

# 乳酸菌的乙醇耐受机制及其在食醋生产中的应用

张霖, 夏程程, 王文悦, 余帆, 肖柯, 易弛, 樊鑫, 朱晓青, 肖俊锋, 李琴, 汪超, 穆杨, 周梦舟\*  
(湖北工业大学发酵工程教育部重点实验室, 工业发酵省部协同创新中心,  
湖北省食品发酵工程技术研究中心, 湖北武汉 430068)

**摘要:** 传统固态发酵食醋因其丰富的菌群在风味、品质等方面有着不可比拟的优势, 乳酸菌作为固态食醋发酵中重要的功能微生物, 广泛应用于食品、生物等领域。然而, 食醋在发酵过程中乳酸菌会受到高乙醇环境的胁迫, 因此探究乳酸菌如何在高乙醇环境下生存具有积极意义。该研究选择耐乙醇副干酪乳杆菌 (PC-5) 和不耐乙醇植物乳杆菌 (PR-7) 作为实验对比菌株, 通过检测生物指标发现: 在体积分数为 8% 的乙醇环境下, PC-5 的多糖含量占比和细胞膜通透性分别提高至 0.56% 和 75%, 且显著高于 PR-7。此外, 代谢途径中的己糖激酶 (Hexokinase, HK)、6-磷酸果糖激酶 (6-Phosphofructokinase, PFK)、丙酮酸激酶 (Pyruvate Kinase, PK) 的活性均高于 PR-7, 并分别提高至 99.82、2.78、3.43 U/mg。最后, 在食醋不同发酵阶段中加入 PC-5 使其与酵母菌实现共同发酵, 结果发现: 共发酵食醋体系中多酚的生成和总抗氧化能力比单菌发酵分别提升了 32.14% 和 55.56%。因此乳酸菌对食醋发酵有着良好的促进作用, 为乳酸菌参与食醋共发酵提供了良好的理论依据。

**关键词:** 乳酸菌; 细胞膜; 乙醇胁迫; 混菌发酵

文章编号: 1673-9078(2024)03-91-101

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.3.0322

## Ethanol Tolerance Mechanism of Lactic Acid Bacteria and Its Application in Vinegar Fermentation

ZHANG Lin, XIA Chengcheng, WANG Wenyue, YU Fan, XIAO Ke, YI Chi, FAN Xin, ZHU Xiaoqing,  
XIAO Junfeng, LI Qin, WANG Chao, MU Yang, ZHOU Mengzhou\*

(Research Center of Food Fermentation Engineering and Technology of Hubei, Key Laboratory of Fermentation Engineering, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China)

**Abstract:** Traditional solid-state fermented vinegar has superior flavor and quality due to its rich flora. As lactic acid bacteria are important functional microorganisms in solid-state vinegar fermentation, they are widely used in food-related and biological fields. However, lactic acid bacteria are stressed by high ethanol concentrations during vinegar fermentation. Therefore, how lactic acid bacteria survive at high ethanol concentrations should be explored. In this study, ethanol-tolerant *Lactobacillus paracasei* PC-5 and ethanol-intolerant *Lactobacillus plantarum* PR-7 were selected for comparison. Based on the biological indicators, the polysaccharide content and cell membrane permeability of PC-5 increased to 0.56% and 75%,

引文格式:

张霖,夏程程,王文悦,等.乳酸菌的乙醇耐受机制及其在食醋生产中的应用[J].现代食品科技,2024,40(3):91-101.

ZHANG Lin, XIA Chengcheng, WANG Wenyue, et al. Ethanol tolerance mechanism of lactic acid bacteria and its application in vinegar fermentation [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(3): 91-101.

收稿日期: 2023-03-16

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31601455); 湖北省粮食局科技创新项目 (2017-58)

作者简介: 张霖 (1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品发酵与微生物, E-mail: 625229957@qq.com

通讯作者: 周梦舟 (1986-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品发酵与微生物, E-mail: zmkelvin@hbut.edu.cn

respectively, and were significantly higher than those of PR-7 in an ethanol environment with a volume fraction of 8%. PC-5 outperformed PR-7 in terms of the activities of hexokinase (HK), 6-phosphofructokinase (PFK), and pyruvate kinase (PK) in the metabolic pathway, with activities increasing to 99.80, 2.78, and 3.43 U/mg, respectively. Finally, PC-5 was added to the vinegar at different fermentation stages to achieve mixed culture co-fermentation with yeast. Polyphenol production and total antioxidant capacity were found to increase by 32.14% and 55.56%, respectively, compared with those of single culture bacteria fermentation. Therefore, lactic acid bacteria had positive stimulation effects on vinegar fermentation. Such findings provide a good theoretical basis for the use of lactic acid bacteria in mixed culture fermentation of vinegar.

**Key words:** lactic acid bacteria; cell membrane; ethanol stress; mixed culture fermentation

食醋作为酸性调味品在我国有着悠久的酿造历史, 不仅富含营养, 而且具有降血糖、降血脂等多种有益于人体的功能, 其发酵方式主要分为传统固态发酵和液态发酵。其中, 液态发酵方式的发酵时间较短使得微生物物种较为单一, 并且发酵产物减少, 从而其产物的风味成分简单。然而, 固态发酵是一种微生物在几乎没有游离水的固态基质环境中进行发酵的方式, 相比于液态发酵, 它具有较长的发酵周期, 因此促进微生物代谢生成芳香族化合物, 为食醋增添风味<sup>[1]</sup>。

目前在固态发酵工艺中, 利用大曲来促进酒精发酵的效率提升<sup>[2]</sup>, 在大曲中富集着丰厚的微生物<sup>[3]</sup>, 这些微生物有助于提高淀粉在酒精发酵过程中的转化率和酒精浓度, 为后续醋酸发酵提供了有效的准备。此外, 产生的有机酸让醋的风味和口感更加丰盈<sup>[4]</sup>。然而因传统固态发酵的菌种结构复杂, 环境因素较多, 且难以控制变量, 从而阻碍了食醋品质的稳定性。有研究表明乳酸菌是固态食醋发酵中的重要功能微生物<sup>[5]</sup>, 可以通过不同发酵类型, 产生乳酸、醋酸、丁酸等物质, 从而提高食醋中有机酸含量, 另外产生的少量酮类物质和酚类物质赋予食醋更加宜人的香味<sup>[6]</sup>。因此, 乳酸菌广泛应用于医药与健康产业领域中。

大量研究表明在酒精发酵阶段过程中, 乳酸菌的加入有助于酵母的生长<sup>[7]</sup>, 同时乳酸菌和酵母菌共同发酵时会产生协同作用, 即酵母菌为乳酸菌补给营养物质, 而乳酸菌则给予酵母菌能量来源。值得注意的是, 在酒精发酵阶段, 乳酸菌会面临高乙醇环境的胁迫, 对其代谢产物和生产效率造成不利影响。然而, 在发酵中期, 随着乳酸菌适应恶劣的环境, 出现了耐受高乙醇浓度的菌株, 这些菌株在发酵过程中, 产生乙酸、乳酸等代谢产物, 对食醋的调味做出贡献。但乳酸菌是如何适应高乙醇环境的机制仍不明晰。因此为探究食醋发酵的过程中乳

