

传统发酵牦牛酸乳中细菌素产生菌的筛选与鉴定

Screening and identification of lactobacillin-producing strain in traditional yak yogurt

张梅梅^{1,2,3} 索化夷^{1,2} 赵欣³ 骞宇³

ZHANG Mei-mei^{1,2,3} SUO Hua-yi^{1,2} ZHAO Xin³ QIAN Yu³

李键⁴ 丁阳平¹ 张玉¹

LI Jian⁴ DING Yang-ping¹ ZHANG Yu¹

(1. 西南大学食品科学学院, 重庆 400715; 2. 西南大学重庆市特色食品工程技术研究中心, 重庆 400715; 3. 重庆第二师范学院重庆市功能性食品协同创新中心, 重庆 400067; 4. 西南民族大学生命科学与技术学院, 四川 成都 610041)
(1. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Chongqing Engineering Research Center of Regional Food, Chongqing 400715, China; 3. Chongqing Collaborative Innovation Center for Functional Food, Chongqing University of Education, Chongqing 400067, China; 4. College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu, Sichuan 610041, China)

摘要:从西藏羊八井地区、云南香格里拉的传统牦牛酸乳中分离出 26 株乳酸菌,以枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌以及酿酒酵母为指示菌。采用牛津杯双层琼脂扩散法检测菌株的抑菌谱大小,并经过有机酸排除、过氧化氢排除、蛋白酶水解检测试验,最终筛选得到 5 株产细菌素的菌株,编号分别为 3、23、24、21 和 25。通过微生物形态学与 16S rDNA 序列同源性分析,鉴定这些菌株分别为干酪乳杆菌、植物乳杆菌和乳酸乳球菌乳亚种。抑菌谱试验表明,这些细菌素能够抑制部分食源性革兰氏阳性菌和阴性致病菌,对真菌无抑菌活性。

关键词:牦牛酸乳;乳酸菌;细菌素;筛选;鉴定

Abstract: The 26 strains isolated from traditional fermented yak milk in Yangbajin-Tibet and Yunnan-Shanggrila area. In this study, the inhibitory spectrum of the selected strain was determined by Oxford cup double agar diffusion method *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and Yeast was taken as the indicator, to screen out lactic acid bacteria with high antibacterial activity from va-

rious stains. At the same time, according to the exclusion of organic acids, hydrogen peroxide and proteolysis detection, speculated that the inhibitory effect of lactic acid bacteria may come from lactobacillin. The results showed that 3, 21, 23, 24, 25 strains have higher antibacterial activity. And 5 strains were identified by 16S rDNA sequence analysis. The 3, 23 and 24 as *Lactobacillus casei*, 21 as *Lactobacillus plantarum*, 25 as *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Antibacterial spectrum test showed that lactobacillin could effectively inhibit some food-borne gram positive and negative bacteria. All isolated strains had no antimicrobial activity against fungi.

Keywords: yak yogurt; Lactic acid bacteria; bacteriocin; strain screen; identification

牦牛是极端高原环境下的代表性家畜,在中国主要分布于青藏高原地区,是牧民主要的生产生活资料^[1]。中国共有牦牛 1 400 多万头,占全世界牦牛总数的 95% 以上^[2]。牦牛酸乳是由牦牛乳经传统发酵方法制得,发酵过程受极端环境因素的影响,有着复杂的微生物菌群,研究^[3]表明这些牦牛酸乳中蕴含着丰富的乳酸菌资源。

细菌素是指乳酸菌在代谢过程中由核糖体合成的一类具有抑菌活性的多肽或蛋白质复合物^[4]。它可以选择性地杀死肠道内有害微生物、提高肠道免疫力,控制大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌等食源性致病菌,抑制或消灭乳制品、肉制品、果汁饮料等食品中的腐败菌,代替抗生素作为饲料添加剂^[5-7]。具替代天然防腐剂和抗生素的潜在应用价值,因此是乳酸菌功能性研究领域的一大热点。

基金项目:国家公益性行业(农业)科研专项(编号:201303085);重庆市社会民生科技创新专项(编号:cstc2015shmszx80021);重庆市特色食品工程技术研究中心能力提升项目(编号:cstc2014ptgc8001);重庆市功能性食品协同创新中心建设项目(编号:167001);中央高校基本业务费专项资金(编号:XDJK2017D122)

