

黔东南地区传统发酵白酸汤中乳酸菌的 益生特性及应用

陈中爱¹, 熊江¹, 石庆楠², 林莉³, 吕都¹, 刘永翔^{1*}

(1. 贵州省农业科学院生物技术研究所, 贵阳 550025; 2. 黔东南州食品药品检验检测中心, 凯里 556099;
3. 凯里学院, 凯里 556099)

摘要: **目的** 研究酸汤来源的乳酸菌的生物学特性及安全性。**方法** 以发酵白酸汤为实验原料, 通过耐酸耐胆盐实验、评价菌株的疏水性、自凝聚能力和药敏实验, 筛选出具有益生特性的乳酸菌, 并将其接种于白酸汤中, 测定其产酸能力及活菌数。**结果** 鉴定出4株为副干酪乳杆菌, 2株为植物乳杆菌, 其中副干酪乳杆菌1-6和植物乳杆菌ST-10对二甲苯、氯仿的疏水性均大于60%, 放置24h的自凝聚率较其他菌株都较优; 不同菌株对抗生素表现出的敏感性、耐药性不相同。副干酪乳杆菌1-6作为发酵剂添加后对白酸汤pH值、总酸度均无显著影响($P > 0.05$), 但是活菌数与传统老酸汤发酵效果接近。**结论** 副干酪乳杆菌1-6是一株性能优良的益生乳酸菌, 为后续白酸汤发酵益生菌的开发奠定了基础。

关键词: 发酵白酸汤; 筛选鉴定; 乳酸菌; 益生特性

Probiotic characteristics and application of lactic acid bacteria in traditional fermented sour soup in southeast Guizhou

CHEN Zhong-Ai¹, XIONG Jiang¹, SHI Qing-Nan², LIN Li³, LV Du¹, LIU Yong-Xiang^{1*}

(1. *Biotechnology Research Institute Academy of Agricultural Sciences of Guizhou Province, Guiyang 550025, China;*
2. *Qiandongnan Food and Drug Inspection and Testing Center, Kaili 556099, China;*
3. *Kaili University, Kaili 556099, China*)

ABSTRACT: Objective To study the biological characteristics and safety of lactic acid bacteria derived from sour soup. **Methods** Fermented sour soup was used as the experimental test material. Through the acid and bile salt resistance test, the hydrophobicity of the strain, the self-aggregation ability and the drug sensitivity test, the lactic acid bacteria with probiotic properties were screened out and inoculated in acid. In the soup, its acid-producing ability and the number of viable bacteria were determined. **Results** The results identified 4 strains of *Lactobacillus paracasei* and 2 strains of *Lactobacillus plantarum*. Among them, *Lactobacillus paracasei* 1-6 and *Lactobacillus plantarum* ST-10 had both para-xylene and chloroform hydrophobicities greater than 60%. The 24 h self-aggregation rate was better than other strains. Different strains showed different sensitivity and resistance to antibiotics. The addition of *Lactobacillus paracasei* 1-6 as a starter had no significant effect on the pH value and total acidity of sour soup ($P > 0.05$), but the number of viable bacteria was close to the fermentation effect of the traditional old sour soup.

基金项目: 黔农科院青年基金项目([2017]25号)

Fund: Supported by the Academy of Agricultural Sciences of Guizhou Province ([2017]25)

*通信作者: 刘永翔, 研究员, 主要研究方向为食品微生物。E-mail: 352123862@qq.com

*Corresponding author: LIU Yong-Xiang, Professor, Biotechnology Research Institute Academy of Agricultural Sciences of Guizhou Province, No.472, Xinzhong Road, Huaxi District, Guiyang 550025, China. E-mail: 352123862@qq.com

Conclusion *Lactobacillus paracasei* 1-6 is a probiotic lactic acid bacteria with excellent performance, which lays the foundation for the subsequent development of probiotics from the fermentation sour soup.

