

臭味发酵食品中益生菌分离鉴定及功能性研究

曲勤凤, 俞漪, 徐琼, 刘洋*

(上海市质量监督检验技术研究院/国家食品质量监督检验中心(上海), 上海 200233)

摘要: 目的 分析臭味天然发酵食品中常见益生菌种类。**方法** 本实验从臭味天然发酵食品中选取了 4 种常见益生菌株, 并对耐酸耐胆盐能力、抗药性进行了研究。**结果** 4 株益生菌株经 16S rDNA 分子鉴定为鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)和粪肠球菌(*Enterococcus faecium*)。嗜酸乳杆菌在 pH 4 的培养基培养 16 h 后, 其相对 $OD_{600\text{ nm}}$ 值为 51.13%, 具有较强的耐酸能力。植物乳杆菌在 0.3 g/L 和 0.6 g/L 胆盐质量浓度下培养 16 h 后, 其相对 $OD_{600\text{ nm}}$ 值分别为 98.88%、66.22%, 具有较强的耐胆盐能力。实验结果表明这 2 株菌的耐药性都低于鼠李糖乳杆菌和粪肠球菌。**结论** 植物乳杆菌、嗜酸乳杆菌为耐酸耐胆盐低耐药性特点的益生菌株。

关键词: 益生菌; 臭味发酵食品; 16S rDNA 序列分析; 耐酸耐胆盐; 耐药性

Isolation, identification and functional study of probiotics from odor fermented food

QU Qin-Feng, YU Yi, XU Qiong, LIU Yang*

(Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research/National Center of Supervision and Inspection on Food Products Quality (Shanghai), Shanghai 200233, China)

ABSTRACT: Objective To analyze the common probiotic species in stinky natural fermented foods. **Methods** Naturally fermented foods had a large number of probiotics, 4 strains of bacteria were isolated from naturally fermented foods for research. These strains were studied in acid, bile salt tolerance and drug resistance. **Results** The 4 strains of bacteria were analyzed by PCR, 16S rDNA sequence analysis showed that these probiotics were *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* and *Enterococcus faecium*. After 16 h cultured in the culture medium of pH 4, *Lactobacillus acidophilus*'s relative $OD_{600\text{ nm}}$ value was 51.13%, which was strong acid resistance. *Lactobacillus plantarum* was cultured after 16 h at 0.3 g/L and 0.6 g/L bile salt mass concentrations, its relative $OD_{600\text{ nm}}$ values were 98.88% and 66.22%, which was strong salt tolerance. Results showed that the drug resistance of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* was lower than that of *Lactobacillus rhamnosus* and *Enterococcus faecium*. **Conclusion** These results show that both *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* are that with the characteristics of low resistance to acid, bile salts and drugs.

KEY WORDS: probiotic; odor fermented food; 16S rDNA sequence analysis; acid and bile salt tolerance;

基金项目: 市场监管总局科技计划资助(2017QK167)、上海市市场监督管理局青年科技启明星计划资助项目(QMX2018012)

Fund: Supported by the Science and Technology Plan Project of State Administration of Market Supervision (2017QK167), and Youth Science and Technology Star Program of Shanghai Market Supervision and Administration Bureau (QMX2018012)

*通讯作者: 刘洋, 博士, 正高级工程师, 主要研究方向为食品微生物、分子生物学。E-mail: liuyang@sqi.org.cn

*Corresponding author: LIU Yang, Ph.D, Professor, Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research/National Center of Supervision and Inspection on Food Products Quality (Shanghai), No.381, Cangwu Road, Xuhui District, Shanghai 200023, China. E-mail: liuyang@sqi.org.cn

drug resistance

1 引言

发酵是一种古老、传统的食品储存与加工的方法。传统发酵食品以其制作成本低,改善食品的风味、营养及有较强的稳定性等优点在世界广泛分布,具有风味独特、营养丰富等特点。传统发酵食品多采用自然接种方式进行生产,部分类型的生产技艺已具有数千年的历史^[1-3]。有一类特殊的发酵食品,好吃不好闻,人们常常形容为“臭味发酵食品”。中国臭味食品在大陆最为多见,以蔬菜类较为常见,如臭豆腐,发酵性的臭豆腐又名腐乳^[4];宁波三臭,包括臭冬瓜、臭苋菜梗(又名“霉苋菜梗、臭苋菜”)、臭菜心^[4];臭豆豉有特殊的氨味^[5]。动物性臭味食品相对较少,臭蛋和臭鳊鱼是较为有名的动物性臭味食品。臭蛋^[6]、臭鳊鱼^[7]都是近几年消费者餐桌上的美味。臭味发酵食品不仅具有较高的营养价值,具有独特的风味,备受消费者的青睐;而且这些食品中蕴含着丰富的益生菌资源。

