木醋杆菌对乳酸菌发酵复合果汁的影响

陈华丽[1,2]，吴继军[1]，邹波[1]，刘忠义[2]，徐玉娟[1]，肖更生[1]，余元善[1]

（1.广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所，农业部功能食品重点实验室，广东省农产品加工重点实验室，广东广州 510610）（2.湘潭大学化工学院，湖南湘潭 411105）

摘要：本研究探讨了木醋杆菌对复合果汁乳酸菌发酵后乳酸菌活菌数、乳酸菌对胃肠道的耐受性和主要营养成分及抗氧化能力的影响。结果表明，在 30 ℃的条件下，乳酸菌在复合果汁生长迅速，发酵 24 h 后，活菌数均达 8.50 log cfu/mL 以上；单一发酵组与共发酵组经人工胃液、人工肠液消化后乳酸菌存活率均在 60.00%以上，通过胆盐、体外消化后存活率均对比 MRS 肉汤发酵组存活率有所提高；木醋杆菌可增加乳酸菌的胆盐耐受能力。发酵后的复合果汁 pH 值均下降到 3.90 以下，葡萄糖、苹果酸和 Vc 含量均显著性降低(p<0.05)，乳酸含量和抗氧化活性(ORAC 值)均显著性提高(p<0.05)，木醋杆菌与乳酸菌共发酵显著降低复合果汁中单糖的含量，增加乙酸和纤维素产量(p<0.05)。综上所述，木醋杆菌能够在一定程度上提高乳酸菌胃肠道耐受性，降低复合果汁的单糖含量，增加果汁的酸度和细菌纤维素的含量。

关键词：乳酸菌；木醋杆菌；胃肠道耐受性；营养成分

文章篇号：1673-9078(2019)03-125-132 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.3.020

Effects of *Gluconacetobacter xylinus* on the Fermentation of a Mixed Fruit Juice by *Lactic acid bacteria*

CHEN Hua-li[1,2], WU Ji-jun[1], ZOU Bo[1], LIU Zhong-yi[2], XU Yu-juan[1], XIAO Geng-sheng[1], YU Yuan-shan[1]

(1.Sericulture & Agri-Food Research Institute Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Functional Foods Ministry of Agriculture, Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Guangzhou 510610, China) (2.College of Chemical Engineering, Xiangtan University, Xiangtan 411105, China)

Abstract: This study investigated the effects of *Gluconacetobacter xylinus* on the number of living *Lactic acid bacteria*, tolerance of *Lactic acid bacteria* to the gastrointestinal tract, main nutrients, and antioxidant capacity of a fermented mixed juice, were studied in this paper. The results showed that at 30 ℃, *Lactic acid bacteria* grew rapidly in the mixed juice. After 24 h fermentation, the number of living bacteria was over 8.50 log CFu/mL. The survival rate of *Lactic acid bacteria* in the single fermentation group and the co-fermentation group after digestion by simulated gastric juice and simulated intestinal juice were more than 60.00%. The survival rate of the juice fermentation group was improved by the bile salt and *in vitro* digestion as compared with that of the MRS broth fermentation group. *Gluconacetobacter xylinus* could enhance the bile salt tolerance of *Lactic acid bacteria*. The pH of the mixed juice after fermentation decreased to less than 3.90, the contents of glucose, malic acid and Vc all decreased significantly (p < 0.05), whilst the content of lactic acid and the antioxidant activity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC) value) increased significantly (p < 0.05). Co-fermentation with *Gluconacetobacter xylinus* and *Lactic acid bacteria* significantly reduced the monosaccharide content in the mixed juice, but increased the yield of acetic acid and cellulose (p < 0.05). In summary, *Gluconacetobacter xylinus* could improve the gastrointestinal tolerance of *Lactic acid bacteria* to a certain extent, reduce the monosaccharide content of in the mixed fruit juice, and increase the acidity of juice and the content of bacterial cellulose.

Key words: *Lactobacillus*; *Gluconacetobacter xylinus*; gastrointestinal tolerance; nutrients

收稿日期：2018-07-26

基金项目：国家自然科学基金项目（31501541）；国家重点研发计划课题（2017YFD0400703）；国家公益性行业(农业)科研专项(201503142-03)；广东省省级科技计划项目（2017B020207005）；广州市科技计划项目产学研协同创新重大专项（201704020037）

作者简介：陈华丽（1994-），女，硕士研究生，研究方向：食品加工

通讯作者：吴继军（1976-），男，研究员，硕士，研究方向：果蔬深加工

近年来，乳酸菌发酵果蔬制品的研究已十分广泛，利用乳酸菌发酵果蔬，不仅可以保留果蔬中的活性成分，还能赋予食品独特的风味。但乳酸菌要在人体内发挥其益生功能，必须能够顺利进入人体胃肠道并达到一定浓度[1]。以果汁作为载体，对提高乳酸菌的胃肠道耐受性具有一定的作用。Valero-Cases 等[2]研究发现，采用番茄汁和费约果汁进行乳酸发酵，可以提高

植物乳杆菌体外胃肠道消化的耐受性。张玉慧[3]研究表明，发酵蓝莓果汁中的干酪乳杆菌和植物乳杆菌在人工胃液、肠液和胆盐的环境中存活率较高。而固定化益生菌细胞在胃肠道环境中能有更高的存活率和代谢活性[4]，细菌纤维素(Bacterial Cellulose，BC)由于具有较高的机械强度、热稳定性、良好的生物相容性以及无毒性，近年来被广泛应用于固定化酶及固定化细胞技术[5]。工业化合成 BC 能力最强的是木醋杆菌[6]。Żywicka 等[7]采用与木醋杆菌共发酵固定化酵母细胞，结果表明固定化后的酵母细胞与游离形态比，产酒精量更高。Ton 等[8,9]研究了 BC 作为载体固定化酵母细胞用于酒精发酵，结果表明 BC 可以保护酵母细胞抵御外界不利条件如高渗透压、低 pH 等不利条件的影响，且被 BC 固定化的酵母细胞代谢活性要高于游离细胞，对产品的感官无负面影响。Fijałkowski 等[10]通过共培养乳酸菌和木醋杆菌，研究在振荡和静置模式下被固定化乳酸菌在模拟胃液和胆盐溶液中的存活率，结果表明振荡培养固定化的乳酸菌细胞在模拟胃液和胆盐中的存活率更高。

