DOI:10.12441/spyswjs.20240618003 [文章编号] 1673-1689(2025)06-0078-11

嗜盐四联球菌的安全性、生长特性及发酵性能研究

吕冉晖[1] 钟燕华[1] 游 阳[2] 袁润涵[1] 关恩怡[1] 段 杉[1*]

(1. 华南农业大学食品学院,广东 广州 510642; 2. 北方伟业计量集团有限公司,北京 100009)

摘要:【目的】嗜盐四联球菌(*Tetragenococcus halophilus*,*T. halophilus*)菌株间生理学特性差异较大,作者通过比较不同来源嗜盐四联球菌的部分安全性、生长特性和发酵性能指标,旨在建立对该菌种的规律性认识。**【方法】**选取17株源自不同水产品和酱醪的嗜盐四联球菌,测定其抗生素抗性、生物胺产量、溶血活性、不同环境条件下的生长情况以及发酵大豆水解液后的风味特征,并通过相关性分析找出各指标的关联。**【结果】**在安全性方面,17株菌株普遍对青霉素、万古霉素和四环素敏感,而对复方新诺明、链霉素和克林霉素有抗性,且同一来源菌株的抗生素测试结果比较接近;所有菌株普遍产生酪胺和尸胺,少数菌株产生亚精胺和组胺,且产组胺的菌株均源自虾酱和腌渍鱼肉;所有菌株均未表现出溶血活性。在生长特性方面,所有菌株在25 g/dL NaCl、pH 5.0和15 ℃的条件下生长缓慢,但在胁迫条件缓解后,其生长速度逐渐恢复,大部分菌株的最适生长温度在30~37 ℃;低质量浓度葡萄糖能促进菌株生长,但随着葡萄糖质量浓度升高,部分菌株的生长速度反而下降;所有菌株均能在无氧环境下生长。采用因子分析对17株菌株的生长情况进行综合评估,发现酱醪来源的菌株得分较高,表明它们的环境适应能力较强。在发酵性能方面,所有菌株均能提高大豆水解液的风味和营养价值,发酵后的总酸(TA)、氨基酸态氮(AAN)和TCA可溶性肽质量浓度均上升。相关性分析揭示了嗜盐四联球菌的生长能力与其产酸能力呈正相关,而与AAN和生物胺产量呈负相关。**【结论】**嗜盐四联球菌的安全性、生长特性及发酵性能与其来源存在一定关联性,这些发现为嗜盐四联球菌的研究提供了理论依据。

关键词:嗜盐四联球菌;安全性;生长特性;发酵性能

Safety Properties, Growth Characteristics, and Fermentation Performance of *Tetragenococcus halophilus*

LYU Ranhui[1] *ZHONG Yanhua*[1] *YOU Yang*[2] *YUAN Runhan*[1] *GUAN Enyi*[1] *DUAN Shan*[1*]

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. North Weiye Group Co., Ltd., Beijing 100009, China)

Abstract: [**Objective**] The physiological characteristics vary greatly among different strains of *Tetragenococcus halophilus* (*T. halophilus*). By comparing some indicators of safety properties, growth characteristics, and fermentation performance of *T. halophilus* strains from different sources, the authors aim to establish a regular understanding of this bacterial species. [**Method**] Seventeen strains of *T. halophilus* derived from different aquatic products and soy sauce mash were selected, and their antibiotic resistance, biogenic amine production, hemolytic activity, growth under different environmental conditions, and flavor characteristics after fermenting soybean hydrolysate were determined. Additionally, correlation analysis was conducted to identify the associations among various indicators. [**Result**] In terms of safety properties, the 17 strains were generally

基金项目:阳江市省科技创新战略专项("大专项+任务清单")项目(SDZX2023028)

通信作者:段杉(1966—),男,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事食品生物技术等方面的研究。E-mail: duanshan@scau.edu.cn

收稿日期:2024-06-18 **修回日期:**2024-08-06

sensitive to penicillin, vancomycin, and tetracycline, but resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole, streptomycin, and clindamycin, with strains from the same source showing similar results in antibiotic tests. All the strains commonly produced tyramine and cadaverine, and a few strains produced spermidine and histamine. Histamine-producing strains all originated from shrimp paste and pickled fish. None of the strains exhibited hemolytic activity. In terms of growth characteristics, all the strains grew slowly under conditions of 25 g/dL NaCl, pH 5, and 15 ℃, while their growth rates gradually recovered after the stress conditions were alleviated, with most strains showing the optimal growth temperatures between 30 ℃ and 37 ℃. Glucose at low concentrations promoted the growth of strains, while as the glucose concentration increased, the growth rates of some strains decreased. All the strains could grow under anaerobic conditions. Factor analysis was performed to comprehensively assess the growth of the 17 strains, and the results showed that strains from sauce mash had higher scores, indicating their strong environmental adaptability. In terms of fermentation performance, all the strains improved the flavor and nutritional value of soybean hydrolysate, increasing the mass concentrations of total acids (TA), amino acid nitrogen (AAN), and TCA-soluble peptides after fermentation. Correlation analysis revealed that the growth ability of *T. halophilus* was positively correlated with its acid production but negatively correlated with AAN and biogenic amine production. [**Conclusion**] The safety properties, growth characteristics, and fermentation performance of *T. halophilus* have certain correlations with the strain sources. These findings provide a theoretical basis and reference for gradually establishing a regular understanding of *T. halophilus*.

