

# *Akkermansia muciniphila*发酵不同浓度复配脱脂乳的理化特性比较

叶根云, 吴中琴, 徐璐, 蒋佳彦, 袁滨锋, 李宗军\*

(湖南农业大学食品科学技术学院, 湖南长沙 410125)

**摘要:**嗜黏蛋白阿克曼菌 (*Akkermansia muciniphila*, 简称 Akk) 作为潜在新型益生菌被广泛关注。该研究将脱脂牛奶与 Akk 营养培养基按照一定比例进行复配, 制备不同浓度的复配脱脂乳, 接种 Akk 后进行发酵。通过测定发酵牛奶的 pH 值、稳定性、可溶性蛋白质、蛋白酶活力、游离氨基酸、短链脂肪酸含量以及 DPPH· 清除能力、羟自由基清除能力、ABTS<sup>+</sup> 清除能力, 来评价 Akk 发酵牛奶的营养特性。结果表明 Akk 发酵脱脂乳产生的主要短链脂肪酸为乙酸, 且随着发酵液中 BHI 含量升高, 发酵液的 pH 值与可溶性蛋白含量呈现显著下降趋势, 分别下降至 5.21 与 4.9 mg/mL; 蛋白酶活力不断增强, 最高可达 51.02 U/mL; 游离氨基酸共检测了 17 种, 其中亮氨酸含量最高 (305.517 8 μg/mL), 半胱氨酸含量最低; 谷氨酸呈显著降低 (62.495 5 μg/mL 降低至 5.818 9 μg/mL); DPPH 自由基清除能力与还原力不断增强, 羟自由基清除力下降。综上所述, 在有生长因子存在的情况下, Akk 菌可以用于牛奶发酵, 未来在进一步确证动物源生长因子的安全性、排除科技伦理的影响后, 或者寻找到了新的非动物源 Akk 生长因子的情况下, 有望推出新一代 Akk 发酵功能牛奶。

**关键词:**嗜黏蛋白阿克曼菌; 发酵; 脱脂乳; 抗氧化; 氨基酸; 短链脂肪酸

文章编号: 1673-9078(2025)02-108-115

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.2.0097

## Comparison on the Physicochemical Characteristics of Skim Milk Fermented by *Akkermansia muciniphila* at Different Concentrations in Formulated Milk

YE Genyun, WU Zhongqin, XU Lu, JIANG Jiayan, YUAN Binfeng, LI Zongjun\*

(College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410125, China)

**Abstract:** *Akkermansia muciniphila* (Akk) has garnered widespread attention as a potential novel probiotic. In this study, skim milk was formulated with Akk nutrient medium in certain proportions to prepare formulated skim milk at different concentrations, and then the formulated skim milk was inoculated with Akk for fermentation. The nutritional characteristics of Akk-fermented milk were evaluated by measuring the pH, stability, soluble protein content, protease activity, free amino acids, short-chain fatty acid content, as well as 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH·) scavenging capacity, hydroxyl radical

引文格式:

叶根云, 吴中琴, 徐璐, 等. *Akkermansia muciniphila* 发酵不同浓度复配脱脂乳的理化特性比较 [J]. 现代食品科技, 2025, 41(2): 108-115.

YE Genyun, WU Zhongqin, XU Lu, et al. Comparison on the physicochemical characteristics of skim milk fermented by *Akkermansia muciniphila* at different concentrations in formulated milk [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(2): 108-115.

收稿日期: 2024-01-21

基金项目: 湖南省农业产业技术体系项目 (湘农发 2022-67)

作者简介: 叶根云 (2001-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品微生物, E-mail: 13217318260@163.com

通讯作者: 李宗军 (1968-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: hnlizongjun@163.com

scavenging capacity, and 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6- sulphonate) (ABTS<sup>+</sup>) scavenging capacity. The results showed that the main short-chain fatty acid produced in Akk-fermented skim milk was acetic acid, and with the increase of BHI content in the fermentation broth, the pH value and soluble protein content of the fermentation broth showed a significant downward trend, decreasing to 5.21 and 4.9 mg/mL, respectively. The protease activity continuously increased, reaching a maximum of 51.02 U/mL. A total of seventeen free amino acids were detected, with leucine having the highest content (305.517 8 μg/mL) and cysteine having the lowest content; Glutamic acid decreased significantly (from 62.495 5 μg/mL to 5.818 9 μg/mL); The DPPH radical scavenging capacity and reducing power continuously increased, whilst the hydroxyl radical scavenging capacity decreased. In summary, in the presence of growth factors, Akk can be used for milk fermentation. In the future, after further verification of the safety of animal-derived growth factors, elimination of the influence of scientific and technological ethics, or the discovery of new non-animal-derived growth factors for Akk, a new generation of Akk-fermented functional milk is expected to be introduced.

**Key words:** *Akkermansia muciniphila*; fermentation; skim milk; short-chain fatty acid; antioxidant; amino acid

2004年荷兰瓦赫宁根大学微生物学实验室的研究者们 Muriel Derrien 等从人类粪便中, 分离出了一种在黏蛋白降解细菌里占据优势地位的 Muc T 菌株, 并将其命名为 *Akkermansia muciniphila* 菌 (Akk)。Akk 菌是一种属于 *Planctomycetes verrucomicrobia-Chlamydiae superphylum* 的革兰氏阴性厌氧、不运动、不形成孢子的椭圆形细菌, 其单细胞长轴约为 0.6~1.0 μm, 生物体多以单细胞或成对生长, 很少呈链状生长。Akk 在 37 °C 与 pH 值为 6.5 的环境下生长速率最快, pH 值低于 5.5 或者高于 8 不生长, 可以使用肠道粘蛋白作为其唯一碳源与氮源<sup>[1]</sup>。有研究表明氧也是影响 Akk 生长的因素, 其并非严格厌氧, 它可以从中低氧环境中获益<sup>[2]</sup>。此外, Akk 菌还可以合成除苏氨酸以外的所有必需氨基酸, 其中包括大量存在再粘蛋白中的丝氨酸、半胱氨酸、脯氨酸<sup>[3]</sup>。Akk 在生命早期时肠道中就有定植, 经过一年的繁殖, 其水平达到稳定并接近成年人水平, 其比例可以占到肠道总微生物的 1%~3%<sup>[4,5]</sup>, 是人类肠道最丰富的 20 种物种之一。

