

酱油渣中乳酸乳球菌分离鉴定及对模拟胃肠环境的耐受性

Isolation, identification and tolerance to simulated gastrointestinal environment of *Lactococcus lactis* from soy sauce residue

黄桂东^{1,2,3,4,5}

唐素婷^{1,2,3,4,5}

程云辉⁶

孙张乐^{1,2,3,4,5}

HUANG Gui-dong^{1,2,3,4,5}

TANG Su-ting^{1,2,3,4,5}

CHENG Yun-hui⁶

SUN Zhang-le^{1,2,3,4,5}

陈梓琦^{1,2,3,4,5}

焦 叶⁶

张 灿⁷

钟先锋^{1,2,3,4,5}

CHEN Zi-qi^{1,2,3,4,5}

JIAO Ye⁶

ZHANG Can⁷

ZHONG Xian-feng^{1,2,3,4,5}

(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. 佛山市酿造工程技术研究中心, 广东 佛山 528231; 5. 佛山农业生物制造工程技术研究中心, 广东 佛山 528231; 6. 长沙理工大学化学与食品工程学院, 湖南 长沙 410114; 7. 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 Brewing Technology, Foshan, Guangdong 528231, China; 5. Foshan Engineering Research Center for Agricultural Biological Manufacturing, Foshan, Guangdong 528231, China; 6. School of Chemistry and Food Engineering, Changsha University of Science and Technology, Changsha, Hunan 410114, China; 7. Kaiping Baiyi Feed Science and Technology Development Co., Ltd., Jiangmen, Guangdong 529300, China)

摘要:利用形态学观察、生理生化试验、16S rRNA 基因序列分析方法,从酱油渣中分离鉴定乳酸乳球菌,并研究其对模拟胃肠环境的耐受能力。初步从酱油渣中分离得到 4 株乳酸乳球菌,3 株鉴定为 *Lactococcus lactis subsp. hordniae*,称之为 HT127、HT223 和 HT227;1 株鉴定为 *Lactococcus lactis subsp. lactis*,称为 HT122。生长曲线测定结果发现,4 株菌生长情况基本相似,对数生长期为 2~12 h。模拟胃肠环境耐受试验结果表明:耐受胃液 3 h 后,菌株 HT223、HT127、HT227、HT122 的菌存活率达 (94.85±0.05)%, (81.67±0.25)%, (77.99±0.58)%,

(58.57±0.57)%;在模拟肠液中继续培养 8 h,菌株 HT122、HT127、HT223、HT227 的菌存活率为 (77.78±0.68)%, (67.42±0.72)%, (34.25±0.08)%, (22.28±0.18)%。说明菌株 HT127 对人工模拟胃肠液显示出较好的耐受能力。

关键词:酱油渣;乳酸乳球菌;鉴定;模拟胃肠环境

Abstract: In order to enrich lactic acid bacteria resource from soy sauce residue, *Lactococcus lactis* from soy sauce residue were screened and identified by physiological and biochemical tests and 16S rRNA gene sequence analysis, and their tolerance to gastrointestinal environment were further studied. Four strains of lactic acid bacteria were isolated from soy sauce residue. Three of them were identified as *Lactococcus lactis subsp. hordniae*, HT127, HT223 and HT227, respectively. One was identified as *Lactococcus lactis subsp. lactis* and named HT122. The results of growth curve showed that the growth of four strains were similar, and the logarithmic growth period was 2~12 h after inoculation. The results of gastrointestinal fluid tolerance test showed that strains

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:黄桂东,女,佛山科学技术学院特聘教授,博士,硕士生导师。

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

收稿日期:2019-04-16

HT233, HT127, HT227, HT122 could tolerate the simulated gastric juice, with live bacterial rates of $(94.85 \pm 0.05)\%$, $(81.67 \pm 0.25)\%$, $(77.99 \pm 0.58)\%$, $(58.57 \pm 0.57)\%$ respectively. Meanwhile, the live bacterial rates of HT122, HT127, HT223, HT227 were $(77.78 \pm 0.68)\%$, $(67.42 \pm 0.72)\%$, $(34.25 \pm 0.08)\%$, $(22.28 \pm 0.18)\%$ after cultured for 8 h in the simulated intestinal juice. All the results suggested that HT127 might show the good tolerance to the simulated gastrointestinal environment and could be benefit to the expansion of food-borne lactic acid bacteria resource bank.