酸菌的耐乙醇的机制, 以及对食醋发酵品质的影响, 本文从醋胚中筛选到耐乙醇达体积分数为 14% 的副干酪乳杆菌 PC-5 以及不耐乙醇的植物乳杆菌 PR-7。据文献报道细胞膜的通透性、流动性、胞外多糖含量能对乳酸菌在不利环境中的稳定性起到促进作用<sup>[8-10]</sup>, 因此探究了 PC-5 和 PR-7 高乙醇浓度下的细胞膜通透性、流动性、细胞多糖的含量以及生长重要代谢途径中三羧酸循环 (Tricarboxylic Acid Cycle, TCA)、糖酵解途径 (Glycolytic Pathway, EMP) 的限速酶活和腺嘌呤核苷三磷酸酶 (ATPase) 酶的活性等指标, 初步探究副干酪乳杆菌 PC-5 耐乙醇的机制。最后在不同发酵阶段中分别加入乳酸菌, 观察对比混菌发酵和单菌发酵之间的风味和品质上的差异, 为耐乙醇乳酸菌的工业化生产提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料

醋胚; 乳酸菌培养基 (MRS); 1,6- 苯基 -1,3,5- 己三烯 (1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene, DPH), 华顺生物技术有限公司; 碘化丙啶, 上海化学试剂有限公司; 2×Rapid Taq Master Mix, 诺唯赞生物科技股份有限公司。

### 1.2 仪器与设备

UV-1601 紫外 / 可见分光光度计, 北京瑞利分析仪器有限公司; JY92-IIN 超声波细胞粉碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; HNY-2112B 电热恒温培养箱, 天津市欧诺仪器仪表有限公司; CT15RE 高速冷冻离心机, 日立工机株式会社。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 菌种的选择

##### 1.3.1.1 耐高乙醇体积分数乳酸菌的筛选及纯化

取 6 个不同时期的醋胚各 5.00 g 于 100 mL 培

培养基 (37 °C) 中培养 1 d, 取上清发酵液作为样本, 梯度稀释后将样液涂布在含有体积分数为 10% 和 12% 乙醇的 MRS 固体培养基上, 分别于 37 °C 恒温培养箱中培养 3 d, 取单菌落至 MRS 培养基, 活化 18 h, 随后用 MRS 液体培养基 (乙醇体积分数为 0%、4%、8%、12%、14%) 进行检验, 将乳酸菌菌液与体积分数为 40% 的甘油 1:1 混合放置 -80 °C 保存。

### 1.3.1.2 16S rDNA 的检测步骤

PCR 扩增体系: 25.00 μL 2×Rapid Taq Master Mix 酶、2.00 μL 引物 27 F、2.00 μL 引物 1492 R、1.00 μL 模板菌液、ddH<sub>2</sub>O 补足至 50.00 μL。

扩增条件: 95 °C 预变性 3 min、95 °C 变性 15 s、60 °C 退火 15 s、72 °C 延伸 23 s、循环 30 次、72 °C 终延伸 5 min。

## 1.3.2 细胞稳定性

### 1.3.2.1 苯酚-硫酸法测定细胞多糖

将 100.00 mL 浓硫酸滴入 20.00 mL 试管, 缓慢冷却至室温, 加入 1.20 g 苯酚混合搅拌, 制成显色液备用。取 1.00 mL 培养 24 h 的细胞悬液, 加入 5.00 mL 显色液, 混合搅拌, 置于沸水浴中加热 30 min, 拿出冷却至室温, 测定其吸光度值 (490 nm), 每个样品平行测定三次<sup>[11]</sup>。

### 1.3.2.2 乳酸菌细胞膜流动性的测定

样品经过离心, 离心转速为 5 000 r/min, 温度为 4 °C, 离心时间为 5 min, 弃上清。随后加入 5.00 mL 的 PBS 重悬, 同时加入 4.00 mL 浓度为 2.00 μmol/L 的 DPH 染液, 在 30 °C 水浴锅中加热 1.5 h, 再次离心后取菌体并加入 4.00 mL 的 PBS 重悬备用。在发射波长为 429 nm, 激发波长为 358 nm, 激发狭缝与发射狭缝均为 5 nm 的条件下检测吸光度<sup>[12,13]</sup>。

### 1.3.2.3 乳酸菌细胞膜通透性的测定

样品中分别加入质量浓度为 5.00 μg/mL 的 PI 染料, 在 4 °C 的条件下避光染色 10 min。检测 FL3 (红色) 荧光通道的乳酸菌样品, PI 染料的激发 / 发射波长分别设定为 488 nm/635 nm<sup>[14]</sup>。记录 10 000 个细胞, 通过 Flowjo 软件分析数据<sup>[15]</sup>。

### 1.3.2.4 细胞膜流动性的计算

$$B = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + GI_{VH}} \quad (1)$$

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (2)$$

$$\eta = \frac{2B}{0.46 - B} \quad (3)$$

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (4)$$

式中:

$B$ ——荧光偏振度;

$r$ ——荧光各向异性;

$\eta$ ——细胞平均微粘度;

$I_{VV}$ ——激发光为 90 度方向, 发射光也为 90 度方向测得的荧光强度;

$I_{VH}$ ——激发光为 90 度方向, 而发射光为 0 度方向时测得的荧光强度;

$G$ ——光栅校正因子;

$I_{HV}$ ——激发光为 0 度, 而发射光为 90 度测得的荧光强度;

$I_{HH}$ ——激发光为 0 度, 发射光也为 0 度测得的荧光强度。

## 1.3.3 酶粗液的提取

将样品在冰浴的条件下超声破碎, 超声条件为: 80% 振幅, 运行 2 s, 间隔 5 s, 超声时间 20 min。随后将破碎的溶液离心后取上清 (10 000 r/min, 在 4 °C 的条件下离心 8 min)。

## 1.3.4 酶活的测定

使用苏州科铭生物科技有限公司的试剂盒进行测定柠檬酸合酶 (Citrate-synthase, CS)、己糖激酶 (Hexokinase, HK)、果糖-6-磷酸激酶 (6-Phosphofructokinase, PFK)、丙酮酸激酶 (Pyruvate Kinase, PK) 和乳酸脱氢酶 (Lactate Dehydrogenase, LDH) 的活性。异柠檬酸脱氢酶 (Isocitrate Dehydrogenase, ICDHc) 和  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶 ( $\alpha$ -Ketoglutarate Dehydrogenase,  $\alpha$ -KGDH) 的测定使用 solarbio 生命科技公司提供的活性检测试剂盒。超微量总 ATP 酶的测定使用南京建成公司的超微量总 ATP 酶试剂盒。

## 1.3.5 食醋发酵的方法

采用大米粉为发酵原料, 酒精发酵条件: 温度为 38 °C, 体积分数为 8% 的酵母粉, 体积分数为 2% 接种量的乳酸菌; 醋酸发酵条件: 温度为 34 °C, 体积分数为 4% 的乙醇, 体积分数为 6% 的醋酸菌, 摇床转速为 180 r/min<sup>[16]</sup>。工艺流程如下:

大米打粉过筛 → 米粉糊化 → 加  $\alpha$ -淀粉酶液化 → 加糖化酶糖化 → 装瓶 → 加活化酵母, 酒精发酵 [加入乳酸菌 (组 1)] → 接种 (醋酸菌) → 醋酸发酵 [加入乳酸菌 (组 2)] → 杀菌包装

### 1.3.6 成品醋的指标测定

#### 1.3.6.1 还原糖的测定

采用二硝基水杨酸 (3,5-Dinitrosalicylic Acid, DNS) 法: 将发酵液稀释 100 倍, 取 3 只比色管标号 1、2、3, 加入稀释后的发酵液 0.50 mL 加入 DNS 试剂 0.50 mL 混匀, 沸水浴 5 min, 冷却后加入 4.00 mL 蒸馏水混匀, 测  $OD_{540}$ <sup>[17]</sup>。