有越来越多的研究表明 Akk 与肥胖<sup>[6,7]</sup>、糖尿病<sup>[8,9]</sup>、心血管疾病<sup>[10]</sup>、神经系统性<sup>[11,12]</sup>等多种疾病存在密切关系。其具有优秀的益生作用, 成为下一代益生菌有巨大潜力。但由于 Akk 的培养条件十分严苛, 目前 Akk 在食品领域的应用处于探索发展阶段, 有研究发现 Akk 不仅可以在人乳中降解人乳寡糖, 而且降解机制与分解黏蛋白类似<sup>[13]</sup>。这为 Akk 的应用提供了一个新思路, 因此推测 Akk 可以利用人乳, 也许在牛乳中也可以保持生物活性。

本团队前期尝试了将 Akk 单独发酵脱脂乳效果并不显著, 但是在脱脂乳中加入一定量的 BHI 培养基, 可以明显改善其生物活性。于是本研究尝试采

用 Akk 发酵不同比例复配的脱脂乳与 BHI 培养基, 探究其对不同浓度复配乳理化特性的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

*Akkermansia muciniphila* ATCC BAA-835, 购于北京百欧博伟生物技术有限公司; 脱脂乳粉, 美国 BD 公司; 脑心浸液肉汤、脑心浸液琼脂、猪胃黏蛋白, 青岛海博生物有限公司; 蛋白定量测定试剂盒, 南京建成生物有限公司; 彩虹光谱蛋白 Maker (10~180 ku), 诺唯赞生物科技有限公司; SDS-PAGE 凝胶电泳试剂盒: 上海碧云天生物技术有限公司; DPPH, 阿拉丁试剂有限公司; ABTS, 上海瑞永生物科技有限公司; 氨基酸标品: 谷氨酸 (Glu)、赖氨酸 (Lys)、丝氨酸 (Ser)、天冬氨酸 (Asp)、丙氨酸 (Ala)、苯丙氨酸 (Phe)、酪氨酸 (Tyr) 苏氨酸 (Thr)、亮氨酸 (Leu)、异亮氨酸 (Ile)、缬氨酸 (Val)、色氨酸 (Trp)、甘氨酸 (Gly)、甲硫氨酸 (Met)、脯氨酸 (Pro)、(纯度均 ≥ 98.5%), Biosharp 生物科技公司; 对氯甲酸异丁酯 (Isobutyl chloroformate, IBCF) (分析纯), 阿拉丁试剂公司; 硝酸、浓盐酸、氢氧化钠、二氯甲烷、吡啶、异丁醇、无水硫酸钠 (分析纯), 国药集团化学试剂有限公司。对照品乙酸、丙酸、丁酸、戊酸均购于麦克林公司。内标 4-甲基戊酸购于麦克林公司。3-(三氟甲基) 苯基三甲基氢氧化铵 5% 甲醇溶液 (批号 IH0096-0), TCI 公司; 维生素 C、三氯甲烷、浓硫酸、甲醇 (分析纯), 国药集团化学试剂有限公司。

### 1.2 仪器与设备

Basic1 厌氧 / 微氧工作站, 重庆江雪科技有限

公司; LDZM-L-I 立式高压蒸汽灭菌器, 上海习仁科学仪器有限公司; SW-CJ-2D 双人单面垂直净化工作台, 上海沪净医疗器械有限公司; UNIC-7200 型可见分光光度计, 济南博鑫生物技术有限公司; 天能 VE-186 电泳仪, 上海橙诚科学仪器有限公司; PHS-3E pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; 7890B 气相色谱质谱仪, 安捷伦有限公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 菌种活化与培养

将冻存的菌液接于 10 mL 脑心浸液肉汤 (BHI) 培养基中, 在厌氧工作站 (气体组成为 80% CO<sub>2</sub>、10% H<sub>2</sub>、10% N<sub>2</sub>, 体积比) 中 37 °C 培养 2 d。菌株恢复活力后, 以 10% (体积分数) 接种量至 BHI 中转代, 每隔 24 h 转代, 活化 3 代作为 Akk 种子液。上述操作均在无菌条件下进行。

#### 1.3.2 脱脂乳培养基的配制及分装

脱脂乳粉与温水以 1:12 配制成脱脂乳。将脱脂乳与 BHI 肉汤按照不同比例使得发酵液最终体积为 50 mL 复配成脱脂乳混合发酵液试剂瓶中, 分六组, 其培养基含量以 10% ( $V_{\text{BHI}}/V_{\text{全}}$ ) 逐级递增, 封口膜封口。采用二次灭菌方法 (条件: 先 72~75 °C, 保持 15~20 s 的巴氏杀菌, 再 115 °C、10 min 灭菌), 灭菌后趁热将脱脂乳混合发酵液转入厌氧操作箱内, 将瓶盖拧松, 静置 12 h 备用。

