

牦牛曲拉源乳酸菌的 耐受性与抑菌性能比较

朱建宁¹, 曹磊², 文鹏程², 杨敏³, 汪月², 张忠明², 张卫兵^{2,*}

(1. 甘肃省药品监督管理局审评认证中心, 甘肃兰州 730070;

2. 甘肃农业大学食品科学与工程学院, 甘肃兰州 730070;

3. 甘肃农业大学理学院, 甘肃兰州 730070)

摘要:以源于牦牛曲拉的6株益生乳酸菌为研究对象,比较了耐酸能力、耐胆盐能力、耐渗透压能力和抑菌性能。结果表明:6株乳酸菌菌株的耐酸能力、耐胆盐能力、耐渗透压能力和抑菌性能各不相同。菌株G2、G4、Q1对酸性环境的耐受性最好,G2和G4的耐胆酸盐的能力最强,G2、G4、Q1对高渗透压的耐受性较强,所有菌株在模拟胃肠液环境下的存活率均在90%以上;菌株Q2对大肠杆菌的抑菌效果最强,菌株Q1次之;菌株Q1和Q2对金黄色葡萄球菌的抑制效果较好,其次是菌株G2;对沙门氏菌抑菌作用最强的为菌株Q2,抑菌能力最差为G3;对单增李斯特菌抑菌作用最强的为菌株G4。研究结果可为牦牛曲拉源益生乳酸菌的应用提供理论依据。

关键词:曲拉,乳酸菌,耐受性,抑菌性能

Comparison of Tolerance and Antibacterial Activity of Lactic Acid Bacteria from Yak Qula

ZHU Jian-ning¹, CAO Lei², WEN Peng-cheng², YANG Min³,
WANG Yue², ZHANG Zhong-ming², ZHANG Wei-bing^{2,*}

(1. Review Certification Center of Gansu Drug Administration, Lanzhou 730070, China;

2. College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

3. College of Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Six strains probiotic lactic acid bacteria originated from yak Qula were used as the research objects, and their acid resistance, bile salt resistance, osmotic pressure resistance and inhibition ability were compared. The results showed that the six kinds of strains of lactic acid bacteria had different acid resistance, bile salt resistance, osmotic pressure resistance and inhibition ability. Strains G2, G4 and Q1 were best tolerant to acidic environments. Strains G2 and G4 had the strongest cholate tolerance. Strains G2, G4, and Q1 had strong resistance to high osmotic pressure. The survival rate of all strains in simulated gastrointestinal fluid were over 90%. Strain Q2 had the strongest antibacterial effect against *Escherichia coli*, followed by the strain Q1. Strain Q1 and Q2 had a better inhibitory effect on *Staphylococcus aureus*, followed by strain G2. Strain with the strongest antibacterial activity against *Salmonella* was strain Q2, and the worst antibacterial ability was strain G3. The strongest antibacterial activity against *Listeria monocytogenes* was the strain G4. The research results can provide a theoretical basis for the application of probiotic lactic acid.

Key words: Qula; lactic acid bacteria; tolerance; inhibition ability

中图分类号: TS252.54

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2020)07-0115-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020.07.020

引文格式: 朱建宁, 曹磊, 文鹏程, 等. 牦牛曲拉源乳酸菌的耐受性与抑菌性能比较[J]. 食品工业科技, 2020, 41(7): 115-120, 125.

传统发酵乳制品中蕴藏着种类丰富的微生物,是益生菌的重要来源^[1-3]。牦牛曲拉是将牦牛乳脱脂后,在自然条件下进行发酵使酪蛋白凝结、干燥后

制成的一种发酵乳制品^[4]。曲拉可以直接食用,而且也是牧民制作酸奶的发酵剂^[5-7]。实验室前期从牦牛曲拉中筛选得到了发酵性能优良的乳酸菌,但对

收稿日期: 2019-07-01

作者简介: 朱建宁(1965-),女,本科,正高级工程师,主要从事食品质量管理方面的研究, E-mail: 840361110@qq.com。

* 通讯作者: 张卫兵(1974-),男,博士,教授,主要从事乳品微生物方面的研究, E-mail: 45330301@qq.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31560442, 31760466); 企业研究转化与产业化专项(2018-SF-C29)。

其益生性能尚不明确。

乳酸菌要在肠道内发挥益生作用,必须能够通过胃肠道并存活下来,因此需要对强酸、高胆酸盐和高渗透压具备一定的耐受性^[8-10]。乳酸菌具有调节肠道菌群的作用,其抑菌机理是进入肠道后,通过黏附作用定殖于肠道并排斥其它病原菌的黏附,同时可产生多种抑菌成分用于保护肠黏膜上皮细胞免受其它病原菌带来的损害^[11-12]。有研究表明,乳酸菌通过自身代谢产生各种不同类型的有机酸、H₂O₂、二乙酰和细菌素等物质可以抑制胃肠道中的有害微生物生长繁殖^[13]。临床应用表明,乳酸菌可以有效治疗肠道有害菌引起的腹泻等疾病^[9,14]。

本试验以实验室前期从牦牛曲拉中分离筛选的6株乳酸菌为研究对象,考察了它们的耐酸、耐胆盐和耐渗透压能力,同时研究了它们对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌和单增李斯特菌的抑菌性能。研究可为青藏高原极端环境条件下的传统牦牛曲拉中乳酸菌种质资源的开发利用提供重要的科学依据和理论支撑,对牦牛曲拉源乳酸菌的工业化应用及乳酸菌发酵剂制备提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

