DOI:10.13652/j.spjx.1003.5788.2022.81091 [文章编号] 1003-5788(2023)04-0026-06

产胞外多糖乳酸菌的筛选及鉴定

Screening and identification of extracellular polysaccharide-producing lactic acid bacteria

陈 靖[1] 周佳豪[1] 毛琪琪[1] 唐 霞[2] 刘成国[1,3] 周 辉[1,3]

CHEN Jing[1] *ZHOU Jia-hao*[1] *MAO Qi-qi*[1] *TANG Xia*[2] *LIU Cheng-guo*[1,3] *ZHOU Hui*[1,3]

(1. 湖南农业大学食品科学技术学院,湖南 长沙 410128;2. 皇氏集团湖南优氏乳业有限公司,湖南 长沙 410008;3. 湖南农业大学长沙现代食品创新研究院,湖南 长沙 410128)

(1. *College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan* 410128, *China*; 2. *Huangshi Group Hunan Youshi Dairy Co., Ltd., Changsha, Hunan* 410008, *China*; 3. *Changsha Innovation Institute for Food of Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan* 410128, *China*)

摘要:目的:筛选出产胞外多糖能力强的乳酸菌菌株。**方法:**从实验室分离保藏的乳酸菌中挑选 40 株乳酸菌,以商业菌株鼠李糖乳杆菌(*L. rhamnosus* GG,LGG)为阳性对照菌株,采用菌落拉丝法和苯酚—硫酸法筛选出胞外多糖产量高的菌株,对其进行体外抗逆性、安全性和抗生素敏感性试验,并对最终得到的菌株进行表型特征分析和种属鉴定。**结果:**对 40 株乳酸菌进行初筛和复筛,得到了 10 株胞外多糖产量较多的乳酸菌;最终分离鉴定出 4 株高产 EPS 乳酸菌,产量均在 600 mg/L 以上,分别为 2 株副干酪乳杆菌(LZ9089、LZ9Y10)、1 株干酪乳杆菌(LZ9183)和 1 株短乳杆菌(LZ9285)。**结论:**4 株高产胞外多糖的菌株具有良好的益生特性,具有潜在的开发利用价值。

关键词:胞外多糖;乳酸菌;筛选;鉴定;益生功能

Abstract: Objective: To screen lactic acid bacteria strains with strong ability to produce extracellular polysaccharide. **Methods:** Forty strains of lactic acid bacteria isolated and preserved in the laboratory were selected, and the commercial strain *L. rhamnosus* GG (LGG) was used as the positive control strain. The strains with high extracellular polysaccharide yield were screened by colony drawing method and phenol-sulfuric acid method, and their stress resistance, safety and antibiotic sensitivity were tested in vitro. The phenotypic characteristics and species identification of the finally obtained strains were analyzed. **Results:** After primary screening and secondary screening of 40 strains of lactic acid bacteria, 10 strains of lactic acid bacteria with high extracellular polysaccharide production were obtained. After comprehensive evaluation of polysaccharide production, stress resistance and preliminary safety of the 10 strains of lactic acid bacteria, 4 strains of lactic acid bacteria with high EPS production were finally isolated and identified, namely, 2 strains of lactobacillus paracasei (LZ9089, LZ9Y10), 1 strains of Lactobacillus casei (LZ9183) and 1 strains of Lactobacillus brevis (LZ9285). **Conclusion:** Four strains with high exopolysaccharide yield have good basic probiotic characteristics and have potential development and utilization value.

Keywords: exopolysaccharides; lactic acid bacteria; sift; identification; probiotic function

乳酸菌具有抗逆性强、数量多、安全性高等特点[1-2]。乳酸菌胞外多糖(Lactic acid bacteria exopolysaccharide,LAB EPS)是由乳酸菌在其生长繁殖过程中为适应所在环境正常代谢产生的糖类化合物。LAB EPS 作为乳酸菌重要的次级代谢产物,其对于菌体的主要功能在于抵抗来自于有害物质、抗生素、噬菌体及一些原生生物的伤害,免受外界刺激,维持细胞正常水分等[3],还能促进细胞吸收环境中的无机盐与矿物质,螯合金属离子,协调传递与运输细胞内外的某些物质[4-5]。根据多糖黏性表型的特性,菌株若产胞外多糖其菌落会更加湿润、黏稠,用接种针挑起会产生连续的拉丝现象,因此常用菌落拉丝法初步判断菌株是否能产生胞外多糖[6-7];还可以通过乳平板(ESM)法、苯酚—硫酸法等来筛选产 EPS 的菌株[8],其中苯酚—硫酸法是检验菌株胞外多糖产量较为精确的方法之一。冯芳[9]从 MRS-S 平板培养基上挑取产黏菌落,传代培养后提取发酵液中粗

