

酱腌菜中酵母菌对高产 AI-2 信号分子乳酸菌发酵特性的影响

吕欣然¹, 佟鑫瑶¹, 顾娜泥¹, 励建荣^{1,2*}, 白凤翎¹, 檀茜倩¹, 崔方超¹, 俞张富³, 沈荣虎³

(¹渤海大学食品科学与工程学院 辽宁省食品安全重点实验室

生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心 辽宁锦州 121013

²大连工业大学海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心 辽宁大连 116034

³杭州萧山农业发展有限公司 杭州 311215)

摘要 乳酸菌和酵母菌是酱腌菜发酵过程中的优势微生物,它们之间的相互关系与发酵特性是影响产品品质的重要因素。本文采用哈维氏弧菌 BB170 菌株报告法和总酯滴定法,从市售酱腌菜来源菌株中筛选高产 AI-2 信号分子乳酸菌和产香型酵母菌。借助正交试验优化乳酸菌和酵母菌复配菌株的发酵条件,比较复配菌株与乳酸菌单独发酵后 AI-2 产量、耐酸性、耐盐性、降解亚硝酸盐等发酵特性的差异,探究酵母菌对高产 AI-2 信号分子乳酸菌发酵特性的影响。结果表明:获得 1 株高产 AI-2 信号分子的植物乳杆菌 SR 和产酯含量达 0.6 g/L 的膜璞毕赤酵母菌 S-0-1。菌株复配优化发酵条件为:接种量 2%,接种比例 1:1(SR:S-0-1),培养温度 28 ℃。在优化的复配发酵条件下,复配菌株与植物乳杆菌 SR 单独培养相比,其产酸速率增加,AI-2 合成能力提高了 1.4 倍,耐酸率(pH=3)增长 4.8 倍,5%耐盐率增加 1.6 倍,亚硝酸盐降解能力没有显著性变化,基本维持在 98%。上述结果说明膜璞毕赤酵母菌 S-0-1 可提高植物乳杆菌 SR 产 AI-2 信号分子的产量,从而增强复配菌株的发酵特性。本研究为深入探究 AI-2/LuxS 群体感应系统在乳酸菌酵母菌混合发酵体系中的相互调控机制提供理论参考。

关键词 酱腌菜; 乳酸菌; 酵母菌; 信号分子 AI-2; 发酵特性

文章编号 1009-7848(2024)03-0065-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.03.007

酱腌菜又称腌渍菜,是以白菜、黄瓜、萝卜、生姜等新鲜蔬菜为原料,经不同的腌渍工艺发酵而成^[1-2]。乳酸菌是其发酵过程中的优势微生物,在发酵过程中主要通过降低酱腌菜的 pH 值,抑制杂菌生长来保证酱腌菜的安全性,并促进产品风味物质的形成^[3]。此外,酵母菌作为另外一种关键微生物,同时存在于酱腌菜发酵过程中,其在酒精合成代谢的同时也产生有机酸、杂醇油、酯类等多种风味物质,对产品风味的形成具有不可替代的作用^[4-7]。有报道证实乳酸菌和酵母菌的混合培养体系对发酵产品的发酵速率、感官特性及风味品质等方面都有显著的促进作用^[8]。探究乳酸菌和酵母菌二者间的互作关系,可在微生物水平上改善酱腌菜的品质和风味特性。

群体感应系统是微生物间进行信息交流的一

种机制^[8-10],通过自体诱导物(Autoinducer, AI)进行种间/种内的信息交流,对微生物特定生理功能和基因表达具有一定的调控作用^[11]。AI-2/LuxS 群体感应系统是由信号分子 AI-2 传导的用于细菌种间信息交流的系统, LuxS 蛋白是催化 AI-2 合成的关键蛋白。其参与调控乳酸菌的多种重要生理功能,包括黏附能力、生物膜的形成、细菌素的合成、风味物质形成等^[12-14]。研究证实 AI-2/LuxS 群体感应系统在乳酸菌和酵母菌共培养体系中也发挥着重要作用,可介导 LuxS 蛋白基因表达水平的变化^[15-16]。燕彩玲等^[17]研究发现毕赤氏酵母菌(*Pichia pastoris*)Y10-2 通过促进植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)5-4-1 信号分子 AI-2 的分泌,增强植物乳杆菌 5-4-1 生物膜的形成能力。酵母菌与乳酸菌为酱腌菜发酵过程中相互影响最紧密的微生物,其混合培养体系中酵母菌对乳酸菌 AI-2 信号分子水平及发酵特性的影响尚不清楚。

本研究从市售酱腌菜中分离筛选高产 AI-2 信号分子的乳酸菌和产香能力较好的酵母菌,用

收稿日期: 2023-03-05

基金项目: 辽宁省教育厅面上项目(JYTMS20231621); 辽宁省锦州市科技指导性计划项目(JZ2022B031)

第一作者: 吕欣然,女,博士,讲师

通信作者: 励建荣 E-mail: lijr6491@163.com

正交试验优化乳酸菌和酵母菌复配菌株的接种量、接种比例、培养温度等发酵条件,比较复配菌株与乳酸菌单独发酵后 AI-2 产量、生长特性、耐酸性、耐盐性、降解亚硝酸盐能力等发酵特性的差异。从 AI-2/LuxS 群体感应角探究酵母菌对高产 AI-2 信号分子乳酸菌发酵特性的影响,为深入探究 AI-2/LuxS 群体感应在乳酸菌酵母菌混合发酵体系中的相互调控机制提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 样品和菌株 农乡乐黄瓜皮(广州钦州)、老坛泡豇豆(四川)、老坛酸菜(四川)、龙城窖坛鱼酸菜(四川)、老坛泡菜(四川)、不差钱酸菜(辽宁)、小缸酸菜(吉林)、老坛泡酸菜(贵州)等10款市售酱腌菜样品均购于京东线上购物平台。哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)BB170 保藏于本院微生物学与分子生物学实验室。