作者简介:张梅梅,女,西南大学在读硕士研究生。

通信作者:索化夷(1978—),男,西南大学副教授,博士。

E-mail: birget@swu.edu.cn

收稿日期:2017-01-01

传统发酵的牦牛酸乳中蕴含着丰富的乳酸菌资源,从中筛选出抑菌活性强的细菌素产生菌,对于细菌素的制备和投入生产具有重要意义。目前只有少数学者研究的细菌素产生菌株来源于青藏高原的牦牛酸乳。陈芝兰等^[8]从西藏地区发酵牦牛乳中分离出 7 株产细菌素的乳酸菌,研究表明这些菌株发酵上清液对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌有明显抑制作用,对真菌无抑制活性。杨吉霞等^[9]从青藏高原的牦牛奶酪中筛选出 Y13 菌株,其细菌素粗提液对蜡芽孢杆菌、大肠埃希菌、单增李斯特菌、费氏柠檬酸杆菌和鼠伤寒沙门氏菌有较强的抑制作用。丁武蓉^[10]从青藏高原的牦牛酸乳中筛选出德氏乳杆菌保加利亚亚种 F17,其对金黄色葡萄球菌和李斯特菌有抑制作用。张艳^[11]、崔琴^[12]和张丽^[13]也分别从四川和甘肃地区牦牛酸奶中筛选和鉴定产细菌素的乳酸菌菌株,其对常见的病原菌均有很好的抑制作用。本研究拟采用分离自西藏羊八井地区和云南香格里拉的 26 株乳酸菌作为供试菌株,筛选、鉴定出产细菌素的菌株,并对其抑菌特性和抑菌谱进行初步研究,以期为天然生物防腐剂工业化的开发和医药利用提供研究基础,为中国极端环境下乳酸菌菌种资源的开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料

供试菌株:26 株乳酸菌菌株,1~10 号分离自西藏羊八井地区牦牛酸乳,11~26 号分离自云南香格里拉牦牛酸乳;

指示菌:致病性菌株(枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌)、非致病性菌株(酿酒酵母),均为西南大学食品科学学院保藏。

1.1.2 试剂

琼脂、MRS 肉汤、LB 肉汤、马铃薯葡萄糖肉汤、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶;生化试剂,北京索莱宝科技有限公司;

细菌基因组 DNA 提取试剂盒(DP302)、2×Taq PCR MasterMix;天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 仪器与设备

电子显微镜:OLYMPUS-BX43 型,奥林巴斯有限公司;
牛津杯:内径 6 mm、外径 8 mm、高 10 mm,东台市吉泰不锈钢制品厂;

游标卡尺:0~150 mm,无锡锡工量具有限公司;
梯度 PCR 仪:SI1000 Thermal Cycler 型,美国 Bio-Rad 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 菌株的活化镜检 无菌条件下将 26 个冻干保藏管开封并加生理盐水使冻干菌体溶解呈悬浮状,吸出并移入盛有 5 mL MRS 液体培养基中,于培养箱中 37 ℃培养 24 h,即为 F1 代培养液。将 F1 代培养液以 1% 的接种量转接于 MRS 液体培养基中,37 ℃培养箱中培养 24 h,得到 F2 代菌株。分别在 MRS 固体培养基平板上划线,验证菌株纯种。与此同时,对所有菌株作革兰氏染色,电子显微镜观察染色菌体细胞,再次验证菌株纯种^[14]。

1.3.2 乳酸菌发酵上清液的制备 参考文献^[15]^[12]。

1.3.3 细菌素产生菌的初筛

(1) 指示菌悬液的制备^[15]^[12]:各指示菌经 24 h 培养后,用微量加液器取 5 mL 含盐量为 0.85% 的生理盐水冲洗长满菌落的试管斜面,菌液转装到 5 mL 的无菌试管中,振荡均匀后制得菌悬液。通过梯度浓度稀释,得到含菌量约为 10⁸CFU/mL 的指示菌菌液。

(2) 菌株抑菌谱大小及抑菌活性的检测^[16-17]:采用牛津杯双层琼脂扩散法。制成双层培养基平板后,将灭过菌的牛津杯用无菌镊子均匀地放入双层培养基平板中。放置 5 min 后,利用移液枪向每个牛津杯中加 200 μL 乳酸菌发酵上清液,分别于适宜的温度下培养 24 h 后,牛津杯中上清液已完全被吸收。采用游标卡尺测量抑菌圈的直径,挑选出抑菌效果好、抑菌谱较广的菌株。