基金项目:湖南省自然科学青年基金项目(编号:2021JJ40242)

作者简介:陈靖,男,湖南农业大学在读硕士研究生。

通信作者:周辉(1980—),男,湖南农业大学副教授,博士。E-mail:paradise917@163.com

收稿日期:2022-11-23 **改回日期:**2023-03-22

胞外多糖,通过苯酚—硫酸法测得柠檬明串珠菌 B-2 的粗多糖产量为 28.3 g/L,远高于同类型菌株。白瑛[10]将菌株接种于 10%脱脂乳中,每间隔 6 h 采用苯酚—硫酸法测定菌株胞外多糖产量,发现嗜热链球菌 MN-BM-A01 在 24 h 内的胞外多糖产量为 167.23 mg/L,且各时间段的多糖产量均高于其他菌株。

研究拟从湖南主要山区牧场的牛乳及乳制品中筛选得到的 40 株乳酸菌中,采用初筛菌落拉丝法和复筛苯酚—硫酸法相结合的方法,筛选出胞外多糖产量高的菌株,对筛选到的菌株进行体外抗逆试验及安全性评价等试验,并进行种属鉴定,以期为菌株的开发与利用提供依据。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

40 株乳酸菌:从湖南主要山区牧场的牛乳及乳制品中筛选获得;

浓盐酸、苯酚、硫酸:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

MRS 培养基、M17 培养基:广东环凯微生物科技有限公司;

胃蛋白酶(3 000 ～ 3 500 U/g)、胰蛋白酶(≥50 000 U):北京索莱宝科技有限公司;

血平板、赖氨酸脱羧酶试剂盒:广东环凯微生物科技有限公司;

抗菌素测试试剂盒:杭州微生物试剂有限公司;

DNA 细菌提取试剂盒:北京天根生化科技有限公司。

1.2　仪器与设备

恒温培养箱:GZ-400-S 型,韶关市广智科技设备有限公司;

全自动高压蒸汽灭菌锅:BKQ-B50II 型,山东博科科学仪器有限公司;

全波长酶标仪:Multiskan GO 型,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;

台式高速离心机:TG16-WS 型,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司。

1.3　方法

1.3.1　菌株活化及菌悬液制备　将乳酸菌置于 MRS 液体培养基中 37 ℃培养 24 h,活化 2 次,得到的培养液于 4 ℃、8 000 r/min 离心 5 min;用无菌 0.85% NaCl 溶液洗涤、离心、重悬,重复 2 次。

1.3.2　产 EPS 乳酸菌的筛选

(1) 菌落拉丝法初筛:菌株于 37 ℃固体培养基上培养 48 h,将接种针触碰单菌落,缓慢地往外拉,对比不同菌株菌落是否有明显拉丝的现象,筛选出有连续拉丝现象的乳酸菌。

(2) 胞外多糖产量复筛:将各菌株接种至 50 mL MRS 液体培养基中,37 ℃培养 24 h,离心 10 min 除去菌体,沸水浴 10 min,冷却至室温后加入质量分数为 80%的三氯乙酸溶液至终质量浓度为 6%,4 ℃静置 12 h,离心 10 min 除去蛋白沉淀,上清液中加入 3 倍体积的无水乙醇,4 ℃静置 12 h,离心 20 min 收集粗多糖沉淀,沉淀中加入适量蒸馏水溶解,使用截留分子量为 8 000 ～ 14 000 D 的透析袋于 4 ℃下透析 72 h,每 8 h 换水,将多糖溶液定容至 50 mL 备用。

1.3.3　乳酸菌 EPS 产量测定　采用苯酚—硫酸法测定各菌株 EPS 产量,以葡萄糖含量为横坐标,吸光值为纵坐标,绘制葡萄糖标准曲线,测定待测菌株 EPS 溶液在 490 nm 处的吸光值,通过葡萄糖标准曲线换算,可得到各菌株发酵液中的多糖含量。

1.3.4　耐酸耐胆盐试验　将 3%的乳酸菌菌悬液接种至 pH 值分别 2,3、含 3.0 g/L 牛胆盐的 MRS 液体培养基中,测定 $OD_{600\ nm}$值,37 ℃培养 12 h,测定 $OD_{600\ nm}$值,以 $\triangle OD_{600\ nm}$表示菌株耐酸耐胆盐能力。

1.3.5　模拟胃肠液试验　按文献[11]中的方法配制模拟胃肠液,取 1 mL 乳酸菌菌悬液,利用平板计数法测定 0 h 的活菌数,另取 1 mL 乳酸菌菌悬液至 9 mL 模拟胃液、肠液中,旋涡震荡 30 s,37 ℃培养 3 h,利用平板计数法测定 3 h 的活菌数,并按式(1)计算 LAB 在胃肠液中的存活率。

$$C=\frac{m_1}{m_2}\times 100\%, \tag{1}$$

式中:

C——存活率,%;

m_1——3 h 活菌数的 lg 值;

m_2——0 h 活菌数的 lg 值。

1.3.6　初步安全性评价

(1) 溶血试验:在血琼脂平板上点种 5 μL 乳酸菌培养液,37 ℃培养 72 h。以金黄色葡萄球菌为阳性对照组,观察血琼脂平板中菌落周围是否具有透明的溶血圈,判断菌株的溶血性。

(2) 抗生素敏感试验:将含抗生素药物的 20 种药敏纸片轻压在含乳酸菌的固体培养基表面,通过测量抑制圈直径判断 LAB 的抗生素敏感性。

(3) 脱羧酶试验:采用赖氨酸脱羧酶试剂盒,以金黄色葡萄球菌为阳性对照组,通过西林瓶中液体颜色变化判断菌株是否产生生物胺。

1.3.7　菌株鉴定

(1) 产胞外多糖乳酸菌的菌落形态观察与镜检:将 LAB 活化,于固体培养基上划线,培养 48 h 观察菌落形态,并取适量菌液进行革兰氏染色,显微镜下观察菌株形态。

(2) 产胞外多糖乳酸菌的生理生化指标鉴定:对筛选出来的菌株进行过氧化氢酶试验、乙醇氧化试验、硫化氢试验、明胶液化试验、硝酸盐还原试验及吲哚反应试验。

(3) 产胞外多糖乳酸菌 16S rDNA 鉴定:提取活化后的 LAB DNA,进行 PCR 扩增,送往华大基因测试公司进行 16S rDNA 序列测定,将测得的序列置于 Genbank 数据库中,利用 Blast 软件进行比对。

1.3.8　数据分析　所有试验平行 3 次,利用 Excel 2016 软件进行数据整理及统计分析,以 SPSS Statistics 21 进行方差分析(ANOVA)LSD 多重比较;使用 Origin 2018 软件制图。

2　结果与分析

2.1　产胞外多糖乳酸菌的初筛

通过菌落拉丝法从 40 株乳酸菌中初筛出有连续拉丝现象的菌株,菌株 12、77、79、83、89、91、150、154、183、194、260、285、302、Y06、Y07、Y08、Y10、Y14、Y27、Y28 的菌落有连续拉丝现象,可初步判定这 20 株乳酸菌为产糖疑似菌株。其他菌株的连续拉丝现象不明显,可能是产糖量较少或者不产糖。因此,选择有连续拉丝现象的 20 株乳酸菌进行后续试验。

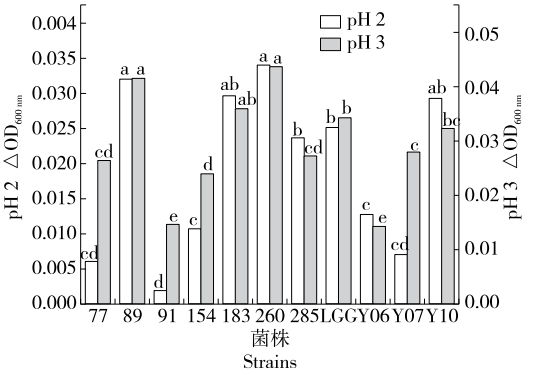
2.2　胞外多糖产量复筛

参照葡萄糖标准曲线方程 $y=0.002\ 8x+0.111\ 8$,$R^2=0.998\ 4$,排除发酵结束后培养基残余多糖对菌株多糖产量的影响,计算出各菌株的胞外多糖产量,结果见图 1。

由图 1 可知,菌株 12、77、79、83、89、91、150、154、183、194、260、285 的多糖含量均高于对照株 LGG($P<0.05$),菌株 302、Y10、Y28 与对照菌株相比无显著差异($P>0.05$)。菌株多糖产量复筛的最终选定菌株为 77、89、91、154、183、260、285、Y06、Y07、Y10。

2.3　菌株对酸的耐受性

胃酸在人体内会形成强酸环境,只有在强酸性条件下存活的菌株才能进入肠道发挥益生作用[12]。由图 2 可知,当培养环境 pH 值为 2 时,菌株 89、183、260、Y10 对酸的耐受性均高于对照菌株 LGG;当 pH 值为 3 时,菌株 89、183、260 对酸的耐受性高于对照菌株 LGG,菌株 Y10 的耐酸能力达到了与 LGG 相近的水平,表明菌株 89、183、260、Y10 4 株乳酸菌对酸的耐受性较强,其中菌株 183、260 的耐酸能力更为突出,与对照菌株相比差异显著($P<0.05$)。当培养液 pH 值为 2 时,菌株 183 的 $\triangle OD_{600\ nm}$ 值为 0.029 7±0.003 1,菌株 260 的 $\triangle OD_{600\ nm}$ 值为 0.034 0±0.002 6;当培养液 pH 值为 3 时,菌株 183 的 $\triangle OD_{600\ nm}$ 值为 0.036 0±0.003 0,菌株 260 的 $\triangle OD_{600\ nm}$ 值为 0.043 7±0.004 0;同一酸性环境下,菌株 183、260 的耐酸能力无显著性差异($P>0.05$)。



