

酱油渣中副干酪乳杆菌的分离鉴定及抗氧化特性研究

Isolation, identification and antioxidant properties of
Lactobacillus paracasei from soy sauce residue

唐素婷^{1,2,3,4} 区锡敏^{1,2,3,4} 黄桂东^{1,2,3,4} 程云辉⁵ 蔡逸夫^{1,2,3,4}

TANG Su-ting^{1,2,3,4} OU Xi-min^{1,2,3,4} HUANG Gui-dong^{1,2,3,4} CHENG Yun-hui⁵ CAI Yi-fu^{1,2,3,4}

杨晓萍^{1,2,3,4} 银波⁵ 张灿⁶ 钟先锋^{1,2,3,4}

YANG Xiao-ping^{1,2,3,4} YIN Bo⁵ ZHANG Can⁶ ZHONG Xian-feng^{1,2,3,4}

(1. 佛山科学技术学院食品科学与工程学院, 广东 佛山 528231; 2. 广东省传统发酵食品工程技术研究中心, 广东 佛山 528231; 3. 广东省食品流通安全控制工程技术研究中心, 广东 佛山 528231; 4. 佛山农业生物制造工程技术研究中心, 广东 佛山 528231; 5. 长沙理工大学化学与食品工程学院, 湖南 长沙 410114; 6. 开平市佰益饲料科技发展有限公司, 广东 江门 529300)
(1. College of Food Science and Engineering, Foshan University, Foshan, Guangdong 528231, China; 2. Guangdong Engineering Research Center for Traditional Fermentational Food, Foshan, Guangdong 528231, China; 3. Guangdong Engineering Research Center for Safety Control of Food Circulation, Foshan, Guangdong 528231, China; 4. Foshan Engineering Research Center for Agricultural Biological Manufacturing, Foshan, Guangdong 528231, China; 5. School of Chemistry and Food Engineering, Changsha University of Science and Technology, Changsha, Hunan 410114, China; 6. Kaiping Baiyi Feed Science and Technology Development Co., Ltd., Jiangmen, Guangdong 529300, China)

摘要:利用传统微生物培养法从酱油渣中分离得到 10 株副干酪乳杆菌, 其中 8 株为 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, 称为 HT31、HT51、HT90、HT111、HT125、HT159、HT253 和 HT256; 2 株为 *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans*, 称为 HT155 和 HT158。通过形态学观察、生理生化特征试验及 16S rRNA 基因序列分析方法对其进行鉴定, 并研究其对人工胃肠液耐受能力、疏水能力及抗氧化能力。模拟胃肠液耐受试验结果表明: 耐受胃液 3 h 后, 菌株 HT31、HT111、HT155 菌株存活率分别为 (86.33±1.24)%、(31.37±0.50)%、(57.43±1.56)%; 在模拟肠液中培养 8 h 后, 菌株 HT31、HT111、

HT155 菌株存活率分别为 (60.22±0.16)%、(62.18±0.70)%、(52.84±0.00)%。疏水性试验结果表明: 菌株 HT31、HT111、HT155 疏水率分别为 (18.52±0.76)%、(26.51±0.66)%、(25.41±0.58)%。抗氧化试验结果表明: 菌株 HT31 细胞悬浮液 DPPH 清除率为 (26.25±0.01)%、其无细胞提取物 DPPH 清除率为 (16.03±0.03)%; 菌株 HT31 细胞悬浮液羟基自由基清除率为 (42.88±0.21)%、其无细胞提取物羟基自由基清除率为 (27.74±0.01)%、表明菌株 HT31 具有较好的模拟胃肠液耐受能力、疏水能力及抗氧化能力。

关键词:酱油渣; 乳酸菌; 人工胃肠液耐受能力; 疏水能力; 抗氧化能力

基金项目:“十三五”国家重点研发计划项目(编号: 2018YFD0400405); 国家自然科学基金项目(编号: 31660459); 广东省自然科学基金项目(编号: 2018A0303130275)

作者简介:唐素婷, 女, 佛山科学技术学院初级工程师, 硕士。

通信作者:钟先锋(1981—), 男, 佛山科学技术学院教授, 硕士生导师, 博士。E-mail: zhongxf81@126.com

收稿日期:2019-06-05

Abstract: *Lactobacillus paracasei* were isolated from soy sauce residue by traditional microbial culture method, and identified by morphological observation, physiological and biochemical characteristics test, and 16S rRNA gene sequence analysis. Their tolerance to artificial gastrointestinal juice, hydrophobic capacity, and antioxidant capacity were also studied. Ten strains of *Lactobacillus paracasei* were isolated from soy sauce residue, of

which eight were *L. paracasei* subsp. *paracasei*, named HT31, HT51, HT90, HT111, HT125, HT159, HT253, and HT256; two of them were *L. paracasei* subsp. *tolerans*, named HT155 and HT158. The results of simulated gastrointestinal fluid tolerance test showed that the viability of strains HT31, HT111 and HT155 reached $(86.33 \pm 1.24)\%$, $(31.37 \pm 0.50)\%$, $(57.43 \pm 1.56)\%$. After 8 hours of culture in simulated gastrointestinal fluid, the viability of strains HT31, HT111 and HT155 reached $(60.22 \pm 0.16)\%$, $(62.18 \pm 0.70)\%$, and $(52.84 \pm 0.56)\%$, respectively. The results of hydrophobicity test showed that the hydrophobicity of strains HT31, HT111 and HT155 reached $(18.52 \pm 0.76)\%$, $(26.51 \pm 0.66)\%$, and $(25.41 \pm 0.58)\%$. The results of antioxidant test showed that the DPPH scavenging rate of cell suspension of strain HT31 was $(26.25 \pm 0.01)\%$, and its DPPH scavenging rate of cell-free extract was $(16.03 \pm 0.03)\%$. The hydroxyl radical scavenging rate of cell-free extract of strain HT31 was $(42.88 \pm 0.21)\%$, and its hydroxyl radical scavenging rate of cell-free extract was $(27.74 \pm 0.01)\%$. The result showed that strain HT31 had good capacity of tolerance to simulated gastrointestinal juice, hydrophobic and antioxidant.

