

柿子醋醪中优良乳酸菌的筛选及其耐受性和功能性分析

焦时阳, 王晓彤, 侯玉新, 王梦洋, 陈明强, 杨延辉, 王大红

Screening of Superior Lactic Acid Bacteria in Persimmon Vinegar Broth and Analysis of Its Tolerance and Function

JIAO Shiyang, WANG Xiaotong, HOU Yuxin, WANG Mengyang, CHEN Mingqiang, YANG Yanhui, and WANG Dahong

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022070040>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

自然发酵泡菜中高体外抗氧化活性乳酸菌的筛选及其对模拟胃肠道环境的耐受性

Screening of High Antioxidant Activity Lactic Acid Bacteria in Traditional Fermented Pickles and Its Tolerance to Simulated Gastrointestinal Environments

食品工业科技. 2019, 40(22): 93-97,103 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.22.017>

牦牛曲拉源乳酸菌的耐受性与抑菌性能比较

Comparison of Tolerance and Antibacterial Activity of Lactic Acid Bacteria from Yak Qula

食品工业科技. 2020, 41(7): 115-120,125 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.07.020>

西藏曲拉和发酵乳中抗氧化和益生特性乳酸菌的筛选及鉴定

Screening and Identification of Lactic Acid Bacteria with Antioxidant and Probiotic Properties from Qula and Fermented Milk in Tibet

食品工业科技. 2019, 40(2): 142-147 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.02.025>

酸汤中乳酸菌的鉴定及其耐酸、耐胆盐和抗氧化活性

Identification, Acid and Bile Salt Tolerance, and Antioxidant Ability of Lactic Acid Bacteria Isolated from Sour Soup

食品工业科技. 2020, 41(16): 121-126,139 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.16.020>

产ACE抑制肽菌株的筛选及其在模拟消化道环境中的活性分析

Screening of ACE-inhibiting Peptide Producing Strains and Their Activity Analysis in Simulated Digestive Tract Environment

食品工业科技. 2021, 42(18): 142-147 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021020033>

降解展青霉素的乳酸菌的筛选鉴定及其降解特性研究

Screening and Identification of Lactic Acid Bacteria Degrading Patulin and Its Degrading Characteristics

食品工业科技. 2020, 41(18): 87-92 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.18.014>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

焦时阳, 王晓彤, 侯玉新, 等. 柿子醋醪中优良乳酸菌的筛选及其耐受性和功能性分析 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(8): 161–169.
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022070040

JIAO Shiyang, WANG Xiaotong, HOU Yuxin, et al. Screening of Superior Lactic Acid Bacteria in Persimmon Vinegar Broth and Analysis of Its Tolerance and Function[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(8): 161–169. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022070040

· 生物工程 ·

柿子醋醪中优良乳酸菌的筛选及其耐受性和功能性分析

焦时阳¹, 王晓彤¹, 侯玉新¹, 王梦洋¹, 陈明强², 杨延辉³, 王大红^{1,*}

(1. 河南科技大学食品与生物工程学院, 河南洛阳 471023;

2. 安徽永荣生物科技有限公司, 安徽合肥 230011;

3. 北京肽师傅生物科技有限公司, 北京 101400)

摘要: 为了从柿子醋醪中获得适合植物基质发酵的具有产酸能力强、耐受性能好和功能性强乳酸菌。以自然发酵的柿子醋醪为目标乳酸菌供体, 采用 MRS 液体培养基培养、溶钙圈法初步筛选, 分离得到 5 株乳酸菌菌株。通过对菌株的产酸能力、耐受性、抗氧化能力以及产 β -葡萄糖苷酶水平进行测定, 对综合性能较强的两株乳酸菌菌株进行形态学及 16S rDNA 分析。结果表明: 经筛选鉴定得到的两株优良乳酸菌为嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 和植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)。两株乳酸菌菌株产酸能力分别为 2.00、2.24 g/100 mL; 最低耐受 pH 均为 1.5; 最高耐受乙醇浓度均为 10%; 胆盐耐受性均为 1%、最高耐受 NaCl 浓度均为 7%; 对 ABTS⁺、DPPH、O²⁻ 自由基清除能力分别为 65.12% 和 62.26%, 77.42% 和 68.89%, 93.76% 和 87.89%; 产 β -葡萄糖苷酶能力分别为 26.37, 30.27 IU/L。本文从柿子醋醪中获得用于植物基质发酵的具有较强生物学性能的两株乳酸菌菌株, 该菌株为益生菌的开发提供了菌种资源。

关键词: 柿子醋醪, 乳酸菌, 筛选, 鉴定, 耐受性能, 产酸能力, 抗氧化能力

中图分类号: Q93-33

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)08-0161-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022070040



本文网刊:

Screening of Superior Lactic Acid Bacteria in Persimmon Vinegar Broth and Analysis of Its Tolerance and Function

JIAO Shiyang¹, WANG Xiaotong¹, HOU Yuxin¹, WANG Mengyang¹, CHEN Mingqiang², YANG Yanhui³,
WANG Dahong^{1,*}

(1. School of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China;

2. Anhui Yongrong Biotechnology Co., Ltd., Hefei 230011, China;

3. Beijing Peptide Master Biotechnology Co., Ltd., Beijing 101400, China)

Abstract: In order to obtain lactic acid bacteria (LAB) with a strong acid production capacity, good tolerance, and high function from persimmon vinegar broth, which is suitable for plant substrate fermentation. Using the persimmon vinegar broth naturally fermented as a source of lactic acid bacteria, five strains were isolated using MRS liquid culture medium and calcium-dissolving circle methods. The abilities of producing acid, tolerance, antioxidant and β -glucosidase production of the 5 LABs were measured, the morphology and 16S rDNA identification of the screened two LABs with stronger comprehensive performance were analyzed. Based on the results of the screening, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* were identified as two excellent strains of lactic acid bacteria. Both lactic acid bacteria produced acid at a rate of 2.00 and 2.24 g/100 mL, respectively. Among the pH tolerances, the lowest was 1.5, the highest was 10% for ethanol, 1% for bile salts, and 7% for NaCl. The scavenging abilities of screened two LABs on ABTS⁺, DPPH, O²⁻ free

收稿日期: 2022-07-07

作者简介: 焦时阳 (1998-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 生物技术与工程, E-mail: jsy5214863@163.com。

* 通信作者: 王大红 (1980-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 酿造技术与工程, E-mail: wangdahong2003@163.com。

radicals were 65.12% and 62.26%, 77.42% and 68.89%, 93.76% and 87.89%, respectively. The production of β -glucosidase were 26.37 and 30.27 IU/L. In this paper, the two LABs strains with strong biological properties were obtained from persimmon vinegar broth for plant substrate fermentation, which could provide strain resources for the development of probiotics.

