酱醪的乳酸菌的抑菌、抗氧化能力和对胃酸、胆盐与溶菌酶的耐受能力,以及对冻干和高温条件的抗性,并评估了乳酸菌协同高盐稀态酱油发酵的能力。结果表明,5株乳酸菌可在低盐质量浓度(50 g/L)下生长,且对中高盐质量浓度(100 g/L和150 g/L)有良好的耐受能力。这些耐盐乳酸菌皆具有低疏水性,可抑制大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌等致病菌,并具有良好的抗氧化能力。其中 *Pediococcus acidilactici* ZQ1 与 *Pediococcus acidilactici* WT1 对胃酸、胆盐和溶菌酶的耐受能力高于 *Pediococcus pentosaceus* WT6、*Weissella paramesenteroides* JL-5、*Weissella paramesenteroides* LCW-28 和对照菌 *Lactiplantibacillus plantarum* JP31。此外,*P. acidilactici* WT1 经冷冻干燥处理后的存活率最高(85%),且该菌株在60℃下的存活率比 *L. plantarum* JP31 高2个数量级。利用 *P. acidilactici* WT1 协同高盐稀态酱油发酵,可使酱油中氨基酸态氮和有机酸质量浓度分别提高11.03%和34.42%。该研究初步证实了食品来源的耐盐乳酸菌的益生特性和用于酱油发酵的潜力。

关键词: 耐盐乳酸菌; 益生菌; 抗逆特性; 酱油; 协同发酵

中图分类号: TS 201.3 文章编号: 1673-1689(2024)05-0009-10 DOI: 10.12441/spyswjs.20221221003

Probiotic Properties of Salt-Tolerant Lactic Acid Bacteria and Their Applications in Soy Sauce Fermentation

LI Jialian^{1,2,3,4}, WANG Tao^{1,2,3,4}, FANG Fang^{*1,2,3,4}

(1. Science Center for Future Foods, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Engineering Research Center of Ministry of Education on Food Synthetic Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 4. Jiangsu Province Engineering Research Center of Food Synthetic Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Salt-tolerant lactic acid bacteria (LAB) derived from food resources are generally safe and tolerant to stress. Studying their probiotic and fermentation characteristics is of great significance for finding novel functional strains that can be used for food fermentation. Probiotic characteristics including antimicrobial activity, antioxidant capacity and tolerance to gastric acid, bile salts and

收稿日期: 2022-12-21

修回日期: 2023-02-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(32172182)。

* 通信作者: 方芳(1976—),女,博士,研究员,博士研究生导师,主要从事传统酿造食品微生物资源与安全研究。

E-mail: ffang@jiangnan.edu.cn

lysozyme of 5 strains of salt-tolerant LAB from soy sauce moromi were investigated in this study. Their resistance to freeze-drying and high temperature conditions were also investigated and the synergistic ability of the 5 strains in high-salt liquid-state soy sauce fermentation was evaluated. The results showed that 5 strains of LAB could grow under low salinity (50 g/L) and had good tolerance to medium and high salinity (100 g/L and 150 g/L). These salt-tolerant LAB strains showed low hydrophobicity and could inhibit pathogens such as *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. These strains have good antioxidant capacity. Among them, the tolerance of *Pediococcus acidilactici* ZQ1 and *Pediococcus acidilactici* WT1 to gastric acid, bile salts and lysozyme are higher than that of *Pediococcus pentosaceus* WT6, *Weissella paramesenteroides* JL-5, *Weissella paramesenteroides* LCW-28, as well as the control strain *Lactiplantibacillus plantarum* JP31. In addition, the survival rate of *P. acidilactici* WT1 after freeze-drying treatment was the highest (85%) and the survival rate of this strain at 60 °C was 2 orders of magnitude higher than that of *L. plantarum* JP31. *P. acidilactici* WT1 increased the mass concentrations of amino acid nitrogen and organic acids in soy sauce by 11.03% and 34.42%, respectively, through synergistic fermentation. The results of this study preliminarily confirm the probiotic properties of food-derived salt-tolerant LAB and their potential applications in soy sauce fermentation.

Keywords: salt-tolerant lactic acid bacteria, probiotics, stress resistant characteristics, soy sauce, synergistic fermentation

益生菌是一类具有调节肠道菌群、维持肠道稳态、免疫调节、抑制病原菌、抗过敏、抗肿瘤、延缓衰老等生理功能的有益微生物^[1-3]。益生菌顺利到达宿主主体内并发挥作用需具备对消化道中酸、胆盐和酶的耐受能力,并且能够黏附于肠道上皮细胞。乳酸菌是益生菌的重要来源之一,它们产生的短链脂肪酸可参与改善肠道菌群结构、缓解结肠疾病和神经元疾病症状。乳酸菌具有的抗氧化活性也有助于调节肠道稳态^[4]。此外,由感染致病细菌引起的高烧、头痛、虚弱、干咳、腹痛或便秘等症状^[5],虽然可以通过抗生素治疗,但药物的不当使用会增加致病菌的耐药性^[6]。乳酸菌产生的次生代谢物(细菌素、有机酸等),是天然的抗菌物质,并且是安全的食品生物防腐剂,可以代替有害的化学防腐剂^[5-6]。细胞代谢过程中产生的活性氧(ROS)会通过氧化应激过程造成生物体受损,导致多种与年龄相关的退行性疾病^[7]。乳酸菌产生的具有有益抗氧化活性的生物活性化合物可以消除 H₂O₂ 和 O²⁻, 弥补人体内源性抗氧化能力不足的缺陷;此外,乳酸菌还可通过硫氧还蛋白-硫氧还蛋白还原酶、谷胱甘肽-谷氧还蛋白或其他有助于修复受损蛋白质和 DNA 的保护系统来减少氧化应激的损伤^[8-9]。