氢氧化钠 天津市大茂化学试剂厂;盐酸 天津市大茂化学试剂厂;牛胆盐 上海中秦化学试剂有限公司;氯化钠 北京中科百奥生物技术公司;MRS培养基、MRS肉汤培养基及LB琼脂培养基 青岛海博生物技术有限公司;磷酸盐缓冲液(phosphate balanced solution, PBS) 北京万佳首化生物科技有限公司;胃蛋白酶(1:10000) 北京赛而生物药业有限公司;胰蛋白酶(1:250) 北京联立信生物技术有限公司;乳酸菌菌株:Q1嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)、Q2耐久肠球菌(*Enterococcus durans*)及G1、G2、G3、G4瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*) 甘肃农业大学食品科学与工程学院实验室保藏;指示菌株:大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌和单增李斯特氏菌 甘肃农业大学食品科学与工程学院实验室保藏。

SW-CJH-2FD型超净工作台 苏州净化设备有限公司;YX-280A型高压灭菌锅 上海三申医疗器械有限公司;HG303-4型电热恒温培养箱 上海一恒科学仪器有限公司;PHS-3C型pH计 上海仪电科学仪器有限公司;754 PC型紫外分光光度计 上海光谱仪器有限公司;AL 204型分析天平 上海Mettler-Toledo公司。

1.2 实验方法

1.2.1 乳酸菌耐酸能力测定 参照Gu等^[15]的方法测定。将乳酸菌活化后以3%接种量接种到pH分别为2.5、3.5、4.5和6.5的MRS液体培养基37℃培养,在0、2、4、6、12和24h时取样,测定各菌株的OD_{600nm}值。用pH为6.5,接种量为3%的MRS液体培养基作为对照,以对应pH的液体培养基调零。重复三次试验取平均值。

1.2.2 乳酸菌耐胆酸盐能力的测定 参照Gu等^[15]

的方法进行测定。将乳酸菌活化后以3%接种量接种到牛胆盐质量分数分别为0.0%、0.1%、0.3%和0.5%的MRS液体培养基37℃培养,在0、2、4、6、12和24h时取样,测定各菌株的OD_{600nm}值。用未添加胆酸盐,接种量为3%的MRS液体培养基作为对照,以对应的胆酸盐浓度液体培养基调零。重复三次试验取平均值。

1.2.3 耐渗透压能力的测定 参照吴均^[16]的方法测定。将乳酸菌活化后以3%接种量接种到NaCl质量分数分别为0%、3%、5%、7%和9%的MRS液体培养基37℃培养,分别在0、2、4、6、12和24h时取样,测定各菌株的OD_{600nm}值。用未添加NaCl,接种量为3%的MRS液体培养基作为对照,以对应的NaCl浓度液体培养基调零。重复三次试验取平均值。

1.2.4 模拟在人体胃肠道条件下的耐受性 对6株乳酸菌进行模拟人体胃肠道传输测试。模拟胃液参照Charteris等^[17]的方法:将0.35g胃蛋白酶用100mL 0.2%的无菌生理盐水稀释混匀后,将溶液用盐酸溶液调pH至2.5。模拟肠液参照Bao等^[18]的方法:将0.1g胰蛋白酶和1.8g牛胆盐加入到100mL含1.1g NaHCO₃和0.2g NaCl的蒸馏水中,混匀后用NaOH溶液将pH调至8.0。配制好的胃肠液用0.22μm的膜采用膜过滤法进行消毒备用。将乳酸菌在MRS液体培养基中37℃培养24h后,4000r/min离心5min,用pH7.0的PBS缓冲液冲洗3次,调整菌落数至10⁸~10⁹CFU/mL,并以10%的接种量转接到模拟胃液中,采用平板计数法测定0和3h的活菌数。以10%的接种量转接到模拟肠液中测定0和4h的活菌数并根据公式计算存活率。测定时间参考乳酸菌在人体胃肠道内的停留时间所确定。

$$\text{存活率}(\%) = C1/C2 \times 100$$

式中:C1为处理后的MRS液体培养基上所测得的乳酸菌活菌数(CFU/mL);C2为对照MRS液体培养基上所测得的乳酸菌活菌数(CFU/mL)。

1.2.5 乳酸菌抑菌活性的测定 参照曾小群等^[19]用牛津杯法测定。在培养皿中倒入20mL的LB琼脂培养基,待冷却凝固,将0.1mL稀释至10⁶CFU/mL的指示菌悬液涂布于LB培养基上。在每个培养皿中放入4个牛津杯,在其中三个牛津杯中加入0.2mL乳酸菌菌体浓度为10⁹CFU/mL时离心得到的乳酸菌上清液,剩余牛津杯中加入等量MRS液体培养基作为对照,于37℃培养24h,观察抑菌圈并测量抑菌圈直径大小。重复三次试验取平均值。

1.3 数据分析

全部试验数据采用Microsoft Excel 2010和SPSS 18.0(SPSS Inc., USA)数据处理系统进行分析,采用ANOVA进行方差分析,用Duncan's法进行多重显著性分析和标准偏差(±SE)计算,利用Origin 8.0软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 耐酸能力比较