KEY WORDS: fermented sour soup; screening and identification; lactic acid bacteria; live features

0 引言

益生菌是可以在宿主中存活, 并当摄入足够数量时对宿主产生有益作用的微生物。有研究发现, 益生菌对多种疾病如急性腹泻、高血压、糖尿病和便秘等都具有良好的预防或缓解作用^[1-2], 其良好的功能特性和健康促进作用已被广泛接受和认可。目前研究最多的益生菌是乳酸菌, 乳酸菌在食品中的应用有着悠久的历史, 它通过发酵酸化和酶学过程保障了发酵制品的关键味道和品质, 是公认的安全的食品级微生物^[3-4]。而对益生菌菌株的应用, 必须经过严格的筛选及评估其所具有的益生特性后才能应用。益生菌筛选的一个重要条件是菌株能产生一些抗菌物质抑制致病菌的生长, 另外还需要考虑菌株的一些其他特性^[5], 如菌株对胃肠道低酸和胆盐等不良环境的耐受性能力、在肠道内定殖能力、降低胆固醇能力、对宿主的安全性等^[6], 这些特性是其益生特性具有应用价值的前提条件。

白酸汤是贵州黔东南地区的一种发酵调味品, 它以大米制作过程中滤出的米汤为原料, 加入之前已经发酵成熟的白酸汤, 置于室温自然发酵 7~8 d 制作而成, 常作为火锅底料或作为汤饮用, 其味酸而不烈、鲜美醇香, 广受人们欢迎。目前, 对苗族地区自然发酵白酸汤中的研究较少, 只有田永峰等^[7-8]少量相关报道, 研究主要集中在对其制作工艺、微生物区系、营养成分、发酵过程中有机酸变化等方面, 而分离出的乳杆菌的生物学特性及安全性等并未得到有效的评价。为充分了解白酸汤中乳酸菌的上述特性, 本研究以苗族农家自酿白酸汤为材料, 采取模拟体内实验(疏水性实验和自凝聚性实验)及体外实验, 通过对菌株的体外耐酸耐胆盐能力分析, 分离鉴定出优良的发酵菌株, 评价疏水性、自凝聚性、药敏实验, 初步研究乳酸菌的安全性, 并将其应用于白酸汤的发酵中, 旨在从中获得到具有潜在益生特性的菌株, 为其应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

MRS 肉汤培养基(批号: BS1137, 杭州百思生物技术有限公司); 牛胆盐(批号: BS1027, 国药集团化学试剂有限公司); 二甲苯(批号: Cas1330207, 天津大茂化学试剂厂); 药敏纸片(杭州天和微生物试剂有限公司); 氯仿、乙酸乙酯等化学试剂(分析纯, 济南义盛商贸有限责任公司)。

1.2 仪器与设备

STARTER 3100 pH 计[美国奥豪斯仪器(上海)有限公

司]; SW-CJ-ID 超净工作台(上海苏净实业有限公司); UV1800 分光光度计(日本岛津公司); 5424R 高速台式冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); DYY-6C 电泳仪(北京市六一仪器厂); QL-901 旋涡混合器(中国海门其林贝尔仪器制造有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 白酸汤的制备

采用米饭制作过程中滤出的米汤为原料, 加入一定比例冷却的沸水和发酵成熟的白酸汤, 体积比约 15%, 置于室温自然发酵 4~5 d 制作而成, 发酵的酸汤为乳白色, 具有苗族酸汤特有的香气, 香味浓郁, 酸爽适口。收集贵州省黔东南州白酸汤样品 6 种, 将白酸汤样品在其发酵容器中充分搅拌均匀后, 用灭菌移液器吸取白酸汤样品于灭菌采样瓶中, 放入有冰袋的保鲜盒里, 在较低温度下带回实验室。

1.3.2 菌株耐酸和耐胆盐测定

取各白酸汤样品 1 mL 分别于生理盐水中振荡, 梯度稀释, 涂布, 划线培养, 直到纯化为单一菌落。以前期获得的 12 株菌进行耐酸性实验。参考 LIONG 等^[9]的方法, 将菌液调节至所需 pH, 培养 3 h 后吸取 1 mL 的菌悬液进行梯度稀释后平板涂布, 进行菌落计数。将乳酸菌菌悬液分别置于含 0.3% 和 1% 牛胆盐的液体 MRS 培养基中, 分别培养 3 h 后, 吸取 1 mL 的菌悬液进行梯度稀释, 平板涂布后进行菌落计数。每个稀释度做 3 个平行。

1.3.3 菌株的分子生物学鉴定

将纯化的菌株以 1% 的接种量接种于 MRS 培养基中, 经 37 °C 过夜培养 12 h 后, 取 5 mL 菌液经 10000 g 离心 3 min 后弃上清液得菌体, 采用缓冲液离心洗涤 3 次, 按照 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒说明书进行。利用细菌通用引物, PCR 扩增其 16S rRNA 基因片段, 然后测定所得产物序列。登录 NCBI 网站, 进行同源性分析, 将测序序列在 Gene Bank 数据库中进行 BLAST 比对。PCR 扩增引物分别为: 正向引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCC TGGCTCAG-3'; 反向引物 1541R: 5'-AAGGAGGTGA TCCAGCC-3'。引物的合成和 PCR 产物的测序由上海生工生物完成。