1.3.4 细菌素产生菌的复筛 参考文献^[18-19]做排除有机酸、过氧化氢试验和对蛋白酶的敏感性试验。

1.3.5 细菌素产生菌的鉴定与系统发育树构建 取经过初筛与复筛的菌株培养液按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒的操作说明对菌株进行 DNA 提取,并储存于-20 ℃备用。PCR 反应采用 25 μL 体系:模板 1 μL、27F(10 μmol/L) 1 μL、1495R(10 μmol/L) 1 μL、2×Taq PCR MasterMix 12.5 μL,加入 ddH₂O 补足至 25 μL。设置阴性对照,加入以上除了模板的所有试剂,准备完毕后进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 1.5 min,55 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 1.5 min,共 30 个循环;72 ℃延伸 10 min。反应结束后,取 5 μL PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。由北京华大基因公司对 5 株菌 16S rDNA 进行测序。将所得序列通过 NCBI 中的 GenBank,使用 BLAST 程序进行比对分析。从 GeneBank 数据库中调取参考菌株序列,使用 Clustalx 1.83 软件进行序列匹配比对,通过 MEGA 5.0 软件中 Neighbor-Joining 构建分离菌株的系统发育树,置信度检测采用自举法,自举数据集为 1 000^[20-22]。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌活化菌株形态结构

由图 1 可知,21、23 和 25 号菌株经培养后,菌落呈乳白色,表面光滑且凸起,边缘整齐。菌株经革兰氏染色后,在显微镜下呈蓝紫色,形态分别为杆状和球形,符合乳酸菌特征。

2.2 细菌素产生菌的初筛结果

采用牛津杯双层琼脂扩散法检测抑菌谱大小,部分初筛效果见图 2,产生的抑菌谱见表 1。与前人^[15]^[43]^[18-23]的初筛结果进行对比,从 26 株乳酸菌中筛选出 7 株对致病性指示菌均有较强抑制作用的菌株。它们的编号分别为 3、10、11、21、23、24、25,抑菌结果见图 3。

由图 3 可知,所筛选出的 7 株乳酸菌菌株既抑制革兰氏阳性菌,又抑制革兰氏阴性菌,且抑菌活性较高,其上清液对枯草芽孢杆菌的抑菌效果好于金黄色葡萄球菌。由表 1 可知,21 号菌对枯草芽孢杆菌抑制效果最好,其抑制圈直径为 18.48 mm;11 号菌对大肠杆菌抑制效果最好,其抑制圈直径为 14.64 mm;21 号菌对金黄色葡萄球菌抑制效果最好,其抑

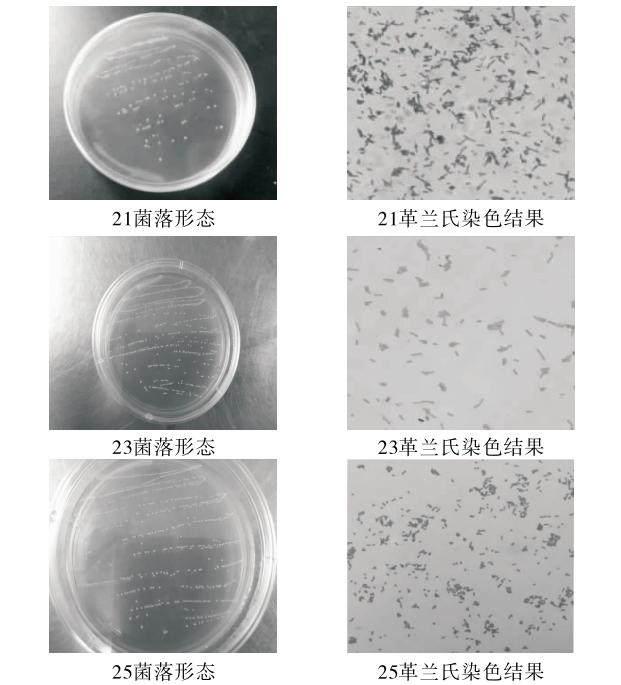


图 1 菌株特性
Figure 1 Strains characteristic

表 1 初筛乳酸菌的抑菌谱[†]