强酸环境下可以抑制乳酸菌生长,甚至杀死菌体,乳酸菌到达肠道之前,必须先经过胃酸环境,因

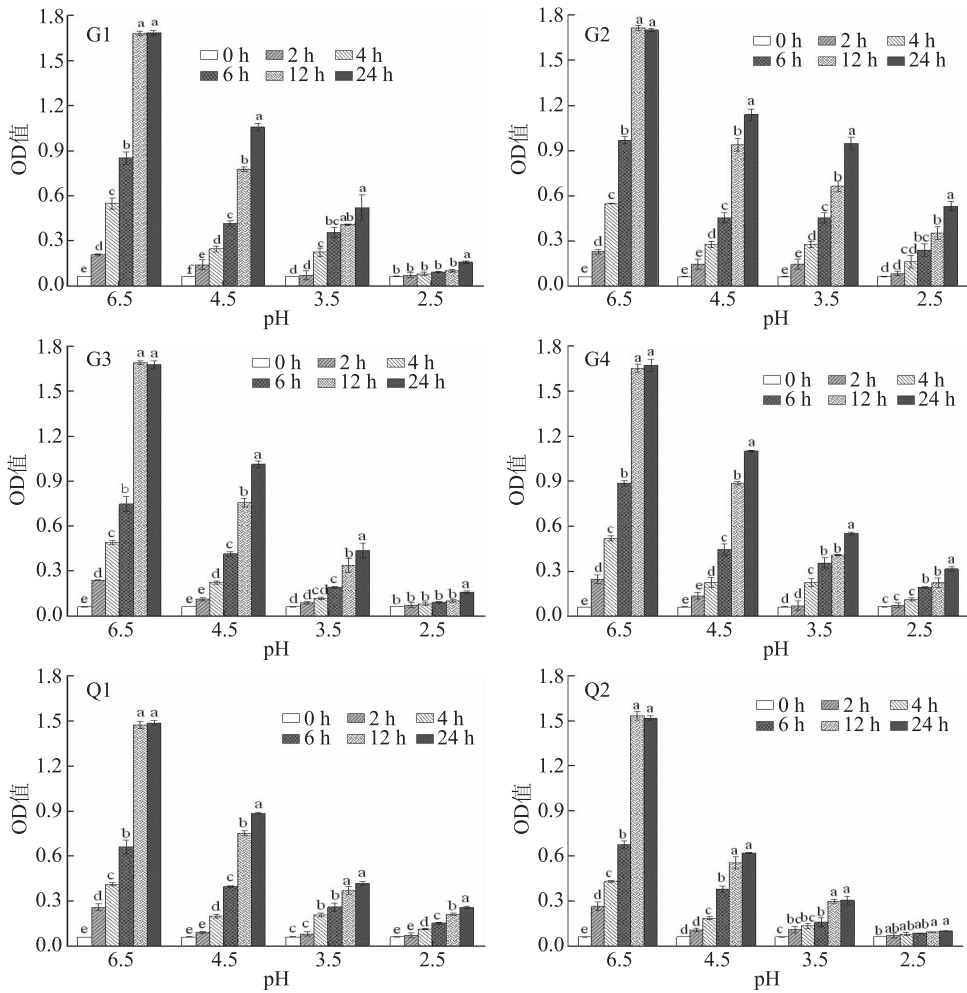


图1 不同 pH 下菌株的 OD 值

Fig.1 The OD value of tested strains in different pH

注:同一 pH 下字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

此,乳酸菌必须具有一定的耐酸能力,才能具有益生作用。根据饮食结构的不同,人体胃部的 pH 通常为 3.0 左右^[8]。测定不同 pH 下各菌株生长 24 h 内液体培养基的 OD 值,比较乳酸菌菌株的耐酸性能,结果如图 1 所示。

由图 1 可知,6 株乳酸菌在培养周期内 OD 值均随着培养基 pH 的降低而减小;同一菌株在不同 pH 时表现了不同的生长状态,在低酸性条件下大量生长繁殖,高酸性条件下呈现缓慢繁殖能力或持平的态势,表明不同菌株对酸的耐受能力不同。当培养基 pH 在 2.5 时,菌株 G2、G4、Q1 生长培养液的 OD 值随着培养时间的增加呈增大的趋势,说明菌株 G2、G4、Q1 在 pH2.5 条件下依旧能够生长繁殖,对强酸具有较好的耐受性。菌株 G1 和 G3 在 pH2.5 时,在培养周期内,OD 值缓慢增大但增幅较小,说明菌株具有一定的耐酸能力,但耐酸能力相对较弱。菌株 Q2 耐酸能力最弱,在 pH2.5 时,随着培养时间增长,菌株生长培养液 OD 值基本保持不变,表明菌体处于低生存状态,基本不生长繁殖,耐酸性能差。在 pH3.5 和 4.5 培养条件下,所有菌株的 OD 值都增大,说明各菌株对 pH3.5 存在一定的耐受性。在低 pH 条件下,菌体处于低生存状态,可能是由于 pH 过低,

导致乳酸菌无法维持自身细胞内 pH 的稳定,从而导致生长停滞,甚至衰亡^[20]。综上所述,所有乳酸菌菌株对不同的酸性条件有不同的耐受性,其中 G2、G4、Q1 对酸性环境的耐受性最好。

