

人肠道乳酸片球菌的分离鉴定及其发酵枸杞汁性能分析

李晓静, 魏晓博, 程雪, 张志刚, 刘洪涛, 刘慧燕, 方海田

Isolation and Identification of *Pediococcus lactis* in Human Intestinal Tract and Its Performance Analysis of Fermented Goji Berry Juice

LI Xiaojing, WEI Xiaobo, CHENG Xue, ZHANG Zhigang, LIU Hongtao, LIU Huiyan, and FANG Haitian

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023020207>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

宁夏自然发酵泡菜中乳酸菌的分离鉴定及其在枸杞汁发酵中的应用

Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Naturally Fermented Pickles from Ningxia and Its Application in Goji Berry Juice Fermentation

食品工业科技. 2021, 42(23): 126-134 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021030363>

溶藻弧菌噬菌体Va2001的分离鉴定及其应用

Isolation and Identification of a *Vibrio alginolyticus* Bacteriophage Va2001 and Its Application

食品工业科技. 2021, 42(23): 102-109 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021020103>

一株产 γ -PGA的芽孢杆菌的分离鉴定及发酵条件的优化

Isolation and Identification of a Strain of *Bacillus* Producing γ -PGA and Its Fermentation Conditions Optimization

食品工业科技. 2018, 39(19): 101-108 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.19.018>

自然发酵酸浆中一株高产酸菌的分离与鉴定

Isolation and Identification of a High Acid-Producing Lactic Acid Bacteria in Acidic Fermentation Broth of Tofu

食品工业科技. 2019, 40(9): 105-108,114 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.09.019>

传统发面中乳酸菌的分离与鉴定

Isolation and identification of lactic acid bacteria from Chinese traditional sourdough

食品工业科技. 2017(14): 141-145 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.14.028>

一株高产丁酸的丁酸梭菌分离鉴定及其生物学性质研究

Isolation and Identification of a Strain of *Clostridium butyricum* with High Yield of Butyric Acid and Its Biological Characteristics

食品工业科技. 2020, 41(7): 82-88,101 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.07.015>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

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. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020207

LI Xiaojing, WEI Xiaobo, CHENG Xue, 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. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020207

· 生物工程 ·

人肠道乳酸片球菌的分离鉴定及其发酵枸杞汁性能分析

李晓静¹, 魏晓博¹, 程雪², 张志刚², 刘洪涛², 刘慧燕^{1,*}, 方海田^{1,*}

(1. 宁夏大学食品科学与工程学院, 宁夏微生物应用技术与安全控制重点实验室, 宁夏银川 750021;

2. 湖北中医药大学基础医学院, 湖北武汉 430065)

摘要: 为获取定植能力强和枸杞汁发酵性能优良的候选菌株, 从人肠道中分离筛选出 3 株乳酸菌。通过形态、生理生化、16S rDNA 序列分析及系统发育树构建进行鉴定, 并对其耐酸、耐胆盐、耐人工胃液、肠液及其发酵性能进行研究, 研究其定植能力和发酵性能。结果表明, 经鉴定 3 株均为乳酸片球菌 (*Pediococcus lactis*), 分别编号为 NXU_220218、NXU_220219 和 NXU_220220。其中 NXU_220218 在 2~8 h 生长速度较快, 产酸能力较强, 对酸、胆盐、人工胃液的耐受能力均优于 NXU_220219 和 NXU_220220, 在 pH 为 2 时的存活率约为 67%, 在浓度为 0.3% 的牛胆盐中的存活率约为 65%, 对人工胃液的耐受能力为 72%, 人工肠液的耐受能力达到 95%。将菌株 NXU_220218 接种于枸杞汁中发酵, 经测定发现发酵枸杞汁中的还原糖含量显著降低, 自由基清除率显著提高, 表明其对枸杞汁具有良好的发酵性能, 可作为乳酸菌的候选菌株应用于枸杞汁的发酵。

关键词: 肠道, 乳酸片球菌, 分离, 鉴定, 枸杞汁, 发酵性能, 耐受性

中图分类号: Q939.99

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)22-0143-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020207

