

食品源植物乳植杆菌 YZ-010 乙醇耐受与降解特性及其代谢调控机制解析

周晓雯¹, 陈谋通², 薛亮², 叶志伟^{1*}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东省微生态制剂工程技术研究中心, 广东广州 510642)

(2. 广东省科学院微生物研究所, 华南应用微生物国家重点实验室, 广东省微生物安全与健康重点实验室, 农业农村部农业微生物组学与精准应用重点实验室, 广东广州 510070)

摘要: 乙醇耐受性与降解能力是乳酸菌功能开发的重要基础, 但其调控机制尚不清晰。为了筛选高乙醇耐受及降解能力乳酸菌并解析其代谢机制, 本研究从不同食品来源分离获得 140 余株乳酸菌, 通过其在 8% 和 12% (φ) 乙醇培养基中的生长情况评价耐受性, 并测定其在 4%、8% 和 12% (φ) 乙醇条件下的降解能力; 同时采用实时荧光定量 PCR 分析优势菌株相关基因表达。结果显示, 共筛选获得 6 株在 12% (φ) 乙醇条件下仍能良好生长的菌株, 其中植物乳植杆菌 YZ-010 表现最优, 在 4% (φ) 乙醇条件下降解率达 33.01 wt. %。乙醇胁迫下, YZ-010 菌株醇醛脱氢酶相关基因 (*adh1*、*aldh*、*nox* 和 *adh zinc-binding*) 转录显著上调, 同时甘油酯代谢 (*plsC* 和 *dhaT*)、氨酰-tRNA 合成 (*thrS*)、肽聚糖合成 (*dacA*) 和嘌呤转运 (*NCS2*) 相关基因转录增强, 而氨基酸代谢相关基因 (*argG*、*argH* 和 *gadB*) 下调。结果表明, 植物乳植杆菌 YZ-010 通过增强醇醛转化、维持细胞结构稳定及代谢重编程实现乙醇耐受与降解。综上, 本研究为乳酸菌解酒功能开发及乙醇耐受机制解析提供了理论基础。

关键词: 植物乳植杆菌; 乙醇耐受; 乙醇降解; 基因表达调控; 醇醛脱氢酶

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2027.6.0566

Ethanol Tolerance and Degradation Characteristics of Food-Derived *Lactiplantibacillus plantarum* YZ-010 and Its Metabolic Regulatory Mechanisms

ZHOU Xiaowen¹, CHEN Moutong², XUE Liang², YE Zhiwei^{1*}

(1. College of Food Science, Research Center for Micro-Ecological Agent Engineering and Technology of Guangdong Province, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. Guangdong Institute of Microbiology; State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China; Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health; Key Laboratory of Agricultural Microbiome and Precision Application, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510070, China)

Abstract: Ethanol tolerance and degradation capacity are important foundations for the functional development of lactic acid bacteria (LAB), whereas their regulatory mechanisms remain unclear. To screen LAB with high ethanol tolerance and degradation capacity and to elucidate the underlying metabolic mechanisms, more than 140 LAB strains were isolated from various food sources. Ethanol tolerance was evaluated based on their growth in media containing 8% and 12% (φ) ethanol, and ethanol degradation capacities were determined under 4%, 8%, and 12% (φ) ethanol conditions. Meanwhile, quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was employed to analyze the expression levels of key functional genes in the selected strain under ethanol stress. The results showed that six strains were able to grow well in the presence of 12% (φ) ethanol, among which *Lactiplantibacillus plantarum* YZ-010 exhibited the highest ethanol tolerance and degradation ability, with a degradation rate of 33.01 wt. % under 4% (φ) ethanol. Under ethanol stress, the transcription levels of alcohol/aldehyde dehydrogenase-related genes (*adh1*, *aldh*, *nox*, and *adh zinc-binding*) of *L. plantarum* YZ-010 were significantly upregulated. Meanwhile, genes involved in glycerolipid metabolism

收稿日期: 2026-04-13; 修回日期: 2026-05-17; 接受日期: 2026-05-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32272298; 31801918); 广东省自然科学基金项目 (2015A030310225)。

作者简介: 周晓雯 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物与医药, E-mail: zwx834544939@163.com

通讯作者: 叶志伟 (1984-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 天然产物与微生物工程, E-mail: zhwye@scau.edu.cn

(*plsC* and *dhaT*), aminoacyl-tRNA synthesis (*thrS*), peptidoglycan synthesis (*dacA*), and purine transport (*NCS2*) were also upregulated, whereas genes related to amino acid metabolism (*argG*, *argH*, and *gadB*) were downregulated. These results indicate that *L. plantarum* YZ-010 enhances ethanol tolerance and degradation through strengthened alcohol-aldehyde conversion, maintenance of cellular structural stability, and metabolic reprogramming. This study provides a theoretical basis for the development of anti-alcohol functional LAB and the elucidation of ethanol tolerance mechanisms.

Key words: *Lactiplantibacillus plantarum*; ethanol tolerance; ethanol degradation; gene expression regulation; alcohol/aldehyde dehydrogenases

含酒精饮品作为全球范围内最重要的微生物发酵产品之一,在人类社会、经济活动及文化传承中均具有重要地位。近年来,随着消费需求的持续增长,酒精饮品产业规模不断扩大。据统计,中国白酒销售总额于2018年达到5363.83亿元,并在全球蒸馏酒市场中占据主导地位^[1,2]。然而,在酒精饮品广泛消费的同时,其对人体健康的潜在危害亦日益凸显。世界卫生组织数据显示,饮酒相关疾病负担约占全球总疾病负担的5.1%^[3]。短期摄入乙醇可抑制中枢神经系统功能,而长期过量饮酒则与多种系统性疾病密切相关,包括酒精性肝炎、消化道肿瘤及心血管疾病等^[4-6]。