1.1.2 培养基和试剂 MRS 肉汤、固体培养基、马铃薯葡萄糖固体培养基(potato dextrose agar medium, PDA)、酵母浸出粉胨葡萄糖(yeast peptone dextrose, YPD)肉汤培养基,北京奥博星生物技术有限公司;琼脂粉,北京索莱宝科技有限公司;AB 培养基,山东拓普生物工程有限公司。细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒、真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒、PCR 扩增引物、DNA marker-D、Taq PCR Master mix, 上海生工生物工程有限公司;碳酸钙、无水对氨基苯磺酸、乙酸锌、盐酸萘乙二胺、亚铁氰化钾、亚硝酸钠标准溶液、三丁酸甘油酯,上海麦克林生化科技有限公司;氯化钠,国药集团化学试剂有限公司。

1.2 主要仪器和设备

DYY-8C 电泳仪,北京六一生物科技有限公司;ABI stepone plus 聚合酶链式反应仪、5804R 冷冻高速离心机,德国艾本德股份有限公司;GI54DS 立式高压蒸汽灭菌锅,致微(厦门)仪器有限公司;DL-CJ-2N 超级洁净工作台,北京市东联哈尔仪器制造有限公司;Cheimdox XRS 凝胶成像仪, Bio-Rad(美国)公司;Imark 酶标仪,美国 BIO-RAD 公司;BMM-480YS 生物显微镜,上海绘统光学仪器有限公司;UV2550 紫外可见分光光度计,

岛津企业管理(中国)有限公司;IKA Vortex GENIUS 3 振荡器,德国 IKA 公司;Bioscreen C 全自动生长曲线分析仪,上海谓载商贸发展有限公司。

1.3 方法

1.3.1 乳酸菌和酵母菌的分离纯化 参照孙庆申等^[18]方法,将10款市售酱腌菜样品进行均质拍打,按10倍梯度稀释,移取100 μL 适宜梯度稀释液分别涂布于含有1% CaCO₃的MRS固体培养基和YPD琼脂培养基中,然后置于37℃和30℃下培养24~48 h。在MRS固体培养基中筛选溶钙圈明显的菌落进行进一步纯化乳酸菌菌株,在YPD琼脂培养基中挑选形态大小不一的单菌落进行进一步纯化酵母菌菌株。

1.3.2 高产信号分子 AI-2 乳酸菌的筛选 将分离纯化得到的乳酸菌于37℃培养18 h后,经6 000 r/min 离心10 min 后收集上清液,由滤菌器(0.22 μm)过滤,得到乳酸菌的无细胞上清液。按同样方法收集哈维氏弧菌 BB170 无细胞上清液。同时,将哈维氏弧菌 BB170 接种于 AB 液体培养基,摇床培养至 OD_{595nm} 为 0.8 左右,然后以 1:1 000 稀释哈维氏弧菌 BB170,并参照顾悦等^[15]方法检测乳酸菌产生的信号分子 AI-2 荧光强度值。

1.3.3 产香酵母菌的筛选 通过总酯滴定法^[19]对分离纯化的酵母菌进行产香能力的测定。用 0.1 mol/L NaOH 标准溶液滴定酵母菌培养液至酚酞显色后,水浴加热皂化回流,冷却至室温后,用 0.1 mol/L HCl 标准溶液滴定至红色消失,记录滴定消耗 NaOH 和 HCl 的体积。计算菌株培养液中总酯含量,筛选出合成总酯含量较高的酵母菌。

1.3.4 菌株鉴定 形态学鉴定:1) 乳酸菌形态学鉴定:采用革兰氏染色法并在光学显微镜 100 倍油镜下观察菌株形态。2) 酵母菌形态学鉴定^[4]:挑取单个酵母菌菌落用亚甲基蓝染色后光学显微镜 100 倍油镜下观察菌株形态。

生理、生化鉴定:参照《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》^[20]对乳酸菌菌株进行生理、生化鉴定,结合形态学鉴定和生理、生化结果对菌株进行初步鉴定。

分子生物学鉴定:按照细菌、真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒说明分别提取乳酸菌和酵

母菌总 DNA。以 27f: 5'-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3', 1492r: 5'-TACGGYTACCTTTGT-TACGACTT-3' 为乳酸菌扩增引物^[20-21], 以 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 为酵母菌扩增引物^[4]。参照崔天琦等^[21]和李默等^[4]的方法分别进行乳酸菌和酵母菌的 PCR 扩增。获得的扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检验后送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 将所得序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 同源性比对分析, 利用 MEGA6.0 构建出系统发育进化树。

1.3.5 复配菌株的正交试验设计 采用正交试验法, 将乳酸菌与酵母菌按表 1 中的菌株接种比例、接种量和培养温度接种于 10 mL MRS 肉汤中 37 °C 培养 48 h 后, 测定其 pH 值和 OD_{595nm}, 以此为指标确定复配菌株适宜的发酵条件。

表 1 因素水平编码表

水平/因素	酵母菌/乳酸菌	接种量/%	培养温度/°C
1	1:1	2	28
2	2:1	3	33
3	1:3	4	37

1.3.6 复配菌株发酵性能测定 AI-2 产量: 将对数生长期的乳酸菌和酵母菌按 1:1 的比例以 2% (体积分数) 接种于 MRS 肉汤中, 28 °C 培养 24 h 后, 按 1.3.2 节的方法测定复配菌株合成信号分子 AI-2 的能力^[15]。

