

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2025.80007

乳酸片球菌 N8 的益生特性及高活性保护剂的筛选

赵 瑛^{1,2} 邹 苑^{1,2} 叶志伟^{1,2} 郭丽琼^{1,2} 林俊芳^{1,2}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东 广州 510640; 2. 广东省微生态制剂工程技术研究中心, 广东 广州 510640)

摘要: [目的] 研究食品源乳酸片球菌 N8 的生物学特性和体外益生功能, 制备高活性 ($>10^{12}$ CFU/g) 喷雾干燥益生菌制剂。[方法] 对分离自干酪的一株乳酸菌 (N8) 进行形态学和细菌 16S rDNA 基因序列分析鉴定, 通过生长特性、安全性、耐受性、抑菌能力、黏附能力以及抗氧化能力等确定其益生潜力, 并进行喷雾干燥制备益生菌制剂, 筛选出高活性喷雾干燥保护剂。[结果] 结合 16S rDNA 基因序列和形态学鉴定 N8 为乳酸片球菌。乳酸片球菌 N8 呈快速“S”型生长, 其益生特性为无溶血性, 对多种抗生素敏感, 上清液可以有效抑制多种致病菌的生长; 对热、pH、胆盐及模拟胃肠道液环境均表现出较强的稳定性, 具有较强的黏附能力。乳酸片球菌 N8 无细胞上清液和完整细胞悬液对 DPPH 自由基、ABTS 自由基和羟自由基均有较强的清除能力。其中, 以水牛奶、蛹虫草多糖、谷氨酸钠等物质为保护剂时, 乳酸片球菌制剂的活菌数均高达 10^{12} CFU/g。[结论] 乳酸片球菌 N8 是一株具有良好益生潜能的食物源乳酸菌, 以水牛奶、蛹虫草多糖、谷氨酸钠等作为喷雾干燥保护剂可制备出高活性益生菌制剂。

关键词: 乳酸片球菌; 益生特性; 抗氧化特性; 高活性; 喷雾干燥

Probiotic properties of *Pediococcus acidilactici* N8 and screening of high-viability protectants

ZHAO Ying^{1,2} ZOU Yuan^{1,2} YE Zhiwei^{1,2} GUO Liqiong^{1,2} LIN Junfang^{1,2}

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510640, China; 2. Guangdong Microecological Formulation Engineering Technology Research Center, Guangzhou, Guangdong 510640, China)

Abstract: [Objective] To investigate the biological characteristics and *in vitro* probiotic functions of the food-derived *Pediococcus acidilactici* N8, and to screen effective protectants for the preparation of high-viability ($>10^{12}$ CFU/g) spray-dried probiotic preparations. [Methods] A lactic acid bacterium (strain N8) isolated from cheese was identified through morphological analysis and 16S rDNA gene sequencing. Its probiotic potential was determined through tests on growth characteristics, safety, tolerance, antibacterial activity, adhesion ability, and antioxidant capacity. Spray drying was employed to prepare probiotic formulations, and high-viability spray-drying protectants were screened. [Results] Based on morphological characteristics and 16S rDNA gene sequence analysis, strain N8 was identified as *P. acidilactici*. It exhibited a rapid S-shaped growth curve and probiotic traits including non-hemolytic activity and sensitivity to multiple antibiotics. Its supernatant effectively inhibited the growth of various pathogenic bacteria. The strain showed strong stability under heat, varying pH levels, bile salts, and simulated gastrointestinal fluid conditions, and possessed strong adhesion ability. Both the cell-free supernatant and intact cell suspension of *P. acidilactici* N8 demonstrated strong scavenging abilities against DPPH, ABTS, and hydroxyl radicals. When buffalo milk, *Cordyceps militaris* polysaccharides, and sodium glutamate were used as protectants, the viable count of the probiotic preparation reached 10^{12} CFU/g. [Conclusion] *P. acidilactici* N8 is a food-derived lactic acid bacterium with good probiotic potential. Using buffalo milk, *C. militaris* polysaccharides, and sodium glutamate as spray-drying protectants can yield high-viability

基金项目: 广东省重点领域研发计划“营养健康食品创制”专项项目 (编号: 2022B0202050002); 国家自然科学基金项目 (编号: 32272785, 32072646)

通信作者: 邹苑 (1989—), 女, 华南农业大学食品学院副教授, 博士。E-mail: zouyuan@scau.edu.cn

林俊芳 (1962—), 男, 华南农业大学食品学院研究员, 博士。E-mail: linjf@scau.edu.cn

收稿日期: 2025-01-03 **改回日期:** 2025-08-01

引用格式: 赵瑛, 邹苑, 叶志伟, 等. 乳酸片球菌 N8 的益生特性及高活性保护剂的筛选[J]. 食品与机械, 2025, 41(10): 1-10.

Citation: ZHAO Ying, ZOU Yuan, YE Zhiwei, et al. Probiotic properties of *Pediococcus acidilactici* N8 and screening of high-viability protectants[J]. Food & Machinery, 2025, 41(10): 1-10.

probiotic preparations.

Keywords: *Pediococcus acidilactici*; probiotic properties; antioxidant properties; high-viability; spray drying

随着中国生活水平的提高以及健康饮食观念的普及,益生菌制剂因其具有丰富的营养价值和生理功能,受到广大消费者的青睐。益生菌为活的微生物,摄入足够量时,会给宿主带来健康益处^[1],如降低胆固醇、预防癌症、减轻乳糖不耐受、改善便秘和对抗胃肠道感染等^[2-6]。但由于其在热、pH 和氧气等环境压力下会失去活力,显著降低益生菌对宿主的健康益处^[7]。因此,筛选适用于益生菌制剂的乳酸菌株,对于提高益生菌制剂中的活菌数具有重要意义。

乳酸菌在肠道微生物群中占据主导地位,已被认为是安全且有效的益生菌。乳酸片球菌归属片球菌属,革兰氏染色呈阳性、不能形成芽孢、不能合成细胞色素、无运动性,属于兼性厌氧乳酸菌,细胞形态呈球形,不形成链状^[8]。有研究^[9]表明,乳酸片球菌具有潜在的益生价值。Jang 等^[10]研究了从韩国传统食品——发酵比目鱼中分离得到的乳酸片球菌 FS2 的益生特性以及口服给药对降低小鼠血液胆固醇的影响。结果表明,该菌株具有对酸和胆汁的高抵抗力、高水平的 DPPH 自由基清除能力、高肠道黏附率和对食源性病原体的良好抗菌活性;联合异麦芽低聚糖一起服用可以降低血液中的胆固醇水平。Jaiswal 等^[11]从传统发酵米粥分离得到的乳酸片球菌 UAMS,对酸和胆汁具有良好的耐受性,具备对结肠细胞的黏附性以及肠道中存在所需的疏水性,且还具备抑菌和抗癌特性。武真邑等^[12]研究表明,猪源乳酸片球菌 ZLP025 耐受 pH 3~10,具有较好的耐酸碱性以及产乳酸性能,能显著抑制猪源大肠杆菌且其发酵上清液还能有效抑制猪源大肠杆菌生物膜的形成,具有良好的应用潜力。

