

黑果枸杞酵素中乳酸菌和酵母菌的分离鉴定和安全性评价

胡金丽¹, 高庆超¹, 扎西巴藏¹, 曹效海^{1,2}, 王树林^{1,2,3*}

(1. 青海大学农牧学院, 西宁 810016; 2. 青海-甘肃食品研发与检测联合实验室, 西宁 810016;
3. 青海大学省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室, 西宁 810016)

摘要: 目的 对黑果枸杞酵素中乳酸菌和酵母菌进行分离鉴定, 并对其安全性进行评价。**方法** 采用形态学观察、16S rDNA、26S rDNA 与内部转录间隔区(internal transcribed spacers, ITS)全序列分析分离鉴定自然发酵黑果枸杞酵素中的乳酸菌和酵母菌, 并对其安全性进行评价, 包括药敏试验、溶血试验和急性毒性试验。

结果 从酵素中分离得到了 3 株菌株分别为类食品乳杆菌(*Lactobacillus paralimentarius*)(M4), 植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)(M6)和库德里阿兹威毕赤氏酵母菌(*Pichia kudriavzevii*)(Y5)。2 株乳酸菌对青霉素类、头孢类、 β -内酰胺类、大环内酯类及四环素类等大多数常见抗生素无耐药性; 酵母菌 Y5 除了对氟康唑表现为耐药外, 对其余抗真菌类抗生素均未表现出耐药性。3 株菌均无急性毒性, 也未发现有溶血现象。**结论** 本研究初步验证了菌株的安全性, 为 3 株菌在黑果枸杞酵素产品的研发与生产中的应用提供了基础研究数据。

关键词: 黑果枸杞酵素; 乳酸菌; 酵母菌; 菌种鉴定; 安全性分析

Identification and safety evaluation of lactic acid bacteria and yeast in *Lycium ruthenicum* Murr. jiaosu

HU Jin-Li¹, GAO Qing-Chao¹, ZHAXIBA-Zang¹, CAO Xiao-Hai^{1,2}, WANG Shu-Lin^{1,2,3*}

(1. College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xi'ning 810016, China; 2. United Laboratory of Food Research and Testing of Qinghai-Gansu Province, Xi'ning 810016, China; 3. State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Qinghai University, Xi'ning 810016, China)

ABSTRACT: Objective To isolate and identify lactic acid bacteria and yeast from *Lycium ruthenicum* Murr. jiaosu, and to evaluate its safety. **Methods** Lactic acid bacteria and yeast were isolated and identified from jiaosu in naturally fermentation of *Lycium ruthenicum* Murr. by morphological observation, 16S rDNA, 26S rDNA and internal transcribed spacers (ITS) full sequence analysis. Meanwhile, the safety was evaluated by susceptibility test, hemolytic test and acute toxicity experiment. **Results** Three strains were isolated from the jiaosu such as *Lactobacillus parallelarius* (M4), *Lactobacillus plantarum* (M6) and *Pichia kudriavzevii* (Y5). Two strains of lactic acid bacteria were sensitive to most common antibiotics such as penicillin, cephalosporin, β -lactams, macrolides and tetracyclines; yeast Y5 showed resistance to fluconazole but sensitivity to other antifungal antibiotics. None of the 3 strains had acute toxicity and hemolytic. **Conclusion** This study preliminarily verifies the safety of the strains, and

基金项目: 青海省重点研发与转化计划项目(2019-SF-C19)

Fund: Supported by the Key Research & Development and Transformation Projects in Qinghai Province (2019-SF-C19)

*通信作者: 王树林, 教授, 主要研究方向为食品科学。E-mail: wangsl1970@163.com

*Corresponding author: WANG Shu-Lin, Professor, College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, No.251, Ning Road, Chengbei District, Xining 810016, China. E-mail: wangsl1970@163.com

provides basic research data for the application of the 3 strains in the development and production of *Lycium ruthenicum* Murr. jiaosu products.

KEY WORDS: *Lycium ruthenicum* Murr. jiaosu; lactic acid bacteria; yeast; strain identification; safety evaluation

0 引言

黑果枸杞 (*Lycium ruthenicum* Murr.) 系茄科 (*Solanaceae*) 枸杞属 (*Lycium*) 多年生棘刺灌木, 其浆果多呈紫黑色球状, 是青藏高原地区的特色浆果资源之一, 富含花青素、有机酸、多糖以及铁、锌等无机矿物质元素^[1]。藏医经典《四部医典》《晶珠本草》中收录记载其味甘而性平, 微温, 可治心热病、尿道结石、月事不調和更年期综合症^[2-3], 亦有滋阴补阳、降压明目之效^[4]。