#### 1.3.6.2 总黄酮的测定

将样品稀释 100 倍后取 1.00 mL, 2.00 mL 体积分数为 60% 的乙醇; 0.50 mL 的体积分数为 5% 的亚硝酸钠于 10.00 mL 容量瓶中, 静置 6 min; 加入 0.50 mL 体积分数为 10% 的硝酸铝溶液, 静置 6 min 后; 加入 4.00 mL 体积分数为 4% 的氢氧化钠溶液定容, 静置 15 min; 在 510 nm 处测定吸光度<sup>[18]</sup>。通过黄酮标准曲线算得样品中黄酮的含量<sup>[19]</sup>。

#### 1.3.6.3 总多酚的测定

将样品稀释 100 倍后取 1.00 mL, 于 10.00 mL 比色管中, 加入 5.00 mL 10% 体积分数的福林酚 (Folin-Ciocalteu, FC) 试剂静置 3 min, 加入 2.00 mL 150.00 g/L 的  $Na_2CO_3$  (15%), 稀释至 10.00 mL, 避光静置 1 h, 于 760 nm 测吸光度<sup>[20]</sup>。

#### 1.3.6.4 总抗氧化能力 (Total Antioxidant Capacity, T-AOC) 的测定

首先提取细胞粗酶液, 离心后取样品 30.00  $\mu$ L、配置好的混合液 900.00  $\mu$ L、无酶水 90.00  $\mu$ L 混匀充分反应 20 min, 于 593 nm 处测定吸光值为  $A_{测定}$ <sup>[21]</sup>。将样品用无酶水替代, 测得吸光值为  $A_{空白}$ 。

#### 1.3.6.5 羟基自由基清除能力的测定

取 2.00 mL PBS 溶液、1.00 mL  $FeSO_4$  溶液、1.00 mL 的 1,10-菲咯啉以及 1.00 mL 样品混匀, 然后在 37  $^{\circ}C$  条件下加热 90 min, 测定吸光值  $A_s$ 。1.00 mL 水替代  $H_2O_2$ , 在 37  $^{\circ}C$  加热 90 min, 测定吸光值  $A_b$ 。1.00 mL 水替代样品, 在 37  $^{\circ}C$  加热 90 min, 测定吸光值  $A_p$ 。吸光值均在 536 nm 的波长下测得<sup>[22]</sup>。

$$C = \frac{A_s - A_p}{A_b - A_p} \times 100\% \quad (5)$$

式中:

$C$ —羟基自由基清除能力, %。

#### 1.3.6.6 超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD) 酶活的测定

A 液: pH 值 8.2 的 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (含 1 mmol/L EDTA·2Na), B 液: 含 4.50 mmol/L 邻苯

三酚的盐酸溶液。将样品在 10 000 r/min 的条件下离心 8 min, 取上清液。邻苯三酚自氧化速率测定: 在 25  $^{\circ}C$ , 依次取 2.35 mL A 液, 2.00 mL 蒸馏水, 0.15 mL B 液于 10.00 mL 比色皿中, 在 325 nm 的波长下, 分别测定开始时和 1 分钟时的吸光值, 二者之差即邻苯三酚自氧化速率  $\Delta A_{325}$  ( $min^{-2}$ )<sup>[23]</sup>。

#### 1.3.6.7 SOD 酶活计算

$$E = \frac{\Delta A_{325} - \Delta A'_{325}}{50\%} \times 100\% \times 4.5 \times \frac{1}{V} \times D \quad (6)$$

式中:

$E$ —SOD 酶活力, U/mL;

$A_{325}$ —邻苯三酚自氧化速率;

$A'_{325}$ —样液或 SOD 液抑制邻苯三酚自氧化速率;

$V$ —样液体积, 单位为 mL;

$D$ —样液的稀释倍数。

反应液的总体积为 4.50 mL。

### 1.3.7 数据处理

所有测试和分析均一式三份。数据采用 SPSSv 21.0 (以平均  $\pm$  SD 表示) 进行分析, 在  $P < 0.05$  时认为差异有统计学意义。图形是使用 OriginPro 8.0 和 GraphPad Prism 8 创建的。

## 2 结果与讨论

### 2.1 耐乙醇乳酸菌的筛选鉴定

为筛选出耐乙醇的乳酸菌, 从食醋的醋胚中筛选出 9 株乳酸菌进行耐乙醇实验, 结果于表 1 所示。

表 1 不同乳酸菌耐乙醇试验

Table 1 Ethanol resistance test of different lactic acid bacteria

菌株	4%	6%	8%	10%	12%	14%
PC-1	+	+	+	+	+	+
PC-2	+	+	+	+	+	-
PC-3	+	+	+	+	+	-
PC-4	+	+	+	+	+	-
PC-5	+	+	+	+	+	+
PC-6	+	+	+	+	+	-
PC-7	+	+	+	+	-	-
PC-8	+	+	+	+	-	-
PC-9	+	+	+	+	+	-
PR-7	+	+	+	-	-	-

注: 根据实验结果, + 表示生长良好, - 表示生长极差。

从表中可知在体积分数为 14% 的乙醇下 PC-5 仍然可以生长, 而 PR-7 在体积分数为 8% 的乙醇下

没有生长趋势，因此最终选择耐乙醇的 PC-5 和不耐乙醇的 PR-7 作为试验菌株。由图 1 的生长曲线可知，随着乙醇体积分数的升高，PC-5 和 PR-7 的生长量均呈现下降趋势，其中，PC-5 在体积分数为

10% 的乙醇下 OD<sub>600</sub> 能达到 0.80，而 PR-7 在乙醇体积分数达到 10% 之后无生长趋势。由于几乎提取不到 PR-7 的蛋白量<sup>[24]</sup>，因此后文中未出现 PR-7 于乙醇体积分数为 10% 和 12% 下的酶活。