喷雾干燥技术操作简单、耗时少,适合连续化生产,被认为是生产益生菌制剂的一种有前景的方法^[13]。喷雾干燥过程中,益生菌细胞会遭受到不同的压力,引起菌株的细胞膜完整性受损,蛋白质变性,酶失去活力,核糖体和 RNA 等大分子稳定性降低,从而使菌粉活菌数降低几个数量级^[14]。Tirta 等^[15]以不同比例的乳清分离蛋白和阿拉伯胶作为乳酸片球菌的包埋材料进行喷雾干燥,活细胞数减少了 0.58~1.11 log(CFU/g)。

研究拟以乳酸片球菌 N8 为研究对象,测定其生长特性、安全性、耐受性、抑菌能力、黏附能力以及抗氧化能力等,同时针对喷雾干燥过程中益生菌活性易受损的问题,探索并筛选出最佳的高活性保护剂配方,为益生菌制剂的大规模生产和广泛应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

山羊奶、水牛奶:市售;

胰酶(猪胰,酶活 250 U/mg)、胃蛋白酶(猪胃黏膜,酶活 30 000 U/g)、猪胆盐(胆酸含量≥60%)、乳清蛋白、抗坏血酸、抗坏血酸钠、低聚果糖、低聚异麦芽糖、低聚木糖:上海源叶生物科技有限公司;

药敏片:常德比克曼生物有限公司;

哥伦比亚血平板、革兰氏染色试剂盒、牛肉浸膏、酵母粉:广东环凯生物科技有限公司;

脱脂乳粉:北京索莱宝科技有限公司;

灵芝多糖、杏鲍菇多糖、蛹虫草多糖:陕西荣林生物科技有限公司;

谷氨酸钠、大豆分离蛋白:山东齐鲁生物科技有限公司;

谷胱甘肽、酪蛋白胨、DPPH、ABTS、七水硫酸镁、磷酸氢二钾:上海麦克林生化科技有限公司;

柠檬酸氢二铵:天津市大茂化学试剂厂;

二甲苯、氯化钠、无水葡萄糖、乙酸钠、一水合硫酸锰、吐温-80:广州化学试剂厂;

无水乙醇:天津康科德科技有限公司;

乳酸片球菌 N8(*Pediococcus acidilactici* N8):分离自干酪,由实验室早期分离并保存;

肠出血大肠杆菌、单增李斯特菌、副溶血性弧菌、鼠伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌等致病菌:均保藏于实验室。

1.1.2 仪器与设备

小型喷雾干燥机:OM-1500A 型,上海欧蒙实业有限公司;

PCR 仪:ETC811 型,北京东胜创新生物科技有限公司;

核酸电泳仪:EPS-300 型,上海天能科技有限公司;

台式高速离心机:5804 R 型,德国 Eppendorf 公司;

生化培养箱:LRH-70 型,上海一恒科学仪器公司;

光学显微镜:CX41 型,日本 Olympus 公司;

高压蒸汽灭菌锅:YXQ5 型,江阴滨江医疗设备有限公司;

菌落计数器:XK97-A 型,邦西仪器科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株 16S rDNA 基因 PCR 鉴定 采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒进行提取,利用通用引物 27F 和 1492R 进行 PCR 扩增。随后送至友康生物进行 16S rDNA 测序。

1.2.2 菌株活化 用接种环蘸取一环保藏于一 80℃超低温冰箱的菌液,于 MRS 琼脂平板上划线,37℃倒置培养 24~48 h 以筛选出形态完整的单菌落。将单菌落接种到经灭菌处理的 MRS 液体培养基中,37℃培养 24 h,按照 2%(体积分数)的接种量活化后,以 5%的接种量进行扩

大培养。为保证菌株纯度,采用光学显微镜观察传代期间的微生物形态。

1.2.3 生长特性曲线测定 每隔 2 h 取活化好的菌液,测定 600 nm 处吸光度值(OD)、pH 以及活菌数,确定该菌株的生长特性。

1.2.4 安全性评价

(1) 溶血性:将活化好的乳酸片球菌和金黄色葡萄球菌分别划线接种于哥伦比亚血琼脂平板上,37 °C 培养 48 h。

(2) 抗生素敏感性试验:取 10 mL 活化好的乳酸片球菌菌液,倒入不烫手的 MRS 琼脂培养基中,随后倒入平板中,待培养基吹干后,用无菌镊子将抗生素药敏片轻轻压在并紧贴培养基表面静置 30 min,每种药敏片设置 3 个平行。37 °C 孵育培养 48 h,测定抑菌圈直径。评价标准参照美国临床与实验室标准协会(CLSI)发布的抗微生物药敏感试验执行标准^[16]。

1.2.5 耐受性分析

(1) 耐热性:将活化好的乳酸片球菌菌液分别于 37, 50, 60, 70, 80 °C 水浴锅中进行热处理,每隔 5 min 进行一次取样。采用梯度稀释涂布平板法,37 °C 培养 48 h 后测定活菌数。按式(1)计算存活率。

$$S_r = \frac{N_r}{N_0} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

S_r ——存活率,%;

N_r ——热处理后的活菌数,CFU/mL;

N_0 ——热处理前的活菌数,CFU/mL。

(2) 耐酸性:将活化好的乳酸片球菌菌液分别接种于 pH 2.5, 3.0, 3.5 的灭菌 MRS 液体培养基中,37 °C 培养 1, 3 h,采用梯度稀释涂布平板法,37 °C 培养 48 h 后测定其活菌数。按式(2)计算存活率。

$$S_s = \frac{N_s}{N_0} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

S_s ——存活率,%;

N_s ——酸处理后的活菌数,CFU/mL;

N_0 ——初始活菌数,CFU/mL。

(3) 耐胆盐:将活化好的乳酸片球菌菌液分别接种于质量分数为 0.1%, 0.2%, 0.3% 含猪胆盐的 MRS 液体培养基中,37 °C 培养 2 h。采用梯度稀释涂布平板法,37 °C 培养 48 h 后计算活菌数。按式(3)计算存活率。

$$S_d = \frac{N_d}{N_0} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

S_d ——存活率,%;

N_d ——胆盐处理后的活菌数,CFU/mL;

N_0 ——初始活菌数,CFU/mL。

(4) 模拟胃肠液耐受性:参照蔡文静^[17]的方法配制人工模拟胃肠液。将活化好的乳酸片球菌菌液用 0.85% 生理盐水洗涤两次后重悬,然后接种到模拟胃液中,使溶液终浓度为 10^8 CFU/mL。37 °C 孵育 3 h,采用梯度稀释涂布平板法,37 °C 培养 48 h 后计算活菌数。将 1 mL 模拟胃液培养物接种到 9 mL 模拟肠液中,37 °C 孵育 4 h,采用梯度稀释涂布平板法,37 °C 培养 48 h 后计算活菌数。按式(4)存活率。

$$S_m = \frac{N_m}{N_0} \times 100\%, \quad (4)$$

式中:

S_m ——存活率,%;

N_m ——在模拟胃液/肠液中处理不同时间的活菌数,CFU/mL;