2.2 耐胆酸盐能力的比较

乳酸菌耐受胆酸盐的能力是其能在肠道中存活必要条件,因此耐胆酸盐能力是益生菌微生物的一个重要特征^[10]。人体小肠中胆酸盐浓度在 0.03%~0.3% 之间波动,能够在正常生理胆酸盐中生长和代谢的菌株才可能在肠道消化过程中存活^[11]。乳酸菌菌株的耐胆酸盐能力如图 2 所示。

由图 2 可知,6 株乳酸菌在培养周期内 OD 值均随着胆酸盐浓度的增大而降低,不同菌株在同一浓度胆酸盐条件下生长状态不同,表明不同菌株对胆酸盐的耐受能力不同。当胆酸盐的添加量为 0.1% 和 0.3% 时,各菌株培养基的 OD 值升高,说明所有菌株对 0.1% 和 0.3% 的胆盐具有一定的耐受性。当胆盐浓度为 0.5% 时,菌株 G2、G4 的培养液 OD 值增大,其余菌株基本保持不变,说明菌株 G2、G4 对高浓度胆盐具有一定的耐受性。不同乳酸菌菌株对胆酸盐的耐受能力存在差异,可能是由于乳酸菌种属差异及其长期所处的生存环境对菌株的影响所造成

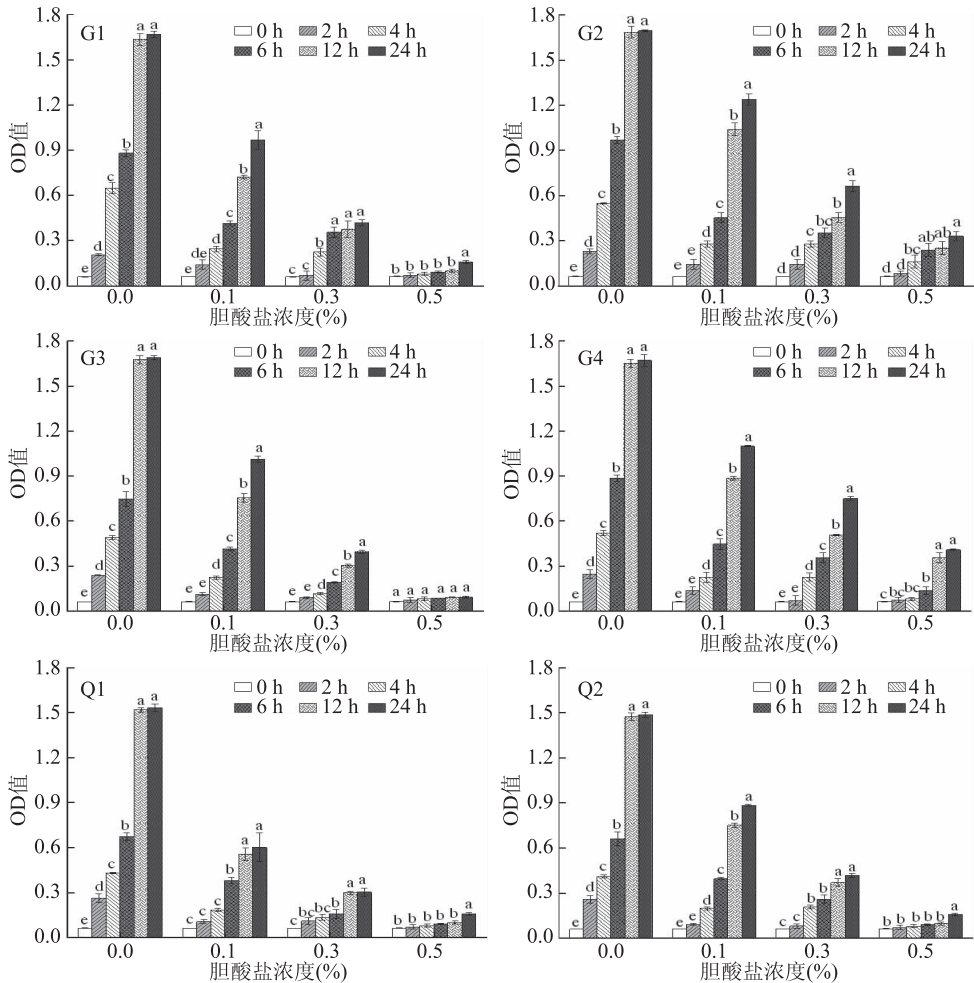


图2 不同胆盐浓度下菌株的OD值

Fig.2 The OD values of tested strains in different bile salt concentration

注:同一胆酸盐浓度下字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

的^[7]。综上所述,所有乳酸菌菌株对不同的胆酸盐浓度有不同的耐受性,其中,G2和G4的耐受性最强,G3的耐胆酸盐的能力最弱。

2.3 耐渗透压能力的比较

微生物能否在胃肠道中存活,渗透压耐受性亦是关键评价指标之一。乳酸菌菌株的耐渗透压能力如图3所示。

由图3可以看出,6株乳酸菌在培养周期内OD值均随着NaCl浓度的增大而降低;不同菌株在相同浓度NaCl环境条件下生长状态不同,表明不同菌株对NaCl的耐受能力不同。当培养液NaCl浓度为3%、5%、7%时,所有菌株培养液的OD值呈现增大的趋势,说明各菌株对3%、5%和7%浓度的渗透压具有一定的耐受性。当培养液NaCl浓度达到9%时,菌株G2、G4、Q1培养液的OD值均呈现增大的趋势,说明菌株G2、G4、Q1在高浓度的渗透压下依然能够生长繁殖,具有较好的耐渗透压的能力。其余菌株在9%NaCl浓度培养条件下培养液OD值基本保持不变,表明菌体处于低生存状态,基本不生长繁殖,耐渗透压能力差。因此,不同菌株对不同的渗透压环境具有一定的耐受性,其中,菌株G2、G4、Q1的耐受性较强。有研究指出,乳酸菌能够适应平稳的

