

唾液链球菌 BD3900 作为口腔益生菌的特性

Characteristics of *Streptococcus salivarius* BD3900 as an oral probiotics

于亚男^{1,2} 吴正钧^{2,3} 韩 璠^{3,4}

YU Ya-nan^{1,2} WU Zheng-jun^{2,3} HAN Jin^{3,4}

(1. 乳业生物技术国家重点实验室, 上海 200436; 2. 上海乳业生物工程技术研究中心, 上海 200436;
3. 光明乳业股份有限公司乳业研究院, 上海 200436; 4. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

(1. State Key Laboratory of Dairy Biotechnology, Shanghai 200436, China; 2. Shanghai Engineering Research Center of Dairy Biotechnology, Shanghai 200436, China; 3. Dairy Research Institute, Bright Dairy & Food Co., Ltd., Shanghai 200436, China; 4. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

摘要:从口腔中分离得到一株唾液链球菌 BD3900, 在体外试验中发现, 该菌具有极强疏水作用(95.8%)和静电作用(表面电荷量 $\geq 88.6\%$)有利于黏附于口腔中, 能耐受 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶菌酶, 存活能力较强; 具有较高的自聚性(15%~20%)及与变形链球菌(*Streptococcus. mutans*)的共聚作用, 在蔗糖存在时, 与变形链球菌共聚率高达 64.3%; 与变形链球菌共培养时, 可以抑制变形链球菌生物膜的形成, 抑制率为 67.1%。说明 BD3900 是一株具有预防龋齿潜力的口腔益生菌。

关键词:唾液链球菌; 变形链球菌; 生物膜; 龋齿; 益生菌

Abstract: Interactions between *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus mutans* play important roles in the development of dental biofilms in oral cavity. *S. salivarius* BD3900, isolated from the oral cavity of a healthy volunteer, displayed the potential to be an oral probiotics *in vitro*. Strong hydrophobicity (95.8%) and high surface charges ($\geq 88.6\%$) endure the strain to be easily adhered in oral cavity. The strain BD3900 was tolerant to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lysozyme (2.0 $\times 10^4$ U/mg), indicating the high ability for the strain to survive in oral cavity. Besides, the strain was determined to be with high auto-aggregating ability (15%~20%) as well as co-aggregating ability with *Streptococcus mutans* in the presence of sucrose at a concentration dependant manner, with a highest co-aggregation rate of 64.3% at a sucrose level of 5 g/100 mL, while no obvious effect of sucrose was observed on the auto-aggregation of the strain BD3526. Furthermore, when co-cultured with the strain BD3900, the formation of *S. mutans* biofilm could be reduced by 67.1%. Therefore, the strain

S. salivarius BD3900 is a candidate of oral probiotics with potential in prevention of dental caries.

Keywords: *Streptococcus salivarius*; *Streptococcus mutans*; biofilm; dental carie; probiotics

目前, 龋齿是普遍存在于儿童和成人中的一种慢性口腔传染病^[1], 其成因与变形链球菌(*Streptococcus mutans*)在牙齿表面的定殖有密切的联系。牙菌斑生物膜的形成是致龋的关键, 因此, 减少或抑制生物膜的形成是防治龋齿的重要途径。抗生素是目前治疗和预防龋齿的主要方法, 但长期使用抗生素容易导致耐药菌株的产生, 导致疗效降低及其潜在的感染风险。

益生菌可以治疗和减缓多种肠道炎症、尿道感染和呼吸道疾病, 并且具有较高的安全性。Stensson M 等^[2]将 113 位 6 岁儿童分成 2 组, 其中 60 位摄入罗伊氏乳杆菌(*Lb.ruteri*) ATCC 55730, 53 位给予安慰剂, 结果发现服用益生菌儿童组龋齿发生的比例较低。郭夏蕾等^[3]发现植物乳杆菌(*Lb.plantarum*)K25 不仅对变形链球菌菌膜有较高的抑制率, 还显著降低变形链球菌的黏附率。因此, 通过筛选特定的益生菌, 可以达到防治龋齿的目的。