随着肠道微生物研究的不断深入,肠道菌群在宿主健康调控中的关键作用逐渐被认识。益生菌及其发酵产物在缓解酒精损伤方面的潜在功能也引起了广泛关注。联合国粮食及农业组织与世界卫生组织将益生菌定义为“当摄入足够数量时,对宿主起有益健康作用的活的微生物”^[7]。其中,乳酸菌因其良好的安全性、代谢活性及风味调控能力,被广泛应用于食品发酵及功能食品开发领域。在酒类发酵过程中,乳酸菌通过代谢有机酸、醇类及氨基酸等物质,参与风味物质的形成与调控^[8,9]。同时,其在宿主中的生理功能亦已被证实,包括促进肠道蠕动^[10]、缓解炎症反应^[11]、增强免疫功能^[12]和调节代谢性疾病^[13]等。

目前,乳酸菌及其代谢产物在解酒领域的研究主要集中于调节肠道菌群结构、降低内毒素水平以及缓解乙醇氧化引起的肝脏损伤等方面^[6,14]。然而,关于乳酸菌是否能够直接参与乙醇降解,尤其是在体外环境或体内血清水平上降低乙醇浓度的研究仍较为有限,其作用机制亦尚不明确。研究表明,乙醇可作为部分微生物的碳源参与代谢过程。例如,大肠杆菌可利用乙醇生成细胞蛋白及脂类物质^[15];黑曲霉在高乙醇环境下可将乙醇转化为中性脂类及甘油代谢产物^[16];粪肠球菌则通过乙醇脱氢酶催化乙醇参与脂类合成^[17]。这些研究表明,部分微生物能够通过代谢乙醇生成次级代谢产物,从而提高其对乙醇环境的适应能力。

故此,本研究从多种食品来源中筛选获得24株具有良好发酵性能且符合益生菌标准的耐乙醇乳酸菌。通过系统评价其乙醇耐受性及乙醇降解能力,筛选得到一株性能优异的植物乳植杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)。在此基础上,进一步优化其体外乙醇降解条件,并结合实时荧光定量PCR(RT-qPCR)技术,对其乙醇代谢相关通路进行解析,重点关注酒精代谢、氨酰-tRNA合成、肽聚糖合成及氨基酸代谢等关键途径中差异表达基因。旨在从分子水平阐明乳酸菌耐受乙醇及降解乙醇的调控机制,为开发新型功能性解酒微生物制剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料与设备

1.1.1 食品材料

奶酪、食用菌(平菇、杏鲍菇、金针菇)、水果(新疆青提、广东糯米糍荔枝)购买自广州市长湴农贸市场,购回后于4℃条件下保存并尽快用于实验。

1.1.2 主要试剂和培养基

重铬酸钾(分析纯),科密欧化学试剂有限公司;浓硫酸(分析纯),广州化学试剂厂;无水乙醇(分析纯)、过氧化氢(0.3 wt.%),广州谊科园生物科技有限公司;TriQuick Reagent总RNA提取试剂,北京索莱宝科技有限公司;2×Green Taq Master Mix Taq酶预混液,南京巨匠生物科技有限公司;TransScript® One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix一步法去除gDNA及第一链cDNA合成试剂盒、PerfectStart® Green qPCR SuperMix(+Universal Passive Reference Dye)染料法荧光定量PCR预混液,北京全式金生物技术股份有限公司。

MRS液体培养基(100 mL)组成为:蛋白胨1.0 g、牛肉膏1.0 g、酵母提取物0.5 g、葡萄糖2.0 g、吐温-80

0.1 mL、K₂HPO₄ 0.2 g、醋酸钠 0.5 g、柠檬酸氢二铵 0.2 g、MgSO₄ 7H₂O 0.058 g、MnSO₄ 5H₂O 0.025 g，调节 pH 值至 6.4，于 121 °C 灭菌 20 min。固体培养基在上述基础上添加 2.0 g 琼脂。MRS-Ca 培养基：在 MRS 固体培养基中添加 CaCO₃ 0.3 g；MRS-E 培养基：在 MRS 固体培养基中添加 5% (φ) 经无菌过滤的无水乙醇。

1.1.3 主要仪器与设备

UV4802 型紫外分光光度计，上海优尼科仪器有限公司；5804R 型高速冷冻离心机，德国 Eppendorf 公司；MJ Mini 梯度 PCR 仪、凝胶快速成像系统 Gel Doc™ XR+，美国 Bio-Rad Laboratories 生命科学公司；实时荧光定量 PCR 仪 Quantity Studio 3，美国 Applied Biosystems 公司；生物显微镜 BK6000，重庆奥特光学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 食品源乳酸菌的分离筛选

在无菌条件下将样品剪碎，称取 10 g 加入 90 mL 无菌生理盐水中，充分振荡混匀后进行 10 倍梯度稀释至 10⁻⁵。取 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 四个梯度稀释液分别涂布于 MRS-Ca 和 MRS-E 固体培养基上，37 °C 倒置培养 48 h。挑取在 MRS-Ca 培养基上形成溶钙圈且能在 MRS-E 培养基上生长的菌株进行分离纯化。

1.2.2 菌株生理学鉴定及分子生物学鉴定

选取菌落形态呈乳白色、圆形、表面光滑且黏稠的菌株进行过氧化氢酶试验，在载玻片上滴加 0.3% H₂O₂，筛选无气泡产生的菌株作为候选乳酸菌。采用碱裂解法提取模板 DNA：菌液与 50 mmol·L⁻¹ NaOH 混匀，98 °C 裂解 20 min 后加入 Tris-HCl 中和，作为 16S rDNA PCR 扩增模板。PCR 体系为：2×Green-Taq Mix 10 μL，上下游引物各 1 μL，模板 2 μL，ddH₂O 补至 20 μL。引物序列如表 1 所示。

表 1 分子鉴定和 RT-qPCR 试验相关基因的引物序列

Table 1 Table 1 Primer sequences for genes related to molecular identification and RT-qPCR experiments