传统发酵过程中微生物体系复杂,在多数天然发酵工艺中,微生物菌群复杂且发酵过程难以控制,能产生大量有益微生物和部分有害微生物,如各类益生菌、酵母菌、霉菌、醋酸菌及其他细菌等,其中益生菌是发酵过程中产生的重要一类微生物。益生菌因对人体有独特的健康功效^[8,9]引起了科学研究者的广泛关注,如降胆固醇的益生作用^[10-13]、抗氧化能力^[14]、明显抑制致病菌效果^[15,16]、调节肠道菌群的功能^[17]。

根据文献报道,活性益生菌的数量必须至少大于 10^6 CFU/g 才能发挥益生作用^[18],食用后在体内是否存在这主要与耐酸耐胆盐能力有关,因此耐酸耐胆盐能力是筛选益生菌一个重要标志^[19]。本研究主要对2类常见的发酵臭味食品臭豆腐和臭腐乳在发酵过程中可能产生的益生菌种类进行分析,采用分子生物学鉴定技术结合表型特征对中国传统的天然发酵臭味食品分离的益生菌进行鉴定,为传统发酵食品存在的营养价值提供一定的依据;同时对所分离出的益生菌进行耐酸耐胆盐能力和抗生素耐受性评价,可为筛选具有潜在生产应用价值的益生菌提供依据,为抗生素的合理使用和益生菌安全性评价提供参考。

2 材料与amp;方法

2.1 实验样品

臭味食品包括市购臭豆腐和臭腐乳。

2.2 标准菌株

金黄色葡萄球菌 ATCC25923(由中国微生物菌种保藏中心提供)。

2.3 试剂材料

MRS 培养基、MRS 培养液、革兰氏染色试剂盒、3%过氧化氢、精氨酸水解酶培养基、七叶苷、pH9.6 葡萄糖肉汤(北京陆桥技术有限公司); SDS 提取液[2.4 g/L SDS, 0.5 mol/L NaCl, 0.1 mol/L Tris-HCl, 0.05 mol/L Na₂EDTA(pH8.0)], TE 缓冲液[10 mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 1 mmol/L EDTA (pH8.0)], 10 mg/mL 溶菌酶(10 mg/mL)(美国 Sigma 公司); 蛋白酶(20 mg/mL, 德国 Merk 公司); 2×PCR(聚合酶链式反应)反应缓冲液、0.5×电泳缓冲液、Taq DNA 聚合酶、dNTP、DL2000marker(日本 Takara 公司); 异丙醇、无水乙醇、三氯甲烷(分析纯, 国药集团化学试剂北京有限公司); Tris 饱和酚(上海捷倍思公司); 琼脂糖(1%, 上海天根化工有限公司); 溴化乙锭[赛默飞世尔科技(北京)公司]; 抗菌药物药敏纸片(杭州微生物试剂有限公司)。

2.4 仪器设备

PRIMO-Starx2005 生物显微镜(100×, 德国 ZEISS 公司); UV-1800 紫外分光光度计(日本岛津公司); ABI VERITI 温度梯度 PCR 仪(美国 ABI VERITI 公司); SMI12 恒温培养箱(36 °C±1 °C, 美国 SHELLAB 公司); Mark II 厌氧培养系统(荷兰 Anoxomat MARK II 公司); DS-11 核酸蛋白分析仪(美国 Denovix 公司); SUBCELL 电泳仪、Geldoc XR+紫外凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2.5 实验方法

2.5.1 菌株分离、纯化^[20]

称取 25 g 样品, 用 225 mL 0.85%生理盐水均质, 然后做 10 倍系列稀释, 取适宜 3 个稀释度, 各稀释度取 0.1 mL 液体分别涂布于固体 MRS 培养基平板上, 37 °C 厌氧培养 72 h。根据形态特征挑选形态各异典型菌落, 反复划线纯化获得纯菌株, 进行菌落观察和生化初步鉴定。

2.5.2 菌株初步鉴定

(1) 菌落形态观察

MRS 平板形态观察和革兰氏染色^[21]。

(2) 生化初步鉴定

3%过氧化氢酶、葡萄糖产酸试验、七叶苷水解试验、精氨酸水解酶、石蕊牛奶^[22]。

2.5.3 分子生物学鉴定

(1) 引物的设计与合成

16S rDNA 通用引物:

16SF: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';

1495R: 5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3';

引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

(2) 总 DNA 的提取

从单克隆菌株纯培养平板上挑取单个菌落进行裂解,

提取 DNA^[23], 用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计测定 DNA 浓度, 当 A_{260}/A_{280} 比值介于 1.6~2.0 之间时, 符合 PCR 检测要求, 提取获得 DNA 置于 -20 °C 长期保存。

(3) PCR 扩增

25 μ L 的反应体系: 在 0.2 mL 的 PCR 反应管中, 正向引物和反向引物各 200 nmol/L, 2 \times PCR 反应缓冲液 12.5 μ L, 2.0 μ L DNA 模板(约 50 ng)。PCR 反应条件: 98 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 5 s, 72 °C 延伸 90 s, 32 个循环, 4 °C 保存, 使用 PCR 仪进行 PCR 扩增。每个 PCR 反应均应设置 2 个平行试验, 同时设置阳性对照和阴性对照, 阳性对照使用与目标菌种同种的模式菌种或参比菌株的 DNA 为模板, 阴性对照采用不含目标序列的 DNA 为模板。