我们前期研究表明，荔枝、雪莲果和龙眼营养丰富，分别富含单糖、低聚糖和多糖，酸度低，作为一种发酵基质，可以很好地促进乳酸菌的生长，并且能改善热处理产生的蒸煮味。本文以荔枝、雪莲果和龙眼为研究对象，研究木醋杆菌对复合果汁乳酸菌发酵后乳酸菌活菌数、乳酸菌对胃肠道的耐受性和主要营养成分及抗氧化能力的影响，以期为复合果汁的多菌种发酵饮料的研发提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

原料：雪莲果，龙眼，购自本地水果市场；荔枝汁，购自果香园食品有限公司。

菌种：LC-G11 干酪乳杆菌、Lp-G18 植物乳杆菌和 Lr-G14 鼠李糖乳杆菌，购自广州硕维食品技术有限公司；ATCC23767 木醋杆菌，本实验室保藏。

试剂：MRS 琼脂培养基和肉汤培养基，广东环凯微生物科技有限公司；苯酚，阿拉丁试剂有限公司；果糖、葡萄糖、蔗糖、草酸、苹果酸、乳酸、乙酸、柠檬酸、抗坏血酸，上海源叶生物科技有限公司；蔗果三糖、蔗果四糖，和光纯药工业株式会社；其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

PB-J-S02E 破壁料理机，江门市贝尔斯顿电器有限公司；PB-10 型 pH 计，Sartorius 公司；UV1800 型紫外可见分光光度计，日本岛津公司；LC-20AT 型高效液相色谱仪，日本岛津公司；Infinite M200PRO 型酶标仪，瑞士 TECAN 公司；SPX-250B-Z 型生化培养箱，上海博讯实业有限公司医疗设备厂；ZHWY-211B 型恒温培养振荡器，上海智城分析仪器制造有限公司；JW-1042 型低速离心机，安徽嘉文仪器装备有限公司；YXQ-LS-5OS 型立式蒸汽灭菌锅，上海博讯实业有限公司医疗设备厂；无菌操作台，苏净集团苏州安泰空气技术有限公司；HWS-24 型电热恒温水浴锅，上海一恒科学仪器有限公司；D3024R 台式高速冷冻离心机，美国赛洛捷克 SCILOGEX 公司；DHG-9240A 型电热恒温鼓风干燥箱，上海齐欣科学仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 复合果汁的制备

新鲜雪莲果去皮，切片（厚度为 5 mm），90~100 ℃热烫 2 min，置于 0.40%的维生素 C 的护色液中浸泡 10 min 后打浆过滤；新鲜龙眼剥壳去核打浆过滤；将荔枝汁、龙眼汁和雪莲果汁 1:1:1(*V*:*V*:*V*)混合，贮藏于-20 ℃冷库中备用。

1.3.2 菌种活化复壮

在灭菌的 MRS 肉汤中接入乳酸菌的保藏培养物，30 ℃下静置培养 18 h；在灭菌的#350 醋酸菌液体培养基中接入木醋杆菌保藏培养物，30 ℃下 160 r/min 振荡培养 24 h。

1.3.3 复合果汁的发酵

单一发酵：复合果汁经热杀菌(100 ℃，30 s)处理，接种一种乳酸菌（接种量约为 6.00 log cfu/mL），置于 30 ℃培养箱中静置培养，每隔 12 h 取样用于分析微生物和其他理化指标。

共发酵：复合果汁经热杀菌(100 ℃，30 s)处理，接种一种乳酸菌（接种量约为 6.00 log cfu/mL）以及 10%的木醋杆菌，分别置于 30 ℃的培养箱中静置培养和振荡培养(160 r/min)，每隔 12 h 取样用于分析微生物和其他理化指标。

对照组：接种一种乳酸菌(接种量约为 6.00 log cfu/mL)于灭菌的 MRS 肉汤中，置于 30 ℃的培养箱中静置培养，每隔 12 h 取样用于分析微生物指标。

1.3.4 乳酸菌活菌数的测定

采用稀释倒平板法，具体原理和步骤参考 GB 4789-2016 中乳酸菌菌落总数的测定方法[11]。

1.3.5 乳酸菌胃肠道耐受性的测定

人工胃肠液的配制方法：参照中华人民共和国药典[12]。

人工胃液耐受性实验：pH 值为 2.50 的人工胃液中加入 10%菌体发酵液中混匀，37 ℃条件下，100 r/min 转速摇床培养，分别于 0、2 h 后取样，进行乳酸菌活菌数的测定。

人工肠液耐受性实验：人工肠液中加入 10%菌体发酵液混匀，37 ℃条件下，100 r/min 转速摇床培养，分别于 0、4 h 后取样，进行乳酸菌活菌数的测定。

胆盐耐受性实验：配制 4.5 g/L 胆盐溶液，121 ℃灭菌 15 min，加入 10%的菌体发酵液，37 ℃静置培养 24 h 后，进行乳酸菌活菌数的测定。

模拟体外消化实验：pH 值为 2.50 的人工胃液中加入 10%菌体发酵液中混匀，37 ℃条件下，100 r/min 转速摇床培养 2 h 后，用 0.20 mol/L $NaHCO_3$ 调节 pH 至 6.80，添加 10% (*W/V*)的胰蛋白酶和 0.45% (*W/V*)的猪胆盐混匀，37 ℃条件下，100 r/min 转速摇床培养 4 h 后，进行乳酸菌活菌数的测定。