Keywords: soy sauce residue; *Lactobacillus paracasei*; artificial gastrointestinal fluid tolerance; hydrophobic capacity; antioxidant capacity

酱油渣是酱油发酵结束后,经淋油或抽油产生的固体残渣^[1]。2017 年中国酱油产量接近 860 万 t^[2],按照每生产 1 kg 酱油产出 0.67 kg 酱油渣比例进行计算,中国酱油渣年产量高达 600 万 t。酱油渣富含粗蛋白^[3]、粗脂肪^[4]等物质,是理想的非常规蛋白饲料^[5]。但酱油渣用作饲料,存在含盐量较高、适口性较差及不易贮存等缺点^[6-7],在一定程度上限制了酱油渣的应用。接种特定微生物,再次发酵酱油渣,改善其理化性质及营养品质,可解决上述问题^[8-9]。

酱油发酵是一个多种微生物参与的过程,乳酸菌是其发酵过程中的主要细菌。不同发酵阶段酱醪中乳酸菌群的组成不同,主要包括嗜盐四联球菌属^[10-11]、乳杆菌属、乳酸乳球菌、片球菌属、魏斯氏菌属等^[12-13]。乳杆菌是目前应用最多的益生菌,其中干酪乳杆菌及植物乳杆菌被公认为是经典的益生菌^[14]。近年来,从干酪乳杆菌中划分出来的副干酪乳杆菌受到较多关注。Jahreis 等^[15]研究发现, LTH2579 能显著提高机体粒细胞吞噬率及氧化型低密度脂蛋白抗体水平; 田丹^[16]研究发现, X12 产生的肽聚糖具有诱导肿瘤细胞的免疫原性死亡的功能; Gardiner 等^[17]研究表明,副干酪乳杆菌发酵干酪,可增加干酪产品中游离氨基酸的数量,提高产品质量。目前对于酱油发酵过程乳酸菌资源的研究中,尚未见酱油渣中副干酪乳杆菌的相关研究报道。

试验拟采用传统微生物培养方法从酱油渣中分离、

纯化乳杆菌,利用生理生化特征试验及分子生物学方法进行鉴定,并测定其对模拟人工胃液、肠液的耐受性,疏水性及抗氧化性能,以期筛选得到益生特性良好的副干酪乳杆菌,为其再次应用于酱油渣发酵或饲料生产等方面提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

酱油渣:原料主要为大豆与小麦粉,采用高盐稀态工艺酿造,广东省某调味食品有限公司;

革兰氏染色试剂盒、过氧化氢生化鉴定管、吡啶生化鉴定管、硫化氢生化鉴定管、明胶生化鉴定管、硝酸盐(还原)生化鉴定管、MRS 肉汤等:广东环凯微生物科技有限公司。

1.1.2 仪器与设备

全自动灭菌锅:GR60DA 型,致微(厦门)仪器有限公司;

显微镜:PH100 型,凤凰光学集团有限公司;

电子分析天平:ME104 型,梅特勒-托利多精密仪器有限公司;

冷冻霜冰箱:BCD-189WDPV 型,海尔股份有限公司;

恒温培养箱:LRH-150 型,上海一恒科学仪器有限公司;

超净工作台:SW-CJ-1FD 型,苏州安泰空气技术有限公司;

微孔板分光光度计酶标仪:Epoch2 型,美国伯腾仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 酱油渣中乳酸菌的分离纯化 根据文献^[18-20]修改如下:无菌条件下,称取酱油渣 25 g 溶解于 225 g 无菌磷酸盐缓冲溶液中,制成 10^{-1} , 10^{-2} , ..., 10^{-7} 共 7 个浓度稀释液。吸取稀释液 0.1 mL,涂布于 MRS 固体培养基,37 °C 倒置培养 24~48 h。挑取菌落反复划线至菌落一致。挑取单菌落于 MRS 肉汤中 37 °C 培养 12 h,与体积分数 50% 甘油按 1:1 (体积比)混合, -20 °C 保藏备用。划线于 MRS 固体斜面培养基, 37 °C 培养至长出菌落, 4 °C 保藏备用。

1.2.2 酱油渣中乳酸菌的鉴定

(1) 形态学观察:根据文献^[21]修改如下,菌株划线于固体培养基中,37 °C 培养 48 h,观察菌株的菌落形态。进行革兰氏染色试验,显微镜下观察菌株的菌体形态。革兰氏阳性菌株进行过氧化氢酶接触试验,有气泡产生为阳性反应,无气泡产生为阴性。

(2) 生理生化试验:参照《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》^[22],具体试验操作参考生化鉴定管的说明书。