(4) PCR 扩增产物的凝胶电泳

PCR 扩增产物电泳检测: 配制 1% 琼脂糖凝胶, 加入溴化乙锭贮存液至终浓度为 0.5 μ g/mL, 制胶。在电泳槽中加入 0.5 \times TBE 缓冲液, 以 5:1(V:V)的比例加入 PCR 产物和 6 \times loading buffer, 9 V/cm 恒压电泳, 紫外凝胶成像系统下观察与分析。将 PCR 产物送到测序, 将测序结果在 GenBank 中进行 BLAST 分析, 构建系统发育树。

2.5.4 分离菌种功能性研究

(1) 耐酸实验

将活化好的菌株, 按 3% 接种量接种于 pH 值分别为 2.0、4.0、6.0、6.5 和 7.0 的 MRS 肉汤, 37 °C 厌氧培养 16 h, 测各组菌液的 $OD_{600\text{nm}}$ 值。

(2) 耐胆盐实验

将活好的菌株, 按 3% 接种量接种于胆盐质量浓度分别为 0、0.3、0.6 g/L 的 MRS 液体培养基中, 37 °C 厌氧培养 16 h, 测各组菌液的 $OD_{600\text{nm}}$ 值。

(3) 药敏实验

采用药敏纸片法^[24]测定益生菌对抗生素的耐药性。取 1.0 mL 菌液浓度为 10^8 CFU/mL 菌悬液加入到 15 mL 无菌并融化后的 MRS 培养基中, 混匀后倾注 90 mm 无菌平皿上, 待凝固后放入药物纸片, 37 °C 厌氧培养 48 h 后测定并记录抑菌圈直径, 以标准敏感菌金黄色葡萄球菌 ATCC25923 为质控菌根据敏感和耐药的标准判定^[25]。

3 结果与分析

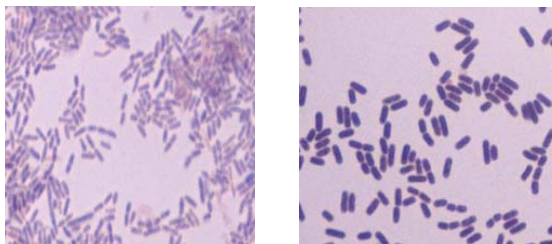
3.1 菌落形态与初步鉴定

3.1.1 平板菌落形态

在 MRS 培养基上 37 °C 厌氧培养 72 h 后, 菌落形态呈白色, 且表面光滑, 边缘整齐。分别从臭豆腐和臭腐乳中各筛选出 2 株菌株, 进行革兰氏染色镜检。

3.1.2 革兰氏染色观察

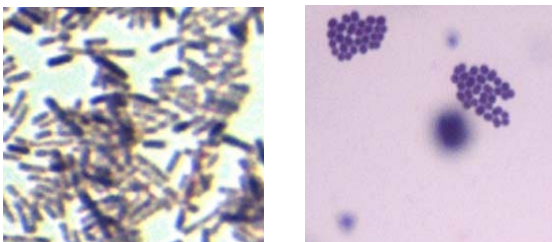
从臭豆腐 MRS 平板上挑取菌落在显微镜下观察后为革兰氏阳性杆状, 根据染色后菌体的形态分离出 2 株菌株, 分别命名为 CDF1、CDF2, 见图 1; 从臭腐乳 MRS 平板上染色后的形态分离出 1 株革兰氏阳性杆菌、1 株革兰氏阳性球菌, 分别命名为 CFR1、CFR2, 见图 2。MRS 平板菌落特点及革兰氏染色镜检情况见表 1。



注: 左边为 CDF1; 右边为 CDF2。

图 1 各菌落革兰氏染色镜检(臭豆腐)

Fig.1 Gram staining microscopic examination of each colony (stinky tofu)



注: 左边为 CFR1; 右边为 CFR2。

图 2 各菌落革兰氏染色镜检(臭腐乳)

Fig.2 Gram staining microscopic examination of each colony (stinky bean curd)

表 1 MRS 平板菌落特点及革兰氏染色镜检

Table 1 Colony characteristics of MRS plate and Gram staining microscopy

菌株编号	MRS 平板菌落生长特点	革兰氏染色镜检
CDF1	白色菌落, 表面光滑, 边缘整齐	阳性短杆菌
CDF2	白色菌落, 表面光滑, 边缘整齐	阳性短杆菌
CFR1	白色菌落, 表面光滑, 边缘整齐	阳性长杆菌
CFR2	白色菌落, 表面光滑, 边缘整齐	阳性球菌