渗透压变化,但渗透压的突然增大或减小都抑制微生物的生长,甚至导致死亡^[11]。

2.4 耐受模拟人体胃肠液能力

胃液的低pH环境和其中的胃蛋白酶对菌体的生长存在抑制作用。另外,小肠液中的各种酶和胆汁酸等也会对乳酸菌的生长产生抑制^[7]。因此,胃肠道运输测试是选择潜在益生菌的重要标准。6株乳酸菌在模拟胃液和肠液下的生存能力见图4和图5。

由图4可以知,6株菌对模拟胃液的耐受性具有相似性又存在差异,在其中培养3h后,活菌数较0h差值均小于0.78 log CFU/mL,存活率均>90%。其中,菌株G2存活率最高为94%,活菌数较0h减少0.50 log CFU/mL。由图5可以看出,所有乳酸菌菌株在模拟肠液下具有较高的存活率,在模拟肠液下生存4h后的存活率高于模拟胃液下的存活率,存活率均在92%以上。其中,菌株G2和Q1的生存能力最强,存活率达到98%,菌株G4次之,存活率为97%。综上所述,菌株G2、G4及Q1具有较好的耐受性。本研究中,所有菌株在模拟胃肠液环境下的存活率均在90%以上,活菌数减少量<0.78 log CFU/mL,这个结果高于De等^[20]的研究结果;Prasad^[21]对两株商业发酵菌株的耐受能力进行了研究,其结果低于本研究