(3) 分子生物学鉴定:将革兰氏呈阳性、过氧化氢酶接触试验呈阴性菌株送至华大基因进行 16S rRNA 基因序列测序。

(4) 系统发育树的构建:根据文献[23-24]进行修改,根据菌株的测序序列信息,登陆 GenBank 中 BLAST 程序(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)比对,在 EzBioCloud 数据库查询模式菌株信息,利用 Mega 5.0 软件,采用邻近算法,bootstrap 为 1 000 构建系统发育树。

1.2.3 副干酪乳杆菌模拟胃液耐受性测定 根据文献[25]修改如下:菌株活化 3 代,调节菌液 $OD_{600\text{ nm}} = 1.00 \pm 0.05$,吸取 3 mL 菌液,4 000 r/min 离心 10 min,去上清液,将菌体悬浮于 3 mL 灭菌生理盐水制成菌悬浮液。无菌离心管中加入人工胃液 9 mL、菌悬浮液 1 mL,混合均匀。37 °C 培养,分别在 0(稀释度为 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}),3 h(稀释度为 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5})取样 0.1 mL,使用平板计数法计算菌株存活率。设置 3 个平行,按式(1)计算菌株存活率。

$$S_1 = \frac{A_1}{A_0} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

S_1 ——菌株存活率,%;

A_0 ——耐受人工胃液 0 h 的活菌数,CFU/mL;

A_1 ——耐受人工胃液 3 h 的活菌数,CFU/mL。

1.2.4 副干酪乳杆菌模拟肠液耐受性测定 根据文献[25]修改如下:取人工胃液消化 3 h 的菌株培养液 1 mL,接种于 9 mL 人工肠液中,37 °C 培养 0(稀释度 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}),4(稀释度 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}),8 h(稀释度 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}),使用平板计数法计算菌株存活率。设置 3 个平行,按式(2)计算菌株存活率。

$$S_2 = \frac{A_s}{A_0} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

S_2 ——菌株存活率,%;

A_0 ——人工肠液耐受 0 h 的活菌数,CFU/mL;

A_s ——人工肠液耐受 4,8 h 的活菌数,CFU/mL。

1.2.5 副干酪乳杆菌表面疏水性测定 根据文献[25]修改如下:菌株活化 3 代,调节菌液 $OD_{600\text{ nm}} = 1.00 \pm 0.05$,接种量为 2%(体积分数),37 °C 培养 12 h。菌液 5 000 r/min 离心 5 min,磷酸盐溶液洗涤 2~3 次,重悬。测定菌株 $OD_{600\text{ nm}}$ 。吸取上述菌悬浮液 3 mL,加入二甲苯 1 mL,室温培养 15 min,震荡使其混合,室温静置 1 h,吸取下层水相,以磷酸盐缓冲液为空白对照,测定 $OD_{600\text{ nm}}$,按式(3)计算菌株疏水率。

$$S_3 = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

S_3 ——菌株疏水率,%;

A_0 ——菌液与二甲苯混匀前菌液的 $OD_{600\text{ nm}}$ 值;

A ——菌液与二甲苯混匀后菌液的 $OD_{600\text{ nm}}$ 值。

1.2.6 副干酪乳杆菌抗氧化能力测定

(1) 副干酪乳杆菌培养及无细胞提取物的制备:根据文献[26-27]修改如下,挑取人工胃肠液耐受性及疏水性良好的菌株进行抗氧化试验。菌株活化 3 代,接种量 2%(体积分数),37 °C 培养 1 d。4 °C 下 4 000 r/min 离心 20 min,去上清收菌体。用磷酸盐缓冲液洗涤菌体 3 次,重悬,调整 $OD_{600\text{ nm}} = 1.00 \pm 0.05$ 。菌悬液分为制备乳酸菌无细胞提取物(CFE)和菌体细胞(IC)两组。菌悬液冰浴下超声破碎 12 min,每工作 9 s,停歇 12 s,4 °C 下 9 500 r/min 离心 15 min,上清液即为无细胞提取物。将菌体细胞和无细胞提取物于 4 °C 保存备用。

(2) 副干酪乳杆菌清除 DPPH 能力测定:根据文献[26]修改如下,分别取 2 mL 菌体悬浮液(无细胞提取物)、DPPH 溶液(0.2 mmol/L),室温下避光反应 0.5 h,测定 $OD_{517\text{ nm}}$,空白为无水乙醇。按式(4)计算菌株 DPPH 清除率。

$$S_4 = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100\%, \quad (4)$$

式中:

S_4 ——菌株 DPPH 清除率,%;

A_i ——2 mL DPPH+2 mL 样品的 $OD_{517\text{ nm}}$;

A_j ——2 mL 无水乙醇+2 mL 样品的 $OD_{517\text{ nm}}$;

A_0 ——2 mL DPPH+2 mL 无水乙醇的 $OD_{517\text{ nm}}$ 。

(3) 副干酪乳杆菌清除羟基自由基能力测定:根据文献[26]修改如下,分别取 2 mL 邻菲罗啉(2.5 mmol/L)、磷酸盐缓冲溶液(pH 7.4,0.02 mol/L)、蒸馏水,混匀。分别加入 2 mL 硫酸亚铁溶液(2.5 mmol/L)、 H_2O_2 (20 mmol/L)溶液,混匀,37 °C 水浴 90 min。4 °C 下 5 000 r/min 离心 6 min,测定 $OD_{536\text{ nm}}$,空白为磷酸盐缓冲溶液。按式(5)计算羟基自由基清除率。

$$S_5 = \frac{A_j - A_0}{A_i - A_0} \times 100\%, \quad (5)$$

式中:

S_5 ——羟基自由基清除率,%;

A_i ——2 mL 蒸馏水代替 2 mL H_2O_2 的 $OD_{536\text{ nm}}$;

A_j ——用 2 mL 细胞悬浮液或无细胞提取物代替 2 mL 蒸馏水的 $OD_{536\text{ nm}}$;

A_0 ——磷酸盐缓冲溶液的 $OD_{536\text{ nm}}$ 。

1.3 数据处理

数据统计及处理采用 Excel 2013 以及 SPSS 17.0,采用 Origin 9 绘图。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的菌落形态

从酱油渣中分离得到 10 株乳酸菌,分别为菌株

HT31、HT51、HT90、HT111、HT125、HT155、HT158、HT159、HT253 及 HT256, 菌落颜色均为奶白色, 中央凸起, 菌落表面光滑有光泽, 边缘齐整, 直径为 0.5 ~ 1.5 mm, 菌落形态如图 1 所示。经革兰氏染色试验及酶触试验发现, 10 株乳酸菌的菌体形态均为杆状, 酶触试验均呈阴性, 菌体形态如图 2 所示。

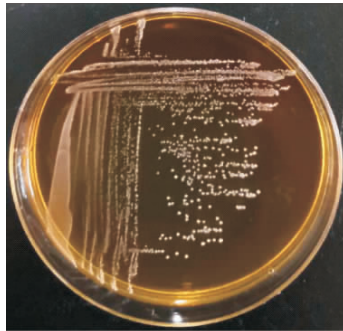


图 1 乳酸菌在 MRS 固体培养基的菌落形态

Figure 1 The colony morphology of lactic acid bacteria in MRS solid medium (HT51, 2 d)

2.2 乳酸菌生理生化试验特征

由表 1 可知, 菌株 HT31、HT51、HT90、HT111、HT125、HT155、HT158、HT159、HT253 和 HT256 在酶触、硝酸盐还原、明胶液化、H₂S 产生、吲哚试验中均呈阴性, 参考张刚^[28]、华鹤良^[29]的方法, 结合形态学结果, 初步判定上述菌株为乳杆菌属 (*Lactobacillus*)。

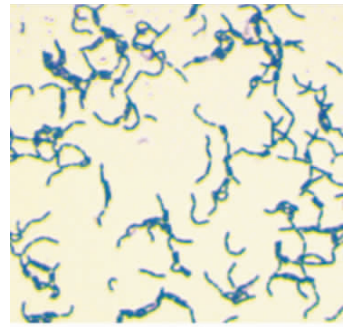


图 2 部分乳酸菌菌株的菌体形态

Figure 2 Microscopic morphology of some *Lactobacillus* strains (×1 000)

表 1 酱油渣中乳酸菌的生理生化鉴定结果[†]

Table 1 Result of physiological and biochemical identification of lactic acid bacteria in soy sauce residue

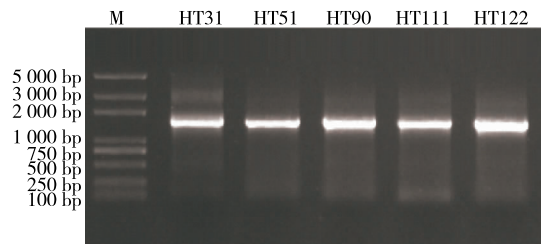
菌株	革兰氏染色	酶触试验	硝酸盐还原	明胶液化	H ₂ S 产生	吲哚试验
HT31	+	-	-	-	-	-
HT51	+	-	-	-	-	-
HT90	+	-	-	-	-	-
HT111	+	-	-	-	-	-
HT125	+	-	-	-	-	-
HT155	+	-	-	-	-	-
HT158	+	-	-	-	-	-
HT159	+	-	-	-	-	-
HT253	+	-	-	-	-	-
HT256	+	-	-	-	-	-

† “+”表示反应呈阳性;“-”表示反应呈阴性、不生长或生长不明显。

2.3 菌株分子生物学鉴定

对 10 株乳酸菌进行基因组提取、PCR 扩增及测序。凝胶电泳图如图 3 所示。由图 3 可知, 10 株乳酸菌的 PCR 扩增产物大小均在 1 500 bp 左右, 且电泳带光亮明显, 无杂质, 可进行测序^[30]。

得到菌株 16S rRNA 基因序列后, 进行 Blast 比对, 结果如表 2 所示。使用 Mega 5.0 构建系统发育树, 如图 4 所示。由图 4 可知, 菌株 HT31、HT51、HT90、HT111、HT125、HT155、HT158、HT159、HT253、HT256 均与模式菌株 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* ATCC 25302^T、*Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* JCM 1171^T 处于同一分支。结合表 2, 将菌株 HT31、



电泳条件: 3 μL 样品 + 1% 琼脂糖凝胶, 使用 Trans 2K[®] Plus DNA Marker

图 3 部分乳酸菌 16S rRNA PCR 扩增产物电泳图

Figure 3 Electrophoresis of 16S rRNA amplified products of partial lactic acid bacteria

表 2 酱油渣中分离菌株的 16S rRNA 序列同源性比对结果

Table 2 Results of 16S rRNA sequence homology analysis of isolates from soy sauce residue