3.1.3 生化鉴定结果

以上 4 株菌纯化分离后进行葡萄糖产酸产气试验、七叶苷水解试验、精氨酸水解酶和石蕊牛奶鉴定, 结果见表 2。经鉴定分离出的 4 株菌的生化反应均过氧化氢酶阴性, 分解葡萄糖、七叶苷, 精氨酸水解酶阳性, 石蕊牛奶鉴定试验阳性, 符合乳酸菌生化特点。

3.2 16S rDNA 基因序列分析

PCR 扩增产物经 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测, 分离株在 1500 bp 处均出现特异性条带, 与预期扩增大小一致, 说明扩增成功, 见图 3。测序后, 将各菌株的 16S rDNA 基因测序结果在 GenBank 中进行 BLAST 分析, 各菌株与参考菌株的同源性均达到 99%以上, 见表 3。为显示菌株之间的亲缘关系及系统地位, MEGA5 构建系统发育树, 见图 4。

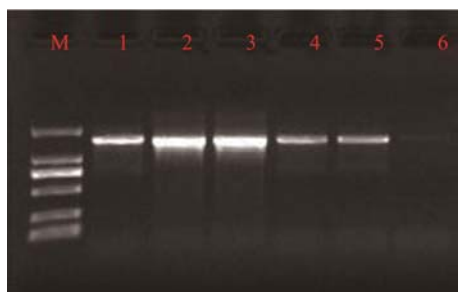
3.3 耐酸实验结果

有关益生菌耐酸研究表明, 耐酸特性是优良益生菌作为功能性食补因子的一个重要指标。本研究中的 CDF1、CDF2 在培养基 pH 值为 7 时 $OD_{600\text{ nm}}$ 值最大; CFR1 在培养基 pH 值为 6.5 时 $OD_{600\text{ nm}}$ 值稍高于 pH 6; CRF2 在培养基 pH 值为 6 时 $OD_{600\text{ nm}}$ 值为最大生长量; 说明培养基在 pH 6.5±0.5 是臭味食品中分离益生菌最佳培养条件, 见图 4。在 pH 2.0 培养基中, 各菌株基本不生长; 各菌株在 pH 4.0 培养基中 $OD_{600\text{ nm}}$ 与初始值相比, 相对 $OD_{600\text{ nm}}$ 值分别为 CDF1 35.19%、CDF2 22.91%、CRF1 51.13%和 CRF2 18.90%; 说明臭豆腐中提取的 CRF1 嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)具有较强的耐酸能力。

表 2 生化特征结果
Table 2 Biochemical characteristic results

生化反应	过氧化氢酶	葡萄糖产酸	七叶苷水解酶	精氨酸水解酶	石蕊牛奶鉴定
CDF1	—	+	+	+	+
CDF2	—	+	+	+	+
CFR1	—	+	+	+	+
CFR2	—	+	+	+	+

注: “+”为阳性反应, “—”为阴性反应。



注: 1~6: CDF1、CDF2、CFR1、CFR2、阳性对照、阴性对照; M: DL2000Marker(由下至上依次为 100、250、500、750、1000、2000 bp)。

图 3 分离株 16S rDNA 基因 PCR 扩增产物电泳结果

Fig.3 Electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA gene fragments from two isolates

3.4 耐胆盐实验结果

耐胆盐能力是益生菌的重要特征之一, 益生菌要到达并定殖于肠道, 必须对胆盐有一定的耐受性。由图 5 可知, 随着胆盐质量浓度的升高, 各菌株的生长受到不同程度的抑制。将菌株在 0.3 g/L 的胆盐质量浓度下培养 16 h 后, 相对 $OD_{600\text{ nm}}$ 值分别为 CDF1 83.21%、CDF2 98.88%、CRF1 73.76%、CRF2 67.79%; 将菌株在 0.6 g/L 的胆盐质量浓度下培养 16 h 后, 相对 $OD_{600\text{ nm}}$ 值分别为 CDF1 25.77%、CDF2 66.22%、CRF1 21.33%、CRF2 48.09%; 在 0.3 g/L 和 0.6 g/L 的胆盐质量浓度下, 臭豆腐中提取的 CDF2 *Lactobacillus plantarum* 相对 $OD_{600\text{ nm}}$ 值最高, 表现出较强的耐胆盐能力。

表 3 16S rDNA 序列的 BLAST 分析结果
Table 3 16S rDNA sequence analysis results of BLAST

菌株	参考序列	同源性	BLAST 结果
CDF1	MH3478190.1	99%	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (鼠李糖乳杆菌)
CDF2	MF405262.1	99%	<i>Lactobacillus plantarum</i> (植物乳杆菌)
CFR1	MK123485.1	99%	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (嗜酸乳杆菌)
CFR2	MH473327.1	99%	<i>Enterococcus faecium</i> (粪肠球菌)