Table 1 Bacteriostatic effect of early screening bacteriocin					mm
菌株	枯草芽孢杆菌	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	酿酒酵母	
1	14.74(++)	9.70(+)	10.30(++)	—	
2	10.80(++)	11.86(++)	10.04(++)	—	
3	15.02(+++)	12.54(+++)	11.56(++)	—	
4	17.50(+++)	12.10(+++)	9.88(+)	—	
5	16.66(+++)	11.20(++)	10.08(++)	—	
6	17.50(+++)	10.60(++)	10.60(++)	—	
7	10.36(++)	13.30(+++)	10.40(++)	—	
8	14.30(+++)	10.40(++)	11.16(++)	—	
9	9.24(+)	10.22(++)	9.92(+)	—	
10	18.00(+++)	12.64(+++)	11.14(++)	—	
11	16.54(+++)	14.64(+++)	11.26(++)	—	
12	11.78(++)	12.80(+++)	10.40(++)	—	
13	14.64(+++)	12.50(+++)	11.12(++)	—	
14	15.16(+++)	10.62(++)	10.06(++)	—	
15	11.24(++)	10.78(++)	9.86(+)	—	
16	11.48(++)	10.14(++)	9.94(+)	—	
17	13.82(+++)	10.06(++)	9.90(+)	—	
18	12.56(+++)	9.78(+)	9.96(+)	—	
19	13.24(+++)	9.84(+)	9.92(+)	—	
20	13.42(+++)	10.26(++)	9.32(+)	—	
21	18.48(+++)	13.34(+++)	11.70(++)	—	
22	12.96(+++)	11.10(++)	10.60(++)	—	
23	15.12(+++)	13.10(+++)	11.14(++)	—	
24	15.46(+++)	12.76(+++)	11.12(++)	—	
25	15.72(+++)	12.06(+++)	11.30(++)	—	
26	12.38(+++)	11.90(++)	10.56(++)	—	

[†] —表示抑菌圈直径≤8 mm; +表示抑菌圈直径 8~10 mm; ++表示抑菌圈直径 10~12 mm; +++表示抑菌圈直径≥12 mm。

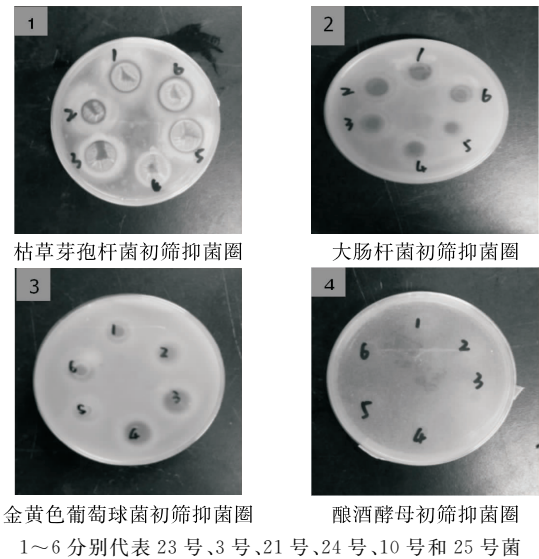


图 2 各指示菌的初筛效果
Figure 2 Bacteriostatic effect of indicator of early screening bacteriocin

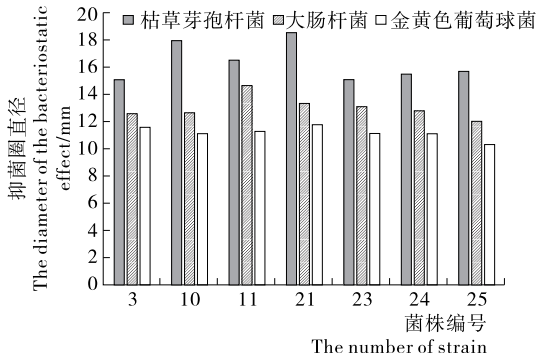


图 3 初筛乳酸菌抑菌活性
Figure 3 The inhibitory activity of preliminary screening lactic acid bacteria

制圈直径为 11.70 mm,所有菌株对酿酒酵母无抑菌活性。

2.3 细菌素产生菌的复筛结果

2.3.1 有机酸排除结果 抑制指示菌的物质可能是细菌素也可能是酸,因此需要排除有机酸的干扰。将去除菌体的发酵上清液的 pH 值调至 4.5^{[15]17},以致病菌株为指示菌进行抑菌试验,抑菌结果见表 2。

由表 2 可知,当把 MRS 液体培养基的 pH 调到 4.5 时,对指示菌无抑制作用,而发酵上清液在此 pH 条件下有抑制作用,说明发酵上清液中确有抑菌活性物质存在^[24]。编号为 3、21、23、24、25 菌株的发酵上清液 pH 调为 4.5 后,其对各指示菌抑菌活性的下降都低于 15%。姚丽娅等^[25]从传统发酵制品中分离出的 S1-1 菌株经有机酸排除试验后,其抑菌活性下降了 26.47%。淮骏^{[15]17}从黄瓜汁里分离出的 H1 菌株,经有机酸排除试验后,其对枯草芽孢杆菌的抑菌活性分别下降了 30%。因此这些菌株经有机酸排除试验后,不仅具有抑菌作用,而且抑菌作用相对理想。故各菌株的抑菌性不是有机酸作用的结果,还有其他抑菌物质存在。