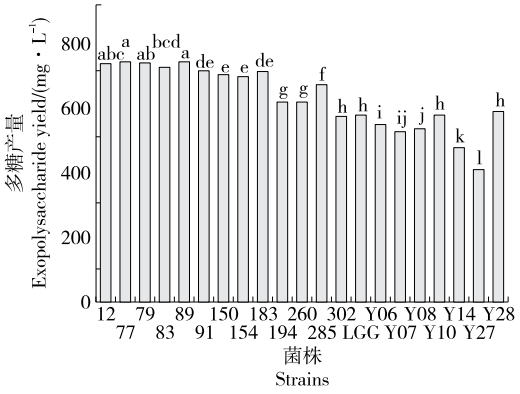
小写字母不同表示差异显著($P<0.05$)

图 2　菌株对酸的耐受性

Figure 2　Acid tolerance of strains

2.4　菌株对胆盐的耐受性

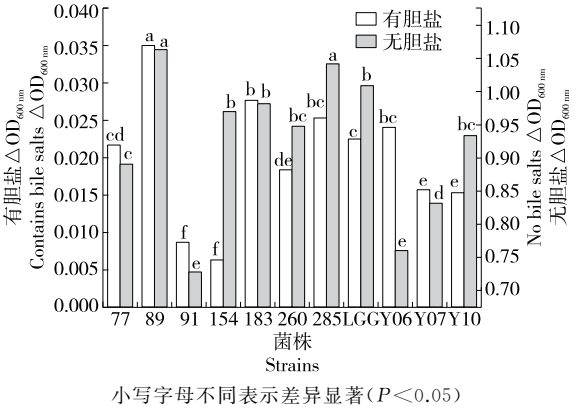
乳酸菌通过胃酸后,还需要通过肠道中高渗透压的胆盐环境。牛胆盐与人胆盐成分近似,因此选用牛胆盐为模拟人体肠道胆盐环境[13]。由图 3 可知,在无胆盐环境中,菌株 89、285 的 $\triangle OD_{600\ nm}$ 值高于对照菌株 LGG($P<0.05$),菌株154、183、260、Y10的生长情况与对照菌



小写字母不同表示差异显著($P<0.05$)

图 1　菌株胞外多糖含量

Figure 1　Extracellular polysaccharide content



小写字母不同表示差异显著($P<0.05$)

图 3　菌株对胆盐的耐受性情况

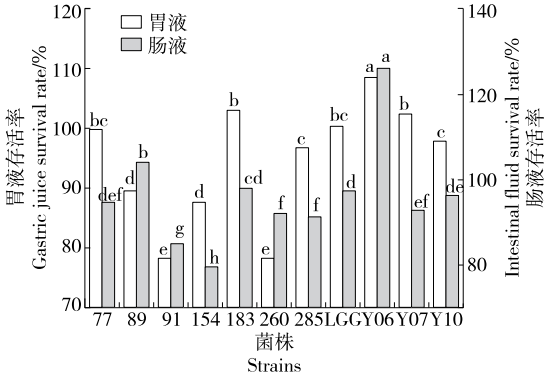
Figure 3　Tolerance of strains to bile salts

无显著差异($P>0.05$),说明无胆盐条件下,大部分菌株均生长较好。在添加胆盐环境中,对照菌 LGG 的生长明显被抑制,其$\triangle OD_{600\ nm}$值为 0.225 0±0.028 7;菌株 89、183、285、Y06 的$\triangle OD_{600\ nm}$值均高于 LGG,菌株 89、183 的$\triangle OD_{600\ nm}$值与 LGG 的差异显著($P<0.05$),表明这 4 株菌在有胆盐环境下的生长较稳定,具有较强的耐受胆盐能力。

2.5　菌株对模拟胃肠液的耐受性

在人体胃液中的蛋白酶能够杀死细菌、乳酸菌,并且肠液中的各类酶液也会抑制乳酸菌的繁殖生长[14]。因此,菌株是否能抵御宿主胃肠道的恶劣环境,表现出良好的抗逆性,在宿主肠道中定植、生长并发挥益生功能是判定菌株是否为益生菌的关键条件之一[15]。胃肠道中的消化酶能抑制众多微生物生存,乳酸菌只有在足够数量活菌的情况下才能定殖在机体肠道中[16]。