#### 1.3.3 接种

在冷却后的脱脂乳混合发酵液中以 10% (体积分数) 的接种量接种 Akk 种子液, 种子液浓度 ( $4.5 \times 10^7$  CFU/mL), 37 °C 厌氧培养箱中培养 48 h。

#### 1.3.4 不同脱脂乳发酵培养液活菌数的测定

参考 GB 4789.2-2022, 取 1 mL 发酵后的脱脂乳发酵培养液, 用 9 mL 0.85% (质量分数) 无菌生理盐水稀释, 充分混匀, 制备 1:10 的样品匀液。然后用 1 mL 的无菌移液枪取 1:10 的样品匀液 1 mL, 沿管壁缓慢地注射装有 9 mL 的无菌生理盐水中, 再用干净的无菌吸管吹打混匀, 得到 1:100 的样品匀液。按照上述步骤配制好 10 倍系列稀释样品匀液, 每次使用无菌吸头稀释。取 200  $\mu$ L 适宜梯度稀释液进行平板涂布, 涂布完成后将平板倒置, 于 1.3.1 条件下培养 5 d 后计数, 每个梯度平行 3 次。

$$C = A \times B \times 5 \quad (1)$$

式中:

A—同一稀释梯度菌落平均数;

B—稀释倍数;

C—活菌数, CFU/mL。

#### 1.3.5 不同脱脂乳发酵培养液 pH 值的测定

参考 GB 5009.237-2016 的方法, 采用 pH 值计测定。

#### 1.3.6 不同脱脂乳发酵培养液稳定性的测定

参考吴中琴等<sup>[14]</sup>的方法, 取脱脂乳发酵培养液于离心管中, 10 000 r/min 离心 10 min 后, 去上清, 取沉淀, 在进行烘干称重。沉淀量与样本量的比值即为稳定性的判断标准。

$$D = \frac{m_1}{m_2} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

D—沉淀率, %;

$m_1$ —沉淀物质量, g;

$m_2$ —样品质量, g。

#### 1.3.7 不同脱脂乳发酵培养液可溶性蛋白质的测定

将发酵后的脱脂乳发酵培养液 10 000 r/min 离心 10 min, 过 0.45  $\mu$ m 滤膜, 根据南京建成试剂盒指示 (BCA 法), 取上清用于检测总可溶性蛋白的浓度。

#### 1.3.8 不同脱脂乳发酵培养液蛋白酶活力的测定

参考吴中琴等<sup>[14]</sup>的方法, 以测定氨基态氮的量来衡量蛋白酶活力的数值。定义为 1 mL 酶液在 40 °C 下每分钟水解酪蛋白产生 1  $\mu$ g 酪氨酸所用酶量为一个酶活力单位, 以 U/mL 表示。

#### 1.3.9 不同脱脂乳发酵培养液的抗氧化指标

参考李思宁等<sup>[15]</sup>的方法, 用于分离乳清。10 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 去沉淀, 过 0.45  $\mu$ m 滤膜, 获得乳清样品。-4 °C 冰箱冷冻备用。参考 Xiao 等<sup>[16]</sup>的方法, 对样品的 DPPH 自由基清除能力、羟自由基清除能力、还原力、ABTS<sup>+</sup> 清除能力进行测定。

##### 1.3.9.1 清除 DPPH 自由基能力的测定

将上清液稀释 10 倍后, 将稀释液与 DPPH 甲醇溶液 (0.4 mmol/L) 以 1:1 的比例混合混匀。室温放置 30 min 后, 2 000 r/min 离心 10 min, 测定 517 nm 处的吸光度值。用维生素 C 标准液绘制标准曲线, 实验结果以  $\mu$ g VCE/mL 表示。



### 1.3.9.2 羟自由基清除能力的测定

将上清液稀释 10 倍后, 取 1 mL 稀释液与 1 mL 9 mmol/L 的硫酸亚铁混合, 再加入 1 mL 8.8 mmol/L 过氧化氢, 随后加入 9 mmol/L 水杨酸乙醇溶液 1 mL。充分混合, 37 °C 在保温 60 min, 2 000 r/min 离心 10 min 后, 测定 510 nm 处吸光度值。绘制维生素 C 校正曲线, 作为羟自由基清除活性百分比的函数。用维生素 C 标准液绘制标准曲线, 实验结果以 mg VCE/mL 表示。

### 1.3.9.3 还原力的测定

将上清液、(0.2 mol/L, pH 值 6.6) 磷酸盐缓冲液、10 mg/mL  $K_3Fe(CN)_6$  溶液以 1:5:5 的比例混合均匀。在 50 °C 下反应 20 min 后, 再将混合液与 100 mg/mL 三氯乙酸 TCA 溶液以 11:5 的比例混合均匀。2 000 r/min 离心 10 min 后, 将离心后的上清液与 1 mg/mL 的  $FeCl_3$  溶液以 5:1 的比例混合均匀。反应 10 min 后, 测定 700 nm 处的吸光度值。用维生素 C 标准液绘制标准曲线, 实验结果以  $\mu g$  VCE/mL 表示。

### 1.3.9.4 ABTS<sup>+</sup>清除能力的测定

将上清液稀释 100 倍后, 将稀释液与 ABTS<sup>+</sup> 乙醇溶液以 1:4 的比例混匀, 室温反应 6 min, 于 734 nm 处测定吸光度值。用维生素 C 标准液绘制标准曲线, 实验结果以 mg VCE/mL 表示。