酵素是一种微生态整体^[5-7], 多指以单种或几种果蔬、覃类为发酵基质, 经天然或益生菌接种发酵制得的包含产酶微生物、相互调节因子及其相互作用代谢产物的液态或固态食品^[8-9]。酵素风味独特, 且富含如酶类(脂肪酶、蛋白酶、淀粉酶等)、矿物元素、有机酸、多糖等多种对人体有益的微生物代谢产物, 具备调节生命活动、维持机体功能、组织修复等功效^[6,10]。针对酵素在自然发酵过程中菌种多、周期冗长、组分复杂且条件和品质难以把控等问题^[11], 有研究提出了接种发酵的概念, 这一方法的提出极大地缩短了酵素的生产周期、降低生产成本并使产品品质保持在相对稳定的水平, 对酵素实现商业化具有重要意义。

商业益生菌制剂虽然经过菌种安全性鉴定, 且能在发酵过程中保持稳定性能^[12-13], 但是原材料的差异性和菌种的特异性使得一般的益生菌发酵制剂不一定适用于不同的原材料生产, 且菌种或菌种中的酶对底物或者寄主存在偏好性^[14], 存在对原料中的各组分的发酵利用不充分的可能。IGNATOVA 等^[15]发现 18 株保加利亚乳杆菌具有菌株特异性, 对不同的低聚糖的利用能力存在差异。相似地, 张秋香等^[16]发现以低聚果糖和低聚木糖为碳源, 乳杆菌对碳源的利用速率普遍高于双歧杆菌, 这与乳酸菌的种属相关。因此从自然发酵的黑果枸杞酵素中分离鉴定出优势微生物, 所得菌种对黑果枸杞中的营养成分的利用将更加充分, 更有利于其酵素产品的质量控制和产业化^[17-20]。但少量研究发现部分益生菌可能引发人体败血症、产生抗药性^[21-23]。因此, 对无长期使用历史、新筛选出的益生菌进行菌种安全性分析是十分必要的。

本研究参考前人的研究思路, 采用常规的几种方法从天然发酵的黑果枸杞酵素中分离得到 3 株优势微生物, 进行形态学观察、16s rDNA、26S rDNA 与内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 全序列分析鉴定, 并对其安全性进行分析, 以期为黑果枸杞酵素高端产品的开发与生产提供菌种, 降低生产成本, 丰富黑果枸杞精深加工系

列产品, 推动黑果枸杞产业的发展。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黑果枸杞酵素(实验室自制, 黑果枸杞鲜果采摘自海拔 2800 m 的青海省格尔木市大格勒乡); MRS 培养基按文献^[24]配制; 酵母浸出粉豚葡萄糖(yeast extract peptone dextrose medium, YEDP)培养基按文献^[25]配制; 垫料、鼠粮(江苏省协同生物工程有限公司); 无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级昆明种雄性小鼠(中国农业科学院兰州兽医研究所)

WL 营养琼脂(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 血平板成品、沙氏琼脂培养基(广东环凯生物科技有限公司); 药敏纸片(深圳康泰生物制品公司); ROSCO 药敏纸片(丹麦 Rosco 公司); 亚甲基蓝(天津福晨化学试剂公司); Ezup 柱式细菌、真菌及酵母基因组 DNA 抽提试剂盒(上海生工生物工程公司); DreamTaq-TM DNA 聚合酶(美国 MBI 公司); AB0014 琼脂糖(美国 BBI 公司)。

1.2 仪器与设备

SW-CJ-2FD 超净工作台(苏州安泰空气技术公司); SPX-450FT 生化培养箱(宁波普朗特仪器公司); 3730XL 测序仪、2720 热循环仪(美国 ABI 公司); DYY-5 稳压电泳仪、DYCP-31DNDNA 电泳槽(北京六一仪器厂); MF6 光学显微镜(杭州讯数科技公司); FR980 凝胶成像系统(上海复日科技有限公司)

1.3 试验方法

1.3.1 优势微生物菌种分离鉴定

将经多层纱布过滤的酵素发酵液静置 1 h, 取上清液 1 mL, 经梯度稀释, 取 100 μ L 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 梯度稀释的酵素稀释液涂布于 YEPD 固体培养基和 MRS 琼脂平板上, 分别在 28 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 的最适条件下恒温培养 48 h 后, 挑取表观形态不同的菌株划线接种于 WL 固体培养基和 MRS 琼脂平板, 通过孔雀石绿-沙黄染液染色法^[26]、革兰氏染色法和过氧化氢酶实验^[27], 观察菌落形态特征和细胞形态特征对酵母菌和乳酸菌进行初步鉴定。

将划线分离得到的单菌落委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行分子水平上的酵母菌 26S rDNA、ITS 区序列鉴定和乳酸菌 16S rDNA 序列鉴定。

1.3.2 抗生素敏感性试验

乳酸菌抗生素敏感性试验采取平板药敏纸片琼脂扩

散法^[28], 所采用的药敏纸片如表 1 所示。

酵母菌抗生素敏感性试验参照陶亦帆^[29]的研究方法。所采用的抗真菌药敏纸片包括: 氟康唑、伏立康唑、两性霉素 B、伊曲康唑。结果判定参照《CLSI 抗菌药物敏感性试验标准》。