2.3.2 过氧化氢排除结果 过氧化氢是乳酸菌的一种代谢

合成产物,能够抑制微生物的生长,因此必须排除过氧化氢的干扰。故将上述 7 株菌的发酵上清液经 80 ℃ 加热处理 10 min,使过氧化氢充分分解,冷却后以致病菌株为指示菌进行试验,抑菌结果见表 3。

由表 3 可知,7 株菌株经过氧化氢排除试验后,抑菌圈直径均无明显变化。其中 11 号菌株加热前后对枯草芽孢杆菌的抑菌圈直径变化最大,其抑菌性下降了 8.60%。曹珂珂等^[26]从植物性原料中分离出的 B-17 菌株,其发酵上清液经 80 ℃ 水浴 10 min 后,抑菌性下降了 10.3%。张彦斌等^[27]从内蒙古传统乳制品中分离的 S4-3-1 菌株用过氧化氢酶处理发酵上清液,其抑菌活性下降了 15.51%。由此可见,这 7 株菌仍有较强的抑菌性,说明发酵上清液中主要的抑菌物质不

是过氧化氢。

2.3.3 菌株的酶水解试验结果 在排除有机酸和过氧化氢的抑菌作用后,以这 7 株菌作为目的菌株,以枯草芽孢杆菌为指示菌。对其发酵上清液进行胰蛋白酶和木瓜蛋白酶的酶水解试验,以检测发酵液中具有较强抑菌性的物质是否为蛋白质,结果见表 4。

由表 4 可知,酶处理后 3、21、23、24 和 25 菌株上清液产生的抑菌圈明显小于原上清液产生的抑菌圈,其中 21 号菌株对枯草芽孢杆菌的抑菌圈直径明显减小,抑菌活性下降了 58.23%。但 10、11 号菌株的抑菌活性下降得较少,分别为 2.00%和 3.08%,可见其抑菌物质对蛋白酶不敏感。由于细菌素具有蛋白质特性,因而在各种消化酶处理后,其抑菌活

表 2 有机酸排除试验
Table 2 The results of organic acid excl

菌株	枯草芽孢杆菌			大肠杆菌			金黄色葡萄球菌			pH 4.5 MRS 培养液
	原 pH/ mm	调 pH 后/ mm	活性下降 率/%	原 pH/ mm	调 pH 后/ mm	活性下降 率/%	原 pH/ mm	调 pH 后/ mm	活性下降 率/%	
3	15.02	13.24	11.85	12.54	10.72	14.51	11.56	9.86	14.71	0
10	18.00	11.40	36.66	12.64	9.48	25.00	11.14	9.06	18.67	0
11	16.54	11.54	30.23	14.64	9.46	35.38	11.26	9.86	12.43	0
21	18.48	16.92	8.44	13.34	12.84	3.75	11.70	10.30	11.97	0
23	15.12	13.10	13.36	13.10	11.56	11.76	11.14	10.30	7.54	0
24	15.46	14.12	8.67	12.76	10.88	14.73	11.12	10.32	7.19	0
25	15.72	14.16	9.92	12.06	10.62	11.94	10.30	9.50	7.77	0

表 3 过氧化氢作用的排除
Table 3 The results of hydrogen peroxide excl

菌株	枯草芽孢杆菌			大肠杆菌			金黄色葡萄球菌		
	加热前/ mm	加热后/ mm	活性下降 率/%	加热前/ mm	加热后/ mm	活性下降 率/%	加热前/ mm	加热后/ mm	活性下降 率/%
3	11.24	11.08	1.40	10.72	10.16	5.22	9.86	9.72	1.42
10	9.10	9.02	0.88	9.48	9.32	1.69	9.06	9.04	0.22
11	11.40	10.42	8.60	9.46	9.34	1.27	9.86	9.62	2.43
21	13.92	13.28	4.60	10.18	10.02	1.57	10.04	9.64	3.98
23	13.10	12.02	8.24	9.56	9.44	1.26	10.30	9.96	3.30
24	14.12	13.64	3.40	9.88	9.60	2.83	10.32	9.98	3.29
25	14.16	13.48	4.80	9.62	9.46	1.66	9.50	9.34	1.68

表 4 蛋白酶水解试验
Table 4 The results of protease hydrolysis test

菌株	未经过蛋白酶处理的 发酵上清液/mm	经过蛋白酶处理的 发酵上清液/mm	活性下降 率/%
3	15.02	9.06	39.68
10	18.00	17.64	2.00
11	16.54	16.03	3.08
21	18.48	7.72	58.23
23	15.12	8.68	42.59
24	15.46	9.38	39.33
25	15.72	8.42	46.44