Keywords: *Tetragenococcus halophilus*; safety property; growth characteristic; fermentation performance

嗜盐四联球菌是一种在高盐发酵食品中广泛存在的耐盐乳酸菌[1]。研究表明，接种嗜盐四联球菌进行发酵可提高食品中鲜味氨基酸和挥发性成分等关键风味物质的含量，进而改善食品的整体风味和品质[2-3]。但是，不同菌株在生理特性上的差异限制了其在食品工业中的广泛应用。

在安全性方面，部分嗜盐四联球菌能够合成组胺和酪胺，而部分菌株不仅不产生组胺，甚至能抑制其生成[4-6]；筛自宣威火腿和韩国豆酱的嗜盐四联球菌在对庆大霉素的耐药性测试中呈现出完全相反的结果，并且同一来源的不同菌株对部分抗生素的敏感程度也存在较大差异[7-8]。此外，韩国豆酱中筛出的大部分嗜盐四联球菌无溶血活性，但其中2株却具有弱溶血性[8]。在生长特性方面，嗜盐四联球菌的不同菌株也表现出较大差异。Link等[9]从羽扇豆中筛选出的6株嗜盐四联球菌的最适生长盐质量浓度各不相同。王博等[10]从酱油中分离得到12株嗜盐四联球菌，其中部分菌株能够耐受高盐及高糖环境，而部分菌株仅能耐受高盐环境，且在酸胁迫处理后的相对生长率也表现出明显差异。嗜盐四联球菌的这些安全性和生长特性差异不利于保障食品的食用安全性以及控制食品的发酵质量。在发酵性能方面，目前的研究多集中于嗜盐四联球菌与其他微生物共同发酵以增强食品风味，而单菌发酵的研究相对较少[11-13]。这表明目前对嗜盐四联球菌的认识尚不全面，需进一步扩大样品量并深入研究其生理特性，从而逐步建立起对该菌种的规律性认识。

作者对17株不同水产品和酱醪来源的嗜盐四联球菌进行了安全性、生长特性和发酵性能的研究，并通过相关性分析找出各指标之间的关联，旨在为嗜盐四联球菌的进一步开发与应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株与材料

作者所在实验室前期分离并用甘油管保存的嗜盐四联球菌，其中菌株JLB、JLD和JLE分离自酱醪，菌株XJA1、XJA6、XJA8、XJA11和XJA12分离自A工厂虾酱，菌株XJB4和XJB21分离自B工厂虾酱，菌株SYX19分离自C工厂虾酱，菌株XJE10分离自腌渍鱼肉。大豆原料为产自黑龙江的非转基因大豆。

1.2 主要试剂与培养基

抗生素试敏纸片：常德比克曼生物科技有限公司；生物胺混合标准溶液：色谱纯，中国伟业计量标准物质中心；丹黄酰氯：分析纯，上海麦克林生化科技有限公司；乙腈：色谱纯，德国Meker公

司；风味蛋白酶、木瓜蛋白酶：优级纯，上海源叶生物科技有限公司；哥伦比亚血平板：广东环凯微生物科技有限公司。

高盐MRS培养基（g/L）：蛋白胨10，牛肉浸膏10，酵母提取粉5，葡萄糖20，乙酸钠5，氯化钠100，柠檬酸氢二铵2，吐温-80 1，磷酸氢二钾2，七水硫酸镁0.2，七水硫酸锰0.05。

高盐MRS琼脂平板（g/L）：在上述高盐MRS培养基的基础上添加15 g琼脂。

生物胺前体培养基（g/L）：在上述高盐MRS培养基的基础上分别添加2.5 g色氨酸、精氨酸、赖氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、组氨酸。

1.3 仪器与设备

酶标仪：FLX800T型，美国BioTek公司；高效液相色谱仪：Agilent1 260II型，美国Agilent Technologies公司；超净工作台：SW-CJ-1FDA型，苏州安泰空气技术有限公司；电热鼓风干燥箱：101-1型，上海沪南科学仪器有限公司；凯氏定氮仪：KDN-04C型，上海纤检仪器有限公司；pH计：PB-10型，赛多利斯科学仪器（北京）有限公司。

1.4 试验方法

1.4.1 菌株活化

将存于−20 ℃的嗜盐四联球菌接种至高盐MRS培养基中，在30 ℃下培养48 h，取1 mL菌液加入新的高盐MRS培养基中，在30 ℃培养48 h。重复2次后，得到嗜盐四联球菌菌悬液。

1.4.2 抗生素抗性测试

采用K-B纸片扩散法，吸取100 μL嗜盐四联球菌菌悬液涂布在高盐MRS琼脂平板上，待完全吸收后，将药敏纸片贴在表面，于30 ℃培养72 h，结束后测量抑菌圈直径。由于目前尚未就抗生素对四联球菌属的抑菌圈直径值进行明确定义，根据系统发育树的位置，肠球菌属与四联球菌属最为接近，因此选择以肠球菌属为标准。结果判定标准遵循美国临床实验室标准化委员会（Clinical and Laboratory Standards Institute，CLSI）的方法手册[14]。

1.4.3 生物胺产量测定

1）标准曲线的建立：将100 μg/mL的生物胺标准液用色谱级乙腈进行梯度稀释，配制成质量浓度分别为3.125、6.250、12.500、25.000、50.000 μg/mL生物胺标准系列溶液，现用现配。

2）衍生化及色谱条件：参考GB 5009.208—2016《食品安全国家标准 食品中生物胺的测定》进行衍生化。采用DIKMA Spursil C18色谱柱（250 mm×4.6 mm×5 μm），柱温35 ℃，流量0.8 mL/min，进样体积20 μL，流动相A为一级水，流动相B为乙腈，采用二元高压梯度洗脱。梯度洗脱程序：0~22 min，体积分数60%流动相B；22~28 min，体积分数75%流动相B；28~42 min，体积分数100%流动相B；42~50 min，体积分数60%流动相B。

3）样品制备：接种体积分数1%的嗜盐四联球菌菌悬液至生物胺前体培养基中，混匀后置于30 ℃恒温培养箱中培养72 h。结束后将培养液于12 000 r/min离心2 min，进行上清液的衍生化及测定。

1.4.4 溶血活性测试

取适量嗜盐四联球菌菌悬液于12 000 r/min离心2 min，去上清液，将底部菌体划线于哥伦比亚血平板上，30 ℃培养48 h，观察菌落周围是否有溶血圈[15]，以金黄色葡萄球菌为阳性对照。

1.4.5 生长特性的研究

1）NaCl质量浓度：接种体积分数1%的嗜盐四联球菌菌悬液至高盐MRS培养基中，培养基的NaCl质量浓度分别为100、150、200、250 g/L。在30 ℃培养72 h后，使用酶标仪测定600 nm处的吸光度值，并将初始接种的培养基调零作为对照。

2）pH：接种体积分数1%的菌悬液至初始pH分别为5.0、6.0、6.8的高盐MRS培养基中，在30 ℃培养72 h。测定方法与NaCl质量浓度试验相同。

3）温度：接种体积分数1%的菌悬液至高盐MRS培养基中，培养温度分别为15、25、30、37 ℃，培养时间均为72 h。测定方法与NaCl质量浓度试验相同。

4）葡萄糖质量浓度：接种体积分数1%的菌悬液至葡萄糖质量浓度分别为0、10、20、30、40 g/L的高盐MRS培养基中，在30 ℃培养72 h。测定方法与NaCl质量浓度试验相同。