乳酸菌可通过 H⁺-ATP 酶活性、外部碱化、胆盐水解酶活性等抵御胃肠道胁迫环境^[10]。耐盐乳酸菌除具有这些特性外,还可在受到盐胁迫时通过调控代谢途径对渗透压变化做出反应,并通过调节胞内代谢平衡来维持细胞的正常生长^[10-11]。因此,在应对不利甚至极端环境方面,耐盐乳酸菌具有优于非耐盐乳酸菌的优势。贺晓洁等从红酸汤中筛选出的一株耐盐产酸植物乳植杆菌 L-14, 具有良好的耐酸(pH 2 条件下培养 3 h, 存活率高于 80%)和耐胆盐胁迫(3 g/L 胆盐处理 3 h, 活菌数高于 1×10⁶ CFU/mL)能力^[12]。此外,耐盐乳酸菌还具有合成细菌素、胞外多糖等益生特性,在延长食品保质期、有效预防和治疗细菌感染等方面具有较好的应用潜力^[13]。耐盐乳酸菌具有良好的耐受环境胁迫的能力,可在食品加工过程中保持较高的活菌数和细胞活性^[14]。嗜酸乳酸足球菌、戊糖足球菌和魏斯氏菌等耐盐乳酸菌广泛存在于腊肠、泡菜、酱油、豆豉等高盐发酵食品中。它们在食品发酵过程中起着重要的作用,不仅可促进有益发酵微生物生长,还对食品中酯类、有机酸及短链脂肪酸等风味物质的合成具有重要贡献^[4,15-16]。此外,由减盐引起的发酵食品体系中功能微生物的减少和腐败菌的增殖,会导致发酵食品中

风味物质的损失以及生物胺等有害物质的产生,进而影响食品的风味和安全^[17]。利用分离自食品发酵体系的功能微生物进行协同发酵,可能会比利用其他来源的菌株更具优势^[18]。

作者通过考察分离自酱油发酵酱醪的5株耐盐乳酸菌的益生特性、抗逆特性和协同高盐稀态酱油发酵的能力,揭示耐盐乳酸菌作为食品发酵功能微生物的应用特性和潜力。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

嗜酸乳酸足球菌 *Pediococcus acidilactici* ZQ1 和 *Pediococcus acidilactici* WT1、戊糖足球菌 *Pediococcus pentosaceus* WT6、类肠膜魏斯氏菌 *Weissella paramesenteroides* LCW-28 和 *Weissella paramesenteroides* JL-5;分离自发酵酱醪;植物乳植杆菌 *Lactiplantibacillus plantarum* JP31、大肠杆菌 *Escherichia coli* JL-1、鼠伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhimurium* UK-1、蜡状芽孢杆菌 *Bacillus cereus* ZJY04、变异链球菌 *Streptococcus mutans* CGMCC1.2499、腐生葡萄球菌 *Staphylococcus saprophyticus* DY-4、鲁氏接合酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* ZQ-01;保藏于课题组菌种库。

正己烷(色谱纯)、溶菌酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶、猪胆盐;上海麦克林生化科技有限公司;福林酚试剂、没食子酸、DPPH 自由基;美国阿拉丁工业公司;LB 培养基、MRS 培养基;青岛海博生物技术有限公司。其他常规试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

PCR 仪:美国 Bio-Rad 公司;超净工作台、恒温培养箱:上海跃进医疗器械厂;漩涡振荡仪:上海琪特分析仪器有限公司;紫外分光光度计、高效液相色谱:日本岛津公司;冷冻干燥机:上海田枫实业有限公司;恒温水浴锅:上海森信实验仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 乳酸菌种子液的制备 分别将培养皿上的乳酸菌单菌落接种于液体 MRS 培养基,37 °C 培养 12 h 至对数生长期,再以 2% 的体积分数接种至新鲜液体 MRS 培养基,37 °C 培养 12 h 至对数生长期。

1.3.2 乳酸菌耐盐能力测定 取对数期 (OD_{600} 为 1) 乳酸菌培养液,8 000 r/min 离心 5 min 取菌体,用

PBS(0.02 mol/L,pH 7.0)洗涤 2 遍,按 1×10^9 CFU/mL 分别接入含有 50、100、150 g/L 的 NaCl 的 MRS 液体培养基并置于 37 °C 培养 24 h。分别于 0 h 和 24 h 取样,梯度稀释后涂布至 MRS 固体培养基上,于 37 °C 培养 48 h 后进行活菌计数,并计算存活率。

1.3.3 抑菌能力测定 用 LB 半固体培养基将 5 种指示菌的种子液稀释至活菌数为 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ CFU/mL,倒在底层放有牛津杯的固体琼脂上,待培养基凝固后,用无菌镊子将牛津杯轻轻拔出,注入 100 μ L 上述耐盐乳酸菌的发酵上清液,置于 4 °C 静置 2 h,待上清液扩散,然后放于 37 °C 的恒温培养箱中正置培养约 12 h,取出测量抑菌圈直径^[19]。

1.3.4 表面特性测定

1) 表面疏水性 取对数期 (OD_{600} 为 1) 乳酸菌培养液,用 PBS 洗涤 2 遍后使菌体重悬,调整菌悬液 OD_{600} 至 0.8。在试管内加入 4 mL 菌液、1 mL 正己烷,对照组不加正己烷,封口,用漩涡振荡仪剧烈振荡 60 s,静置 15 min 分层。吸取下层水溶液 1.0 mL,以 PBS 为空白对照,在 600 nm 波长下测定光密度,细菌细胞表面疏水性 (cell-surface hydrophobicity, CSH) 按式(1)计算^[20]:

$$D_{\text{CSH}} = (D_0 - D_s) / D_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中: D_{CSH} 为细胞表面疏水性; D_0 为对照组光密度值; D_s 为实验组光密度值。

2) 表面凝集性 取 5 mL 按上述方法调整好菌体浓度的菌悬液,于 37 °C 恒温箱静置 2 h,轻轻吸取 200 μ L 上层悬浮液,不摇动,测定其在 600 nm 波长处的光密度值,菌体表面凝集性 (surface agglutination, SA) 按式(2)计算^[21]:

$$D_{\text{SA}} = (D_0 - D_t) / D_0 \times 100\% \quad (2)$$

式中: D_{SA} 为表面凝集性; D_0 为菌悬液初始光密度值; D_t 为菌悬液静置后光密度值。

1.3.5 抗氧化能力测定

1) 三价铁离子还原力 将 1 mL 菌液 (OD_{600} 为 1,悬浮于 PBS 中)与 2.5 mL PBS 和 2.5 mL 的 10 g/L 铁氰化钾水溶液混合,在 50 °C 孵育 30 min 后,加入 2.5 mL 的 100 g/L 三氯乙酸并将混合物离心 10 min,吸取上层溶液 2.5 mL,与 2.5 mL 水和 0.5 mL 的 1 g/L FeCl_3 水溶液混合,并在 700 nm 处测定光密度,以蒸馏水为对照且与实验组同步处理,将测得的结果分别减去实验组数值并计算还原百分比^[22]。