1.3.6 各种理化指标的测定

pH 值测定：pH 值用 pH 计直接测定。

多糖含量的测定：发酵复合果汁(600 μL)与 300 μL 40% (*W/V*)三氯乙酸水溶液混合，-20 ℃放置 10 min，4 ℃放置 2 h 之后，离心(12000 r/min，4 ℃，5 min)，上清液加 5 倍体积的冷冻乙醇(100%，*V/V*)沉淀多糖。放置 4 ℃过夜，离心(12000 r/min，4 ℃，5 min)收集沉淀物，用 75%(*V/V*)酒精洗 2 次。沉淀物用 1 mL 蒸馏水(80 ℃)溶解。采用苯酚-硫酸法，以葡萄糖为标准品确定多糖含量[13]。

抗氧化能力的测定：抗氧化能力的测定采用氧自由基吸收能力(Oxygen Radical Absorbance Capacity，ORAC)法测定，结果以 mmol Trolox/L 表示[14]。

糖组分的测定：采用 HPLC 法测定[15]。色谱柱为 Shodex Asahipak NH2P-50 4E(4.60 mm×250 mm)色谱柱，检测器为蒸发光(ELSD)检测器，柱温 40 ℃，漂移管温度 50 ℃，流动相 70%乙腈，流速 1 mL/min，进样量 10 μL。

纤维素含量的测定：取发酵液离心(5000 r/min，10 min)，收集沉淀，浸入 0.10 mol/L NaOH 溶液中 80 ℃处理 2 h，除去残存的菌体和杂质。用 0.50%的冰乙酸浸泡中和，使用蒸馏水反复多次冲洗，置于 60 ℃烘箱干燥至恒重并称重。纤维素含量用(g/L)表示[16]。

有机酸和 Vc 的测定：采用 HPLC 法测定[17]。色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C18 (4.60 mm×250 mm)色谱柱，检测器为二极管阵列检测器，柱温 30 ℃，使用 0.10 mol/L $(NH_4)_2HPO_4$ (pH=2.70)为流动相，流速 0.60 mL/min，紫外检测波长 210 nm 和 245 nm，进样量 10 μL。

1.3.7 数据分析

数据采用统计软件 SPSS17.0 进行方差分析（Duncan's multiple range tests），结果以平均值±标准偏差表示，并用 Origin8.0 软件制图。

2 结果与讨论

2.1 木醋杆菌对乳酸菌在复合果汁发酵过程中生长动力学的影响

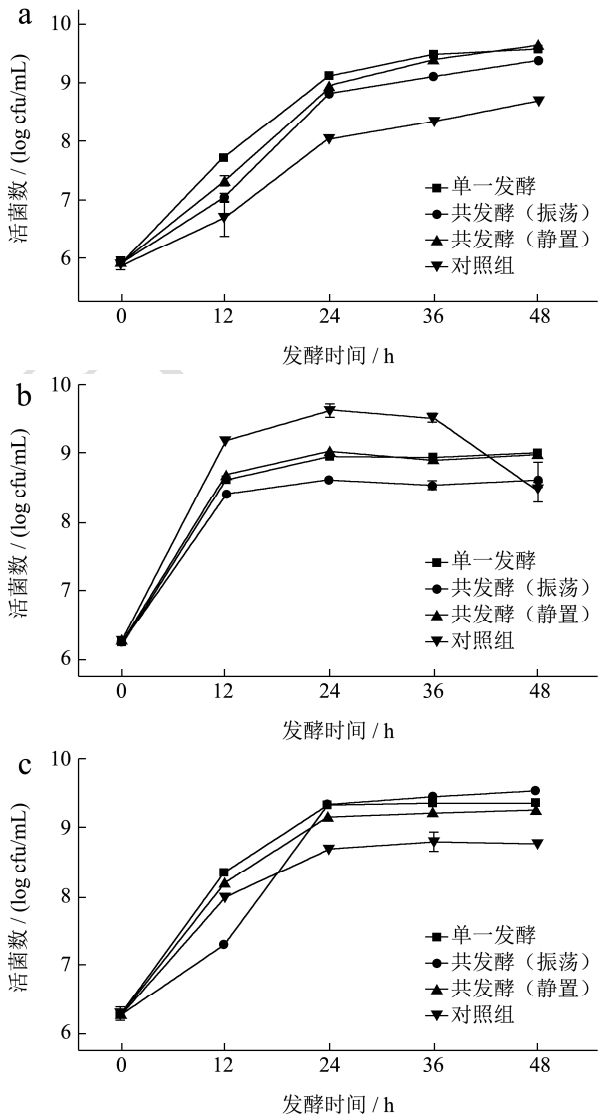

图 1 木醋杆菌对鼠李糖乳杆菌(a)、植物乳杆菌(b)和干酪乳杆菌(c)在复合果汁发酵过程中生长动力学的影响

Fig.1 Effect of *Gluconacetobacter xylinus* on growth kinetics of *Lactobacillus rhamnus* (a)、*Lactobacillus plantarum* (b) and *Lactobacillus casei* (c) during the fermentation of mixed juice

图 1a 是鼠李糖乳杆菌在复合果汁中单一发酵、与木醋杆菌共发酵（振荡、静置）和在 MRS 肉汤中发

酵的生长曲线。由图可知，鼠李糖乳杆菌在复合果汁中生长迅速，发酵的前 24 h，复合果汁中的营养物质充足，乳酸菌呈指数增长。发酵 36 h 后，单一发酵组与共发酵组（振荡、静置）的活菌数均达到 9.00 log cfu/mL 以上，此后仍呈缓慢增长趋势。对照组为鼠李糖乳杆菌在 MRS 肉汤中的生长，发酵期间菌种的生长相对其他三组较慢，发酵结束后活菌数为 8.67 log cfu/mL，明显低于复合果汁发酵组。说明鼠李糖乳杆菌在复合果汁中的生长优于在 MRS 肉汤中的生长，且加入木醋杆菌共发酵对鼠李糖乳杆菌生长动力学无影响。

