

泡菜中乳酸菌的分离鉴定及体外抗性筛选

Isolation and identification of lactic acid bacteria from fermented vegetables and in vitro resistance screening

周先容¹ 兰凌霞¹ 汤艳燕¹ 黄盛蓝¹ 李玉珠¹

ZHOU Xian-rong¹ LAN Ling-xia¹ TANG Yan-yan¹ HUANG Sheng-lan¹ LI Yu-zhu¹

于丽洪¹ Zsolt Zalán² 赵欣³ 杜木英^{1,2}

YU Li-hong¹ ZALÁN Zsolt² ZHAO Xin³ DU Mu-ying^{1,2}

(1. 西南大学食品科学学院, 重庆 400715; 2. 中匈食品科学合作研究中心, 重庆 400067;

3. 重庆第二师范学院功能性食品协同创新中心, 重庆 400067)

(1. College of Food Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Chinese-Hungarian Cooperative Research Centre for Food Science, Southwest University, Chongqing 400067, China; 3. Chongqing Collaborative Innovation Center for Functional Food, Chongqing University of Education, Chongqing 400067, China)

摘要:从泡菜中分离得到 5 株乳酸杆菌, 经 16S rDNA 种属分析, 其中 4 株为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*), 编号分别为 E-6-1、E-1-2、E-6-3、D-2-3, 1 株为消化乳杆菌(*Lactobacillus alimentarius*), 编号为 C-2-1。通过人工胃液和胆盐试验来确定 5 株菌的体外抗性。结果表明, D-2-3 乳酸菌具有较好的抗人工胃液能力, 其在 pH 3.0 的人工胃液处理 3 h 后的存活率高达 95.38%, 且在 1, 2, 3 g/L 胆盐中均能较好的生长。说明该菌株具有益生菌潜质。

关键词: 泡菜; 乳酸菌; 分离鉴定; 抗性筛选; 16S rDNA

Abstract: This study aimed to isolate lactic acid bacteria containing *in vitro* resistance ability from Sichuan fermented vegetables. Five strains of *Lactobacillus* were isolated from fermented vegetables and analyzed by 16S rDNA. Four strains of them were *Lactobacillus plantarum*, named as E-6-1, E-1-2, E-6-3, D-2-3 respectively, and another one was *Lactobacillus alimentarius*, named as C-2-1. The *in vitro* resistance of the 5 strains was determined by artificial gastric juice and bile salt. The results showed that the lactic acid bacteria numbered D-2-3 had good anti-artificial gastric juice ability, and the survival rate was 95.38% after 3 h of artificial gastric juice treatment at pH 3.0, growing well at 1, 2 and 3 g/L bile salt. These showed

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金(编号: XDJK2017D133); 中央高校基本科研业务费专项资金(编号: XDJK2017D125)

作者简介: 周先容, 女, 西南大学在读硕士研究生。

通信作者: 杜木英(1972—), 女, 西南大学副教授, 博士。

E-mail: muyingdu@swu.edu.cn

收稿日期: 2017-07-15

that the strain has probiotic potential, through further verification was expected to carry out further development and utilization.

Keywords: fermented vegetables; lactic acid bacteria; isolation and identification; resistance screening; 16S rDNA

泡菜是由新鲜蔬菜经乳酸菌等微生物发酵制得的美味食品^[1]。泡菜的整个发酵过程温度较低, 可较好地保存蔬菜中的营养物质, 且乳酸菌可利用原料中的可溶性物质发酵产生大量的酯类化合物、乳酸、乙氨基酸以及一些生物活性物质, 可使发酵蔬菜的营养价值得到进一步的提高^[2]。

乳酸菌(LAB)是一种主要的益生菌微生物^[3]。泡菜中具有较丰富的乳酸菌种类, 所以从发酵优良的泡菜中分离筛选具有益生特性的乳酸菌具有重要意义。刘佩等^[4]在泡菜中分离得到 1 株植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*), 通过硫酸二已酯、紫外线诱变处理后, 得到一株可有效提高共轭亚油酸合成能力的突变菌株, 产 CLA 量最高可达 2.09 mg/mL。穆琳^[5]从西藏自然发酵的干酪中分离筛选出一株产 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)的编号为 ML7 的发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)。淮骏^[6]从发酵黄瓜汁中筛选出 1 株可产广谱乳酸菌素的编号为 H 的植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)。汤伟等^[7]从泡菜中分离出一株消化乳杆菌, 分析表明其具有 92.92% 的亚硝酸盐降解率, 体外胆固醇清除率达到 31.8%。除此之外, 许多优良乳酸菌还具有产细菌素、产胞外多糖、富集硒、铬、锌等微量元素的作用^[8-11]。