Key words: persimmon vinegar broth; lactic acid bacteria; screening; identification; tolerance; acid production capacity; antioxidant capacity

柿子是我国特色的植物基水果,我国柿子种植面积占世界总种植面积的 90%,产量占世界总产量的 78%^[1],居世界之首;成熟新鲜的柿果中含有大量的维生素 A、维生素 C、钙、磷、铁等营养物质^[2]。但柿果多产于山区,虽产量大却不耐贮存和运输,导致大量柿子腐烂,由此风味物质丰富、健康营养的果醋应运而生^[3]。

乳酸菌(Lactic acid bacteria, LAB)是一类发酵碳水化合物产生乳酸的厌氧或兼性厌氧型革兰阳性细菌^[4-5]。乳酸菌代谢产生的有机酸^[6]等物质具有降低胃肠道 pH、抑制或杀死肠道病原菌^[7]、调节肠道菌群平衡^[8-9]、改善食品风味^[10]、提高食品的保藏性和附加值^[11]的特点。因而人们将乳酸菌作为一种安全无毒的功能微生物被广泛应用于食品、医药等领域^[12-13]。贺晓洁等^[14]从传统发酵辣椒制品中筛选出 1 株耐盐乳酸菌并将其应用于红酸汤生产中;朱坤^[15]、王文涛等^[16]通过筛选得到优良乳酸菌并将其应用于发酵饲料中,发现动物肉质更加健康;孙悦等^[17]从酸菜汤中分离筛选出对耐药性 *Escherichia coli* 拮抗活性较强的乳酸菌,以期利用生物抗菌剂控制耐药菌的生长。随着人们对食品健康化、多样化的消费需求,对乳酸菌在不同发酵基质中的适应性和耐受性提出了更高的要求,目前在非乳基质中现有的乳酸菌具有存在生长缓慢及需要驯化的问题^[18],因此筛选适合植物基质发酵的乳酸菌是开发益生菌类相关健康食品的关键问题之一。

研究发现自然发酵的柿子醋醪中含有一定量的具有耐高酸醇特性的乳酸菌^[19]。因此本文以自然发酵的柿子醋醪为优良乳酸菌的供体,筛选出具有产酸能力强、耐受性能好、抗氧化能力强及产 β -葡萄糖苷酶水平高且潜在具有适合于植物基质发酵能力的优良乳酸菌,为进一步应用和开发乳酸菌相关健康品提供了菌种资源。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

柿子醋醪 洛阳市柿王醋业有限公司; Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒 生工生物工程股份有限公司; E.Z.N.ATM Mag-Bind Soil DNA Kit OMEGA 生物; Qubit3.0 DNA 检测试剂盒 Life Technologies; Qubit[®] 3.0 荧光剂 美国英杰生命技术有限公司; DPPH、ABTS 上海蓝季生物科技发展有限公司; Tris 天津市科密欧化学试剂有限公司; 对硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷(pNPG) 上海源叶生

物科技有限公司; MRS 液体培养基 蛋白胨 10 g、牛肉膏 10 g、酵母粉 5 g、葡萄糖 20 g、 K_2HPO_4 2 g、柠檬酸三胺 2 g、乙酸钠 5 g、吐温 80 1 mL、 $MgSO_4$ 0.58 g、 $MnSO_4$ 0.25 g、蒸馏水 1000 mL; 选择培养基在 MRS 液体培养基的基础上添加 2% 的琼脂以及 1% 的 $CaCO_3$ 。

Pico-21 台式离心机 美国 Thermo Fisher 科技公司; UV-2600 紫外可见分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司; XSP-2CA 显微镜 上海光学仪器六厂; DYCZ-21 电泳槽 北京市六一仪器厂; FR-1000 凝胶成像系统 上海复日科技有限公司; ETC 811 PCR 仪 北京东胜创新生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 乳酸菌的分离与纯化 取柿子醋醪 3 mL 于 MRS 液体培养基中进行菌体培养,梯度稀释至 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 并吸取 200 μ L 涂布于 MRS 选择培养基上,每个稀释度做 3 个平行试验,37 $^{\circ}C$ 恒温培养 36~48 h。观察菌落,将产生溶钙圈的菌落单独选取出来,并对菌落的形态进行记录^[20]。

1.2.2 菌株形态学特性

1.2.2.1 菌落表型 观察并记录菌落的透明程度、颜色、表面光滑程度、边缘形状、大小、干湿状态及凹凸情况等。

1.2.2.2 革兰氏染色及镜检 用接种环挑取适量已纯化的不同表型的单菌落固定到载玻片上。进行革兰氏染色、镜检,选取细胞呈杆状或球状的革兰氏阳性菌进行后续实验^[21]。

1.2.3 菌株的发酵特性

1.2.3.1 菌株生长曲线 将菌株活化后,接种至 MRS 液体培养基中于 37 $^{\circ}C$ 静置培养,每隔 4 h 取样,在 600 nm 处测定吸光度,以培养时间(0~72 h)为横坐标,OD 值为纵坐标,绘制生长曲线^[22]。

1.2.3.2 产酸能力 参照步骤 1.2.3.1,每隔 4 h 取样测定总酸度值(以乳酸计)并记录。以培养时间 72 h 为横坐标, MRS 培养液的酸度值为纵坐标,绘制供试菌株产酸值动态变化曲线;总酸度测定参照 GB 12456-2021 食品中总酸的测定^[23],结果以乳酸计。

1.2.4 菌株的耐受性

1.2.4.1 耐酸性测试 将供试菌株活化后分别接种到 pH 为 1.5、2.5、3.5、4.5、5.5 的培养基中静置培养^[24],24 h 时取样测 OD₆₀₀ 值,用相应空白培养基作参比,每组实验做三次。

1.2.4.2 耐乙醇能力 将供试菌株分别接种到乙醇浓度为 2%、4%、6%、8%、10% 的培养基中静置培养^[24], 24 h 时取样测 OD₆₀₀ 值, 用相应空白培养基作参比, 每组实验做三次。

1.2.4.3 耐胆盐测试 将供试菌株分别接种到猪胆盐浓度为 0.05%、0.1%、0.5%、1.0%、1.5% 的培养基中静置培养^[24], 24 h 时取样测 OD₆₀₀ 值, 用相应空白培养基作参比, 每组实验做三次。

1.2.4.4 耐渗透压能力 将供试菌株分别接种到 NaCl 质量分数为 3%、4%、5%、6%、7%、8% 的培养基中静置培养^[25], 24 h 时取样测 OD₆₀₀ 值, 用相应空白培养基作参比, 每组实验做三次。

1.2.5 菌株的功能性分析

1.2.5.1 抗氧化性 发酵上清液的制备: 将菌株活化后, 接种至 MRS 液体培养基中 37 ℃ 静置培养。菌株传至 3 代培养 24 h 后, 10000 r/min 离心 10 min, 收集发酵上清液。