由图 4 可知,在模拟人工胃肠液的环境中,筛选出的 10 株乳酸菌均具有较高的存活率。胃液中的存活率在 78%以上,肠液中的存活率最低为 79%,菌株在胃液与肠液中的存活率有差异,如菌株 Y06 在胃液中的存活率高达(108.48±3.65)%,在肠液中的存活率高达(125.96±5.04)%,其存活率高于 100%可能是由于菌株在模拟胃肠液中的适应能力较强,放置 3 h 内,菌株又进行了生长繁殖。在模拟胃液环境下,只有菌株 183、Y06、Y07 的存活率高于对照菌株 LGG,菌株 77、285、Y10 的存活率与对照菌株无显著性差异($P>0.05$),可能是由于菌株的特异性所致。在模拟肠液环境下,菌株 89、183、Y06 的存活率高于对照菌株 LGG,菌株 77、Y10 的存活率与对照菌株相近无明显差异($P>0.05$)。张汝京等[17]从 15 株乳酸菌中发现 5 株乳酸菌在人工胃液中的存活率为 60%以上,在人工肠液中的存活率为 80%以上,且具有良好的耐酸耐胆盐能力。郑越等[18]研究发现 6 株植物乳杆菌均能在 pH 值为 2 的酸性环境中存活 3 h 以上,存活率>40%,且在模拟胃肠液中存活率均>95%。综上,菌株 89、183、285、Y06、Y07、Y10 在模拟胃肠液中均具有较强的耐受性,因此具备顺利通过人体胃肠液的潜能,且菌株 Y06、183 在该试验中表现得尤为突出。



小写字母不同表示差异显著($P<0.05$)

图 4　菌株对模拟胃肠液的耐受性情况

Figure 4　Tolerance of strains to simulated gastrointestinal fluids

2.6　初步安全性评价

为了确保乳酸菌能够被安全服用,应用于食品或医药行业,需要对菌株进行溶血性、赖氨酸脱羧酶活性试验以评价菌株的初步安全性[19]。由表 1 可知,以金黄色葡萄球菌作为阳性对照菌株,11 株受试菌株均未产生溶血现象,且赖氨酸脱羧酶活性均呈阴性。综上,从产生生物胺和溶血性方面来看,所有受试菌初步判定为安全菌株。

表 1　乳酸菌的溶血性和脱羧酶活性†

Table 1　Hemolysis and decarboxylase activity of LAB

菌株编号	溶血性[a]	脱羧酶活性[b]
77	−	−
89	−	−
91	−	−
154	−	−
183	−	−
260	−	−
285	−	−
LGG	−	−
Y06	−	−
Y07	−	−
Y10	−	−
金黄色葡萄球菌	+	γ

† a "−"为非溶血性;"+"为溶血;b "−"为脱羧酶呈阴性;"γ"为脱羧酶呈阳性。

2.7　抗生素敏感性测定结果

在临床试验和乳酸菌制剂中,常将乳酸菌与抗生素联用,菌株若存在抗生素抗性基因,可能会转移给致病菌,由此危害人体健康,因此研究菌株对抗生素的敏感性是有必要的[20]。

由表 2 可知,11 株乳酸菌对 20 种抗生素的敏感性存在一定差异,对氨苄西林、头孢氨苄、头孢唑林等常用抗生素较敏感,对羧苄西林、新霉素、头孢哌酮等敏感性较弱。当乳酸菌制剂与抑制圈>15 mm 的抗生素联用时,如菌株 77 与米诺环素(抑制圈直径≥25 mm)联用,乳酸菌的存活率会受到影响,进而影响乳酸菌制剂的益生效果[21]。

2.8　菌株表型特征分析

综合对 10 株乳酸菌菌株的产多糖量、抗逆性能以及初步的安全性评价结果,最终选取 LZ9089、LZ9183、LZ9285、LZ9Y10 进行测序鉴定。

表 2　菌株对 20 种抗生素的敏感性†

Table 2　Strains sensitivity to 20 antibiotics

抗生素	77	89	91	154	183	260	285	LGG	Y06	Y07	Y10
羧苄西林	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R
氨苄西林	S	R	S	I	S	S	S	I	S	R	R
青霉素	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R
苯唑西林	S	I	S	R	S	S	S	S	S	R	I
头孢氨苄	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S
头孢唑林	R	I	R	I	R	I	I	R	I	R	R
头孢呋辛	S	S	S	I	I	R	I	S	R	S	S
头孢他啶	S	S	R	S	R	S	R	R	I	I	I
哌拉西林	S	S	R	I	S	S	S	S	I	S	S
头孢拉定	S	I	R	S	S	S	I	I	I	I	I
多西环素	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
丁胺卡那	I	I	R	I	R	S	R	S	S	S	S
庆大霉素	S	R	I	S	I	R	I	S	S	S	S
卡那霉素	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
新霉素	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R
红霉素	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
米诺环素	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
头孢哌酮	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R
四环素	I	I	I	I	R	R	I	R	R	R	R
头孢曲松	I	S	I	I	I	S	S	S	S	S	I