1.3.4 疏水性测定

根据 MANCINI 等^[10]的方法, 略作改动后, 采用细菌黏着物质法测定菌株的疏水性。将 1 mL 二甲苯、氯仿、乙酸乙酯分别与 3 mL 菌悬液混合, 旋涡振荡 3 min 后静置 25 min, 测定吸光度 A_1 , 计算菌株的疏水性, 见式(1):

$$\text{疏水性}/\%=(1-A_1/A_0)\times 100\% \quad (1)$$

式中, A_0 为在 600 nm 波长下测得菌悬液的吸光度; A_1 为放置 25 min 后于 600 nm 波长处测得吸光度。

1.3.5 菌株自凝聚性测定

参考 RIAZ 等^[11]和 LAZADO 等^[12]的方法, 将受试菌株培养后, 离心, 收集菌体, 用磷酸盐缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤 2 次, 以生理盐水为空白对照。细菌自凝聚率按式(2)计算:

$$\text{自凝聚率}/\%=(1-A_1/A_0)\times 100\% \quad (2)$$

式中: A_0 为 600 nm 波长处测得吸光度; A_1 为不同时间点测得吸光度。

1.3.6 药敏性

采用抗生素对所选菌株进行药敏实验^[13], 判定参照临床实验室标准化委员会(Committee for Standardization of Clinical Laboratories, CLSI)最新版的标准(见表 1)进行。取 100 μL 供试菌液涂布于 MRS 固体培养基上, 贴放药敏纸片, 培养约 20 h 后, 测定抑菌圈的直径, 单位以 mm 记。

表 1 药敏性判断标准
Table 1 Judgement criteria of drug susceptibility

抗生素名称	药物含量 ($\mu\text{g}/\text{片}$)	抑菌圈直径判断标准/mm		
		耐药 R	中度敏感 MS	敏感 S
青霉素	10	≤ 28	—	≥ 29
氨苄西林	10	≤ 28	—	≥ 29
环丙沙星	5	≤ 15	16~20	≥ 21
头孢唑啉	30	≤ 14	15~17	≥ 18
丁胺卡那	30	≤ 13	14~17	≥ 18
复方新诺明	25	≤ 10	11~15	≥ 16
诺氟沙星	10	≤ 12	13~16	≥ 17
红霉素	15	≤ 13	15~17	≥ 18

注: “—”表示不存在敏感性。

1.3.7 菌株发酵产酸能力测定

将待测菌株接种于 MRS 液体培养基中培养 48 h 后, 待测菌株以 3% 的接种量接入 200 mL MRS 液体培养基中。通过酸碱滴定法测定菌株的产酸量, 分析结果以乳酸计(见式 3), 将发酵液滴定至微红色^[14]。pH 值采用 pH 计测定。

$$\text{乳酸}/\%=(N_{\text{NaOH}}\times V_{\text{NaOH}}\times 0.09/V_{\text{样品}})\times 100\% \quad (3)$$

式中, N_{NaOH} 为 NaOH 的浓度, mol/L; V_{NaOH} 为所用 NaOH 溶液的体积, mL; $V_{\text{样品}}$ 为发酵液的体积, mL。

1.3.8 发酵白酸汤中乳酸菌活菌数的测定

按 0.1% (商业发酵剂)和 5% (待测菌株)的添加量对灭菌的米汤进行发酵, 当发酵的 pH 值降低到 4.5 时, 将其放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中, 停止发酵。在发酵后的第 0、1、3、5、7 d