N_0 ——初始活菌数,CFU/mL。

1.2.6 抑菌能力测定 制备 LB 琼脂平板,待其凝固后,用无菌镊子在其表面均匀放置 4 个无菌牛津杯(内径 6 mm、外径 8 mm、高 10 mm),分别取 1 mL 菌悬液终浓度为 10^7 CFU/mL 的金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌、鼠伤寒沙门氏菌、副溶血性弧菌和肠出血大肠杆菌 5 种致病菌加入到冷却好的 LB 琼脂培养基(以不烫手为宜),混匀后倾倒在制备好的 LB 琼脂平板,待成孔后将牛津杯取出。将活化好的乳酸片球菌菌液离心后过 0.22 μm 无菌滤膜,向牛津杯中加入 150 μL 已灭菌的 MRS 培养基作为对照。室温下静置扩展 2 h,37 °C 培养 48 h。用游标卡尺测量抑菌圈直径,重复 3 次取平均值。

1.2.7 黏附能力测定

(1) 自聚集能力:将活化好的乳酸片球菌菌液 5 000 r/min 离心 10 min,弃上清,用 0.85% 生理盐水清洗菌体 2 次后,调整菌悬液的 OD_{600 nm} 值为 0.80 ± 0.05 ,涡旋混匀,37 °C 分别孵育 4, 8, 24 h,取上清液测定 OD_{600 nm} 值。按式(5)计算自凝聚率。

$$A = \left(1 - \frac{A_1}{A_0}\right) \times 100\%, \quad (5)$$

式中:

A ——自凝聚率,%;

A_0 ——菌悬液的 OD_{600 nm} 值;

A_1 ——上清液的 OD_{600 nm} 值。

(2) 表面疏水性:按 1.2.7(1)的方法制备菌悬液,将菌悬液与二甲苯按体积比 3:1 涡旋混匀,37 °C 孵育 30 min,取水相层测定 OD_{600 nm} 值,按式(6)计算表面疏水率。

$$H = \left(1 - \frac{A_t}{A_0}\right) \times 100\%, \quad (6)$$

式中:

H ——表面疏水率,%;

A_0 ——菌悬液的 OD_{600 nm} 值;

A_t ——加入二甲苯静置 30 min 后 OD_{600 nm} 值。

1.2.8 抗氧化能力测定 将活化好的乳酸片球菌菌液于 5 000 r/min 离心 10 min,收集上清液过 0.22 μm 滤膜,得无细胞上清液(CFS);用 0.85% 生理盐水洗涤菌体沉淀 2~3 次,并将菌体重悬,得到完整细胞菌悬液(ICS)。参照文献[18-19]的方法测定 DPPH 自由基、ABTS 自由基清除率;参照文献[20]的方法测定羟自由基清除率,并以 0.5 mg/mL 抗坏血酸(V_c)作为阳性对照。

1.2.9 高活性保护剂的筛选 扩大培养完成后,将菌液于 4 ℃、5 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,用无菌的 0.85% 生理盐水洗涤菌泥 2 次后,55 ℃水浴 10 min,将菌泥与保护剂按质量比 1:5 混合制备菌悬液。待菌泥与保护剂混匀后,喷雾干燥(蠕动泵速度 12 r/min、风机频率 50 Hz、雾化压力 0.2 MPa、通针 10 s)。试验前于 200 ℃下通入无菌水 2 min,冷却,进风温度达到稳定后上样待测。

单一保护剂的筛选:分别按表 1 进行单一保护剂筛选,以喷雾干燥乳酸片球菌制剂活菌数作为评价指标,分别考察不同保护剂对乳酸片球菌的保护效果。

表 1 喷雾干燥保护剂的筛选

Table 1 Screening of spray-drying protectants		
种类	保护剂名称	浓度/%
混合物类	山羊奶、脱脂乳、水牛奶	5.00
蛋白类	乳清蛋白、大豆分离蛋白、酪蛋白胨	5.00
食用菌多糖类	蛹虫草多糖、灵芝多糖、杏鲍菇多糖	5.00
低聚糖类	低聚果糖、低聚异麦芽糖、低聚木糖	5.00
抗氧化剂类	谷氨酸钠、谷胱甘肽、抗坏血酸钠	2.00
空白	生理盐水	0.85

1.2.10 菌粉活菌计数 称取 0.5 g 菌粉加入到装有 4.5 mL 0.85% 生理盐水的试管中,将菌粉稀释 10 倍。以同样的方法依次稀释到合适的稀释度,将 100 μL 稀释液加入倒好的 MRS 琼脂培养基中进行涂板,每个稀释度重复 3 次,37 ℃倒置培养 24~48 h,选择菌落数范围在 30~300 的稀释度进行计数。

1.3 数据处理

所有试验设置 3 个平行。采用 Excel、SPSS 26.0、Origin 2022 软件进行数据整理及作图, $P<0.05$ 表示差异显著。结果均以“平均值±标准偏差”表示。

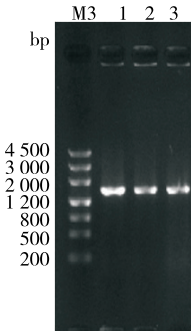
2 结果与分析

2.1 菌株 16S rDNA 鉴定

由图 1 可知,核酸电泳的扩增条带约位于 1 500 bp 处,挑选其中 1 个阳性结果测序,经基因同源性对比高达 99.93%,鉴定 N8 为乳酸片球菌。

2.2 菌株形态观察

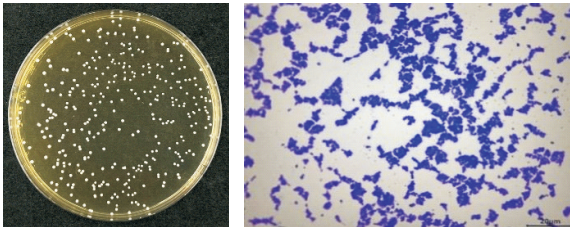
由图 2 可知,乳酸片球菌菌落边缘整齐、表面湿润且光滑,呈白色圆形凸起,为革兰氏阳性菌,在显微镜下为



M3. Marker 3 1~3. 乳酸片球菌 N8

图 1 16S rDNA 琼脂糖凝胶电泳图

Figure 1 16S rDNA agarose gel electrophoresis



(a) 菌落形态图 (b) 显微形态图

图 2 乳酸片球菌 N8 的菌落形态与显微形态

Figure 2 Colony morphology and micromorphology of *Pediococcus acidilactici* N8

球状,成对或聚团状排列,不形成链状,无芽孢,且在整个视野范围中未发现其他杂菌,适用于后续试验研究。

2.3 生长特性曲线测定

由图 3 可知,乳酸片球菌 N8 在 MRS 培养基中呈现典型的微生物生长曲线特征。0~2 h 处于生长延滞期,OD 值、pH 值变化较小,活菌数由 7.92 lg(CFU/mL)仅上升到 8.21 lg(CFU/mL),该阶段微生物生长较缓慢,需要进行代谢调整适应环境;2~10 h 呈指数型增长,处于对数生长期,OD 值和 pH 值变化较显著,活菌数增长较快;10 h 后进入稳定期,OD 值、pH 值变化较小,活菌数趋于稳定,且稳定期的菌体对热最不敏感。综上,乳酸片球菌 N8 的最佳培养时间为 12~14 h,此时 OD 值和 pH 值达到稳定且活菌数达到峰值。