Keywords: soy sauce residue; *Lactococcus lactis*; identification; simulated gastrointestinal environment

酱油酿造是多种微生物协同作用的结果,每种微生物对酱油酿造过程的成分变化乃至酱油品质优劣均有一定影响^[1-3]。酱油酿造过程涉及的微生物有曲霉、乳酸菌、酵母菌等^[4],其中,乳酸菌是参与酱油酿造最重要的细菌,主要包括乳杆菌属^[5]、乳酸乳球菌属^[6]、魏斯氏菌属^[6]、片球菌属^[4,6]等。酱油渣是酱油酿造后产生的残渣,携带一定种类和数量的微生物,如乳酸乳球菌等^[5-6]。目前大多数报道集中于对酱油酿造过程中乳酸菌的研究,查阅中国知网数据库和 Pubmed 数据库,尚未见有关酱油渣中乳酸乳球菌的报道,对酱油渣中乳酸菌的认识不足。

近年来,乳酸乳球菌因其良好的益生特性被广泛应用于食品行业。部分乳酸乳球菌及其亚种能产生乳链菌肽^[7-8],是无毒的食品防腐剂,可用于食品防腐及保鲜^[9];乳酸乳球菌还可产胞外多糖,用于干酪^[10]和豆腐^[11]制作,其代谢产物能够改善产品的流变学特性等。

为了深入挖掘乳酸菌资源并延伸酱油渣的可利用价值,试验拟采用传统菌株筛选方法,从酱油渣中分离、筛选、鉴定乳酸乳球菌,并对其部分益生特性进行研究,以期为食源性乳酸菌资源库扩充提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

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

过氧化氢生化鉴定管、革兰氏染色试剂盒、硫化氢生化鉴定管、吡唑生化鉴定管、硝酸盐(还原)生化鉴定管、明胶生化鉴定管、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

冷冻霜冰箱:BCD-189WDPV 型,海尔股份有限公司;

显微镜:PH100 型,凤凰光学集团有限公司;

恒温培养箱:LRH-150 型,上海一恒科学仪器有限公司;

全自动灭菌锅:GR60DA 型,致微(厦门)仪器有限公司;

电子分析天平:ME104 型,梅特勒—托利多精密仪器有限公司;

超净工作台:SW-CJ-1FD 型,苏州安泰空气技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 酱油渣中乳酸菌的分离与纯化 根据文献^[12-14]修改如下:称取酱油渣样品 10 g 溶解于 90 g 无菌生理盐水中,制成 10^{-1} , 10^{-2} , ..., 10^{-6} 共 6 个浓度稀释液。吸取稀释液 0.1 mL,涂布于含 3 g/100 mL 碳酸钙的 MRS 固体培养基中,37 °C 倒置培养 24~36 h。挑取菌落划线 2~3 次至菌落一致。挑取单菌落 37 °C 培养 12 h,与甘油混合,−20 °C 保藏。

1.2.2 酱油渣中乳酸菌的鉴定

(1) 形态学观察:根据文献^[15]修改如下,菌株划线培养于 MRS 固体培养基,37 °C 培养 48 h,观察菌株的菌落形态。进行革兰氏染色试验,使用油镜,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》^[16],具体试验操作参考生化鉴定管说明书。

(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往华大基因进行菌株的 16S rRNA 序列测序。

(4) 系统发育树的构建:根据文献^[17-18]修改如下,登陆 GenBank 中 BLAST 程序(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)比对测序菌株,并查询模式菌株信息,利用 Mega 5.0 软件,使用邻近算法, *Bacillus subtilis* NCDO1769 为外群菌株,bootstrap 为 1 000 构建系统发育树。