### 1.3.10 金属离子螯合能力的测定

参考 Xiao 等<sup>[16]</sup>的方法。将上清液稀释 5 倍后, 将 1 mL 稀释液与 3.7 mL 蒸馏水以 11:37 的比例混合均匀, 再与  $FeCl_2$  (2 mmol/L) 和菲咯啉 (5 mmol/L) 以 47:1:2 的比例充分混合。在室温下反应 20 min 后, 562 nm 处测定其吸收值。利用 EDTA-2Na 标准液绘制标准曲线, 实验结果以  $\mu g$  EDTA-2Na/mL 表示。

### 1.3.11 游离氨基酸的测定

参考汪雨龙等<sup>[17]</sup>的方法, 并加以改进。将 Akk 发酵牛乳经两次处理衍生后, 采用后进样口进样, 使用 GCMS 进行定量分析。

### 1.3.12 短链脂肪酸的测定

参考常满等<sup>[18]</sup>的方法并加以改良后, 采用内标法测定样品中短链脂肪酸的含量。

## 1.4 数据处理

运用 SPSS 20.0 软件和 Excel 处理分析实验数据, 用 Duncan's 法进行差异显著性分析,  $P < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同脱脂乳发酵培养液的活菌数

将选择的适宜梯度稀释液各取 200  $\mu$ L 涂布在 BHI 固体培养基上, 37 °C 厌氧培养后计数情况见图 1。由图 1 可知, 后三组较前三组, 活菌数呈上升趋势。在未添加 BHI 培养基的脱脂乳发酵培养液中的活菌数只有 6.97 lg CFU/mL, 而加入了 50% BHI 培养基的脱脂乳发酵培养液中活菌数最高, 可达 7.93 lg CFU/mL。这可能是因为 Akk 的生长条件严格, 需要充足的营养, 而加入 BHI 培养基能为 Akk 提供生长所需的营养, 而单一的脱脂乳与加入少量的 BHI 不足以为 Akk 生长提供充足的营养条件。

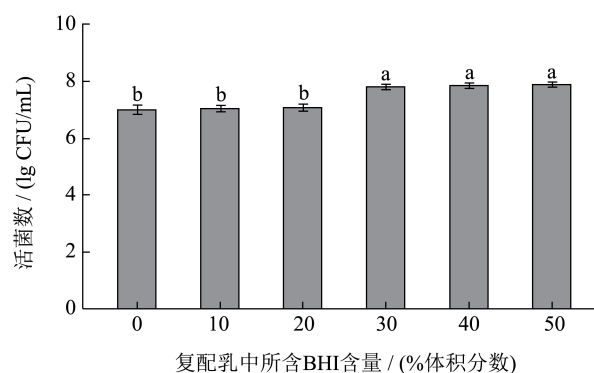


图 1 发酵 48 h 后的活菌数

Fig.1 The number of viable bacteria after 48 hours fermentation

注: 不同小写字母表示各组之间的显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

下同。

### 2.2 不同脱脂乳发酵培养液的pH值

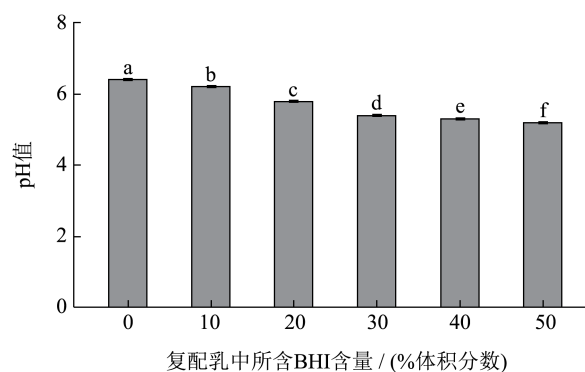


图 2 发酵 48 h 后的 pH 值变化

Fig.2 The change of pH before and after 48 h fermentation

脱脂乳发酵培养液发酵 48 h 后的 pH 值变化情况见图 2。由图 2 可知, 培养液发酵 48 h 后, 随着 BHI 培养基含量的增加, 发酵培养液的 pH 随之降低。其中未添加 BHI 培养基的培养液 pH 值为 6.41,

加入 50% BHI 培养基的培养液 pH 值为 5.21。六组数据之间具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。结合其活菌数 (图 1) 测量结果, 这可能是因为 Akk 在生长过程中会产生短链脂肪酸等酸性物质, 且其在 BHI 培养基中生长情况更好, 在脱脂乳中生长情况差, 从而导致了纯脱脂乳的 pH 值较高。

### 2.3 不同脱脂乳发酵培养液的稳定性分析

一般情况下, 脱脂乳发酵培养液的稳定性用沉淀率表示。脱脂乳发酵培养液发酵 48 h 后的沉淀率见图 3。由图 3 可知, 前三组的沉淀较少, 大致位于 1.45%~2.58% 之间; 后三组的沉淀较多, 大致位于 6.5%~8.17% 之间。并且, 离心后前三组脱脂乳发酵培养液的上清呈乳浊色, 后三组脱脂乳发酵培养液的上清呈透亮的乳清色。六组数据之间具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。这可能是因为 Akk 在高浓度 BHI 培养基中培养时, 生长代谢能力更加旺盛, 产酸能力越强, 使得发酵液 pH 值下降到达某些蛋白质等电点时产生沉淀<sup>[19]</sup>; 也可能是因为 Akk 在生长过程中分泌了蛋白酶, 蛋白酶水解乳蛋白产生的沉淀。