1.3.3 溶血试验

将活化好的纯菌种划线于血琼脂平板培养皿上, 然后在相应的最适温度条件下(乳酸菌为 37 °C, 酵母菌为 28 °C)倒置培养 48 h, 观察并记录是否有溶血现象^[29-30]。

1.3.4 急性毒性试验

将适应环境后的昆明鼠随机分成 4 组, 6 只/组, 分别是食品乳杆菌(M4)组、植物乳杆菌(M6)组和库德里阿兹威毕赤氏酵母菌(Y5)组和空白对照(Control)组。试验组采用相应的菌液用无菌的磷酸盐缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)将菌液浓度调至 1×10^8 CFU/mL 进行灌胃, 对照组采用 PBS 缓冲液进行灌胃。每只小鼠灌胃 1 次, 剂量为 0.2 mL/只, 每天准时喂养饲料, 更换垫料, 于灌胃前 1 d, 灌

胃后的 1、3、5、7 d 记录体重变化。喂养过程中, 观察小鼠精神状况、排泄状况、表观行为指数、呼吸以及突发死亡的情况, 给药 1 周后处死全部小鼠, 解剖脏器, 生理盐水清洗后滤纸吸去多余水分, 观察异常状况^[31-32]。

1.4 数据处理与统计分析

利用 IBM SPSS Statistics 20.0 和 Microsoft Excel 2016 等统计软件进行数据处理和分析, 结果以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。

2 结果与分析

2.1 自然发酵黑果枸杞酵素菌种的鉴定结果

2.1.1 乳酸菌和酵母菌的形态学鉴定结果

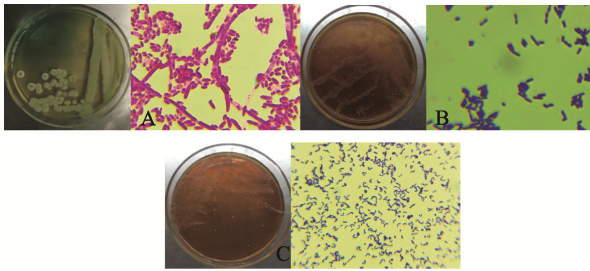
菌种安全性评价的第一步就是在分类学上对菌株的种属进行鉴定。本研究从自然发酵的黑果枸杞酵素中分离得到 1 种酵母菌(Y5)和 2 种乳酸菌(M4 和 M6), 形态学观察结果如表 2 和图 1 所示。

表 1 乳酸菌药敏实验直径判断标准
Table 1 Diameter judgment standard of lactic acid bacteria drug sensitivity test

抗菌药物类别	抗菌药物名称	纸片含药量/(μg /片)	抑菌圈直径判断标准/mm		
			耐药 R	中介 I	敏感 S
青霉素类	氨苄西林	10	≤ 13	14~16	≥ 17
糖肽类	万古霉素	30	≤ 14	15~16	≥ 17
头孢类	头孢氨苄	30	≤ 14	15~17	≥ 18
	头孢噻肟	30	≤ 14	15~22	≥ 23
喹诺酮类	氧氟沙星	5	≤ 14	15~16	≥ 17
	环丙沙星	5	≤ 12	13~14	≥ 15
	诺氟沙星	10	≤ 12	13~16	≥ 17
氨基糖苷类	链霉素	10	≤ 11	12~14	≥ 15
	新霉素	30	≤ 12	13~16	≥ 17
	庆大霉素	10	≤ 11	12~14	≥ 15
β -内酰胺类	卡那霉素	30	≤ 13	14~17	≥ 18
	阿莫西林	10	≤ 13	14~17	≥ 18
大环内酯类	红霉素	15	≤ 13	14~22	≥ 23
四环素类	四环素	30	≤ 14	15~18	≥ 19

表 2 优势微生物形态学观察结果
Table 2 Results of morphological observation of dominant microorganisms

编号	菌落大小/mm	菌落颜色	菌落表面	菌落形态	细胞形态
Y5	4~5	浅绿色	粗糙	圆形凸起, 边缘不整齐	杆状, 椭圆
M4	1~2	乳白色	光滑	圆形凸起, 边缘整齐	长杆状
M6	1~2	白色	光滑	圆形凸起, 边缘整齐	直杆短链状



注: A: Y5; B: M4; C: M6。

图 1 优势微生物形态学观察图(1000 X)

Fig.1 Figures of morphological observation of dominant microorganisms (1000 X)

2.1.2 酵母菌及真菌的 26S rDNA 与 ITS 全序列分析结果
通过将 Y5 号菌株测序结果拼接, 与核糖体数据库上检索序列相似度高于 99% 的菌株进行序列比对。发现与 Y5 号菌株相似度为 100% 的菌株几乎均为库德里阿兹威毕赤氏酵母菌(*Pichia kudriavzevii*), 如图 2 所示。