1.2.3 乳酸乳球菌生长曲线测定 根据文献^[19]修改如下:菌株活化 3 代,调节 $OD_{600\text{ nm}}$ 为 (1.00 ± 0.05) ,按照 2% (体积分数)的接种量接种于 MRS 肉汤培养基,37 °C 恒温培养,以未接种的 MRS 液体培养基为阴性对照,分别培养 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40 h,使用酶标仪测定菌株的 $OD_{600\text{ nm}}$,记录数据并绘制生长曲线。

1.2.4 乳酸乳球菌模拟胃液耐受性测定 根据文献^[12, 20]修改如下,菌株活化 3 代,吸取 4 mL 菌液,5 000 r/min 离心 8 min,去上清液,将菌体悬浮于 4 mL 灭菌生理盐水制成菌悬液。无菌离心管中加入 4.5 mL 人工胃液、0.5 mL 菌悬液,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。

$$S_1 = \frac{A_1}{A_0} \times 100\%, \tag{1}$$

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。

1.2.5 乳酸乳球菌模拟肠液耐受性测定 根据文献[12, 20]修改如下,取人工胃液消化 3 h 的菌株培养液 0.5 mL,接种于 4.5 mL 人工肠液中,37 ℃ 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。

$$S_2 = \frac{A_s}{A_0} \times 100\%, \tag{2}$$

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 h 或 8 h 的活菌数,CFU/mL。

1.3 数据处理

数据统计与处理采用 Excel 2013 以及 SPSS 17.0,绘图采用 Origin 9。

2 结果与分析

2.1 乳酸乳球菌形态学观察

从酱油渣中分离得到 4 株乳酸乳球菌,分别为菌株

HT122、HT127、HT223、HT227,菌落颜色为灰白色,菌落表面光滑,边缘齐整,直径为 0.3~1.0 mm。经染色试验发现 4 株乳酸菌均为革兰氏阳性菌,菌体均为球状,呈单个、成对或短链分布。酱油渣中部分乳酸乳球菌的菌体形态如图 1 所示。

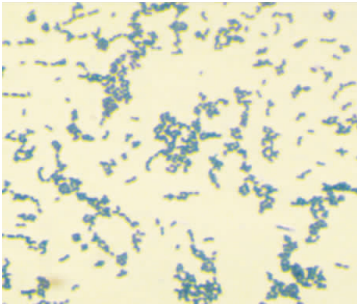


图 1 部分乳酸乳球菌菌株的菌体形态

Figure 1 Microscopic morphology of partial *Lactococcus lactis* from soy sauce residue ($\times 1\,000$)

2.2 乳酸乳球菌生理生化试验特征

由表 1 可知,菌株 HT122、HT127、HT223 和 HT227 的革兰氏染色试验菌体均呈紫色,过氧化氢酶接触试验、硝酸盐还原反应、葡萄糖产气试验、6.5% NaCl 生长试验及 45 ℃ 生长试验均呈阴性。参考雷霞^[21]、华鹤良^[22]的方法,结合形态学研究结果,初步判断以上 4 株菌为乳酸乳球菌属(*Lactococcus*)。

表 1 乳酸乳球菌生理生化鉴定结果[†]

Table 1 Results of the biochemical identification of *Lactococcus lactis* from soy sauce residue

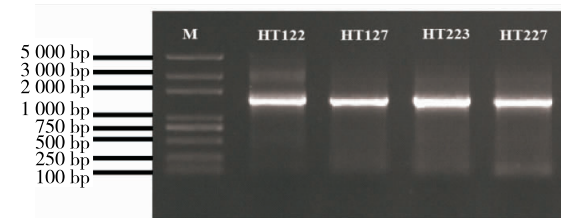
菌株编号	革兰氏染色	酶触试验	硝酸盐还原反应	葡萄糖产气	45 ℃ 生长	6.5% NaCl 生长	发酵类型
HT122	+	—	—	—	—	—	同型
HT127	+	—	—	—	—	—	同型
HT223	+	—	—	—	—	—	同型
HT227	+	—	—	—	—	—	同型