DPPH 自由基清除率的测定: 取 5 mL DPPH 溶液, 加入 0.6 mL 上清液混匀, 避光放置 30 min, 517 nm 处测其吸光度记为 A₁, 按公式计算 DPPH 自由基的清除率^[26]:

$$E(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100$$

式中: E 为自由基清除率, %; A₀ 为以蒸馏水代替样品测得的吸光度值; A₂ 为以无水乙醇代替 DPPH 溶液测得的吸光度值。

超氧阴离子自由基(O²⁻·)清除率的测定: 取 1 mL 上清液, 加入 5 mL Tris-HCl 缓冲液振荡混匀后, 加入 12 mmol/L 邻苯三酚 0.2 mL, 反应 4 min 后加入 0.2 mL 浓 HCl 终止反应, 320 nm 处测吸光度为 A₁, 按公式计算 O²⁻·清除率^[27]:

$$E(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100$$

式中: E 为自由基清除率, %; A₀ 为以蒸馏水代替样品测得的吸光度值; A₂ 为以蒸馏水代替邻苯三酚溶液测得的吸光度值。

ABTS⁺自由基清除率的测定: 取上清液 2 mL, 加入 8 mL ABTS 工作液, 振荡混匀 6 min 后于 734 nm 处测定其吸光度为 A₁, 按公式计算 ABTS⁺自由基的清除率^[28]:

$$E(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100$$

式中: E 为自由基清除率, %; A₀ 为以蒸馏水代替样品测得的吸光度值; A₂ 为以 0.2 mol/L pH7.4 的磷酸缓冲液代替 ABTS⁺工作液测得的吸光度值。

1.2.5.2 产 β-葡萄糖苷酶能力 对硝基苯酚(pNP)标准曲线: 分别配制浓度为 5、10、20、30、40、50、60 μmol/L 的 pNP 标准溶液, 分别取 2 mL 不同浓度标准溶液加入 1 mL 的 Na₂CO₃ 溶液混匀, 400 nm 下

测定其吸光度值^[29]。pNP 标准曲线方程: y=0.0123x-0.0066, R²=0.9994。

菌株培养 24 h, 4 ℃ 条件下 10000 r/min 离心 10 min, 收集菌体。用生理盐水重悬 2 次后得粗酶液。将粗酶液经沸水浴加热 10 min 即得到失活的酶液。

β-葡萄糖苷酶的活性测定: 取 0.1 mL 粗酶液, 加入 1.8 mL pH5.0 的乙酸-乙酸钠缓冲溶液, 于 37 ℃ 水浴预热 5 min; 加入已于 37 ℃ 水浴预热 10 min 的 5 mmol/L 的对硝基苯基-β-D-吡喃半乳糖苷(pNPG)溶液 1 mL, 10 min 后加入 1 mL Na₂CO₃ 溶液终止反应, 于 400 nm 处测吸光值, 以失活的酶液为空白, 计算酶活力^[30]:

$$U = \frac{C \times N}{10 \times 0.1}$$

式中: U 为酶活力, IU/L; C 为 pNP 含量, μmol/L; 10 为反应时间, min; N 为原酶液稀释倍数; 0.1 为添加酶液体积, mL。

1.3 菌株分子生物学鉴定

1.3.1 基因组 DNA 提取 采用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒(SK8255), 按照试剂盒使用说明进行细菌基因组 DNA 抽提。

1.3.2 PCR 扩增 采用引物 27F(5'-AGTTTGATC MTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-GGTTACCTTGTTA CGACTT-3')。PCR 反应体系为: Mix 混合物 15 μL; 双蒸水 12 μL; DNA 模版 1 μL; 正反引物各 1 μL, 扩增程序为: 96 ℃ 预变性 5 min; 96 ℃ 变性 20 s; 62 ℃ 退火 20 s; 72 ℃ 延伸 30 s; 共 35 个循环, 得到 PCR 产物^[31]。line-height-add:-0.3pt

1.3.3 PCR 产物检测及纯化 将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 使用 1% 琼脂糖凝胶、150 V 电压、100 mA 电流电泳 20 min 观察条带性状。按照磁珠纯化标准操作流程对 PCR 产物进行纯化。

1.3.4 测序及结果比对 对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测及纯化后上机检测, 测序工作委托六合华大基因科技有限公司进行。将测序结果进行 Blast 比对, 并采用 MEGA 7 构建系统发育树。

1.4 数据处理

采用 Excel 2016、Origin 2018、MEGA 7 和 SPSS 23.0 数据软件进行数据处理与分析。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌筛选结果

通过培养纯化, 共筛选到五株乳酸菌, 分别编号为 R1、R2、R3、R4、R5。菌落形态见图 1a: 五株乳酸菌菌落均呈乳白色且表面凸起、边缘光滑、湿润有光泽; 革兰氏染色镜检结果见图 1b: 菌株染色结果均为阳性, 细胞形态为杆状且无芽孢, 单个、成对或成簇排列。

2.2 菌株的发酵特性

2.2.1 菌株的生长曲线 根据图 1 的筛选结果, 对五

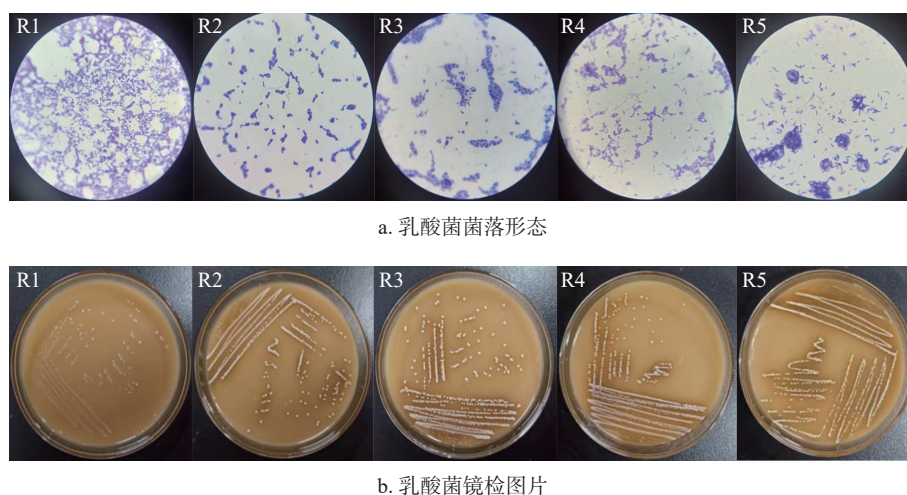
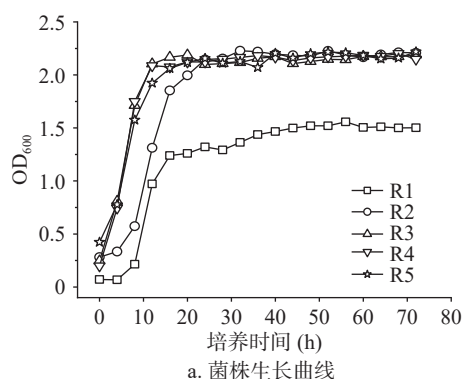