本文网刊:



Isolation and Identification of *Pediococcus lactis* in Human Intestinal Tract and Its Performance Analysis of Fermented Goji Berry Juice

LI Xiaojing¹, WEI Xiaobo¹, CHENG Xue², ZHANG Zhigang², LIU Hongtao², LIU Huiyan^{1,*}, FANG Haitian^{1,*}

(1. Ningxia Key Laboratory of Food Microbiology Application Technology and Safety Control, School of Food Science and Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750021, China;

2. College of Basic Medical Sciences, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

Abstract: In order to obtain candidate strains with strong colonization ability and excellent fermentation performance of goji berry juice, 3 strains of lactic acid bacteria were isolated and screened from human intestinal tract. They were identified by morphological, physiological and biochemical, 16S rDNA sequence analysis and phylogenetic tree construction, and their acid resistance, bile salt resistance, artificial gastric fluid, intestinal fluid resistance and fermentation performance were studied. The results showed that all three strains were identified as *Pediococcus lactis*, numbered NXU_220218, NXU_220219 and NXU_220220, respectively. The growth rate from 2 to 8 h, the ability of NXU_220218 to produce acid was stronger, and the tolerance to acid, bile salt and artificial gastric juice was better than NXU_220219 and NXU_220220. The survival rate of NXU_220218 was 67% at pH2, 65% in bovine bile salt at 0.3% concentration, 72% tolerance to artificial gastric juice, and 95% tolerance to artificial intestinal juice. Finally, the NXU_220218 strain was inoculated and

收稿日期: 2023-02-23

基金项目: 宁夏重点研发计划项目 (2017BY069); 宁夏食品微生物应用技术与安全控制重点实验室平台建设项目 (2021JCTJ0030); 自治区青年拔尖人才工程 (2019); 宁夏大学贺兰山学者项目 (2020)。

作者简介: 李晓静 (1996-), 女, 硕士, 研究方向: 健康食品生物制造, E-mail: 826636862@qq.com。

* 通信作者: 刘慧燕 (1977-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 健康食品生物制造, E-mail: liuhy@nxu.edu.cn。

方海田 (1978-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 健康食品生物制造, E-mail: fanght@nxu.edu.cn。

used in the preparation of fermented goji berry juice. It was found that the reducing sugar content and the free radical scavenging rate in the fermented goji berry juice were significantly reduced and increased, respectively, compared with the unfermented goji berry juice, indicating that the NXU_220218 strain had good fermentation performance for goji berry juice and could be used as a candidate strain of lactic acid bacteria for the fermentation of goji berry juice.

Key words: intestinal; *Pediococcus lactis*; isolation; identification; goji berry juice; fermentation properties; tolerability

枸杞中含有多种活性成分。其中枸杞多糖是最丰富的活性成分,具有丰富的药理活性和保健活性^[1],如降血糖、抗氧化、增强免疫力等作用^[2-3]。枸杞中的有效成分可以改善肠道微生物群的组成和丰度^[4],而枸杞对肠道微生物组、微生物代谢产物及其相互作用的影响的研究仍然非常有限^[5]。

乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)是一类对宿主有益的活性微生物,进入并定植在胃肠道后,能够与宿主共生,从而构成一个复杂的微生态环境^[6]。乳酸菌不仅可以调节人体代谢平衡,还是发酵产品中的主要微生物^[7],其在发酵过程中,不仅可以改善食品本身带有的气味及产品特性,还可以提高产品营养价值^[8-10]。此外,乳酸菌在发酵过程中,产生大量的蛋白酶及各种微量的脂肪酶,可将食品中的大分子物质蛋白质和脂肪降解为更易被人体吸收的小分子氨基酸及脂肪酸等。其自身不仅可以合成维生素 B1、B2、B3、B5 等,还可以产生某些游离氨基酸或氨基酸衍生物,抑制丙烯酰胺的合成^[11-12]。乳酸菌在食品行业应用广泛,常被用来发酵酸奶及其他乳制品、蔬菜以及肉制品等^[13]。由于枸杞自身并没有突出的香味,并且药味浓重,使用商业乳酸菌发酵剂发酵的枸杞汁风味和口感不佳,影响了乳酸菌发酵枸杞汁饮品的生产和市场开发^[14]。因此,开发新的发酵剂来改善枸杞汁的药味浓重和口感不佳具有重要意义,而从人肠道筛选一株安全、有益且发酵性能优良的乳酸菌的相关研究较少。