图 1b 是植物乳杆菌在复合果汁中单一发酵、与木醋杆菌共发酵（振荡、静置）和在 MRS 肉汤中发酵的生长曲线。由图可知，植物乳杆菌在复合果汁中没有经历明显的延滞期，直接进入对数生长期。发酵 24 h 后，单一发酵组与共发酵组（振荡、静置）乳酸菌生长趋势变缓，进入稳定期。对照组植物乳杆菌发酵初期生长迅速，24 h 后活菌数达到最大值，此后菌种生长进入衰退期，后生长动力不足，活菌数下降，48 h 后活菌数略低于其他三组。因此，复合果汁作为发酵基质，有充足的营养物质供乳酸菌生长，但在振荡条件下，木醋杆菌会影响植物乳杆菌的生长。

图 1c 是干酪乳杆菌在复合果汁中单一发酵、与木醋杆菌共发酵（振荡、静置）和在 MRS 肉汤中发酵的生长曲线。由图可知，发酵初期，干酪乳杆菌快速增长，发酵 24 h 后，单一发酵组与共发酵组（振荡、静置）的活菌数均达到 9.00 log cfu/mL 以上，此后进入生长稳定期。对照组干酪乳杆菌活菌数低于复合果汁发酵组。由此可见，复合果汁非常适合干酪乳杆菌生长，加入木醋杆菌不影响干酪乳杆菌的生长。

2.2 木醋杆菌对发酵复合果汁中乳酸菌胃肠道耐受性的影响

图 2 是发酵复合果汁中的鼠李糖乳杆菌经人工胃液、人工肠液、胆盐和体外消化后的存活率。胃液 pH 值变化范围大，餐后胃液 pH 值一般在 3.00 左右，食物停留 1~2 h。由图可知，人工胃液消化 2 h 后，4 组乳酸菌存活率仍然较高，均在 100.00%以上，证明鼠李糖乳杆菌具有一定的耐酸和抗胃蛋白酶消化的能力；食物在肠液里通常停留 1~4 h，肠液 pH 值大约为 7.60，其中的胆汁和消化酶会影响肠道中益生菌的存活率。人工肠液消化 4 h 后，4 组发酵液中的乳酸菌存活率差异不大，均在 100.00%以上。证明鼠李糖乳杆菌具有一定的耐胰蛋白酶的能力。经胆盐消化 24 h 后，果汁发酵组存活率均在 45.00%以上，其中以与木醋杆菌共发酵振荡组存活率最高，对照组的活菌数由 8.41 log cfu/mL 下降到 7.90 log cfu/mL，存活率仅为 31.33%，证明复合果汁可以提高鼠李糖乳杆菌的胆盐消化耐受性，在振荡发酵条件下，木醋杆菌能提高发酵复合果汁中的鼠李糖乳杆菌胆盐消化耐受性。经过完整的模拟人体消化环境处理后，鼠李糖乳杆菌和木醋杆菌共发酵振荡组的存活率显著性高于其他组(p<0.05)，存活率在 25.00%以上，单一发酵组与共发酵静置组存活率也均在 15.00%以上，均高于对照组。上述结果表明，相对于 MRS 肉汤，复合果汁可以提高鼠李糖乳杆菌的胃肠道耐受性，在振荡发酵条件下木醋杆菌能显著提高发酵复合果汁中鼠李糖乳杆菌在低 pH、胃蛋白酶、胰蛋白酶和胆盐的共同消化刺激下的耐受性(p<0.05)。

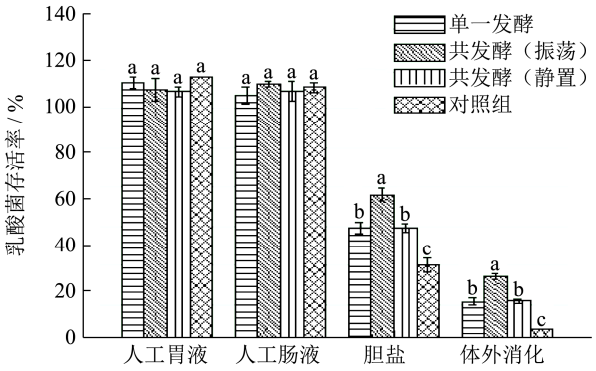

图 2 木醋杆菌对复合发酵果汁中鼠李糖乳杆菌胃肠道耐受性的影响

Fig.2 Effect of *Gluconacetobacter xylinus* on tolerance of *Lactobacillus rhamnus* to gastrointestinal digestion in fermented mixed juice

注：a、b、c 和 d 表示同一处理组各数值之间的显著性差异(p<0.05)，下图同。

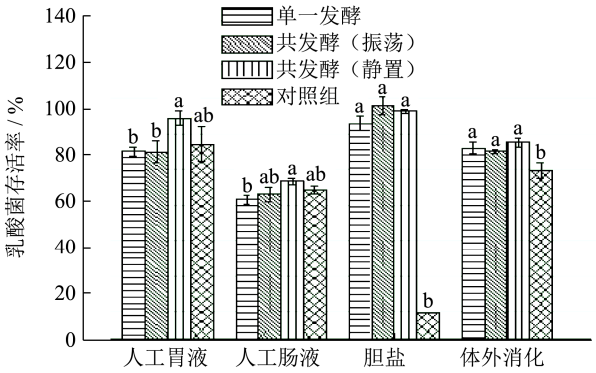

图 3 木醋杆菌对复合发酵果汁中植物乳杆菌胃肠道耐受性的影响

Fig.3 Effect of *Gluconacetobacter xylinus* on tolerance of *Lactobacillus plantarum* to gastrointestinal digestion in fermented mixed juice