2) 总酚还原力 向 100 μ L 菌液 (OD_{600} 为 1,悬

浮于PBS) 中加入 250 μL 福林酚试剂, 静置 1 min 后, 加入 750 μL 的 200 g/L Na_2CO_3 水溶液, 用水定容至 5.0 mL, 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 2 h, 8 000 r/min 离心 2 min 后于 760 nm 处测量光密度, 以 245 mg/L 没食子酸溶液为对照且与实验组同步处理, 将实验组测得的光密度值与没食子酸溶液光密度值进行比较并计算还原百分比^[22]。

3) DPPH 自由基清除能力 取 200 μL 菌液(OD_{600} 为 1, 悬浮于 PBS 中), 加入 3.8 mL 的 0.1 mmol/L DPPH 自由基甲醇溶液, 涡旋混匀后避光反应 30 min, 8 000 r/min 离心 2 min 后于 517 nm 处测定光密度, 以 0.1 mmol/L DPPH 自由基甲醇溶液光密度为对照, 分别减去实验组数值并计算降解百分比^[23]。

1.3.6 胃酸耐受能力测定 将 10 g/L 胃蛋白酶用稀盐酸调整 pH 分别至 2、3、4, 溶液过 0.22 μm 微孔滤膜除菌, 配制人工胃液^[24-25]。

取对数期(OD_{600} 为 1)乳酸菌培养液, 用 PBS 洗涤 2 遍, 按 1×10^9 CFU/mL 接入人工胃液中, 放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱静置培养, 分别于 0、1、2、3 h 吸取菌悬液, 进行梯度稀释并涂布至 MRS 固体培养基上, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱倒置培养 48 h 进行活菌计数。

1.3.7 胆盐耐受能力测定 将 10 g/L 胰蛋白酶、6.8 g/L 磷酸二氢钾分别加入最终质量浓度为 1、2、3 g/L 的猪胆盐, 用氢氧化钠溶液调节 pH 至 6.8, 溶液过 0.22 μm 微孔滤膜除菌, 配制人工肠液^[24-25]。

取对数期(OD_{600} 为 1)乳酸菌培养液, 用 PBS 洗涤 2 遍, 按 1×10^9 CFU/mL 接入人工肠液中, 放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱静置培养, 分别于 0、1、2、3 h 从中吸取菌悬液, 进行梯度稀释, 涂布至 MRS 固体培养基上, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱倒置培养 48 h 进行活菌计数。

1.3.8 溶菌酶抗性测定 取对数期 (OD_{600} 为 1)乳酸菌培养液, 用 PBS 洗涤 2 遍, 接入含有 2 g/L 溶菌酶的 MRS 液体培养基中, 调整 OD_{600} 至 0.5, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱静置培养, 分别于 0、1、2、3 h 从中吸取菌悬液, 在 600 nm 处测量光密度^[22]。

1.3.9 冷冻干燥耐受能力测定 冻干保护液配方为: 低聚果糖 50 g/L、脱脂乳粉 50 g/L、氯化钠 8.5 g/L。

取对数期(OD_{600} 为 1)乳酸菌培养液, 用 PBS 洗涤 2 遍, 按 1×10^9 CFU/mL 接入冻干保护液中, 取 10 mL 放入 -80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱过夜冷冻, 然后放于冷冻干燥机 (50 MPa, -4 $^{\circ}\text{C}$) 处理 1 周制得冻干菌

粉。用生理盐水溶解冻干菌粉并定容至 10 mL, 梯度稀释后涂布至 MRS 固体培养基上, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱倒置培养 48 h 进行活菌计数, 并计算存活率。

1.3.10 高温耐受能力测定 取对数期(OD_{600} 为 1)乳酸菌培养液, 用 PBS 洗涤 2 遍, 按 1×10^9 CFU/mL 接入 PBS 中, 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min 后从中吸取菌悬液, 进行梯度稀释, 涂布至 MRS 固体培养基上, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱倒置培养 48 h 进行活菌计数。

1.3.11 协同酱油发酵

1) 制曲工艺 将豆粕与 1.5 倍质量的水混合均匀, 浸泡 2 h, 121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 30 min, 冷却至室温。将酱油曲精(原料总质量的 0.15%)与适量面粉混合均匀, 然后再和豆粕、面粉(质量比为 6:4)充分拌匀。在恒温恒湿培养箱中 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 适时翻曲, 制曲 48 h, 曲料表面长满黄绿色菌丝即为成曲^[17]。

2) 发酵工艺 将制好的成曲与含 200 g/L NaCl 的盐水以 1:2 的体积比混合, 使体系内盐的最终质量浓度为 180 g/L。将混合均匀后的酱醪分装入 2 L 烧杯中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 发酵 40 d。发酵前期每天搅拌一次, 后期 2~3 d 搅拌一次。分别于第 0、5、10、15、20、25、30、35、40 天取样^[17]。协同发酵第 0 天添加 1×10^8 CFU/g 的 *Pediococcus acidilactici* WT1, 第 25 天(pH 5.0~5.5)添加 1×10^6 CFU/g 鲁氏接合酵母 ZQ-01; 对照(CK)组只添加鲁氏接合酵母, 添加方式与协同发酵相同。

3) 样品分析 取酱醪样品 5 g 溶解在 100 mL 的生理盐水中, 涡旋混匀过滤之后用于分析。微生物采用活菌平板计数法测定; 氨基酸态氮质量浓度采用氢氧化钠滴定法测定; 有机酸采用高效液相色谱测定^[17]。

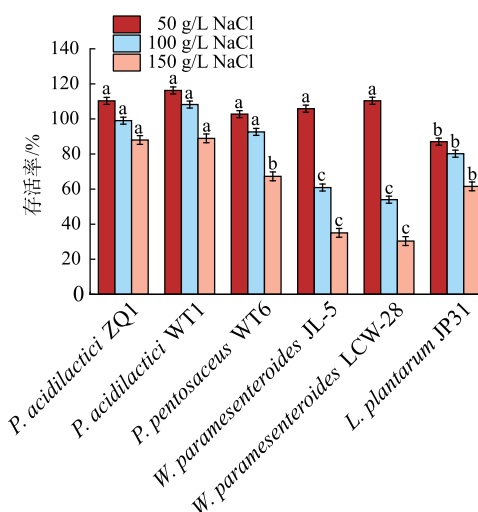
1.3.12 数据处理 所有实验均重复 3 次, 使用 SPSS 26 进行数据处理和显著性分析, 并用 Origin 2022 进行绘图处理。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌耐盐能力比较