取样, 采用平板计数法检测白酸汤中乳酸菌的活菌数。

1.4 数据处理

实验数据处理采用 SPSS 19 软件进行分析, 实验结果以平均值 \pm 标准偏差表示, 显著性分析采用 Duncan 检验。

2 结果与分析

2.1 菌株的耐酸和耐胆盐性能测定

益生乳酸菌顺利通过胃酸的消化作用进入肠道是益生菌的一个重要特点^[15]。菌株能否在 pH=2.0~3.0 环境中存活 1.5~3 h 是衡量菌株耐酸性的标准之一^[16]。由表 2 可知, 测试的 12 株乳酸菌均可以在 pH=3 及 pH=2 的条件下存活, 活菌数均大于 5 lg(CFU/mL)。在 pH=3 的条件下处理 3 h, 活菌数较高的是菌株 1-6、ST-2、ST-10、ST-12, 约维持在 7~8 lg(CFU/mL), 其次是菌株 1-3、ST-7、ST-9、ST-11、ST-14, 活菌数约维持在 6~7 lg(CFU/mL)。在 pH=2 的条件下处理 3 h, 只有菌株 ST-2、ST-10 活菌数约维持在 7~8 lg(CFU/mL), 其余菌株 1-3、1-6、ST-11、ST-12 的活菌数为 6~7 lg(CFU/mL), 这些菌株的活菌数相对于在 pH=3 的条件下处理 3 h 有所下降, 但仍然表现出较高的酸耐受性。KANG 等^[17]将从韩国泡菜中分离的植物乳杆菌 C182 置于 pH=3 的低酸环境中处理 3 h, 生存率达到 52.5%, 置于 pH=2 的低酸环境中处理 3 h, 生存率降为 5.62%。研究表明, 乳酸菌在代谢过程中会产生细菌素, 这可能会增加菌株对酸的耐受性。因为乳酸菌的细菌素在肠道内帮助菌株定殖较其他菌株有竞争优势^[18-19]。有研究发现菌株之间耐酸性的差异可能与他们本身的 H^+ -ATP 酶活性有关^[20]。

0.3%胆盐浓度被认为是筛选耐胆盐菌株的临界浓度^[21]。12 株乳酸菌菌株在 0.3%胆盐浓度下处理 3 h 均表现出了较好的耐受性, 菌株 1-6、ST-10、ST-12 的活菌数约维持在 7~8 lg(CFU/mL), 菌株 1-3、2-1、ST-2、ST-9、ST-11 的活菌数约维持在 6~7 lg(CFU/mL), 均表现出较高的耐受性; 当菌株在 1%胆盐浓度下处理 3 h 时, 活菌数急剧降低, 7 株菌的活菌数降低到 6 lg(CFU/mL)以下, 5 株菌不能存活。研究表明, 菌株对胆盐的耐受性可能与菌体的胆盐水解酶有关, 这可以帮助结合的胆盐水解, 从而降低其毒性^[22]。LEITE 等^[23]研究了 34 株分离于巴西酸奶中的乳杆菌对 0.3%的胆盐均具有较好的耐受能力, 存活时间 0.5~4 h。

根据对乳酸菌菌株的低酸和胆盐耐受性筛选, 本研究最终筛选出 6 株(1-3、1-6、ST-2、ST-10、ST-11、ST-12)进一步进行分子生物学鉴定其益生特性分析。

2.2 分子生物学鉴定结果

如图 1 所示, 经 16S rRNA 测序的方法获得 6 株乳酸菌的 16S rRNA 基因, 分别为 1-3 (1508 bp)、1-6 (1511 bp)、ST-2

(1508 bp)、ST-10 (1514 bp)、ST-11 (1508 bp)、ST-12 (1513 bp)。选取 Gen Bank 中相似性较高菌株的 16S rDNA 基因序列进行系统发育树分析。最终确定菌株 1-3、1-6、ST-2 和 ST-11 为副干酪乳杆菌, 菌株 ST-10 和 ST-12 为植物乳杆菌。

表 2 乳酸菌菌株对低酸和胆盐的耐受性

Table 2 Tolerance to low acid and bile salt of different strains of lactic acid bacteria

菌株	活菌数			
	pH=3	pH=2	0.30%胆盐	1.00%胆盐
1-2	+	+	*	-
1-3	++	++	**	*
1-6	+++	++	***	*
2-1	+	+	**	-
3-1	+	+	*	-
ST-2	+++	+++	**	*
ST-7	++	+	*	*
ST-9	++	+	**	-
ST-10	+++	+++	***	*
ST-11	++	++	**	*
ST-12	+++	++	***	*
ST-14	++	+	*	-

注: +++: 活菌数范围在 7~8 lg(CFU/mL); ++: 活菌数范围在 6~7 lg(CFU/mL); +: 活菌数范围在 5~6 lg(CFU/mL); -: 活菌数范围在 5 lg(CFU/mL) 以下。***: 活菌数范围在 7~8 lg(CFU/mL); **: 活菌数范围在 6~7 lg(CFU/mL); *: 活菌数范围 6 lg(CFU/mL) 以下。