2.4 安全性评价

2.4.1 溶血性 溶血性是筛选益生菌的基础标准之一,致病菌生长过程中所分泌的溶血素会导致红细胞破裂而产生溶血现象^[21]。由图 4 可知,阳性对照金黄色葡萄球菌呈现典型的 β 溶血环,而乳酸片球菌未产生溶血环,与夏雪茹^[22]和裴露露^[23]的研究结果一致。说明不同来源的乳酸片球菌均没有溶血性,符合益生菌菌株的标准,可安全使用。

2.4.2 抗生素敏感性 益生菌另一个重要的安全指标为抗生素敏感性,其潜在风险源于耐药基因的水平转移可

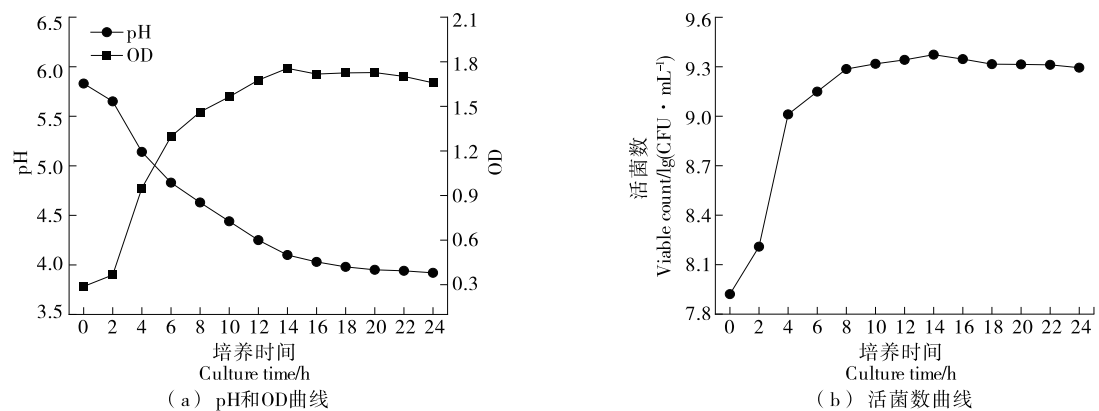
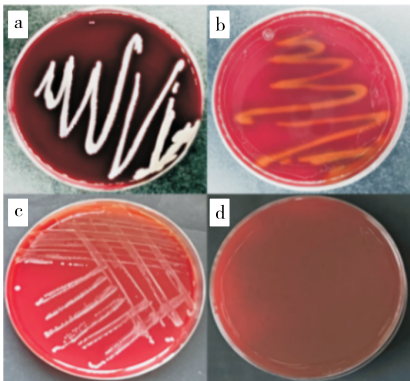


图 3 乳酸片球菌 N8 生长特性曲线

Figure 3 Growth characteristic curve of *Pediococcus acidilactici* N8



a, b. 金黄色葡萄球菌 c, d. 乳酸片球菌
图 4 溶血性试验结果

Figure 4 Results of hemolytic test

能会对宿主的安全造成威胁^[24]。由表 2 可知,乳酸片球菌对红霉素、氯霉素、青霉素、四环素和氨苄西林均具有一定的敏感性,对林可霉素、庆大霉素、头孢曲松、环丙沙

星、复方新诺明等抗生素耐药,与高慢慢等^[25]和 Fugaban 等^[26]的研究结果基本一致。

2.5 耐受性

2.5.1 耐热性 由表 3 可知,乳酸片球菌 N8 在极端条件(80 ℃, 5 min)下完全失活,故排除后续分析。乳酸片球菌 N8 经 70 ℃ 水浴 5 min 后,活菌数为 $(1.33 \pm 0.27) \times 10^2$ CFU/mL; 经 60 ℃ 水浴 5 min 后存活率达 55.24%,活菌数为 $(1.93 \pm 0.07) \times 10^9$ CFU/mL,处理时间延长至 15 min 时存活率降至 8.57%,活菌数为 $(0.30 \pm 0.05) \times 10^9$ CFU/mL; 经 50 ℃ 水浴 15 min 后,活菌数为 $(2.07 \pm 0.14) \times 10^9$ CFU/mL,存活率为 59.05%。表明乳酸片球菌具有良好的热稳定性,适用于喷雾干燥菌粉的制备。

2.5.2 耐酸性 由图 5 可知,当 pH 为 2.5、3.0 时,随着时间的延长,存活率略微下降,但处理 3 h 时存活率仍较高,为 88.22% 和 95.93%。在 pH 3.5 下孵育 3 h 时存活率 > 100%。Mathara 等^[27]研究发现,随着 pH 的增加,益生菌的

表 2 乳酸片球菌 N8 抗生素敏感性测定结果[†]

Table 2 Results of antibiotic sensitivity of *Pediococcus acidilactici* N8

抗生素种类	含药量/ μg	抑菌圈直径判断标准/mm			抑菌圈直径/mm	敏感性
		S	I	R		
红霉素 E	15	≥ 23	13~23	≤ 13	18.33 ± 0.14^b	I
氯霉素 C	30	≥ 18	12~18	≤ 12	22.67 ± 0.14^a	S
林可霉素 MY	2	≥ 21	14~21	≤ 14	8.50 ± 0.00^e	R
庆大霉素 GEN	10	≥ 15	12~15	≤ 12	8.67 ± 0.14^e	R
青霉素 PEN	10	≥ 15	14~15	≤ 14	23.00 ± 0.41^a	S
环丙沙星 CIP	5	≥ 21	15~21	≤ 15	0.00 ± 0.00^f	R
四环素 TET	30	≥ 19	14~19	≤ 14	17.33 ± 0.14^c	I
头孢曲松 CTR	30	≥ 23	19~23	≤ 19	13.67 ± 0.14^d	R
复方新诺明 SXT	25	≥ 16	10~16	≤ 10	0.00 ± 0.00^f	R
氨苄西林 AMP	10	≥ 17	16~17	≤ 16	17.83 ± 0.14^{bc}	S

[†] S 为敏感, I 为中度敏感, R 为耐药。

表 3 乳酸片球菌 N8 在不同温度下的活菌数

Table 3 Number of viable bacteria of <i>Pediococcus acidilactici</i> N8 at different temperatures					CFU/mL
时间/min	37 ℃	50 ℃	60 ℃	70 ℃	80 ℃
0	$(3.50 \pm 0.31) \times 10^9$	$(3.50 \pm 0.31) \times 10^9$	$(3.50 \pm 0.31) \times 10^9$	$(3.50 \pm 0.31) \times 10^9$	$(3.50 \pm 0.31) \times 10^9$
5	$(3.50 \pm 0.12) \times 10^9$	$(3.33 \pm 0.20) \times 10^9$	$(1.93 \pm 0.07) \times 10^9$	$(1.33 \pm 0.27) \times 10^2$	—
10	$(3.63 \pm 0.23) \times 10^9$	$(2.33 \pm 0.14) \times 10^9$	$(1.00 \pm 0.09) \times 10^9$	—	—
15	$(3.43 \pm 0.26) \times 10^9$	$(2.07 \pm 0.14) \times 10^9$	$(0.30 \pm 0.05) \times 10^9$	—	—