基因	酶	引物序列 (5'→3')	用途
16S rDNA	/	F: AGAGTTTGACCTGGCTCA R: GGTACCTTGTTACGACTT	菌株 16S rDNA 分子鉴定
16S rRNA	/	F: CTCAACCGAAGAAGTGC R: TCCTGTTTGCTACCCAT	内参基因 RT-qPCR 试验
<i>nox</i>	NADPH 氧化酶	F: TGGTTGCGACGTAAGCGC R: GCACTGAAACCAGCCAATC	目标基因 RT-qPCR 试验
<i>aldh</i>	醛脱氢酶	F: CGATGCTGCTATTGCCTCT R: GAA TGTCTGCGGTTTGCTC	
<i>adh1</i>	醇脱氢酶	F: GGAATGTGTCGGCACTGAAG R: ATAAGTCGTAACGGAGGCGG	
<i>adh2</i>	醇脱氢酶	F: CATCGCAATGAGTCGCCA R: GACCAACAACCGCACCAG	
<i>adhE</i>	醇醛脱氢酶	F: AAATGTAGTTCTGCGGCTGC R: TGCTGGTTTACCTGATGAGT	
<i>adh zinc-binding</i>	锌指结合型醇脱氢酶	F: GGCTGCGACAGTGCTTATCA R: GCTGGGTCAAAAAGGAATGTG	
<i>argG</i>	精氨酸琥珀酸合酶	F: GGGAAGTTTACGAAGCACCA R: GAGAACCAAAAGACCGTTGTAGA	
<i>argH</i>	精氨酸琥珀酸裂解酶	F: TATTTGCGCCATTGGGAGC R: CACAAAACCGTGAGAGATGC	
<i>gabB</i>	琥珀酸半醛脱氢酶	F: GACTGGTTCTAAGCGTGGTG R: TAAAGCGTTTTGATGAGGTG	
<i>thrS</i>	苏氨酸-tRNA 连接酶	F: ATGGGTGACGGCGAACAA R: AAGTCATTTACGAACCCG	

NCS2	NCS2 渗透酶家族	F: TCACCGTTATTAAACGTCG R: AGCCTAAAGCAATCCCATC
<i>dacA</i>	丝氨酸型 D-Ala-D-Ala 羧肽酶	F: AACATTACTCCGCACTTCCTG R: CGTCGTAGTCGTGTAGTTGTGG
<i>plsC</i>	1-酰基甘油-3-磷酸酰基转移酶	F: CGTGTTTGTACCCGTTGT R: CGATTGACAGGAAAGGCG
<i>dhaT</i>	1,3-丙二醇脱氢酶	F: CGATGAAACAACCTCAGCGA R: CGTGGGTTAGAGAAGGCG

1.2.3 菌株乙醇耐受性分析

菌株经两次活化后,调整菌悬液浓度至约 1×10^{10} CFU/mL,以 2% (φ) 接种量接种至含 8% 和 12% (φ) 乙醇的培养基中,37 °C 培养 24 h。通过测定培养前后 OD₆₀₀ 变化值 (Δ OD₆₀₀) 评价菌株的乙醇耐受能力。各处理设置 3 次重复。

1.2.4 菌株降解乙醇能力测定

参照文献方法并略作修改^[18],菌株经三次活化后,以 2% (φ) 接种量接种至不同乙醇体积分数的培养基中,于 37 °C 培养 24 h。分别于 0 h 和 24 h 取培养液 1.0 mL,在 8 000 rpm、4 °C 条件下离心 5 min,收集上清液。将上清液与重铬酸钾-硫酸溶液按 1:10 (φ) 比例混合,充分混匀后置于沸水浴中反应 10 min,冷却至室温后,在 610 nm 波长处测定吸光度。根据乙醇标准曲线计算样品中乙醇浓度,并按下式计算乙醇降解率:

$$A_0 = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

A_0 ——乙醇降解率,wt.%;

A_1 ——初始菌液中的乙醇质量,g;

A_2 ——发酵后菌液中的乙醇质量,g。

1.2.5 乙醇标准曲线绘制

采用容量瓶配制体积分数分别为 0%、4%、8%、12%、16% 和 20% (φ) 的乙醇标准溶液。分别取 0.1 mL 各浓度乙醇标准液,加入 1.0 mL 重铬酸钾-硫酸溶液于 2 mL 离心管中,充分混匀后密封,于沸水浴中反应 10 min,使体系充分氧化。反应结束后取出冷却至室温,在 610 nm 波长处测定其吸光度。以乙醇体积分数为横坐标、吸光度为纵坐标,建立标准曲线 ($y=0.3051x+0.0016$),并据此计算样品中乙醇浓度。

1.2.6 RT-qPCR 分析乙醇降解与耐受相关基因表达

筛选乙醇降解率最高的菌株 YZ-010 作为研究对象。以添加乙醇培养的菌株为实验组,以 MRS 培养的菌株为对照组。根据前期确定的最佳乙醇降解条件及菌株生长曲线,将种子液菌浓度调整至约 1×10^{10} CFU/mL,以 2% (φ) 接种量接种于含 4% (φ) 乙醇的培养基中,37 °C 静置培养 12 h。采用 TriQuick Reagent 总 RNA 提取试剂提取菌体总 RNA,并使用 TransScript® One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 一步法去除 gDNA 及第一链 cDNA 合成试剂盒进行反转录合成 cDNA。以合成的 cDNA 为模板,采用 PerfectStart® Green qPCR SuperMix (+Universal Passive Reference Dye) 染料法荧光定量 PCR 预混液进行 RT-qPCR 分析,以 16S rRNA 为内参基因,检测醇醛脱氢酶相关基因 (*nox*、*aldh*、*adh1*、*adh2*、*adhE* 和 *adh zinc-binding*)、氨基酸代谢相关基因 (*argG*、*argH*、*gadB*)、氨酰-tRNA 合成相关基因 (*thrS*)、嘌呤转运蛋白相关基因 (*NCS2*)、肽聚糖合成相关基因 (*dacA*)、以及甘油脂代谢相关基因 (*plsC*、*dhaT*) 等基因的表达水平。试验设计的引物序列如表 1 所示。反应程序为:94 °C 预变性 30 s;随后进行 45 个循环 (94 °C 5 s, 55 °C 15 s, 72 °C 10 s)。实验数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因相对表达量^[19]。