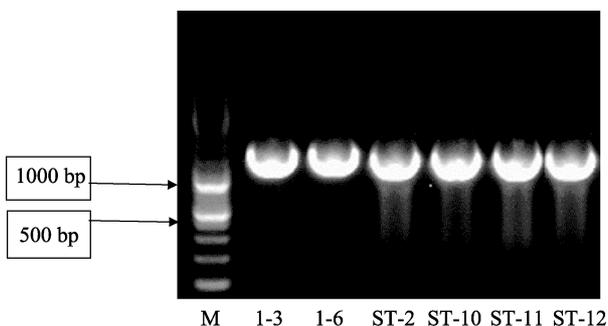


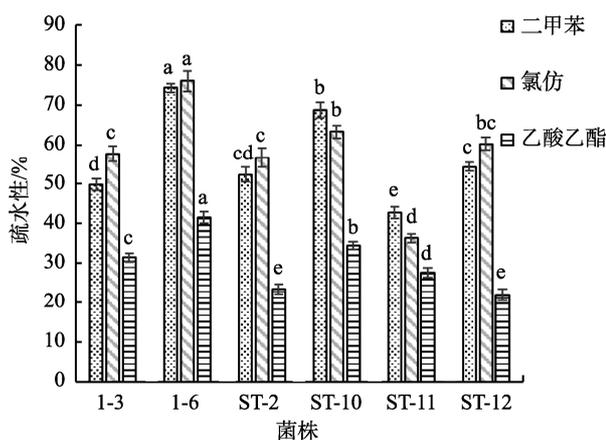
图 1 6 株乳酸菌的 16S rRNA 基因的 PCR 电泳图

Fig.1 PCR electrophoretogram of 16S rRNA gene of 6 strains of lactic acid bacteria

2.3 菌株疏水性

疏水率的评价标准如下: 疏水率小于 20% 为非疏水, 疏水率介于 20% 和 50% 为中度疏水, 疏水率大于 50% 为高疏水性^[24]。由图 2 可知, 所有菌株均对二甲苯、氯仿和

乙酸乙酯表现出一定的疏水性, 不同菌株的疏水性差异较大。二甲苯是一种非极性溶剂, 除了菌株 1-3、ST-11 (< 50%), 其余 4 株菌 1-6、ST-2、1ST-10、ST-12 均表现出对二甲苯较高的疏水性(> 50%), 其中疏水性最强的是菌株 1-6, 达到 74.31%, 其次则是 ST-10 和 ST-12, 其疏水率分别达 68.84%、54.40%, 说明这些菌株都具有疏水的细胞表面。氯仿是酸性溶剂, 菌株 1-3、1-6、ST-2、ST-10 和 ST-12 对氯仿的疏水性均大于 50%, 可被认为是高度疏水性菌株。乙酸乙酯是单碱性溶剂, 该菌株对乙酸乙酯的疏水性低于二甲苯和氯仿的疏水性, 菌株 1-6 对乙酸乙酯的疏水性最强, 疏水性为 41.59%, 其余的菌株疏水性在 34.41%~21.93%, 均属于中度疏水。二甲苯、氯仿和乙酸乙酯这 3 种有机溶剂的疏水性结果表明, 菌株 1-6 和 ST-10 具有良好的疏水性。分析不同菌株的疏水性大小存在显著性差异, 可能与菌种的特异性有关, 这与韦明明^[25]的研究结果具有一致性。



注: 不同字母表示不同菌株之间测定指标存在显著性差异 ($P < 0.05$), 下同。

图 2 乳酸菌菌株的疏水性($n=3$)

Fig.2 Hydrophobicity of lactic acid bacteriae ($n=3$)

2.4 菌株自凝聚性测定

根据 MONTORO 等^[26]的报道, 细菌的自凝聚能力可分为: 低(16%~35%)、中等(35%~50%)和高(50%以上)自凝聚能力。如图 3 所示, 菌株 1-6 和 ST-10 在前 3 h 内快速凝聚, 凝聚率均大于 35%, 属于中等凝聚能力, 其余菌株凝聚率均小于 35%, 属于低等凝聚能力。在 24 h 时, 菌株 1-6 表现出最高的自凝聚能力, 为 73.66%, 其次是菌株 ST-10, 自凝聚率达 70.31%, 其余菌株自凝聚率均在 50% 左右, 且菌株 1-6、ST-10 与其他菌株之间存在显著性差异($P < 0.05$)。因此, 无论是在 3 h 时还是在 24 h 时, 菌株 1-6、ST-10 较其他菌株表现出更好的自凝聚能力。