生长特性: 将对数生长期的乳酸菌和酵母菌按 1:1 的比例以 2% (体积分数) 接种于 MRS 肉汤中, 置于 28 °C 培养 48 h。使用 pH 计和紫外分光光度计每隔 2 h 测定复配菌株培养液的 pH 值和 OD_{595nm} 处吸光值^[22]。

耐酸性: 将对数生长期的乳酸菌和酵母菌按 1:1 的比例以 2% (体积分数) 接种量分别接种于 pH 值为 2.0, 3.0 的 MRS 肉汤中, 于 28 °C 培养 3 h。测定 0 和 3 h 菌株培养液的 OD_{595nm} 吸光值, 按公式(1)计算菌株的耐酸率^[23]。

$$\text{耐酸率}(\%) = \frac{A_1}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

式中: 0 h 吸光值记为 A₀; 3 h 后 pH 2.0 (pH

3.0) 中的吸光值记为 A₁。

耐盐性: 将对数生长期的乳酸菌和酵母菌按 1:1 的比例以 2% (体积分数) 接种到盐的体积分数分别为 3%, 5% 的 MRS 肉汤中, 28 °C 培养 48 h 后, 分别测定 OD_{595nm} 吸光值。按公式(2)计算菌株的耐盐率^[24]。

$$\text{耐盐率}(\%) = \frac{B_1}{B_0} \times 100 \quad (2)$$

式中: 未添加 NaCl 的 MRS 中 OD_{595nm} 吸光值, 记为 B₀; 添加 3% (5%) NaCl 的 MRS 中 OD_{595nm} 吸光值, 记为 B₁。

降解亚硝酸盐能力^[25-26]: 将对数生长期的乳酸菌和酵母菌按 1:1 的比例以 2% (体积分数) 接种于含 125 μg/mL NaNO₂ 的 MRS 肉汤中, 28 °C 培养 24 h 后, 采用 GB/T 5009.33-2016 中的盐酸萘乙二胺法检测亚硝酸盐含量^[25]。

1.4 数据处理

采用 SPSS 21.0 软件的单因素方差分析 (ANOVA) 对数据进行显著性方差分析, 利用 GraphPad Prism 8 软件进行作图。

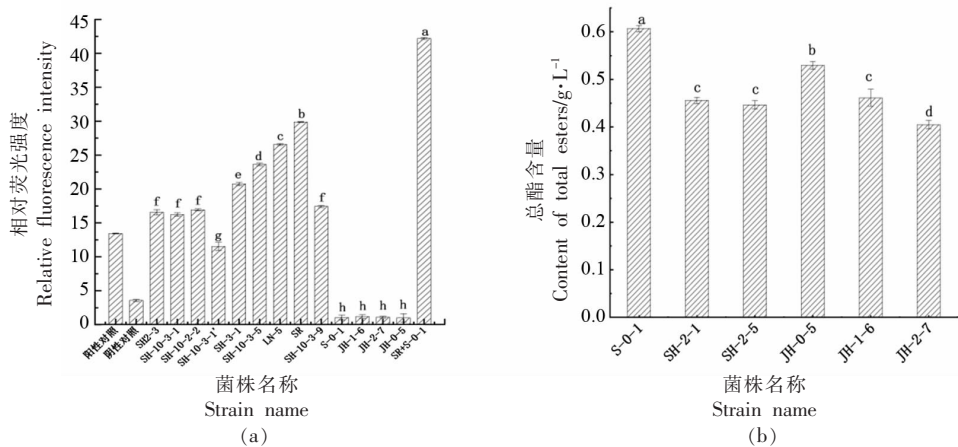
2 结果与讨论

2.1 乳酸菌的分离

利用乳酸菌产酸可使培养基中 CaCO₃ 溶解产生溶钙圈原理, 从 10 个市售酱腌菜样品中共分离出有明显钙溶圈菌株 56 株, 经革兰氏染色阳性和过氧化氢酶阴性初步判定有 35 株为乳酸菌菌株。

2.2 高产信号分子 AI-2 乳酸菌的筛选

哈维氏弧菌 (*V. harveyi*) BB170 是哈维氏弧菌 BB120 的突变菌株, 极少量的信号分子 AI-2 可诱导其荧光酶基因的表达, 从而产生发光反应^[7]。图 1a 显示了不同菌株产信号分子 AI-2 的相对荧光强度, 由此可知, 乳酸菌菌株除菌株 SH-10-3-1 外, 其它菌株产信号分子 AI-2 的相对荧光强度均高于阳性对照 ($P < 0.05$), 说明大部分乳酸菌都具有 AI-2/Lux S 群体感应系统, 但合成信号分子 AI-2 的能力存在显著性差异。其中, 乳酸菌中菌株 SR 产信号分子 AI-2 的相对荧光强度最高, 因此, 选择乳酸菌 SR 为后续试验的研究对象。



注:S-0-1、SH-2-1、SH-2-5、JH-1-6、JH-2-7、JH-0-5为酵母菌;SR+S-0-1为乳酸菌和酵母菌复合发酵,其余菌株均为乳酸菌;图中不同小写字母代表不同菌株之间的显著性分析($P<0.05$)。

图1 不同菌株产信号分子AI-2的相对荧光强度(a)和酵母菌合成总酯的含量(b)

Fig.1 Relative fluorescence intensity of AI-2 signaling molecule produced by the different bacteria(a) and content of total esters synthesized by yeast (b)