†　敏感(S)；中间(I)；耐药(R)。

由图 5 可知，4 株乳酸菌均为革兰氏阳性菌。由表 3 可知，菌株 LZ9089 呈细长杆状，长链状排列；菌株 LZ9183 呈粗短杆状，分散、成双或成簇状排列；菌株 LZ9285 呈粗短杆状，分散或成堆排列；菌株 LZ9Y10 呈粗短杆状，分散、成双或成簇状排列。

2.9　菌株的生理生化指标鉴定

4 株乳酸菌的过氧化氢酶试验、乙醇氧化试验、硫化氢试验、明胶液化试验、硝酸盐还原试验、吲哚反应试验结果均为阴性。

2.10　菌株 16S rDNA 鉴定结果

通过 16S rDNA 测序对筛选出的 4 株胞外多糖产量高且基础益生性能较好的 LAB 进行鉴定，其 PCR 扩增序列分子量为 1 200～1 500 bp。将 4 株菌测序结果在

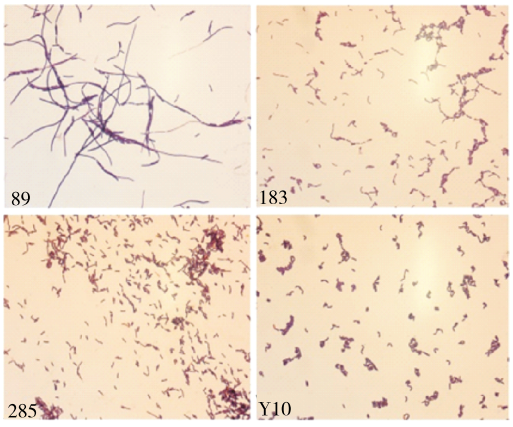


图 5　革兰氏镜检图

Figure 5　Gram microscopy

表 3　菌株的菌落形态

Table 3　The colony morphology of the strain

菌株编号	菌落大小	菌落形状	菌落颜色
LZ9089	单个菌落较小	中间隆起，边缘凹凸不平	较透明
LZ9183	单个菌落较大	近似圆形，边缘较整齐，质地均匀	白色
LZ9285	单个菌落较大	中间隆起，边缘凹凸不平	白色，周围较透明
LZ9Y10	单个菌落较小	近似圆形，隆起，边缘较整齐，质地均匀	较透明

NCBI数据库中进行BLAST比对,筛选出的4株乳酸菌分别为2株副干酪乳杆菌(LZ9089、LZ9Y10)、1株干酪乳杆菌(LZ9183)和1株短乳杆菌(LZ9285)。

3　结论

试验采用菌落拉丝法对挑选的40株乳酸菌进行初步筛选,再通过苯酚—硫酸法测定菌株胞外多糖产量进行复筛,得到了10株胞外多糖产量较多的乳酸菌。综合对10株乳酸菌菌株的产多糖量、抗逆性能以及初步安全性评价结果,最终分离鉴定出4株高产EPS乳酸菌,分别为2株副干酪乳杆菌(LZ9089、LZ9Y10)、1株干酪乳杆菌(LZ9183)和1株短乳杆菌(LZ9285)。试验仅筛选得到目标菌株,后续可对菌株所产的胞外多糖进行研究,进一步探究多糖组分及其生理活性。

参考文献

[1] 胡鹏钰, 于俊娟, 王鹏, 等. 母乳来源益生菌的筛选及潜在益生特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(14): 190-195.
HU P Y, YU J J, WANG P, et al. Screening of probiotics from breast milk and study on potential probiotic characteristics[J]. Food and Fermentation Industry, 2021, 47(14): 190-195.

[2] 蒙月月, 陆婧婧, 占萌, 等. 植物乳杆菌KLDS 1.0318产酸、耐酸、耐胆盐能力 及其免疫特性研究[J]. 食品工业科技, 2018, 39(15): 70-76.
MENG Y Y, LU J J, ZHAN M, et al. Study on the acid-producing, acid-resistant, bile salt-tolerant ability and immune characteristics of *Lactobacillus plantarum* KLDS 1.0318[J]. Food Industry Science and Technology, 2018, 39(15): 70-76.

[3] SANTORO M, GAUDINO G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing [J]. Experimental Cell Research, 2005, 304(1): 274-286.

[4] OZTURK S, ASLIM B, SULUDERE Z. Evaluation of chromium (VI) removal behaviour by two isolates of *Synechocystis* sp. in terms of exopolysaccharide (EPS) production and monomer composition[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(23): 5 588-5 603.