唾液链球菌(*Streptococcus salivarius*)是婴儿出生后最先定殖在口腔中的乳酸菌之一^[4], 是健康成人口腔中典型的共生菌群。本试验所用供试菌株 *S.salivarius* BD3900 (CG-MCC13308) 来自健康志愿者口腔, 通过体外试验, 分析了 BD3900 作为预防口腔疾病益生菌的潜质。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

变形链球菌(*S.mutans* CGMCC1.2499): 中国普通微生物保藏中心;

基金项目:上海乳业生物工程技术研究中心资助(编号:16DZ2280600)
作者简介:于亚男, 女, 上海海洋大学在读硕士研究生。
通信作者:吴正钧(1955—), 男, 光明乳业股份有限公司教授级高级工程师, 硕士。E-mail: wuzhengjun@brightdairy.com
收稿日期:2017—06—05

唾液链球菌 BD3900 (*S. salivarius* CGMCC13308): 乳业生物技术国家重点实验室;

BHI 培养基、M17 培养基: 英国 OXOID 公司;
TPY 合成培养基: 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;

胰酪蛋白胨、酵母提取物: 上海拜力生物科技有限公司;

L-胱氨酸: 上海阿拉丁生化科技股份有限公司;
Na₂HPO₄、NaH₂PO₄、NaCl、C₁₂H₂₂O₁₁、CH₃COONa、Na₂SO₄、99%乙醇、结晶紫试剂、二甲苯、乙酸乙酯、氯仿: 分析纯, 上海国药集团化学试剂有限公司。

1.1.1.2 主要仪器设备

高压蒸汽灭菌锅: HVE-50 型, 日本 Hirayama 公司;
超净工作台: TH-CB-402 型, 英国 Labconco 公司;
厌氧培养箱: Bug Box DUAL 型, 英国 Jouan S.A 公司;
电子天平: XW-80A 型, 上海青浦沪西仪器厂;
酶标仪: Spectra M5 型, 美国 Molecular Devices 公司;
小型冷冻离心机: 5417R 型, 德国 Eppendorf 公司;
pH 计: PHS-25 型, 美国奥立龙公司;
全自动生长曲线分析仪: Bioscreen C 型, 上海谓载商贸发展有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菌落形态与细胞观察 将 BD3900 划线接种于 M17 固体培养基上, 37 ℃ 厌氧培养 48 h, 观察单菌落形态。挑取单菌落进行革兰氏染色, 于显微镜下观察菌体形态。

1.2.2 菌体的制备 将新活化的 BD3900 和 *S. mutans* 分别接种于 M17 和 BHI 液体培养基中, 37 ℃ 静置培养 24 h, 4 ℃、10 000×g 离心 20 min, 取菌体。用 pH 6.8 的无菌磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次, 最后将菌体悬浮于少量 pH 6.8 的 PBS 中, 备用。

1.2.3 唾液链球菌 BD3900 最适培养基筛选 调节 BD3900 活菌数约为 10⁶ CFU/mL, 取 50 μL 该菌液于 96 孔板, 分别加入 200 μL M17、TYC、BHI 或 TPY 培养基, 37 ℃ 静置培养 24 h。用微生物全自动生长曲线分析仪每隔 1 h 测一次 OD_{600 nm} 值, 每组设置 3 个平行孔, 试验重复 2 次。

1.2.4 唾液链球菌 BD3900 最适培养温度 挑取新鲜培养的 BD3900 菌体于 M17 液体培养基中, 调整其初始的 OD_{600 nm} = 0.10 ± 0.01, 分别置于 37, 42, 45 ℃ 水浴中培养, 每隔 2 h 测 OD_{600 nm} 吸光值, 每个温度设置 3 个平行, 试验重复 2 次。