2.3 产酯酵母菌的分离筛选

利用YPD琼脂培养基初步分离筛选获得酵母菌菌株16株,通过对其进行产香能力的比较,筛选发现6株酵母菌发酵48h后,产生总酯含量在0.40 g/L以上(图1b)。同时,酵母菌S-0-1和JH-0-5的总酯量可达0.50 g/L以上,其中,酵母菌S-0-1总酯含量最高,为0.60 g/L。因此,选取产酯含量较高的酵母菌S-0-1作为后期复合发酵菌株的供试菌。

2.4 菌株鉴定结果

2.4.1 形态学鉴定结果 乳酸菌SR的镜检结果如图3a所示,菌株为革兰氏阳性、无鞭毛,无芽孢、无菌丝的短杆菌。酵母菌S-0-1镜检如图3b所示,菌株形态为椭圆形、一端或两端芽殖。

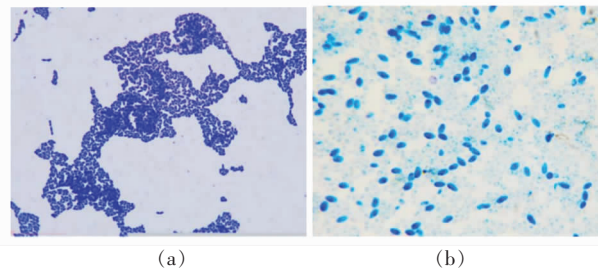


图2 乳酸菌SR(a)和酵母菌S-0-1(b)的形态镜检图(10×100)

Fig.2 Microscopic examination of lactic acid bacteria SR (a) and yeast S-0-1 (b) (10×100)

2.4.2 乳酸菌生理、生化鉴定结果 乳酸菌SR经生化鉴定管反应结果如表2,根据《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》^[20]可初步判定为植物乳杆菌。

表2 乳酸菌SR的生理、生化鉴定结果

Table 2 Physiological and biochemical identification results of strain SR

项目	结果	项目	结果	项目	结果	项目	结果
纤维二糖	+	葡萄糖	+	蔗糖	+	乳糖	+
阿拉伯糖	-	麦芽糖	+	甘露糖	+	鼠李糖	-
葡萄糖酸盐	-	棉籽糖	+	甘露醇	-	密二糖肉汤	-
果糖	+	松三糖肉汤	+	山梨醇	-	半乳糖	-
木糖	+	七叶苷	+				

注:“+”为阳性;“-”为阴性。

2.4.3 菌株16S rDNA鉴定结果 将乳酸菌SR和酵母菌S-0-1分别进行16S rDNA和18S rD-

NA基因扩增,测序结果在NCBI的GenBank数据库中进行比对,构建系统发育树。菌株SR与植物

乳杆菌 (*Lactiplantibacillus plantarum*) 的 16S rDNA 的相似性达 99%(图 3a)。菌株 S-0-1 与膜璞毕赤酵母 (*Pichia membranaceus*) 的同源性最高, 基因序列相似度为 98%(图 3b)。因此, 菌株 SR 被鉴定为植物乳杆菌, 菌株 S-0-1 被鉴定为膜璞毕赤酵母, 此结果与形态学和生理生化鉴定结果相一致。

2.5 菌株复配发酵的正交试验

由表 3 可知, 以 pH 值和 OD_{595nm} 为评价指标, 在菌株接种比例(A)、接种量(B)和培养温度(C)3 个因素中, 对发酵结果影响排序依次为 B>A>C, 即接种量对发酵结果的影响最大, 其次为菌株配比, 然后为培养温度。最终确定菌株复合发酵条件为 A₁B₁C₁, 即接种量为 2%, 接种比例 1:1(SR:S-0-1), 28 °C 培养时效果最佳。

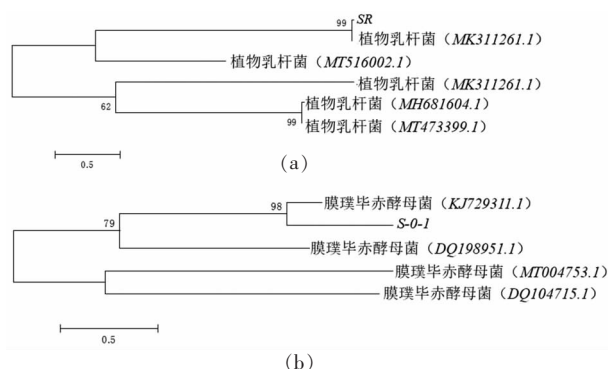


图 3 植物乳杆菌 SR(a)和膜璞毕赤酵母菌 S-0-1(b)的系统发育树图

Fig.3 Phylogenetic trees of *Lactobacillus plantarum* SR (a) and *Pichia membranaceus* S-0-1 (b)

表 3 乳酸菌、酵母菌复合发酵正交表

Table 3 Orthogonal table of compound fermentation of lactic acid bacteria and yeast

试验	酵母菌/乳酸菌(A)	接种量(B)/%	培养温度(C)/°C	指标	
				pH	OD
1	1:1	2	28	3.8167	1.5253
2	1:1	3	33	3.8267	1.8733
3	1:1	4	37	3.8433	1.6763
4	2:1	2	33	3.83	1.633
5	2:1	3	37	3.8533	1.7347
6	2:1	4	28	3.8633	1.578
7	1:3	2	37	3.8400	1.5253
8	1:3	3	28	3.8400	1.8733
9	1:3	4	33	3.8833	1.6763
K ₁	11.4867	11.4867	11.52		
K ₂	11.5466	11.52	11.54		
K ₃	11.5633	11.5899	11.5366		
k ₁	3.8289	3.8167	3.84		
k ₂	3.8489	3.8322	3.8467		
k ₃	3.8544	3.8511	3.8455		
r	0.0255	0.0344	0.0067		
因子主次	B A C				
最优	A ₁ B ₁ C ₁				
K ₁	5.2146	5.1913	5.105		
K ₂	4.9314	5.1154	4.946		
K ₃	4.8627	4.702	4.9457		
k ₁	1.7382	1.7304	1.7017		
k ₂	1.6438	1.7051	1.6487		
k ₃	1.6209	1.5673	16.486		
r	0.1173	0.1631	0.053		
因子主次	B A C				
最优	A ₁ B ₁ C ₁				