5）氧气：接种体积分数1%的菌悬液分别至装有高盐MRS培养基的透气（无菌纱布封口）和密闭容器，在30 ℃培养72 h。测定方法与NaCl质量浓度试验相同。

1.4.6 因子分析

对不同条件下的生长情况进行因子分析统计[16]，具体步骤如下：1）所有结果取平均值；2）对

数据进行标准化处理；3）计算相关系数矩阵；4）计算相关系数矩阵的特征值和贡献率等；5）对因子载荷矩阵进行旋转处理；6）计算因子得分。

1.4.7　发酵性能的研究

1）大豆水解液的发酵：选择适量大豆→清洗→加水粉碎（料液比1∶3）→调节pH 7→酶解7 h（分别加入质量分数1%的木瓜蛋白酶（800 U/mg）和风味蛋白酶（120 U/mg））→煮沸灭活→灭菌（121 ℃、30 min）→接种体积分数1%的菌悬液→无菌纱布封口→发酵（30 ℃有氧发酵12 d）→样品（不接种为不发酵组）。

2）指标的测定：活菌数的测定参考GB 4789.2—2022《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》；pH采用pH计进行测定；TA和AAN参考GB 5009.235—2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸态氮的测定》中的酸度计法进行测定；TCA可溶性肽参考Zhu等[17]的方法进行测定。

1.4.8　数据统计及图表绘制

利用Microsoft Excel 2016对数据进行处理分析，采用GraphPad Prism 8.0进行绘图，使用SPSS Statistics 23.0数据分析软件对数据进行因子分析。

2　结果与讨论

2.1　安全性研究

2.1.1　各菌株的抗生素抗性测试结果

如表1所示，大部分菌株对青霉素、四环素和万古霉素表现为敏感，与来自韩国大酱以及宣威火腿中的嗜盐四联球菌的测试结果一致[7-8]。而链霉素、复方新诺明和克林霉素对大部分菌株无抑制作用，普遍表现为耐药，少数表现为中介。此外，头孢噻肟、环丙沙星、氯霉素以及红霉素对菌株的抑制效果差异较大，各菌株对这3种抗生素的敏感程度并不一致，来自酱醪的菌株对头孢噻肟和氯霉素均表现为敏感，而来自3号虾酱的菌株普遍对这2种抗生素具有抗性。统计测试结果，发现菌株JLD、JLE和XJA8都对半数以上的抗生素敏感，表现出较好的安全性。相反，菌株XJA6、XJB4、XJC20和XJE10等对多数抗生素耐药，表明它们在耐药性上存在较大风险。如图1所示，通过聚类分析发现，筛自酱醪的菌株聚为一类，而筛自同一虾酱样品的菌株也比较接近，这说明嗜盐四联球菌的抗生素抗性可能与其来源密切相关。

表1　各菌株的抗生素耐药结果

Table 1　Antibiotic resistance of each strain

菌株	抗生素种类										数量/个		
	青霉素	头孢噻肟	复方新诺明	环丙沙星	氯霉素	克林霉素	万古霉素	四环素	红霉素	链霉素	敏感	中介	耐药
JLB	S	S	R	S	S	I	S	I	R	R	5	2	3
JLD	S	S	R	S	S	I	S	S	S	R	7	1	2
JLE	S	S	R	S	S	R	S	S	I	R	6	1	3
XJA1	S	S	R	S	R	R	S	S	R	R	5	0	5
XJA6	S	R	R	R	R	R	S	S	I	R	3	1	6
XJA8	S	S	R	S	S	R	S	S	S	R	6	1	3
XJA11	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R	5	0	5
XJA12	S	I	R	S	S	R	S	I	S	R	5	2	3
XJB4	S	S	R	S	R	R	S	S	R	R	5	0	5
XJB21	I	S	I	I	R	R	S	S	I	R	3	4	3
XJC3	S	R	R	S	R	R	S	S	S	R	5	0	5
XJC5	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	4	0	6
XJC17	S	I	R	R	R	R	S	S	R	R	4	0	6
XJC20	S	R	R	I	R	R	S	S	I	R	3	2	5
XJC22	S	R	R	R	R	S	S	S	I	R	4	1	5
XJE10	S	R	R	I	R	R	S	S	R	I	3	2	5
SYX19	S	S	R	I	R	R	S	S	I	R	4	2	4

注："S"表示敏感，"I"表示中介，"R"表示耐药

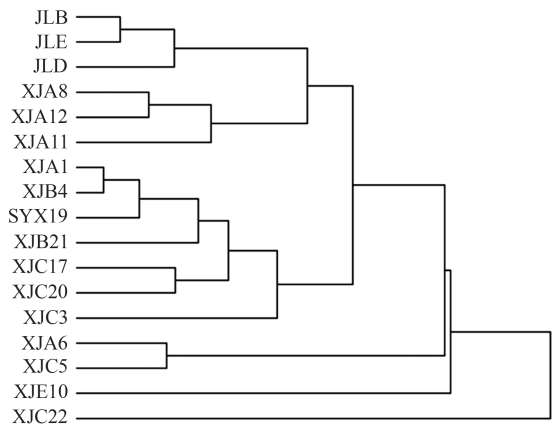


图 1　各菌株的抗生素抗性聚类图

Fig. 1　Clustering of antibiotic resistance of strains

2.1.2　各菌株的生物胺产量

生物胺在某些高盐发酵食品中广泛存在，而目前关于其浓度和食用安全性研究尚不充分[18]。这是因为不同食品的摄入量和人群对生物胺的耐受度因文化习惯而异，导致难以制定统一的生物胺限量标准[19]。仅有少数国家和地区针对特定食品设定了生物胺的限量规定，例如，欧盟规定食品中组胺的质量分数上限为 200 mg/kg，而酪胺的限量标准在 100~800 mg/kg[20]，上海市地方标准暂定发酵肉制品中组胺的质量分数≤200 mg/kg。