耐盐乳酸菌分离自酱油发酵的酱醪。酱醪耐盐乳酸菌可在 50 g/L 盐质量浓度条件下生长, 且它们对盐的耐受能力均好于对照菌 *L. plantarum* JP31。*P. acidilactici* 和 *P. pentosaceus* 在中高盐质量浓度(100 g/L 和 150 g/L)下, 对盐的耐受能力均好于对照菌 *L. plantarum* JP31。其中 *P. acidilactici* WT1 耐

盐能力最强,可在50 g/L 和 100 g/L 盐质量浓度条件下生长。酱醪来源的耐盐乳酸菌 *P. acidilactici* 对高盐的耐受能力也强于分离自土壤的耐盐乳酸菌(10~12 g/dL 的盐质量浓度下存活率低于 60%)^[26]。菌株 *W. paramesenteroides* JL-5 和 *W. paramesenteroides* LCW-28 在中高盐度时存活率低于 *L. plantarum* JP31,见图 1。虽然 *W. paramesenteroides* 在中高盐质量浓度下的存活率比本研究其他菌株低,但它们在较高盐条件下可在较长一段时间内保持较高的菌体浓度,这对于它们在高渗食品发酵体系中发挥作用仍具有重要意义^[15]。



不同小写字母表示组间具有显著性差异($P<0.05$)。

图 1 乳酸菌在不同盐质量浓度下的存活率

Fig. 1 Survival rate of lactic acid bacteria at different salt mass concentrations

2.2 乳酸菌的益生特性

2.2.1 乳酸菌的抑菌作用 益生菌可以通过抑制肠道致病菌或形成肠道保护屏障来维持肠道微生态平衡,也可通过抑制发酵食品中的腐败菌来提高食品的安全性及品质。作者考察了耐盐乳酸菌对大

肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、蜡状芽孢杆菌、变异链球菌和腐生葡萄球菌的抑菌能力。由表 1 可知,食品来源的耐盐乳酸菌对 4 株致病菌和 1 株食品腐败菌均有一定的抑菌效果。菌株 *P. acidilactici* ZQ1 和 *P. acidilactici* WT1 对 *E. coli*、*S. typhimurium* 和 *B. cereus* 的抑菌能力与 *L. plantarum* JP31 基本相同,但它们对 *S. mutans* 的抑菌能力优于 *L. plantarum* JP31。菌株 *P. pentosaceus* WT6 和 *W. paramesenteroides* 对 4 株致病菌的抑制能力接近 *L. plantarum* JP31,但不如 *P. acidilactici*。腐生葡萄球菌是酱油发酵过程中的腐败菌,含量过高会引起酱油变质。菌株 *P. pentosaceus* WT6 和 *L. plantarum* JP31 对 *S. saprophyticus* 都具有较强的抑制作用,略优于其他菌株。

2.2.2 乳酸菌的表面特性 肠道黏附能力是益生菌定植肠道并发挥其益生功效的关键因素之一。这种黏附能力可通过菌株表面疏水性和表面凝集性来表征^[27]。由图 2 可知,作者考察的几株耐盐乳酸菌和植物乳植杆菌的表面疏水性和表面凝集性差别不大,都在 10%~17%。虽然这些菌株的表面特性同黏附能力较好的菌株相比属于较低水平,但此结果表明它们具有一定的肠道黏附能力。

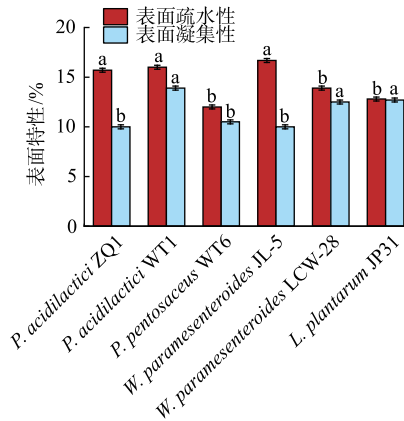
2.2.3 乳酸菌的抗氧化能力 益生菌的抗氧化能力不仅可以抵抗氧化应激对菌株造成的伤害,对于宿主也具有保护作用。作者考察了耐盐乳酸菌的三价铁离子还原能力、总酚还原能力和 DPPH 自由基清除能力。由图 3 可知,耐盐乳酸菌均有一定的抗氧化能力,能还原 5% 以上的三价铁离子;除 *W. paramesenteroides* LCW-28 外,总酚还原力均高于 20%;对 DPPH 自由基的清除能力都在 50% 以上。这说明耐盐乳酸菌与植物乳植杆菌一样,具有良好的抗氧化能力。

表 1 乳酸菌的抑菌能力

Table 1 Antimicrobial ability of lactic acid bacteria

菌株	抑菌能力				
	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. saprophyticus</i>
<i>P. acidilactici</i> ZQ1	++	+++	+++	++	++
<i>P. acidilactici</i> WT1	++	+++	++	+++	++
<i>P. pentosaceus</i> WT6	++	++	++	+	+++
<i>W. paramesenteroides</i> JL-5	+	+++	++	+	++
<i>W. paramesenteroides</i> LCW-28	+	++	++	++	+
<i>L. plantarum</i> JP31	++	+++	+++	+	+++

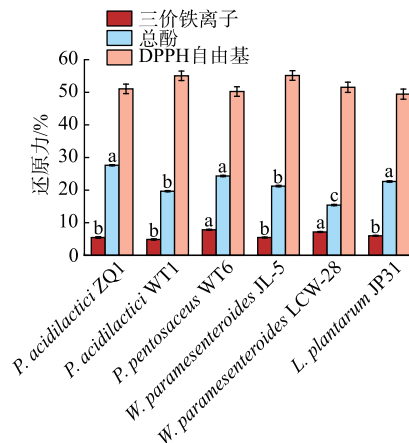
注: + 表示抑菌圈直径 10.0~14.9 mm, ++ 表示抑菌圈直径 15.0~19.9 mm, +++ 表示抑菌圈直径 20.0~24.9 mm。