1.2.7 数据分析

论文所有试验均设置 3 次平行重复,结果以平均值 $\pm$ 标准误表示。原始数据采用 Excel 2019 进行整理与初步统计处理,并利用 GraphPad Prism 8.0.2 绘制图表。不同处理组之间的差异通过 SPSS Statistics 26 进行统计分析,采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 及 *t* 检验进行显著性比较,显著性水平设定为 $P < 0.05$ 。qRT-PCR 数据以

16S rRNA 为内参基因，采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算目标基因的相对表达量。图中不同字母表示组间差异达到显著水平。

2 结果与讨论

2.1 乳酸菌分离与鉴定

从不同食品来源中初步分离获得 200 余株具有乳酸菌典型菌落特征的菌株，其菌落呈圆形、乳白色、表面光滑且黏稠、边缘整齐。进一步筛选在 MRS-Ca 培养基上形成溶钙圈且能在 MRS-E 培养基中正常生长的菌株进行生理学鉴定。结果表明，经触酶试验阴性及革兰氏染色阳性等鉴定，共有 140 余株菌被初步判定为乳酸菌。接着，通过 16S rDNA 测序并与美国国家生物技术信息中心（NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）数据库进行同源性比对，鉴定结果显示分离菌株主要包括副干酪乳酪杆菌（*Lacticaseibacillus paracasei*）、植物乳植杆菌（*Lactiplantibacillus plantarum*）、戊糖片球菌（*Pediococcus pentosaceus*）、发酵粘液乳杆菌（*Limosilactobacillus fermentum*）和肠膜明串珠菌（*Leuconostoc mesenteroides*）等（表 2）。镜检结果进一步验证了上述菌株的典型形态特征（图 1），16S rDNA 扩增条带清晰，表明扩增体系稳定可靠（图 2）。

表 2 论文试验分离得到的部分食品源乳酸菌及其活性鉴定

Table 2 Partial food-derived lactic acid bacteria lactic acid bacteria isolated in the experiment and their activity identification

菌株编号	菌种	食品来源	乙醇耐受能力		乙醇降解率 (> 10 wt.%)
			8% (φ)	12% (φ)	
YZ-001	副干酪乳酪杆菌	奶酪	++	+	Y
YZ-002			+++	-	Y
YZ-003			++	-	Y
YZ-004			++	-	N
YZ-005			-	-	N
YZ-006		杏鲍菇、	++	-	N
YZ-007		平菇、	+	+	Y
YZ-008		新疆青提、	+	-	N
YZ-009		广东糯米滋荔枝	++	-	N
YZ-010			+++	++	Y
YZ-011			+++	+	N
YZ-012			-	-	N
YZ-013			+++	+	Y
YZ-014	戊糖片球菌	金针菇	+++	++	N
YZ-015			++	++	Y
YZ-016	发酵粘液乳杆菌	新疆青提、 广东糯米滋荔枝	-	-	Y
YZ-017			+	-	N
YZ-018			-	-	N
YZ-019			-	-	N
YZ-020			-	-	N
YZ-021			-	-	N
YZ-022			+	-	N
YZ-023	肠膜明串珠菌	广东糯米滋荔枝	-	-	N
YZ-024			-	-	N

注：“+++”表示 $OD_{600} > 0.5$ ；“++”表示 OD_{600} 介于 0.3~0.5；“+”表示 OD_{600} 介于 0.1~0.3；“-”表示 $OD_{600} < 0.1$ ；“Y”表示在 4% (φ) 乙醇体积分数条件下乙醇降解率 > 10 wt.%；“N”表示在 4% (φ) 乙醇体积分数条件下乙醇降解率 ≤ 10 wt.%。

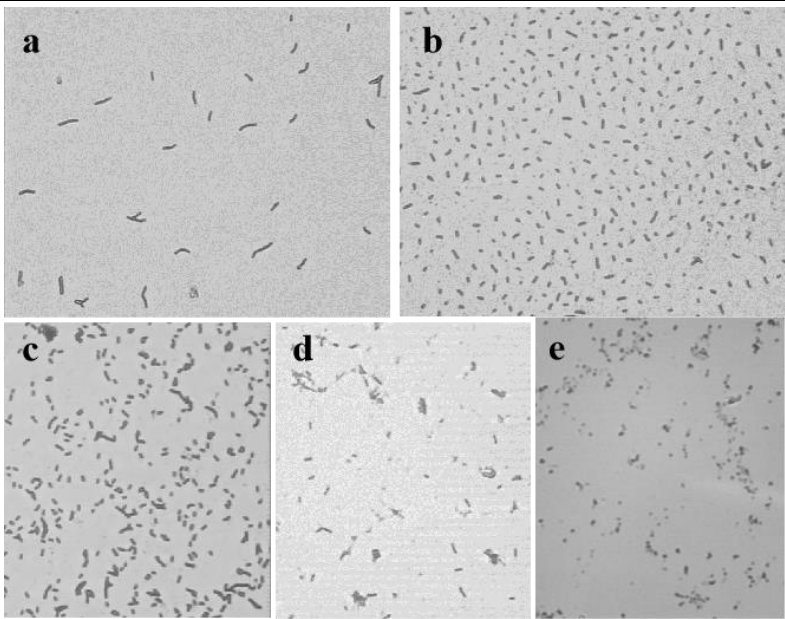


图 1 论文试验分离得到的食品源乳酸菌镜检图（代表菌种）（×400 倍）

Fig.1 Microscopic examination image of food-derived lactic acid bacteria isolated in the experiment (representative strains) (×400 magnification)