图 3 是发酵复合果汁中的植物乳杆菌经人工胃液、人工肠液、胆盐和体外消化后的存活率。由图可知，人工胃液消化 2 h 后，4 组乳酸菌存活率仍然较高，均在 80.00%以上，证明植物乳杆菌具有一定的耐酸和胃蛋白酶的能力；人工肠液消化 4 h 后，4 组发酵液中的乳酸菌存活率均在 60.00%以上，证明植物乳杆菌具有一定的耐胰蛋白酶的能力。胆盐消化 24 h 后，果汁发酵组胆盐消化存活率均在 90.00%以上，对照组的活菌数由 8.42 log cfu/mL 下降到 7.47 log cfu/mL，存活率仅为 11.04%，显著性低于复合果汁发酵组(p<0.05)，证明复合果汁可以提高植物乳杆菌的胆盐消化耐受性，木醋杆菌能略微提高发酵复合果汁中植物乳杆菌的胆盐消化耐受性。经模拟人体消化环境处理后，由图可知，复合果汁发酵组存活率显著性高于对照组(p<0.05)，证明在低 pH、胃蛋白酶、胰蛋白酶和胆盐的共同消化刺激下，复合果汁可以提高植物乳杆菌的胃肠道耐受性，木醋杆菌对复合发酵果汁中的植物乳杆菌胃肠道耐受性影响不显著(p>0.05)。

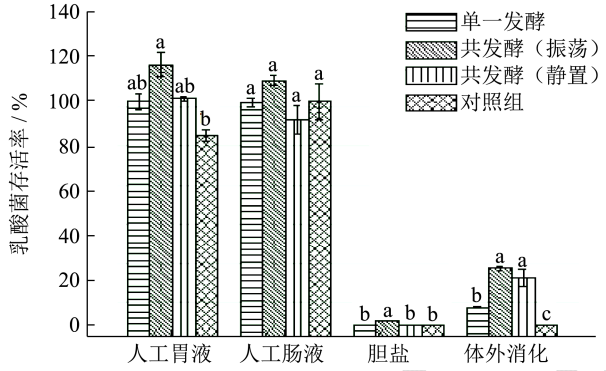

图 4 木醋杆菌对复合发酵果汁中干酪乳杆菌胃肠道耐受性的影响

Fig.4 Effect of *Gluconacetobacter xylinus* on tolerance of *Lactobacillus casei* to gastrointestinal digestion in fermented mixed juice

图 4 是发酵复合果汁中的干酪乳杆菌经人工胃液、人工肠液、胆盐和体外消化后的存活率。由图可知，人工胃液消化 2 h 后，4 组乳酸菌存活率仍然较高，均在 80.00%以上，证明干酪乳杆菌具有一定的耐酸和胃蛋白酶的能力；人工肠液消化 4 h 后，4 组发酵液中的乳酸菌存活率均在 95.00%以上，证明干酪乳杆菌具有一定的耐胰蛋白酶的能力。胆盐消化 24 h 后，4 组乳酸菌存活率存在显著性差异(p<0.05)，复合果汁共发酵振荡组胆盐消化存活率为 1.84%，显著高于其他三组，单一发酵组与共发酵静置组存活率分别为 0.03%和 0.02%，对照组的活菌数由 8.63 log cfu/mL 下降到 3.60 log cfu/mL，存活率仅有万分之一，证明复合果汁可以提高干酪乳杆菌的胆盐消化耐受性，木醋杆菌则显著提高了干酪乳杆菌对胆盐消化耐受性(p<0.05)。经模拟人体消化环境处理后，干酪乳杆菌与木醋杆菌共发酵，其乳酸菌的存活率显著性高于其他两组(p<0.05)，存活率在 20.00%以上，对照组存活率最低，活菌数由 8.80 log cfu/mL 下降到 5.31 log cfu/mL，存活率仅为 0.03%，证明在低 pH、胃蛋白酶、胰蛋白酶和胆盐的共同消化刺激下，复合果汁可以提高干酪乳杆菌的耐受性，与木醋杆菌共发酵能提高复合发酵果汁中的干酪乳杆菌耐受性。

2.3 木醋杆菌对复合果汁乳酸发酵营养成分的影响

木醋杆菌对鼠李糖乳杆菌发酵复合果汁营养成分的影响如表 1 所示，复合果汁发酵后 pH 降低，单一发酵组和共发酵组之间无显著性差异(p>0.05)。葡萄糖含量对比发酵前显著性降低(p<0.05)，共发酵振荡组降糖效果最为明显，果糖和蔗糖发酵前后含量变化不大，说明乳酸菌和木醋杆菌最先发酵利用果汁中的葡萄糖发酵产酸；蔗果三糖、蔗果四糖和蔗果五糖属于低聚果糖，是复合果汁-雪莲果汁中的主要糖类物质，一些研究表明，并不是所有乳杆菌都能利用低聚果糖，大部分的嗜酸乳杆菌，干酪乳杆菌和植物乳杆菌都能利用低聚果糖，而鼠李糖乳杆菌作为一种被广泛研究的益生菌株却不能利用低聚果糖[18]。发酵后复合果汁中蔗果三糖和蔗果四糖含量略微增加，可能是少量多糖发生了水解；发酵后多糖含量显著增加(p<0.05)，说明鼠李糖乳杆菌在发酵过程中产生了胞外多糖。复合果汁发酵后苹果酸含量对比发酵前显著性降低(p<0.05)，乳酸含量显著性增加(p<0.05)，说明鼠李糖乳杆菌除了糖酵解途径还通过苹果酸-乳酸发酵（malol actic fermenation，MLF）途径将苹果酸（二元酸）转变为乳酸（一元酸），使口感相对苹果酸更加圆润、柔和，风味更佳[19]；发酵后复合果汁中乙酸含量增加，其中共发酵组乙酸含量显著性高于单一发酵组(p<0.05)，说明加入木醋杆菌提高了果汁乙酸含量，赋予了发酵复合果汁多层次的口感；发酵后复合果汁中柠檬酸和草酸含量增加，单一发酵组和共发酵组无显著性差异(p>0.05)，说明复合果汁发酵代谢过程中产生柠檬酸和草酸；复合果汁发酵后 Vc 含量下降，可能是发生了氧化和降解[20]。发酵后复合果汁中纤维素含量上升，且共发酵组纤维素含量高于单一发酵组，说明木醋杆菌利用复合果汁中的营养物质产生 BC，提高了复合果汁膳食纤维的含量。发酵后复合果汁中抗氧化活性增加，共发酵组抗氧化活性显著性高于单一