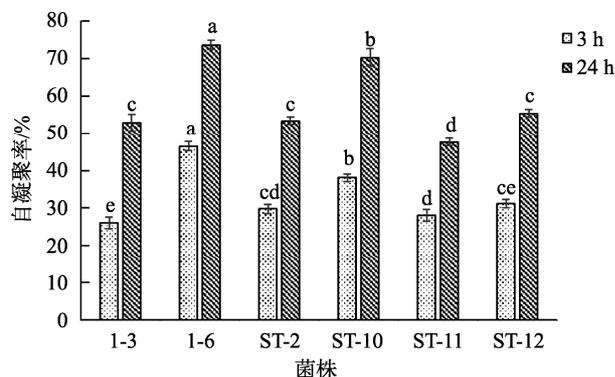


图 3 乳酸菌菌株的自凝聚率(n=3)
Fig.3 Autoagglutination rate of lactic acid bacteria (n=3)

2.5 药敏性

随着抗生素在临床治疗的广泛应用, 乳酸菌的耐药性也越来越严重, 所以对益生菌菌株进行安全性评价非常有必要。各菌株对抗生素的敏感性见表 3。菌株 1-3、ST-2、ST-10、ST-12 对青霉素和头孢唑啉均敏感。在抗生素分类中, 青霉素类和头孢类是临床使用最早和较广泛的抗生素, 并且细菌对他们具有广谱抗菌特性。ST-2、ST-11 对氨苄西林表现为中度敏感, 其他均为敏感。所有菌株均对环丙沙星表现出耐药性, 有研究显示, 多数乳酸菌对糖肽类抗生素环丙沙星会产生耐药性, 这与本研究结果相一致。菌株 ST-2 对丁胺卡那中度敏感, 其余均表现为抗性。菌株 1-3、ST-2、ST-11 对复方新诺明表现为抗性, 1-6、ST-10、ST-12 表现为敏感。所有菌株对诺氟沙星均表现为耐药性。综上所述, 不同菌株对抗生素表现出的敏感性、耐药性不尽相同, 可能是由于菌株耐药机制、抗生素的使用频率以及广泛程度不同所致。

表 3 乳酸菌的抗生素敏感性
Table 3 Antibiotic sensitivity of lactic acid bacteria

抗生素	菌株					
	1-3	1-6	ST-2	ST-10	ST-11	ST-12
青霉素	S	MS	S	S	MS	S
氨苄西林	R	R	MS	R	MS	R
环丙沙星	R	R	R	R	R	R
头孢唑啉	S	MS	S	S	MS	S
丁胺卡那	R	R	MS	R	R	R
复方新诺明	R	S	R	S	R	S
诺氟沙星	R	R	R	R	R	R
红霉素	S	R	S	R	R	S

注: R 表示耐药, MS 表示中度敏感, S 表示敏感。

2.6 发酵过程中 pH 和总酸含量的变化

上述益生菌特性研究结果表明, 副干酪乳杆菌 1-6 具有最佳的功能活性。因此, 本研究选择副干酪乳杆菌 1-6 用于下一步发酵白酸汤的研究。由图 4 可知, 对照组和实验组的总酸含量和 pH 变化趋势相似。白酸汤中总酸含量在发酵过程中由低到高再到低的现象是由于发酵开始时微生物大量繁殖, 使得总酸含量增加, 随后由于白酸汤中微生物发酵所需的营养物质被过量消耗, 导致微生物生长受到抑制, 出现总酸含量下降趋势。接种副干酪乳杆菌与传统老酸汤发酵组(对照组)相比, 两组的 pH 值和总酸度无显著差异($P > 0.05$), 这可能是因为白酸汤中副干酪乳杆菌的产酸能力较好, 表明将副干酪乳杆菌是一株具有潜在应用价值的乳酸菌。

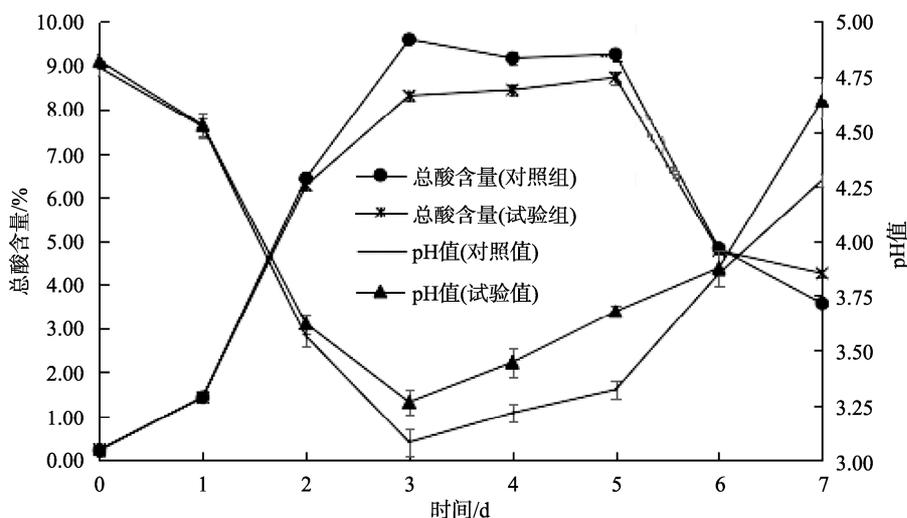


图 4 白酸汤发酵过程中 pH 和总酸含量的变化(n=3)
Fig.4 Change in pH and the content of total acid during storage (n=3)