本研究从人肠道分离筛选乳酸菌,通过形态观察、分子生物学方法对其进行鉴定,并对其耐酸、耐胆盐及发酵性能进行测定,筛选性能优良的乳酸菌,最后将其应用到发酵枸杞汁中。对发酵前后的枸杞汁中多糖、还原糖及抗氧化能力进行对比分析,以期改善发酵枸杞汁的品质和风味,为发酵枸杞汁的工业化生产和新发酵剂的制备提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

枸杞 宁夏中宁枸杞产业创新研究院提供(采收时间:2021 年 6 月);细菌基因组 DNA 提取试剂盒 北京索莱宝科技有限公司;6% 苯酚、浓硫酸、3,5-二硝基水杨酸(3,5-Dinitrosalicylic acid, DNS)、0.2 mmol/L 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 2,2-Diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl, DPPH)、30 mmol/L 吩嗪硫酸甲酯(Phenazine methosulfate, PMS)、338 μmol/L 还原

型辅酶 I (Nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)、72 μmol/L 氯化硝基四氮唑蓝(Nitroterazolum blue chloride, NBT) 国药集团化学试剂有限公司;琼脂糖 北京擎科生物科技有限公司;牛胆盐、HCl 特正商贸有限公司;MRS 培养基 青岛高科技工业园海生物技术有限公司。

BXM-30R 压力蒸汽灭菌器 上海博讯实业有限公司;SW-CJ-2FD 超净工作台 北京东联哈尔仪器制造有限公司;LRH-250 生化培养箱 广东省医疗器械厂;BIO-RAD 凝胶成像系统 美国 BIO-RAD 公司;BIO-RAD CFX96 梯度 PCR 仪 美国 BIO-RAD 公司;FR980 恒温培养箱 上海复日科技有限公司;SpectraMax iD3 多功能酶标仪 美谷分子仪器上海有限公司;S210 pH 计 上海仪电科学仪器股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株分离筛选 招募 3 位无消化系统疾病的志愿者,并且最近 3 个月没有接受抗生素治疗。制备 10%(w/v)人类粪便悬液:称取 2 g 新鲜人类粪便,在超净台中加入 10 mL 无菌 PBS 漩涡 1~5 min,使粪便充分打散,释放肠道微生物。500 r/min 离心 5 min,使粪便中的渣滓沉降于管底,取上清至 Ep 管中,再加入 PBS 涡旋离心,使粪便中的渣滓沉降于管底,取上清至 50 mL 无菌 Ep 管中,得到人粪便菌悬液^[15]。

将人粪便菌悬液用无菌 PBS 稀释至 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} ,分别涂布于 MRS 固体平板。37 °C 培养 24~36 h 后,在平板中选取形态、颜色、大小不同的单菌落,进行液体培养基培养,随后在固体培养基上划线培养,以提高菌株的纯度^[16]。

1.2.2 革兰氏染色 将菌种进行划线培养,挑单菌液体培养后进行革兰氏染色,菌液涂片固定。滴加结晶紫后,染色 1 min,水洗。滴加碘液后染色 1 min,水洗。用 95% 的酒精脱色约 30 s,水洗,吸去水分。滴加番红后,染色 1 min,水洗。吸干或在空气中凉干后,油镜镜检^[17]。

1.2.3 菌株鉴定 初步鉴定:根据《伯杰氏细菌鉴定手册》^[18]有关细菌形态和生理生化特性等对分离出的菌株进行鉴定。

采用 16s rDNA 基因进行分子生物学鉴定,以乳酸片球菌 NXU-220218、NXU-220219、NXU-220220 菌株的基因组为模板进行 PCR 扩增,正反向引物为 8F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'/1492R: 5-

GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 反应体系为 (20 μ L): 模板 DNA 2 μ L, KOD 酶 (5 U/ μ L) 0.4 μ L, 10 \times KOD buffer 2 μ L, 2 mmol/L d NTPs 2 μ L, 引物 (F+R) 1.2 μ L, MgSO₄ 1.2 μ L, dd H₂O 11.2 μ L, PCR 扩增参数设置为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸。得到的 PCR 扩增产物进行 1.5% (质量分数) 琼脂糖凝胶电泳。确认聚合酶反应扩增片段, 若 PCR 扩增产物在 1800 bp 左右, 则可送测序, 将 16s rDNA 序列于 NCBI 进行 BLAST 同源序列检索^[19-20], 比较筛选菌株与已知菌株的系统发育关系和系统地位, 如果同源性大于 99%, 则确认为同一类细菌, 借助 Mega X 软件建立系统发育树^[21-22]。

1.2.4 乳酸菌生长曲线 取 2% 乳酸菌悬液接种于 MRS 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C 培养, 从 0 h 开始, 每隔 2 h 取样一次, 用分光光度法 (波长 600 nm) 测吸光度值 (OD)。以空白培养基作为对照, 一种菌液每次取样做三次重复。以时间为横坐标, 吸光度值为纵坐标, 制作生长曲线^[23]。

1.2.5 乳酸菌产酸能力 取 2% 乳酸菌悬液接种于 MRS 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C 培养, 从 0 h 开始, 每 2 h 取样一次, 测定其 pH。以空白培养基作为对照, 一种菌液每次取样做三次重复。以时间为横坐标, pH 为纵坐标, 制作产酸曲线^[24]。

1.2.6 乳酸菌耐酸能力 用盐酸将 MRS 液体培养基 pH 调至 2.0, 121 $^{\circ}$ C 灭菌 15 min, 冷却备用。按合适的接种量将菌悬液接种到 pH 为 2.0 的 MRS 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养 4 h, 每种乳酸菌做三个重复, 采用平板菌落计数法测定各个乳酸菌的活菌数。与未经过酸化的培养基培养的菌株作对比, 计算乳酸菌的相对生长比率^[25], 即存活率。

$$\text{相对生长比率}(\%) = \frac{N_2}{N_1} \times 100$$

式中: N_1 为酸耐受前的活菌数, CFU/mL; N_2 为酸耐受 4 h 的活菌数, CFU/mL。

1.2.7 乳酸菌耐胆盐能力 取一定的牛胆盐于 MRS 液体培养基中, 使其质量分数分别为 0% (空白)、0.3%、0.5% 和 0.7%, 调节 pH 至 6.5 \pm 0.2, 121 $^{\circ}$ C 灭菌 15 min, 冷却备用。按合适的接种量将菌悬液分别接种至不同浓度牛胆盐的 MRS 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养 24~36 h 后观察不同浓度胆盐培养液中菌株的生长情况, 测定其波长为 600 nm 时 OD 值, 计算乳酸菌在胆盐中的存活能力^[26]。

$$\text{乳酸菌耐胆盐存活率}(\%) = \frac{N_1}{N_0} \times 100$$

式中: N_0 为未加牛胆盐的 OD 值, 测定波长为 600 nm; N_1 为添加不同浓度牛胆盐的 OD 值, 测定波长为 600 nm。

1.2.8 乳酸菌对人工胃液和人工肠液耐受性实验
人工胃液的配制: NaCl 0.20%、胃蛋白酶 0.30%, HCl

调 pH 至 2.5, 用孔径 0.20 μ m 微孔滤膜过滤除菌, 制得人工胃液备用^[27]。

人工肠液制备: 胰腺液: 胰蛋白酶 0.10%, 调 pH 至 8.0, 过滤除菌备用。胆液: 胆盐 1.80%, 调 pH 至 8.0, 过滤除菌备用。将胰腺液和胆液以 2:1 混合即为人工肠液^[28]。