1.2.5 唾液链球菌 BD3900 疏水作用力 用 pH 6.8 PBS 调节 BD3900 菌悬液至 OD_{600 nm} = 0.6, 向上述菌悬液(3 mL)加入疏水溶剂二甲苯(1 mL), 静置 5 min, 充分振荡 120 s, 再静置 10 min, 取水相测其 OD_{600 nm} 值。疏水率按式(1)计算:

$$H = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%, \tag{1}$$

式中:
H——疏水率, %;
A₀——BD3900 菌悬液初始吸光值;

A₁——静置后的水相吸光值。

1.2.6 唾液链球菌 BD3900 表面电荷 以乙酸乙酯作为路易斯碱, 氯仿作为路易斯酸^[5], 按照 1.2.5 的方法测定。

1.2.7 唾液链球菌 BD3900 对溶菌酶的耐受性 调节 BD3900 活菌数约为 10⁸ CFU/mL, 取 50 μL 该菌液、200 μL M17 液体培养基分别加入不同浓度的溶菌酶(20 000 U/mg)溶液, 使溶菌酶的终浓度分别为 0, 50, 75, 100, 125, 150 μg/mL, 37 ℃ 培养 24 h。用微生物全自动生长曲线分析仪每隔 1 h 测一次 OD_{600 nm} 值, 每组设置 3 个平行孔, 试验重复 2 次。

1.2.8 BD3900 的溶血性 向融化后冷却至 45 ℃ 的 M17 固体培养基中加入 5 mL/100 mL 马血, 倒平板, 待其凝固后, 将新鲜培养的 BD3900 菌体划线于血琼脂平板上, 37 ℃ 厌氧培养 48 h, 观察是否产生溶血圈。

1.2.9 唾液链球菌 BD3900 的自聚能力 调节 BD3900 菌悬液菌浓使其 OD_{600 nm} = 0.6, 37 ℃ 分别静置 2, 4 h, 检测其上层液体的 OD_{600 nm} 值。自凝集率按式(2)计算:

$$S = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100\%, \tag{2}$$

式中:
S——自凝集率, %;
A₀——BD3900 菌悬液初始吸光值;
A_t——静置 *t* h 后 BD3900 菌悬液上层液体的吸光值。

1.2.10 唾液链球菌 BD3900 和变形链球菌的共聚能力 调节 BD3900 和 *S. mutans* 菌悬液菌浓, 使其 OD_{600 nm} = 0.6, 等比例混合, 用涡旋振荡器混合均匀后立即测混合后的 OD_{600 nm} 值, 37 ℃ 分别静置 2, 4 h, 检测其上层液体的 OD_{600 nm} 吸光值^[6]。共凝集率按式(3)计算:

$$C = \frac{A_{0\text{mix}} - 2A_{\text{mix}}}{A_{0\text{mix}}} \times 100\%, \tag{3}$$

式中:
C——共凝集率, %;
A_{0mix}——0 h 混合菌悬液吸光值;
A_{mix}——*t* h 后混合菌悬液上层液体的吸光值。

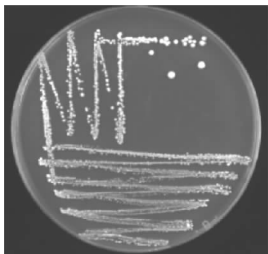
1.2.11 唾液链球菌 BD3900 对 *S. mutans* 生物膜形成的影响 将 Barira Islam 等^[7]的方法进行部分改良, 具体操作步骤: 将 *S. mutans* 和 BD3900 菌悬液的菌浓调整为 10⁵ CFU/mL, 各取 50 μL 于 96 微孔板中, 再加 100 μL BHI 液体培养基(含有 0.25% 蔗糖)共培养, 对照组将 BD3900 菌悬液以无菌生理盐水替代。将微孔板置于 37 ℃ 厌氧培养 24 h, 用去离子水将每个参与反应的微孔洗涤 3 次以上, 尽可能去除游离细菌, 倒扣微孔板, 待其自然干燥后, 向每孔加入 100 μL 0.5 g/L 的结晶紫溶液, 室温下染色 15 min, 使结合在板底部的生物膜着色; 除去染色液后, 用去离子水洗涤至不显染料颜色为止; 自然干燥后每孔加入 200 μL 无水乙醇使染料充分释放, 测其 OD_{600 nm} 值。