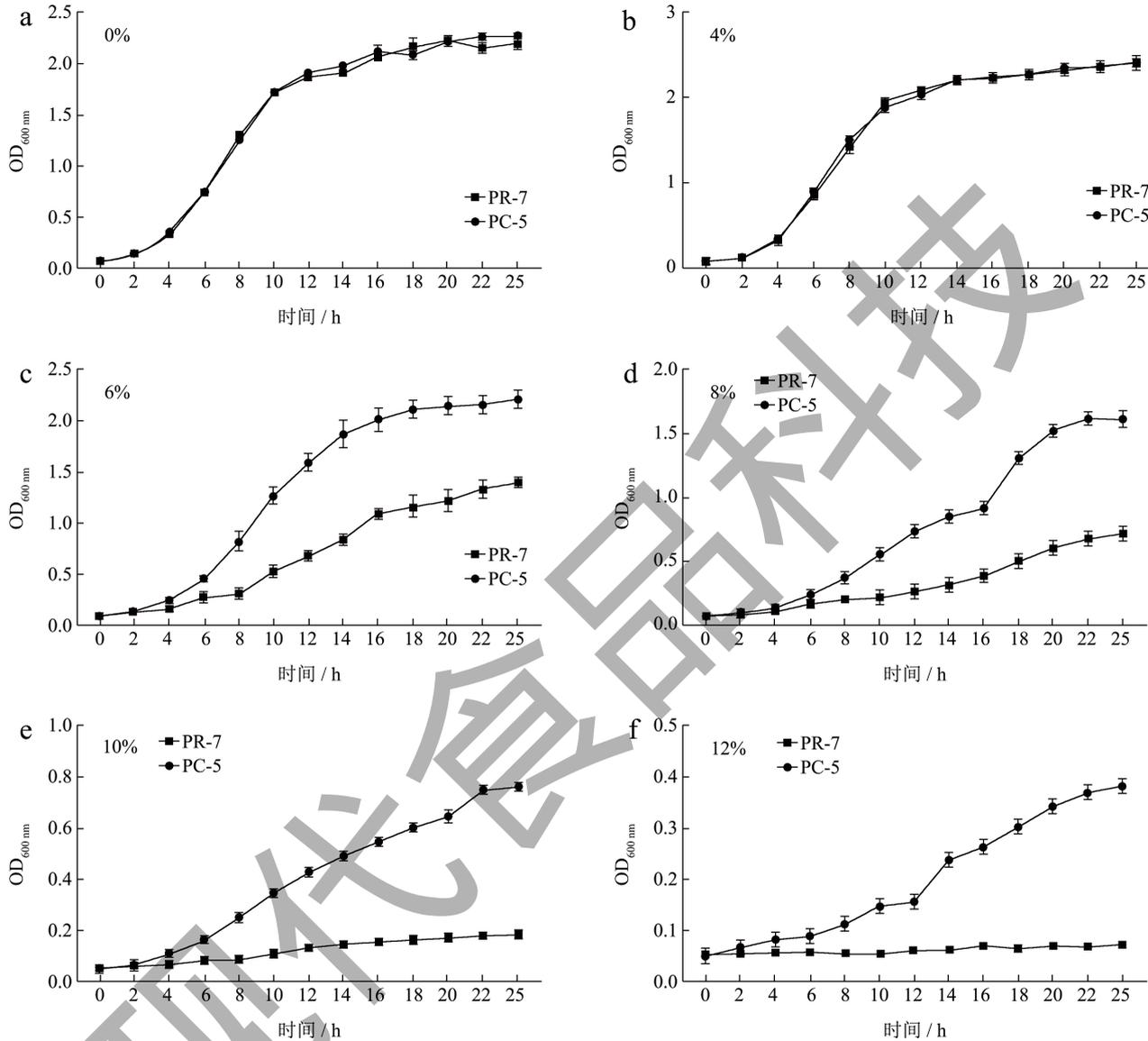


图 1 不同乙醇浓度对 PR-7 和 PC-5 中生物量 OD<sub>600</sub> 的影响

Fig.1 Effect of different ethanol concentrations on OD<sub>600</sub> of biomass in PR-7 and PC-5

## 2.2 PCR电泳结果

如图 2 所示，将所测得的 16S rDNA 基因序列放置 NCBI 中核酸 DNA 的数据库比对发现，PR-7 菌株与植物乳杆菌相似度高达 99.99% 以上，PC-5 菌株与副干酪乳杆菌相似度高达 99.99% 以上。

## 2.3 乙醇对乳酸菌细胞稳定性的影响

由图 3a 所知，不同体积分数乙醇下 PC-5 的多

糖含量占比从 0.90% 下降到 0.30%，PR-7 的多糖含量占比从体积分数为 0.85% 下降到 0.10%，尤其是当乙醇体积分数达到 8% 以后，PC-5 的多糖含量高达 PR-7 的两倍。这可能是由于乳酸菌的细胞多糖与细胞壁的组成成分相关，是决定细胞壁稳定性的重要因素之一，当细胞受到胁迫时，多糖可以为其提供能量。所以当细胞多糖含量下降的时候，细胞壁的稳定性的随之下降。

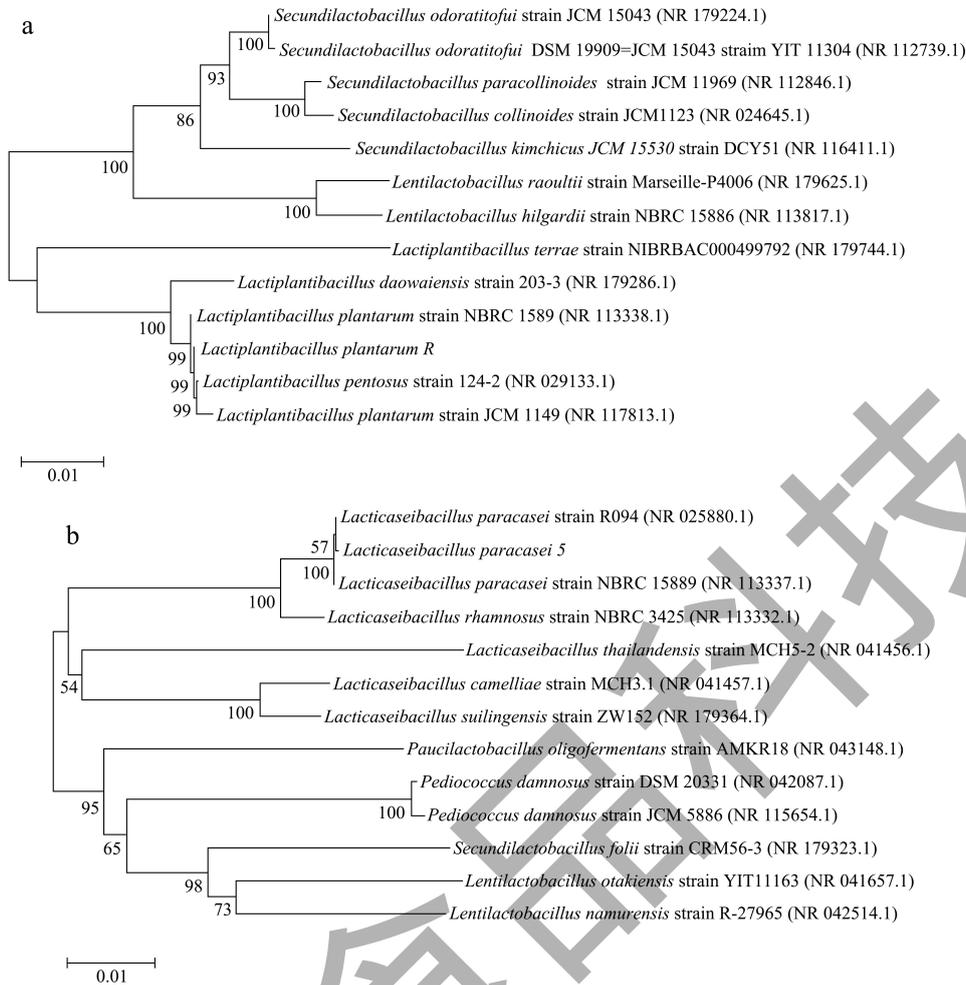


图2 系统发育树图

Fig.2 Phylogenetic tree diagram

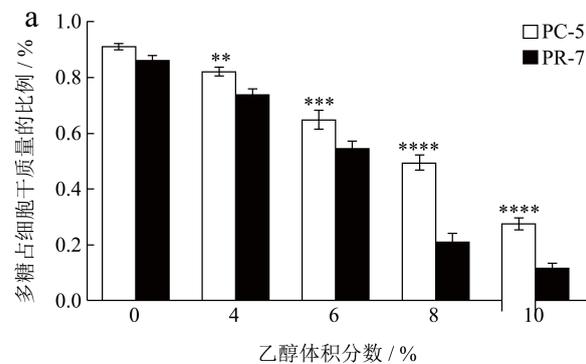
注: (a) PR-7; (b) PC-5。

图3b显示PI单染直方图中成为阳性区域,随着环境胁迫作用越强,菌株的阳性区域逐渐增加,这可能是由于较高的乙醇体积分数使细胞膜破损,使得染料通过细胞膜进入细胞内部并与核酸进行结合,从而导致阳性区域的比例上升。结果显示,随着乙醇体积分数升高,PC-5菌株的阳性区域比例从5.00%增至50.00%,而PR-7菌株也由6.00%升至89.00%,这表明PC-5菌株在高体积分数乙醇条件下细胞膜稳定性较好。