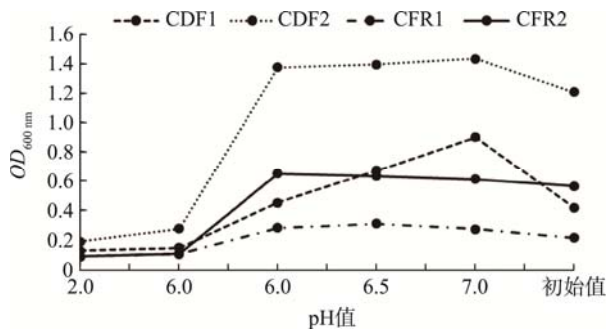


图 4 在不同 pH 值培养基中培养 16 h 后的 $OD_{600 \text{ nm}}$ 值

Fig.4 $OD_{600 \text{ nm}}$ values of lactic acid bacteria cultivated in media at different pH for 16 h

3.5 药敏实验结果

本研究利用 5 大类 9 种抗生素对臭味食品中分离出的 4 种益生菌进行药敏实验。利用金黄色葡萄球菌作为质控菌株,结果符合《抗菌药物药敏纸片判断标准》^[25],药敏纸片能满足于本次实验所需。实验结果显示 4 株菌都存在耐药性,并且不只对一种抗生素具有耐性,而是具有多重耐药性,对四环素和氯霉素均敏感,而对其他的 7 种抗生

素表现出不同的耐药性;CRF2 的肠球菌对 4 种抗生素具有耐药性,高于其他 3 种乳杆菌。CDF1、CDF2、CFR1 分离的乳杆菌对头孢丙丁均耐药;除了头孢噻唑 CDF1 的为中度敏感,CRF1 为敏感,CDF1 和 CFR1 对其他 8 种抗生素的耐药性保持高度的一致;而 CDF2 在庆大霉素、阿莫西林、头孢他啶、多粘菌素、环丙沙星耐药性结果与另外 2 个乳杆菌是完全相反的结果,说明同属不同种类的乳杆菌耐药性差距较大。

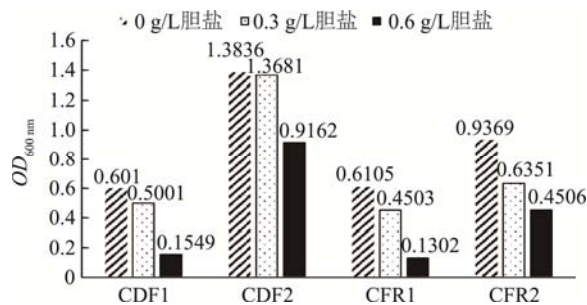


图 5 在不同胆盐含量培养基中培养 16 h 后的 $OD_{600 \text{ nm}}$ 值($n=3$)

Fig.5 $OD_{600 \text{ nm}}$ values of lactic acid bacteria cultivated in media with different bile salt concentrations for 16 h ($n=3$)

表 3 对 14 种抗菌药物的药敏实验结果

Table 3 Drug sensitivity test results of lactic acid bacteria to 14 kinds of antimicrobial agents

抗生素种类	含量	CDF1		CDF2		CFR1		CFR2					
		抑菌圈/mm	结论	抑菌圈/mm	结论	抑菌圈/mm	结论	抑菌圈/mm	结论				
氨基糖苷类	庆大霉素 10 μg/片	1.688	1.626	S	1.144	1.156	R	1.688	1.69	S	0	0	R
	阿莫西林 20 μg/片	1.26	1.236	R	2.446	2.532	S	1.3656	1.266	R	1.406	1.254	R
	头孢他啶 30 μg/片	1.398	1.487	R	2.446	2.532	S	1.656	1.266	R	1.406	1.254	R
头孢类	头孢噻唑 30 μg/片	1.852	1.812	I	3.782	3.258	S	3.478	3.302	S	1.502	1.578	I
	头孢丙丁 30 μg/片	0	0	R	0	0	R	1.304	1.342	R	2.216	2.148	S
多肽类	多粘菌素 300 μg/片	1.198	1.156	S	0	0	R	2.392	2.492	S	0	0	R
四环类	四环素 10 μg/片	2.578	2.706	S	1.706	1.875	S	2.536	2.487	S	2.522	2.587	S
其他	环丙沙星 5 μg/片	2.01	2.154	S	0	0	R	2.182	2.198	S	1.858	1.992	S
	氯霉素 30 μg/片	2.502	2.548	S	2.372	2.247	S	3.454	3.547	S	2.502	2.518	S

注: R 表示耐药, I 表示中介, S 表示敏感; 测量受试菌与标准对照菌的抑菌圈宽度, 参照 WHO 提供的 NCCLS 最新版本。

4 结论与讨论

天然臭味食品中蕴含着丰富的益生菌资源, 如具有独特风味的北京豆汁, 可以从不同批次不同季节中分离出 68 株菌株^[26]; 对自然发酵的臭冬瓜分离出植物性益生菌在肠道中的存活率比动物性益生菌高, 并且都具有优良的特性^[27]。本研究从臭豆腐和臭腐乳中分离到 4 株细菌, 进行革兰氏染色、生化鉴定及 16S rDNA 鉴定为鼠李糖乳杆菌 *Lactobacillus rhamnosus*(CDF1)、植物乳杆菌