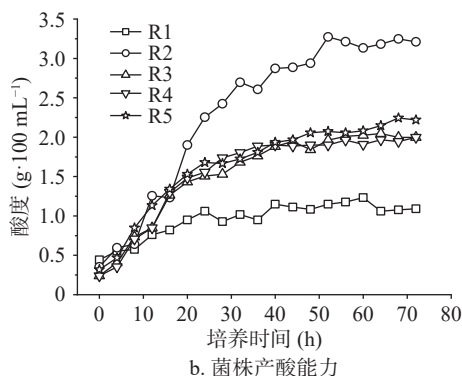
图 1 乳酸菌菌落形态及镜检图片

Fig.1 Colony morphology and microscopic pictures of lactic acid bacteria

株乳酸菌进行生长曲线研究,结果如图 2a 所示。R1~R5 均经过约 4 h 的延滞期后进入对数生长期。在前 4 h, R3~R5 的生长速度比 R1、R2 快;4 h 后均进入对数生长期,菌体量急剧增加;20 h 左右进入稳定期,菌体浓度趋于稳定,其中 R1-R4 四株乳酸菌的 OD 值在 2.0 及以上,而 R1 生长量最低。



a. 菌株生长曲线



b. 菌株产酸能力

图 2 乳酸菌生长曲线及产酸能力

Fig.2 Growth curve and acid production capacity of lactic acid bacteria

2.2.2 菌株的产酸能力 乳酸菌通过厌氧发酵产生乳酸、乙酸以及其他挥发性有机酸,使发酵的植物基质 pH 降低,从而抑制有害微生物滋生,达到改善物质营养、风味及延长保存期的目的^[7,10]。结果如图 2b 所示, R1 产酸能力最弱,在 25 h 前产酸速率稍强,25 h

后呈现小幅度波动,产乳酸量最高为 1.233 g/100 mL; R2 产酸能力最强,前 30 h 产酸速率大,30 h 后逐渐减慢,最高达到 3.248 g/100 mL; R3~R5 产酸能力差别不大,前 25 h 产酸速率较大,25 h 后产酸速度减慢,产酸量最高分别为 2.011、1.997 和 2.245 g/100 mL。五株乳酸菌产酸速率均呈现先快后慢直至不再增加的趋势,通过图 2 综合分析这可能是因为前期营养物质丰富、菌体量少,乳酸菌不断增殖而产酸速率较快;但随着营养物质的锐减、菌体量逐渐呈饱和状态,以及环境 pH 不断下降,导致乳酸菌的产酸速率减慢直至不再增加。

2.3 菌株的耐受性及功能性结果

2.3.1 菌株的耐受性

2.3.1.1 菌株耐酸能力 具有较强耐酸能力的乳酸菌才能顺利通过胃酸屏障,到达肠道内发挥其益生作用^[25]。对五株乳酸菌进行耐酸性实验,结果如表 1 所示,随着 pH 的不断减小,菌株的生长能力呈减弱趋势,说明环境 pH 降低后,乳酸菌的生长受到了一定程度的阻碍,甚至死亡,菌体量急剧下降。在 pH 为 1.5~2.5 时, R2~R5 的生长受到抑制,但仍有一定的存活和生长;而 R1 在五组不同 pH 条件下,均呈现较低的生长量,说明 R1 的耐酸性最差。pH 为 2.5 时, R4 生长情况最好,其 OD 值为 0.25, R2、R3、R5 没有明显差别;在 pH 为 3.5 时, R5 生长情况最佳,其 OD 值高达 1.194,其次是 R3、R2 和 R4。姜蕾等^[32]对筛得的 axb74 和 axb79 菌株进行耐酸性实验,结果发现 axb74 最高耐酸为 pH3.5,其 OD 值为 0.18; axb79 最高耐酸为 pH3.0,其 OD 值为 0.16。本实验筛得的菌株 R2~R5 在 pH1.5 和 pH2.5 时 OD 值均在 0.13 以上;当 pH 为 3.5 及以上时, OD 值高达 0.4 以上,其耐酸性远远优于 axb74 和 axb79 菌株。

2.3.1.2 菌株耐乙醇能力 在植物基质发酵过程中通常会加入酵母菌等益生菌进行协同发酵,而酵母菌在发酵过程中会产生乙醇^[33-34],因此耐乙醇能力也是

表 1 菌株耐酸能力
Table 1 Acid resistance of the strains

菌株编号	不同pH对应的OD值				
	1.50	2.50	3.50	4.50	5.50
R1	0.033±0.002 ^{Bb}	0.035±0.002 ^{Cb}	0.040±0.001 ^{Eb}	0.062±0.006 ^{Eb}	0.068±0.004 ^{Ba}
R2	0.135±0.002 ^{Ad}	0.144±0.003 ^{Bd}	0.616±0.004 ^{Cc}	2.029±0.029 ^{Bb}	2.477±0.067 ^{Aa}
R3	0.144±0.005 ^{Ad}	0.143±0.003 ^{Bd}	0.724±0.008 ^{Bc}	1.73±0.032 ^{Db}	2.472±0.031 ^{Aa}
R4	0.161±0.002 ^{Ac}	0.250±0.014 ^{Ad}	0.418±0.008 ^{Dc}	1.876±0.025 ^{Cb}	2.468±0.096 ^{Aa}
R5	0.146±0.001 ^{Ad}	0.166±0.005 ^{Bd}	1.194±0.009 ^{Ac}	2.104±0.019 ^{Ab}	2.478±0.108 ^{Aa}

注: 不同大写字母表示同一pH不同菌株差异显著($P<0.05$); 不同小写字母表示同一菌株不同pH差异显著($P<0.05$)。

筛选乳酸菌的重要指标。对五株乳酸菌进行耐乙醇实验, 结果如表 2 所示, 随着乙醇浓度的不断增加, 菌株的生长能力呈显著减弱趋势, 说明在高浓度的乙醇中乳酸菌的生长会受到一定程度的影响。在耐乙醇能力实验中, 由表 2 可知 R4 的耐乙醇能力最强, R1 最差。当乙醇浓度为 4% 时, R4 和 R2 的菌体量最大。当乙醇浓度提高到 10% 时, R4 和 R5 的菌体量最大, R3、R2 次之, 但这四株乳酸菌的 OD 值仍高达 0.95 以上; 有文献 [32] 报道发现筛得的 axb74 和 axb79 菌株在乙醇浓度为 10% 时, 菌株 R2~R5 的 OD 值远大于 axb74 和 axb79 菌株的 OD 值。