2.6 复合菌株合成信号分子 AI-2 的能力

由图 1a 可知, 酵母菌菌株 S-0-1、JH-1-6、JH-2-7、JH-0-5 产信号分子 AI-2 的相对荧光强度均低于阴性对照, 说明这些菌株不能合成 AI-2 信号分子。但植物乳杆菌 SR 和膜璞毕赤酵母菌 S-0-1 复合发酵后的相对荧光强度显著高于植物乳杆菌 SR 单独合成 AI-2 信号分子的产量 ($P < 0.05$), 且提高了 1.4 倍, 说明乳酸菌与酵母菌复配后, 酵母菌提高了乳酸菌合成信号分子 AI-2 的能力。顾悦等^[15]研究发现, 不同酵母菌与乳酸菌组合后会促进或抑制信号分子 AI-2 的分泌, 原因可能是不同酵母菌的代谢产物存在差异, 有些代谢产物能促进乳酸菌 AI-2 信号分子的合成, 但另外一些代谢产物抑制乳酸菌的生长, 从而抑制乳酸菌合成 AI-2 信号分子的能力。本研究中植物乳杆菌 SR 与膜璞毕赤酵母菌 S-0-1 复配后, 酵母菌显著提高了乳酸菌合成 AI-2 信号分子的能力, 可以解释为与膜璞毕赤酵母菌所产生的某些代谢产物更利于 AI-2 信号分子的分泌。

2.7 菌株复配发酵的发酵性能

2.7.1 菌株复配发酵的生长特性 生长曲线可直观反映出植物乳杆菌 SR 单独或与膜璞毕赤酵母 S-0-1 复配后生长规律的差异性。由图 4 可知, 在 0~16 h 植物乳杆菌 SR 单独或与膜璞毕赤酵母 S-0-1 复配后的 OD 值均处于对数生长期, 16 h 后进入稳定期, 32 h 后进入衰退期, 且两组最终 OD 值差异不明显 ($P > 0.05$)。说明植物乳杆菌 SR 与膜璞毕赤酵母 S-0-1 复配后生长状态正常。范维

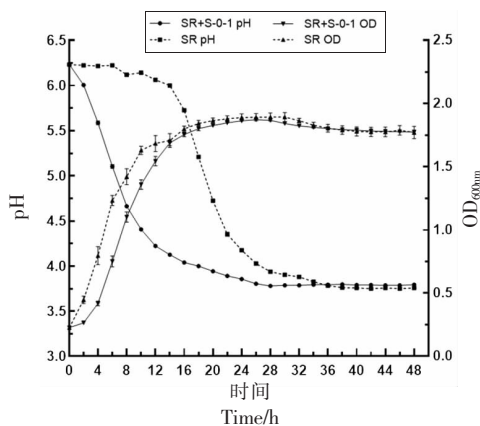


图 4 菌株复配发酵的生长曲线

Fig.4 The growth curve of the compound strains fermentation performance

等^[16]研究发现, 在乳酸菌发酵牛乳的过程中添加马克思克鲁维酵母 (*Kluyveromyces marxianus*) 能够与乳酸菌共同生长。

2.7.2 菌株复配发酵的产酸能力 pH 值是发酵过程中表征菌株生长速度和代谢产物的积累速度的重要参数之一, 它影响着乳酸菌的抑菌性、降解亚硝酸盐和改善产品风味的能力。因此, 产酸能力是判断菌株发酵性能的重要指标^[27-29]。

在 0~28 h 植物乳杆菌 SR 单独与膜璞毕赤酵母 S-0-1 复配后的产酸曲线均呈下降趋势, 在 28~36 h 逐步进入平缓稳定期, pH 值基本都稳定在 3.7 左右。在 0~14 h 时, 植物乳杆菌 SR 单独培养的 pH 值均高于复配组的 pH 值, 且其产酸曲线下降趋势缓慢, 说明菌株复配后产酸速率增加。因此, 在产品发酵过程中可使用乳酸菌和酵母菌复配发酵剂来加速产品发酵速率。此外, 从产酸曲线和生长曲线可以看出, 植物乳杆菌 SR 单独培养或与膜璞毕赤酵母 S-0-1 复配后的产酸速率和生长速率均具有相关性。

2.7.3 菌株复合发酵的耐酸、耐盐、降解亚硝酸盐性能 耐酸性是衡量菌株是否可以工业化应用的重要评价指标, 只有耐酸能力强的菌株才更易适应腌渍菜的发酵环境^[28]。由表 4 可知, 在 pH=3 的 MRS 培养基中, 植物乳杆菌 SR 的耐酸率为 15.36%, 植物乳杆菌 SR 和膜璞毕赤酵母 S-0-1 复配发酵的耐酸率为 74.5%, 提高了 4.8 倍。同时, 在 pH=2 下 MRS 培养基中, 复配菌株的耐酸性提高了 1 倍。说明与植物乳杆菌 SR 单独发酵相比, 植物乳杆菌 SR 与膜璞毕赤酵母 S-0-1 复配发酵后对酸的耐受能力上有显著性提高 ($P < 0.05$)。Moslehi-Jenabian 等^[30]研究发现, AI-2 活性增强可显著的提高嗜酸乳酸杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) NCFM 耐酸能力, pH 值为 5.0, 4.0 和 3.0 的酸性冲击下, 与 pH 值为 6.5 相比, 分别增加了 2, 2.5 和 4.5 倍。本研究发现与其研究结果相似, 表明膜璞毕赤酵母 S-0-1 能够通过提高植物乳杆菌 SR 分泌 AI-2 的产量来应对酸胁迫环境, 从而增强菌株的耐酸能力。