力会有不同程度的下降^[28]。因此可以初步推测 3、21、23、24 和 25 这 5 株乳酸菌产生的抑菌物质具有蛋白质性质,即细菌素;10、11 号菌株其抑菌物质含蛋白质类似物极少,因此其活性物质为非蛋白组分或者起抑菌作用的不是单一的物质。

2.4 细菌素产生菌的 16S rDNA 序列同源性鉴定结果

通过对牦牛酸乳中分离出的乳酸菌进行细菌素产生菌的初筛和复筛,综合比较得出编号为 3、21、23、24、25 菌株有较好的抑菌活性。这 5 株菌株总 DNA 经 PCR 扩增、电泳后的结果见图 4,可知扩增后的电泳条带集中在 1 500 bp 左右,符合乳酸菌扩增片段长度;阴性对照无条带,说明未出现污染。16S rDNA 比对结果见表 5。

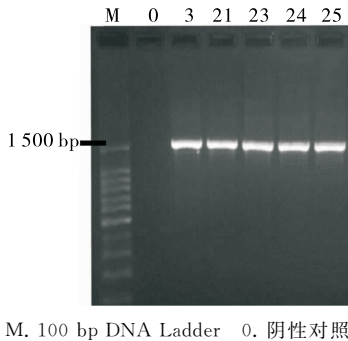


图 4 细菌素产生菌 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Figure 4 AGE of bacteriocin-producing strains 16S rDNA-PCR products

2.5 系统发育树分析

将 5 株分离菌株测序结果与 GenBank 中已有序列进行比对分析,结果表明分离菌株同源性均在 100%,大于分类研究阈值 97%^[29],系统发育树中,各分支长度间的差异代表物种进化程度的高低。由图 5 可知,鉴定已知的 5 株乳酸菌分为 2 个进化枝,表明 5 株乳酸菌分为 2 个遗传类型。干酪乳

表 5 细菌素产生菌鉴定结果

Table 5 The identification result of bacteriocin-producing strain			
编号	相似度/%	拉丁文名	中文名
3	100	<i>Lactobacillus casei</i>	干酪乳杆菌
21	99	<i>Lactobacillus plantarum</i>	植物乳杆菌
23	100	<i>Lactobacillus casei</i>	干酪乳杆菌
24	100	<i>Lactobacillus casei</i>	干酪乳杆菌
25	100	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	乳酸乳球菌乳球亚种

杆菌(编号为 3、23、24)和植物乳杆菌(编号为 21)处在同一分枝中,乳酸乳球菌乳球亚种(编号为 25)处于另一分支,表明干酪乳杆菌与植物乳杆菌的亲缘关系很近,同属于乳杆菌属。因此试验菌株涉及乳球菌属和乳杆菌属。其中编号为 3、23、24、21 和 25 的菌株都以 100% 的自举支持率分别与干酪乳杆菌、植物乳杆菌和乳酸乳球菌乳球亚种聚在一起。可见,系统发育树分析结果与 16S rDNA 序列分析结果相一致。

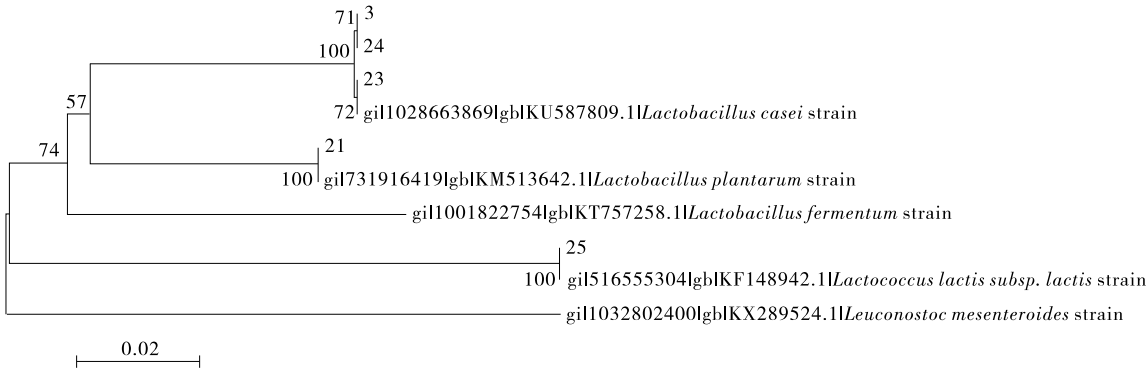


图 5 细菌素产生菌系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree of bacteriocin-producing strain