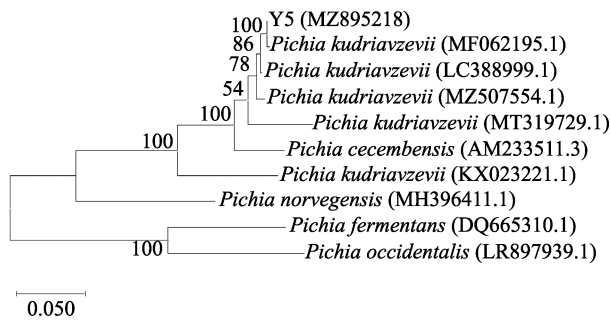


图 2 菌株 Y5 系统进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of strain Y5

2.1.3 乳酸菌的 16S rDNA 全序列分析结果

形态学观察结果表明 M4、M6 为乳杆菌, 接着对其 16S rDNA 基因序列分析, 进一步发现数据库中类食品乳杆菌(*Lactobacillus paralimentarius*)与 M4 号菌株相似度为 93.0%, 如图 3 所示; M6 号菌株经过测定, 相似度高达 99% 的菌株均是植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*), 如图 4 所示。

2.2 抗生素敏感性试验结果

抗生素敏感性结果判定参照 CLSI 抗菌药物敏感性试验标准进行, 试验结果见表 3 和 4。

本研究采用 8 大类 14 种药敏纸片分别对 M4 和 M6 进行抗生素敏感性试验。结果表明, 2 株乳酸菌对青霉素类、头孢类、 β -内酰胺类、大环内酯类及四环素类抗生素均表示为敏感; 对糖肽类抗生素表现耐药。青霉素作为最早被人类发现的抗生素, 在临床上的应用历史和范围都极广, 所以微生物对其产生耐药性的现象也最为普遍^[27], 但本次试验中的乳酸菌对青霉素类抗生素都敏感, 不存在耐药

性。糖肽类抗生素中的万古霉素被认为是人类药物史上对付顽强性耐药菌株的最后一道防护线, 临床上常被用作 β -内酰胺类或其它类抑菌抗生素药物治疗无效后才使用的抗生素, 但本次试验中的 2 株乳酸菌却均对其耐药。对于喹诺酮类抗生素, 2 株菌均有较高的耐药性, 仅有 M6 菌株对诺氟沙星表现出敏感, 喹诺酮类药物耐药性与携带的耐药基因存在一定相关性^[33]; 对于氨基糖苷类抗生素, M4 除对新霉素敏感外, 对其余氨基糖苷类抗生素表现耐药; M6 除了对卡那霉素表现为耐药外, 其他均为敏感; 2 株菌均对卡那霉素耐药, 分析原因可能是细菌过度表达氨基糖苷修饰酶进而诱发对氨基糖苷类药物的抗性机制^[34]。2 株乳酸菌的抗生素敏感性存在差异, 这可能是乳杆菌对各类抗生素的敏感性存在种间差别^[35], 存在菌株特异性和后天获得性的可能^[27], 而具体的耐药机制仍需进一步探索。

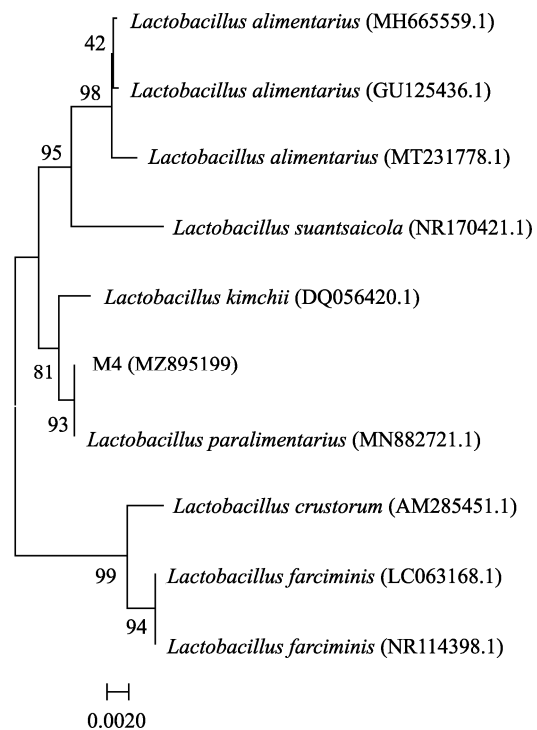


图 3 菌株 M4 系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of strain M4

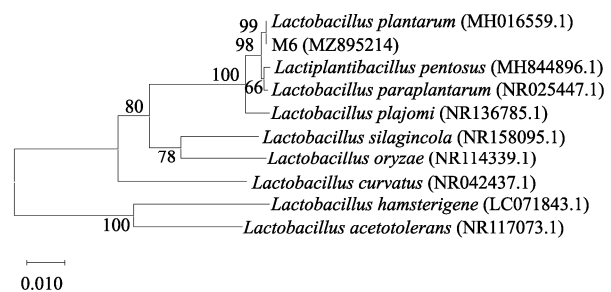


图 4 菌株 M6 系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of strain M6

表 3 乳酸菌抗生素药敏实验结果(n=3)
Table 3 Drug sensitivity test results of lactic acid bacteria (n=3)