2 结果与分析

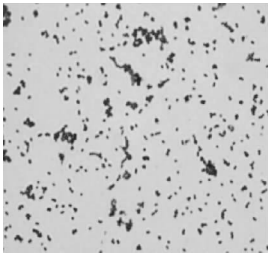
2.1 菌落和细胞形态观察

BD3900 在 M17 固体培养基上呈现白色、圆形的菌落形态, 表面光滑湿润, 边缘规则, 无色素产生[见图 1(a)]。革兰

氏染色后在油镜下观察,菌体形态为椭圆形,直径 1~2 mm,无芽孢,成单、成对或者成链存在,BD3900 的菌体形态[见图 1(b)],与文献[8]报道的结果基本一致。



(a) 菌落形态



(b) 菌体形态

图 1 *S. salivarius* BD3900 的菌落和菌体形态

Figure 1 Colonies and cell morphology of *S. salivarius* BD3900

2.2 BD3900 最适生长条件

将 BD3900 分别接种于不同的培养基,每隔 1 h 测定一次 $OD_{600\text{ nm}}$ 值,以培养时间为横坐标, $OD_{600\text{ nm}}$ 值为纵坐标绘制不同营养条件下的生长曲线,筛选最适生长培养基。由图 2 可知,BHI 和 M17 培养基最快进入生长指数期和稳定期,比其他培养基(TYC 和 TPY)提前了 3 h 以上,可能是 BHI 和 M17 培养基中含有某些可被菌体快速利用的物质,从而促进菌体先于其他培养基进入增殖阶段。但 BHI 培养基在菌株增殖效果方面不及 M17 培养基(最高 $OD_{600\text{ nm}}$ 为 0.8),BD3900 在 M17 培养基中生长状态显著优于其他培养基,其 $OD_{600\text{ nm}}$ 值最高可达 1.4,说明 M17 培养基营养全面而充足,有利于 BD3900 菌体的大量繁殖。因此,选择 M17 作为 BD3900 培养基。BD3900 接种于 M17 液体培养基后于 37,42,45 °C 水浴培养,每隔 2 h 测定发酵液的 $OD_{600\text{ nm}}$,最先达到 0.6 的温度即为最适生长温度。由图 3 可知,在培养前

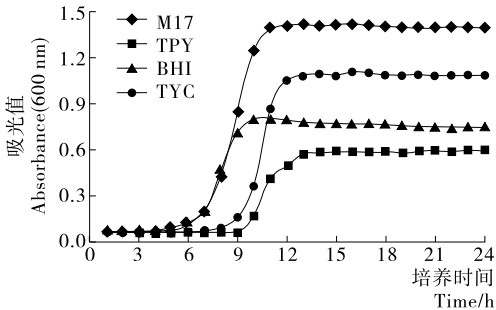


图 2 *S. salivarius* BD3900 在不同培养基中的生长曲线

Figure 2 Growth curve of *S. salivarius* BD3900 in different media

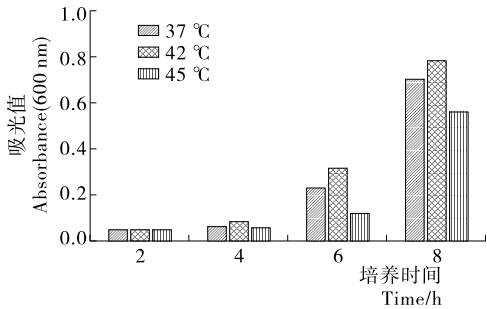


图 3 不同温度下 *S. salivarius* BD3900 的生长情况

Figure 3 The growth of *S. salivarius* BD3900 under different cultivation temperatures