注：a: 副干酪乳酪杆菌；b: 植物乳植杆菌；c: 戊糖片球菌；d: 发酵粘液乳杆菌；e: 肠膜明串珠菌。

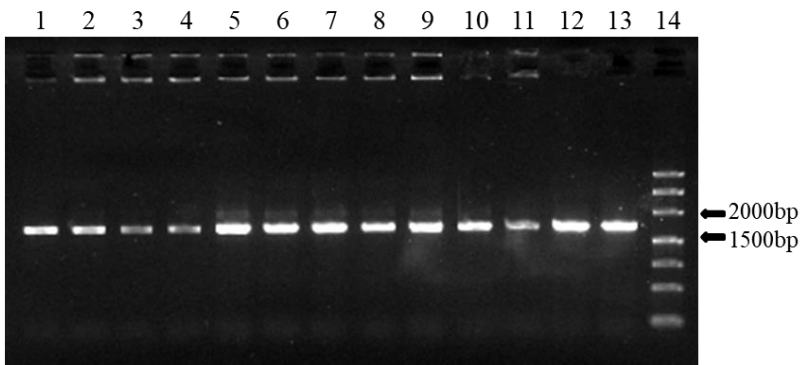


图 2 16S rDNA PCR 扩增分析

Fig.2 16S rDNA PCR amplification analysis

注：泳道 1~13: 菌株 16S rDNA；泳道 14: 分子标记 Marker 3。

2.2 耐乙醇与乙醇降解菌株的筛选

以 ΔOD_{600} 表征菌株在乙醇环境下的生长能力，对 24 株功能性较优的乳酸菌进行耐受性评价。结果显示，在 8% (φ) 乙醇条件下有 15 株菌表现出明显生长，在 12% (φ) 乙醇条件下仍有 8 株菌保持一定生长能力（表 2）。其中，植物乳植杆菌 YZ-010、YZ-011 和 YZ-013，副干酪乳酪杆菌 YZ-001 以及戊糖片球菌 YZ-014 和 YZ-015 在较高乙醇浓度下仍表现出较好的生长趋势（图 3），表明其具有较强的乙醇耐受能力。

进一步分析不同菌株在 4%、8%和 12% (φ) 乙醇条件下的降解能力（表 3）。结果表明，乙醇耐受性较强的菌株通常表现出更高的乙醇降解能力。在 4%乙醇条件下，共有 7 株菌的降解率超过 10%，其中 YZ-002、YZ-007、YZ-010 和 YZ-013 显著高于其他菌株，分别达到 26.66 wt.%、28.46 wt.%、33.01 wt.%和 24.23 wt.%；在 8% (φ) 乙醇条件下，YZ-010 和 YZ-013 仍保持较高降解能力（16.14 wt.%和 11.39 wt.%）。

上述结果表明，乳酸菌的乙醇耐受性与其乙醇降解能力之间存在一定关联，表现为耐受性较强的菌株通常具有更高的乙醇降解水平。该现象提示部分乳酸菌可能具备乙醇代谢相关功能基因并参与乙醇转化过程^[20]。综合菌株的乙醇耐受性与降解能力，选择植物乳植杆菌 YZ-010 作为后续机制研究的代表菌株。

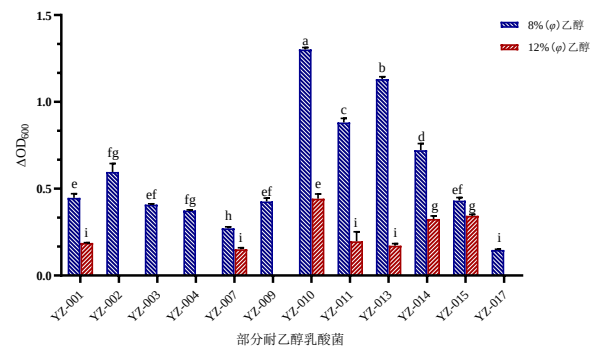


图3 乳酸菌各菌株在不同体积分数乙醇下培养 24 h 菌体密度差

Fig.3 The difference in cell density of various strains of lactic acid bacteria after 24-hour cultivation under different ethanol volume fractions

注：不同字母（a~i）表示在同一指标下差异具有统计学意义（ $P<0.05$ ）。

表 3 乳酸菌各菌株于不同乙醇体积分数下培养 24 h 的乙醇降解率

Table 3 Ethanol degradation rate of various strains of lactic acid bacteria cultured for 24 hours at different ethanol volume fractions

菌株	乙醇降解率（wt.%）		
	4%（φ）乙醇	8%（φ）乙醇	12%（φ）乙醇
YZ-002	26.66±2.24 ^{bc}	4.01±0.25 ^e	-
YZ-003	19.39±2.34 ^d	5.68±0.02 ^d	-
YZ-007	28.46±2.60 ^b	7.29±0.99 ^c	2.12±0.92 ^b
YZ-010	33.01±1.14 ^a	16.14±1.13 ^a	4.91±0.55 ^a
YZ-011	6.92±0.80 ^g	-	-
YZ-013	24.23±1.82 ^c	11.39±0.45 ^b	2.12±1.33 ^b
YZ-014	6.81±0.30 ^g	-	-
YZ-015	13.52±1.10 ^f	-	-
YZ-016	12.97±0.05 ^e	-	-

注：不同字母（a~g）表示在同一指标下差异具有统计学意义（ $P<0.05$ ）。

2.3 植物乳植杆菌 YZ-010 菌株乙醇降解效率分析

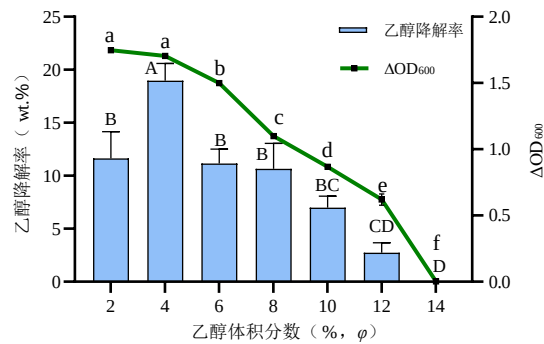


图 4 植物乳植杆菌 YZ-010 菌株在不同体积分数乙醇下的乙醇降解率及菌体密度差 ΔOD_{600}

Fig.4 Ethanol degradation rate and bacterial density difference ΔOD_{600} of YZ-010 under different volume fraction of ethanol