[5] YEGORENKOVA I V, TREGUBOVA K V, MATORA L Y, et al. Biofilm formation by *Paenibacillus polymyxa* strains differing in the production and rheological properties of their exopolysaccharides[J]. Current Microbiology, 2011, 62(5): 1 554-1 559.

[6] RUAS-MADIEDO P, DE LOS REYES-GAVILÁN C G. Invited review: Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria[J]. Journal of Dairy Science, 2005, 88(3): 843-856.

[7] 田丰伟, 丁虎生, 丁纳, 等. 产胞外多糖的乳酸菌的简便筛选与鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(3): 15-19.
TIAN F W, DING H S, DING N, et al. Simple screening and identification of exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria[J]. Food and Fermentation Industry, 2008, 34(3): 15-19.

[8] BERG D J C, SMITS A, POT B, et al. Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food fermentation processes and culture collections [J]. Food Biotechnology, 1993, 7(3): 189-205.

[9] 冯芳. 产胞外多糖乳酸菌的筛选及其分子特性的研究[D]. 天津: 天津大学, 2018: 51-52.
FENG F. Screening of Lactic acid bacteria producing extracellular polysaccharide and study on its molecular characteristics [D]. Tianjin: Tianjin University, 2018: 51-52.

[10] 白瑛. 高产胞外多糖嗜热链球菌株筛选及产糖特性分析与应用研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2016: 35-39.
BAI Y. Screening of streptococcus thermophilus strain with high exopolysaccharide production analysis of sugar production characteristics and application research [D]. Beijing: China Agricultural University, 2016: 35-39.

[11] 雷文平, 周辉, 陈绮, 等. 具有透明质酸酶抑制活性益生菌的体外筛选及鉴定[J]. 食品科学, 2021, 42(2): 151-157.
LEI W P, ZHOU H, CHEN Q, et al. Screening and identification of probiotics with hyaluronidase inhibitory activity in vitro[J]. Food Science, 2021, 42(2): 151-157.

[12] 王帅静, 李啸, 刘玲彦, 等. 西藏牦牛粪和乳源中益生菌的筛选与鉴定[J]. 中国酿造, 2021, 40(7): 43-48.
WANG S J, LI X, LIU L Y, et al. Screening and identification of probiotics in Tibetan yak dung and milk source[J]. China Brewing, 2021, 40(7): 43-48.

[13] 王昊乾, 马玉珠, 赵景娜, 等. 瑞士乳杆菌的筛选与应用[J]. 中国乳品工业, 2021, 49(11): 4-8, 18.
WANG H G, MA Y Z, ZHAO J N, et al. Screening and application of Lactobacillus helveticus[J]. China Dairy Industry, 2021, 49(11): 4-8, 18.

[14] 苏森森. 粪便乳杆菌FZB1的分离鉴定与益生特性研究[D]. 成都: 成都医学院, 2017: 37-39.
SU S S. Isolation, identification and probiotic characteristics of Lactobacillus faecalis FZB1 [D]. Chengdu: Chengdu Medical College, 2017: 37-39.

[15] HOOD S, ZOTTOA E. Effect of low pH on the ability of Lactobacillus acidophilus to survival and adhere to Human intestinal cells[J]. Food Science & Nutrition, 1988, 53(5): 1 514-1 516.

[16] 孙熙洽, 崔承弼, 齐仕博, 等. 低盐泡菜中耐酸性乳酸菌的筛选、鉴定及特性研究[J]. 食品与机械, 2022, 38(1): 24-31, 37.
SUN X L, CUI C B, QI S B, et al. Screening, identification and characterization of acid-resistant lactic acid bacteria in low-salt pickles[J]. Food & Machinery, 2022, 38(1): 24-31, 37.

[17] 张汝京, 胡亚凡, 海丹, 等. 具有抑制肠道致病菌和黏附Caco-2细胞作用的益生性乳酸菌的筛选及鉴定[J]. 食品工业科技, 2019, 40(20): 133-139, 153.
ZHANG R J, HU Y F, HAI D, et al. Screening and identification of beneficial lactic acid bacteria that can inhibit intestinal pathogenic bacteria and adhere to Caco-2 cells[J]. Food Industry Science and Technology, 2019, 40(20): 133-139, 153.

(下转第169页)

resulted products[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021(7): 216-222.

[13] 叶沁. 鳄鱼里脊抗氧化肽的制备及其生物学功能研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2019: 19.
YE Q. Studies on the preparation and biological functions of antioxidant peptides from crocodile tenderloin [D]. Xiamen: Xiamen University, 2019: 19.

[14] LI X. Comparative Study of 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical (DPPH) scavenging capacity of the antioxidant Xanthones family [J]. Chemistry Select, 2018, 3(46): 13 081-13 086.

[15] XIE Z J, HUANG J R, XU X M, et al. Antioxidative activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate[J]. Food Chemistry, 2008, 111(2): 370-376.