不同小写字母表示组间具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

图2 乳酸菌的表面特性

Fig. 2 Surface characteristics of lactic acid bacteria



不同小写字母表示组间具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

图3 乳酸菌的抗氧化能力

Fig. 3 Antioxidant capacity of lactic acid bacteria

2.2.4 乳酸菌对胃酸的耐受能力 益生菌通过消化道的重要屏障是胃酸,因为极端酸性环境能够使大部分细菌失活。作者将耐盐乳酸菌暴露于不同pH的模拟胃酸中,来考察它们对胃酸的耐受能力。如图4所示,pH 2条件对所有乳酸菌的存活均有影响。其中菌株 *P. acidilactici* WT1 在此条件下的耐受性最好,活菌数只下降了1个数量级; *P. acidilactici* ZQ1 和 *L. plantarum* JP31 活菌数分别下降了2个数量级和3个数量级;而 *P. pentosaceus* WT6、*W. paramesenteroides* JL-5 和 *W. paramesenteroides* LCW-28 活菌数低于 10 CFU/mL。在 pH 3 和 pH 4 条件下, *P. acidilactici* 的总菌数几乎不变, *L. plantarum* JP31 的存活受到影响较小, *P. pentosaceus* WT6、*W. paramesenteroides* JL-5 和

W. paramesenteroides LCW-28 耐受酸性条件的能力最差。上述结果表明,耐盐乳酸菌 *P. acidilactici* WT1 与 *P. acidilactici* ZQ1 的耐酸能力优于 *L. plantarum* 和 *W. paramesenteroides*,可耐受 pH 3 和 pH 4 的酸性环境。

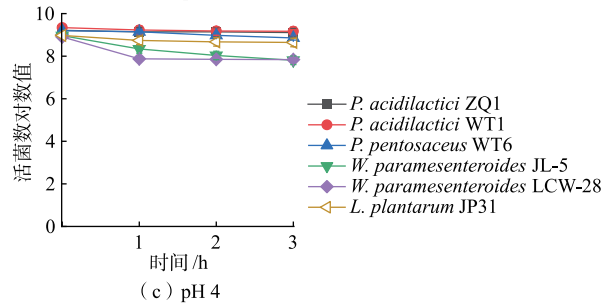
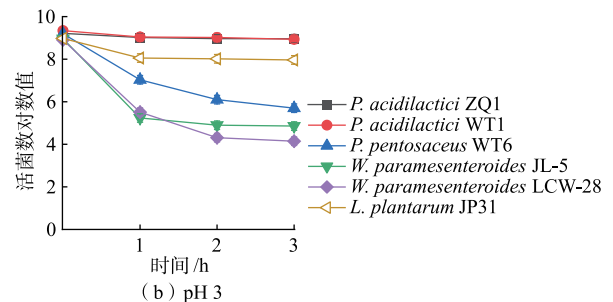
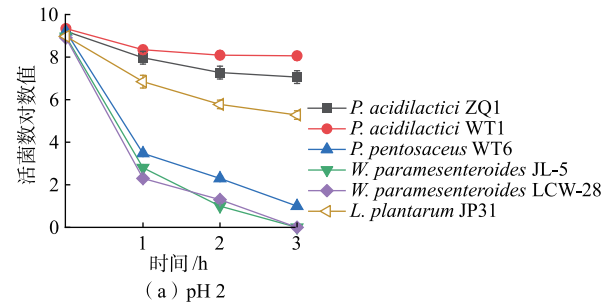


图4 乳酸菌对模拟胃酸的耐受能力

Fig. 4 Tolerance of lactic acid bacteria to simulated gastric acid

2.2.5 乳酸菌的胆盐耐受能力 益生菌在肠道中会受到胆汁中胆盐的抑制作用^[27]。作者发现,耐盐乳酸菌 *P. acidilactici* 具有良好的胆盐耐受能力, *P. pentosaceus* WT6 和 *L. plantarum* JP31 耐受胆盐能力次之, *W. paramesenteroides* 耐受胆盐能力最差,见图5。当体系中胆盐质量浓度为 1 g/L 时, *P. acidilactici* WT1 活菌数下降了 0.6 个数量级, *P. acidilactici* ZQ1、*P. pentosaceus* WT6 和 *L. plantarum* JP31 下降了 1~2 个数量级, *W. paramesenteroides* 活菌数下降了 2~3 个数量级。当胆盐质量浓度为 2 g/L 和 3 g/L 时, *P. acidilactici* WT1 与 *P. acidilactici* ZQ1 活菌数几乎与低质量浓度胆盐中相同,而其他

菌株受胆盐胁迫的影响显著且活菌数下降了 5~8 个数量级。

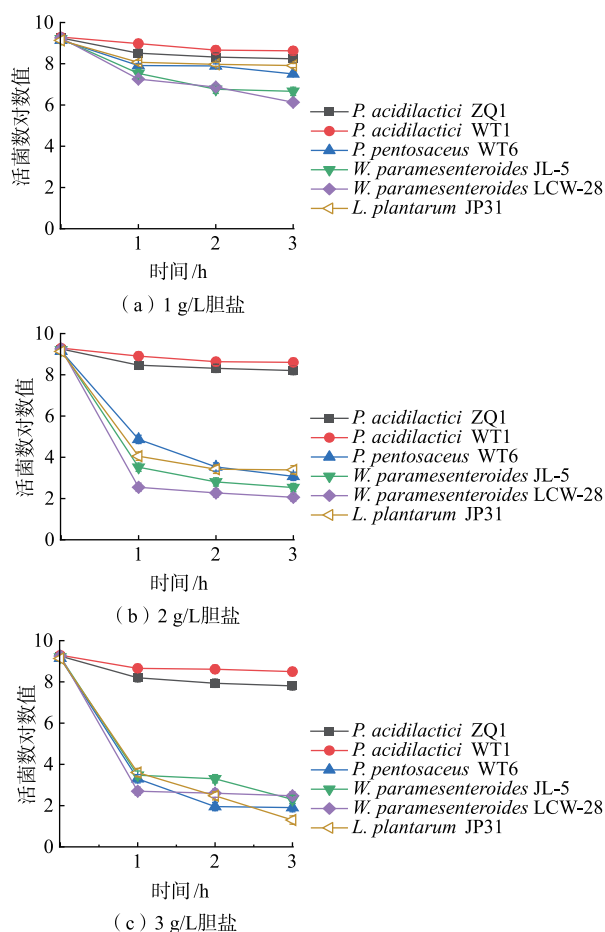


图 5 乳酸菌对胆盐的耐受能力

Fig. 5 Tolerance of lactic acid bacteria to bile salts

2.2.6 乳酸菌对溶菌酶的抗性 肠道益生菌发挥作用的关键是能顺利通过消化道。溶菌酶存在于唾液和小肠液等生物体液中,且对接触菌株的活性及其在肠道中定植有一定的影响^[21]。因此,肠道益生菌需对溶菌酶具备一定的抗性。如图 6 所示, *P. acidilactici* ZQ1 和 *P. acidilactici* WT1 的生长几乎不受 2 g/L 溶菌酶的影响,并且它们对溶菌酶的耐受能力显著高于其他菌株。菌株 *P. pentosaceus* WT6 和 *L. plantarum* JP31 在 2 g/L 溶菌酶存在时生长受到抑制,但仍能缓慢生长。而 *W. paramesenteroides* JL-5 和 *W. paramesenteroides* LCW-28 在溶菌酶存在时生长完全受到抑制。这些结果说明,酱醪来源的耐盐乳酸菌 *P. acidilactici* 对溶菌酶的抗性优于 *L. plantarum*,具有抵御消化道中溶菌酶胁迫的潜力。