可在人体肠道中存活并定殖是乳酸菌在人体内发挥益

生作用的前提,而耐酸和耐胆盐能力是评价乳酸菌能否在人体内存活定殖的2个重要指标^[12-14]。Pennacchia等^[15]对从香肠中分离出的乳酸菌进行耐酸和耐胆盐试验,结果表明,28株菌在pH 2.5的培养基中处理3 h后的存活率>80%,而且大多数菌株可在3 g/L的胆盐培养基中生长。Liong等^[16]对乳酸菌耐酸、耐胆盐和清除胆固醇的能力进行了研究,表明所有菌株对pH 2.0的环境均有一定的耐受力,其中*L. acidophilus* ATCC 4962, *L. casei* ASCC 290和*L. casei* ASCC 292耐酸能力最强,在pH 2.0中处理2 h后的存活率超过了 10^7 CFU/mL。陈孝勇等^[17]对传统发酵牦牛酸乳中益生性乳酸菌进行体外筛选,其中有4株乳酸菌在人工胃液中的存活率>90%,且可在胆盐中良好生长。

目前从泡菜中分离纯化乳酸菌的研究较多,但对泡菜中分离的乳酸菌进行体外抗性筛选的研究鲜有报道。本研究从泡菜样品中分离纯化乳酸菌,采用16S rDNA种属分析确定菌株种属,对已知种属的乳酸菌进行体外人工胃液耐受和胆盐耐受试验,筛选出体外抗性较好的乳酸菌,旨在为其后续研究及工业化应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 样品来源

泡菜样品:分别为泡萝卜、泡豇豆和泡辣椒,成都毛哥泡菜厂。

1.1.2 主要培养基及试剂

MRS琼脂培养基、MRS肉汤培养基:北京陆桥科技有限公司;

硫代乙醇酸钠、猪胆盐:山东西亚化学工业有限公司;

胃蛋白酶:3 000 mg/U,北京索莱宝生物科技有限公司;

盐酸:分析纯,成都市科龙化工试剂厂;

通用细菌基因组DNA提取试剂盒、Proteinase K、50×TAE缓冲溶液、琼脂糖、2×Taq PCR MasterMix、15 000 bp DNA Ladder:天根生化(北京)科技有限公司;

GoldView核酸染色剂(EB替代品):武汉百浩天生物科技有限公司;

PCR扩增引物:1495R(上游引物)、27F(下游引物),由上海生工生物工程公司合成。

1.1.3 仪器及设备

低温生化培养箱:BF-150A型,施都凯仪器设备(上海)有限公司;

超净工作台:SW-CJ-2FD型,苏州安泰空气技术有限公司;

立式压力蒸气灭菌锅:LDZM-80KCS-II型,上海申安医疗器械厂;

台式高速冷冻离心机:ICEN-24R型,杭州奥盛仪器有限公司;

生物显微镜:BK6000型,重庆奥特光学仪器有限公司;

正置生物显微镜:OLYMPUS-X43型,日本奥林巴斯

公司;

医用低温冰箱:ULTS1651型,赛默飞世尔(苏州)仪器有限公司;

纯水/超纯水制造系统:UPH-II-20T型,四川优普超纯水科技有限公司;

电子天平:ES 500型,天津市得安特传感技术有限公司;

小型水平电泳槽:Mini-Sub Cell GT Cel型,美国Bio-Rad公司;

PCR凝胶成像仪:Tanon-2500型,上海Tanon科技有限公司;

pH计:PHS-3E型,上海仪电科学仪器股份有限公司;

电泳仪:JY600C型,北京君意东方电泳设备有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 乳酸菌富集培养 取上述泡菜汁5 mL接种于121℃、灭菌15 min的50 mL MRS肉汤中,于37℃培养18~24 h^[18],待培养基变浑浊,底部有白色菌体沉淀物说明菌株得到了较好的富集。