[†] “+”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 乳酸乳球菌分子生物学鉴定

对 4 株乳酸乳球菌进行基因组提取、16S rRNA 基因 PCR 扩增、测序,所得凝胶电泳图如图 2 所示。由图 2 可知,4 株乳酸乳球菌 PCR 产物大小均在 1 500 bp 左右,且条带清晰无弥散。

得到菌株的 16S rRNA 基因序列,进行 Blast 比对,结果如表 2 所示。利用 Mega 5.0 软件构建系统发育树,如图 3 所示。由图 3 可知,菌株 HT122、HT127、HT223、HT227 均与模式菌株 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM 5805^T、*Lactococcus lactis* subsp. *hordniae* NBRC 100931^T 处于同一分支。结合表 2,将菌株 HT127、HT223、HT227 鉴定为 *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae*



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

图 2 乳酸乳球菌 16S rRNA PCR 扩增产物电泳图

Figure 2 Electrophoresis of 16S rRNA amplified products of *Lactococcus lactis* from soy sauce residue

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 *Lactococcus lactis* from soy sauce residue

菌株	菌株名称	菌株编号	登陆号	相似性/%
HT122	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	JCM 5805(T)	BALX01000047	97.87
HT127	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>hordniae</i>	NBRC 100931(T)	BCVL01000058	98.82
HT223	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>hordniae</i>	NBRC 100931(T)	BCVL01000058	99.17
HT227	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>hordniae</i>	NBRC 100931(T)	BCVL01000058	99.31

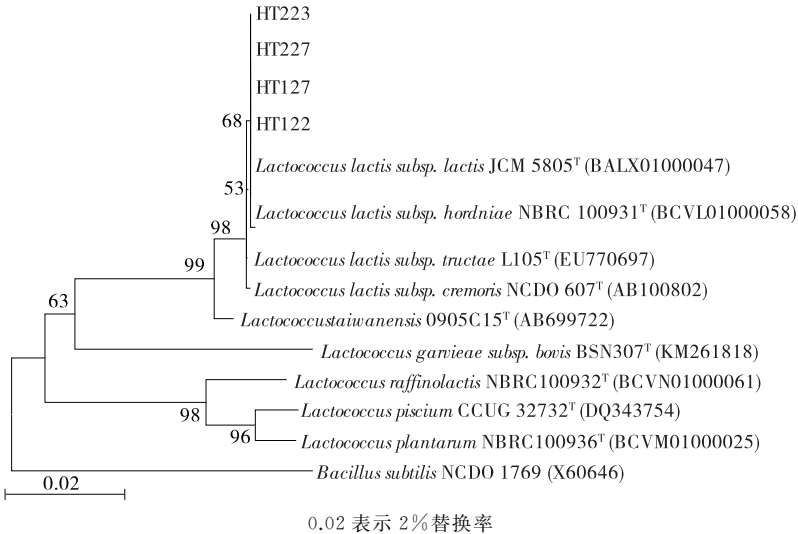


图 3 乳酸乳球菌 16S rRNA 基因序列系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequence of *Lactococcus lactis* from soy sauce residue

(乳酸乳球菌霍氏亚种); 将菌株 HT122 鉴定为 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (乳酸乳球菌乳亚种)。Ansah^[6] 研究也发现酱油发酵过程中存在乳酸乳球菌。

2.4 乳酸乳球菌生长曲线

由图 4 可知,从酱油渣中分离得到的 4 株乳酸乳球菌的生长趋势总体相似。0~2 h 为延迟期,2~12 h 为对数生长期,接种 12 h 后,菌株生长速率减缓,进入生长稳定期。