2.3.1.3 菌株耐胆盐能力 小肠内胆盐的含量一般在 0.03%~0.3%, 只有具有一定胆盐耐受能力的乳酸菌才能通过肠道, 进而对人体发挥其益生作用, 因此乳酸菌的耐胆盐能力也是在肠道存活的重要条件[35]。五株乳酸菌对胆盐的耐受性能测试数据如表 3 所示, 其结果表明, 除 R1 外, 其余四株乳酸菌在胆盐浓度为 0.05%~0.5% 时生长状态良好, 其中 R2 和 R3 表现出了较强的胆盐耐受性, 其 OD 值均在 0.99 以上, 说明可以在正常的胆盐范围内大量存活。

胆盐浓度为 1% 时, 菌株的胆盐耐受性能均减弱, 但 R3、R2 仍有大量菌体存活; 当胆盐浓度为上升至 1.5% 时, R2 生长情况明显高于其他四株乳酸菌。相较王娴等[36]研究的乳酸菌 A、B, 菌株 R2~R5 的耐胆盐能力更好。

2.3.1.4 菌株耐渗透压能力 当体内渗透压浓度突然变化时会影响乳酸菌生长代谢[25]。因此对五株乳酸菌进行了耐渗透压实验, 结果如表 4 所示, 五株乳酸菌生长能力均随着 NaCl 浓度的增大而显著降低, 说明 NaCl 浓度对菌株的生长有一定的抑制作用。在相同 NaCl 浓度环境条件下各菌株的生长状态不同, 表明不同菌株对 NaCl 的耐受能力有差异。R2、R3 表现的耐渗透压能力最强, R1 最差。当 NaCl 浓度为 3~5% 时, R5 生长状态良好, OD 值均稳定在 1.69 以上; 当 NaCl 浓度升高到 6% 及以上时, R2 和 R3 的生长能力明显高于其他三株乳酸菌, 说明 R2 和 R3 相比较其他菌株具有较强的耐渗透压能力。王娴等[36]在对 A、B 两株乳酸菌进行耐渗透压实验时发现: 当 NaCl 浓度为 7%、培养 24 h 时, 乳酸菌 A 的 OD 值为 0.4 左右, 乳酸菌 B 的 OD 值仅为 0.1 左右,

表 2 菌株耐乙醇能力
Table 2 Ethanol resistance of the strains

菌株编号	不同乙醇浓度对应的OD值				
	2%	4%	6%	8%	10%
R1	1.098±0.007 ^{Ca}	0.990±0.008 ^{Db}	0.562±0.003 ^{Dc}	0.167±0.011 ^{Dd}	0.086±0.006 ^{Ee}
R2	2.405±0.035 ^{Ba}	2.121±0.019 ^{Bb}	1.837±0.017 ^{Bc}	1.663±0.005 ^{Bd}	0.950±0.004 ^{De}
R3	2.402±0.045 ^{Ba}	1.917±0.008 ^{Cb}	1.706±0.010 ^{Cc}	1.330±0.004 ^{Cd}	1.075±0.003 ^{Ce}
R4	2.635±0.034 ^{Aa}	2.370±0.135 ^{Ab}	2.108±0.012 ^{Ac}	1.902±0.026 ^{Ad}	1.611±0.008 ^{Ae}
R5	2.645±0.031 ^{Aa}	2.117±0.032 ^{Bb}	2.080±0.022 ^{Ab}	1.904±0.015 ^{Ac}	1.481±0.016 ^{Bd}

注: 不同大写字母表示同一乙醇浓度下不同菌株差异显著($P<0.05$); 不同小写字母表示同一菌株不同乙醇浓度下差异显著($P<0.05$)。

表 3 菌株耐胆盐能力
Table 3 Bile salt tolerance of the strains

菌株编号	不同猪胆盐浓度对应的OD值				
	0.05%	0.1%	0.5%	1%	1.5%
R1	0.094±0.006 ^{Dd}	0.350±0.006 ^{Eb}	0.702±0.003 ^{Da}	0.146±0.002 ^{Dc}	0.046±0.010 ^{De}
R2	1.992±0.012 ^{Ba}	1.942±0.017 ^{Ba}	0.996±0.005 ^{Bb}	0.538±0.004 ^{Bc}	0.421±0.016 ^{Ad}
R3	2.063±0.016 ^{Aa}	2.060±0.026 ^{Aa}	1.108±0.003 ^{Ab}	0.663±0.005 ^{Ac}	0.133±0.020 ^{Cd}
R4	1.693±0.013 ^{Ca}	0.835±0.008 ^{Dc}	1.026±0.010 ^{Bb}	0.528±0.003 ^{Bd}	0.109±0.009 ^{Ce}
R5	2.083±0.041 ^{Aa}	0.993±0.004 ^{Cb}	0.743±0.008 ^{Cc}	0.477±0.021 ^{Cd}	0.367±0.014 ^{Be}

注: 不同大写字母表示同一胆盐浓度下不同菌株差异显著($P<0.05$); 不同小写字母表示同一菌株不同胆盐浓度下差异显著($P<0.05$)。

表 4 菌株耐渗透压能力

Table 4 Osmotic pressure resistance of strains

菌株编号	不同NaCl浓度对应的OD值				
	3%	4%	5%	6%	7%
R1	0.582±0.005 ^{Ca}	0.437±0.037 ^{Cb}	0.285±0.002 ^{Ec}	0.212±0.004 ^{Dc}	0.082±0.003 ^{Cd}
R2	2.432±0.025 ^{Aa}	2.270±0.046 ^{Ab}	1.906±0.011 ^{Bc}	1.237±0.014 ^{Ad}	0.605±0.002 ^{Ae}
R3	2.398±0.081 ^{Aa}	2.222±0.016 ^{Ab}	1.695±0.012 ^{Cc}	1.101±0.004 ^{Bd}	0.664±0.012 ^{Ae}
R4	2.085±0.033 ^{Ba}	1.646±0.008 ^{Bb}	1.212±0.004 ^{Dc}	0.718±0.004 ^{Cd}	0.466±0.008 ^{Be}
R5	2.350±0.097 ^{Aa}	2.256±0.128 ^{Aa}	2.081±0.018 ^{Ab}	0.792±0.003 ^{Cc}	0.488±0.005 ^{Bd}