菌株	菌株名称	菌株编号	登陆号	相似性/%
HT31	<i>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</i>	ATCC 25302(T)	ACGY01000162	99.38
HT51	<i>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</i>	ATCC 25302(T)	ACGY01000162	99.25
HT90	<i>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</i>	ATCC 25302(T)	ACGY01000162	98.91
HT111	<i>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</i>	ATCC 25302(T)	ACGY01000162	99.32
HT125	<i>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</i>	ATCC 25302(T)	ACGY01000162	99.64
HT155	<i>Lactobacillus paracasei subsp. tolerans</i>	JCM 1171(T)	D16550	99.32
HT158	<i>Lactobacillus paracasei subsp. tolerans</i>	JCM 1171(T)	D16550	98.98
HT159	<i>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</i>	ATCC 25302(T)	ACGY01000162	98.71
HT253	<i>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</i>	ATCC 25302(T)	ACGY01000162	98.50
HT256	<i>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</i>	ATCC 25302(T)	ACGY01000162	98.25

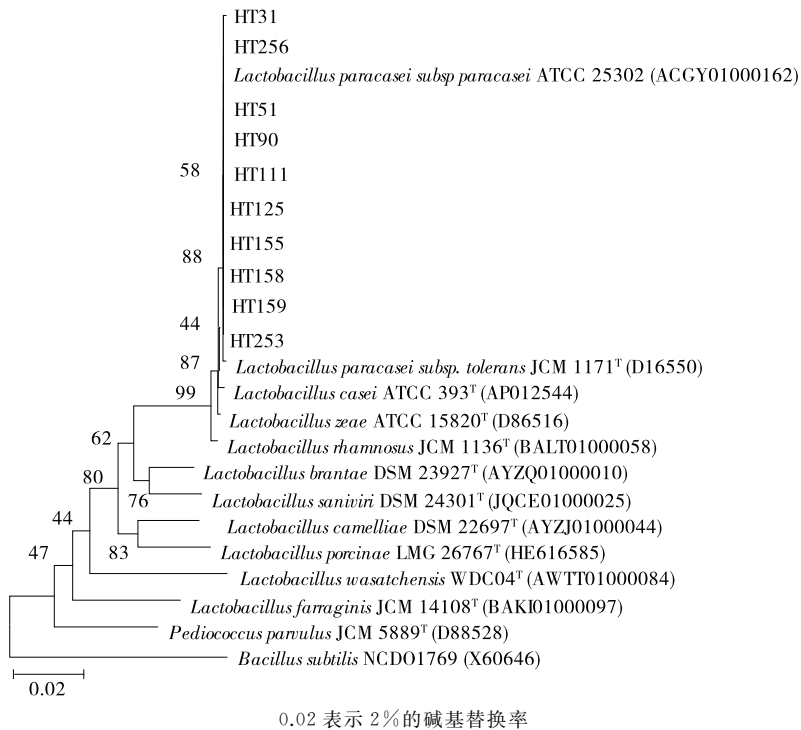


图 4 副干酪乳杆菌 16S rRNA 基因序列系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequence of *Lactobacillus paracasei*

HT51、HT90、HT111、HT125、HT159、HT253、HT256 鉴定为 *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* (副干酪乳杆菌副干酪亚种); 将菌株 HT155、HT158 鉴定为 *Lactobacillus paracasei subsp. tolerans* (副干酪乳杆菌坚韧亚种)。Wei 等^[31]发现参与酱油发酵的细菌主要有乳杆菌、魏斯氏菌、芽孢杆菌等; 胡传旺^[12]研究发现, 酱油发酵过程的主要微生物有乳杆菌、片球菌、魏斯氏菌等。

2.4 副干酪乳杆菌模拟胃液耐受能力

在实际应用中, 乳酸菌要发挥其积极作用会受到诸多因素的限制, 其中包括机体消化道中低 pH 胃液的作

用^[32]。如乳酸菌耐受胃液的能力差, 则导致菌株存活率过低, 难以发挥其益生特性, 因此胃液耐受能力是研究乳酸菌益生特性的指标之一。由图 5 可知, 菌株 HT31、HT256 对模拟胃液耐受性较好, 在胃液中耐受 3 h 后, 菌株存活率分别为 (86.33±1.24)%, (80.88±5.39)%; 菌株 HT90、HT158、HT159、HT253 耐受胃液 3 h 后, 菌株存活率分别为 (66.32±0.35)%, (69.08±0.41)%, (67.15±0.03)%, (63.47±0.67)%; 菌株 HT155、HT51、HT111 耐受胃液 3 h 后, 菌株存活率分别为 (57.43±1.56)%, (48.66±0.28)%, (31.37±0.50)%; 菌株 HT125 的存活

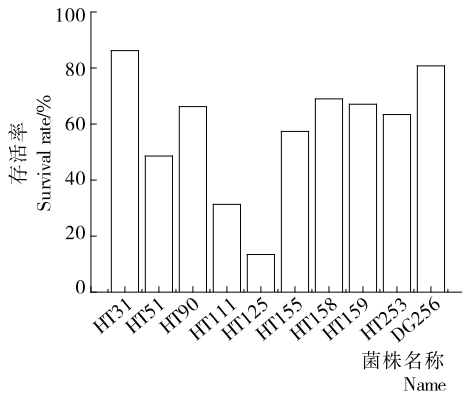


图 5 副干酪乳杆菌在模拟人工胃液中的存活率

Figure 5 The experimental results of *Lactobacillus paracasei* in simulated artificial gastric juice