发酵组(p<0.05)，可能是因为乳酸菌发酵促进结合态酚类物质的释放以及加入木醋杆菌共发酵进一步提高复合果汁酸度减缓了酚类物质的氧化，从而提升了复合果汁的生物活性[21,22]。

表 1 木醋杆菌对复合果汁经鼠李糖乳杆菌发酵后营养成分的影响

Table 1 Effect of *Gluconacetobacter xylinus* on nutrient composition of mixed juice fermented by *Lactobacillus rhamnus*

营养品质	发酵前	发酵后		
		单一发酵	共发酵（振荡）	共发酵（静置）
pH	5.25±0.01^{a}	3.67±0.02^{b}	3.61±0.08^{b}	3.65±0.02^{b}
果糖/(g/L)	42.90±3.19^{a}	42.92±0.19^{ab}	39.49±0.11^{ab}	40.50±0.20^{b}
葡萄糖/(g/L)	41.89±0.19^{a}	29.08±0.30^{b}	24.04±0.55^{d}	25.96±0.47^{c}
蔗糖/(g/L)	37.48±0.21^{a}	37.52±1.05^{a}	37.94±1.34^{a}	37.76±0.57^{a}
蔗果三糖/(g/L)	2.07±0.03^{b}	2.66±0.04^{a}	2.56±0.13^{a}	2.56±0.02^{a}
蔗果四糖/(g/L)	3.57±0.03^{d}	4.27±0.02^{a}	4.03±0.08^{c}	4.15±0.05^{b}
多糖/(mg/L)	59.02±0.85^{c}	119.73±1.28^{b}	119.73±4.03^{b}	156.15±9.58^{a}
苹果酸/(g/L)	0.71±0.01^{a}	0.17±0.03^{b}	0.23±0.00^{b}	0.20±0.00^{b}
乳酸/(g/L)	0.05±0.01^{d}	13.01±0.31^{b}	11.12±0.11^{c}	14.96±0.84^{a}
乙酸/(g/L)	0.41±0.01^{c}	0.44±0.00^{c}	0.62±0.03^{b}	0.66±0.03^{a}
柠檬酸/(g/L)	0.20±0.01^{b}	0.54±0.01^{a}	0.54±0.03^{a}	0.57±0.07^{a}
草酸/(g/L)	0.45±0.02^{b}	0.81±0.03^{a}	0.77±0.00^{a}	0.78±0.03^{a}
Vc/(g/L)	0.40±0.04^{a}	0.16±0.01^{c}	0.02±0.00^{d}	0.35±0.02^{b}
纤维素/(g/L)	2.60±0.52^{b}	3.77±0.94^{b}	10.36±2.10^{a}	11.25±1.70^{a}
ORAC 值/(mmol Trolox/L)	18.56±1.43^{c}	24.16±1.11^{b}	25.41±0.72^{ab}	28.35±1.35^{a}

注：a、b、c 和 d 表示同一行各数值之间的显著性差异(p<0.05)。下表同。

表 2 木醋杆菌对复合果汁经植物乳杆菌发酵后营养成分的影响

Table 2 Effect of *Gluconacetobacter xylinus* on nutrient composition of mixed juice fermented by *Lactobacillus plantarum*

营养品质	发酵前	发酵后		
		单一发酵	共发酵（振荡）	共发酵（静置）
pH	5.25±0.01^{a}	3.47±0.01^{c}	3.48±0.01^{ab}	3.48±0.00^{b}
果糖/(g/L)	42.90±3.19^{a}	36.72±0.12^{b}	36.66±0.41^{b}	35.74±0.05^{b}
葡萄糖/(g/L)	41.89±0.19^{a}	29.44±0.12^{b}	25.32±0.02^{c}	28.54±0.07^{b}
蔗糖/(g/L)	37.48±0.21^{a}	29.66±0.05^{b}	28.24±0.33^{d}	28.76±0.08^{c}
蔗果三糖/(g/L)	2.07±0.03^{a}	1.67±0.02^{b}	1.65±0.01^{b}	1.66±0.01^{b}
蔗果四糖/(g/L)	3.57±0.03^{a}	3.09±0.03^{b}	3.00±0.01^{c}	3.01±0.01^{c}
多糖/(mg/L)	59.02±0.85^{a}	31.66±2.35^{c}	47.52±1.38^{b}	31.16±1.23^{c}
苹果酸/(g/L)	0.71±0.01^{a}	0.21±0.01^{b}	0.22±0.01^{b}	0.21±0.02^{b}
乳酸/(g/L)	0.05±0.01^{d}	7.11±0.28^{b}	3.66±0.36^{c}	8.31±0.02^{a}
乙酸/(g/L)	0.41±0.01^{c}	0.42±0.00^{c}	0.61±0.06^{a}	0.50±0.01^{b}
柠檬酸/(g/L)	0.20±0.01^{ab}	0.18±0.01^{b}	0.17±0.01^{b}	0.22±0.01^{a}
草酸/(g/L)	0.45±0.02^{a}	0.16±0.01^{c}	0.12±0.02^{d}	0.22±0.01^{b}
Vc/(g/L)	0.40±0.04^{a}	0.04±0.01^{c}	0.04±0.00^{c}	0.06±0.00^{b}
纤维素/(g/L)	2.60±0.52^{c}	2.67±0.58^{c}	6.69±1.60^{b}	9.94±2.84^{a}
ORAC 值/(mmol Trolox/L)	18.56±1.43^{a}	14.58±1.51^{a}	19.32±2.68^{a}	16.03±1.70^{a}