抗菌药物类别	抗生素	纸片含药量/(μg/片)	M4	M6
			抑菌圈直径/mm	
青霉素类	氨苄西林	10	36.70±1.25 (S)	21.30±0.47 (S)
糖肽类	万古霉素	30	6.00±0.00 (R)	12.30±2.62 (R)
头孢类	头孢氨苄	30	29.30±1.25 (S)	27.30±0.47 (S)
	头孢噻肟	30	39.70±1.41 (S)	27.70±2.50 (S)
喹诺酮类	氧氟沙星	5	12.30±1.25 (R)	12.30±2.06 (R)
	环丙沙星	5	7.70±0.94 (R)	8.00±0.00 (R)
	诺氟沙星	10	6.00±0.00 (R)	16.00±0.00 (S)
氨基糖苷类	链霉素	10	9.30±0.47 (R)	11.30±0.47 (I)
	新霉素	30	18.70±2.06 (S)	22.30±1.25 (S)
	庆大霉素	10	10.30±1.70 (R)	16.00±2.45 (S)
β-内酰胺类	卡那霉素	30	8.00±2.16 (R)	7.30±0.47 (R)
	阿莫西林	10	30.00±1.41 (S)	27.00±0.00 (S)
大环内酯类	红霉素	15	28.70±0.47 (S)	26.30±0.47 (S)
四环素类	四环素	30	19.30±4.11 (S)	24.00±0.82 (S)

注: 表中敏感(S), 中介(I), 耐药(R), 下同。

由表 4 可知, 酵母菌 Y5 除了对氟康唑表现耐药外, 对于抗真菌药物类抗生素均为敏感。氟康唑作为一种三唑类抗真菌药物, 可以选择性地通过抑制细胞色素 P450 酶系的活性减少麦角甾醇的合成, 阻止真菌细胞膜的合成^[36], 从而达到抑菌的效果。



图 5 M4、M6 和 Y5 溶血实验结果
Fig.5 Hemolysis test results of M4, M6 and Y5

表 4 酵母菌抗生素药敏试验结果
Table 4 Results of antibiotic sensitivity test of yeast

抗生素名称	纸片含量/(μg/片)	抑菌圈直径/mm
氟康唑	25	6.00±0.00 (R)
伏立康唑	1	27.30±1.89 (S)
两性霉素 B	10	14.00±0.00 (I)
伊曲康唑	8	30.70±0.95 (S)

2.3 溶血实验结果

溶血性是菌株进行体外安全性评价的重要指标之一^[37]。潜在的溶血性微生物的存在, 可能会导致败血症的发生。根据溶血特征和致病力可将溶血性分为 2 类, α 溶血(草绿色溶血圈)和 β 溶血(透明溶血圈), 前者对人体致病性较差, 后者却存在强致病性。由图 5 可知, 乳酸菌菌种(M4 和 M6)和酵母菌(Y5)的菌落周围均无溶血圈出现, 说明 3 株菌均无溶血性。

2.4 急性毒性试验结果

小鼠口服菌液后 1 周内的体重变化以及解剖后心、肝、脾、肺、肾和胰线对比情况如图 6 和 7 所示。

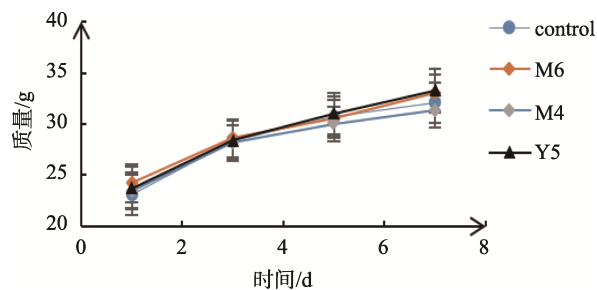


图 6 小鼠体重变化(n=6)
Fig.6 Changes in body weight of mice (n=6)



注: 从上到下分别是 control、M6、M4 和 Y5, 从左到右分别是心、肝、脾、肺、肾和胰腺。

图 7 小鼠解剖后脏器对比图

Fig.7 Comparison of organs in mice after anatomy

急性毒性试验是指对动物进行 1 次给药或在 24 h 内进行多次给药, 通过观察动物的生理活动、中毒状况、死亡情况等指标来判断样品毒性的性质和强弱, 是毒性研究的第一步^[38]。实验中对照组和试验组小鼠在体重上的增长改变都正常, 无显著性差异($P>0.05$)。小鼠在灌胃前后毛色光亮不潮湿, 无痉挛, 排泄物正常, 活动及精神状态亦无异常, 在实施过程中未发生死亡, 由图 7 可知, 解剖后小鼠的心、肝、脾、肺、肾、胰腺的颜色和形状均无异常, 说明 3 株菌对小鼠体重增长、行为指数和脏器均无显著影响($P>0.05$), 即无急性毒性。这一现象与熊江和刘博等^[30,39]研究结果一致。