存活率显著提高,甚至有几株菌株在 pH 为 2.0,2.5 下的存活率均>100%。这可能归因于酸性条件下,质子在细胞内积累,影响跨膜 pH 梯度,而耐酸性菌株能够通过质子转位 ATP 酶主动从细胞中去除质子或通过产生碱性化合物来调节细胞内 pH 的稳态。表明乳酸片球菌具有优异的耐胃酸特性,能够满足益生菌制剂在胃酸环境中的存活需求^[28]。

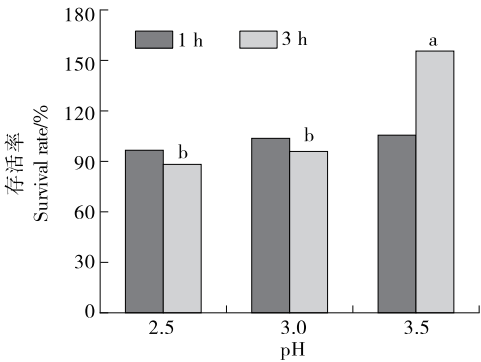


图 5 不同 pH 下乳酸片球菌 N8 的存活率
Figure 5 Survival rate of *Pediococcus acidilactici* N8 at different pH values

2.5.3 耐胆盐 由图 6 可知,经 2 h 培养后,乳酸片球菌在 0.1%、0.2%、0.3% 胆盐浓度下的存活率分别为 149.0%、147.0%、141.5%。Song 等^[29]研究发现,乳酸片球菌 M76 对胆汁应激具有高度抵抗力,在含有质量分数为 0.3%、1.0%、3.0% 的胆盐浓度下孵育 24 h 后存活率分别高达 $(101.8 \pm 0.92)\%$ 、 $(104.0 \pm 1.11)\%$ 、 $(101.4 \pm 0.15)\%$ 。说明乳酸片球菌在模拟人体肠道胆盐环境下表现出更强的环境耐受能力,能更好地在肠道中定殖从而发挥其益生作用。

2.5.4 模拟胃肠液耐受性 胃肠道环境耐受性是评估益生菌的一个关键标准^[30]。正常情况下,人体胃液的 pH 为 1.5~4.5,其酸性大小会在进食后有所波动,通常维持在 3.0 左右,而食物在胃中停留的时间一般为 1~3 h,相对较短^[31]。由图 7 可知,乳酸片球菌在模拟胃液中的存活率≥70%,具有优异的胃液耐受性,能够更好地通过胃部在肠道上部定殖^[32]。在模拟肠液中孵育 4 h 后,存活率为

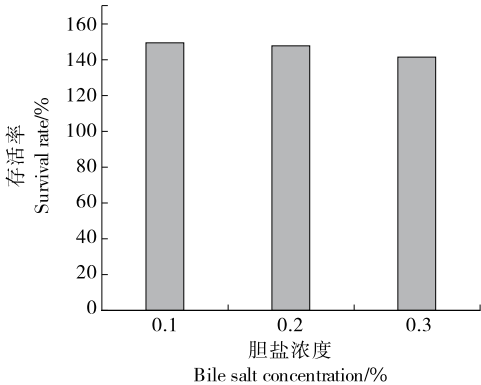


图 6 不同胆盐浓度下乳酸片球菌 N8 的存活率
Figure 6 Survival rate of *Pediococcus acidilactici* N8 at different bile salt concentrations

$(95.50 \pm 2.39)\%$,且活菌数量稳定在 10^7 CFU/mL,表明乳酸片球菌具备较强的肠液耐受性。Jensen 等^[33]研究表明,18 种潜在益生菌在模拟肠液消化 240 min 的活力比模拟胃液消化 180 min 的更高,且活菌数几乎没有发生变化。李晓静等^[34]从人肠道中分离筛选得到的乳酸片球菌对人工胃液的耐受能力为 72%,人工肠液的耐受能力达到 95%,与试验结果基本一致。说明乳酸片球菌具有较强的模拟胃肠液耐受性。

2.6 抑菌能力

由表 4 可知,乳酸片球菌发酵上清液对 5 种致病菌的

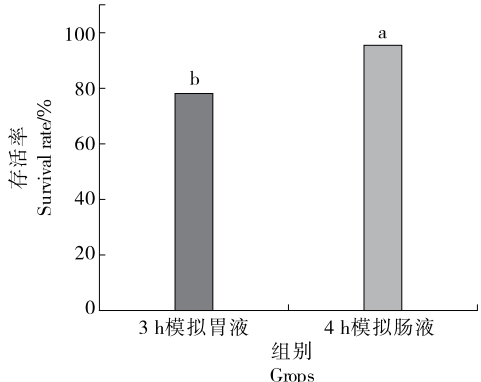


图 7 不同模拟胃肠液下乳酸片球菌 N8 的存活率
Figure 7 Survival rate of *Pediococcus acidilactici* N8 in simulated gastrointestinal fluid

抑菌圈大小为单增李斯特菌>金黄色葡萄球菌>鼠伤寒沙门氏菌>肠出血大肠杆菌>副溶血性弧菌。其中,对单增李斯特菌的抑制最为突出,抑菌圈直径高达 (16.95 ± 0.10) mm,显著高于对其他4种致病菌的。Albano等^[35]从Alheira香肠中分离得到乳酸片球菌HA-6111-2和HA-5692-3,分别产生bacHA-6111-2和bacHA-5692-3细菌素,两种细菌素均以低水平抑制了屎肠杆菌HKLSH和无害李斯特菌细胞的生长。从韩国传统发酵物Nuruk中分离出的乳酸片球菌S-2,能通过分泌细菌素抑制革兰氏阳性和阴性病原菌,如大肠杆菌、沙门氏菌等^[36]。这归因于乳酸菌的抑菌机理为多因素作用结果,主要是由于它们产生的细菌素和/有机酸的存在。

表4 乳酸片球菌N8对不同致病菌的抑菌圈大小[†]

Table 4 Inhibitory zone diameters of *Pediococcus acidilactici* N8 against different pathogenic bacteria

致病菌	抑菌圈直径/mm	抑菌程度	菌种性质
金黄色葡萄球菌	16.31 ± 0.15^b	++++	G+
单增李斯特菌	16.95 ± 0.10^a	++++	G+
鼠伤寒沙门氏菌	14.91 ± 0.18^c	+++	G-
副溶血性弧菌	10.81 ± 0.22^e	+++	G-
肠出血大肠杆菌	11.57 ± 0.05^d	+++	G-

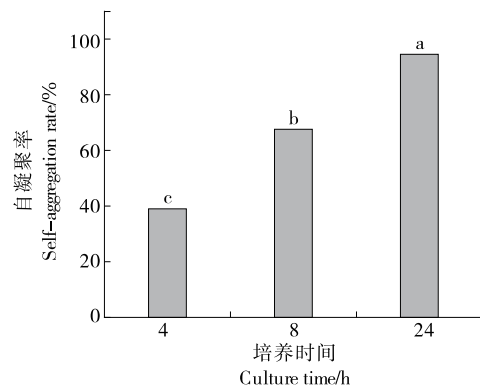
[†] +表示抑菌圈直径<5 mm; ++表示抑菌圈直径为5~10 mm; +++表示抑菌圈直径为10~15 mm; ++++表示抑菌圈直径≥15 mm; -表示无抑制作用;同列字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