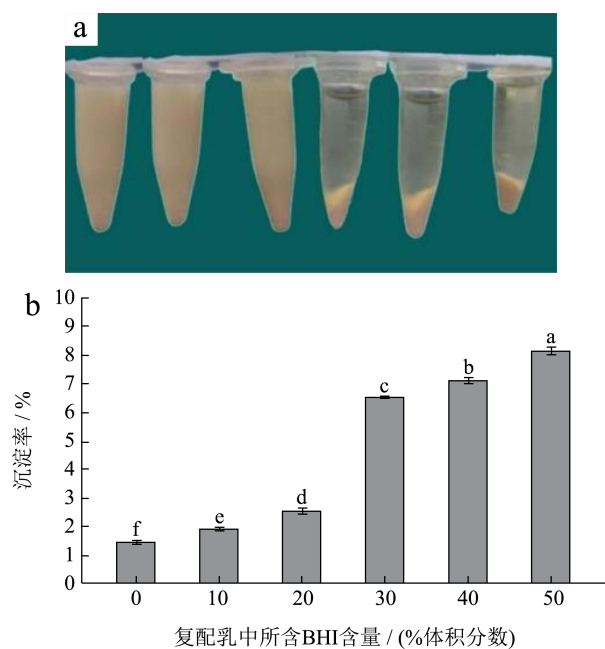


图 3 不同脱脂乳发酵培养液的沉淀率

Fig.3 The precipitation rate of different skimmed milk fermentation broth

### 2.4 不同脱脂乳发酵培养液的可溶性蛋白质含量

可溶性蛋白质质量浓度大小可以反映 Akk 在脱脂乳发酵培养液中的发酵能力强弱。由图 4 可知, 脱脂乳发酵培养液中的可溶性蛋白质质量浓

度最高可达 11.71 mg/mL, 最低为 6.80 mg/mL。且随着发酵液中 BHI 浓度的升高, 可溶性蛋白质质量浓度下降。其原因可能是, Akk 在乳液发酵过程中会将一些可溶性的蛋白质进行降解, 并用于自身的生长发育或者在发酵过程中分泌了蛋白酶, 从而将乳液中的可溶性蛋白降解。

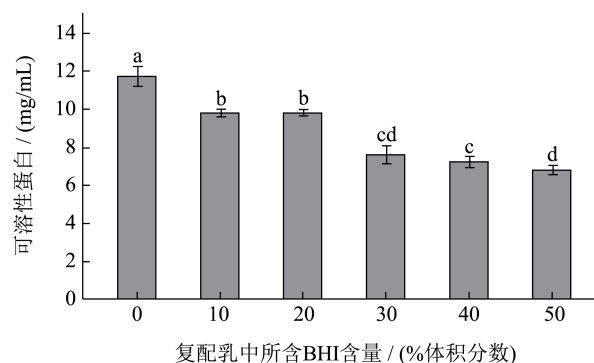


图 4 不同脱脂乳发酵培养液的可溶性蛋白质含量

Fig.4 Soluble protein content of different skimmed milk fermentation broth

### 2.5 不同脱脂乳发酵培养液蛋白酶活力测定结果

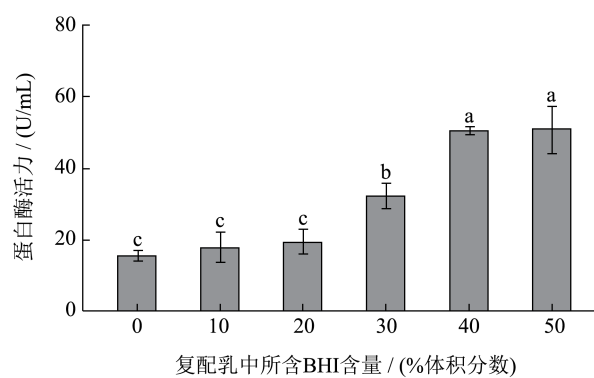


图 5 不同脱脂乳发酵培养液的蛋白酶活

Fig.5 Protease activity of different skim milk fermentation broths

由图 5 可知, 后三组培养液的蛋白酶活力较前三组培养液的蛋白酶活力变化较大。这可能是因为前三组培养液中脱脂乳含量较高、BHI 培养基含量较低, Akk 生长较慢, 发酵能力较弱。而后三组培养液中 BHI 培养基含量较高, 能为 Akk 生长繁殖提供充足营养, 其生物活性显著增强, 具有较高的酶活性; 或者是因为发酵过程中可以生成蛋白酶, 导致在 Akk 发酵脱脂乳培养液后, 发酵液中的蛋白酶活力显著增强。张甦<sup>[20]</sup>的研究了鲜牛乳中嗜冷菌数量与蛋白酶活力关系, 发现蛋白酶活力随着嗜冷菌活菌数的增多而增强。与本文的研究结果大致相同。