注：不同字母（a~f 或 A~D）表示在同一指标下差异具有统计学意义（ $P<0.05$ ）。

为进一步探究植物乳植杆菌 YZ-010 菌株是否通过乙醇代谢或以乙醇作为碳源实现体外乙醇降解作用，根据前期菌株生长曲线分析，菌株在培养 12 h 左右处于对数生长中后期，此时其生长及代谢活性较高，因此选择 12 h

作为最佳降解乙醇效率测定时间点。在不同体积分数乙醇条件下, YZ-010 菌株在 4% (φ) 乙醇培养 12 h 时乙醇降解率达到最高值 18.97 wt.% (图 4), 但在 2% 和 4% (φ) 乙醇条件下的菌体密度差异不显著。朱敏等^[21]研究表明, 适宜浓度的乙醇胁迫可增强乳酸菌的代谢活性与存活能力。因此推测, 4% (φ) 乙醇胁迫可能激活了植物乳植杆菌中与醇类转化相关的代谢酶系统。基于此, 本研究进一步选取 4% (φ) 乙醇处理条件下的 YZ-010 菌株, 对其相关代谢途径基因表达变化进行分析。

2.4 植物乳植杆菌 YZ-010 菌株在乙醇胁迫下的基因调控分析

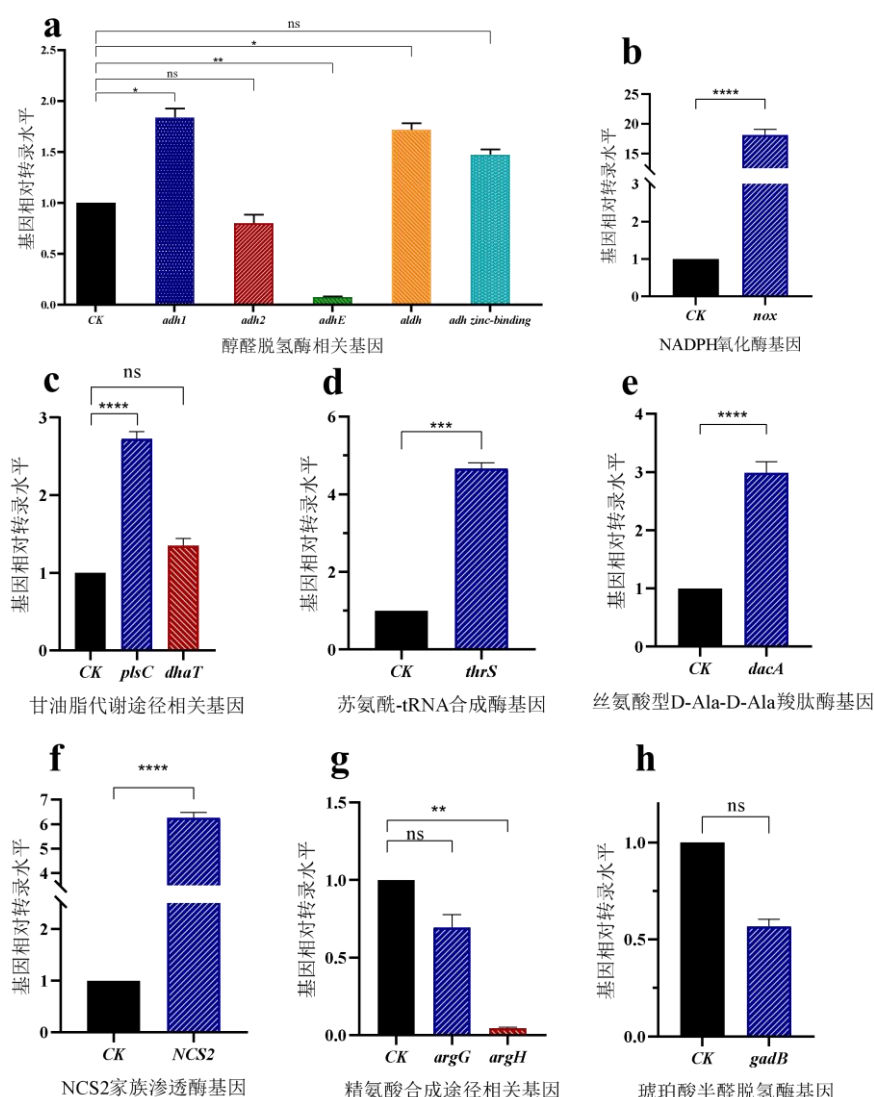


图 5 植物乳植杆菌 YZ-010 菌株乙醇耐受和降解相关调控基因的转录水平

Fig.5 Transcriptional levels of regulatory genes related to ethanol tolerance and explanation of *Lactiplantibacillus plantarum* YZ-010

注: a: 醇醛脱氢酶相关基因 *adh1*、*adh2*、*adhE*、*ald* 和 *adh zinc-binding* 的转录水平; b: NADPH 氧化酶基因 *nox* 的转录水平; c: 甘油脂代谢途径相关基因 *plsC* 和 *dhaT* 的转录水平; d: 苏氨酸-tRNA 合成酶基因 *thrS* 的转录水平; e: 丝氨酸型 D-Ala-D-Ala 羧肽酶基因 *dacA* 的转录水平; f: NCS2 家族渗透酶基因 *NCS2* 的转录水平; g: 精氨酸合成途径相关基因 *argG* 和 *argH* 的转录水平; h: 琥珀酸半醛脱氢酶基因 *gadB* 的转录水平。与对照组相比, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ 。