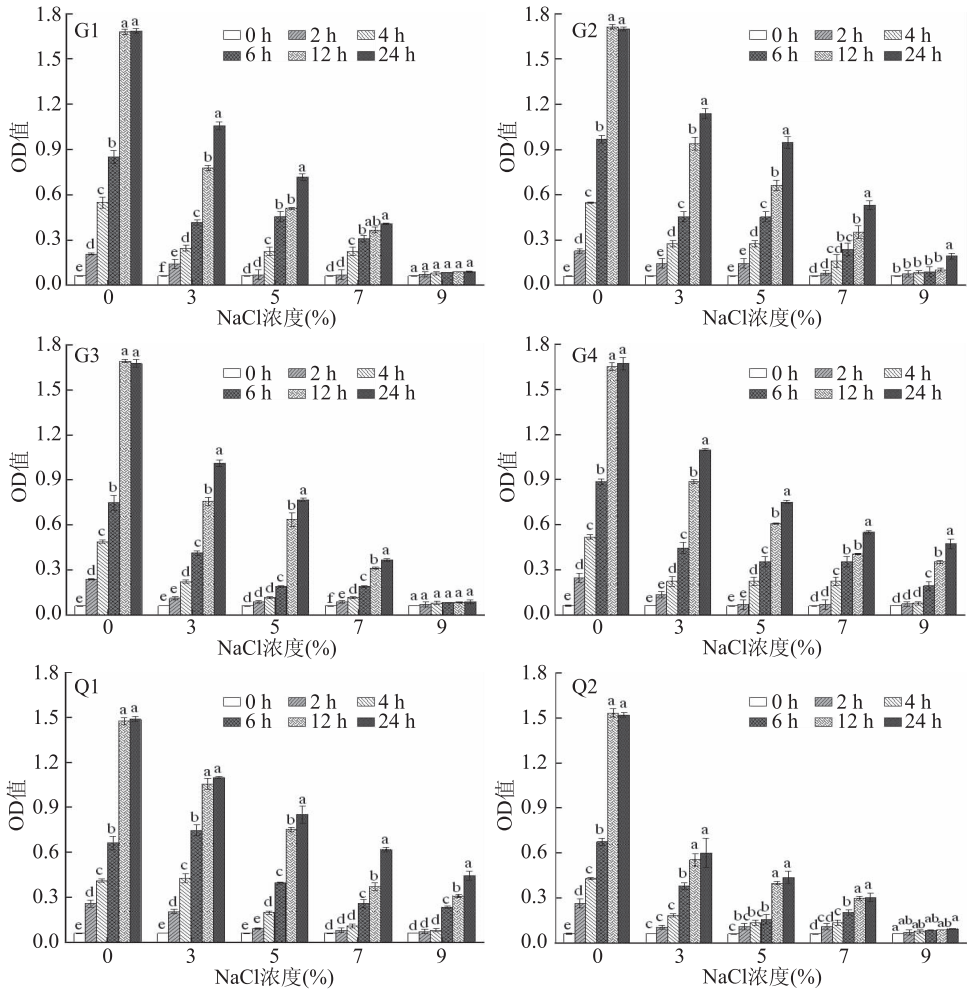


图3 不同 NaCl 浓度下菌株的 OD 值

Fig.3 The OD value of tested strains in different NaCl concentration

注:同一浓度下字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。

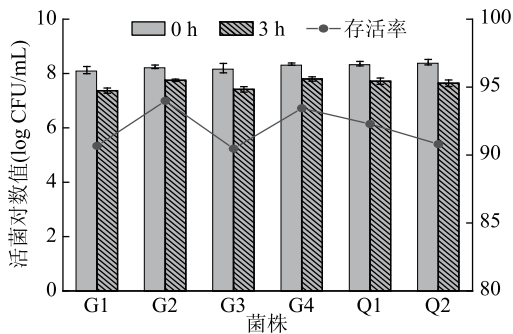


图4 菌株在模拟人体胃液条件下耐受性

Fig.4 The viable counts(log CFU/mL)and survival rates of strains after 3 h in the simulated gastric juice

的结果,活菌数减少了7.60 log CFU/mL,本研究与张蓓^[7]的研究结果活菌数减少量 < 1.00 log CFU/mL 相似。产生这种差异的原因可能归因于乳酸菌来源的不同及乳酸菌种间差异所导致。

2.5 乳酸菌抑菌特性比较

6 株乳酸菌对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌以及单增李斯特菌的抑菌能力如表 1 所示。由表 1 可以看出,本试验的乳酸菌对不同致病菌的抑菌能力存在差异。通过比较乳酸菌对大肠杆菌的抑

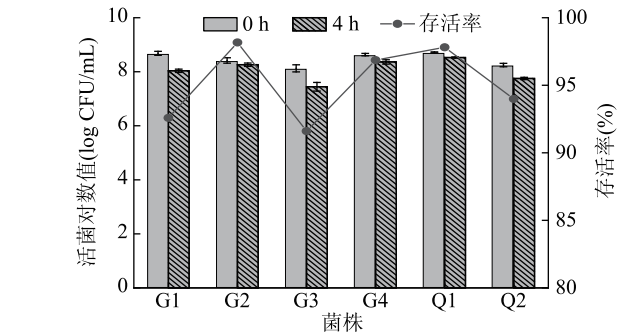


图5 菌株在模拟人体肠液条件下耐受性

Fig.5 The viable counts(log CFU/mL)and survival rates of strains after 4 h in the simulated intestinal juice

菌效果,菌株 Q2 的抑菌效果最强,其抑菌圈直径为 (17.57 ± 0.32) mm,菌株 Q1 的抑菌效果仅次于菌株 Q2 为 (16.55 ± 0.30) mm,抑菌能力最差为菌株 G3,其抑菌圈直径为 (13.26 ± 0.28) mm;比较乳酸菌对金黄色葡萄球菌的抑制效果,菌株 Q1 和 Q2 的抑菌圈直径分别达到 (15.49 ± 0.39) 和 (15.46 ± 0.46) mm,抑菌效果较好,其次是菌株 G2,其抑菌圈达到 (14.87 ± 0.10) mm;对沙门氏菌抑菌作用最强的为菌株 Q2,抑菌圈直径为 (16.04 ± 0.67) mm,抑菌能力最差为

表1 乳酸菌菌株的抑菌结果
Table 1 Results on the antibacterial activity of LAB strains

指示菌株	抑菌圈直径(mm)					
	G1	G2	G3	G4	Q1	Q2
大肠杆菌	14.71 ± 0.65 ^d	16.20 ± 0.13 ^{bc}	13.26 ± 0.28 ^c	15.57 ± 0.38 ^c	16.55 ± 0.30 ^b	17.57 ± 0.32 ^a
金黄色葡萄球菌	13.76 ± 0.11 ^d	14.87 ± 0.10 ^b	13.37 ± 0.22 ^d	14.31 ± 0.18 ^b	15.49 ± 0.39 ^a	15.46 ± 0.46 ^a
沙门氏菌	12.44 ± 0.15 ^e	15.44 ± 0.21 ^b	11.37 ± 0.17 ^f	13.47 ± 0.15 ^d	14.59 ± 0.24 ^c	16.04 ± 0.67 ^a
单增李斯特氏菌	13.55 ± 0.30 ^d	15.71 ± 0.32 ^c	13.65 ± 0.14 ^d	16.66 ± 0.31 ^a	14.55 ± 0.42 ^c	14.40 ± 0.22 ^c

注:同一行中不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

G3, 抑菌圈直径为(11.37 ± 0.17) mm;对单增李斯特菌抑菌作用最强的为菌株 G4, 抑菌圈直径为(16.66 ± 0.31) mm。

不同乳酸菌的抑菌能力存在差异,研究表明革兰氏阳性菌对乳酸杆菌更加敏感^[22]。万金敏^[23]对传统发酵牦牛乳中的5株乳酸菌研究发现,其抑菌圈最大直径在15.24~18.21 mm之间变化,与本文的研究结果较一致。而吴均^[16]对耐久肠球菌抑菌性能研究发现,其抑菌圈在9.50~12.70 mm的范围内,低于本研究的结果。另外,乳酸杆菌与乳酸球菌的抑菌性能存在一定差异,张蓓^[7]对曲拉中乳酸杆菌研究发现,所有菌株对大肠杆菌的抑菌性较差,这与本文的研究结果存在差异,可能原因是菌株种间的差异所导致。总体来看,在本研究中的6株菌既能抑制G⁺菌,又能抑制G⁻菌,说明它们具有相对较宽的抑菌谱。