2.7 发酵白酸汤中乳酸菌活菌数的测定

如表4所示,将清水米汤灭菌后,接种副干酪乳杆菌1-6发酵的白酸汤活菌数与对照组没有显著性差异($P > 0.05$),表明副干酪乳杆菌1-6对菌株生长无不良影响,发酵活力与传统老酸汤发酵效果接近。说明副干酪乳杆菌1-6在冷藏过程中可以保持较好的存活能力,因此有潜力用作生产益生白酸汤的辅助发酵剂。

3 结论与讨论

本研究从贵州黔东南发酵白酸汤中分离出12株乳

酸菌,并筛选出6株耐低酸和高胆盐的菌株,通过16S rRNA分子生物学鉴定6株乳酸菌,菌株1-3、1-6、ST-2、ST-11为副干酪乳杆菌,ST-10和ST-12为植物乳杆菌,副干酪乳杆菌为白酸汤的优势菌群。副干酪乳杆菌1-6具有较好的疏水性、自凝聚率、抗生素敏感性。接种副干酪乳杆菌1-6发酵白酸汤,白酸汤中的总酸含量先升高后降低,与传统老酸汤发酵相比,发酵期间活菌数没有显著性差异($P > 0.05$)。本研究结果为副干酪乳杆菌1-6作为益生性发酵菌株的开发和应用提供了理论参考。

表4 冷藏期间活菌数变化
Table 4 Change in viable count during storage

组别	活菌数/[lg(CFU/mL)]				
	0 d	1 d	3 d	5 d	7 d
对照组	6.43±0.21 ^b	6.69±0.20 ^b	7.39±0.19 ^a	7.67±0.13 ^a	7.70±0.26 ^a
试验组	7.28±0.19 ^b	7.35±0.21 ^{ab}	7.64±0.23 ^a	7.52±0.11 ^{ab}	7.57±0.12 ^{ab}