根据 NCBI 数据库及京都基因与基因组百科全书 (KEGG, <https://www.kegg.jp/>) 的最新注释与通路信息, 对与植物乳植杆菌 YZ-010 菌株同源性较高的功能基因进行比对分析, 重点涉及醇醛脱氢酶及其同工酶相关调控基因、嘌呤转运蛋白相关基因, 以及甘油脂代谢、氨酰-tRNA 合成、肽聚糖合成和氨基酸代谢等关键通路基因。

醇醛脱氢酶是微生物乙醇代谢过程中的关键限速酶。由图 5a 和 5b 可知, YZ-010 菌株中醇醛脱氢酶相关基因表达存在显著差异, 其中 *adh1*、*adh zinc-binding*、*ald* 和 *nox* 转录水平较对照组均显著上调, 尤其 *nox* 上调达 18.11

倍,而 *adhE* 基因表达显著下调, *adh2* 无显著变化。醇醛脱氢酶体系通常依赖 NAD^+ 、 NADP^+ 及 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 等金属辅因子,介导乙醇、乙醛与乙酰辅酶 A 之间的可逆转化过程。本研究结果表明,上述上调基因可能协同促进乙醇向乙醛及乙酰辅酶 A 的转化,从而降低体系中乙醇含量。已有研究表明,乳酸菌中醇醛脱氢酶存在底物特异性差异,其对不同醇类的催化效率可能导致表达水平差异^[22,23]。

在甘油酯代谢方面,植物乳植杆菌细胞膜重要组分磷脂酸的合成受 *plsC* 基因调控,其前体酰基-辅酶 A 可来源于脂肪酸代谢途径^[24]。由图 5c 可知, *dhaT* 与 *plsC* 基因转录水平均显著上调,其中 *plsC* 上调 2.73 倍,提示乙醇胁迫可能促进乙酰辅酶 A 积累并增强其向脂质合成通路的流动。该类代谢重定向在黑曲霉及蓝藻聚囊藻等微生物中亦有类似报道^[16,25],说明 YZ-010 菌株可能通过增强膜脂合成以维持细胞结构稳定性,从而提高乙醇耐受能力。

细胞壁与细胞膜结构同样是抵御乙醇胁迫的重要屏障。由图 5d 和 5e 可知, *thrS* 与 *dacA* 基因转录水平显著上调,分别较对照组提高 4.67 倍和 6.26 倍。*thrS* 编码苏氨酸-tRNA 合成酶,参与氨酰-tRNA 生成,在蛋白质合成及肽聚糖交联过程中具有重要作用^[26]。丝氨酸型 D-Ala-D-Ala 羧肽酶基因 *dacA* 负责去除糖肽细胞壁前体的 D-丙氨酰残基,进而催化合成肽聚糖和有助于细胞壁结构重塑。因此,YZ-010 菌株可能通过增强细胞壁相关蛋白合成与肽聚糖代谢,提高细胞结构完整性与渗透屏障功能,从而增强抗乙醇胁迫能力^[27,28]。

大肠杆菌中的 NCS2 家族渗透酶已被报道对腺嘌呤、鸟嘌呤及次黄嘌呤等嘌呤类物质具有较高的摄取亲和力^[29],可为细胞核苷酸合成、DNA 修复以及碳氮源补给提供重要底物支持。由图 5f 可知, YZ-010 菌株中 NCS2 渗透酶相关基因转录水平显著上调,表明在乙醇胁迫条件下,该菌株可能通过增强外源嘌呤摄取能力,提高核苷酸代谢水平,从而为细胞生长及能量代谢提供额外底物来源。

在氨基酸代谢方面(图 5g 和 5h),精氨酸合成途径中的 *argG* 和 *argH* 基因转录水平均显著下调,同时参与琥珀酸代谢的 *gadB* 基因表达亦呈下降趋势。植物乳植杆菌作为兼性厌氧菌,其能量代谢在一定程度上依赖氨基酸代谢途径^[30]。在精氨酸代谢过程中,琥珀酸裂解酶与精氨酸琥珀酸合成酶是介导瓜氨酸向精氨酸转化的关键酶,而精氨酸可通过脱氨作用生成 NH_4^+ 并产生 ATP,从而中和胞内 H^+ 、维持 pH 值稳态。此外, *gadB* 编码的琥珀酸半醛脱氢酶不仅参与氨基酸代谢,还可促进对吡啶环、糠醛及 5-羟甲基糠醛等应激相关底物的利用。然而,本研究结果显示上述基因整体下调,提示 YZ-010 菌株在乙醇胁迫条件下可能非主要依赖经典氨基酸代谢途径供能,而是通过其他替代性碳源利用或能量获取机制维持细胞代谢平衡,但其具体调控机制仍有待进一步深入解析。

3 结论

本研究从不同食品来源分离获得乳酸菌资源,筛选出具有较强乙醇耐受性与乙醇降解能力的优势菌株。其中,植物乳植杆菌 YZ-010 在 4% (φ) 乙醇条件下表现出最高降解率(33.01 wt.%),且在较高乙醇浓度下仍保持良好生长性能,综合表现最优。基因表达分析表明,在乙醇胁迫下, YZ-010 菌株通过上调醇醛脱氢酶相关基因(*nox*、*aldh*、*adh1* 和 *adh zinc-binding*)促进乙醇向乙酰辅酶 A 转化,同时增强甘油酯代谢(*plsC* 和 *dhaT*)、氨酰-tRNA 合成(*thrS*)、肽聚糖合成(*dacA*)及嘌呤转运(*NCS2*)等相关通路,以维持细胞结构稳定并提高环境适应能力;而氨基酸代谢相关基因(*argG*、*argH* 和 *gadB*)下调,表明其在乙醇胁迫下可能通过代谢途径重编程实现能量供给优化。综上,植物乳植杆菌 YZ-010 菌株通过协同调控乙醇代谢与细胞结构稳态实现对乙醇环境的适应与利用。本研究为乳酸菌解酒功能菌株的筛选及乙醇耐受和代谢分子机制的解析提供了理论依据。