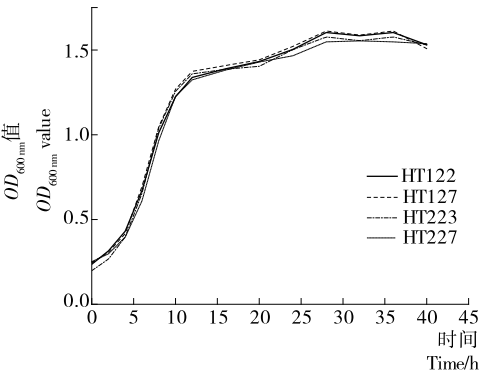


图 4 乳酸乳球菌菌株生长曲线

Figure 4 Growth curves of *Lactococcus lactis* from soy sauce residue

2.5 乳酸乳球菌模拟胃液耐受能力

胃液主要由黏液、盐酸、胃蛋白酶组成,在胃液作用下,微生物的活菌数会逐渐减少。由于微生物需要超过一定数量才能对机体发挥益生特性,因此需要考察乳酸乳球菌的胃液耐受能力^[23]。由图 5 可知,菌株 HT223 的模拟胃液耐受能力较好,耐受胃液 3 h 后,菌株存活率为 (94.85±0.05)%;菌株 HT127、HT227、HT122 耐受胃液 3 h 后,菌株存活率分别为 (81.67±0.25)%、(77.99±

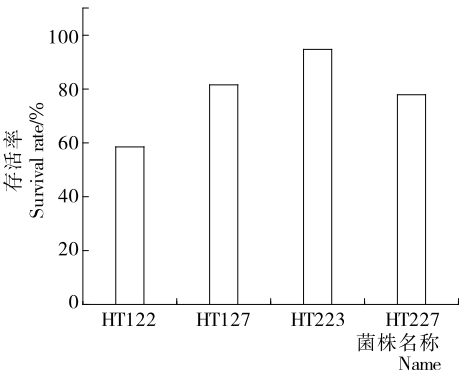


图 5 乳酸乳球菌在模拟人工胃液中的存活率

Figure 5 Test results of live bacteria counts of *Lactococcus lactis* in simulated artificial gastric juice

0.58)%, (58.57±0.57)%。迪娜热尔·迪力达西等^[24]对从新疆传统发酵乳品中分离出的乳酸乳球菌进行胃液耐受能力试验,发现其3 h存活率达94.27%。说明不同菌株对人工胃液耐受能力有差异。

2.6 乳酸乳球菌模拟肠液耐受能力

肠液主要成分为胰液和胆汁。胰液中的胰蛋白酶可水解微生物的菌体蛋白质,抑制乃至杀死微生物。胆汁中含有一定量胆盐,胆盐在人体肠道的浓度为0.03%~0.30%,能改变微生物细胞膜的通透性,抑制、杀死进入肠道的微生物^[25]。微生物到达小肠后,因胰蛋白酶、胆盐的抑制作用及营养的缺乏等因素逐渐死亡^[12]。因此,需评估乳酸菌对肠液的耐受能力。由图6可知,菌株HT127耐受肠液能力较好,耐受肠液4,8 h后的菌株存活率分别为(93.61±0.67)%, (67.42±0.72)%;菌株HT227耐受肠液能力较差,耐受模拟肠液4,8 h的菌株存活率分别为(26.83±0.13)%, (22.28±0.18)%。结合4株乳酸乳球菌模拟胃液耐受能力的结果,发现菌株HT127耐受模拟胃液、肠液能力较好。

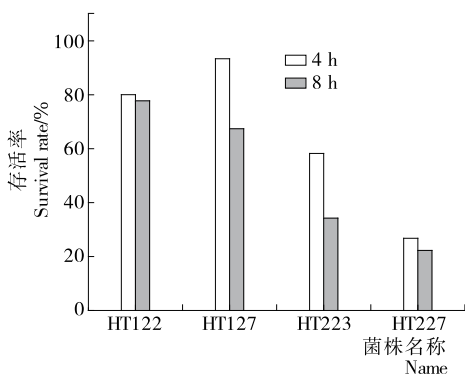


图6 乳酸乳球菌在模拟人工肠液中的存活率

Table 6 Results of *Lactococcus lactis* in simulated artificial intestinal fluid

3 结论

从酱油渣中分离得到了4株乳酸乳球菌,经鉴定,分别属于*Lactococcus lactis subsp. hordniae*(乳酸乳球菌霍氏亚种)和*Lactococcus lactis subsp. lactis*(乳酸乳球菌乳亚种)。对其体外模拟胃肠环境耐受能力研究发现,菌株HT127耐受模拟胃肠环境能力较好。后续可对其生长特性、益生特性等进行深入研究与探讨,为乳酸乳球菌资源库的丰富提供科学依据。