表 2 是复合果汁经植物乳杆菌发酵 48 h 后主要营养品质的变化，从表 2 可知，经植物乳杆菌发酵后的复合果汁 pH 显著性降到 3.48 左右(p<0.05)。果糖、葡萄糖和蔗糖含量对比发酵前显著性降低(p<0.05)，其中与木醋杆菌共发酵对糖组分的转化利用率更高，振荡组降葡萄糖和蔗糖效果更显著(p<0.05)；蔗果三糖、蔗果四糖属于低聚果糖，是复合果汁-雪莲果汁中的主要糖类物质，研究表明，大部分的嗜酸乳杆菌，干酪乳

杆菌和植物乳杆菌都能利用低聚果糖[18]。发酵后复合果汁中蔗果三糖和蔗果四糖含量降低，说明植物乳杆菌发能够利用低聚果糖进行生命活动；多糖含量下降，可能是植物乳杆菌发酵产胞外多糖能力不强，且多糖发生了水解所致。复合果汁发酵后苹果酸含量显著性降低(p<0.05)，乳酸含量显著性增加(p<0.05)，说明植物乳杆菌除了糖酵解途径还通过 MLF 发酵途径将苹果酸转变为乳酸；发酵后复合果汁中乙酸含量增加，其中共发酵组乙酸含量显著性高于单一发酵组(p<0.05)，说明加入木醋杆菌共发酵提高了果汁乙酸含量，赋予了发酵复合果汁多层次的口感；发酵前后柠檬酸含量变化不大，说明发酵菌种无明显转化利用柠檬酸的能力；发酵后草酸含量降低，说明草酸能够被转化利用；复合果汁发酵后 Vc 含量均下降，可能是发生了氧化和降解[20]。发酵后复合果汁中纤维素含量上升，且共发酵组纤维素含量高于单一发酵组，说明木醋杆菌利用复合果汁中的营养物质产生 BC，提高了复合果汁膳食纤维的含量。发酵后的复合果汁抗氧化活性对比发酵前无显著性差异(p>0.05)，可能是复合果汁经乳酸菌发酵后释放的酚类物质含量与植物乳杆菌为了解除高浓度多酚对其生长的抑制作用而主动降解的酚类物质含量相近，从而导致发酵后抗氧化活性无明显变化[23]。

表 3 木醋杆菌对复合果汁经干酪乳杆菌发酵后营养成分的影响

Table 3 Effect of *Gluconacetobacter xylinus* on nutrient composition of mixed juice fermented by *Lactobacillus casei*

营养品质	发酵前	发酵后		
		单一发酵	共发酵（振荡）	共发酵（静置）
pH	5.25±0.01^{a}	3.67±0.01^{c}	3.89±0.01^{b}	3.66±0.01^{c}
果糖/(g/L)	42.90±3.19^{a}	37.06±0.08^{b}	34.61±0.30^{bc}	33.06±0.15^{c}
葡萄糖/(g/L)	41.89±0.19^{a}	23.19±0.23^{b}	17.37±0.20^{d}	20.10±0.10^{c}
蔗糖/(g/L)	37.48±0.21^{a}	37.63±0.22^{a}	36.01±0.40^{b}	33.46±0.48^{b}
蔗果三糖/(g/L)	2.07±0.03^{c}	2.32±0.01^{a}	2.11±0.03^{bc}	2.13±0.04^{b}
蔗果四糖/(g/L)	3.57±0.03^{b}	3.65±0.02^{a}	3.55±0.02^{b}	3.45±0.04^{c}
多糖/(mg/L)	59.02±0.85^{b}	60.78±4.42^{b}	84.15±5.91^{a}	62.04±2.43^{b}
苹果酸/(g/L)	0.71±0.01^{a}	0.15±0.01^{b}	0.24±0.00^{b}	0.19±0.01^{b}
乳酸/(g/L)	0.05±0.01^{d}	13.11±0.05^{b}	7.56±0.09^{c}	13.46±0.01^{a}
乙酸/(g/L)	0.41±0.01^{c}	0.44±0.00^{c}	0.88±0.07^{a}	0.59±0.04^{b}
柠檬酸/(g/L)	0.20±0.01^{b}	0.37±0.02^{a}	0.36±0.01^{a}	0.38±0.01^{a}
草酸/(g/L)	0.45±0.02^{c}	0.65±0.01^{a}	0.49±0.03^{b}	0.62±0.00^{a}
Vc/(g/L)	0.40±0.04^{a}	0.02±0.00^{b}	0.01±0.00^{b}	0.01±0.00^{b}
纤维素/(g/L)	2.60±0.52^{c}	3.17±0.93^{c}	9.62±0.65^{b}	13.33±0.51^{a}
ORAC 值/(mmol Trolox/L)	18.56±1.43^{b}	18.49±1.63^{b}	28.63±1.88^{a}	27.77±1.63^{a}

表 3 是复合果汁经干酪乳杆菌发酵 48 h 后主要营养品质的变化，从表 3 可知，经干酪乳杆菌发酵后的复合果汁 pH 降低，其中单一发酵组与共发酵静置组的 pH 下降更为显著(p<0.05)。果糖、葡萄糖和蔗糖含量对比发酵前显著性降低(p<0.05)，其中与木醋杆菌共发酵对糖组分的转化利用率更高，降糖效果更显著(p<0.05)；蔗果三糖、蔗果四糖和蔗果五糖属于低聚果糖，是复合果汁-雪莲果汁中的主要糖类物质，研究表明，大部分的嗜酸乳杆菌，干酪乳杆菌和植物乳杆菌都能利用低聚果糖[18]。发酵后的复合果汁蔗果三糖和蔗果四糖含量发生变化，说明干酪乳杆菌发能够利用低聚果糖进行生命活动；经干酪乳杆菌发酵后，复合果汁中的多糖含量上升，说明干酪乳杆菌发酵过程中产生了胞外多糖。发酵后复合果汁中苹果酸含量对比发酵前显著性降低(p<0.05)，乳酸含量显著性增加(p<0.05)，说明干酪乳杆菌可能经过 MLF 发酵途径将苹果酸转变为乳酸；发酵后复合果汁中乙酸含量增加，其中共发酵组乙酸含量显著性高于单一发酵组(p<0.05)，说明加入木醋杆菌共发酵提高了果汁乙酸含量，赋予了发酵复合果汁多层次的口感；发酵后复合果汁中柠檬酸和草酸含量增加，说明复合果汁发酵代谢过程中产生柠檬酸和草酸；发酵后复合果汁 Vc 含量均下降，可能是发生了氧化和降解[20]。发酵后复合果汁中纤维素含量上升，且共发酵组纤维素含量高于单一发酵组，说明木醋杆菌利用复合果汁中的营养物质产生 BC，提高了复合果汁膳食纤维的含量。干酪乳杆菌单一发酵后的复合果汁抗氧化活性对比发酵前变化不大，与木醋杆菌共发酵后的复合果汁抗氧化活