1.2.2 乳酸菌分离与纯化 取上述富集培养好的含菌悬液培养基1 mL,在无菌状态下用无菌生理盐水稀释至 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 。分别取 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 稀释度的菌悬液100 μL涂布于MRS平板培养基,置于37℃恒温培养48~72 h,观察并记录菌落形态。挑取平板上菌落形态不同的菌进行划线分离,如此重复直至分离纯化得到形态一致的、纯的单菌落,然后进行革兰氏染色和接触酶试验,淘汰非目标菌株^[19-21]。目标菌株于20%的甘油中-80℃保存备用。

1.2.3 乳酸菌的16S rDNA分析

(1) 菌株基因组DNA提取:通过平板菌落形态观察及革兰氏染色镜检确定菌株纯化完成后,再次挑取单菌落接种于MRS肉汤中,37℃恒温培养24 h,然后按照细菌基因组DNA提取试剂盒说明书对所培养的菌株进行DNA提取,将提取的DNA放于-20℃冰箱备用。

(2) PCR扩增:PCR引物使用生工生物技术公司合成的16S rDNA基因通用引物对乳酸菌16S rDNA进行扩增。上、下游引物分别为27F(5'-AGA GTT TGA TCC TGGCTC AG-3')和1495R(5'-CTA CGG CTA CCTTGT TAC GA-3')。

PCR扩增体系整个体系为25 μL,其中模板DNA 1 μL,上游引物(27F)和下游引物(1495R)分别1 μL,2×Taq plus Buffer 12.5 μL,无菌dd H₂O 9.5 μL。并以无菌超纯水替代模板DNA作为阴性对照^[22]。

PCR扩增条件:预变性94℃ 5 min;变性94℃ 30 s,退火55℃ 30 s,延伸72℃ 1 min,共29个循环,最后72℃延伸5 min。

(3) 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR产物及PCR产物测序:取上述PCR扩增产物5 μL,用1.5%琼脂糖凝胶电泳对其进行检测。电泳条件:电压110 V,时间45 min。将所提菌株的16S rDNA送往北京华大基因公司进行测序。测序成功的序列使用NCBI中的BLAST(Basic Local Alignment

Search Tool) 程序进行比对分析。

(4) 构建系统发育树:从 Gene Bank 数据库中调取参考菌株序列,采用 Clustalx 1.83 软件进行序列匹配比对,通过 MEGA 5.0 软件构建菌株的系统发育树,置信度检测采用自举法,其中自举数据集为 1 000^[23]。

1.2.4 乳酸菌体外抗性试验

(1) 耐胆盐试验:在 MRS-THIO 培养基(含 0.2% 巯基乙酸钠的 MRS 肉汤)中添加猪胆盐使其浓度分别为 0, 1, 2, 3 g/L, 121 °C 灭菌 15 min, 将 5 mL 活化好的菌种以 2% (0.1 mL/5 mL) 的接种量分别接入其中,以空白培养基(未接菌的 0.0% 的 MRS-THIO 培养基)为对照,37 °C 培养 24 h 后,分别测定上述不同浓度培养基的 $OD_{600\text{ nm}}$ 值^[24-25],按式(1)计算菌株对胆盐的耐受力:

$$\text{胆盐耐受力} = \frac{\text{含胆盐培养基的 } OD_{600\text{ nm}}}{\text{空白培养基的 } OD_{600\text{ nm}}} \times 100\% \quad (1)$$

(2) 人工胃液的配制:人工胃液由 0.2% NaCl 和 0.35% 胃蛋白酶组成,按照对应的质量体积比分别称取试验所需 NaCl 和胃蛋白酶进行配制,用 1 mol/L 的 HCl 将配制好的人工胃液 pH 调整为 3.0,再用 0.22 μm 的滤膜过滤除菌备用^[25]。