根据已有研究发现, $\gamma$ 各向异性与细胞膜流动性呈负相关<sup>[25]</sup>,图3c显示,当乙醇体积分数增加时,两株菌 $\gamma$ 各向异性都有升高的趋势,暗示细胞膜流动性减小,稳定性降低。这可能是由于乙醇与脂质-水界面处的膜相互作用,削弱了极性分子自由交换的疏水屏障,从而扰乱膜的结构和功能,造成膜的稳定性下降<sup>[26]</sup>。此外,当乙醇体积分数达到8%及以上时,PR-7的各向异性从0.75上升至0.90,

且耐乙醇的PC-5的各向异性从0.70上升至0.80,证明了仅极少量的乙醇就能显著改变膜的流动性和稳定性,而当体积分数达到8%及以上时,会严重破坏细胞膜的稳定性,因此PC-5的稳定性优于PR-7。

综上所述,PC-5的多糖含量、细胞膜流动性以及细胞破裂情况均比PR-7更具优越性,因此,PC-5具有优良的细胞稳定性。



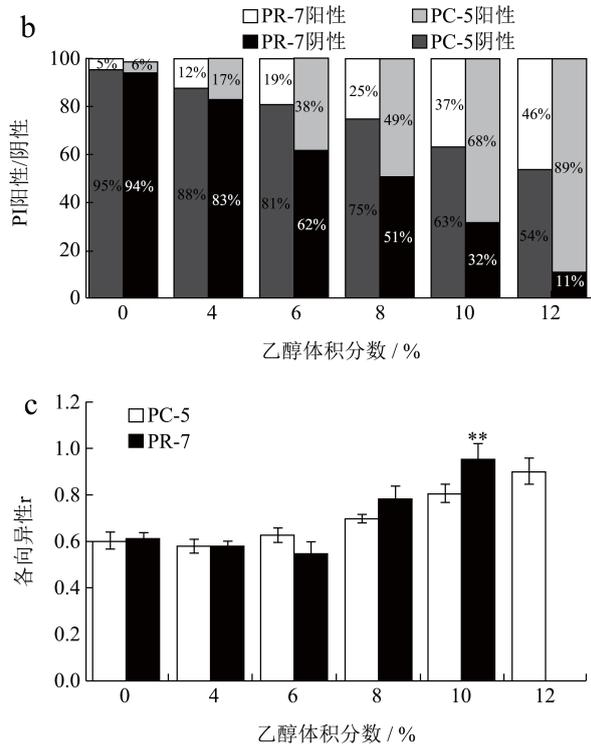


图3 不同乙醇体积分数对 PR-7 和 PC-5 中细胞稳定性的影响

Fig.3 Effect of different ethanol concentrations on cell stability in PR-7 and PC-5

注：图 3a 和图 3c 中“\*\*\*\*\*”表示  $P < 0.0001$ ，“\*\*\*\*”表示  $P < 0.001$ ，“\*\*”表示  $P < 0.01$ 。

### 2.4 乙醇对乳酸菌重要代谢途径酶活的影响

在物质代谢和能量代谢的过程中，TCA 循环起到重要作用，其中 CS、ICDHc、 $\alpha$ -KGDH 是三个关键限速酶。图 4 显示，随着乙醇体积分数升高，PR-7 的 CS、ICDHc 以及  $\alpha$ -KGDH 酶的活性出现先上升后下降的趋势，且于体积分数为 6% 的乙醇下出现拐点。然而，PC-5 的 CS 比酶活从 2.30 U/mg 逐渐上升至 4.20 U/mg，但体积分数为 12% 时降低至 1.10 U/mg；ICDHc 比酶活升至 47.90 U/mg，体积分数为 12% 时下降至 7.80 U/mg； $\alpha$ -KGDH 比酶活随乙醇体积分数从 0%~12% 而下降至 7.80 U/mg；这可能是由于乳酸菌为了抵御外界胁迫，细胞需要大量 ATP 提供能量，使得酶活上升；而当乙醇达到一定体积分数时，细胞的结构将会被破坏，导致菌体死亡，造成酶活降低的现象。但 PC-5 和 PR-7 的 TCA 循环的三个限速酶酶活的差异不大，所以推断出这并不是乳酸菌耐受乙醇的关键酶。

EMP 途径是为机体提供生命活动所必需能量的重要途径之一，从图 5 可见，PC-5 中 HK、PK 和 PFK 的比酶活在体积分数为 0%~8% 乙醇范围内

分别上升至 99.80、3.40、2.80 U/mg，体积分数为 12% 乙醇下降至 22.20、0.70、0.50 U/mg；PR-7 中的比酶活在体积分数为 0%~6% 乙醇范围内上升至 82.00、2.00、1.30 U/mg，体积分数为 8% 乙醇下降至 19.00、0.60、0.40 U/mg。不同的是，PC-5 三种酶活均高于 PR-7，说明 PC-5 中的糖酵解酶活更高，能在高乙醇环境下为乳酸菌提供更多的能量<sup>[27]</sup>。

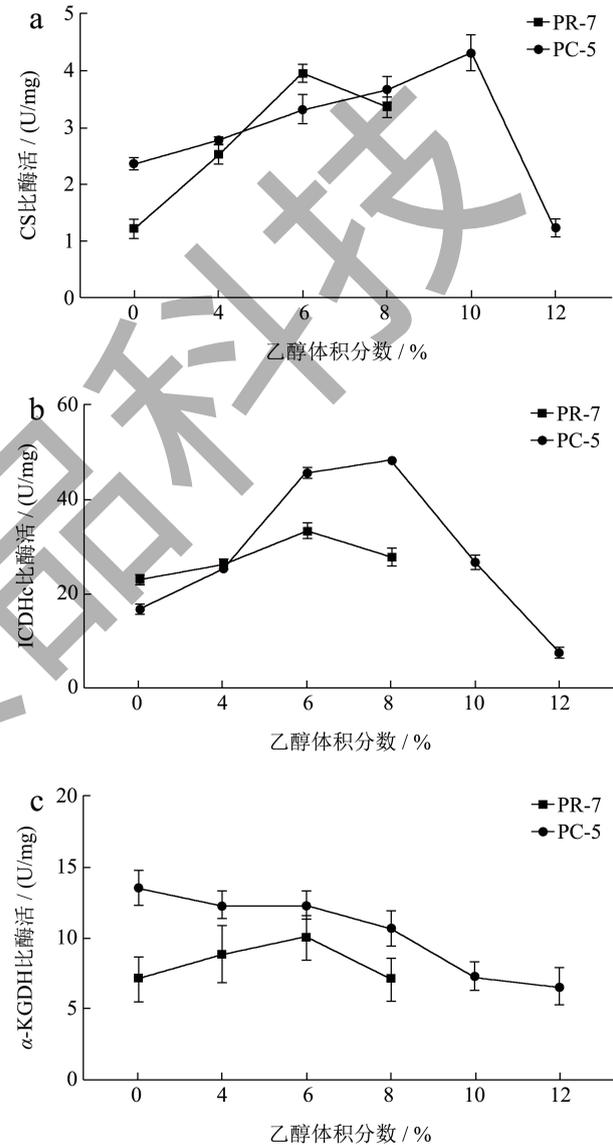


图4 不同体积分数乙醇对 PR-7 和 PC-5 中 TCA 循环中酶活的影响

Fig.4 Effect of different ethanol concentrations on enzyme activity in the TCA cycle in PR-7 and PC-5