性显著性升高(p<0.05)，说明加入木醋杆菌共发酵进一步提高复合果汁酸度减缓了酚类物质的氧化，从而提升了复合果汁的生物活性[21,22]。

3 结论

3.1 复合果汁营养丰富，以乳酸菌在 MRS 肉汤中的培养作为对照，鼠李糖乳杆菌、植物乳杆菌和干酪乳杆菌均能在复合果汁中很好的生长，且与木醋杆菌共发酵并不影响乳酸菌的生长，单一发酵组与共发酵组在发酵结束后活菌数均大于对照组。

3.2 发酵复合果汁组以及对照组中鼠李糖乳杆菌、植物乳杆菌和干酪乳杆菌对低 pH 和胃蛋白酶共同消化的耐受性及胰蛋白酶消化耐受性均较强；发酵复合果汁能提高乳酸菌的胆盐耐受性，其中以振荡条件下木醋杆菌与乳酸菌共发酵对胆盐消化耐受性最强；在低 pH、胃蛋白酶、胰蛋白酶和胆盐消化的共同刺激下，相比对照组，复合果汁能够显著提高乳酸菌的胃肠道耐受性(p<0.05)，而在振荡发酵条件下，木醋杆菌能进一步提高鼠李糖乳杆菌和干酪乳杆菌的胃肠道耐受性。

3.3 复合果汁发酵后营养成分发生了改变，使得有机酸含量升高，pH 值降低，抗氧化能力增加，其中鼠李糖乳酸菌发酵还能显著提高多糖产量(p<0.05)。与单一乳酸菌发酵相比，木醋杆菌与乳酸菌共发酵显著降低复合果汁中单糖的含量，增加乙酸和纤维素产量。

参考文献

[1] 崔琴,贠建民,张丽,等.甘南州牧区优良乳酸菌耐受特性的研究[J].食品工业科技,2010,31(3):216-219
CUI Qin, YUN Jian-min, ZHANG Li, et al. Study on the tolerance property of super LAB strains in pastoralarea of Gannan prefecture [J]. Food Industry Science and Technology, 2010, 31(3): 216-219

[2] Valero-Cases E, Roy N, Frutos M J, et al. Influence of the fruit juice carriers on the ability of *Lactobacillus plantarum* DSM20205 to improve *in vitro* intestinal barrier integrity and its probiotic properties [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(28): 5632-5638

[3] 张玉慧.乳酸菌发酵蓝莓果汁的工艺研究[D].沈阳:沈阳农业大学,2016
ZHANG Yu-hui. Study on the fermentation process of blueberry juice by *Lactobacillus* [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2016

[4] Rao A V, Shiwnarain N, Maharaj J. Survival of microencapsulated *Bifidobacterium pseudolongum* in simulated gastric and intestinal juices [J]. Canadian Institute of Food Science and Technology Journal, 22(4): 345-349

[5] 朱春林.细菌纤维素膜应用于固定化微生物细胞及音响膜的初步研究[D].南京:南京理工大学,2008
ZHU Chun-lin. Application of bacterial cellulose membrane in immobilized microorganism cell and sound film [D]. Nanjing: Nanjing University of Science and Technology, 2008

[6] 马霞,王瑞明,关凤梅,等.发酵生产细菌纤维素菌株的特点[[J].四川食品与发酵,2005,41(1):20-22
MA Xia, WANG Rui-ming, GUAN Feng-mei, et al. Characteristics of strain to produce bacterial cellulose by fermenting [J]. Sichuan Food and Fermentation, 2005, 41(1): 20-22

[7] Żywicka A, Peitler D, Rakoczy R, et al. Wet and dry forms of bacterial cellulose synthetized by different strains of *Gluconacetobacter xylinus* as carriers for yeast immobilization [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2016, 180(4): 805-816

[8] Ton N M N, Le V V M. Application of immobilized yeast in bacterial cellulose to the repeated batch fermentation in wine-making [J]. International Food Research Journal, 2018, 3: 983-987

[9] Ton N M N, Nguyen M D, Pham T T H, et al. Influence of initial pH and sulfur dioxide content in must on wine fermentation by immobilized yeast in bacterial cellulose [J]. International Food Research Journal, 2017, 3: 743-749

[10] Fijałkowski K, Peitler D, Rakoczy R, et al. Survival of probiotic lactobacillus immobilized in different forms of bacterial cellulose in simulated gastric juices and bile salt solution [J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 68: 322-328

[11] GB 4789.35-2016,中国人民共和国国家标准[S]
GB 4789.35-2016, The national standard of the people's republic of China [S]

[12] 国家药典委员会.中国药典(2015 版)二部附录[M].北京:中国医药科技出版社,2015
National Pharmacopoeia Commission. The Second Appendix of Chinese Pharmacopoeia (2015 Edition) [M]. Beijing: China Pharmaceutical Science and Technology Press, 2015

[13] Wu Y, Cui S W, Tang J, et al. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from boat-fruited *Sterculia* seeds by response surface methodology [J]. Food Chemistry, 2007, 105(4): 1599-1605

（下转第 139 页）