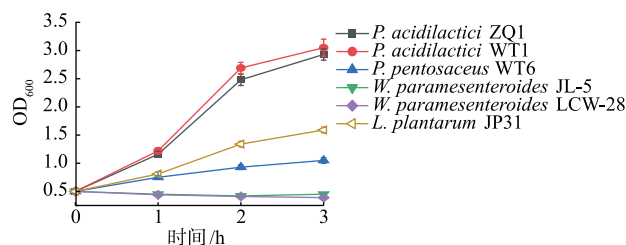


图 6 溶菌酶对乳酸菌生长的影响

Fig. 6 Effect of lysozyme on the growth of lactic acid bacteria

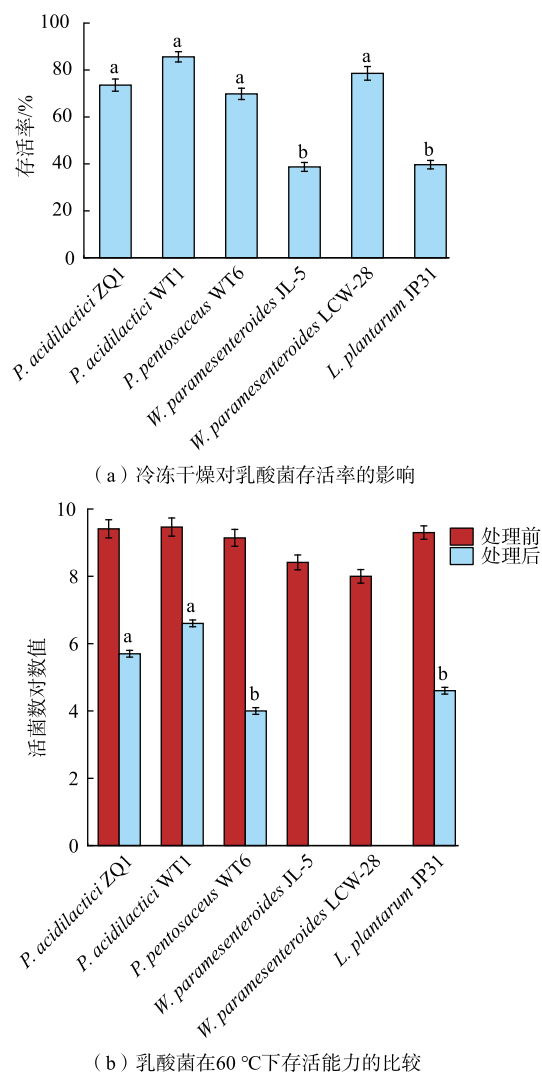
2.3 乳酸菌的抗逆特性

通过冷冻干燥或喷雾干燥制备菌粉可以长期保存益生菌的活性和性状,然而这两种工艺对菌株生理特性有影响,会造成活菌的损失。因此,选择对冻干和高温环境耐受性较好的益生菌菌株具有更好的应用价值。由图 7(a)可知,冷冻干燥对乳酸菌活性有一定的影响。其中 *P. acidilactici* WT1 耐受冻干条件的能力最好,存活率可达到 85%。除 *W. paramesenteroides* JL-5 外,酱油来源的耐盐乳酸菌耐受冻干的能力均显著高于 *L. plantarum* JP31,存活率都高于 70%。

大多数乳酸菌的最适生长温度为 30~37 ℃, *P. acidilactici* 可在较高温度(40~45 ℃)下生长,作者通过比较不同乳酸菌在 60 ℃处理 30 min 的活菌数来初步评估它们耐受高温的潜力。由图 7 (b)可知,高温处理后,乳酸菌活性受到显著影响,活菌数下降了 2 个数量级以上。其中, *W. paramesenteroides* 检测不到活菌,说明该种菌株对高温耐受能力极差。 *P. acidilactici* WT1 耐受高温能力最好,活菌数降低了 2.8 个数量级。 *P. pentosaceus* WT6 和 *L. plantarum* JP31 耐高温能力不如 *P. acidilactici*,活菌数分别下降了 5.1 和 4.7 个数量级。

2.4 乳酸菌协同酱油发酵

通过比较 5 株耐盐乳酸菌的益生特性和抗逆特性,选取各项能力较优的 *P. acidilactici* WT1 协同高盐稀态酱油发酵。由图 8 可知,从发酵初期到发酵结束(0~40 d),协同发酵的细菌总数和乳酸菌总数均高于对照组。其中协同发酵组的乳酸菌浓度始终在 1×10^8 CFU/g 以上,比对照组的乳酸菌浓度高 3~4 个数量级。由此说明,通过添加 *P. acidilactici* WT1 可以显著增加酱醪中细菌和乳酸菌的总量。



不同小写字母表示组间具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

图7 乳酸菌的抗逆能力比较
Fig. 7 Comparison of the stress resistance of lactic acid bacteria

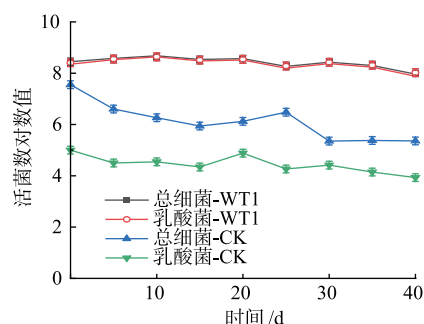
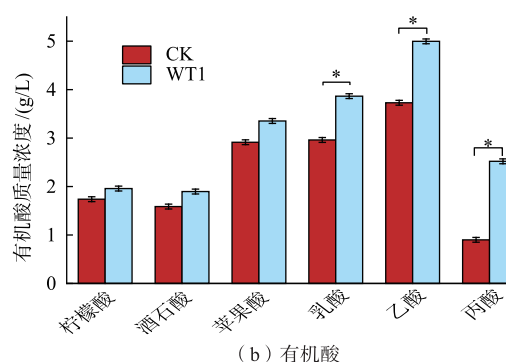
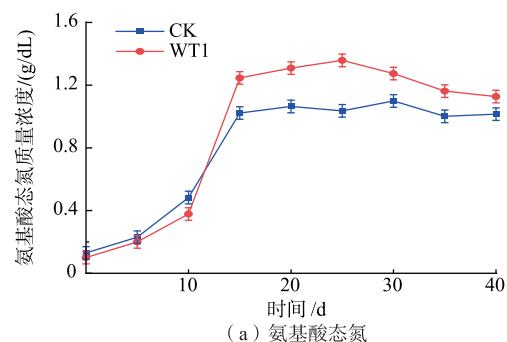