率较低,仅为(13.45±0.11)%。

2.5 副干酪乳杆菌模拟肠液耐受能力

乳酸菌耐受机体肠道高胆汁酸的能力是研究其益生特性的又一指标^[32]。由图 6 可知,菌株 HT31、HT253、HT111、HT155 耐受肠液能力较好,耐受肠液 4 h 后的存活率分别为(95.40±0.55)%,(85.36±0.02)%,(74.56±0.44)%,(71.57±0.15)%;其余菌株耐受肠液 4 h 后的存活率均在 30%~60%。耐受模拟肠液 8 h 后,菌株 HT31、HT111、HT155 的耐受能力较好,存活率分别为(60.22±0.16)%,(62.18±0.70)%,(52.84±0.00)%;菌株 HT51、HT90、HT158 耐受模拟肠液能力稍差,存活率分别为(39.04±1.03)%,(36.00±0.04)%,(43.67±0.09)%;菌株 HT125、HT159、HT253、HT256 耐受模拟肠液 8 h 后,存活率<30%。

2.6 副干酪乳杆菌表面疏水性

乳酸菌进入人体肠道后,需要有一定的肠道附着能力才能发挥其益生特性。细菌的疏水性有利于细菌对肠

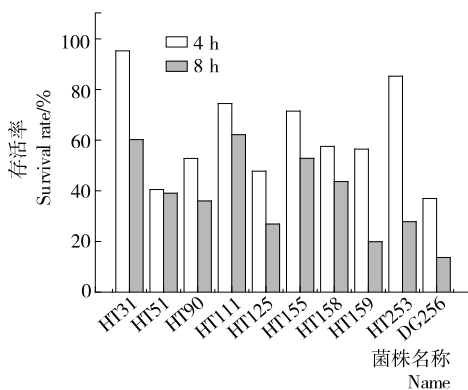


图 6 副干酪乳杆菌在模拟人工肠液中的存活率

Figure 6 Experiments on the number of living bacteria of *Lactobacillus paracasei* in simulated artificial intestinal fluid

膜的黏附,疏水性越大,细菌黏附力越大^[33]。由图 7 可知,菌株 HT111、HT155 疏水性较好,疏水率分别为(26.51±0.66)%,(25.41±0.58)%;菌株 HT31、HT256、HT253 的疏水性稍弱,疏水率分别为(18.52±0.76)%,(17.59±0.24)%,(15.77±0.49)%;其余菌株的疏水率<10%。

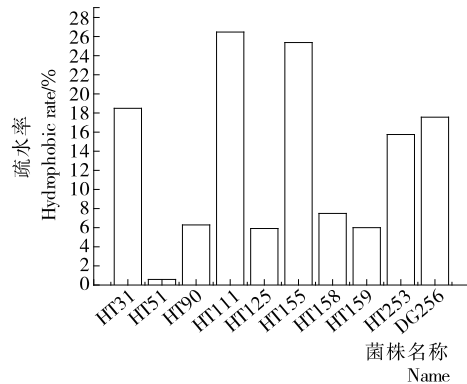


图 7 副干酪乳杆菌的表面疏水性

Figure 7 Hydrophobicity results of *Lactobacillus paracasei*

2.7 副干酪乳杆菌抗氧化能力

挑选模拟胃液、肠液耐受性良好,疏水性较好的副干酪乳杆菌菌株 HT31、HT111、HT155 进行抗氧化能力测定。由图 8 可知,菌株 HT31 清除 DPPH 的能力较好,其细胞悬浮液的 DPPH·清除率为(26.25±0.01)%;无细胞提取物的清除率为(16.03±0.03)%;菌株 HT111、HT155 细胞悬浮液的 DPPH·清除率<10%,其无细胞提取物的 DPPH·清除率分别为(15.03±0.02)%,(18.67±0.09)%。由图 9 可知,菌株 HT31、HT155 清除·OH 能力较好,其细胞悬浮液清除率分别为(42.88±0.21)%,(36.10±0.00)%;其无细胞提取物·OH 清除率分别为(27.74±0.01)%,(38.24±0.73)%;菌株 HT111 的细胞悬浮液、无细胞提取物·OH 清除率分别为

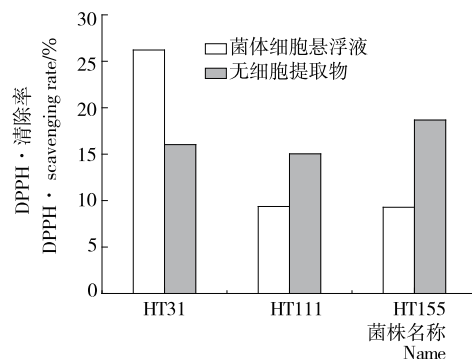


图 8 副干酪乳杆菌清除 DPPH· 的能力

Figure 8 Test result of DPPH· scavenging by *Lactobacillus paracasei*

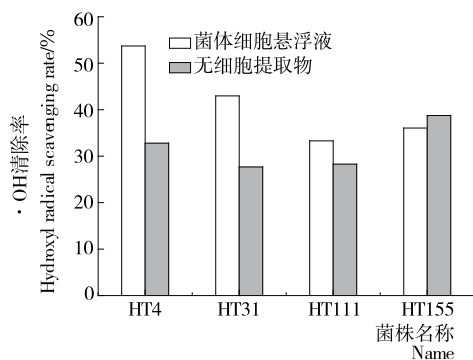


图9 副干酪乳杆菌清除·OH的能力

Figure 9 Test result of hydroxyl radicals scavenging by *Lactobacillus paracasei*