[16] 干建松. 超声辅助酶解海带蛋白制备抗氧化肽及其活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(5): 64-72.
GAN J S. Study on preparation of antioxidant peptides from kelp protein by ultrasonic assisted enzymatic hydrolysis and its activity [J]. China Food Additives, 2022, 33(5): 64-72.

[17] 吴明泽, 王笑, 胡祥昊, 等. 中华圆田螺肉抗氧化肽的分离纯化及小鼠体内外活性研究[J]. 食品与机械, 2019, 35(12): 151-157.
WU M Z, WANG X, HU X H, et al. Purification of antioxidant peptides from the meat of Oncomelania sinensis and its in vivo and in vitro of mice activity[J]. Food & Machinery, 2019, 35(12): 151-157.

[18] 于智慧, 郭艳, 周丽媛, 等. 双酶酶解驴骨泥工艺优化及酶解液抗氧化性、氨基酸含量分析[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(11): 60-66.
YU Z H, GUO Y, ZHOU L Y, et al. The process optimization of Donkey bone mud with double enzyme and analysis of antioxidant activity and amino acid content of the enzymatic hydrolysis solution[J]. Food Research and Development, 2021, 42(11): 60-66.

[19] 戴妍. 鸡肉寡肽的抗氧化、抗疲劳功能活性研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2019: 18-19.
DAI Y. Antioxidant and anti-fatigue functional activities of chicken oligopeptides[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2019: 18-19.

[20] NIELSEN P M, PETERSEN D, DAMBMANN C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis[J]. Journal of Food Science, 2001, 66(5): 642-646.

[21] 史晋源. 甲鱼肽的抗氧化活性与抗疲劳作用研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2021: 18.
SHI J Y. Study on the antioxidant activity and anti-fatigue effect of soft-shelled turtle peptides[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2021: 18.

[22] LIANG J, DENG B, LIU T, et al. Preparation of antioxidant peptides from Porphyra haitanensis via response surface optimization[J]. Food Research and Development, 2020, 41(5): 1-6.

(上接第 31 页)

[18] 郑越, 段涛, 宋丹, 等. 六株植物乳杆菌的益生特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(10): 119-125.
ZHENG Y, DUAN T, SONG D, et al. Study on the probiotic characteristics of six strains of Lactobacillus plantarum[J]. Food and Fermentation Industry, 2022, 48(10): 119-125.

[19] 谢晓娜, 张元秋, 杨郑州, 等. 一株降胆固醇菌株的筛选鉴定及安全性评价[J]. 中国乳品工业, 2021, 49(3): 19-23, 56.
XIE X N, ZHANG Y Q, YANG Z Z, et al. Screening, identification and safety evaluation of a cholesterol-lowering strain[J]. China Dairy Industry, 2021, 49(3): 19-23, 56.

[20] 何宇星, 其其日力格, 刘玮, 等. 潜在益生作用乳酸菌的筛选鉴定及其生物学特性[J]. 现代食品科技, 2021, 37(11): 50-57, 67.
HE Y X, Qiqirilige, LIU W, et al. Screening and identification of potential probiotic lactic acid bacteria and their biological characteristics[J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(11): 50-57, 67.

[21] 王炜哲, 翟征远, 郝彦玲. 市售酸奶中发酵剂乳酸菌的耐药性及耐药基因研究进展[J]. 中国乳品工业, 2022, 50(2): 34-37.
WANG W Z, ZHAI Z Y, HAO Y L. Research progress on drug resistance and drug resistance genes of lactic acid bacteria used as starter in commercial yogurt[J]. China Dairy Industry, 2022, 50(2): 34-37.

(上接第 134 页)

[26] 赵菊润, 王艺涵, 金艳, 等. 石斛属植物化学成分及药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(9): 2 358-2 372.
ZHAO J R, WANG Y H, JIN Y, et al. Research advances in chemical constituents and pharmacological activities of *Dendrobium* plants[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2022, 47(9): 2 358-2 372.

[27] 林君, 黄友琴. 铁皮石斛生物活性成分及产品加工的研究进展[J]. 轻工科技, 2022, 38(2): 21-23, 56.
LIN J, HUANG Y Q. Research progress on bioactive constituents and product processing of *Dendrobium officinales*[J]. Light Industry Science and Technology, 2022, 38(2): 21-23, 56.

[28] 唐文文, 夏俊丽, 陈垣. 铁皮石斛茎、叶、花功能性成分、抗氧化活性及其相关性[J]. 食品与机械, 2021, 37(7): 45-50.
TANG W W, XIA J L, CHEN H. Analysis of functional composition, antioxidant activity and their correlation instem, leaf and flower from *Dendrobium officinale*[J]. Food & Machinery, 2021, 37(7): 45-50.