(3) 模拟人工胃液试验:在超净工作台中吸取 5 mL 培养好的含菌培养基于 10 mL 无菌离心管中,经 3 000 r/min 离心 10 min,弃去上层培养基并收集菌体,加入等体积(5 mL)无菌生理盐水混匀制成菌悬液,然后取 1 mL 菌悬液与 9 mL pH 3.0 的人工胃液混匀,此时取 1 mL 上述混合液作为人工胃液处理 0 h 的样品,剩余 9 mL 混合液置于恒温水浴摇床(37 °C, 150 r/min)中培养 3 h。0 h 和 3 h 的样品分别经 10 倍梯度稀释,选择合适梯度采用平板涂布的方法测定活菌数(CFU/mL),在 MRS 固体培养基上 37 °C 培养 48 h,按式(2)计算存活率。

$$\text{存活率} = \frac{3\text{ h 活菌数}}{0\text{ h 活菌数}} \times 100\% \quad (2)$$

1.2.5 数据处理 各项试验重复 3 次,数据通过 Excel 处理后,以“平均值±标准偏差”来表示;图表由 Origin 8.0 软件绘制。

2 结果与分析

2.1 菌株形态结构

从泡菜样品中分离得到 5 株乳酸杆菌,编号分别为 E-6-1(*Lactobacillus plantarum*)、C-2-1(*Lactobacillus alimentarius*)、E-1-2(*Lactobacillus plantarum*)、E-6-3(*Lactobacillus plantarum*)、D-2-3(*Lactobacillus plantarum*)。菌株纯化完成后,MRS 固体培养基上有单菌落出现,且菌落形态几乎一致,菌落呈白色或乳白色,表面光滑湿润,边缘整齐,形状为圆形,菌株形态特征见图 1。

菌落细胞经革兰氏染色镜检呈阳性,过氧化氢酶试验呈现阴性,形态有长杆状、短杆状,符合乳酸菌细胞形态特征,在 100 倍油镜下,菌株细胞形态见图 2。

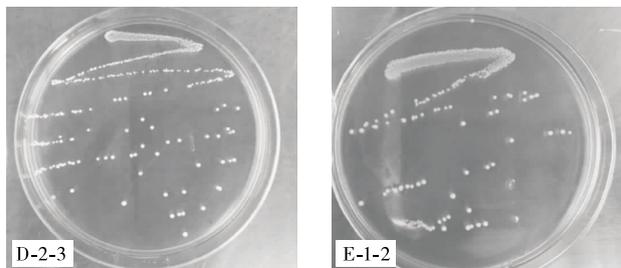


图 1 乳酸菌菌落形态

Figure 1 Colony morphology of *Lactobacillus*

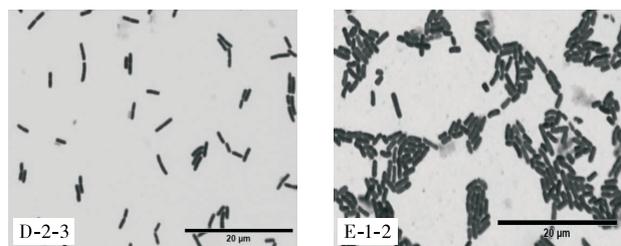
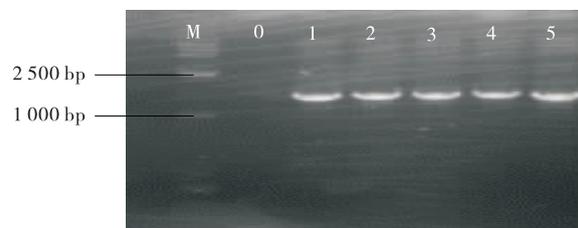


图 2 乳酸菌菌落形态革兰氏染色结果

Figure 2 Gram staining results of *Lactobacillus*

2.2 乳酸菌 16S rDNA 序列 PCR 扩增

以提取的菌株 DNA 为模板,经 PCR 扩增后直接采用琼脂凝胶电泳进行检测,结果见图 3。由图 3 可知,阴性对照无条带,说明 PCR 扩增过程中未被污染。1~5 条带清晰无拖尾现象,整个条带位于 1 000~2 500 bp,符合乳酸菌的预期扩增片段长度。



M, 15 000 bp DNA Ladder 0, 阴性对照组 1~5, 分别代表编号为 E-6-1、C-2-1、E-1-2、E-6-3、D-2-3 的菌株

图 3 乳酸菌 PCR 扩增产物 16S rDNA 琼脂糖凝胶电泳图

Figure 3 Agarose gel electrophoresis of 16S rDNA-PCR products from *Lactobacillus*

2.3 PCR 扩增产物测序与 Gene Bank 分析种属

表 1 为测序成功的 5 株乳酸杆菌经 BLAST 程序比对分析的结果。结果表明,5 株菌全部鉴定成功,与 Gene Bank 数据库中已知乳酸菌的同源性均达 99% 及以上。