如表 2 所示，17 株嗜盐四联球菌普遍产生酪胺和尸胺，但均不产生精胺。部分菌株产生亚精胺和组胺，而仅从腌渍鱼肉中筛出的菌株产生色胺。XJA11、XJA12 和 SYX19 的尸胺产量较高，均超过 5 μg/mL，而其余菌株的尸胺产量普遍在 2~4 μg/mL 之间。除菌株 XJA8、XJC20 和 XJE10 外，其余菌株均产生酪胺，但质量浓度较低，为 1~4 μg/mL。此外，仅有 5 株菌株产生组胺，且均来自虾酱和腌渍鱼肉，推测海鲜原料中的菌株可能更倾向于产生组胺。其中菌株 XJA11、XJA12 和 XJE10 的组胺产量较高，分别为 23.16、20.84、16.69 μg/mL。尽管所有菌株都产生生物胺，但总产量介于 2.17~37.53 μg/mL，远低于限量标准。

表 2　各菌株的生物胺产量

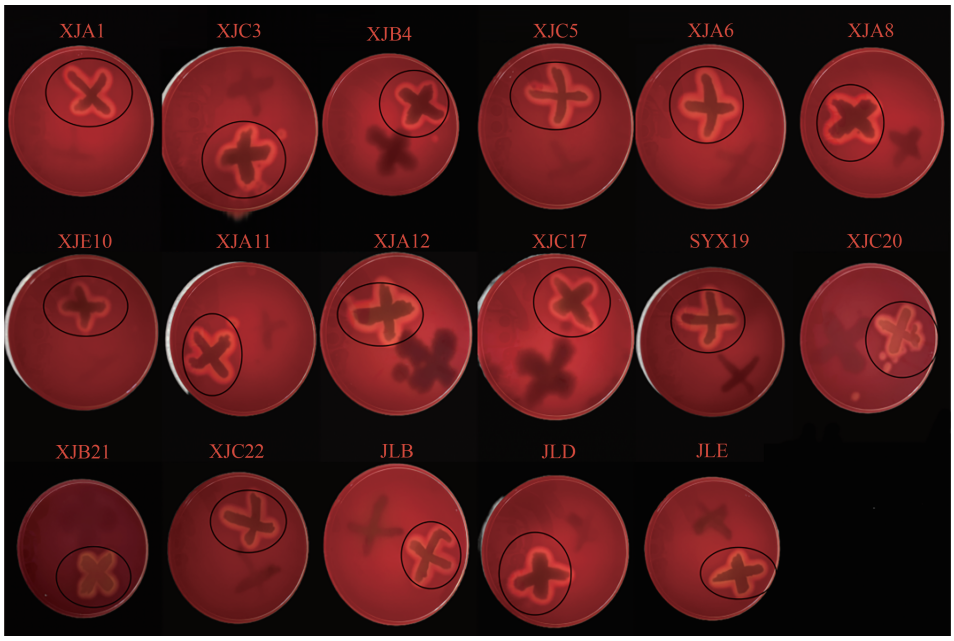
Table 2　Biogenic amine production by each strain　　单位：μg/mL

菌株	尸胺质量浓度	酪胺质量浓度	亚精胺质量浓度	色胺质量浓度	组胺质量浓度	总量
JLB	5.47±0.12	2.28±0.13	—	—	—	7.75±0.25
JLD	1.54±0.48	2.84±0.22	—	—	—	4.38±0.70
JLE	3.11±0.09	2.13±0.01	2.79±0.18	—	—	8.03±0.28
XJA1	3.10±0.12	2.10±0.02	—	—	—	5.20±0.14
XJA6	2.15±0.18	2.17±0.11	3.24±0.27	—	—	7.56±0.56
XJA8	1.76±0.01	—	—	—	4.46±0.26	6.22±0.27
XJA11	7.94±0.13	2.69±0.23	—	—	23.16±0.45	33.79±0.81
XJA12	10.88±0.53	3.15±0.14	2.66±0.12	—	20.84±0.36	37.53±1.15
XJB4	2.69±0.06	2.03±0.08	2.60±0.01	—	—	7.32±0.15
XJB21	2.37±0.19	2.95±0.12	—	—	—	5.32±0.31
XJC3	2.56±0.17	2.10±0.03	—	—	—	3.66±0.20
XJC5	1.81±0.02	2.02±0.02	1.41±0.26	—	9.00±0.82	14.24±1.12
XJC17	3.16±1.08	2.64±0.01	—	—	—	5.80±1.09
XJC20	2.17±0.07	—	—	—	—	2.17±0.07
XJC22	1.26±0.09	2.42±0.31	0.97±0.08	—	—	4.65±0.48
XJE10	7.85±0.18	—	—	1.09±0.09	16.69±0.81	25.63±1.08
SYX19	7.73±0.27	3.30±0.14	—	—	—	11.03±0.41

注：“—”表示未检出，所有样品中均未检出精胺。

2.1.3　各菌株的溶血试验结果

具有溶血活性的菌株会产生溶血素，而溶血素不仅会破坏红细胞，还会损伤多种细胞并诱发其凋亡和裂解[21]。17 株菌株的溶血活性见图 2。在光照条件下，金黄色葡萄球菌阴影周围有明显的透明溶血圈，而测试的嗜盐四联球菌阴影附近并



黑色圆圈框为金黄色葡萄球菌阳性对照

图2　溶血活性的阴阳对照

Fig. 2　Negative and positive controls in the hemolytic test

未观察到类似的透明圈，这表明所有测试菌株均无溶血活性。

2.2　各菌株的生长特性

大部分豆酱、酱油、鱼露等高盐食品的盐质量浓度在100~260 g/L，且发酵过程中的pH下降到5.5左右[10, 22-25]。嗜盐四联球菌作为这些食品中的常见微生物，考察其在胁迫条件下的生长情况至关重要。

如图3(a)所示，17株嗜盐四联球菌都可在100~250 g/L NaCl质量浓度下生长。在NaCl质量浓度为100~200 g/L时，3株酱醪来源菌株的生长速度明显高于其余菌株，当NaCl质量浓度达到250 g/L时，其生长速度优势不明显。而菌株XJC3、XJE10和XJA11在该NaCl质量浓度下的生长速度较快，耐盐性较好，这可能与其来源有关，因为水产品的盐质量浓度高于酱油。相比之下，菌株SYX19在各NaCl质量浓度下的生长速度最慢，耐盐性最差。