期 BD3900 在各测试温度下均有不同程度的增加,培养至 8 h 时,37,42 °C 样品组的 $OD_{600\text{ nm}}$ 均达到 0.6,但 42 °C 样品组的 $OD_{600\text{ nm}}$ 值在各取样点始终高于 37 °C 样品组的,因此,BD3900 的最适生长温度为 42 °C。

2.3 BD3900 的溶血特性

微生物的安全性是 FAO/WHO 评价其应用潜质的考量因素之一,作为益生菌对宿主无害是首要前提。溶血性是衡量链球菌安全性的关键性指标,不同链球菌在血平板上的溶血现象主要有 α 型、 β 型、 γ 型三类。 α 型溶血:菌落周围呈现较窄的草绿色溶血环,此类菌称为 α 型溶血性链球菌,又叫草绿色链球菌; β 型溶血:菌落周围出现较宽的透明溶血环,这类菌能产生溶血素等毒素,致病性强,被称为 β 型溶血性链球菌; γ 型溶血:菌落周围无溶血环,故这类链球菌安全性最高,被称为不溶血链球菌。BD3900 在血平板上无溶血圈出现(见图 4),表明摄入菌株 BD3900 后,侵染宿主的风险较低,具有较高的安全性,符合食品应用的基本要求[5]。

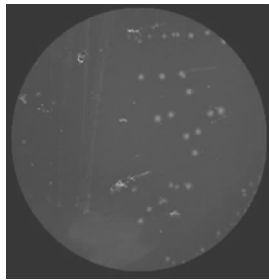


图 4 *S. salivarius* BD3900 的溶血作用

Figure 4 Hemolytic activity of *S. salivarius* BD3900 on blood agar

2.4 疏水作用和静电作用分析

在口腔中,益生菌通过特异性和非特异性方式黏附于口腔黏膜上,益生菌非特异黏附能力主要与静电、疏水和范德华力相关。由表 1 可知,BD3900 对非极性溶剂二甲苯黏附率高达 95.8%,说明其具有极强的表面疏水性。Handley 等[9]将由人体唾液分离出的 12 株唾液链球菌进行疏水性测试,发现它们都具有很强的疏水性(93.5%~95.2%)。此外,BD3900 还具有一定的静电作用力,对氯仿和乙酸乙酯表现高度的黏附性,分别为 88.6%和 99.6%,表明菌体表面携带大量可产生静电作用力的电荷。BD3900 所具备的较强的

表 1 *S. salivarius* BD3900 疏水性和表面电荷量

Table 1 Hydrophobicity and surface charge of <i>S. salivarius</i> BD3900			
<i>S. salivarius</i> BD3900	疏水率	酸电荷	碱电荷
百分比/%	95.8±1.2	99.6±0.1	88.6±2.4

疏水作用力和静电作用力,有助于其黏附于口腔黏膜表面,从而与病原菌竞争结合位点以发挥其益生特性。

2.5 对抗生素和溶菌酶的耐受性分析

溶菌酶是一类广泛存在于唾液、泪液、血清、淋巴等中能够选择性分解微生物细胞壁导致微生物死亡的非特异性免疫因子^[10]。测试 BD3900 对不同浓度溶菌酶的耐受性,由图 5 可知,当溶菌酶的终浓度为 50~100 μg/mL 时,与不加溶菌酶的对照组相比生长趋势无显著差异;当培养体系中溶菌酶的浓度达到 125 μg/mL 时,BD3900 进入对数期和稳定期的时间延长,该浓度的溶菌酶对 BD3900 开始发挥作用;而溶菌酶的浓度达到 150 μg/mL 时,BD3900 无明显生长迹象。Angmo 等^[11]在发酵食品中分离出 84 株乳酸菌,大部分的菌株都可以耐受 50 μg/mL 的溶菌酶,其中菌株标号 55 和 72 对 100 μg/mL 的溶菌酶具有较好的耐受性。BD3900 能够耐受 100 μg/mL 的溶菌酶,远高于人体口腔环境中常见的溶菌酶浓度(1~57 μg/mL)^[12],表明 BD3900 不仅能非特异性黏附于口腔黏膜表面,而且在口腔中具有良好的存活能力。