盐对于酱腌菜的制作至关重要, 主要以防腐、增香、保脆和脱水作用为主^[31]。但高浓度盐的胁迫会造成微生物细胞结构损伤甚至死亡^[20]。因此, 菌

株在高浓度盐下生存、生长和代谢的能力是判断其是否能够良好应用在酱腌菜等发酵食品中的重要评价指标。由表4可知,在3%和5%盐浓度下,复配菌株与植物乳杆菌 SR 单独培养相比,其耐盐率提高了1.2和1.6倍。吴哲铭^[32]研究发现,外源添加信号分子 AI-2 可提高嗜盐四联球菌 (*Tetragenococcus halophilus*) MJ4 耐盐相关的热休克蛋白 clpB、DnaK、buA 的表达水平。因此,说明膜璞毕赤酵母 S-0-1 与植物乳杆菌 SR 复配后,增加了 AI-2 信号分子的产量,从而进一步增强了菌

株的耐盐能力。

亚硝酸盐含量是酱腌菜加工贮藏过程中不可忽视的一个重要安全性评价指标^[29]。因此,菌株的亚硝酸盐降解能力是评价菌株是否适用于发酵酱腌菜的重要指标。由表4可知,植物乳杆菌 SR 单独培养和与膜璞毕赤酵母菌 S-0-1 复配发酵后,其对亚硝酸盐的降解能力没有明显差异,亚硝酸盐降解率均在97.61%左右。因此,说明 AI-2 产量与菌株亚硝酸盐降解能力之间没有直接调控关系。

表4 单菌株与复合菌株的耐酸、耐盐、降解亚硝酸盐性能

Table 4 Acid resistant, salt resistant, and degrading nitrite properties of single and compound strains

菌株	亚硝酸盐降解率/%	耐酸率/%		耐盐率/%	
		pH=2	pH=3	3%	5%
SR	97.63 ± 0.02	11.04 ± 0.01	15.36 ± 0.02	84.38 ± 0.02	44.52 ± 0.02
SR+S-0-1	97.61 ± 0.02	23.25 ± 0.02	74.50 ± 0.01	98.47 ± 0.01	69.18 ± 0.02

3 结论

本研究利用哈维氏弧菌 (*V. harveyi*) BB170 菌株报告法从市售酱腌菜来源的35株乳酸菌中,筛选到1株高产信号分子 AI-2 的植物乳杆菌 SR。同时,筛选获得一株产酯含量达0.6 g/L 的膜璞毕赤酵母菌 S-0-1。通过正交试验确定乳酸菌和酵母菌复配适宜发酵条件为:接种量2%,接种比例1:1(SR:S-0-1),培养温度28℃。在最佳复配发酵条件下,复配菌株与植物乳杆菌 SR 单独培养相比,其产酸速率增加,AI-2 合成能力提高了1.4倍,耐酸率(pH=3)增长了4.8倍,5%耐盐率增加了1.6倍。综上所述,膜璞毕赤酵母菌 S-0-1 的添加提高了植物乳杆菌 SR 合成信号分子 AI-2 的能力,从而增强了复合菌株的产酸速率、耐酸性及耐盐等能力。本研究为深入探究酱腌菜中乳酸菌和酵母菌混合发酵体系中 AI-2/LuxS 群体感应调控机制提供了理论基础。

参 考 文 献

[1] 鄯晋晓. 四川泡菜菌系分离、筛选及发酵剂的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2008.
SHAN J X. Study on the microbial flora in Sichuan sauerkraut and starter culture of sauerkraut [D]. Chongqing: Southwest University, 2008.

[2] 贺蓓蓓, 彭晓顺, 杨逸飞, 等. 乳酸菌发酵酸菜研究进展[J]. 绿色科技, 2021, 23(20): 257-260, 265.
HE B B, PENG X S, YANG Y F, et al. Research progress of sauerkraut fermented by lactic acid bacteria[J]. Journal of Green Science and Technology, 2021, 23(20): 257-260, 265.

[3] LIU W L, ZHANG L W, SHI J, et al. Assessment of the safety and applications of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* Y31 as an adjunct culture in North-eastern Chinese traditional fermentation paocai [J]. Food Control, 2015, 50: 637-644.

[4] 李默, 曹凯欣, 任广钰, 等. 自然发酵锦州小菜中优良酵母菌的筛选及鉴定[J]. 中国食品学报, 2021, 21(4): 277-285.
LI M, CAO K X, REN G Y, et al. Screening and identification of excellent yeast in Jinzhou dishes[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(4): 277-285.

[5] 郑慧纹, 闫茹, 徐琳琳, 等. 东北酸菜发酵酵母菌冻干保护剂的优化研究[J]. 中国酿造, 2020, 39(3): 136-140.
ZHENG H W, YAN R, XU L L, et al. Optimization of lyophilized protectants for fermented yeast[J]. Chinese Brewing, 2020, 39(3): 136-140.