3 结论

本试验通过对传统发酵牦牛酸乳中细菌素产生菌的筛选,得到 5 株对致病性指示菌(枯草芽孢杆菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌)有较好抑制作用的乳酸菌,经微生物形态学与分子生物学鉴定结果表明,编号 3、23 和 24 菌株为干酪乳杆菌、编号 21 菌株为植物乳杆菌、编号 25 菌株为乳酸乳球菌乳球亚种。干酪乳杆菌、植物乳杆菌和乳酸乳球菌乳球亚种均为食品上可用菌,而在已有的细菌素产生菌的筛选研究中,所得菌株很多并非食品中可用。因此本研究的结果可用于食品中以防范食源致病菌对食品的污染。

参考文献

[1] SHENG Qing-hai, LI Jian-cai, ALAM M S, et al. Gross composition and nutrient profiles of Chinese yak (Maiwa) milk[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2008, 43 (3): 568-572.

[2] 钟金城, 陈智华, 赵素君, 等. 牦牛生态类型的分类[J]. 生态学报, 2006, 26(7): 2 068-2 072.

[3] 王远微, 张诚民, 索化夷, 等. 传统发酵牦牛酸奶中马克斯克鲁维酵母菌的分离鉴定及系统发育分析[J]. 食品科学, 2014, 35 (15): 216-220.

[4] 陈静, 张玉苍, 何连芳. 乳酸菌产细菌素的研究进展及其应用前景[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(4): 1 925-1 927.

[5] 周凌华, 王豪, 王荫榆, 等. 功能性益生乳酸菌的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2012(24): 990-997.

[6] 诸永志, 姚丽娅, 徐为民, 等. 乳酸菌细菌素应用于肉制品防腐剂的的研究进展[J]. 食品科技, 2008, 33(2): 136-139.

[7] 王小娜, 宋达峰, 顾青. 产细菌素乳酸菌的鉴定及其特性研究[J]. 中国食品学报, 2011, 11(3): 181-186.

[6] 刘长建, 姜波, 崔玉波, 等. 生物防腐剂乳酸菌素的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2010, 30(3): 87-90.

[8] 陈兰芝, 田发益, 何建清, 等. 西藏地区发酵牛乳中产细菌素乳酸菌的筛选及鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(10): 6-10.

[9] 杨吉霞, 贺稚非, 陈宗道. 牦牛奶酪中产细菌素乳酸菌菌株的筛选[J]. 食品科学, 2015, 36(3): 122-126.

[10] 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.

[11] 张艳. 高产细菌素乳酸菌的分离鉴定及其相关基因的克隆[D]. 成都: 西南民族大学, 2012.

[12] 崔琴. 甘南牧区发酵牦牛酸乳中优良乳酸菌的筛选及发酵性能的研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2010.

[13] 张丽. 传统发酵牦牛奶中益生乳杆菌筛选 及其免疫调节功能研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2011.

[14] BENSALAH F, DELORME C, RENAULT P. Characteris-ation of thermotolerant cocci from indigenous flora of ‘leben’ in algerian arid area and DNA identification of atypical *Lactococcus lactis* strains [J]. Current Microbiology, 2009, 59(2): 139-146.

[15] 淮骏. 广谱乳酸菌素产生菌的筛选及其发酵研究[D]. 合肥: 安徽大学, 2011.

[16] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985: 136-137, 283-289.

[17] CASTA D, REQUENA T, GOMEZ R. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from goat, s milk and artisanal cheeses: characteristics of a bactericin produced by lactobacillus curvatus IFPL. 105[J]. Appl Bacteriology, 1996, 81: 35-41.

[18] 董彩文, 毛多斌, 白燕红, 等. 产广谱细菌素口乳杆菌菌株的筛选和鉴定[J]. 食品工业科技, 2009, 30(5): 129-133.

[19] 张艾青, 刘书亮, 敖灵. 产广谱细菌素乳酸菌的筛选[J]. 中国酿造, 2007, 34(2): 45-48.

[20] ENNAHAR S, CAI Y, FUJITA Y. Phylogenetic diversity of lactic acid bacteria associated with paddy rice silage as determined by 16S ribosomal DNA analysis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(1): 444-451.

[21] EI-NAGGAR N E A, HAROUN S A, OWEIS E A, et al. I-identification of newly isolated Talaromyces pinophilus and statistical optimization of β -glucosidase production under solid-state fermentation[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2015, 45(7): 712-729.

[22] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2 731-2 739.