3 结论

菌株耐受性试验结果表明,6株乳酸菌菌株的耐酸能力、耐胆盐能力和耐渗透压能力各不相同,其中菌株G2、G4、Q1对酸性环境的耐受性最好,G2和G4的耐胆酸盐的能力最强,G2、G4、Q1对高渗透压的耐受性较强,所有菌株在模拟胃肠液环境下的存活率均在90%以上;

菌株抑菌试验结果表明,6株乳酸菌菌株的抑菌性能各不相同,其中菌株Q2对大肠杆菌的抑菌效果最强,菌株Q1次之;菌株Q1和Q2对金黄色葡萄球菌的抑制效果较好,其次是菌株G2;对沙门氏菌抑菌作用最强的为菌株Q2,最差的为G3;对单增李斯特氏菌抑菌作用最强的为菌株G4。

综合比较,菌株G2、G4、Q1耐受能力及抑菌能力较为突出,具有开发利用价值。

参考文献

- [1] 廖钰婷,吴均,龙谦,等.西藏牧区自然发酵牦牛奶的乳酸菌菌种筛选及工艺优化[J].食品科学,2015,36(11):140-144.
- [2] 丁武蓉.青藏高原传统发酵牦牛奶中乳酸菌多样性及其益生功能研究[D].兰州:兰州大学,2014.
- [3] 杨俊俊.西藏牦牛奶渣中微生物的分离鉴定及优良乳酸菌的筛选[D].杨凌:西北农林科技大学,2014.
- [4] 陈梦音,王琳琳,韩玲,等.基于主成分和聚类分析的曲拉品质的综合评价[J].食品科学,2017,38(13):102-107.
- [5] Liu H N, Zhang C, Zhang H, et al. pH treatment as an effective

tool to select the functional and structural properties of yak milk caseins[J]. Journal of Dairy Science, 2013, 96(9):5494-5500.

[6] Zhang B, Tan Z F, Wang Y P, et al. Dynamic changes of the microbial communities during the preparation of traditional Tibetan Qula cheese[J]. Dairy Science & Technology, 2015, 95(2):1-14.

[7] 张蓓.藏族传统曲拉制作过程中乳酸菌群变化及曲拉中益生性乳酸杆菌的筛选和功能性评价[D].郑州:郑州大学,2017.

[8] Solieri L, Bianchi A, Mottolise G, et al. Tailoring the probiotic potential of non-starter *Lactobacillus* strains from ripened Parmigiano Reggiano cheese by *in vitro* screening and principal component analysis. [J]. Food Microbiology, 2014, 38(4):240-249.

[9] Tulumoglu S, Yuksekdog Z N, Beyatli Y, et al. Probiotic properties of lactobacilli species isolated from children's feces[J]. Anaerobe, 2013, 24:36-42.

[10] 魏艳,曾小群,潘道东,等.新疆地区不同酸奶中优势乳酸菌的分离与鉴定[J].中国食品学报,2012,12(12):161-166.

[11] 王娟,赵湘涛.两株乳酸菌的耐受特性分析与研究[J].中国酿造,2013,32(11):87-90.

[12] Restalener S, Barrett K E. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) [J]. Gut, 2003, 52(7):988-997.

[13] Pringsulaka O, Thongngam N, Suwannasai N, et al. Partial characterisation of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products [J]. Food Control, 2012, 23(2):547-551.

[14] Asurmendi P, Garcia M J, Pascual L, et al. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* by lactic acid bacteria isolated from brewer's grains used as feedstuff in Argentina [J]. Journal of Stored Products Research, 2015, 61:27-31.

[15] Gu R X, Yang Z Q, Li Z H, et al. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from stool samples of longevous people in regions of Hotan, Xinjiang and Bama, Guangxi, China [J]. Anaerobe, 2008, 14(6):313-317.

[16] 吴均.牦牛奶乳中优良乳酸菌的筛选鉴定及发酵酸乳抗氧化特性研究[D].重庆:西南大学,2014.

[17] Charteris W P, Kelly P M, Morelli L, et al. Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract [J]. Journal of

(下转第125页)

瑰提取液添加 20 mL/100 mL,蔗糖添加 5 g/100 mL,苹果浓缩汁添加量 3 g/100 mL。以该配方生产的苹果玫瑰复合果醋饮料产品,按照 GB/T 30884-2014 的要求进行理化指标、微生物指标的检测,测定结果显示产品理化指标、微生物指标符合国家标准要求。