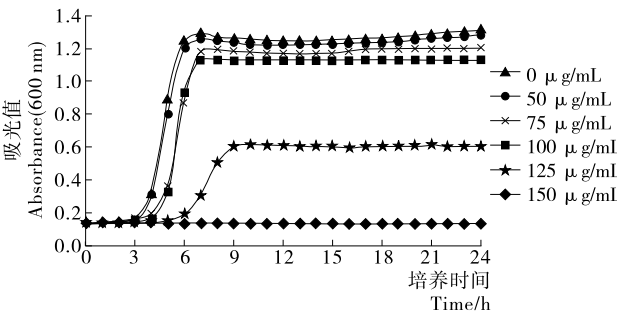


图 5 *S. salivarius* BD3900 对溶菌酶的耐受性
Figure 5 The tolerance of *S. salivarius* BD3900 to lysozyme

2.6 聚和共聚能力分析

Lang 等^[13]认为变形链球菌选择性的与益生菌共聚,有利于将浮游的变形链球菌从口腔中去除。从 624 株乳酸菌中筛选出 6 株与 *S. mutans* 具有共聚能力的菌株,并将其中一株共聚性能最好的副干酪乳杆菌 DSMZ16671 进行小鼠试验。研究^[14]发现,试验组小鼠龋齿的发生率明显低于对照组,表明其能够有效预防龋齿。也有人^[15]指出共聚能力强弱可以作为筛选预防龋病益生菌的一个补充指标,但是否具有应用潜力,还需要结合其他方面的性质来判断。除了共聚能力外,作为口腔益生菌还应具备一定的自聚能力,高自聚作用有利于益生菌在黏膜表面的定殖,不易于被唾液等流体冲刷,同时,高自聚作用有利于提高口腔中益生菌的浓度,使其更好地发挥功能^[16]。由图 6 可知,BD3900 的自聚和共聚能力与孵育时间均呈正相关,即孵育时间越长,BD3900 的聚

集能力(自聚和共聚能力)越强,在测试时间(4 h)内其自聚和共聚率最高可达 20.0%和 64.3%,由此可见,BD3900 菌株自身具有较高的自聚与共聚能力。由于蔗糖是公认的关键性致龋因素^[17],因此,本试验还考察了蔗糖浓度对 BD3900 的自聚能力以及与 *S. mutans* 共聚能力的影响。结果发现:① 蔗糖浓度对 BD3900 自聚作用无显著影响,各蔗糖水平下的自聚效果基本处于相同水平,可推测蔗糖不是介导其自聚的主要因素;② BD3900 与 *S. mutans* 的共聚作用随着蔗糖浓度的递增而加强,以 4 h 的共孵育样品为例,在不添加蔗糖的情况下 BD3900 与 *S. mutans* 共聚率仅为 13.1%,依次加入 0.25%,1.00%,2.00%,5.00%蔗糖后,2 株菌的共同聚集率也相应地攀升,分别达到 21.2%,42.0%,49.0%,64.3%。表明蔗糖是调控 BD3900 共聚效果的一个至关重要的环境因素。

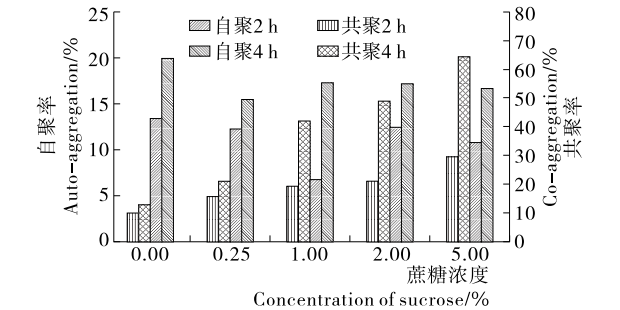


图 6 *S. salivarius* BD3900 的自聚集和共聚集能力
Figure 6 Auto-aggregation and co-aggregation of *S. salivarius* BD3900