图 6a 为细胞中总的 ATP 酶活性，在体积分数为 0%~8% 的乙醇下，PC-5 和 PR-7 的酶活性都在不断上升，其中 PC-5 的 ATP 酶活从 2.00 U/mg 上升至 4.90 U/mg，PR-7 的 ATP 酶活从 0.90 U/mg 上升至 2.90 U/mg，而当乙醇体积分数达到 10% 时，

结构被破坏的 PR-7 蛋白酶活性显著减少, 而 PC-5 则表现出更温和的变化, 其 ATP 酶活性也相对于 PC-7 较高。这表明在乙醇胁迫下, 细胞会利用提高 ATP 合成来提供更多的能量, 以抵抗外界的胁迫。其次, 研究了不同体积分数乙醇下给细胞提供能量的酶活性。

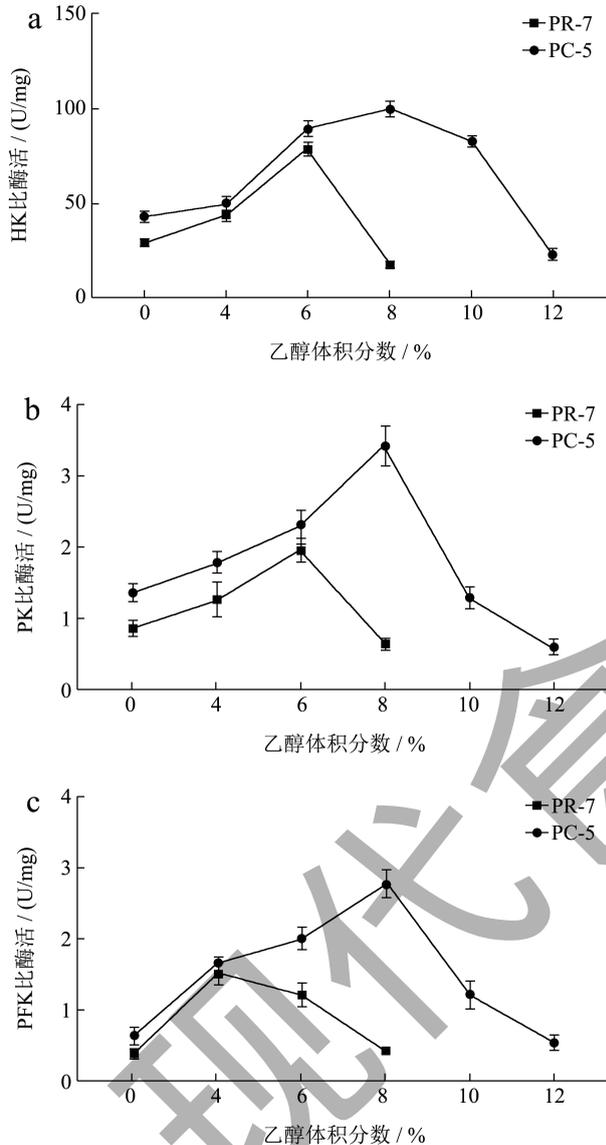


图5 不同体积分数乙醇对 PR-7 和 PC-5 中 EMP 途径中酶活的影响

Fig.5 Effects of different ethanol concentrations on enzyme activities in the EMP pathway in PR-7 and PC-5

图 6b 显示, PC-5 的 LDH 比酶活从体积分数为 0% 乙醇的 16.00 U/mg 上升至体积分数为 8% 时的 48.50 U/mg, 当乙醇体积分数为 12% 时降至 7.70 U/mg; PR-7 的比酶活则从 12.40 U/mg 上升至体积分数为 4% 乙醇时的 19.40 U/mg, 到体积分数为 8% 乙醇时降至 7.10 U/mg。因此, LDH 酶活性

变化趋势与 EMP 途径三个限速酶的趋势一致。再次证明 PC-5 可以产生更多能量, 以提高在高乙醇环境下存活率。

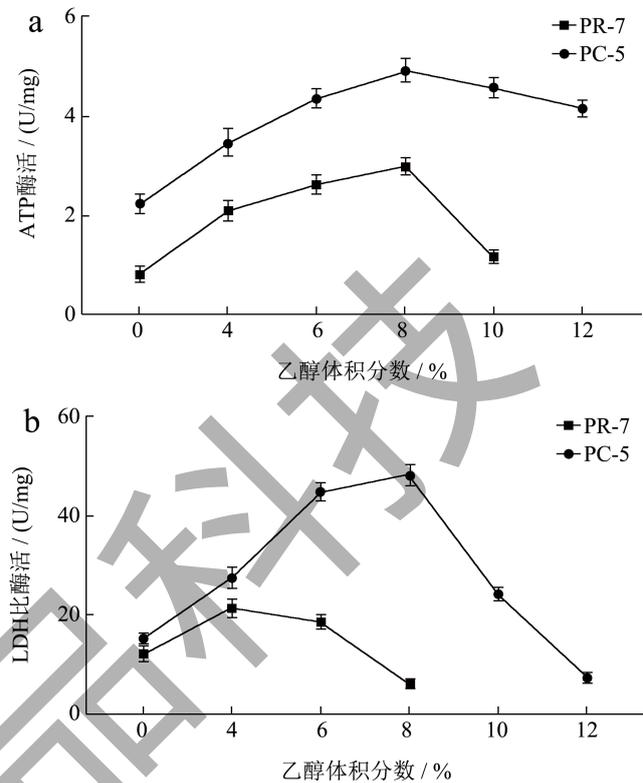


图6 不同体积分数乙醇对 PR-7 和 PC-5 中 ATP 和 LDH 酶活的影响

Fig.6 Effects of different ethanol concentrations on ATP and LDH enzyme activities in PR-7 and PC-5

### 2.5 耐乙醇乳酸菌在酿醋的应用

根据图 7a 可知, 在酒精发酵阶段, 还原糖含量从 120.00 mg/mL 下降至 15.00 mg/mL, 这是因为酵母在发酵过程中消耗了还原糖, 导致乙醇体积分数升高。此外, 在发酵初期, 添加 PC-5 和 PR-7 的变化不太明显, 但随着时间的延长, 乙醇体积分数会有所上升, 这是因为相较于 PR-7, PC-5 的耐乙醇性更强, 从而导致其还原糖的消耗较快。这可能是由于适量的乳酸菌可以加速酵母菌将还原糖转化为乙醇的速度, 而且耐乙醇的乳酸菌在酒精发酵后期更能推动酵母菌的代谢过程。

根据图 7b 可知, 酒精发酵 (1~7 d) 期间, 多酚含量不断上升: PC-5 组从 12.36 mg/mL 升至 37.96 mg/mL, PR-7 组从 10.48 mg/mL 升至 31.12 mg/mL, 对照组从 5.26 mg/mL 升至 28.13 mg/mL, 均出现先上升后下降的趋势, 由此证明乳酸菌的加入促进了酚类物质的生成, 且耐乙醇的乳酸菌促进的效果更为显著。