注: 不同大写字母表示同一NaCl浓度下不同菌株差异显著($P<0.05$); 不同小写字母表示同一菌株不同NaCl浓度下差异显著($P<0.05$)。

其耐渗透压能力低于菌株 R2~R5。

2.3.2 菌株的功能性

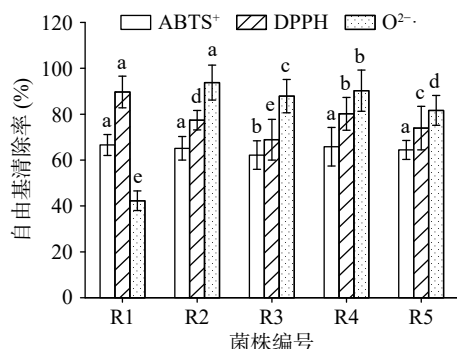
2.3.2.1 菌株的抗氧化性 当机体代谢过程中产生的自由基含量过高时,生物大分子与其结合会造成机体损伤,引发多种疾病^[37]。因此探究了这五株乳酸菌清除 ABTS⁺、DPPH 和 O²⁻自由基的能力。如图 3a 可知,五株菌株对 ABTS⁺自由基的清除能力无明显差异,且均大于 60%;R1 对 DPPH 自由基的清除能力高达 89.69%,其余四株乳酸菌对的 DPPH 自由基的清除率也均高于 65%,且 R1 对 DPPH 自由基的清除能力明显高于 R2~R5;对 O²⁻自由基的清除能力 R2~R5 均在 80% 以上,其中 R2 高达 93.76%,均远远高于 R1 清除 O²⁻自由基的能力。王晓鹏等^[38]在人源乳酸菌抗氧化实验中,筛选的乳酸菌对 DPPH 自由基的清除能力与 R1~R5 清除能力相差不大,但

R1~R5 对 O²⁻自由基的清除能力远大于其筛得的乳酸菌。通过结果综合表明,除 R1 外,R2~R5 四株菌株对三种自由基的清除能力均比较强。

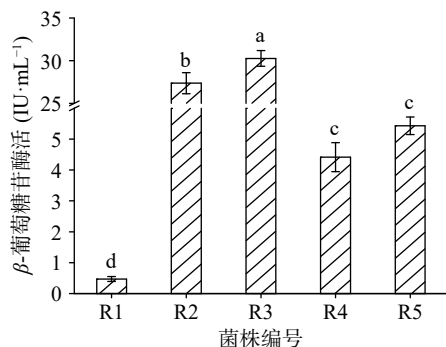
2.3.2.2 菌株的产 β -葡萄糖苷酶能力 β -葡萄糖苷酶可以使得一些植物基发酵物如水果、茶叶中的风味前体物质水解为有浓郁天然风味的香气物质,同时也可以协助纤维素酶降解纤维素^[38],因此乳酸菌的产 β -葡萄糖苷酶能力是衡量其发酵性能的重要指标。根据 pNP 标准曲线得出 pNP 浓度,最终测得五株乳酸菌产 β -葡萄糖苷酶能力如下图 3b 所示,菌株产 β -葡萄糖苷酶能力最强的是 R3,其次为 R2,分别为 30.27 和 26.37 IU/L;最差的是 R1,仅为 0.47 IU/L。钱超等^[39]在筛选高产 β -葡萄糖苷酶的乳酸菌实验中发现,各个菌株间酶活差异较大,从 2.2 到 10.1 U/g。本实验结果符合菌株间酶活差异较大的特点。

2.4 菌株的生物学鉴定结果

综合对比以上五株菌株的发酵特性、耐受性以及功能特性的结果分析,最终选择相对综合能力较强的 R2、R3 进行后续实验。R2、R3 的 PCR 产物电泳结果如下图 4 所示,条带清晰可进行后续实验。测序结果为:R2 和 R3 的 16S rDNA 序列碱基数分别为 1492 和 1460 bp。



a. 菌株抗氧化能力

b. 菌株产 β -葡萄糖苷酶能力图 3 菌株抗氧化能力及产 β -葡萄糖苷酶能力Fig.3 Antioxidant capacity and the ability to produce β -glucosidase of strains

注: 字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

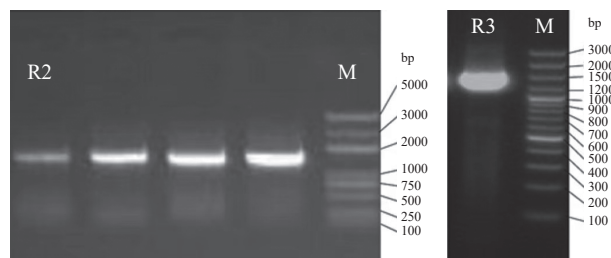


图 4 菌株 R2、R3 的 PCR 扩增产物

Fig.4 PCR amplification products of strains R2 and R3

注: M 为 marker。

根据 Blast 结果,用软件 MEGA 7 对 16S rDNA 进行同源性分析,构建系统发育树,结果如图 5 所示。R2 和 R3 分别与嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)和植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)同源性达到 100% 和 99%。