2.6 不同脱脂乳发酵培养液抗氧化能力

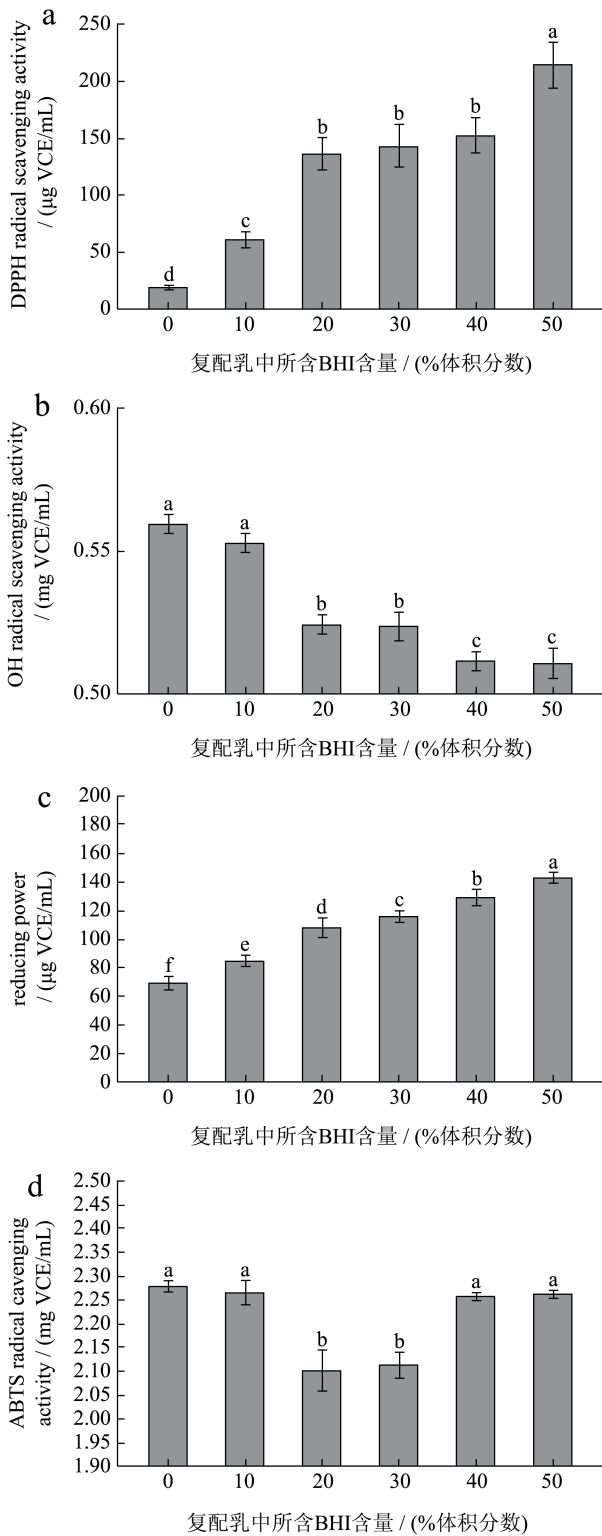


图6 不同脱脂乳发酵培养液的抗氧化活性

Fig.6 Antioxidant activity of different skimmed milk fermentation broth

抗氧化能力强弱能体现 Akk 生物活性的强弱。由图6可知,随着 Akk 发酵能力的增强,乳液发酵液的 DPPH 自由基清除能力和还原力随着乳液

中 BHI 含量的增加而逐渐增强, DPPH 自由基清除能力从 19.12 µg/mL 增至 214.32 µg/mL; 还原力从 70.14 mg/mL 增至 142.82 mg/mL。这可能是因为 Akk 本身具有一定的 DPPH 自由基清除能力和还原力; 或是在发酵过程 Akk 利用复配乳中的蛋白质, 分解释放了具有抗氧化作用的肽<sup>[21]</sup>。而发酵液的羟自由基清除能力从 0.56 mg/mL 降至 0.51 mg/mL。可能是 Akk 生长繁殖过程中, 将具有清除羟自由基的物质吸收利用; 或是因为 Akk 在生长繁殖过程中产生的某种物质, 将具有清除羟自由基的物质代谢分解。ABTS<sup>+</sup> 清除能力在前三组培养液中逐渐降低, 从 2.28 mg/mL 降至 2.11 mg/mL。这可能是因为脱脂乳中含有 ABTS<sup>+</sup> 清除能力的抗氧化物质, 随着脱脂乳的减少, 培养液中清除 ABTS<sup>+</sup> 的抗氧化物质较少; 而在后三组培养液中逐渐增强, 从 2.12 mg/mL 增至 2.26 mg/mL, 这可能是因为 Akk 本身具有 ABTS<sup>+</sup> 清除能力, 或是因为 Akk 发酵能力增强, 发酵产生了具有清除 ABTS<sup>+</sup> 的抗氧化物质。

2.7 不同脱脂乳发酵培养液金属离子螯合能力

从图7可以看出,金属离子螯合能力在六组培养液中呈现为先上升后下降的趋势。李丹等<sup>[22]</sup>发现了脱脂乳中的蛋白质,具有良好螯合金属离子的能力; 王飞镛等<sup>[23]</sup>发现了 pH 值对于金属离子螯合能力也会有一定影响,酸性条件下,金属离子螯合能力更弱。本实验中随着复配乳中 BHI 含量增加,脱脂乳的含量是下降的,其中乳中的蛋白质含量也是减少的; 并且 BHI 含量的增加 Akk 的生长更加旺盛,其可以分解利用其中的蛋白质; 此外, Akk 发酵过程中会产生短链脂肪酸等酸性物质,从而 pH 值下降。所以使得金属离子螯合能力不断减弱。