Lactobacillus plantarum(CDF2)、嗜酸乳杆菌 *Lactobacillus acidophilus*(CFR1)、粪肠球菌 *Enterococcus faecium*(CFR2)。

本研究分离出的菌株具有各自益生功能。鼠李糖乳杆菌可以发酵产生 L-乳酸, 代谢产物丰富, 可预防和治疗各种腹泻、轮状病毒感染和过敏性疫病^[28]。植物乳杆菌广泛分布在发酵食品中, 有着很长时间的食用历史, 具有较安全的食用性和在人体肠道内的益生特性^[29]; 嗜酸乳杆菌具有众多的生理作用, 如能够促进乳糖的消化吸收, 缓解乳糖不耐症等^[30]。粪肠球菌是一类应用较广的益生菌, 已有

许多研究表明,它具有改善动物生产性能、提高动物对疾病的免疫能力等方面的作用。

能否在人体内发挥益生作用,关键在于其能否在胃液的酸性环境和肠道的胆盐环境中存活下来。实验结果表明,在 pH(6.5±0.5)时,4株菌株生长旺盛;在 pH2.0 时,基本不生长;在 pH4.0 时,各菌株均表现出不同程度的耐酸性;其中 CRF1 相对 $OD_{600\text{ nm}}$ 值高于其他菌株,分离的 *Lactobacillus acidophilus* 表现出一定的耐酸能力,在肠道中能保持良好的益生功效。这种耐酸特性是多种机制共同作用的结果,包括双组分信号转导系统、维持胞内外 pH 值平衡,细胞膜组成变化,蛋白质、DNA 损伤修复等^[31]。

人体小肠中胆盐质量浓度在 0.3~3 g/L 之间波动,能够在正常生理胆盐质量浓度中生长和代谢的菌株才可能在肠道消化过程中存活^[32]。臭味食品中分离出的 4 株菌株在 0.6 g/L 的胆盐质量浓度下,相对 $OD_{600\text{ nm}}$ 值下降迅速;而在在 0.3 g/L 的胆盐质量浓度下,4 株菌相对 $OD_{600\text{ nm}}$ 值都超过 60%;其中 CDF2 *Lactobacillus plantarum* 相对于其他菌表现出较强的耐胆盐能力;对于益生菌耐胆盐机制的研究已有诸多报道,但尚不完全清楚,可能与自身的胆盐水解酶、表层蛋白有关^[31]。

臭味天然发酵食品中分离出的益生菌只对四环素和氯霉素敏感,可能是由于菌株来源的样品较少接触这 2 种抗生素的缘故;而阿莫西林、头孢他啶、头孢丙丁可能较为频繁的用于生产生活中,使得分离菌株对其具有一定的耐药性。宋晓敏等^[33]在对发酵食品中益生菌耐药性的现状分析中发现粪肠球菌属对万古霉素、红霉素具有耐药性;Pan 等^[34]对 11 种中国发酵食品中分离的 17 株益生菌进行对 7 种抗生素的抗性测定。结合本研究发现耐药益生菌普遍存在于中国传统发酵食品中,其耐药性发生率与原材料、生产区域密切相关,使得分离菌株耐药性表现与其携带耐药基因具有一定的相关性,这一现象本身会给益生菌的安全应用带来风险。

益生菌对人体具有重要的生理功能,它对胃肠道的耐受性是其发挥生理功能的基本前提。本研究所鉴定的 4 种菌株中,其中嗜酸乳杆菌 *Lactobacillus acidophilus* 和植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* 分别表现出较强的耐酸和耐胆盐能力,具有在人体内定殖的潜力;3 株乳杆菌抗生素的耐药性低于粪肠球菌 *Enterococcus faecium*。综上所述,本研究的臭味天然发酵食品中分离的嗜酸乳杆菌 *Lactobacillus acidophilus* 和植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* 可以广泛应用在其他发酵制品中,可以作为益生菌的候选菌株作进一步的研究。

参考文献

[1] Marco ML, Heeney D, Binda S, et al. Health benefits of fermented foods: Microbiota and beyond [J]. *Curr Opin Biotech*, 2017, 44: 94–102.