2.4 系统发育分析

由图 4 可知,5 株乳酸菌均属于乳杆菌属。C-2-1 以自举支持率 100% 与消化乳杆菌(*Lactobacillus alimentarius*)处于同一个分支上,说明二者亲缘关系较近,可将其归为 *Lactobacillus alimentarius*。E-6-1、E-2-1、D-2-3 和 E-6-3 以自举支持率 99% 与植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)聚在同一个分支上,因此可将这 4 株菌归为 *Lactobacillus*

表1 5株菌的16S rDNA序列分析结果

Table 1 Analysis of 5 strains by 16S rDNA sequences

菌株编号	拉丁菌名	中文名	同源性/%	Gene Bank 登录号
E-6-1	<i>LactoLactobacillus plantarum</i>	植物乳杆菌	99	KP763916.1
C-2-1	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	消化乳杆菌	99	HM130538.1
E-1-2	<i>LactoLactobacillus plantarum</i>	植物乳杆菌	100	KY484772.1
E-6-3	<i>LactoLactobacillus plantarum</i>	植物乳杆菌	99	KP763916.1
D-2-3	<i>LactoLactobacillus plantarum</i>	植物乳杆菌	99	KY078792.1

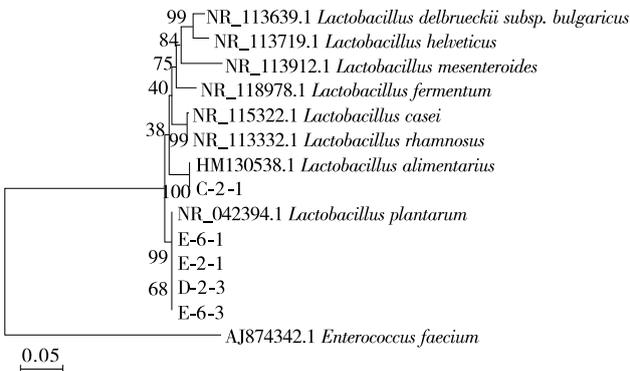


图4 菌株系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of the strains

lus plantarum。由此可知,系统发育树分析结果与16S rDNA序列分析结果一致。

2.5 乳酸菌对人工胃液的耐受性

当进食时,人胃部的pH通常维持在3.0左右^[26],食物在胃中停留时间较短,一般1~3h^[27]。所以本试验选择pH 3.0的人工胃液来测试5株乳酸菌在其中处理3h后的存活率,见表2。

由表2可知,5株乳酸菌在pH 3.0的人工胃液中的存活率存在较大差异,E-6-1、C-2-1、E-1-2、D-2-3均可在pH 3.0的人工胃液中存活,其中E-6-1在0h人工胃液中的活菌数为 2.10×10^7 CFU/mL,人工胃液处理3h后的活菌数为 4.50×10^5 CFU/mL,C-2-1和E-1-2在pH 3.0的人工胃液中处理0h的活菌数分别为 3.16×10^7 , 4.47×10^7 CFU/mL,3h后的活菌数分别为 2.73×10^6 , 8.67×10^6 CFU/mL。而E-6-3在0h人工胃液中的活菌数为 2.21×10^7 CFU/mL,经3h人

表2 乳酸菌耐受人工胃液试验[†]

Table 2 Resistance of lactic acid bacteria to artificial gastric juice

菌株编号	0 h 菌数/ (CFU · mL ⁻¹)	3 h 菌数/ (CFU · mL ⁻¹)	存活率/%
E-6-1	2.10×10^7	4.50×10^5	2.19 ± 0.22
C-2-1	3.16×10^7	2.73×10^6	8.68 ± 0.93
E-1-2	4.47×10^7	8.67×10^6	26.00 ± 8.66
E-6-3	2.21×10^7	—	—
D-2-3	1.33×10^7	1.26×10^7	95.38 ± 9.87

† “—”表示未生长。

工胃液处理后,在MRS固体培养基上并无活菌生长,说明其耐受人工胃液的能力很差。与以上4株菌不同的是,D-2-3在0h人工胃液中的活菌数为 1.33×10^7 CFU/mL,人工胃液处理3h后的活菌数为 1.26×10^7 CFU/mL,存活率高达95.38%,说明其耐人工胃液的能力较好。