参考文献

- [1] HONG J X, ZHAO D R, SUN B G. Research progress on the profile of trace components in Baijiu [J]. Food Reviews International, 2023, 39(3): 1666-1693.
- [2] KANG Q, SUN J Y, WANG B W, et al. Wine, beer and Chinese Baijiu in relation to cardiovascular health: The impact of moderate drinking [J]. Food Science and Human Wellness, 2023, 12(1): 1-13.
- [3] DEVARBHAVI H, ASRANI S K, ARAB J P, et al. Global burden of liver disease: 2023 update [J]. Journal of Hepatology, 2023, 79(2): 516-537.
- [4] RADY E D, ANOUTI A, MITCHELL M C, et al. Current clinical trials for alcohol-associated hepatitis [J]. The American Journal of Pathology, 2026, 196(1): 182-191.

- [5] TORP N, ISRAELSEN M, KRAG A. The steatotic liver disease burden paradox: unravelling the key role of alcohol [J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2025, 22: 281-292.
- [6] VACCA A, BULFONE L, CICCIO S, et al. Alcohol intake and arterial hypertension: retelling of a multifaceted story [J]. *Nutrients*, 2023, 15(4): 958.
- [7] HILL C, GUARNER F, REID G, et al. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic [J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2014, 11(8): 506-514.
- [8] 张春芝,江志国.微生物对葡萄酒香气的影响综述[J].*中国酿造*,2013,32(9):28-31.
- [9] 杜海,邢敏钰,徐岩,等.芝麻香型白酒酿造过程中乳酸菌分离及其碳源利用特征[J].*食品与发酵工业*,2018,44(1):13-18.
- [10] SHARAFEDTINOV K K, PLOTNIKOVA O A, ALEXEEVA R I, et al. Hypocaloric diet supplemented with probiotic cheese improves body mass index and blood pressure indices of obese hypertensive patients-a randomized double-blind placebo-controlled pilot study [J]. *Nutrition Journal*, 2013, 12: 138.
- [11] SAEZ-LARA M J, GOMEZ-LLORENTE C, PLAZA-DIAZ J, et al. The role of probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria in the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and other related diseases: a systematic review of randomized human clinical trials [J]. *Biomed Research International*, 2015, 2015: 505878.
- [12] D'AMELIO P, SASSI F. Gut microbiota, immune system, and bone [J]. *Calcified Tissue International*, 2018, 102(4): 415-425.
- [13] SÁEZ-LARA M J, ROBLES-SANCHEZ C, RUIZ-OJEDA F J, et al. Effects of probiotics and synbiotics on obesity, insulin resistance syndrome, type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease: a review of human clinical trials [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(6): 928.
- [14] 吴博.益生菌发酵乳解酒护肝功效评价[D].哈尔滨:黑龙江大学,2022.
- [15] CAO Y, MU H, GUO J, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the utilization of ethanol [J]. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 2020, 27(1): 1-10.
- [16] VINAYAVEKHIN N, KONGCHAI W, PIAPUKIEW J, et al. *Aspergillus niger* upregulated glycerolipid metabolism and ethanol utilization pathway under ethanol stress [J]. *Microbiologyopen*, 2020, 9(1): e00948.
- [17] KAMIHARA T. Ethanol utilization by *Streptococcus faecalis* [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1969, 133(1): 137-143.
- [18] 高慧.快速解酒厌氧微生物的筛选鉴定及其解酒能力研究[D].杭州:浙江大学,2016.
- [19] 赵逸,陈海盈,李舒丽,等.北冬虫夏草角鲨烯单氧酶基因的类胡萝卜素生物合成功能解析[J].*现代食品科技*,2021,37(9):37-42+278.
- [20] WANG J L, LU C S, XU Q, et al. Comparative genomics analysis provides new insights into high ethanol tolerance of *Lactiplantibacillus pentosus* LTJ12, a novel strain isolated from chinese baijiu [J]. *Foods*, 2022, 12(1): 35.
- [21] 朱敏,李宝坤,李开雄,等.乙醇胁迫对乳酸杆菌关键酶活力的影响[J].*食品与发酵工业*,2015,41(1):40-45.
- [22] LANDETE J M, RODRÍGUEZ H, DE LAS RIVAS B, et al. Characterization of a benzyl alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus plantarum* WCFS1 [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(12): 4497-4503.
- [23] HU Z, JIA P, BAI Y, et al. Characterisation of five alcohol dehydrogenases from *Lactobacillus reuteri* DSM20016 [J]. *Process Biochemistry*, 2019, 86: 73-79.
- [24] DOI Y. Glycerol metabolism and its regulation in lactic acid bacteria [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(13): 5079-5093.
- [25] VIDAL R. Alcohol dehydrogenase adhA plays a role in ethanol tolerance in model *Cyanobacterium Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(8): 3473-3482.
- [26] RAJBHANDARY U L, SÖLL D. Aminoacyl-tRNAs, the bacterial cell envelope, and antibiotics [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(14): 5285-5286.
- [27] 赵文英,李华,王华.酒酒球菌(*Oenococcus oeni*)胁迫适应性反应机制[J].*微生物学报*,2008,4:556-561.
- [28] SALAS-JARA M, ILABACA A, VEGA M, et al. Biofilm forming *Lactobacillus*: new challenges for the development of probiotics [J]. *Microorganisms*, 2016, 4(3): 35.
- [29] PAPAKOSTAS K, BOTOU M, FRILLINGOS S. Functional identification of the hypoxanthine/guanine transporters YjcD and YgfQ and the adenine transporters PurP and YicO of *Escherichia coli* K-12 [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(52): 36827-36840.
- [30] POOLMAN B. Energy transduction in lactic acid bacteria [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 1993, 12(1-3): 125-147.