3 结论

本研究通过对自然发酵黑果枸杞酵素的微生物进行分离鉴定, 从酵素中分离得到了 1 种酵母菌[库德里阿兹威毕赤氏酵母菌(*Pichia kudriavzevii*)]和 2 种乳酸菌[类食品乳杆菌 (*Lactobacillus paralimentarius*)、植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)]。通过药敏试验、急性毒性试验和溶血试验对 3 株菌的安全性进行评价, 发现 3 株菌对大多数常见抗生素无耐药性, 无口服急性毒性, 无溶血性, 总体而言菌株具有较高的安全性。在今后的研究中, 可将筛选出来的菌株用于黑果枸杞酵素的接种发酵研究, 通过确定最佳工艺条件, 实现对黑果枸杞酵素发酵的调控, 推进黑果枸杞酵素产业化、市场化。

参考文献

- [1] 高庆超, 常应九, 马蓉, 等. 黑果枸杞酵素发酵前后主要成分分析及体外抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(5): 275-283.
GAO QC, CHANG YJ, MA R, *et al.* Analysis of main components and antioxidant activity *in vitro* for *Lycium ruthenicum* Murr. jiaosu before and after fermentation [J]. Food Ferment Ind, 2020, 46(5): 275-283.
- [2] CHEN S, ZHOU H, ZHANG G, *et al.* Anthocyanins from *Lycium ruthenicum* Murr. ameliorated *D*-galactose-induced memory impairment, oxidative stress, and neuroinflammation in adult rats [J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(11): 3140-3149.

- [3] WANG H, LI J, TAO W, *et al.* *Lycium ruthenicum* studies: Molecular biology, phytochemistry and pharmacology [J]. Food Chem, 2018, 240: 759-766.
- [4] 刘加成, 王振斌. 微生物酵素食品研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(1): 273-276.
LIU JC, WANG ZB. Research progress on microbial ferment food [J]. Food Ferment Ind, 2016, 42(1): 273-276.
- [5] 朱政, 周常义, 曾磊, 等. 酵素产品的研究进展及问题探究[J]. 中国酿造, 2019, 38(3): 10-13.
ZHU Z, ZHOU CY, ZENG L, *et al.* Research progress and problems exploring of ferment products [J]. China Brew, 2019, 38(3): 10-13.
- [6] ZHAI FH, WANG Q, HAN JR. Nutritional components and antioxidant properties of seven kinds of cereals fermented by the basidiomycete *Agaricus blazei* [J]. J Cere Sci, 2015, 65: 202-208.
- [7] 赵芳芳, 莫雅雯, 蒋增良, 等. 功能性微生物酵素产品的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(7): 283-287.
ZHAO FF, MO YW, JIANG ZL, *et al.* Research progress on functional microbial ferment product [J]. Food Ferment Ind, 2016, 42(7): 283-287.
- [8] 刘灏. 若干果蔬酵素酵母菌与乳酸菌菌株的分离与鉴定[D]. 福州: 福建农林大学, 2019.
LIU H. The isolation and identification of yeast and lactobacillus from several kinds of fruit and vegetable enzyme [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2019.
- [9] 张思, 王蕾, 张志旭, 等. 16 种市售酵素食品功能分析于评价[J]. 食品与机械, 2016, 32(9): 169-200.
ZHANG S, WANG L, ZHANG ZX, *et al.* Functional analysis and evaluation on commercially available enzyme food [J]. Food Mach, 2016, 32(9): 169-200.
- [10] 张巧, 柯博芳, 唐小闲, 等. 不同发酵菌种对大果山楂酵素品质的影响[J]. 食品工业, 2020, 41(6): 162-166.
ZHANG Q, KE BF, TANG XX, *et al.* Effects of different fermentation strains on the quality of *Malus domeri* (Bois) Chev. enzyme drink [J]. Food Ind, 2020, 41(6): 162-166.
- [11] 高庆超. 黑果枸杞酵素发酵过程中微生物及物质变化规律的研究[D]. 西宁: 青海大学, 2020.
GAO QC. Study on change law of microorganisms and metabolites during fermentation progress of *Lycium ruthenicum* Murr. jiaosu [D]. Xining: Qinghai University, 2020.
- [12] 孙笑非, 孙冬岩, 王文娟. 商业益生菌产品安全性的探讨[J]. 饲料研究, 2020, 43(6): 121-122.
SUN XF, SUN DY, WANG WJ. Discussion on the safety of commercial probiotic products [J]. Feed Res, 2020, 43(6): 121-122.
- [13] JUNGENSEN M, WIND A, JOHANSEN E, *et al.* The science behind the probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp Lactis BB-12[®] [J]. Microorganisms, 2014, 2(2): 92-110.
- [14] 刘慧. 枯草芽孢杆菌乙酰乳酸合酶活性检测新方法的建立及该酶的底物偏好性研究[D]. 西安: 西北大学, 2018.
LIU H. Establishment of a new method for detection of *Bacillus subtilis* acetolactate synthase activity and study on the substrate preference of the enzyme [D]. Xi'an: Northwest University, 2018.
- [15] IGNATOVA T, ILIEV I, KIRILOV N, *et al.* Effect of oligosaccharides on the growth of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. Bulgaricus strains isolated from dairy products [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(20): 9496-9502.
- [16] 张秋香, 应聪萍, 刘思思, 等. 乳酸菌利用低聚果糖和低聚木糖的特性研究[J]. 食品与生物技术学报, 2020, 39(4): 18-23.
ZHANG QX, YING CP, LIU SS, *et al.* Fructooligosaccharides and xylooligosaccharides utilization properties of lactic acid bacteria [J]. J Food Sci Biotechnol, 2020, 39(4): 18-23.