(33.33±0.00)%, (28.24±0.06)%。综上,菌株 HT31 抗氧化能力最佳。

3 结论

从酱油渣中分离得到 10 株乳酸菌,经鉴定,8 株属于 *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*, 2 株属于 *Lactobacillus paracasei subsp. tolerans*;对 10 株菌株进行模拟胃肠液耐受性、疏水性及抗氧化试验发现,菌株 HT31 的耐受模拟胃肠环境能力、疏水能力以及抗氧化能力较强。菌株 HT31 丰富了乳酸菌资源库,后续可研究菌株 HT31 的益生特性及应用性能,为酱油渣的深入开发及应用提供科学依据。

参考文献

- [1] 陈敏, 吴昊. 酱渣再利用的研究进展[J]. 中国调味品, 2011, 36(8): 19-23.
- [2] 中国调味品协会. 中国酱油、调味酱产业发展概况及未来发展趋势 [EB/OL]. <http://www.chinacondiment.com/branch/4/23783>. 2017.
- [3] 侯宗霞. 提高酱油残渣中蛋白质利用率的研究[D]. 广州: 暨南大学, 2012: 8.
- [4] YAMAMOTO H, TAKEUCHI F, NAGANO C, et al. Separation of flavonoids and salt in bean cake disposed from soy sauce manufacturing process[J]. Journal of Chemical Engineering of Japan, 2006, 39(7): 777-782.
- [5] SUGIYAMA S. Selection of micro-organisms for use in the fermentation of soy sauce[J]. Food Microbiology, 1984, 1(4): 339-347.
- [6] 巩欣, 程永强, 纪凤娣, 等. 酱油渣的再利用研究进展[J]. 食品工业科技, 2013, 34(5): 384-387.
- [7] 阎杰. 酿造酱渣开发利用的研究进展[J]. 中国酿造, 2007, 26(2): 5-8.
- [8] WEINBERG Z, ASHBELL G, HEN Y, et al. The effect of applying lactic acid bacteria at ensiling on the aerobic stability of silages[J]. J Appl Bacteriol, 1993, 75(6): 512-518.
- [9] SEALE D R. Bacterial inoculants as silage additives[J]. J Appl Bacteriol, 1986, 61(15): 9-26.
- [10] HANAGATA H, SHIDA O, TAKAGI H. Taxonomic homogeneity of a salt-tolerant lactic acid bacteria isolated from shoyu mash[J]. Journal of General and Applied Microbiology, 2003, 49(2): 95-100.
- [11] SITDHIPOL J, TANASUPAWAT S, TEPKAIKUL P, et al. Identification and histamine formation of *Tetragenococcus* isolated from Thai fermented food products[J]. Annals of Microbiology, 2012, 52(9): 1-5.
- [12] 胡传旺. 酱油发酵过程微生物群落解析及功能研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017: 15.
- [13] ANSAH H K. Characterization of microorganisms involved in the second stage of soy sauce fermentation (moromi) and studies on the shelf life of soy sauce[D]. Kumasi: Kwame Nkrumah University of Science and Technology, 2011: 52-61.
- [14] 杨子燕, 赵世伟, 马万平, 等. 干酪乳杆菌的筛选及其在活性乳酸菌饮料中的应用[J]. 食品工业科技, 2018, 39(3): 106-111, 116.
- [15] JAHREIS G, VOGELASANG H, KIESSLING G, et al. Influence of probiotic sausage (*Lactobacillus paracasei*) on blood lipids and immunological parameters of healthy volunteers [J]. Food Research International, 2002, 35(2): 133-138.
- [16] 田丹. *L. paracasei subsp. paracasei* X12 肽聚糖对荷瘤 BALB/c 小鼠的抑制作用及免疫调节机制[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2015: 1.
- [17] GARDINER G, ROSS R P, COLLINS J K, et al. Development of a probiotic Cheeddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains[J]. American Society Microbiology, 1998, 64(6): 2 192-2 199.
- [18] 张鲁冀, 孟祥晨. 自然发酵东北酸菜中乳杆菌的分离与鉴定[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(11): 125-131.
- [19] PARK J N, BYUN E B, HAN I J, et al. Effects of irradiation temperature on the sensory quality improvement of Gamma-irradiated Ganjang-gejang, Korean traditional marinated raw crab portunus trituberculatus in soybean sauce [J]. Fisheries & Aquatic Science, 2015, 18(2): 115-121.
- [20] 栗永乐, 李秀丽, 李传娟, 等. 内蒙古东部地区农家酸菜中乳酸菌的分离与初步鉴定[J]. 食品工业, 2012, 33(11): 132-134.
- [21] 张敏. 甘肃牧区传统发酵牦牛乳中乳酸菌的分离鉴定及优良菌株的筛选[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2011: 12.
- [22] 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: 3-5, 54-57, 100-102.
- [23] 程方, 武运, 武亚婷, 等. 酸马乳源降解亚硝酸盐乳酸菌的分离及鉴定[J]. 中国酿造, 2018, 37(9): 72-77.
- [24] 董晓丽. 益生菌的筛选鉴定及其对断奶仔猪、犊牛生长和消化道微生物的影响[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013: 19-21.