如图3(b)所示，所有菌株在pH 5.0时生长受到严重抑制。随着pH接近中性，菌株的生长速度逐渐恢复，其中菌株JLB、JLD、JLE和XJC22在酸性环境下的生长速度较快，表现出较好的耐酸性。

如图3(c)所示，在15 ℃时大多数菌株的生长速度十分缓慢，而菌株JLD、JLE在该温度下的生长速度高于其余菌株。随着温度升高，大部分菌株在30 ℃时达到最大生长速度，但在37 ℃时生长速度有所下降，表明其最适生长温度为30~37 ℃。而菌株XJB21和XJC22在37 ℃时的OD_{600}值更高，这可能意味着它们在高温下具有更快的生长速度，需进一步验证。

如图3(d)所示，在不含葡萄糖的条件下，所有菌株都能生长，说明葡萄糖不是嗜盐四联球菌的必需生长因子。大多数菌株在10 g/L和20 g/L葡萄糖质量浓度下达到最大生长速度，说明低质量浓度葡萄糖可促进嗜盐四联球菌的生长，但随着质量浓度继续升高，促进作用并不明显。

如图3(e)所示，所有菌株在有氧和无氧环境下均能生长，部分菌株在有氧条件下生长更快，而部分菌株则相反。

2.3　生长特性因子分析

上述结果表明各菌株在不同环境条件下的生长情况存在差异。为综合评价它们的生长特性，在因子分析的基础上，利用因子得分的形式对17株嗜盐四联球菌进行评分。

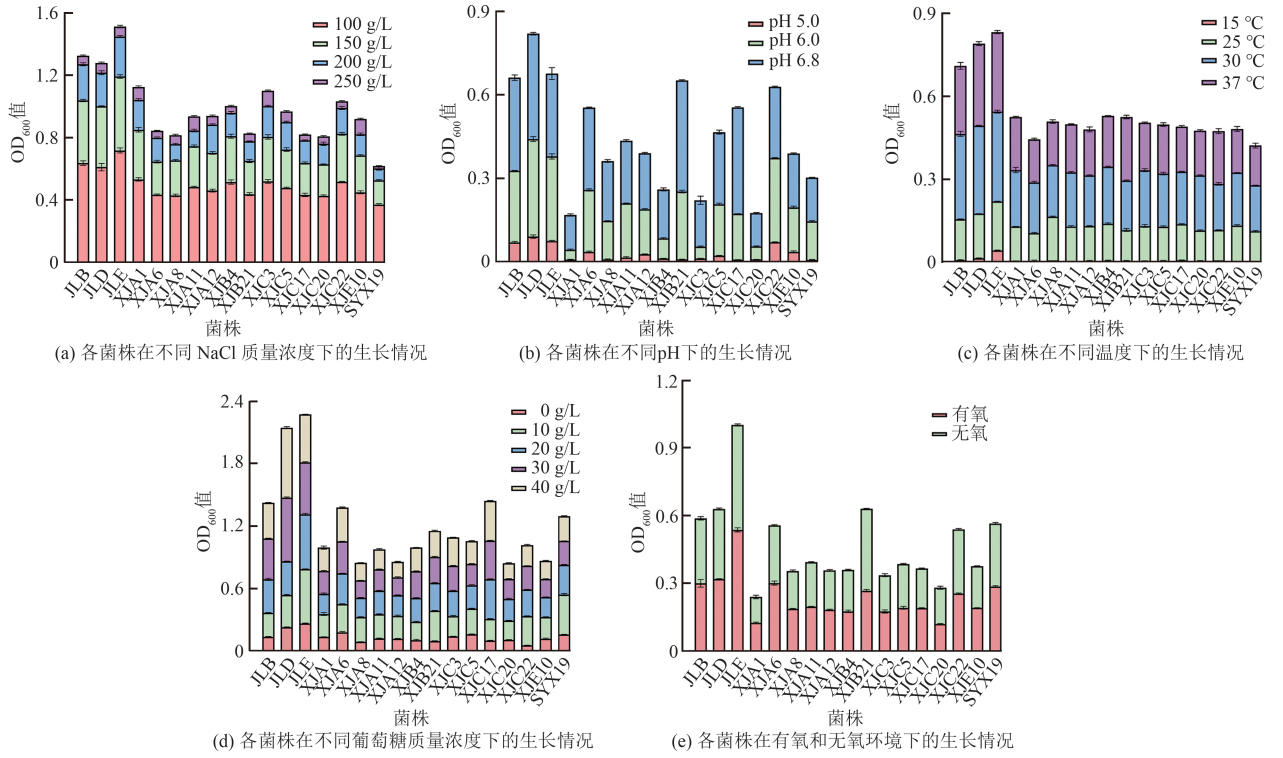
2.3.1　Kaiser-Meyer-Olkin(KMO)和Bartlett球形检验

检验数据是否适合做因子分析，首先要进行KMO和Bartlett检验。若KMO值分布在0.5~1.0，

Bartlett显著性小于0.05，说明变量间的相关性较大且数据总体符合正态分布，则可对数据进行分析。在本次统计中，KMO值为0.762，Bartlett显著性为0.000，因此数据满足因子分析的要求。

2.3.2 各菌株生长特性的数据因子分析

由表3可知，第一个公因子的累计贡献率达到74.114%，特征值为3.706，大于1，综合了菌株生长特性的大部分信息，因此提取一个公因子即可。



(a) 各菌株在不同 NaCl 质量浓度下的生长情况　(b) 各菌株在不同pH下的生长情况　(c) 各菌株在不同温度下的生长情况

(d) 各菌株在不同葡萄糖质量浓度下的生长情况　(e) 各菌株在有氧和无氧环境下的生长情况

图 3　各菌株的生长特性

Fig. 3　Growth characteristics of each strain

表 3　不同菌株生长特点的特征值和方差贡献率

Table 3　Eigenvalues and variance contribution rates for growth characteristics of different strains

成分	初始特征值			提取载荷平方和		
	合计	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%	合计	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	3.706	74.114	74.114	3.706	74.114	74.114
2	0.758	15.153	89.267			
3	0.297	0.583	95.093			
4	0.182	3.650	98.743			
5	0.063	1.257	100.000			

2.3.3 各菌株生长特性的综合评价

根据表4各因子的权重，构建因子得分模型为：F=0.212X_1+0.216X_2+0.250X_3+0.249X_4+0.232X_5。其中：F为因子综合得分；X_1~X_5分别为菌株在温度、葡萄糖质量浓度、氧气、pH和NaCl质量浓度等5种培养环境下的总OD_{600}值。