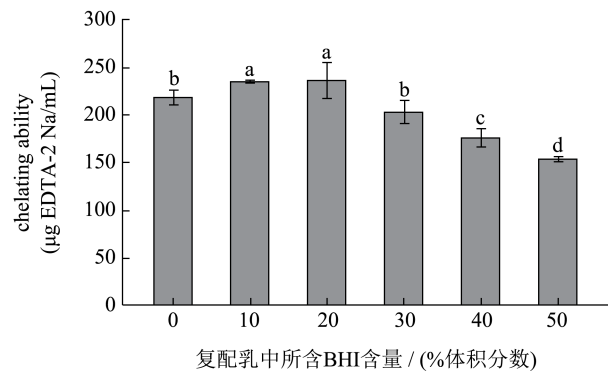


图7 不同脱脂乳发酵培养液金属离子螯合能力

Fig.7 Metal ion chelating ability of different skim milk fermentation broths

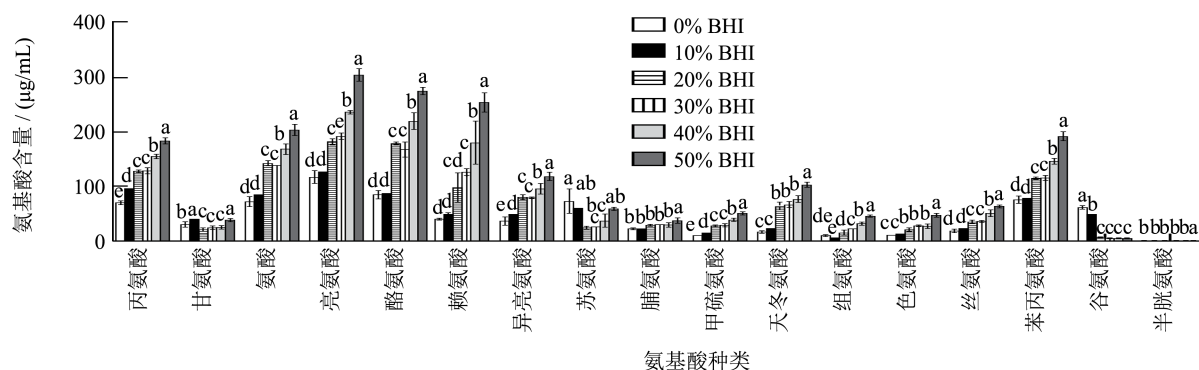


图 8 不同脱脂乳发酵培养液的游离氨基酸含量

Fig.8 Free amino acid content of different skim milk fermentation medium

### 2.8 游离氨基酸

氨基酸是构成蛋白质的基本单位，其种类与数量不仅会影响发酵乳的风味，而且是评价营养价值的重要指标<sup>[24]</sup>。发酵乳中的氨基酸来源主要来自于发酵过程中蛋白质分解、三羧酸循环、糖酵解过程。从图 8 中可以看出，随着乳液发酵液中 BHI 含量的增加，必须氨基酸（除苏氨酸）的含量都是显著升高的，其中亮氨酸含量最高（305.517 8 µg/mL），赖氨酸（253.681 1 µg/mL）次之。非必须氨基酸中丙氨酸、酪氨酸、脯氨酸、天冬氨酸、丝氨酸也是显著上升的，其中酪氨酸含量最高（276.808 3 µg/mL）、丙氨酸含量次之（184.761 5 µg/mL）。这些氨基酸的增加可能是在发酵过程中，Akk 分解复配乳液中营养物质所代谢的产物，随着发酵液中 BHI 含量的升高，Akk 生长代谢更加旺盛，产生了更多的游离氨基酸。而谷氨酸含量显著降低（62.495 5 µg/mL 降低至 5.818 9 µg/mL），与 Zhang 等<sup>[25]</sup>的结果相似。其在发酵周期内消耗迅速，推测谷氨酸可能为细胞株生长或（和）表达的限制性成分<sup>[26]</sup>，在后续发酵过程中，可在复配乳中尝试添加谷氨酸并察其生长情况。

### 2.9 短链脂肪酸

由图 9 可以看出，发酵过程中随着 BHI 含量的增加，乙酸呈现上升状态，而丙酸和戊酸呈现下降状态，推测 Akk 在发酵乳液过程中最重要的产酸物质为乙酸；其中丙酸和戊酸的降低可能是在发酵过程中被利用转换为乙酸，或者在发酵过程中乙酸的增加，乳液 pH 值不断降低抑制了 Akk 发酵过程中其他酸的发酵过程，这些都有待在后续研究中进一步验证。

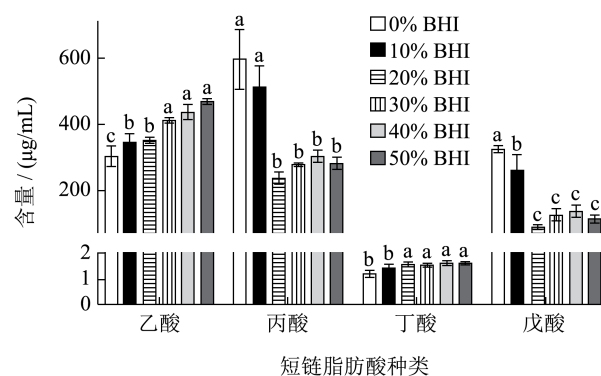


图 9 不同脱脂乳发酵培养液的短链脂肪酸含量

Fig.9 The content of short-chain fatty acids in different skim milk fermentation broths

## 3 结论

Akk 作为具有巨大发展潜力的厌氧益生菌，其生长条件严格，需要厌氧环境及充足的营养。其中发育最好的一组添加比 30%~50%（体积分数），其 AKK 发酵速度快，发酵能力强。随着乳液中 BHI 含量升高，其产酸能力增强，培养液的 pH 值逐渐下降、可溶性蛋白质含量不断下降、蛋白酶活力不断增强，抗氧化活性增加，最高 DPPH 自由基清除能力为 214.32 µg/mL，ABTS<sup>+</sup>清除能力为 2.26 mg/mL，金属离子螯合能力为 236.56 µg/mL，谷氨酸含量降低（最低降至 5.818 9 µg/mL），亮氨酸、酪氨酸等大部分氨基酸含量上升，并同时产生大量的游离脂肪酸（最多含量为乙酸）。表明了 Akk 在有生长因子的情况下，可以用于牛奶发酵，为其在食品领域的应用提供了小部分数据，但是本试验中所采用的 BHI 肉汤，给 Akk 脱脂发酵乳带来了动物源成分（可能含有病毒、朊病毒、过敏原或细菌污染物），其安全性尚未得到证实，直接用于食品领域具有争议，