- [17] WALL MM, NISHIJIMA KA, SARNOSKI P, *et al.* Postharvest ripening of noni fruit (*Morinda citrifolia*) and the microbial and chemical properties of its fermented juice [J]. *J Herb Spice Med Plant*, 2015, 21(3): 294–307.
- [18] TEOH AL, HEARD G, COX J. Yeast ecology of kombucha fermentation [J]. *Int J Food Microbiol*, 2004, 95(2): 119–126.
- [19] 肖梦月, 曹新志, 张楷正, 等. 果蔬酵素中纯菌种筛选及其在复合发酵中的应用[J]. *中国调味品*, 2020, 45(2): 43–48.
- XIAO MY, CAO XZ, ZHANG KZ, *et al.* Screening of pure strains from fruit and vegetable enzymes and their application in complex fermentation [J]. *China Cond*, 2020, 45(2): 43–48.
- [20] 沙如意, 王珍珍, 徐成龙, 等. 三种食用植物酵素中酵母菌的分离鉴定及耐受性试验[J]. *生物资源*, 2020, 42(1): 124–130.
- SHA RY, WANG ZZ, XU CL, *et al.* Isolation, identification and tolerance of yeasts from three kinds of edible plant jiaosu [J]. *Biotic Resour*, 2020, 42(1): 124–130.
- [21] SHARMA P, TOMAR SK, SANGWAN V, *et al.* Antibiotic resistance of *Lactobacillus* sp. isolated from commercial probiotic preparations [J]. *J Food Saf*, 2016, 36(1): 38–51.
- [22] 秦宇轩, 李晶, 王秋涯, 等. 市售酸奶中乳酸菌的鉴定与耐药性[J]. *微生物学报*, 2013, 53(8): 889–897.
- QIN YX, LI J, WANG QY, *et al.* Identification of lactic acid bacteria in commercial yogurt and their antibiotic resistance [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2013, 53(8): 889–897.
- [23] HEMPEL S, NEWBERRY S, RUELAZ A, *et al.* Safety of probiotics used to reduce risk and prevent or treat disease [J]. *Evid Rep Technol Assess*, 2011, (200): 1–645.
- [24] MATTI A, UTAMI T, HIDAYAT C, *et al.* Isolation, screening, and identification of proteolytic lactic acid bacteria from indigenous chao product [J]. *J Aqua Food Prod Technol*, 2019, 28(7): 781–793.
- [25] 毛祥, 夏均, 张芸墨, 等. 四川麸曲曲药中酵母菌的分离鉴定及发酵特性[J]. *食品科学技术学报*, 2018, 36(6): 21–27.
- MAO X, XIA Y, ZHANG YZ, *et al.* Isolation, identification and fermentation characteristics of yeast from Sichuan bran vinegar starter [J]. *J Food Sci Technol*, 2018, 36(6): 21–27.
- [26] 陈美竹. 酱香白酒大曲与酿造过程酵母动态变化研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2016.
- CHEN MZ. Dynamic change of yeast in Daqu and brewing process of Moutai-flavor liquor [D]. Guiyang: Guizhou University, 2016.
- [27] 吴凤玉, 郑喆, 李柳, 等. 宫廷奶酪中优良乳酸菌菌株的分离与鉴定[J]. *食品科学技术学报*, 2019, 37(3): 55–60, 85.
- WU FY, ZHENG Z, LI L, *et al.* Isolation and identification of lactic acid bacteria from traditional royal cheese [J]. *J Food Sci Technol*, 2019, 37(3): 55–60, 85.
- [28] 高慢慢, 焦新雅, 张志胜, 等. 侗族传统发酵酸肉中乳酸菌的筛选、发酵特性及安全性分析[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(12): 94–99, 105.
- GAO MM, JIAO XY, ZHANG ZS, *et al.* Screening, fermentation characteristics and safety analysis of lactic acid bacteria in Dong traditional fermented sour meat [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2020, 41(12): 94–99, 105.