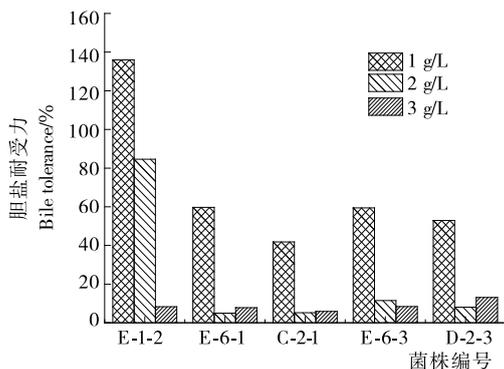
2.6 乳酸菌在不同胆盐浓度下的生长效率

人体中胆盐浓度处于0.3~3.0 g/L^[28],益生性乳酸菌的一个重要特性是对小肠中的胆汁有一定的耐受能力^[29]。故本研究采用0,1,2,3 g/L的胆盐浓度测试菌株在胆盐中的存活率。

由图5可知,5株乳酸菌在含不同浓度胆盐的MRS培养基中均可生长,但不同浓度下生长效率存在较大的差异。在1 g/L的胆盐培养基中,5株菌的生长效率均在40%以上,其中E-2-1在1 g/L的胆盐中生长不但未受到抑制,而且生长效率高达135.97%。随着胆盐浓度上升到2 g/L,乳酸菌的生长效率出现骤降的趋势,除了E-1-2的生长效率为84.59%外,其他4株菌的生长效率都处于20%以下。当胆盐浓度达到3 g/L后,与2 g/L相比,各菌株的生长效率下降并不明显,其中E-6-1、C-2-1和D-2-3在3 g/L胆盐培养基的生长效率反而高于在2 g/L胆盐培养基中的,而且D-2-3的生长效率最高(13.10%)。目前,已有诸多关于乳酸菌耐胆盐机制的研究报道^[30-31],有研究^[30]称其耐受性主要与自身的表层蛋白、胆盐水解酶有关。但确切机制尚不清楚。

3 结论

从泡菜样品中分离纯化得到5株乳酸菌,其中4株为植物乳杆菌(*LactoLactobacillus plantarum*)、1株为消化乳杆



The number of the strains

图5 乳酸菌在胆盐中的生长效率

Figure 5 Growth efficiency of lactic acid bacteria in bile

菌(*Lactobacillus alimentarius*)。经 16S rDNA 鉴定,4 株植物乳杆菌与 Gene Bank 数据库中已有的植物乳杆菌有 99% 的同源性,而消化乳杆菌与已有菌株的同源性高达 100%。对 5 株菌进行耐胆盐和耐人工胃液试验,结果表明菌株编号为 D-2-3 的植物乳杆菌有较好的益生性,在人工胃液处理 3 h 后的存活率达到了 95.38%,在胆盐中能较好的生长。消化乳杆菌不仅可以作为蔬菜和肉制品的发酵剂,还具有降胆固醇、抗养化、清除展青霉素等益生性能,因此后续可对该菌株进行发酵性能、体外降胆固醇以及清除真菌毒素方面的研究。