与单一苹果醋饮料对比分析,研究结果显示复合苹果醋饮料中氨基酸种类及含量较单一苹果醋丰富,必需氨基酸含量及比例较高。复合果醋饮料中氨基酸总量达到 441.47 $\mu\text{g}/\text{mL}$,必需氨基酸总量为 273.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$,占总氨基酸含量的 61.92%。对果醋饮料中的单体酚类物质含量进行分析,结果显示苹果玫瑰复合果醋饮料中单体酚类物质含量较单一苹果醋饮料中物质浓度明显提高,7 种单体酚总量达 266.97 $\mu\text{g}/\text{mL}$,物质浓度提高 164 倍。其中没食子酸含量达到 162.42 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、香草酸含量达到 97.09 $\mu\text{g}/\text{mL}$,咖啡酸含量达到 3.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。对果醋饮料中矿质元素钙、铁、钾、钠含量进行分析,结果显示复合配比工艺并不影响几种矿质元素的含量。以上这些结论可为苹果醋饮料复合加工及新产品开发提供理论依据。本实验研究过程中因受实验条件限制,单体酚种类测定较少,特别是苹果醋中含量较高的绿原酸、根皮苷等物质,将在今后的实验中进一步补充研究。

参考文献

[1] 刘芳,张奶英,刘书亮,等.四川麸醋发酵过程中有机酸及游离氨基酸含量变化分析[J].食品与机械,2017,33(7):11-15.

[2] 孙立军,郭玉蓉,李景景,等.长富2号苹果果肉中游离氨基酸地域特性分析[J].食品科学,2012,33(5):53-57.

[3] 侯丽娟,严超,齐晓茹,等.不同种类水果醋中酚类物质测定与比较[J].食品工业,2016,37(11):151-154.

[4] Fushimi T, Tayama K, Fukaya M, et al. Acetic acid feeding enhances glycogen repletion in liver and skeletal muscle of rats [J]. Journal of Nutrition, 2001, 131(7):1973-1977.

[5] Ubeda C, Hidalgo I C, Torija M J, et al. Evaluation of antioxidant activity and total phenols index in persimmon vinegars produced by different processes [J]. LWT - Food Science and Technology, 2011, 44(7):1591-1596.

[6] 杨盛鑫.国苦水玫瑰精油加工过程废水中玫瑰红色素的回收工艺研究[D].兰州:西北师范大学,2015.

[7] Ajay Pal, Bharat Bhushan, Rajesh Kumari Narwal, et al. Extraction and evaluation of antioxidant and free radical

scavenging potential correlated with biochemical components of red rose petals [J]. Iranian Journal of Science and Technology, 2016(8):1-10.

[8] Min Um, Tae-Ho Han, Jae-Won Lee. Ultrasound-assisted extraction and antioxidant activity of phenolic and flavonoid compounds and ascorbic acid from rugosa rose (*Rosa rugosa* Thunb.) fruit [J]. Food Science and Biotechnology, 2017(12):1-8.

[9] 李霖昕,蒋玉梅,李鹏飞.苦水玫瑰不同部位提取液的抗氧化能力研究[J].营养学报,2014,36(2):204-208.

[10] 赵敏,窦冰然,骆海燕,等.苹果醋发酵工艺及醋饮料的研究[J].食品工业,2016,37(4):27-29.

[11] 张海涛,刘新利.苹果醋研制及氨基酸分析[J].山东轻工业学院学报,2010,24(1):41-44.

[12] 李曦,陈健,唐伟,等.苹果醋饮料中的有机酸分析[J].食品与发酵工业,2017,43(2):220-224.

[13] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.GB/T12456-2008 食品中总酸的测定[S].北京:中国标准出版社,2008.

[14] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.GB/T 5009.157 食品中有机酸的测定[S].北京:中国标准出版社,2016.

[15] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.SN/T 2007-2007 进出口果汁中乳酸、柠檬酸、富马酸含量检测方法[S].北京:中国标准出版社,2007.

[16] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.GB/T 5009.41 食醋卫生标准的分析方法[S].北京:中国标准出版社,2003.

[17] 国家卫生部.GB/T 4789.2 食品安全国家标准食品微生物学检验[S].北京:中国标准出版社,2010.

[18] 陈蓉,张超,顾倩,等.柱前衍生-HPLC法同时测定不同产地茯苓中18种氨基酸含量[J].药物分析杂志,2017,37(2):297-303.

[19] 李晓娇,王晓宇,袁静,等.苹果醋、柿子醋、猕猴桃醋中酚类物质测定与比较[J].食品与发酵工业,2013,39(6):186-190.

[20] 高志勇,刘史力,张洪利,等.火焰原子吸收光谱法测定火棘果中金属元素含量[J].化学与生物工程,2019,36(4):65-68.

[21] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.GB/T 30884-2014 苹果醋饮料国家标准[S].北京:中国标准出版社,2014.

(上接第 120 页)

Applied Microbiology, 1998, 84(5):759-68.

[18] Bao Y, Zhang Y, Zhang Y, et al. Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products [J]. Food Control, 2010, 21(5):695-701.

[19] 曾小群,潘道东,杨瑶,等.一株高效降解胆固醇乳酸菌的筛选鉴定及其益生潜能初探[J].食品科学,2009,30(21):241-245.

[20] De Almeida J, Washington L G, De Sju, et al. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated

from goat milk [J]. Food Control, 2015, 53:96-103.

[21] Prasad G. Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics [J]. International Dairy Journal, 1998, 8(12):993-1002.

[22] Aymerich M T, Garriga M, Monfort J M, et al. Bacteriocin-producing lactobacilli in Spanish-style fermented sausages: Characterization of bacteriocins [J]. Food Microbiology, 2000, 17(1):33-45.

[23] 万金敏.西藏传统发酵乳制品中优良乳酸菌的筛选及发酵性能研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2017.