[6] FREIRE A L, RAMOS C L, SOUZA P N D C, et al. Nondairy beverage produced by controlled fer-

- mentation with potential probiotic starter cultures of lactic acid bacteria and yeast[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 248: 39–46.
- [7] 蔡针华, 程娜, 贾震虎, 等. 群体感应信号分子 AI-2 高产乳酸菌株筛选及特性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(1): 66–71.
- CAI Z H, CHENG N, JIA Z H, et al. Screening and characterization of quorum sensing signal molecule AI-2[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2018, 44(1): 66–71.
- [8] DE MELO PEREIRA G V, BEUX M, PAGNON-CELLI M G B, et al. Isolation, selection and evaluation of antagonistic yeasts and lactic acid bacteria against ochratoxigenic fungus *Aspergillus westerdijkiae* on coffee beans[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2016, 62(1): 96–101.
- [9] TERESA R D K, BARBARA H L. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships[J]. *Infection and Immunity*, 2000, 68(9): 4839–4849.
- [10] QIAN Y L, LI Y, XU T T, et al. Dissecting of the AI-2/LuxS mediated growth characteristics and bacteriostatic ability of *Lactiplantibacillus plantarum* SS-128 by integration of transcriptomics and metabolomics[J]. *Foods*, 2022, 11(5): 638–638.
- [11] 张腾. 植物乳杆菌 HE-1 在共培养中产抑菌物质与 LuxS/AI-2 群体感应现象关系的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2014.
- ZHANG T. Study on the relationship between antimicrobial production and Lux S/AI-2 quorum sensing phenomenon of HE-1 in co-culture[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2014.
- [12] 程爽, 臧晋, 王崎鏊, 等. 河南浙川酸菜中乳酸菌的分离鉴定及其益生特性初探[J]. *中国调味品*, 2022, 47(2): 60–63, 68.
- CHENG S, ZANG J, WANG Q K, et al. Isolation and identification of *Lactobacillus* and its probiotic characteristics in Xichuan pickled cabbage, Henan province[J]. *Chinese Condiments*, 2022, 47(2): 60–63, 68.
- [13] NOVAK E A, SHAO H J, DAEP C A, et al. Autoinducer-2 and QseC control biofilm formation and *in vivo* virulence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [J]. *Infection and Immunity*, 2010, 78(7): 2919–2926.
- [14] 吴荣. 信号分子 AI-2 对乳酸菌生物膜形成的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.
- WU R. Effect of the signaling molecule AI-2 on *Lactobacillus* biofilm formation[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2018.
- [15] 顾悦, 田建军, 刘敏敏, 等. 酵母菌对乳酸菌发酵特性及信号分子 AI-2 活性的影响[J]. *生物加工过程*, 2019, 17(3): 316–323.
- GU Y, TIAN J J, LIU M M, et al. Effects of yeast on the fermentation characteristics of lactic acid bacteria and the activity of the signaling molecule AI-2[J]. *Bioprocessing Process*, 2019, 17(3): 316–323.
- [16] 范维, 李路, 姜铁民, 等. PCRDGGE 技术分析混菌发酵乳中马克斯克鲁维酵母与乳酸菌的相互作用[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(11): 147–152.
- FAN W, LI L, JIANG T M, et al. PCRDGGE analysis of the interaction between Max and *Lactobacillus* in mixed fermented milk[J]. *Food Industry Technology*, 2015, 36(11): 147–152.
- [17] 燕彩玲, 李博, 顾悦, 等. 信号分子 AI-2 的检测方法研究进展[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(6): 1333–1338.
- YAN C L, LI B, GU Y, et al. Progress in the detection method of the signaling molecule AI-2[J]. *Microbiology Bulletin*, 2016, 43(6): 1333–1338.
- [18] 孙庆申, 王钰涵, 韩德权, 等. 酸菜中具有抑菌活性的乳酸菌的分离鉴定及其产细菌素特性[J]. *食品科学技术学报*, 2022, 40(4): 64–73.
- SUN Q S, WANG Y H, HAN D Q, et al. Isolation and identification of bacteriostatic *Lactobacillus* species in sauerkraut and their bacteriocin-producing properties[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2022, 40(4): 64–73.
- [19] 钟姝霞, 万世旅, 边名鸿, 等. 一株高产乙酸乙酯酵母的鉴定及产酯条件的研究[J]. *中国酿造*, 2017, 36(2): 75–79.
- ZHONG S X, WAN S L, BIAN M H, et al. Identification of a high-yield ethyl acetate yeast strain and studying the ester production conditions[J]. *China Brewing*, 2017, 36(2): 75–79.
- [20] 凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 130–133.
- LING D W, DONG X Z. Classification and identification of lactic acid bacteria and experimental methods[M]. Beijing: China Light Industry Press, 1999: 130–133.
- [21] 崔天琦, 吕欣然, 孙梦桐, 等. 降解嗜水气单胞菌