表5为各菌株的因子得分，其中酱醪来源的菌株JLB、JLD和JLE位于前列，且得分大于1，远高于其他菌株，说明它们在不同环境条件下的生长能力均较强，能够适应多种环境条件。

2.4 各菌株的发酵性能

2.4.1 各菌株发酵大豆水解液后的活菌数

图4为接种嗜盐四联球菌至大豆水解液中发酵12 d后的活菌数。结果显示，未发酵组未检测

表4　因子得分系数矩阵

Table 4　Factor score coefficient matrix

指标	因子权重
温度	0.212
葡萄糖质量浓度	0.216
氧气	0.250
pH	0.249
盐质量浓度	0.232

表5　因子综合得分

Table 5　Comprehensive scores of principal factors

排序	菌株	*F*
1	JLE	1.435
2	JLD	1.298
3	JLB	1.077
4	XJB21	0.872
5	XJA6	0.870
6	XJC22	0.850
7	XJC17	0.835
8	XJC5	0.773
9	XJA11	0.746
10	XJC3	0.736
11	SYX19	0.730
12	XJB4	0.712
13	XJA1	0.693
14	XJE10	0.692
15	XJA12	0.689
16	XJA8	0.658
17	XJC20	0.584

到活菌数，而接种组的样品均检测到不同程度的活菌数，说明17株嗜盐四联球菌均可在大豆水解液中存活并生长，并且活菌数与Jeong等[26]人利用嗜盐四联球菌发酵大豆的结果相近。

2.4.2　各菌株发酵大豆水解液后的pH和TA质量浓度

如图5所示，发酵后大豆水解液的pH普遍下降，说明嗜盐四联球菌具有优良的产酸能力。尤其是筛自酱醪的JLB、JLD和JLE菌株，发酵后样品的pH下降幅度最大。TA是评价豆制品发酵风味和口感的关键指标，其质量浓度越高，表明食品的味道更加丰富[27]。与pH相对应，未发酵组的TA质量浓度仅为3.7 g/L，接种嗜盐四联球菌发酵后均高于6.0 g/L，而菌株JLB、JLD和JLE发酵后，大豆水解液的TA质量浓度高达8.0 g/L。

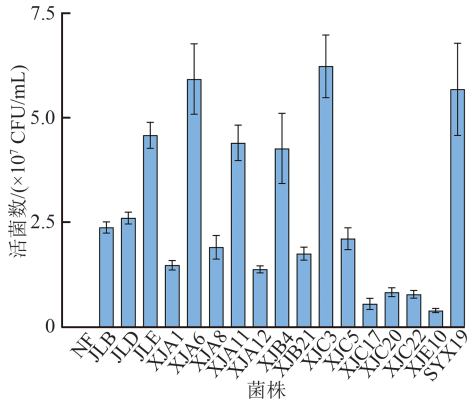


图4　各菌株发酵后的活菌数

Fig. 4　Number of viable bacteria after fermentation of each strain

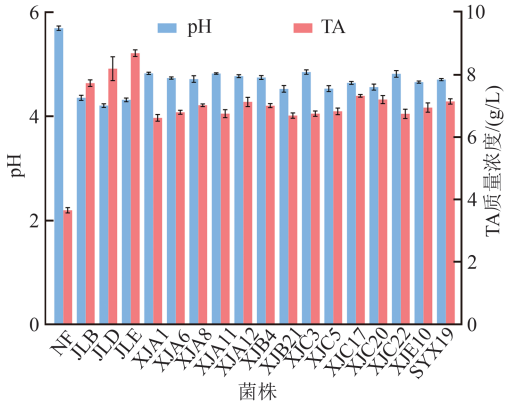


图5　各菌株发酵后的pH和TA质量浓度

Fig. 5　pH and TA mass concentration of each strain after fermentation

2.4.3　各菌株发酵大豆水解液后AAN和TCA可溶性肽的质量浓度

AAN和TCA可溶性肽是评估食品中氮元素以氨基酸和小分子肽形式存在的关键指标，它们不仅用于判断蛋白质的水解程度和发酵进程，而且与食品的风味特征密切相关[28-29]。如图7所示，所有菌株发酵后，大豆水解液中的AAN和TCA可溶性肽的质量浓度显著增加，尤其是菌株SYX19，发酵后样品的AAN和TCA可溶性肽的质量浓度均较高，说明其蛋白质水解能力较强。整体而言，17株嗜盐四联球菌发酵后都不同程度改善了大豆水解液的风味和营养价值。

2.5　相关性分析

如图7所示，对测试的部分指标进行了相关性分析。结果显示，各生长特性指标之间存在极强的

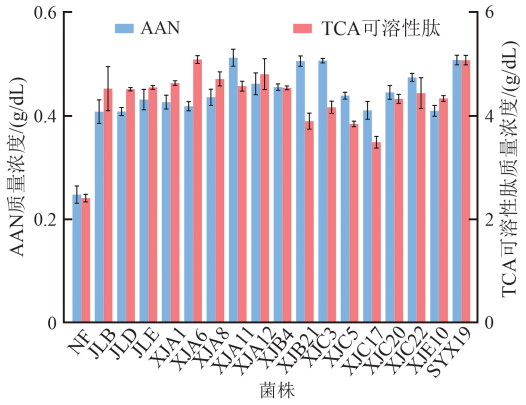
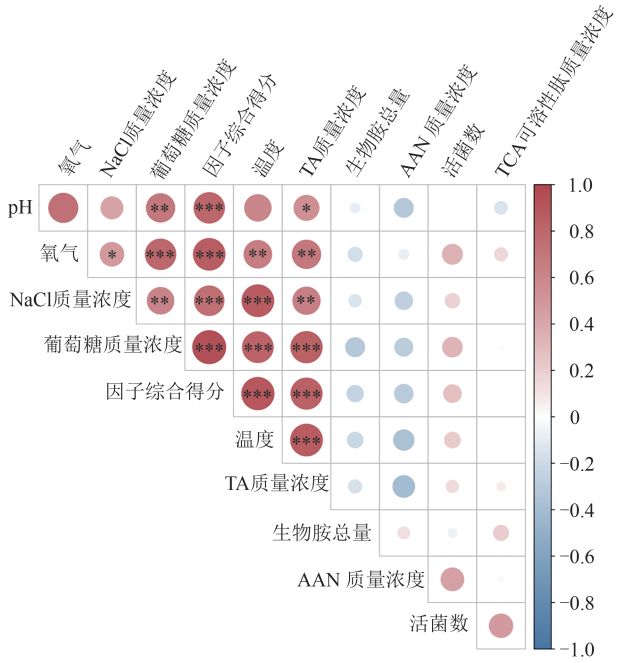