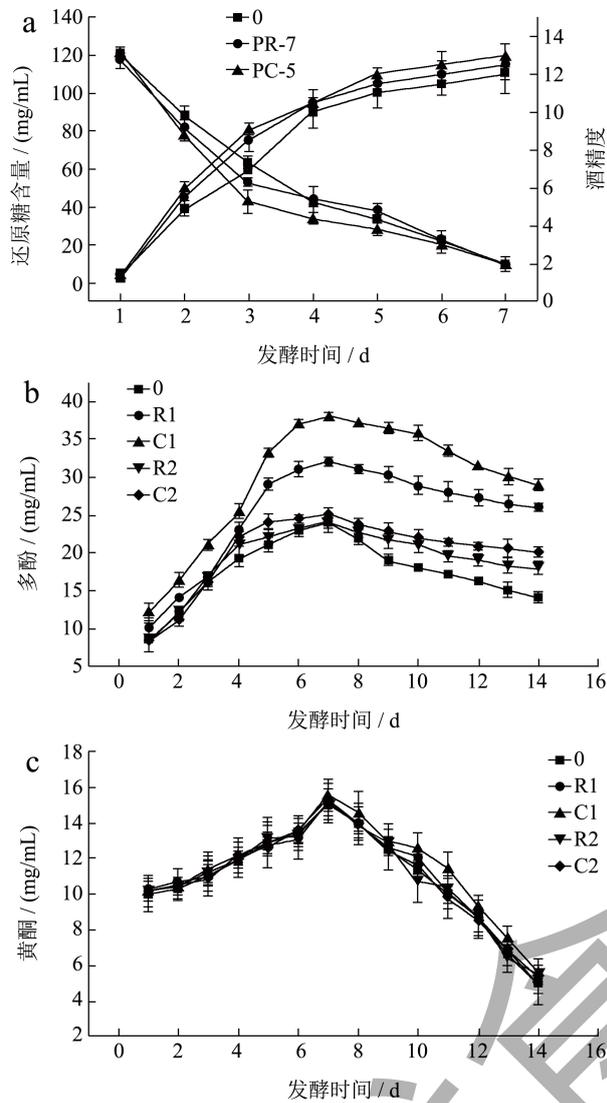


图7 不同发酵时间对还原糖、多酚以及黄酮含量的影响

Fig.7 Effect of different fermentation times on reducing sugar, polyphenol as well as flavonoid contents

注: 0 是对照组, R1 是酒精发酵初期加入 PR-7, C1 是酒精发酵初期加入 PC-5, R2 是醋酸发酵阶段加入 PR-7, C2 是醋酸发酵阶段加入 PC-5, 图 8 同。

由图 7c 可知, 在发酵过程中, 黄酮物质的含量会随着酒精发酵的开始而缓慢上升, PC-5 组、PR-7 组和对照组的黄酮含量从 10.31 mg/mL 上升到 15.45 mg/mL; 然后, 随着醋酸发酵的开始黄酮物质的含量缓慢下降, 从 15.45 mg/mL 下降到 5.42 mg/mL。但是乳酸菌不管加入的时间以及品种, 对黄酮的产生影响都不大。

固态发酵食醋与混菌发酵食醋的抗氧化性是目前的研究热点, 因此探究了乳酸菌对食醋抗氧化性的影响<sup>[28]</sup>。由图 8 可知, 与单菌种发酵相比, 多菌种发酵在抗氧化性方面的表现更为突出, 且单菌种发酵随着时间的增加, 总抗氧化能力从 5.00 mg/mL

上升到 18.00 mg/mL, SOD 酶活在酒精发酵阶段从 30.00 U/mL 上升到 90.00 U/mL, 在醋酸发酵阶段降至 50.00 U/mL, ·OH 清除率从 49% 上升到 75%。混菌发酵随着时间的增加, PC-5 和 PR-7 总抗氧化能力从 5.00 mg/mL 分别上升到 28.00 mg/mL 和 24.00 mg/mL, SOD 酶活在酒精发酵阶段从 30.00 U/mL 分别上升到 140.00 U/mL 和 118.00 U/mL, 在醋酸发酵阶段分别降至 82.00 U/mL 和 71.00 U/mL, ·OH 清除率从 49% 分别上升到 90% 和 85%。在酒精发酵阶段中, PC-5 组的抗氧化指标的提升更为显著, 可能是 PC-5 相比于 PR-7 的乙醇耐受性更好, 乳酸菌的存活率更高, 导致 PC-5 对抗氧化性的提升更为显著。这与它们的细胞结构的稳定性和对不利环境的抵抗有着不可分割的关系<sup>[29,30]</sup>。

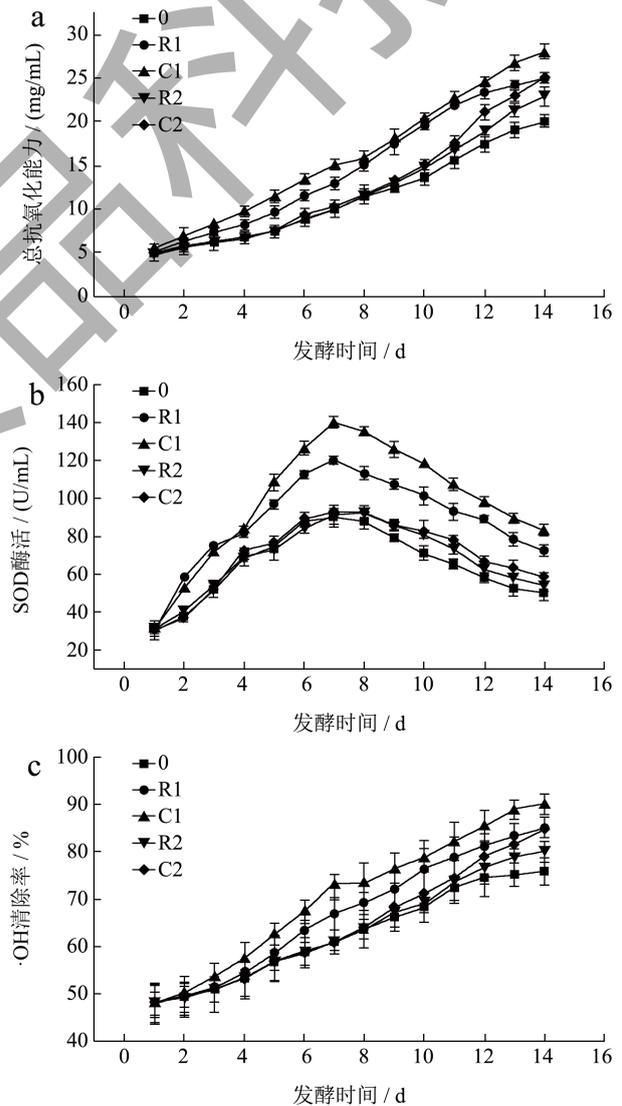


图8 不同发酵时间对总抗氧化能力、SOD 酶活以及·OH 清除率的影响

Fig.8 Effects of different fermentation times on total antioxidant capacity, SOD enzyme activity as well as ·OH clearance