[23] 杨尚娇, 倪亚雯, 倪永清. 新疆传统干酪中 1 株产广谱细菌素乳酸菌的筛选及其生物学特性[J]. 中国酿造, 2015, 34(1): 38-41.

[24] 吴敬. 酸马奶酒中乳酸菌的分离及抗菌特性的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2002: 33-34.

[25] 姚丽娅, 徐为民, 诸永志, 等. 产细菌素乳酸菌的筛选及鉴定 [J]. 食品工业科技, 2008, 29(1): 160-164.

[26] 曹珂珂, 王娣, 李妍. 1 株产广谱细菌素乳酸菌的筛选及其抑菌物质的特性[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(11): 88-91.

[27] 张彦斌, 方芳, 李莉, 等. 内蒙古传统乳制品中产细菌素乳酸菌的筛选及鉴定[J]. 中国乳品工业, 2009, 37(8): 9-12.

[28] SHIBA Prosad Banerjee, KRUSHNA Chandra Dora, SUPRA-TIM Chowdhury. Detection, partial purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus brevis* FPTLB3 isolated from freshwater fish[J]. J. Food Sci. Technol., 2013, 50(1): 17-25.

[29] HAGHSHENAS B, NAMI Y, ABDULLAH N, et al. Potentially probiotic acetic acid bacteria isolation and identification from traditional dairies microbiota[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2015, 50(4): 1 056-1 064.

(上接第 16 页)

[4] POGORZELSKI E, WILKOWSKA A. Flavour enhancement through the enzymatic hydrolysis of glycosidic aroma precursors in juices and wine beverages: a review [J]. Flavour and Fragrance Journal, 2007, 22(4): 251-254.

[5] OHTA T, OMORI T, SHIMOJO H, et al. Identification of monoterpene alcohol beta-glucosidases in sweet-potatoes and purification of a shiro-koji beta-glucosidase[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1991, 55(7): 1 811-1 816.

[6] 袁蕊, 罗惠波. 南北方几种高粱酿酒品质分析[J]. 酿酒科技, 2011(12): 33-36.

[7] 田殿梅, 霍丹群, 张良. 3 种不同品种高粱发酵酒糟及基酒品质的差异[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(7): 74-78.

[8] 廖建民, 曾庆曦, 唐玉明. 杂交高粱酿酒配套特性配套技术及效益分析[J]. 酿酒科技, 1992, 49(1): 6-9.

[9] 曾庆曦, 廖建民, 唐玉明. 杂交梗高粱的特性与酿酒工艺参数的研究[J]. 酿酒科技, 1983(3): 18-19.

[10] 江苏泗阳县洋河酒厂. 提高杂交高粱的酒质和出酒率及新酒人工老熟[J]. 食品与发酵工业, 1978(4): 32-34.

[11] 泸州市酿酒研究所. 梗高粱酿造泸州酒配套工艺研究简报[J]. 酿酒, 1989(5): 34-37.

[12] 练顺才, 谢正敏, 叶华夏, 等. 高粱蒸煮香气成分的研究[J]. 酿酒科技, 2012(3): 40-42.

[13] 朱伟岸, 吴群, 李记明, 等. 白酒酿造谷物类原料中结合态香气物质的分离及检测分析[J]. 食品与生物技术学报, 2015, 34(5): 456-462.

[14] CAI Jin-bao, LIU Bai-zhan, LING Ping, et al. Analysis of free and bound volatiles by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2002, 947: 267-275.

[15] FAN Hai-yan, FAN Wen-lai, XU Yan. Characterization of Key Odorants in Chinese Chixiang Aroma-Type Liquor by Gas Chromatography-Olfactometry, Quantitative Measurements, Aroma Recombination, and Omission Studies [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(14): 3 660-3 668.

[16] 范文来, 徐岩. 应用液液萃取结合正相色谱技术鉴定汾酒与郎酒挥发性成分[J]. 酿酒科技, 2012(2): 17-26.

[17] STAHLBISKUP E, INTERT F, HOLTHUIJZEN J, et al. Glycosidically Bound Volatiles: A Review[J]. Flavour and Fragrance Journal, 1993, 8: 61-80.

[18] PUGLISI C J. The role of acetylenic and allenic precursors in the formation of β -damascenone[D]. Adelaide: Flinders University, 2007: 24-27.

[19] 范文来, 徐岩. 酒类风味化学[M]. 北京: 轻工业出版社, 2014.

[20] YOSHIZAKI Y, TAKAMINE K, SHIMADA S, et al. The Formation of beta-Damascenone in Sweet Potato Shochu[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2011, 117(2): 217-223.