- [29] 陶亦帆. 两种培养基在 ROSCO 真菌药敏试验中的应用[J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2009, 23(4): 247–248.
- TAO YF. Application of two culture mediums on ROSCO antifungal susceptibility test [J]. *Chin J Dermatovenereol*, 2009, 23(4): 247–248.
- [30] 熊江, 何腊平, 张义明, 等. 动物双歧杆菌乳亚种 BZ25 的安全性评价[J]. *食品工业*, 2017, 38(1): 184–189.
- XIONG J, HE LP, ZHANG YM, *et al.* The safety assessment of animal species of *Lactobacillus* BZ25 [J]. *Food Ind*, 2017, 38(1): 184–189.
- [31] 彭塘福, 陈晗, 敬伟甫, 等. 乳酸菌和酵母菌混合发酵脱毒橡胶籽的安
- 全性试验研究[J]. *扬州大学学报(农业与生命科学版)*, 2017, 38(3): 62–67.
- PENG TF, CHEN H, JING WF, *et al.* Experimental study on the safety of detoxified rubber seeds mixedly fermented by lactic acid bacteria and yeast [J]. *J Yangzhou Univ (Agric Life Sci Ed)*, 2017, 38(3): 62–67.
- [32] 吴树声, 郭文涛, 杜鹏程, 等. 鼠疫菌对抗生素敏感性和耐药性的研究进展[J]. *疾病监测*, 2013, 28(9): 781–783.
- WU SS, GUO WT, DU PC, *et al.* Progress in research of antibiotic susceptibility and resistance of *Yersinia pestis* [J]. *Dis Surveil*, 2013, 28(9): 781–783.
- [33] 汪复, 朱德妹, 胡付品, 等. 2008 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2009, 9(5): 321–329.
- WANG F, ZHU DM, HU FP, *et al.* CHINET 2008 surveillance of bacterial resistance in China [J]. *Chin J Infect Chemother*, 2009, 9(5): 321–329.
- [34] 万倩, 李启明, 吴华星, 等. 传统发酵食品中乳酸菌的安全性评估[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(6): 276–286.
- WAN Q, LI QM, WU HX, *et al.* Evaluation for lactic acid bacteria safety in traditional fermented food [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2021, 37(6): 276–286.
- [35] 李章程, 胡洋, 黄书伦, 等. 鹌鹑致病性大肠杆菌分离鉴定及抗生素敏感性试验[J]. *四川畜牧兽医*, 2016, 43(4): 29–30, 33.
- LI ZC, HU Y, HUANG SL, *et al.* Isolation, identification and antibiotics sensitivity test of *Escherichia coli* from the quail [J]. *Sichuan Anim Vet Sci*, 2016, 43(4): 29–30, 33.
- [36] 夏志宽. 阿萨希毛孢子菌氟康唑耐药分子机制初探[D]. 重庆: 中国人民解放军陆军军医大学, 2020.
- XIA ZK. Molecular mechanism of fluconazole resistance in *Trichosporon asahii* [D]. Chongqing: PLA Army Medical University, 2020.
- [37] 孟祥晨, 李雪, 姚蕾, 等. 两株植物乳杆菌作为潜在益生菌的体外评价[J]. *东北农业大学学报*, 2015, 46(9): 44–51.
- MENG XC, LI X, YAO L, *et al.* *In vitro* evaluation of two *Lactobacillus plantarum* as potential probiotics [J]. *J Northeast Agric Univ*, 2015, 46(9): 44–51.
- [38] 李晓, 王学方, 范毅, 等. 连花柴芩可溶性粉的毒理学研究[J]. *中国兽药杂志*, 2020, 54(10): 36–47.
- LI X, WANG XF, FAN Y, *et al.* Study on toxicology of Lianhuachaiqin soluble powder [J]. *Chin J Vet Drug*, 2020, 54(10): 36–47.
- [39] 刘博, 董超, 米阳, 等. 产纤溶酶的海洋放线菌小鼠急毒和抗生素敏感实验[J]. *河北省科学院学报*, 2015, 32(3): 70–73.
- LIU B, DONG C, MI Y, *et al.* Mice acute toxicity and antibiotic sensitivity tests of a plasmin-producing marine actinomycete [J]. *J Hebei Acad Sci*, 2015, 32(3): 70–73.

(责任编辑: 李磅礴 张晓寒)

作者简介



胡金丽, 硕士研究生, 主要研究方向为食品科学。
E-mail: 562843958@qq.com



王树林, 教授, 主要研究方向为食品科学。
E-mail: wangsl1970@163.com