2.7 黏附能力

益生菌的黏附能力是其发挥宿主健康效应的重要指标,可通过测定菌体的自聚集能力和表面疏水性进行综合表征^[37]。益生菌的自聚集性是指菌体在培养过程中,迅速生长导致其自行聚集成团的现象,从而在宿主的胃肠道表面发挥益生功能^[38]。自聚集能力的分级标准:50%以上为高聚集性,36%~50%为中等,16%~35%为低聚集性。由图8可知,乳酸片球菌的自聚集能力随着静置时间的延长而增大,4 h时达到39.00%,8 h时增至67.59%,24 h时高达94.54%,属于高自聚集能力菌株,说明其更容易在肠道中定殖,从而阻止致病菌黏附。益生菌的表面疏水性反映了菌体脱离水相黏附于其他有机相的能力,疏水性越强表明其越容易黏附于人体胃肠道表面,进而发挥益生作用^[39]。二甲苯为非极性有机溶剂,乳酸片球菌对二甲苯表面疏水率远远>60%。这与张媛媛等^[40]的研究结果高度吻合。表明乳酸片球菌具有较强的黏附肠道组织的能力,是益生菌制剂开发应用中的潜力菌株。

2.8 抗氧化能力

乳酸菌具有良好的抗氧化作用^[41-42]。主要是通过产



字母不同表示差异显著($P<0.05$)

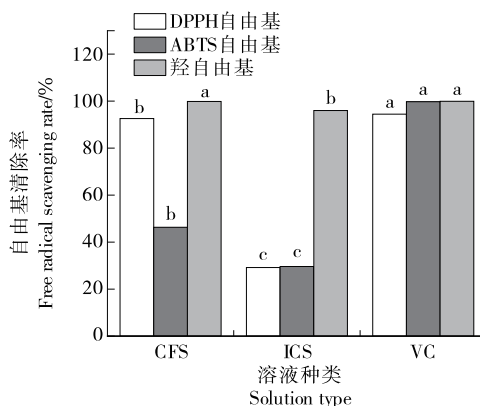
图8 乳酸片球菌N8的自聚集能力

Figure 8 Self-aggregation ability of *Pediococcus acidilactici* N8

生SOD酶和谷胱甘肽来清除自由基,从而减少由此引起的氧化损伤^[43-44]。由图9可知,乳酸片球菌N8的CFS对3种自由基均表现出显著的清除能力,其中对羟自由基的清除率高达 $(99.85 \pm 0.05)\%$,与0.5 mg/mL VC的相当;对DPPH自由基和ABTS自由基的清除率分别为 $(92.56 \pm 0.20)\%$ 和 $(46.34 \pm 0.23)\%$ 。相比之下,ICS对羟自由基的清除率为 $(96.01 \pm 0.08)\%$,而对DPPH自由基和ABTS自由基的清除率仅为 $(29.20 \pm 0.25)\%$ 和 $(29.64 \pm 0.63)\%$,显著低于CFS的。表明该菌株的抗氧化活性物质主要分泌到胞外,可能与其代谢产物中的小分子肽类或者胞外多糖有关。这与刘秋瑾等^[45]的研究结果一致,与吴世芳^[46]的研究结论相反。值得注意的是,不同自由基清除率之间不存在必然相关性,这种差异可能与菌株特异性抗氧化机制有关。但整体来说,乳酸片球菌具备较强的抗氧化能力,其在功能性食品开发领域具有潜在的应用价值。

2.9 单一喷雾干燥保护剂的筛选

使用保护剂能够在一定程度上减轻高温对菌体细胞



字母不同表示差异显著($P<0.05$)

图9 乳酸片球菌N8的抗氧化能力

Figure 9 Antioxidant capacity of *Pediococcus acidilactici* N8

壁和蛋白质结构造成的破坏,减少菌体细胞膜的机械损伤,从而保护菌体的完整性^[47]。由表 5 可知,不同种类的保护剂对乳酸片球菌的保护效果存在显著性差异,对比空白组,所选择的保护剂均可以显著提高乳酸片球菌制剂的活菌数。其中,以水牛奶、蛹虫草多糖、谷氨酸钠等作为喷雾干燥保护剂时表现出了巨大的潜力,益生菌制剂中的活菌数分别为 $(3.16\pm 0.07)\times 10^{12}$, $(1.81\pm 0.14)\times 10^{12}$, $(2.75\pm 0.09)\times 10^{12}$ CFU/g。舒中玉^[48]筛选明胶、麦芽糊精、脱脂奶粉、大豆分离蛋白和酪蛋白酸钠等物质作为乳酸片球菌 S204 喷雾干燥壁材,发现以脱脂奶粉作为壁材时乳酸片球菌存活率最高;而以麦芽糊精作为壁材时存活率最低,最终选择脱脂奶粉作为主要壁材。郭帅等^[49]考察脱脂乳、麦芽糊精、谷氨酸钠、海藻糖、阿拉伯胶对真空低温喷雾干燥制备乳双歧杆菌 Probio-M8 微胶囊的影响,发现脱脂乳、麦芽糊精和谷氨酸钠的保护效果优于海藻糖和阿拉伯胶。综上,不同保护剂对同一菌体发挥了不同的保护作用。

表 5 单一喷雾保护剂的筛选结果[†]
Table 5 Screening results of single spray-drying protectant

保护剂种类	名称	活菌数/(CFU·g ⁻¹)
混合物类	5% 山羊奶	$(1.32\pm 0.05)\times 10^{12d}$
	5% 脱脂乳	$(1.45\pm 0.06)\times 10^{12d}$
	5% 水牛奶	$(3.16\pm 0.07)\times 10^{12a}$
蛋白类	5% 乳清蛋白	$(1.28\pm 0.08)\times 10^{12d}$
	5% 酪蛋白胨	$(1.36\pm 0.09)\times 10^{12d}$
	5% 大豆分离蛋白	$(1.31\pm 0.04)\times 10^{12d}$
食用菌多糖类	5% 蛹虫草多糖	$(1.81\pm 0.14)\times 10^{12c}$
	5% 灵芝多糖	$(6.33\pm 0.63)\times 10^{11ef}$
	5% 杏鲍菇多糖	$(7.33\pm 0.33)\times 10^{11ef}$
低聚糖类	5% 低聚果糖	$(5.33\pm 0.14)\times 10^{11ef}$
	5% 低聚异麦芽糖	$(7.80\pm 0.25)\times 10^{11e}$
	5% 低聚木糖	$(7.87\pm 0.36)\times 10^{11e}$
抗氧化剂类	2% 谷氨酸钠	$(2.75\pm 0.09)\times 10^{12b}$
	2% 谷胱甘肽	$(1.47\pm 0.14)\times 10^{11g}$
	2% 抗坏血酸钠	$(1.25\pm 0.01)\times 10^{12d}$
空白组	0.85% 生理盐水	$(5.00\pm 0.52)\times 10^{11f}$