- 群体感应 AHLs 信号分子的乳酸菌筛选及淬灭作用[J]. 中国食品学报, 2020, 20(9): 19-29.
- CUI T Q, LV X R, SUN M T, et al. Screening and quenching of *Lactobacillus* bacteria for degrading the quorum-sensing AHLs signal molecules of *Aeromonas hydrophila*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(9): 19-29.
- [22] XIAO Y S, HUANG T, HUANG C L, et al. The microbial communities and flavour compounds of Jiangxi yancai, Sichuan paocai and Dongbei suancai: Three major types of traditional Chinese fermented vegetables[J]. LWT, 2020, 121: 108865-108865.
- [23] 王祎然, 韦明明, 张涵, 等. 酸汤中乳酸菌的鉴定及其耐酸、耐胆盐和抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2020, 41(16): 121-126, 139.
- WANG Y R, WEI M M, ZHANG H, et al. Identification of *Lactobacillus* in acid soup and its acid resistance, bile salt resistance and antioxidant activities[J]. Food Industry Technology, 2020, 41(16): 121-126, 139.
- [24] 孙熙洽, 崔承弼, 齐仕博, 等. 低盐泡菜中耐酸性乳酸菌的筛选、鉴定及特性研究[J]. 食品与机械, 2022, 38(1): 24-31, 37.
- SUN X H, CUI C B, QI S B, et al. Screening, identification and characterization of acid-resistant lactic acid bacteria in low-salt kimchi[J]. Food and Machinery, 2022, 38(1): 24-31, 37.
- [25] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定: GB 5009.33-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- National Health and Family Planning Commission of the PRC, State Food and Drug Administration. Determination of nitrite and nitrate in the food safety national standard of food products: GB 5009.33-2016[S]. Beijing: China Standards Press, 2016.
- [26] CHEN Y Q, WU C L, XU W Y, et al. Evaluation of degradation capability of nitrite and biogenic amines of lactic acid bacteria isolated from pickles and potential in sausage fermentation[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2021, 46(1): e16141.
- [27] 徐云凤, 张欣, 褚泽军, 等. 一株具有高效抑菌活性乳酸菌的分离鉴定及生长特性研究[J]. 食品与机械, 2021, 37(3): 12-14, 21.
- XU Y F, ZHANG X, CHU Z J, et al. Isolation and growth characteristics of a strain with high antibacterial activity[J]. Food and Machinery, 2021, 37(3): 12-14, 21.
- [28] 赵明阳. 泡菜发酵优良菌株筛选及细菌组成、风味特性研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2020.
- ZHAO M Y. Screening of excellent fermented strains and bacterial composition and flavor characteristics [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2020.
- [29] 李凤姿. 接种乳酸杆菌及盐对东北酸菜发酵效果的影响研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2019.
- LI F Z. Effects of *Lactobacillus* and salt on fermentation effect of Northeast sauerkraut [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2019.
- [30] MOSLEHI-JENABIAN S, GORI K, JESPERSEN L. AI-2 signalling is induced by acidic shock in probiotic strains of *Lactobacillus* spp.[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 135(3): 295-302.
- [31] 林松洋, 郝利民, 刘鑫, 等. 乳酸菌耐盐分子机制研究进展[J]. 食品科学, 2018, 39(3): 295-301.
- LIN S Y, HAO L M, LIU X, et al. Progress in the molecular mechanism of salt resistance in lactic acid bacteria[J]. Food Science, 2018, 39(3): 295-301.
- [32] 吴哲铭. 基于 luxS/AI-2 群体感应系统对鱼露发酵过程中增香降胺调控机理的研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2020.
- WU Z M. Study on the regulation mechanism of increasing enhancement and reducing amine reduction during fish dew fermentation based on luxS / AI-2 quorum sensing system[D]. Hangzhou: Zhejiang Technology and Business University, 2020.

Effect of Yeasts on Fermentation Characteristics of Lactic Acid Bacteria with High Production of AI-2 in Pickled Vegetables

Lü Xinran¹, Tong Xinyao¹, Gu Nani¹, Li Jianrong^{1,2*}, Bai Fengling¹, Tan Xiqian¹,

Cui Fangchao¹, Yu Zhangfu³, Shen Ronghu³

¹National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, Food Safety Key Lab of Liaoning Province, Bohai University, Jinzhou 121013, Liaoning

²Dalian Polytechnic University Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian 116034, Liaoning

³Hangzhou Xiaoshan Agriculture Development Co., Ltd., Hangzhou 311215)

Abstract Lactic acid bacteria (LAB) and yeasts are the dominant microorganisms in the fermentation process of pickled vegetables, and their relationship and fermentation characteristics are important factors affecting the quality of products. In the study, high-yield AI-2 LAB and aroma-producing yeasts were screened from commercial pickled vegetable using *Vibrio harveyi* BB170 report method and total ester titration method. The mixed fermentation conditions of LAB and yeast were further optimized by orthogonal test. The differences in AI-2 production, acid production rate, acid resistance, salt tolerance, and nitrite degradation between the mixed strains and LAB alone fermentation were compared. Effect of yeasts on the fermentation characteristics of LAB with high production AI-2 was explored. These results showed that *Lactobacillus plantarum* SR with high yield of AI-2 and *Pichia membranaceus* S-0-1 with ester content of 0.6 g/L were obtained. The mixed fermentation conditions were as follows: inoculation amount 2%, inoculation ratio 1:1 (SR:S-0-1), culture temperature 28 °C. Under optimized fermentation conditions, compared with *L. plantarum* SR alone fermentation, the AI-2 synthesis ability, acid tolerance rate (pH = 3) and the salt tolerance rate at 5% of the mixed strains was increased by 1.4 times, 4.8 times and 24.66%, respectively. Meanwhile, the acid production rate of the mixed strains was increased. but there was no significant change in the degradation rate of nitrite of the mixed strains, which basically maintained at 98%. The above results indicated that *Pichia membranaceus* S-0-1 could increase the yield of AI-2 signal molecules in *L. plantarum* SR, result in enhancing the fermentation characteristics of the LAB and yeasts. This study aimed to provide a theoretical basis for further exploring the mutual regulation mechanism of AI-2 / LuxS quorum sensing in mixed fermentation system of LAB and yeasts.

Keywords pickled vegetable; lactic acid bacteria; yeast; signal molecules AI-2; fermentation characteristic