参考文献

[1] CAO Zhen-hui, GREEN-JOHNSON J M, BUCKLEY N D, et al. Bioactivity of soy-based fermented foods: A review[J]. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(1): 223-238.

[2] DET-UDOM R, GILBERT C, LIU Long, et al. Towards

semi-synthetic microbial communities: Enhancing soy sauce fermentation properties in *B. subtilis* co-cultures [J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 101.

[3] 许延涛, 周凯, 蒋雪薇, 等. 酱油酿造风味细菌研究进展[J]. *食品与机械*, 2019, 35(4): 217-222.

[4] 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: 1, 15.

[5] TANAKA Y, WATANABE J, MOGI Y. Monitoring of the microbial communities involved in the soy sauce manufacturing process by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis[J]. *Food Microbiology*, 2012, 31(1): 100-106.

[6] 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.

[7] FRÉDÉRIC L, VUYST L D. Functional lactic acid bacteria starter cultures for the food fermentation industry [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2004, 15(2): 67-78.

[8] MIERAU I, KLEEREBEZEM M. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 68(6): 705-717.

[9] 李有起. Nisin 在食品防腐作用中的研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2012, 33(4): 233-235.

[10] 陈俊亮, 田芬, 霍贵成, 等. 乳酸乳球菌对切达干酪成熟过程中质构和风味的影响[J]. *食品科技*, 2013, 34(21): 163-167.

[11] 赵贵丽, 罗爱平, 黄名正, 等. 乳酸乳球菌生物凝固剂对豆腐贮藏性的影响[J]. *食品工业*, 2018, 39(1): 141-144.

[12] 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: 14-16.

[13] 王哲, 孟宪志, 赵伟. 优良乳酸球菌的筛选及增殖研究[J]. *现代食品科技*, 2007, 23(11): 61-63.

[14] 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.

[15] 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.

[16] 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.

[17] 程方, 武运, 武亚婷, 等. 酸马乳菌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.

[18] 王昱敬. 云南传统酸乳清中乳酸菌多样性及其益生特性研究[D]. 昆明: 云南农业大学, 2017: 16.

[19] 石超. 传统发酵牦牛酸奶中降胆固醇乳酸菌的筛选及其对高脂模型大鼠的益生作用[D]. 兰州: 兰州大学, 2014: 25.

(下转第26页)

3 结论

以蚕蛹为原料制备了蚕蛹多肽螯合钙,通过响应面优化法确定了制备的最优条件为 pH 10、反应温度 73 ℃、肽钙质量比 3.4:1、反应时间 80 min,在此条件下,得到的蚕蛹肽螯合钙中钙含量可达到 14.51%,具有较高的研究和生产价值。通过紫外光谱、红外光谱、扫描电镜分析可知,蚕蛹多肽与钙结合后结构发生了变化,多肽中氨基、羧基、磷酸基团参与肽钙结合反应。同时探究了多肽随钙源添加的结构变化规律,发现磷酸基团极易参与肽钙螯合反应。虽然蚕蛹本身具有产量大、氨基酸配比良好等优势,开发出的蚕蛹多肽螯合钙钙含量高,成本较低,但其生物利用率及安全性还有待通过细胞试验和动物试验进一步研究。