图8 酱油发酵过程细菌总数与乳酸菌数量变化
Fig. 8 Changes of total number of bacteria and lactic acid bacteria during soy sauce fermentation process

氨基酸态氮含量是评价酱油品质的重要指标之一。有机酸是酱油中的重要风味物质,并可与醇类在微生物酯酶的作用下生成酯类风味物质。由图9(a)可知,*P. acidilactici* WT1 协同发酵的酱醪氨基酸态氮质量浓度在发酵第15天开始高于对照组,在第25天时达到最高,为1.36 g/dL,比对照组高31.08%;到发酵终点时 *P. acidilactici* WT1 协同发酵的酱醪中氨基酸态氮质量浓度为1.13 g/dL,比对照组高11.03%。对酱油中主要有机酸质量浓度定量分析表明,*P. acidilactici* WT1 协同发酵增加了酱油中乳酸、乙酸、丙酸、柠檬酸、酒石酸和苹果酸6种有机酸的质量浓度。其中 *P. acidilactici* WT1 协同发酵酱油中乳酸、乙酸和丙酸的质量浓度分别比对照组增加30.74%、34.05%和180.00%,见图9(b)。上述结果表明,*P. acidilactici* WT1 初步显示了可用于协同高盐稀态酱油发酵和改善酱油风味与品质的特性。



* 表示组间具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

图9 酱油发酵过程主要的理化与风味物质质量浓度变化
Fig. 9 Changes in the mass concentration of significant physicochemical and flavor substances during soy sauce fermentation process

3 结语

食品来源的乳酸菌是益生菌的重要组成部分。

由于发酵食品加工工艺的特殊性,使得发酵食品体系中的乳酸菌可能具有优于其他乳酸菌的耐受胁迫能力。通过比较来源于酱油酱醪的足球菌属和魏斯氏菌属的5株耐盐乳酸菌与植物乳植杆菌的益生特性和抗逆特性,发现耐盐乳酸菌具备良好的益生特性,并且有优于乳杆菌的抗逆特性。在酱油发酵过程强化 *P. acidilactici* WT1 可以成功实现益生菌协同酱油发酵,这对于寻找可用于食品的新型功能微生物具有重要意义。

菌株对胃酸和胆盐的抵抗力、抗菌活性和细胞表面黏附性是重要的益生特性。本研究中菌株 *P. acidilactici* ZQ1 和 *P. acidilactici* WT1 具有最好的胆盐耐受能力,可耐受质量浓度 3 g/L 的胆盐;来源于肉类发酵剂的菌株 *P. acidilactici* P2 也具有耐受 3 g/L 胆盐的能力^[28]。这说明食品来源的耐盐乳酸菌对胆盐的耐受能力较好。虽然作者考察的乳酸菌的表面特性较低,但它们具有的黏附能力对维持宿主肠道的菌群平衡和健康具有重要的影响^[29]。益生

菌可以通过合成细菌素、有机酸、双乙酰、乙醛和乙偶姻等抑菌物质抑制肠道致病菌^[30]。作者所用耐盐乳酸菌可抑制常见的致病菌,并且 *P. acidilactici* 对 *S. mutans* 的抑制作用优于植物乳植杆菌。这些来源于酱醪的耐盐乳酸菌还具有良好的溶菌酶抗性、抗氧化能力和对冷冻干燥等不利环境的耐受性,有利于减少通过宿主消化道或因食品加工造成的活菌损失。此外,在高盐稀态酱油发酵初期强化 *P. acidilactici* WT1,至发酵结束活菌数能维持在 1×10^8 CFU/g 以上,可以成功实现协同酱油发酵,并使酱油氨基酸态氮和有机酸质量浓度分别提高 11.03% 和 34.42%,对改善发酵食品的品质和风味都有帮助。作者证实了耐盐乳酸菌具有良好的益生特性和抗逆特性,这说明它们具有成为益生菌的潜力及良好的应用前景,对于应用耐盐乳酸菌开发更多的功能产品具有重要意义,也可为新型益生菌的筛选提供参考。

参考文献:

- [1] OH E Y, LEE S M. Natural killer cell activation by *Weissella cibaria* JW15 isolated from kimchi[J]. **Journal of Bacteriology and Virology**, 2021, 51(2): 62-73.
- [2] PARK S, SARAVANAKUMAR K, SATHIYASEELAN A, et al. Cellular antioxidant properties of nontoxic exopolysaccharide extracted from Lactobacillales (*Weissella cibaria*) isolated from Korean kimchi[J]. **LWT-Food Science and Technology**, 2022, 154: 112727.
- [3] SAMEH A G, EL BAKY REHAB M A, ABO B F A, et al. *In vitro* evaluation of probiotic potential of five lactic acid bacteria and their antimicrobial activity against some enteric and food-borne pathogens[J]. **African Journal of Microbiology Research**, 2016, 10(12): 400-409.
- [4] YU H S, LEE N K, CHOI A J, et al. Antagonistic and antioxidant effect of probiotic *Weissella cibaria* JW15[J]. **Food Science and Biotechnology**, 2018, 28(3): 851-855.
- [5] PELYUNTHA W, CHAIYASUT C, KANTACHOTE D, et al. Organic acids and 2,4-Di-*tert*-butylphenol: major compounds of *Weissella confusa* WM36 cell-free supernatant against growth, survival and virulence of *Salmonella* Typhi[J]. **PeerJ**, 2020, 8: e8410.
- [6] ANAS A, SUKUMARAN V, NAMPULLIPURACKAL DEVARAJAN D, et al. Probiotics inspired from natural ecosystem to inhibit the growth of *Vibrio* spp. causing white gut syndrome in *Litopenaeus vannamei*[J]. **3 Biotech**, 2021, 11(2): 66.
- [7] LI S Y, ZHAO Y J, ZHANG L, et al. Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods[J]. **Food Chemistry**, 2012, 135(3): 1914-1919.
- [8] FENG T, WANG J. Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic: a systematic review[J]. **Gut Microbes**, 2020, 12(1): 1801944.
- [9] JEONG Y, KIM H, LEE J Y, et al. The antioxidant, anti-diabetic, and anti-adipogenesis potential and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from human and fermented foods[J]. **Fermentation**, 2021, 7(3): 123.
- [10] GALINSKI E. Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems[J]. **FEMS Microbiology Reviews**, 1994, 15(2/3): 95-108.
- [11] GUNDE-CIMERMAN N, OREN A, PLEMENITAS A. Adaptation to life at high salt concentrations in archaea, bacteria, and eukarya[M]. Dordrecht: Springer, 2005.
- [12] 贺晓洁, 赵良忠, 李明, 等. 耐盐乳酸菌的筛选及其诱变育种与耐受性研究[J]. **食品与发酵工业**, 2022, 48(1): 84-90.