[†] 字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

3 结论

以 N8 为试验菌株,经形态学观察和分子生物学鉴定,确定该菌株为乳酸片球菌。该乳酸片球菌的生长曲线呈现规律的“S”型,无溶血性,可放心使用;对高温、酸、胆盐具有一定的耐受性,在体外模拟胃肠液环境中具有较高的存活率;对常用的红霉素、氯霉素等抗生素具有敏感性;对 5 株常见的肠道致病菌有较好的抑制作用;具有良好的自

聚集和疏水性;无细胞上清液对 DPPH 自由基、ABTS 自由基、羟自由基有较强的抗氧化能力。将其应用到喷雾干燥益生菌制剂中,水牛奶、蛹虫草多糖、谷氨酸钠等保护剂均表现出了巨大的潜力。王建设等^[50]从鸭空肠内容物中筛选到的乳酸片球菌具有耐酸、耐胆盐、耐高温、抑菌等益生性能,为微生态制剂产品的开发提供了菌种资源。

综上,乳酸片球菌 N8 具备优良的益生性能和体外抗氧化活性,可作为食用菌种应用于功能性抗氧化食品以及新型益生活菌制剂的开发。后续可对乳酸片球菌制剂的喷雾干燥保护剂进行复配研究,进一步探索不同种类的保护剂在喷雾干燥中发挥作用的机理;同时也可通过冷冻干燥制备其制剂。

参考文献

[1] HOTEL A C P, CORDOBA A. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria[J]. Prevention, 2001, 5(1): 1-10.

[2] OAK S J, JHA R. The effects of probiotics in lactose intolerance: a systematic review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019, 59(11): 1 675-1 683.

[3] QUIGLEY E M M. Prebiotics and probiotics in digestive health [J]. Clinical Gastroenterology and Hepatology, 2019, 17(2): 333-344.

[4] SALES-CAMPOS H, SOARES S C, OLIVEIRA C J F. An introduction of the role of probiotics in human infections and autoimmune diseases[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2019, 45(4): 413-432.

[5] WANG J, ZHANG H, CHEN X, et al. Selection of potential probiotic *Lactobacilli* for cholesterol-lowering properties and their effect on cholesterol metabolism in rats fed a high-lipid diet [J]. Journal of Dairy Science, 2012, 95(4): 1 645-1 654.

[6] YERLIKAYA O. Probiotic potential and biochemical and technological properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* strains isolated from raw milk and kefir grains[J]. Journal of Dairy Science, 2019, 102(1): 124-134.

[7] FERNANDEZ B, HAMMAMI R, SAVARD P, et al. *Pediococcus acidilactici* UL5 and *Lactococcus lactis* ATCC 11454 are able to survive and express their bacteriocin genes under simulated gastrointestinal conditions[J]. Journal of Applied Microbiology, 2014, 116(3): 677-688.

[8] 董婷. 乳酸片球菌培养基优化、益生特性及在猪肉防腐中的应用[D]. 天津: 天津大学, 2014: 3-5.

DONG T. Medium optimization, probiotic properties of *Pediococcus acidilactici* and application as preservative in pork [D]. Tianjin: Tianjin University, 2014: 3-5.

[9] GUPTA A, SHARMA N. Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria-*Pediococcus acidilactici* Ch-2 isolated from Chuli-a traditional apricot product of Himalayan region for the production of novel bioactive compounds with special therapeutic properties[J]. Journal of Food Microbiology Safety

- & Hygiene, 2017, 2(1): 119.
- [10] JANG W J, KIM C E, JEON M H, et al. Characterization of *Pediococcus acidilactici* FS2 isolated from Korean traditional fermented seafood and its blood cholesterol reduction effect in mice[J]. Journal of Functional Foods, 2021, 87: 104847.
- [11] JAISWAL S, PRADHAN S N, JAIN D, et al. Probiotic and functional characterization of *Pediococcus acidilactici* isolated from bhaati jaanr, traditional fermented rice porridge[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2022, 194(12): 5 734-5 747.
- [12] 武真邑, 秦士贞, 张董燕, 等. 猪源乳酸片球菌的分离及体外生物学特性研究[J]. 中国饲料, 2022(13): 40-47.
- WU Z Y, QIN S Z, ZHAN D Y, et al. Isolation of *Pediococcus lactis* from pigs and its prebiotic characteristics *in vitro*[J]. China Feed, 2022(13): 40-47.
- [13] HUANG S, VIGNOLLES M L, CHEN X D, et al. Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: a review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 63: 1-17.
- [14] MA C, ZHANG X Q, WANG K Q, et al. Enhancing spray-drying tolerance of *Lactobacillus bulgaricus* via non-sporeforming dormancy induction[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2023, 84: 103309.
- [15] TIRTA G D, MARTIN L, BANI M D, et al. Spray drying encapsulation of *Pediococcus acidilactici* at different inlet air temperatures and wall material ratios[J]. Foods, 2022, 12(1): 165.
- [16] HUMPHRIES R, BOBENCHIK A M, HINDLER J A, et al. Overview of changes to the clinical and laboratory standards institute Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, M100, 31st edition[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2021, 59(12): e0021321.
- [17] 蔡文静. 喷雾干燥法制备副干酪乳杆菌微胶囊及其体外功能验证[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2022: 22-23.
- CAI W J. Preparation and their *in vitro* functional verification of microcapsule of *Lactobacillus paracei* by spray drying method[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2022: 22-23.
- [18] XIAO Y, XING G L, RUI X, et al. Enhancement of the antioxidant capacity of chickpeas by solid state fermentation with *Cordyceps militaris* SN-18[J]. Journal of Functional Foods, 2014, 10: 210-222.
- [19] GIRI S S, RYU E, SUKUMARAN V, et al. Antioxidant, antibacterial, and anti-adhesive activities of biosurfactants isolated from *Bacillus* strains[J]. Microbial Pathogenesis, 2019, 132: 66-72.
- [20] 顾品品, 邢家漂, 王刚, 等. 几种体外评价乳酸菌无细胞提取物抗氧化活性方法的比较研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(23): 84-88.
- GU P P, XING J L, WANG, et al. A comparison of several *in vitro* evaluation methods of *Lactobacillus* cell-free extract antioxidant activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(23): 84-88.
- [21] NWAGU T N, UGWUODO C J, ONWOSI C O, et al. Evaluation of the probiotic attributes of *Bacillus* strains isolated from traditional fermented African locust bean seeds (*Parkia biglobosa*), "daddawa"[J]. Annals of Microbiology, 2020, 70(1): 20.
- [22] 夏雪茹. 兔源乳酸菌的筛选及其益生潜能评价[D]. 保定: 河北农业大学, 2021: 7-9.
- XIA X R. Screening of rabbit-derived lactic acid bacteria and evaluation of its probiotic potential[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2021: 7-9.
- [23] 裴露露. 马源乳酸菌的分离筛选及其抗沙门氏菌感染的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2021: 14-20.
- PEI L L. Isolation and screening of lactic acid bacteria from horses and study on their resistance to *Salmonella* infection [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2021: 14-20.
- [24] COHEN P A. Probiotic safety-no guarantees[J]. JAMA Internal Medicine, 2018, 178(12): 1 577-1 578.
- [25] 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 M M, JIAO X Y, ZHANG Z S, et al. Screening, fermentation characteristics and safety analysis of lactic acid bacteria in dong traditional fermented sour meat[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(12): 94-99, 105.
- [26] FUGABAN J I I, VAZQUEZ BUCHELI J E, KIM B, et al. Safety and beneficial properties of bacteriocinogenic *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* isolated from silage [J]. Letters in Applied Microbiology, 2021, 73(6): 725-734.
- [27] MATHARA J M, SCHILLINGER U, GUIGAS C, et al. Functional characteristics of *Lactobacillus spp.* from traditional Maasai fermented milk products in Kenya[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 126(1/2): 57-64.
- [28] DE ANGELIS M, GOBBETTI M. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review[J]. Proteomics, 2004, 4(1): 106-122.
- [29] SONG Y R, LEE C M, LEE S H, et al. Evaluation of probiotic properties of *Pediococcus acidilactici* M76 producing functional exopolysaccharides and its lactic acid fermentation of black raspberry extract[J]. Microorganisms, 2021, 9(7): 1 364.
- [30] BORICHA A A, SHEKH S L, PITHVA S P, et al. In vitro evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* species of food and human origin[J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 106: 201-208.
- [31] FREIRE A L, RAMOS C L, DA COSTA SOUZA P N, et al. Nondairy beverage produced by controlled fermentation with potential probiotic starter cultures of lactic acid bacteria and yeast[J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 248: 39-46.