图 6　各菌株发酵后的 AAN 和 TCA 可溶性肽的质量浓度

Fig. 6　Mass concentrations of AAN and TCA-soluble peptides of each strain after fermentation



*—P<0.05；**—P<0.01；***—P<0.001。

图 7　相关性分析

Fig. 7　Correlation analysis

相关性，并且这些指标与因子综合得分呈极显著的正相关（P<0.001）。此外，各生长特性指标还与发酵大豆水解液后的活菌数呈正相关，进一步证实了适应力强的菌株在各种环境条件下均具有较快的生长速度。而发酵后的 TA 也与生长特性指标显著正相关（P<0.05），说明生长能力越强的菌株产酸能力也越强，尤其是菌株的耐酸能力与其产酸能力之间存在密切联系。然而，生物胺总量和 AAN 与多个生长特性指标呈负相关。推测生长能力强的菌株在代谢过程中消耗了更多的氨基酸以促进细胞繁殖，导致作为生物胺前体物质的氨基酸质量浓度下降，进而减少了生物胺的转化量。

3　结论

乳酸菌是益生菌群体中的关键成员，而嗜盐四联球菌作为乳酸菌的一种，因其在特殊发酵体系中的存活能力，展现出比其他乳酸菌更强的耐胁迫特性[30]。现有研究表明，该菌种在生理特性上存在较大差异。深入研究嗜盐四联球菌，逐步形成对其特性的系统性理解，对于发掘可用于食品工业的新型功能性微生物资源具有重要的科学意义和应用价值。

作者收集了 17 株不同来源的嗜盐四联球菌，测定并比较它们的生理特性。在安全性方面，各菌株普遍对青霉素、万古霉素和四环素敏感，对复方新诺明、链霉素和克林霉素耐药，并且菌株的耐药性可能与其来源相关。各菌株普遍产生酪胺和尸胺，少数产生亚精胺和组胺，且产组胺菌株均源自虾酱和腌渍鱼肉。此外，所有菌株均未表现出溶血活性。在生长特性方面，各菌株在 NaCl 质量浓度为 25 g/dL、pH 5.0 和 15 ℃条件下的生长被严重抑制，胁迫条件缓解后，生长速度逐渐恢复，且大部分菌株的最适生长温度在 30~37 ℃。葡萄糖在低质量浓度时能促进各菌株生长，但随着质量浓度升高，不同菌株对葡萄糖的敏感程度不一，部分菌株的生长速度反而下降。所有菌株在有氧和无氧环境下均能生长。采用因子分析对生长情况进行综合评估，发现酱醪来源的菌株得分较高，表明它们的环境适应能力较强。在发酵性能方面，各菌株均能提高大豆水解液的风味和营养价值，发酵后大豆水解液的 TA、AAN 和 TCA 可溶性肽的质量浓度均大幅上升。通过相关性分析发现，17 株嗜盐四联球菌的生长能力与其产酸能力呈正相关，与 AAN 和生物胺总量呈负相关。这些发现为逐步建立起对嗜盐四联球菌的规律性认识提供了理论依据。

参考文献

[1] 姜锦惠，赵悦，李盈烁，等. 自然发酵豆酱中嗜盐四联球菌的分离筛选及生长特性研究[J]. 中国酿造，2021，40(10)：36-42.

JIANG J H，ZHAO Y，LI Y S，et al. Isolation，screening and growth characteristics of *Tetragenococcus halophilus* from naturally fermented soybean paste [J]. China Brewing，2021，40(10)：36-42.(in Chinese)

[2] UDOMSIL N，RODTONG S，CHOI Y J，et al. Use of *Tetragenococcus halophilus* as a starter culture for flavor improvement in fish sauce fermentation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2011，59(15)：8401-8408.

[3] WANG Q F，CUI R R，LIU X L，et al. Examining the impact of *Tetragenococcus halophilus*，*Zygosaccharomyces rouxii*，and *Starmerella etchellsii* on the quality of soy sauce：a comprehensive review of microbial population dynamics in fermentation [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition，2024，64(29)：10873-10884.

[4] UDOMSIL N，RODTONG S，TANASUPAWAT S，et al. Proteinase-producing halophilic lactic acid bacteria isolated from fish sauce fermentation and their ability to produce volatile compounds [J]. International Journal of Food Microbiology，2010，141(3)：186-194.

[5] KUDA T，IZAWA Y，ISHII S，et al. Suppressive effect of *Tetragenococcus halophilus*，isolated from fish-*nukazuke*，on histamine accumulation in salted and fermented fish[J]. Food Chemistry，2012，130(3)：569-574.

[6] MA J J，NIE Y，ZHANG L J，et al. Ratio of histamine-producing/non-histamine-producing subgroups of *Tetragenococcus halophilus* determines the histamine accumulation during spontaneous fermentation of soy sauce [J]. Applied and Environmental Microbiology，2023，89(3)：e01884.

[7] LI Y J，SHAN L Y，ZHANG C，et al. Isolation and antibiotic resistant research of *Tetragenococcus halophilus* from Xuanwei ham，a China high-salt-fermented meat products[J]. Antibiotics，2019，8(3)：151.

[8] JEONG D W，HEO S，LEE J H. Safety assessment of *Tetragenococcus halophilus* isolates from doenjang，a Korean high-salt-fermented soybean paste [J]. Food Microbiology，2017，62：92-98.

[9] LINK T，VOGEL R F，EHRMANN M A. The diversity among the species *Tetragenococcus halophilus* including new isolates from a lupine seed fermentation [J]. BMC Microbiology，2021，21(1)：320.