- HE X J, ZHAO L Z, LI M, et al. Screening and breeding of salt-tolerant lactic acid bacteria [J]. **Food and Fermentation Industries**, 2022, 48(1): 84-90. (in Chinese)
- [13] ANKAIAH D, MITRA S, SRIVASTAVA D, et al. Probiotic characterization of bacterial strains from fermented South Indian tomato pickle and country chicken intestine having antioxidative and antiproliferative activities [J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2021, 131(2): 949-963.
- [14] 李巧玉. 魏斯氏菌在酱油发酵过程的含量变化及特性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2018.
- [15] 李巧玉, 陈坚, 曾伟主, 等. 酱醪中魏斯氏菌的分离及特性分析[J]. **微生物学通报**, 2018, 45(11): 2449-2462.
- LI Q Y, CHEN J, ZENG W Z, et al. Isolation and characterization of *Weissella* strains from soy sauce moromi mash [J]. **Microbiology China**, 2018, 45(11): 2449-2462. (in Chinese)
- [16] TEIXEIRA C G, FUSIEGER A, MILIÃO G L, et al. *Weissella*; an emerging bacterium with promising health benefits [J]. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 2021, 13(4): 915-925.
- [17] HU G Y, CHEN J, DU G C, et al. Moromi mash dysbiosis triggered by salt reduction is relevant to quality and aroma changes of soy sauce [J]. **Food Chemistry**, 2023, 406: 135064.
- [18] GELMAN A, DRABKIN V, GLATMAN L. Evaluation of lactic acid bacteria, isolated from lightly preserved fish products, as starter cultures for new fish-based food products [J]. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 2000, 1(3): 219-226.
- [19] 何杉杉, 王晓蕊, 彭禹熙, 等. 雪莲菌中乳酸菌的益生特性 [J]. **食品科学**, 2022, 43(2): 210-216.
- HE S S, WANG X R, PENG Y X, et al. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Tibetan kefir grain [J]. **Food Science**, 2022, 43(2): 210-216. (in Chinese)
- [20] 赵晴, 张甲耀, 陈兰洲, 等. 疏水性石油烃降解菌细胞表面疏水性及降解特性 [J]. **环境科学**, 2005, 26(5): 132-136.
- ZHAO Q, ZHANG J Y, CHEN L Z, et al. Cell-surface hydrophobicity and degradation characteristics of hydrophobic hydrocarbon degrading bacteria [J]. **Environmental Science**, 2005, 26(5): 132-136. (in Chinese)
- [21] 李文, 陈银元, 陈立明, 等. 两株魏斯氏菌的益生特性比较 [J]. **食品与发酵工业**, 2019, 45(15): 37-43.
- LI W, CHEN Y Y, CHEN L M, et al. Comparative analysis of probiotic properties of two *Weissella* strains [J]. **Food and Fermentation Industries**, 2019, 45(15): 37-43. (in Chinese)
- [22] ATTRI P, JODHA D, GANDHI D, et al. *In vitro* evaluation of *Pediococcus acidilactici* NCDC 252 for its probiotic attributes [J]. **International Journal of Dairy Technology**, 2015, 68(4): 533-542.
- [23] YU H S, JANG H J, LEE N K, et al. Evaluation of the probiotic characteristics and prophylactic potential of *Weissella cibaria* strains isolated from kimchi [J]. **LWT-Food Science and Technology**, 2019, 112: 108229.
- [24] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 129-130.
- [25] 陶琦, 刘希望, 秦哲, 等. 利福昔明在人工胃 / 肠液和大鼠肠道菌群及组织样品中的稳定性初步分析 [J]. **中国农业大学学报**, 2022, 27(5): 240-248.
- TAO Q, LIU X W, QIN Z, et al. Stability of rifaximin in artificial gastric/intestinal fluid and rat's intestinal flora and tissue samples [J]. **Journal of China Agricultural University**, 2022, 27(5): 240-248. (in Chinese)
- [26] 毕梦迪, 欧阳铭珊, 黎旭, 等. 渗透压胁迫对耐盐乳酸菌发酵特性的影响 [J]. **中国酿造**, 2020, 39(8): 30-36.
- BI M D, OUYANG M S, LI X, et al. Effect of osmotic stress on the fermentation performance of salt tolerant lactic acid bacteria [J]. **China Brewing**, 2020, 39(8): 30-36. (in Chinese)
- [27] 李文, 王陶, 董玉玮, 等. 高产 γ -氨基丁酸植物乳杆菌的益生特性 [J]. **食品科学**, 2019, 40(24): 173-178.
- LI W, WANG T, DONG Y W, et al. Probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* UL-4, able to produce γ -aminobutyric acid at high yield in chickpea milk [J]. **Food Science**, 2019, 40(24): 173-178. (in Chinese)
- [28] ERKKILÄ S, PETÄJÄ E. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use [J]. **Meat Science**, 2000, 55(3): 297-300.
- [29] 代永刚, 田志刚, 南喜平. 乳酸菌及其生理功能研究的进展 [J]. **农产品加工(学刊)**, 2009(7): 24-26, 29.
- DAI Y G, TIAN Z G, NAN X P. Progress of the *Lactobacillus* and its physiological function [J]. **Academic Periodical of Farm Products Processing**, 2009(7): 24-26, 29. (in Chinese)
- [30] AL-AHMAD A, ELAMIN F, GÄRTTNER R, et al. New bacterial combinations in secondary endodontic infections of patients with a recent systematic antibiotic therapy [J]. **Monographs in Oral Science**, 2021, 29: 144-154.

(责任编辑: 周 玥)