参考文献

- [1] 巨晓英,韩焯,周志江. 自然发酵泡菜中乳酸菌的分离鉴定[J]. 食品与机械, 2008, 24(5): 29-31.
- [2] 赵立彬. 优势菌种筛选与接种发酵提升泡菜营养品质及益生性的研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2010: 9-17.
- [3] SULAIMAN N B, ARIEF I I, BUDIMAN C. Characteristic of Lamb Sausages Fermented by Indonesian Meat-Derived Probiotic, *Lactobacillus plantarum* IIA-2C12, and *Lactobacillus acidophilus* IIA-2B4 [J]. *Journal of Animal Science*, 2016, 39(2): 104-111.
- [4] LIU Pei, SHEN Sheng-rong, RUAN Hui, et al. Production of conjugated linoleic acids by *Lactobacillus plantarum* strains isolated from naturally fermented Chinese pickles[J]. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 2011, 12(11): 923-930.
- [5] 穆琳. 产 γ -氨基丁酸乳酸菌的研究与应用[D]. 杭州: 浙江大学, 2008: 16-40.
- [6] 淮骏. 广谱乳酸菌素产生菌的筛选及其发酵研究[D]. 合肥: 安徽大学, 2011: 9-19.
- [7] 汤伟,胡维,王菁蕊,等. 消化乳杆菌泡菜分离株 W369 的鉴定及其益生功能[J]. *微生物学报*, 2016, 56(6): 932-942.
- [8] 武运,李远,王冰峰,等. 新疆骆驼乳中细菌素乳酸菌的筛选及其抑菌性[J]. *食品与机械*, 2011, 27(3): 25-28.
- [9] 刘文群,黄丽婵,韩伟,等. 乳酸菌同时富集硒铬锌的初步研究[J]. *食品与机械*, 2007, 23(2): 41-42.
- [10] 刘慧,熊利霞,易欣欣,等. 藏灵菇中高产胞外多糖乳酸菌的筛选及其发酵性能的研究[J]. *食品科学*, 2007, 28(5): 211-215.
- [11] 范丽平,王亚峰,霍贵成. 产胞外多糖乳酸菌的鉴定及发酵性能研究[J]. *食品与机械*, 2010, 26(3): 14-17.
- [12] 李利,孔丽,张宁,等. 耐酸耐胆盐乳酸菌的鉴定及筛选[J]. *食品科学*, 2015, 36(21): 123-128.
- [13] GOPAL P K, PRASAD J, SMART J, et al. In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 67(3): 207-216.
- [14] 辛羚,郭本恒,吴正钧. 3 株乳杆菌在模拟消化环境中存活性能的研究[J]. *中国乳品工业*, 2005, 33(5): 15-17.
- [15] PENNACCHIA C, ERCOLINI D, BLAIOTTA G, et al. Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics [J]. *Meat Science*, 2004, 67(2): 309-317.
- [16] LIONG M T, SHAH N P. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains[J]. *Journal of Dairy Science*, 2005, 88(1): 55-66.
- [17] 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.
- [18] 白友菊. 传统发酵型泡菜中乳酸菌的分离筛选及直投式发酵剂的制备[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016: 12-31.
- [19] 张小美,楼秀玉,顾青. 1 株产细菌素乳酸菌的鉴定和细菌素的分离纯化[J]. *中国食品学报*, 2013, 13(12): 181-187.
- [20] 张丽霞,黄开红,周剑忠. 国外开菲尔粒中乳酸菌的分离纯化与鉴定研究[J]. *江西农业学报*, 2008, 20(5): 85-87.
- [21] 田国军,尚艳艳,黄泽元. 腊鱼中优势乳酸菌的分离、纯化及性质鉴定[J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37(6): 78-81.
- [22] 赵辉,蔺善喜,王葳,等. 低高级醇啤酒酵母的选育及中试发酵[J]. *食品工业科技*, 2011(10): 242-244.
- [23] 丛敏,李欣蔚,武俊瑞,等. PCR-DGGE 分析东北传统发酵酸菜中乳酸菌多样性[J]. *食品科学*, 2016, 37(7): 78-82.
- [24] 张和平,孟和毕力格,王俊国,等. 分离自内蒙古传统发酵酸马奶中 *L. casei* Zhang 潜在益生特性的研究[J]. *中国乳品工业*, 2006, 34(4): 4-10.
- [25] 赵欣,骞宇. 牦牛酸乳分离发酵乳杆菌发酵豆浆的胃溃疡预防效果研究[J]. *食品科学*, 2014, 35(17): 236-240.
- [26] PEREIRA D I, GIBSON G R. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2002, 68(9): 4 689-4 693.
- [27] 姜叙诚,袁耀宗,徐家裕,等. 消化系统[M]. 上海: 上海交通大学出版社, 2010: 57-59.
- [28] 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.
- [29] TIGU F, ASSEFA F, MEHARI T, et al. Probiotic property of lactic acid bacteria from traditional fermented condiments: Datta and Awaze [J]. *International Food Research Journal*, 2016, 23(2): 770-776.
- [30] 吕源玲. 耐酸耐胆盐益生乳酸菌的筛选与鉴定[J]. *食品与机械*, 2017, 33(6): 42-45.
- [31] 冯秀娟,左芳雷,陈丽丽,等. 乳酸菌耐酸耐胆盐分析与胆盐水解酶研究[J]. *中国食品学报*, 2013, 13(11): 139-147.