- [2] MCGovern PE, Zhang J, Tang J, et al. Fermented beverages of pre- and proto-historic China [J]. *P Nat A Sci U.S.A.*, 2004, 101(51): 17593–17598.
- [3] Wolfe BE, Dutton RJ. Fermented foods as experimentally tractable microbial ecosystems [J]. *Cell*, 2015, 161(1): 49–55.
- [4] 胡一旻. 宁波饮食文化研究[D]. 宁波: 宁波大学, 2011.
- Hu YM. A study on the food culture of Ningbo [D]. Ningbo: Ningbo University, 2011.
- [5] 尹召军. 临沂臭豆豉中主要功能菌的生物活性特征及其纯种发酵条件优化[D]. 南昌: 江西农业大学, 2011.
- Yin ZJ. Biological activity characteristics of main functional bacteria in stinking Douchi of Linyi and optimization of pure fermentation conditions [D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2011.
- [6] 倪田. 臭蛋加工方法[J]. *农村新技术*, 2001, (8): 35.
- Ni T. Processing method of rotten egg [J]. *New Rural Technol*, 2001, (8): 35.
- [7] 吴静男. 臭鳊鱼[N]. *大江周刊(城市生活)*, 2008-11-02(8).
- Wu JN. Mandarin fish [N]. *Dajiang Weekly (City Life)*, 2008-11-02(8).
- [8] 杜鹏, 霍贵成. 传统发酵食品及其营养保健功能[J]. *中国酿造*, 2004, 23(3): 6–8.
- Du P, Huo GC. Traditional fermented food and its nutritional and health care function [J]. *China Brew*, 2004, 23(3): 6–8.
- [9] 李青青, 陈启和, 何国庆, 等. 我国传统食品中乳酸菌资源的开发[J]. *食品科学*, 2009, 30(23): 516–520.
- Li QQ, Chen QH, He GQ, et al. Diversity and identification of *Lactic acid bacteria* in Chinese traditional foods [J]. *Food Sci*, 2009, 30(23): 516–520.
- [10] Huang Y, Wu F, Wang XJ, et al. Characterization of *Lactobacillus plantarum* lp27 isolated from Tibetan kefir grains: A potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects [J]. *J Dairy Sci*, 2013, 96(5): 2816–2825.
- [11] 丁苗, 刘洋, 葛平珍, 等. 发酵酸肉中降胆固醇乳酸菌的筛选、鉴定及降胆固醇作用的初步研究[J]. *食品科学*, 2014, 35(19): 203–207.
- Ding M, Liu Y, Ge PZ, et al. Screening and Identification of cholesterol-lowering *Lactic acid bacteria* from fermented sour meat [J]. *Food Sci*, 2014, 35(19): 203–207.
- [12] 王辑, 顾芸佳, 马文慧, 等. 内蒙古奶豆腐中潜在益生性乳酸菌的筛选[J]. *食品科学*, 2014, 35(13): 171–177.
- Wang J, Gu YJ, Ma WH, et al. Screening of potential probiotic *Lactic acid bacteria* from Inner Mongolian dairy tofu [J]. *Food Sci*, 2014, 35(13): 171–177.
- [13] 陈大卫, 郭飞翔, 顾瑞霞, 等. 具有降胆固醇能力的人源乳酸菌筛选[J]. *现代食品科技*, 2014, 30(3): 114–120.
- Chen DW, Guo FX, Gu RX, et al. Screening of cholesterol-reducing *Lactic acid bacteria* from human origin [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2014, 30(3): 114–120.
- [14] 刘长建, 刘秋, 孙军德, 等. 风干香肠中乳酸菌的分离鉴定及益生特性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2014, 40(6): 55–59.
- Liu CJ, Liu Q, Sun JD, et al. Probiotic characteristics of *Lactic acid bacteria* from dry fermented sausages [J]. *Food Ferment Ind*, 2014, 40(6): 55–59.
- [15] 郝永伟, 吕蕾, 刘新利. 农户自制酸菜中益生潜力乳酸菌的分离鉴定[J]. *齐鲁工业大学学报(自然科学版)*, 2014, 28(2): 34–36.
- Hao YW, Lv L, Liu XL. Separation and identification of *Lactic acid bacteria* with probiotic potential from Chinese ssuerkraut [J]. *J Shandong Inst Light Ind (Nat Sci Ed)*, 2014, 28(2): 34–36.