2.7 抑制生物膜形成量

S. mutans 被公认为是口腔病原菌,其主要通过代谢口腔环境中的碳水化合物(主要为蔗糖),产生具有黏性的水溶性多糖和不溶性胞外多糖,这些多糖黏附在牙釉表面,成为 *S. mutans* 及其它细菌附着的介质,导致牙菌斑形成,牙菌斑中其他的细菌发酵产酸后引发龋齿。因此,减少 *S. mutans* 生物膜的生成量有利于减少这类致龋菌在口腔中的定殖,从而有助于预防龋齿的形成或缓解龋齿的症状。由图 7 可知,和对照组(*S. mutans* 单菌培养)相比,与 BD3900 共孵育的 *S. mutans* 的生物膜形成量显著降低(67.1%)。由此可见,BD3900 可以有效地遏制 *S. mutans* 的成膜量,具有潜在的抗致龋益生功效。

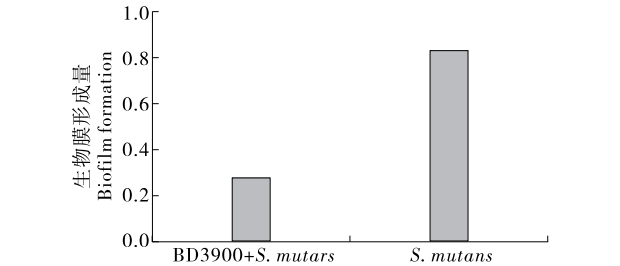


图 7 *S. salivarius* BD3900 对 *S. mutans* 生物膜形成的影响
Figure 7 Antagonistic activity of *S. salivarius* BD3900 on the formation of *S. mutans* biofilm

3 结论

BD3900 是一株新近分离自健康人体口腔的唾液链球菌,其最适的培养介质与培养温度分别为:M17 培养基、42 ℃。该菌株在血平板上呈 γ -型溶血,即无溶血圈出现,表明 BD3900 侵染宿主的风险较低。同时,该菌具有较强的疏水作用和静电作用,具有较好的口腔黏膜黏附能力。该菌对溶菌酶有一定耐受性,保证其在口腔环境中具有一定的存活性能。

BD3900 具有较强的自聚能力,可以避免在摄食后被唾液或者食物冲刷,提高其在口腔的定殖能力;与 *S. mutans* 共培养时,BD3900 表现出与 *S. mutans* 强烈的共聚作用,通过共聚体的形成,增加 *S. mutans* 随食物、唾液从口腔移除的几率;同时,BD3900 可以有效降低 *S. mutans* 生物膜的生成量,从而减少 *S. mutans* 的定殖作用与牙菌斑的形成,进而达到防龋、治龋的目的。因此,BD3900 具有作为口腔益生菌应用的潜力。

参考文献

[1] DYE B A, RAYMER R N, BARKER L K, et al. Overview and quality assurance for the oral health component of the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), 2005-08 [J]. Community Dentistry & Oral Epidemiology, 2007, 35(2): 140-151.

[2] MARIGO A, MAREGA C, ZANNETTI R, et al. Oral administration of Lactobacillus reuteri during the first year of life reduces caries prevalence in the primary dentition at 9 years of age[J]. Caries Research, 2014, 48(2): 111-117.

[3] 郭夏蕾, 张健, 杨贞耐. 抑制口腔变异链球菌的乳酸菌筛选及其抑菌机理[J]. 食品科学, 2016, 37(19): 117-122.

[4] KACIG, GOUDERCOURT D, DENNIN V, et al. Anti-inflammatory properties of Streptococcus salivarius, a commensal bacterium of the oral cavity and digestive tract[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2014, 80(3): 928-934.

[5] PERES C M, ALVES M, HERNANDEZ-MENDOZA A, et al. Novel isolates of lactobacilli from fermented Portuguese olive as potential probiotics [J]. LWT-Food Science and Technology, 2014, 59(1): 234-246.