### 3 结论

通过对不同发酵时期的醋胚进行抽样,选择耐乙醇的乳酸菌 PC-5 与不耐乙醇的 PR-7,从细胞形态、细胞多糖、细胞膜的流动性以及通透性等方面进行研究。研究表明,在高体积分数乙醇下,PC-5 的胞外多糖、细胞膜流动性、通透性等指标均优于 PR-7,其中 PC-5 的细胞多糖在体积分数为 8% 的乙醇体积分数下占比为 0.56%,而 PR-7 中细胞多糖占比仅为 0.20%。说明 PC-5 其结构以及膜脂结构更加稳定,更能适应高体积分数的乙醇环境。其次,在 TCA 循环中 PC-5 的酶活和 PR-7 并无显著差异,但在 EMP 途径中 PC-5 的酶活均高于 PR-7,这与 ATP 酶活的变化相互印证。在乙醇体积分数为 8% 时,PC-5 中 ATP 酶活为 4.90 U/mg,而 PR-7 的 ATP 酶活为 2.90 U/mg,可以看出在高乙醇环境下,PC-5 体内 ATP 酶具有更高的活性,能为其提供更多的能量去抵御高乙醇的环境,从而提高存活率。此外,在食醋发酵体系中 PC-5 和酵母菌混菌发酵比单菌发酵的理化指标均有显著提升,其中多酚的生成和总抗氧化能力分别提升了 32.14% 和 55.56%。最后,乳酸菌在酒精发酵阶段添加比在醋酸发酵阶段添加多酚的生成和 SOD 的酶的活性分别提升了 42.86% 和 37.10%。结果表明,在酒精发酵过程中,乳酸菌和酵母菌可能已经达成共生关系,形成了较为稳定的菌落环境。综上,耐乙醇乳酸菌 PC-5 在高乙醇环境中具有良好的稳定性,并能显著提升食醋的品质,具有工业化应用的潜力。

### 参考文献

- [1] 吴鹏宇.副干酪乳杆菌固态发酵抗逆差异机理研究[D].武汉:华中农业大学,2020.
- [2] 李潇.传统固态发酵食醋大曲中的微生物多样性[D].太原:山西大学,2019.
- [3] NIE Z, ZHENG Y, XIE S, et al. Unraveling the correlation between microbiota succession and metabolite changes in traditional Shanxi aged vinegar [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 9240.
- [4] WANG Z M, LU Z M, SHI J S, et al. Exploring flavour-producing core microbiota in multispecies solid-state fermentation of traditional Chinese vinegar [J]. Scientific Reports, 2016, 6(26): 8-18.
- [5] ZHANG L, HUANG J, ZHOU R, et al. Evaluating the feasibility of fermentation starter inoculated with *Bacillus amyloliquefaciens* for improving acetoin and tetramethylpyrazine in Baoning bran vinegar [J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 255: 42-50.
- [6] 吕艳歌,马海乐,张志燕,等.山西老陈醋醋酸发酵过程中有机酸的变化分析[J].中国酿造,2013,32(5):55-58.
- [7] 王梦颖,赵国忠,赵建新,等.山西老陈醋发酵过程菌群微生态分析及乳酸菌分离[J].中国调味品,2016,41(6):29-33,38.
- [8] FONSECA F, PÉNICAUD C, TYMCZYSZYN E, et al. Factors influencing the membrane fluidity and the impact on production of lactic acid bacteria starters [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(17): 67-83.
- [9] DAI C, XIONG F, HE R, et al. Effects of low-intensity ultrasound on the growth, cell membrane permeability and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2017, 369(19): 1-7.
- [10] CAGGIANIELLO G, KLEEREBEZEM M, SPANO G. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(9): 77-86.
- [11] 张志军,刘建华,李淑芳,等.灵芝多糖含量的苯酚硫酸法检测研究[J].食品工业科技,2006, 2:193-195.
- [12] 杨国栋,周文华,徐飞,等.山萘碱对红细胞膜流动性和膜内源荧光的影响[J].现代应用药学,1993, 1:4-6.
- [13] 程书梅,陈宝江,顾金兰,等.应用荧光偏振法测定酿酒酵母完整细胞膜的流动性[J].河北农业大学学报,2005, 28(6):95-97.
- [14] WANG M, LIU M, HUANG Y, et al. Differential gene expression and methylation analysis of melanoma in TCGA database to further study the expression pattern of KYN1 in melanoma [J]. Journal of Personalized Medicine, 2022, 12(8): 56-66.
- [15] 卢群,刘晓艳,丘泰球,等.超声对酵母细胞膜通透性的影响[J].食品与发酵工业,2005,31(9):14-17.
- [16] 赵翠梅.食醋固态发酵人工菌群构建与发酵工艺优化[D].天津:天津科技大学,2021.
- [17] MCCLEARY B V, MMCGEOUGH P. A comparison of polysaccharide substrates and reducing sugar methods for the measurement of endo-1,4- $\beta$ -xylanase [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 177(5): 52-63.
- [18] MATIĆ P, SABLJIĆ M, JAKOBEK L. Validation of spectrophotometric methods for the determination of total polyphenol and total flavonoid content [J]. Journal of Aoac International, 2017, 100(6): 795-803.
- [19] 刘从竹.混菌酿造复合果酒的工艺优化及其主要成分变化规律的研究[D].广州:华南理工大学,2019.
- [20] 赵晓娟,李敏仪,黄桂颖,等.Folin-Ciocalteu法测定苹果醋饮料的总多酚含量[J].食品科学, 2013,34(8):31-35.
- [21] SI L, LIN R, JIA Y, et al. *Lactobacillus bulgaricus*

- improves antioxidant capacity of black garlic in the prevention of gestational diabetes mellitus: a randomized control trial [J]. *Bioscience Reports*, 2019, 39(8): 22-54.
- [22] DE PAULA R, RABALSKI I, MESSIA M C, et al. Effect of processing on phenolic acids composition and radical scavenging capacity of barley pasta [J]. *Food Research International*, 2017, 102(1): 36-43.
- [23] BORGSTAHL G E O, OBERLEY-DEEGAN R E. Superoxide Dismutases (SODs) and SOD Mimetics [J]. *Antioxidants*, 2018, 7(11): 36-43.
- [24] 李明达. TCA循环中间产物对酿酒酵母胞内代谢关键酶活性的影响[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(3): 331-335.
- [25] 张鹰, 曾新安, 温其标, 等. 荧光偏振法研究脉冲电场对酿酒酵母细胞膜流动性影响[J]. *光谱学与光谱分析*, 2008, 1: 156-160.
- [26] PASSOT S, BOUIX M, GAUTIER J, et al. 50. Relevance of cell biophysical behaviour and membrane fluidity for explaining freezing resistance of lactic acid bacteria [J]. *Cryobiology*, 2012, 65(3): 355.
- [27] LI X, DAI L, LIU H, et al. Molecular mechanisms of furanone production through the EMP and PP pathways in *Zygosaccharomyces rouxii* with D-fructose addition [J]. *Food Research International*, 2020, 133: 109-137.
- [28] İlhan M, Turgut S, Turan S, et al. The assessment of total antioxidant capacity and superoxide dismutase levels, and the possible role of manganese superoxide dismutase polymorphism in acromegaly [J]. *Endocrine Journal*, 2018, 65(1): 1-9.
- [29] PINO A, RUSSO N, SOLIERI L, et al. Microbial consortia involved in traditional sicilian sourdough: characterization of lactic acid bacteria and yeast populations [J]. *Microorganisms*, 2022, 10(2): 20-23.
- [30] RIZZELLO C G, LORUSSO A, RUSSO V, et al. Improving the antioxidant properties of quinoa flour through fermentation with selected autochthonous lactic acid bacteria [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 241: 252-261.