- [16] 于晨龙, 张七斤, 陈光明, 等. 不同来源乳酸菌的分离与鉴定[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(2): 208–212.
Yu CL, Zhang QJ, Chen GM, *et al.* Isolation and identification of *Lactobacillus* from different origins [J]. *Chin J Anim Husband Vet Med*, 2014, 41(2): 208–212.
- [17] Zhang J, Zhang X, Zhang L, *et al.* Potential probiotic characterization of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Inner Mongolia “Hurood” cheese [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2014, 24(2): 225–235.
- [18] Shin HS, Lee JH. Viability of *bifidobacteria* in commercial dairy products during refrigerated storage [J]. *J Food Protect*, 2000, 63(3): 327–331.
- [19] 顾瑞霞, 谭东兴, 郭久和, 等. 胆汁酸盐和低 pH 值对乳酸菌活性的影响[J]. 微生物学通报, 1996, 23(3): 144–146.
Gu RX, Tan DX, Guo JH, *et al.* Effect of bile and low pH on the ability of lactic acid bacterium to survive [J]. *Microbiol*, 1996, 23(3): 144–146.
- [20] 田建军, 张开屏, 张保军, 等. 降胆固醇乳酸菌的筛选及其鉴定[J]. 中国乳业工业, 2011, 39(9): 31–34.
Tian JJ, Zhang KP, Zhang BJ, *et al.* Screening and identification of cholesterol-reducing *Lactic acid bacteria* [J]. *Dairy Ind*, 2011, 39(9): 31–34.
- [21] GB 4789.35-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验[S].
GB 4789.35-2016 National food safety standard-Food microbiological examination-*Lactic acid bacteria* [S].
- [22] 赵宏飞. 产叶酸乳酸菌的筛选及生物学特征研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2009.
Zhao HF. Screening of *Lactic acid bacteria* producing folic acid and study on its biological characteristics [D]. Baoding: Hebei Agriculture University, 2009.
- [23] Makimura K, Murayama SY, Yamaguchi H, *et al.* Detection of a wide range of medically important fungi by polymerase chain reaction [J]. *J Med Microbiol*, 1994, 40(5): 358–364.
- [24] 冯大伟, 周家春. 益生乳酸菌的纸片扩散法药敏性试验评价[J]. 微生物学通报, 2010, 37(3): 454–464.
Feng DW, Zhou JC. Evaluation of agar disc diffusion method for determining antibiotic susceptibility of *Lactic acid bacteria* strains by a selected culture medium [J]. *Microbiol*, 2010, 37(3): 454–464.
- [25] 中国药品生物制品鉴定所国家抗菌药物细菌耐药性监测中心. 抗菌药物药敏纸片判断标准[S]. 2000.
National center for antibacterial drug resistance monitoring, China national institute of pharmaceuticals and biological products. Criteria for judging antibacterial drug sensitivity paper [S]. 2000.
- [26] 陈宇翔, 陈历俊, 姜铁民. 北京豆汁优势菌群的探究及其发酵性能测试[J]. 食品科技, 2013, 38(8): 67–70.
Chen YX, Chen LJ, Jiang TM. Explore and fermentation test of fermented soya-bean milk (Beijing douzhi) advantage bacterium group [J]. *Food Sci Technol*, 2013, 38(8): 67–70.
- [27] 袁晓阳, 陆胜民, 郁志芳. 自然发酵腌制冬瓜主要发酵菌种及风味物质鉴定[J]. 中国食品学报, 2009, 9(1): 219–225.
Yuan XY, Lu SM, Yu ZF. Identification of main fermented strains and flavor substances in naturally fermented wax gourd with strong odour [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2009, 9(1): 219–225.
- [28] 马鹏飞, 陈有亮, 金鸟君. 鼠李糖乳杆菌功能特性的研究进展[J]. 科技通报, 2009, 25(2): 202–206.
Ma PF, Chen YL, Jin NJ. Research and development on the functional properties of *Lactobacillus rhamnosus* [J]. *Bull Sci Technol*, 2009, 25(2): 202–206.
- [29] 勒志强, 王延祥. 植物乳杆菌在人体肠道的益生特性[J]. 中国乳品工业, 2007, 35(9): 30–34.
Jin ZQ, Wang YX. Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* in the human intestinal tract [J]. *China Dairy Ind*, 2007, 35(9): 30–34.
- [30] Sreekumer O, Hosono A. Immediate Effect of *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal flore and fecal enzymes of rate and the *in vitro* inhibition of *escherichia coli* in coculture [J]. *J Dairy Sci*, 2000, 83(5): 931–939.
- [31] 胡爱华, 敖晓琳, 陈岑, 等. 乳酸菌耐酸耐胆盐机制的研究进展[J]. 食品工业科技, 2015, 36(8): 380–384.
Hu AH, Ao XL, Chen C, *et al.* Research progress on mechanism of lactic acid bacteria acid and bile salt resistance [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2015, 36(8): 380–384.
- [32] 杨颖, 田丰伟, 陈卫, 等. 两株乳杆菌益生特性的体外研究[J]. 中国乳品工业, 2006, 34(6): 16–19.
Yang Y, Tian FW, Chen W, *et al.* In vitro study of two *Lactobacillus* strains as potential probiotics [J]. *China Dairy Ind*, 2006, 34(6): 16–19.
- [33] 宋晓敏, 李少英, 马春艳, 等. 发酵食品中乳酸菌的耐药性现状分析[J]. 微生物学通报, 2015, 42(1): 207–213.
Song XM, Li SY, Ma CY, *et al.* Antibiotic resistance in fermented food lactic acid bacteria—a review [J]. *Microbiol*, 2015, 42(1): 207–213.
- [34] Pan L, Hu X, Wang X. Assessment of antibiotic resistance of lactic acid bacteria in Chinese fermented foods [J]. *Food Control*, 2011, 22(8): 1316–1321.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



曲勤凤, 硕士研究生, 高级工程师, 主要研究方向为食品微生物、分子生物学检测。

E-mail: quqf@sqi.org.cn



刘洋, 博士研究生, 正高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: liuyang@sqi.org.cn