3 结论

本研究通过采用纯化培养方式从柿子醋醪中分

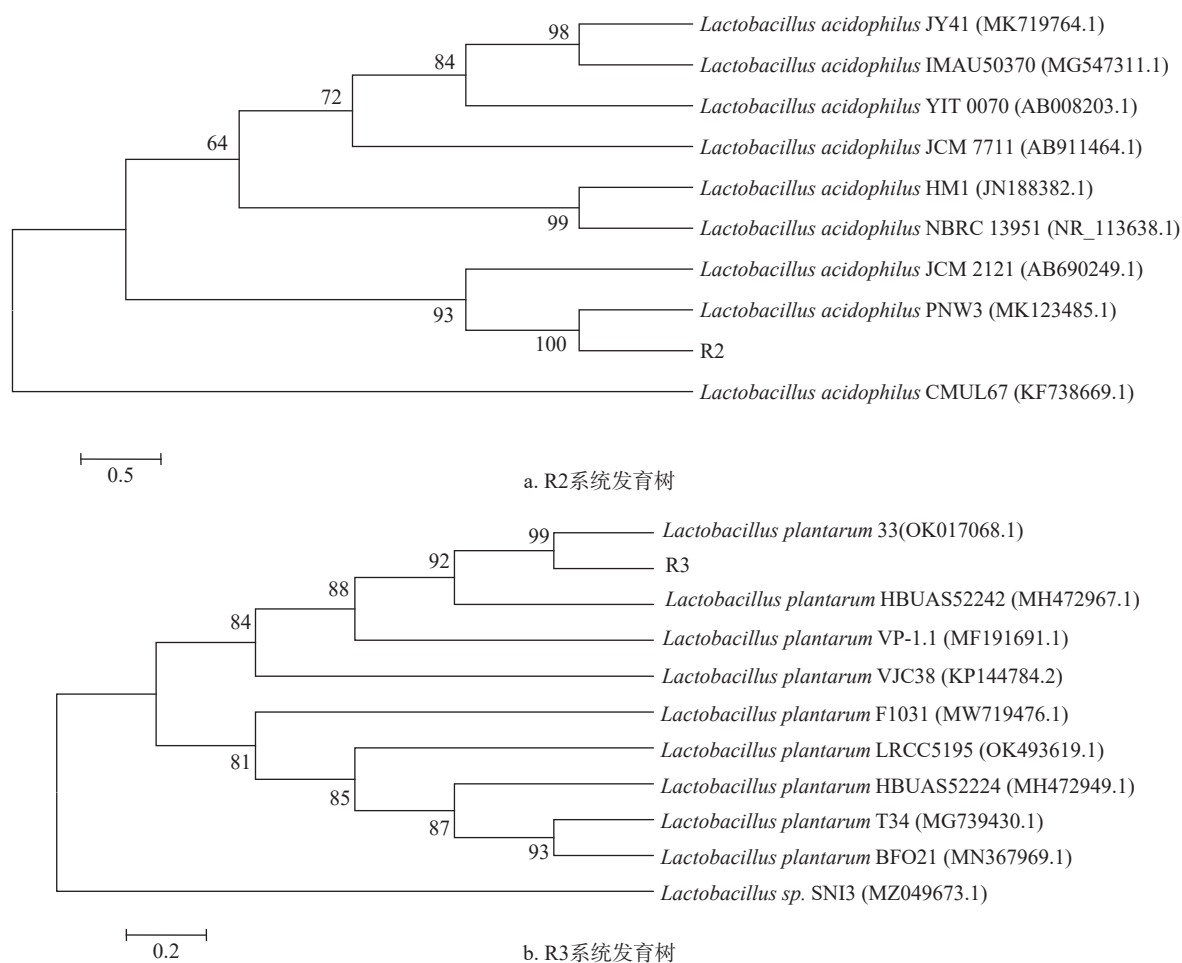


图 5 R2、R3 系统发育树

Fig.5 Phylogenetic trees of R2 and R3

离出五株乳酸菌,经过产酸能力、耐受性、抗氧化能力和产 β -葡萄糖苷酶能力分析,最终筛选得到两株综合能力突出的乳酸菌,其经过形态学和 16S rDNA 序列鉴定后,确定其为 *Lactobacillus acidophilus* 和 *Lactobacillus plantarum*。

两株乳酸菌产酸能力分别为 2.00、2.24 g/100 mL,产 β -葡萄糖苷酶能力分别为 26.37、30.27 IU/L;其在耐受性实验中均表现出良好的耐受能力,尤为突出的是其耐渗透压能力,当 NaCl 浓度升高到 6% 及以上时两株乳酸菌的生长能力明显高于其他菌株;且其也同时具备良好的 ABTS⁺、DPPH 和 O²⁻ 自由基清除能力。

研究结果表明这两株乳酸菌具有产酸能力强、耐受性能好、抗氧化能力强及产 β -葡萄糖苷酶水平高的优良品质。本实验从柿子醋醪中筛得五株乳酸菌,对乳酸菌的耐受性和功能性进行了分析,结果发现两株性能优良的乳酸菌可作为植物基质发酵的潜在益生菌;接下来可以对乳酸菌在植物基质上的发酵能力进一步分析,为适用于非乳基质上的乳酸菌提供菌种资源。

参考文献

[1] 刘滔,朱维,李春美.我国柿子加工产业的现状与对策[J].

食品工业科技,2016,37(24):369-375. [LIU T, ZHU W, LI C M. Present situation and countermeasures of persimmon processing industry in China[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(24): 369-375.]

[2] 张清安,陈锦屏,刘平,等.柿产品的综合开发利用[J].农产品开发,2001(5):23-24. [ZHANG Q A, ZHEN J P, LIU P, et al. Comprehensive development and utilization of persimmon products[J]. Agriculture Products Development, 2001(5): 23-24.]

[3] 包蓉,郑皓,芦艳,等.柿果醋自然发酵下优势酵母菌的分离鉴定[J].中国酿造,2012,31(3):78-82. [BAO R, ZHENG H, LU Y, et al. Separation and identification of superior yeast at natural fermentation condition[J]. China Brewing, 2012, 31(3): 78-82.]

[4] 李军训,罗学刚,高洁,等.益生菌的分类、生理功能与有效性评价研究进展[J].中国农业科技导报,2010,12(6):49-55. [LI J X, LUO X G, GAO J, et al. Research progress on classification, physiological function and validity evaluation of probiotics[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2010, 12(6): 49-55.]

[5] 石青松.乳酸菌发酵饲料的制作及其对断奶仔猪生长性能和肠道健康的影响[D].南京:南京农业大学,2016. [SHI Q S. Production of lactic acid bacteria fermented solid feed and study on its effect on growth performance and intestine health in piglets[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016.]

[6] VUYST L D, LEROY F. Functional role of yeasts, lactic acid bacteria, and acetic acid bacteria in cocoa fermentation processes