[6] 姚沛琳. 乳酸菌抑制变异链球菌生物膜形成的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2015: 10.

[7] ISLAM B, KHAN S N, HAQUE I, et al. Novel anti-adherence activity of mulberry leaves: inhibition of Streptococcus mutans biofilm by 1-deoxynojirimycin isolated from Morus alba [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2008, 62(4): 751-757.

[8] STENFANI S. Use of streptococcus salivarius in the treatment of chronic infections of the respiratory tract: Italy, 20130095044 2011[P]. 2013-04-18.

[9] HANDLEY P S, HARTY D W, WYATT J E, et al. A comparison of the adhesion, coaggregation and cell-surface hydrophobicity properties of fibrillar and fimbriate strains of Streptococcus salivarius[J]. Journal of General Microbiology, 1987, 133(11): 3 207-3 217.

[10] 高景. 溶菌酶与口腔常见疾病关系研究进展[J]. 中国实用口腔科杂志, 2012, 5(9): 570-574.

[11] ANGMO K, KUMARI A, SAVITR I, et al. Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh [J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 66: 428-435.

[12] ZHOU Ju-fen. The level of lysozyme in saliva in the patients with oral candidosis[J]. Beijing Journal of Stomatology, 2003, 11(2): 97-103.

[13] LANG C, BÖTTNER M, HOLZ C, et al. Specific Lactobacillus/Mutans Streptococcus co-aggregation[J]. Journal of Dental Research, 2010, 89(2): 175-179.

[14] TANZER J M, THOMPSON A, LANG C, et al. Caries inhibition by and safety of Lactobacillus paracasei DSMZ16671[J]. Journal of Dental Research, 2010, 89(9): 921-926.

[15] TWETMAN L, LARSEN U, FIEHN N E, et al. Coaggregation between probiotic bacteria and caries-associated strains: an in vitro study[J]. Acta Odontologica Scandinavica, 2009, 67(5): 284-288.

[16] PERES C M, ALVES M, HERNANDEZ-MENDOZA A, et al. Novel isolates of lactobacilli from fermented Portuguese olive as potential probiotics[J]. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie, 2014, 59(1): 234-246.

[17] TSUMORI H, KURAMITSU H. The role of the Streptococcus mutans glucosyltransferases in the sucrose-dependent attachment to smooth surfaces: essential role of the GtfC enzyme[J]. Oral Microbiology & Immunology, 2010, 12(5): 274-280.

(上接第 12 页)

[31] 黄敏欣, 洪泽淳, 赵文红, 等. 红曲对广东客家黄酒发酵及产 γ -氨基丁酸的影响[J]. 中国酿造, 2016(10): 46-50.

[32] 田辉, 孙懿琳, 等. 高效液相色谱法测定酸奶中的四种有机酸[J]. 食品与机械, 2012, 28(5): 87-90, 158.

[33] 贾磊. 酵母与乳酸菌发酵特性研究及混合乳开菲尔的研制[D]. 天津: 天津科技大学, 2011: 29-30.

[34] 王定昌. 浅谈食品酵母的营养与生产应用[J]. 粮油食品科技, 2010, 18(2): 65-67.

[35] 廉桂芳, 谢婕, 赵欣, 等. 传统发酵牦牛酸乳的品质形成规律[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(5): 56-63.

[36] GADAGA H, MUTUKUMIRA A, NARVHUS J A. The growth and interaction of yeasts and lactic acid bacteria isolated from Zimbabwean naturally fermented milk in UHT milk[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 68(1/2): 21-32.

[37] HAUCK T, BRUHLMANN F, SCHWAB W. Formation of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3[2H]-furanone by Zygosaccharomyces rouxii: identification of an inter-mediate[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(7): 3 911-3 918.

[38] 雷华威, 陈晓红, 李伟, 等. 赛里木酸乳原籍菌种发酵乳主体风味成分分析[J]. 食品科学, 2013(20): 127-130.