- 白的功能特性研究[J]. 食品科技, 2013, 38(2): 233-236, 241.
- [7] TANG Chuan-he, CHEN Zhong, LI Lin, et al. Effects of transglutaminase treatment on the thermal properties of soy protein isolates[J]. Food Research International, 2006, 13(39): 704-711.
- [8] SZE-TAO K W C, SATHE S K. Walnuts (*Juglans regia*, L.): Proximate composition, protein solubility, protein amino acid composition and protein in vitro, digestibility[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2000, 80(9): 1 393-1 401.
- [9] MARIA J S, MARÍA J M, ANA M R P. Influence of Maillard conjugation on structural characteristics and rheological properties of whey protein dextran systems[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 39(11): 223-230.
- [10] LIAO Lan, ZHAO Mou-ming, REN Jiao-yan, et al. Effect of acetic acid deamidation-induced modification on functional and nutritional properties and conformation of wheat gluten[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 90(3): 409-417.
- [11] PAREDESLOPEZ O, ORDORICAFALOMIR C, OLIVARESVAZQUEZ M R. Chickpea protein isolates: Physicochemical, functional and nutritional characterization[J]. Journal of Food Science, 2010, 56(3): 726-729.
- [12] PEDROCHE J, YUST M M, LQARI H, et al. Brassica carinata protein isolates: Chemical composition, protein characterization and improvement of functional properties by protein hydrolysis[J]. Food Chemistry, 2004, 88(3): 337-346.
- [13] 赵新淮, 侯瑶. 大豆蛋白限制性酶解对乳化性质和吸水性的影响[J]. 农业机械学报, 2009, 40(12): 159-163.
- [14] AGYARE K K, ADDO K, XIONG You-ling. Emulsifying and foaming properties of transglutaminase-treated wheat gluten hydrolysate as influenced by pH, temperature and salt[J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(1): 72-81.
- [15] 王中江, 江连洲, 魏冬旭, 等. pH 值对大豆分离蛋白构象及表面疏水性的影响[J]. 食品科学, 2012, 33(11): 47-51.
- [16] 魏冬旭, 江连洲, 王辰, 等. pH 值对大豆 11S 球蛋白结构和表面疏水性的影响[J]. 食品科学, 2015, 36(11): 1-5.
- [17] 周昊, 王成章, 叶建中, 等. 高静压处理改善白果蛋白致敏性和功能特性[J]. 农业工程学报, 2016, 32(8): 292-298.
- [18] MAO Xiao-ying, HUA Yu-fei. Composition, structure and functional properties of protein concentrates and isolates produced from walnut (*Juglans regia* L.)[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13(2): 1 561-1 581.
- [19] SHU Yang, XUE Wei-wei, XU Xiao-ying, et al. Interaction of erucic acid with bovine serum albumin using a multi-spectroscopic method and molecular docking technique[J]. Food Chemistry, 2015, 173(4): 31-37.
- [20] 沈敏江, 王文辉, 刘丽, 等. 核桃蛋白有限酶解增溶改性的工艺研究[J]. 中国粮油学报, 2015, 30(8): 93-98.
- [21] TSUMURA K, SAITO T, TSUGE K, et al. Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis[J]. LWT-Food Science and Technology, 2005, 38(3): 255-261.
- [22] 杨森, 唐传核. 微生物转谷氨酰胺酶对大豆分离蛋白乳液凝胶性能的影响[J]. 现代食品科技, 2012, 28(1): 5-8.
- [23] 吴琼, 陈丽娜, 代永刚, 等. 响应面优化转谷氨酰胺酶改性大豆分离蛋白工艺[J]. 食品科学, 2011, 32(4): 7-10.
- [24] GUAN Xiao, YAO Hui-yuan, CHEN Zheng-xing, et al. Some functional properties of oat bran protein concentrate modified by trypsin[J]. Food Chemistry, 2007, 101(1): 163-170.
- [25] KONG Xiang-zhen, ZHOU Hui-ming, QIAN Hai-feng. Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates [J]. Food Chemistry, 2007, 102(3): 759-763.
- [26] GAN Chee-yuen, CHENG Lai-hoong, EASA A M. Physicochemical properties and microstructures of soy protein isolate gels produced using combined cross-linking treatments of microbial transglutaminase and Maillard cross-linking[J]. Food Research International, 2008, 41(6): 600-605.
- (上接第 17 页)
- [25] 柳青. 具有潜在益生特性乳酸菌的筛选鉴定及其特性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018: 16.
- [26] 南晓芳. 豆豉和腐乳中耐盐乳酸菌的筛选、鉴定及其功能特性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2016: 21-22.
- [27] LEITE A M O, MIGUEL M A L, PEIXOTO R S, et al. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains [J]. Journal of Dairy Science, 2015, 98(6): 3 622-3 632.
- [28] 张刚. 乳酸细菌: 基础、技术和应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 41-47.
- [29] 华鹤良. 乳酸菌的分离鉴定及其抗菌肽与发酵性能研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2014: 36.
- [30] 杨小慧. 白酒窖池中益生性乳酸菌的分离筛选及其胞外多糖生物活性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2018: 21.
- [31] WEI Chia-li, CHAO Song-lei, TSAI Wen-bin, et al. Analysis of bacterial diversity during the fermentation of inyu, a high-temperature fermented soy sauce, using nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and the plate count method[J]. Food Microbiology, 2013, 33(2): 252-261.
- [32] 王焕. 鸡源益生菌 BL-Y-1 菌株分离鉴定、发酵条件及其耐受性研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2009: 37-38.
- [33] SVETOSLAV D T, JEAN G L, BERNADETTE D G M. Evaluation of the probiotic potential and effect of encapsulation on survival for *Lactobacillus plantarum*, ST16Pa isolated from papaya[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(3): 973-984.