参考文献

- [1] SUZUKI Y, LANDOWSKI C P, HEDIGER M A. Mechanisms and regulation of epithelial Ca^{2+} absorption in health and disease[J]. Annual Review of Physiology, 2008, 70(1): 257-271.
- [2] BAO X L, LV Y, YANG B C, et al. A study of the soluble complexes formed during calcium binding by soybean protein hydrolysates[J]. Journal of Food Science, 2008, 73(3): C117-C121.
- [3] HOU Hu, WANG Shi-kai, ZHU Xiao, et al. A novel calcium-binding peptide from Antarctic krill protein hydrolysates and identification of binding sites of calcium-peptide complex[J]. Food Chemistry, 2018, 243: 389-395.
- [4] PENG Zhe, HOU Hu, ZHANG Kai, et al. Effect of calcium-binding peptide from Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) bone on calcium bioavailability in rats[J]. Food Chemistry, 2017, 221: 373-378.
- [5] SUN Na, WU Hai-tao, DU Ming, et al. Food protein-derived calcium chelating peptides: A review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2016(58): 140-148.
- [6] ZHAO Ning-ning, HU Jun, HOU Tao, et al. Effects of de-

salted duck egg white peptides and their products on calcium absorption in rats[J]. Journal of Functional Foods, 2014, 8: 234-242.

- [7] 廖森泰, 肖更生, 施英. 蚕桑资源高效综合利用的新内涵和新思路[J]. 蚕业科学, 2009, 35(4): 913-916.
- [8] 张燕, 陈业高, 海丽娜, 等. 蚕蛹氨基酸成分及其营养价值[J]. 云南化工, 2002, 29(6): 22-23.
- [9] 穆利霞, 鲁珍, 廖森泰, 等. 膜超滤对蚕蛹蛋白酶解液风味的影响[J]. 食品科学, 2013, 34(23): 108-112.
- [10] ADAMSON N J, REYNOLDSE C. Characterization of casein phosphopeptides prepared using alcalase: determination of enzyme specificity[J]. Enzyme Microb Technol, 1996, 19(3): 202-207.
- [11] 申勇涛, 原恺, 霍乃蕊, 等. 高钙含量肽钙螯合物的制备与表征分析[J]. 山西农业大学学报: 自然科学版, 2018, 38(5): 50-56.
- [12] 崔宇, 王小林, 孔祥珍, 等. 大豆肽螯合钙能力影响因素的研究[J]. 中国油脂, 2018, 43(2): 70-74.
- [13] 谢焯州, 曹志华, 吴艾纯, 等. 酶解豆粕制备多肽钙螯合物及其抗氧化性[J]. 江西化工, 2017(2): 61-66.
- [14] 陈新峰, 张治国, 王君虹, 等. 响应面法优化微波固相合成毛虾肽螯合钙工艺[J]. 浙江农业学报, 2015, 27(8): 1473-1478.
- [15] 郭耀华. 酶解一发酵鲢鱼副产物制备多肽螯合钙工艺优化及螯合机理研究[D]. 天津: 天津农学院, 2016: 48-49.
- [16] 黄海. 鲤鱼卵钙离子结合活性肽的制备及钙结合机制的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014: 66-67.
- [17] WANG Xu, GAO Ang, CHEN Yue, et al. Preparation of cucumber seed peptide-calcium chelate by liquid state fermentation and its characterization[J]. Food Chemistry, 2017, 229: 487-494.
- [18] ZHANG Kai, LI Jiang-wei, HOU Hu, et al. Purification and characterization of a novel calcium-binding decapeptide from Pacific cod (*Gadus Macrocephalus*) bone: Molecular properties and calcium chelating modes[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 52: 670-679.

(上接第 19 页)

- [20] 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: 13.
- [21] 雷霞. 伊敏河和海拉尔河两岸牧区乳及乳制品中益生乳酸菌的分离鉴定及其体外筛选[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2005: 15.
- [22] 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.
- [23] SOLIERI L, BIANCHI A, MOTTOLESE G, et al. Tailor-

ing 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.

- [24] 迪娜热尔·迪力达西, 刘璐, 加勒哈斯别克·塞力克, 等. 新疆传统发酵乳品中乳酸菌与酵母菌的益生特性[J]. 中国微生物学杂志, 2018, 30(1): 5-9, 13.
- [25] 邹婷婷. 具有潜在益生特性乳杆菌的筛选及鉴定[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2016: 4-5.