[10] 王博，陈坚，堵国成，等. 酱醪嗜盐四联球菌的分类及特性研究[J]. 微生物学报，2018，58(10)：1826-1838.
WANG B，CHEN J，DU G C，et al. Classification and characteristics of *Tetragenococcus halophilus* derived from moromi[J]. Acta Microbiologica Sinica，2018，58(10)：1826-1838.(in Chinese)

[11] LI X Z，XU X Y，WU C Z，et al. Effect of sequential inoculation of *Tetragenococcus halophilus* and *Wickerhamomyces anomalus* on the flavour formation of early-stage moromi fermented at a lower temperature[J]. Foods，2023，12(18)：3509.

[12] CAO C C，SUN H X，SONG X Y，et al. Effect of fermentation with *Tetragenococcus halophilus* and *Zygosaccharomyces rouxii* on selected non-volatile taste compounds in soybean protein hydrolysates [J]. LWT-Food Science and Technology，2023，184：115053.

[13] ZHANG L J，ZHANG L，XU Y. Effects of *Tetragenococcus halophilus* and *Candida versatilis* on the production of aroma-active and umami-taste compounds during soy sauce fermentation[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture，，2020，100(6)：2782-2790.

[14] HUMPHRIES R，BOBENCHIK A M，HINDLER J A，et al. Overview of changes to the clinical and laboratory standards institute performance standards for antimicrobial susceptibility testing，M100，31st edition [J]. Journal of Clinical Microbiology，，2021，59(12)：e00213.

[15] 胡金丽，高庆超，扎西巴藏，等. 黑果枸杞酵素中乳酸菌和酵母菌的分离鉴定和安全性评价[J]. 食品安全质量检测学报，2021，12(20)：8207-8213.
HU J L，GAO Q C，ZHAXIBA Z，et al. Identification and safety evaluation of lactic acid bacteria and yeast in *Lycium ruthenicum* Murr. jiaosu [J]. Journal of Food Safety & Quality，2021，12(20)：8207-8213.(in Chinese)

[16] 王鸿翔，陈秋米，张海涛，等. 基于主成分分析的宁夏水资源承载力研究[J]. 中国农村水利水电，2018(11)：30-34.
WANG H X，CHEN Q M，ZHANG H T，et al. Research on the water source bearing capacity in Ninxia based on principle component analyses[J]. China Rural Water and Hydropower，2018(11)：30-34.(in Chinese)

[17] ZHU W H，LUAN H W，BU Y，et al. Changes in taste substances during fermentation of fish sauce and the correlation with protease activity [J]. Food Research International，2021，144：110349.

[18] 朱翠翠，王海英，赵玉莹，等. 鱼露中组胺降解菌的分离筛选及耐受性[J]. 食品与生物技术学报，2022，41(3)：8-15.
ZHU C C，WANG H Y，ZHAO Y Y，et al. Isolation，screening and tolerance of histamine degrading strains from fish sauce [J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2022，41(3)：8-15.(in Chinese)

[19] 曾新安，闫冰，李筱晴，等. 几种发酵食品生物胺含量检测与食用安全性分析[J]. 现代食品科技，2024，40(7)：236-243.
ZENG X A，YAN B，LI X Q，et al. Detection and safety

analysis of biogenic amines in several fermented foods [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40 (7):236-243.(in Chinese)

[20] 王光强,俞剑燊,胡健,等. 食品中生物胺的研究进展[J]. 食品科学,2016,37(1):269-278.
WANG G Q, YU J S, HU J, et al. Progress in research on biogenic amines in foods[J]. Food Science, 2016, 37 (1):269-278.(in Chinese)

[21] 李秋月,杨雪娇,谭春艳,等. 罗非鱼源肠道益生菌的分离鉴定及其体外益生特性分析[J]. 食品与生物技术学报,2023,42(12):1-9.
LI Q Y, YANG X J, TAN C Y, et al. Isolation and identification of intestinal probiotics from tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) and *in vitro* probiotic characteristics assessment[J]. Journal of Food Science and Biotechnology,2023,42(12):1-9.(in Chinese)

[22] 潘国杨. 嗜盐四联球菌对豆酱品质提升作用及其中鲜味肽的分离鉴定[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2023.

[23] 周玥琦. 乳酸菌发酵制备低盐鲭鱼调味品的研究[D]. 无锡:江南大学,2021.

[24] 吴永祥,刘刚,江尧,等. 混合曲霉菌发酵对鳜鱼内脏速酿鱼露细菌群落结构和品质的影响[J]. 食品科学,2024,45(16):88-96.
WU Y X, LIU G, JIANG Y, et al. Effect of mixed-mold fermentation on the bacterial community structure and quality of fast fermented fish sauce made from mandarin fish viscera [J]. Food Science,2024,45(16):88-96.(in Chinese)

[25] DEVANTHI P V P, GKATZIONIS K. Soy sauce fermentation: microorganisms, aroma formation, and process modification[J]. Food Research International, 2019,120:364-374.

[26] JEONG D W, HEO S, LEE B, et al. Effects of the predominant bacteria from meju and doenjang on the production of volatile compounds during soybean fermentation [J]. International Journal of Food Microbiology,2017,262:8-13.

[27] LIU J J, LI D S, HU Y, et al. Effect of a halophilic aromatic yeast together with *Aspergillus oryzae* in koji making on the volatile compounds and quality of soy sauce moromi[J]. International Journal of Food Science & Technology,2015,50(6):1352-1358.

[28] XIAO N Y, XU H Y, GUO Q Y, et al. Effects of flavourzyme addition on protein degradation and flavor formation in grass carp during fermentation[J]. Journal of Food Biochemistry,2022,46(12):e14405.

[29] 段泽瑞,田梅兰,刘杨柳,等. 食盐添加量对虾酱理化性质和细菌多样性的影响[J]. 食品科学,2024,45(15):85-93.
DUAN Z R, TIAN M L, LIU Y L, et al. Effect of salt concentration on physicochemical properties and bacterial diversity of shrimp paste[J]. Food Science, 2024, 45 (15):85-93.(in Chinese)

[30] 李佳莲,王涛,方芳. 耐盐乳酸菌的益生特性及其在酱油发酵中的应用[J]. 食品与生物技术学报,2024,43(5):9-18.
LI J L, WANG T, FANG F. Probiotic properties of salt-tolerant lactic acid bacteria and their applications in soy sauce fermentation[J]. Journal of Food Science and Biotechnology,2024,43(5):9-18.(in Chinese)

(责任编辑:李春丽)