且其在复配乳中的产酸途径还需要进一步实验进行验证。相信在未来这些动物源成分的安全性得到证实或者发现了非动物源的 Akk 生长因子以后,有望推出 Akk 功能牛奶。

### 参考文献

- [1] DERRIEN M, VAUGHAN E E, PLUGGE C M, et al. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, 54(Pt 5): 1469-76.
- [2] 陶晴,王嫫,彭宇明,等.嗜黏蛋白阿克曼菌在疾病中的保护性作用及机制研究进展[J].*微生物学通报*,2022,49(5):1912-1926.
- [3] OTTMAN N, DAVIDS M, SUAREZ-DIEZ M, et al. Genome-scale model and omics analysis of metabolic capacities of *Akkermansia muciniphila* reveal a preferential mucin-degrading lifestyle [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2017, 83(18): e01014-17.
- [4] LYRA A, FORSSTEN S, ROLNY P, et al. Comparison of bacterial quantities in left and right colon biopsies and faeces [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(32): 4404-4411.
- [5] DERRIEN M, COLLADO M C, BEN-AMOR K, et al. The Mucin degrader *Akkermansia muciniphila* is an abundant resident of the human intestinal tract [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(5): 1646-1648.
- [6] EVERARD A, BELZER C, GEURTS L, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(22): 9066-9071.
- [7] WU Z Q, CHEN X M, MA H Q, et al. *Akkermansia muciniphila* cell-free supernatant improves glucose and lipid metabolisms in caenorhabditis elegans [J]. *Nutrients*, 2023, 15(7): 1725.
- [8] MID S, IPH A, IMS S. Review of literature on *Akkermansia muciniphila* and its possible role in the etiopathogenesis and therapy of type 2 diabetes mellitus [J]. *Journal of the ASEAN Federation of Endocrine Societies*, 2022, 37(1): 69-74.
- [9] ROMANI J, CAIXAS A, ESCOTE X, et al. Lipopolysaccharide-binding protein is increased in patients with psoriasis with metabolic syndrome, and correlates with C-reactive protein [J]. *Clin Exp Dermatol*, 2013, 38(1): 81-84.
- [10] SUN S, LULLA A, SIODA M, et al. Gut microbiota composition and blood pressure [J]. *Hypertension*, 2019, 73(5): 998-1006.
- [11] HE X Y, YAN C X, ZHAO S Y, et al. The preventive effects of probiotic *Akkermansia muciniphila* on D-galactose /AlCl<sub>3</sub> mediated Alzheimer's disease-like rats [J]. *Experimental gerontology*, 2022, 170: 111959.
- [12] KESHAVARZIAN A, GREEN SJ, ENGEN PA, et al. Colonic bacterial composition in Parkinson's disease [J]. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 2015, 30(10): 1351-1360.
- [13] IOANNIS K, JANNEKE E, NOORA O, et al. *Akkermansia muciniphila* uses human milk oligosaccharides to thrive in the early life conditions *in vitro* [J]. *Scientific Reports*, 2020: 10 (1): 14330.
- [14] 吴中琴,汤兴宇,钟媛媛,等.*Akkermansia muciniphila*利用脱脂乳培养基保持其生物活性的研究[J].*食品科技*, 2022,47(3):36-42.
- [15] 李思宁,唐善虎,任然.动物双歧杆菌、植物乳杆菌与传统发酵剂共培养对发酵乳抗氧化特性的影响[J].*食品科学*,2021,42(18):127-134.
- [16] XIAO Y, WANG L, RUI X, et al. Enhancement of the antioxidant capacity of soy whey by fermentation with *Lactobacillus plantarum* B1-6 [J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 12: 33-44.
- [17] 汪雨龙,李晓庆,李秀娟.液液微萃取/固相微萃取-气相色谱法检测柑橘中16种游离氨基酸[J].*食品工业科技*, 2023,44(12):285-292.
- [18] 常满,李晓飞,何芍莹,等.柱前甲基衍生化GC-MS法测定人粪便短链脂肪酸[J].*广东药科大学学报*,2022,38(6):7-12.
- [19] 魏莉娟,孙雯,成霏等.酪蛋白沉淀测定方法在市售纯牛乳中的应用与验证[J].*食品科技*,2014,39(7):290-292, 299.
- [20] 张甦.哈尔滨地区生鲜牛乳中嗜冷菌数量与蛋白酶活力关系的测定[J].*中国乳品工业*,2012,40(7):41-42,49.
- [21] SABEENA F, CAROLINE P. BARON, NINA SKALL NIELSEN, et al. Antioxidant activity of yoghurt peptides: Part 1-*in vitro* assays and evaluation in  $\omega$ -3 enriched milk [J]. *Food Chemistry*, 2010, 123(4): 1081-1089.
- [22] 李丹,赵新淮.酪蛋白的谷氨酰胺酶水解及其产物的金属离子螯合能力[J].*食品与发酵工业*,2010,36(11):21-25.
- [23] 王飞镒,李品高,杨谷毅,等.改性大豆蛋白凝胶对金属离子螯合能力的研究[J].*水处理技术*,2007,12:38-41.
- [24] 杨阳,郭帅,武婷,等.益生菌在发酵乳中的氨基酸代谢特征、发酵特性和贮藏特性[J].*中国食品学报*,2023, 23(7):45-55.
- [25] ZHANG DD, LIU JL, JIANG TM. et al. Influence of *Kluyveromyces marxianus* on proteins, peptides, and amino acids in *Lactobacillus-fermented* milk [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2017, 26: 739-748.
- [26] 胡妍,梅文枫.超高效液相色谱法同时测定细胞培养液中17种游离氨基酸浓度[J].*药学学报*,2023,58(5):1301-1306.