- [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2020, 44(4): 432–453.
- [7] HAI D, KONG L, LU Z, et al. Inhibitory effect of different chicken erived lactic acid bacteria isolates on drug resistant *Salmonella* SE47 isolated from eggs[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2021, 73(1): 54–63.
- [8] LIU H, ZHANG J, ZHANG S, et al. Oral administration of *Lactobacillus fermentum* I5007 favors intestinal development and alters the intestinal microbiota in formula-fed piglets[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(4): 860.
- [9] LIU Z J, XU C, TIAN R, et al. Screening beneficial bacteriostatic lactic acid bacteria in the intestine and studies of bacteriostatic substances[J]. *Journal of Zhejiang University-Science B*, 2021, 22(7): 533–547.
- [10] WANG Y Q, WU J T, LÜ M X, et al. Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 9: 612285.
- [11] MUCK R E, NADEAU E M G, MCALLISTER T A, et al. Silage review: Recent advances and future uses of silage additives[J]. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(5): 3980–4000.
- [12] RODRIGUEZ H, CURIÉL J A, LANDETE J M, et al. Food phenolics and lactic acid bacteria[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 132(2-3): 79–90.
- [13] 翟清燕, 郑世超, 李新玲, 等. 乳酸菌的分类鉴定及在食品工业中的应用[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10: 5260–5265. [ZHAI Q Y, ZHENG S C, LI X L, et al. Classification and identification of lactic acid bacteria and application in food industry[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2019, 10: 5260–5265.]
- [14] 贺晓洁, 赵良忠, 李明, 等. 耐盐乳酸菌的筛选及其诱变育种与耐受性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(1): 84–90. [HE X J, ZHAO L Z, LI M, et al. Screening and breeding of salt-tolerant lactic acid bacteria[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2022, 48(1): 84–90.]
- [15] 朱坤. 发酵饲料对育肥猪生长性能、肉质及结肠微生物的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2018. [ZHU K. Effects of fermented feed on growth performance, meat quality and colon microbiota in finishing pigs[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2018.]
- [16] 王文涛, 何鑫森, 吴赛辉, 等. 发酵饲料对巴民杂交猪肉品质能影响的研究[J]. *猪业科学*, 2021, 38(10): 118–120. [WANG W T, HE X M, WU S H, et al. Effect of fermented feed on meat quality of hybrid of Berkshire pig and Min pig[J]. *Swine Industry Science*, 2021, 38(10): 118–120.]
- [17] 孙悦, 刘佳伊, 陈璐, 等. 抗耐药性大肠杆菌乳酸菌的筛选及抑菌机制[J]. *食品科学*, 2021, 42(2): 121–127. [SUN Y, LIU J Y, CHEN L, et al. Screening of lactic acid bacteria for antagonistic activity against drug-resistant *Escherichia coli* and underlying mechanism[J]. *Food Science*, 2021, 42(2): 121–127.]
- [18] SALMERÓN I. Fermented cereal beverages: From probiotic, prebiotic and synbiotic towards Nanoscience designed healthy drinks[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2017, 65(2): 114–124.
- [19] WANG D H, WANG M Y, CAO L W, et al. Changes and correlation of microorganism and flavor substances during persimmon vinegar fermentation[J]. *Food Bioscience*, 2022, 46: 101565.
- [20] 卢佳音. 发酵蔬菜中菌的分离鉴定及其益生性研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2018. [LU J Y. The isolation, identification and probiotic properties of lactic acid bacteria from sauerkraut[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2018.]
- [21] 赵山山, 杨园园, 周玉岩, 等. 贵州泡菜中乳酸菌的分离鉴定及其在泡菜发酵中的应用[J]. *中国酿造*, 2020, 39(12): 113–119. [ZHAO S S, YANG Y Y, ZHOU Y Y, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Guizhou pickles and its application in pickle fermentation[J]. *China Brewing*, 2020, 39(12): 113–119.]
- [22] 栗永乐. 酸菜中乳酸菌的分离鉴定以及益生特性的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2012. [JIA Y L. The isolation, identification and probiotic properties of lactic acid bacteria from sauerkraut[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2012.]
- [23] 中华人民共和国国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. GB 12456-2021 食品安全国家标准食品中总酸的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2021. [National Health Commission of the People's Republic of China, State Administration for Market Regulation. GB 12456-2021 National food safety standard for determination of total acids in food[S]. Beijing: China Standard Press, 2021.]
- [24] 林龙镇, 邹卫玲, 李安章, 等. 产酸、耐酸乳酸菌的分离鉴定及益生特性[J]. *华南农业大学学报*, 2018, 39(2): 95–102. [LIN L Z, ZOU W L, LI A Z, et al. Isolation, identification and probiotic characteristics of acid-producing and acid-resistant *Lactobacillus* strains[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2018, 39(2): 95–102.]
- [25] 降初祝玛, 陈炼红, 张岩. 传统牦牛酸奶源高产胞外多糖乳酸菌特性及发酵性能[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(21): 140–147. [JIANG C Z M, CHEN L H, ZHANG Y. The characteristics and fermentation performance of lactic acid bacteria with high extracellular polysaccharide production from traditional yak yogurt[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(21): 140–147.]
- [26] TANTICHARAKUNSIRI W, MANGMOOL S, WONGSA-RIYA K, et al. Characteristics and upregulation of antioxidant enzymes of kitchen mint and oolong tea kombucha beverages[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2021, 45(1): e13574.
- [27] CHENG H, HUANG G L, HUANG H L. The antioxidant activities of carboxymethylated garlic polysaccharide and its derivatives[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 140: 1054–1063.
- [28] XIA T, YAO J H, ZHANG J, et al. Evaluation of nutritional compositions, bioactive compounds, and antioxidant activities of Shanxi aged vinegars during the aging process[J]. *Journal of Food Science*, 2018, 83(10): 2638–2644.
- [29] 李志华. 产 β -葡萄糖苷酶乳酸菌菌株的特性研究[D]. 延吉: 延边大学, 2014. [LI Z H. Study on characteristics of lactic acid bacteria strains producing β -glucosidase[D]. Yanji: Yanbian University, 2014.]
- [30] 刘德海, 郝益民, 岳丹丹, 等. 一株产 β -葡萄糖苷酶菌株的筛选及酶学性质研究[J]. *中国酿造*, 2013, 32(6): 47–51, 60. [LIU

- D H, HAO Y M, YUE D D, et al. Isolation of a strain with β -glucosidase and its enzymatic properties[J]. *China Brewing*, 2013, 32(6): 47–51,60.]
- [31] DOMINGOS-LOPES M F P, STANTON C, ROSS P R, et al. Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese[J]. *Food Microbiology*, 2017, 63: 178–190.
- [32] 姜蕾,周雪燕,王斌,等. 新疆酿酒葡萄表皮乳酸菌的分离鉴定及耐受性分析[J]. *中国酿造*, 2018, 37(12): 71–75. [JIANG L, ZHOU X Y, WANG B, et al. Isolation, identification and tolerance analysis of lactic acid bacteria from Xinjiang wine grape skin[J]. *China Brewing*, 2018, 37(12): 71–75.]
- [33] 王静涵,张斯童,滕利荣,等. 益生菌发酵中药的研究现状及产品开发[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(14): 337–343,348. [WANG J H, ZHANG S T, TENG L R, et al. Research status and product development of probiotic fermentation of traditional Chinese medicine [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(14): 337–343,348.]
- [34] 豆康宁. 微生物发酵法改良大豆肽风味[J]. *中国粮油学报*, 2018, 33(2): 31–35,66. [DOU K N. Improvement of soybean peptide flavor by microbial fermentation[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2018, 33(2): 31–35,66.]
- [35] 赵小茜,魏旭丹,陈戴玲,等. 产多糖植物乳杆菌的耐酸耐胆盐能力[J]. *乳业科学与技术*, 2016, 39(3): 1–3. [ZHAO X Q, WEI X D, CHEN D L, et al. Acid and bile salt tolerance of exopolysaccharide-producing strains of *Lactobacillus plantarum*[J]. *Journal of Dairy and Technology*, 2016, 39(3): 1–3.]
- [36] 王娟,赵湘涛. 两株乳酸菌的耐受特性分析与研究[J]. *中国酿造*, 2013, 32(11): 87–90. [WANG X, ZHAO X T. Analysis and study on the tolerance property of two lactic acid bacteria[J]. *China Brewing*, 2013, 32(11): 87–90.]
- [37] 李唤宇,高原,牟光庆,等. 乳酸菌抗氧化活性研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(7): 194–202. [LI H Y, GAO Y, MOU G Q, et al. Antioxidant activity of lactic acid bacteria[J]. *Food Research and Development*, 2019, 40(7): 194–202.]
- [38] 王小鹏,闫爽,高亚欣,等. 人源乳酸菌的筛选鉴定及抗氧化活性研究[J]. *中国乳品工业*, 2022, 50(6): 16–21,64. [WANG X P, YAN S, GAO Y X, et al. Identification and antioxidant analysis of lactobacillus from elder people intestine[J]. *China Dairy Industry*, 2022, 50(6): 16–21,64.]
- [39] 钱超,杨文丹,张宾乐,等. 高产 β -葡萄糖苷酶的乳酸菌在葡萄汁酸面团面包中的应用[J]. *食品与机械*, 2017, 33(5): 14–20. [QIAN C, YANG W D, ZHANG B L, et al. Application of high producing β -glucosidase lactic acid bacteria in raisin sourdough bread [J]. *Food and Machinery*, 2017, 33(5): 14–20.]