- [32] DIVYASHREE S, ANJALI P G, SOMASHEKARAIH R, et al. Probiotic properties of *Lactobacillus casei*-MYSRD 108 and *Lactobacillus plantarum*-MYSRD 71 with potential antimicrobial activity against *Salmonella paratyphi*[J]. Biotechnology Reports, 2021, 32: e00672.
- [33] JENSEN H, GRIMMER S, NATERSTAD K, et al. *In vitro* testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria[J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 153(1/2): 216-222.
- [34] 李晓静, 魏晓博, 程雪, 等. 人肠道乳酸片球菌的分离鉴定及其发酵枸杞汁性能分析[J]. 食品工业科技, 2023, 44(22): 143-151.
- LI X J, WEI X B, CHENG X, et al. Isolation and identification of *Pediococcus lactis* in human intestinal tract and its performance analysis of fermented goji berry juice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(22): 143-151.
- [35] ALBANO H, TODOROV S D, VAN REENEN C A, et al. Characterization of two bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from "Alheira", a fermented sausage traditionally produced in Portugal[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 116(2): 239-247.
- [36] SONG D H, LEE J M, CHUNG K H, et al. Penicillin binding protein from *Pediococcus acidilactici* isolated from nuruk for food biopreservative[J]. Iranian Journal of Public Health, 2018, 47(11): 1 653-1 659.
- [37] ALP D, KULEAŞAN H. Adhesion mechanisms of lactic acid bacteria: conventional and novel approaches for testing[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2019, 35(10): 156.
- [38] 马彩霞. 牦牛发酵乳细菌菌群多样性及益生性乳酸菌筛选应用研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2022: 29-30.
- MA C X. Analysis of bacterial community diversity and screening application of probiotic lactic acid bacteria in yak fermented milk[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2022: 29-30.
- [39] GARCÍA-CAYUELA T, KORANY A M, BUSTOS I, et al. Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype[J]. Food Research International, 2014, 57: 44-50.
- [40] 张媛媛, 赵梦迪, 李悦垚, 等. 犬源乳酸片球菌 GLP236 的分离鉴定、体外益生功能及小鼠安全性评价[J]. 动物营养学报, 2023, 35(12): 8 148-8 160.
- ZHANG Y Y, ZHAO M D, LI Y Y, et al. Isolation, identification, *in vitro* probiotic function and mouse safety evaluation of canine-derived *Pediococcus acidilactici* GLP236 [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2023, 35(12): 8 148-8 160.
- [41] ALKALBANI N S, TURNER M S, AYYASH M M. Isolation, identification, and potential probiotic characterization of isolated lactic acid bacteria and *in vitro* investigation of the cytotoxicity, antioxidant, and antidiabetic activities in fermented sausage[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18: 188.
- [42] KIM S, LEE J Y, JEONG Y, et al. Antioxidant activity and probiotic properties of lactic acid bacteria[J]. Fermentation, 2022, 8(1): 29.
- [43] LIU D M, HUANG Y Y, LIANG M H. Analysis of the probiotic characteristics and adaptability of *Lactiplantibacillus plantarum* DMDL 9010 to gastrointestinal environment by complete genome sequencing and corresponding phenotypes [J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 158: 113129.
- [44] MAYASANKARAVALLI C, DEEPIKA K, ESTHER LYDIA D, et al. Profiling the phyto-constituents of *Punica granatum* fruits peel extract and accessing its *in-vitro* antioxidant, anti-diabetic, anti-obesity, and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2020, 27(12): 3 228-3 234.
- [45] 刘秋瑾, 白长胜, 尹琨伊, 等. 猪源罗伊氏乳杆菌 P2M1 鉴定及体外益生功能评价[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2024, 42(5): 575-582.
- LIU Q J, BAI C S, YIN J Y, et al. Identification of *Lactobacillus reuteri* P2M1 from swine and evaluation of its probiotic function *in vitro*[J]. Journal of Shihezi University (Natural Science), 2024, 42(5): 575-582.
- [46] 吴世芳. 传统发酵牦牛乳中降尿酸乳酸菌的筛选及功能评价[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2023: 39-42.
- WU S F. Screening and functional evaluation of uric acid-lowering lactic acid bacteria in traditional fermented yak milk [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2023: 39-42.
- [47] 张晓宁, 陈境, 麻丽丽, 等. 影响冷冻及喷雾干燥制备益生菌发酵剂活性因素分析[J]. 中国乳品工业, 2021, 49(4): 29-34.
- ZHANG X N, CHEN J, MA L L, et al. Analysis of the influence of different factors on the activity of probiotics producing fermentation agents by freezing and spray drying[J]. China Dairy Industry, 2021, 49(4): 29-34.
- [48] 舒中玉. 乳酸片球菌 S204 益生特性、发酵及喷雾干燥工艺的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2018: 42-44.
- SHU Z Y. Research on biological characteristics, fermentation process and spray drying process of *Pediococcus acidilactici* S204[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2018: 42-44.
- [49] 郭帅, 卢家君, 孟和毕力格. 壁材对真空低温喷雾干燥制备乳双歧杆菌 Probio-M8 微胶囊的影响[J]. 中国食品学报, 2022, 22(5): 219-227.
- GUO S, LU J J, MENG H B L G. The effects of wall materials on the preparation of *Bifidobacterium lactis* probio-M8 microcapsules by vacuum low temperature spray drying[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(5): 219-227.
- [50] 王建设, 赵海燕, 王凡, 等. 乳酸片球菌的分离鉴定与益生功能的初步研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(24): 201-206.
- WANG J S, ZHAO H Y, WANG F, et al. Isolation, identification and the preliminary study on the healthy function of *Pediococcus acidilactici*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(24): 201-206.