注: 同列不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

参考文献

- [1] PATEL S, SHUKLA R, GOYAL A. Probiotics in valorization of innate immunity across various animal models [J]. J Funct Foods, 2015, 14: 549-561.
- [2] KHAN U, SHAHNAWAZ. Probiotics in dairy foods: A review [J]. Food Sci Nutr, 2014, 44(1): 71-88.
- [3] 闫肃, 李慧敏, 张晓冬, 等. 不同食物来源乳酸菌的安全性评价[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(5): 82-89.
YAN S, LI HM, ZHANG XD, et al. Safety assessment of lactic acid bacteria from different food products [J]. Food Ferment Ind, 2018, 44(5): 82-89.
- [4] SHIN M, YONG C, OH S. Regulatory effect of *Lactobacillus brevis* Bmb6 on gut barrier functions in experimental colitis [J]. Foods, 2020, 9(7): 864
- [5] VIJAYA K, VIJAYENDRA S, REDDY O. Trends in dairy and non-dairy probiotic products-A review [J]. J Food Sci Technol Mys, 2015, 52(10): 6112-6124.
- [6] CAGGIA C, DE AM, PITINO I, et al. Probiotic features of *Lactobacillus* strains isolated from *Ragusano* and *Pecorino Siciliano* cheeses [J]. Food Microbiol, 2015, 50: 109-117.
- [7] 田永峰. 贵州苗族发酵型酸汤中功能性乳酸菌的筛选[D]. 贵阳: 贵州大学, 2008.
TIAN YF. Screening of functional lactic acid bacteria in fermented sour soup of miao nationality in guizhou [D]. Guiyang: Guizhou University, 2008.
- [8] 江萍, 张倩, 秦礼康, 等. 凯里“酸汤”的微生物区系调查及营养成分分析[J]. 中国酿造, 1997, (4): 18-20.
JIANG P, ZHANG Q, QIN LK, et al. Microflora investigation and nutrient composition analysis of kaili sour soup [J]. Chin Brew, 1997, (4): 18-20.
- [9] LIONG MT, SHAH NP. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains [J]. J Dairy Sci, 2005, 88(1): 55-66.
- [10] MANCINI A, CARAFA I, FRANCIOSI E, et al. In vitro probiotic characterization of high GABA producing strain *Lactobacillus brevis* DSM32386 isolated from traditional "wild" Alpine cheese [J]. Annal Microbiol, 2019, 69(13): 1435-1443.
- [11] RIAZ M, MEHWISH H, SIDDIQ M, et al. Identification, characterization, and probiotic potential of *Lactobacillus rhamnosus* isolated from human milk [J]. LWT-Food Sci Technol, 2017, 45(6): 84-91.
- [12] LAZADO C, CAIPANG C, BRINCHMANN M, et al. In vitro adherence of two candidate probiotics from *Atlantic cod* and their interference with the adhesion of two pathogenic bacteria [J]. Vet Microbiol, 2011, 148(2): 252-259.
- [13] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Nineteenth informational supplement [M]. PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
- [14] 许女, 贾瑞娟, 李雅茹, 等. 老陈醋来源乳酸菌的益生特性筛选及安全评价[J]. 中国食品学报, 2020, 20(10): 29-39.
XU N, JIA RJ, LI YR, et al. Screening of probiotic characteristics and safety evaluation of lactic acid bacteria from aged vinegar [J]. J Chin Instit Food Sci Technol, 2020, 20(10): 29-39.
- [15] GUO Z, WANG J, YAN L, et al. In vitro comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, A potential new probiotic, with selected probiotic strains [J]. LWT-Food Sci Technol, 2009, 42(10): 1640-1646.
- [16] 陈孝勇, 李键, 赵欣, 等. 传统发酵牦牛酸乳中益生性乳酸菌的体外筛选[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(4): 85-90.
CHEN XY, LI J, ZHAO X, et al. Screening of beneficial lactic acid bacteria from traditional fermented yak yoghurt in vitro [J]. Food Ferment Ind, 2016, 42(4): 85-90.
- [17] KANG B, WOOK T, LEE D, et al. Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potentials from kimchi, traditional Korean fermented vegetable

- [J]. LWT-Food Sci Technol, 2016, 71(9): 130–137.
- [18] VASIEE A, BEHBAHANI BA, YAZDI FT, *et al.* Diversity and probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Horreh, a traditional Iranian fermented food [J]. Probiot Antim Prot, 2018, 10(2): 258–268.
- [19] NORIEGA L, MARGOLLES A. Acquisition of bile salt resistance promotes antibiotic susceptibility changes in bifidobacterium [J]. J Food Protect, 2005, 68(9): 1916–1919.
- [20] MATSUMOTO M, OHISHI H, BENNO Y. H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance [J]. Int J Food Microbiol, 2004, 93(1): 109–113.
- [21] POURRAJAB B, FATAHI S, DEHNAD A, *et al.* The impact of probiotic yogurt consumption on lipid profiles in subjects with mild to moderate hypercholesterolemia: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Nutr Metab Cardiovas, 2020, 30(1): 11–22.
- [22] SUN L, LI XF, ZHANG YY, *et al.* A novel lactic acid bacterium for improving the quality and shelf life of whole wheat bread [J]. Food Control, 2020, 109: 106914.
- [23] LEITE A, MIGUEL M, PEIXOTO R, *et al.* Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains [J]. J Dairy Sci, 2015, 98(6): 3622–3632.
- [24] 赵圣明, 赵岩岩, 马汉军, 等. 发酵酸菜来源乳酸菌的益生特性及其在发酵乳中的应用[J]. 食品科学, 2019, 40(6): 187–194.
- ZHAO SM, ZHAO YY, MA HJ, *et al.* Probiotic characteristics of lactic acid bacteria from fermented sauerkraut and its application in fermented milk [J]. Food Sci, 2019, 40(6): 187–194.
- [25] 韦明明. 番茄酸汤发酵过程分析及混菌发酵工艺研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2016.
- WEI MM. Analysis of the fermentation process of tomato acid soup and study on the fermentation technology of mixed bacteria [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016.
- [26] MONTORO B, NABIL B, LEYRE L, *et al.* Fermented aloreña table olives as a source of potential probiotic *Lactobacillus pentosus* strains [J]. Front Microbiol, 2016, 7: 1583–1592.

(责任编辑: 于梦娇 王欣)

作者简介

陈中爱, 助理研究员, 主要研究方向为食品生物技术。

E-mail: 809424564@qq.com

刘永翔, 研究员, 主要研究方向为食品微生物。

E-mail: 352123862@qq.com