按体积分数 1% 的接种量接种到 pH 为 2.5 的人工胃液中混匀, 37 $^{\circ}$ C、100 r/min 摇床中培养, 分别于 0、1、2、3 h 后取样, 在 600 nm 波长处测定其透光率, 并进行乳酸菌活菌计数。

$$\text{存活率}(\%) = \frac{\text{人工胃液处理 3 h 后活菌数}(\text{CFU/mL})}{\text{人工胃液中初始菌数}(\text{CFU/mL})} \times 100$$

按体积分数 1% 的接种量接种到人工肠液, 混匀, 37 $^{\circ}$ C、100 r/min 摇床培养, 分别于 0、1、2、3、4 h 后取样, 在 600 nm 波长处测定其透光率, 并进行乳酸菌活菌计数。

$$\text{存活率}(\%) = \frac{\text{人工肠液处理 4 h 后活菌数}(\text{CFU/mL})}{\text{人工肠液中初始菌数}(\text{CFU/mL})} \times 100$$

1.2.9 乳酸菌发酵枸杞汁的制备 将枸杞和水以 1:10 的比例混合浸泡 5~6 h, 加入 0.15% (w/v) 的果胶酶进行打浆, 然后进行过滤除籽, 并用柠檬酸将枸杞汁的 pH 调至 4.5 左右, 混匀后进行 65 $^{\circ}$ C、30 min 水浴巴氏杀菌。冷却至室温后将培养好的乳酸菌菌悬液按 5% 的接种量接入枸杞汁中, 轻轻摇晃, 放入 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 48 h。对发酵前后的枸杞汁进行多糖、还原糖含量测定、抗氧化性实验。

1.2.10 枸杞汁中含糖量的测定

1.2.10.1 枸杞汁中多糖含量的测定 使用苯酚-硫酸法测多糖含量^[29-30]。取待测样品或不同浓度标准品 0.3 mL, 在冰水浴中加入 0.2 mL 6% 苯酚溶液; 振荡摇匀后迅速加入 1 mL 浓硫酸, 加入后迅速在冰上转动试管, 加速热量释放, 以不放热或微量放热为宜。混匀后沸水浴 20 min, 冷却至室温。酶标仪进行测定。每孔加样加入 150 μ L 测定液, 在 490 nm 测定各孔吸光度。

1.2.10.2 枸杞汁中还原糖含量的测定 使用 DNS 法测定还原糖^[31], 取待测样品或不同浓度标准品 0.4 mL, 加入 0.8 mL DNS 试剂, 混匀后沸水浴 5 min, 冷却至室温。酶标仪进行测定。每孔加样加入 150 μ L 测定液, 在最大吸收波长处 (540 nm) 测定各孔吸光度。

1.2.11 枸杞汁抗氧化能力的测定

1.2.11.1 DPPH 自由基清除能力测定 参考 Bai 等^[32]报道方法略有修改, 在试管中先加入 2 mL 0.1 mmol/L DPPH 甲醇溶液, 再加入枸杞样品溶液 2 mL, 混匀后于 37 $^{\circ}$ C、避光反应 30 min, 517 nm 处测定吸光度,

计算 DPPH 自由基的清除率。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_s}{A_c}\right) \times 100$$

式中, A_c : 2 mL PBS+2 mL DPPH 甲醇溶液的吸光值; A_s : 2 mL 样品溶液+2 mL DPPH 甲醇溶液的吸光值。

1.2.11.2 超氧阴离子自由基清除活性测定 参考马妮等^[33]的方法, 向 96 孔板中依次加入 50 μL 338 $\mu\text{mol/L}$ NADH 溶液和 50 μL 30 mmol/L PMS 溶液, 充分混匀后加入 50 μL 72 $\mu\text{mol/L}$ NBT 溶液, 混匀后加入 50 μL 不同发酵时间枸杞样品, 混匀后室温反应 15 min, 在 560 nm 处测定吸光度, 记为 A_s , 用相同体积的 PBS 溶液代替样品溶液, 测定其吸光值, 记为 A_c 。

$$\text{超氧阴离子自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_s}{A_c}\right) \times 100$$

式中, A_c : 对照组吸光度; A_s : 样品组吸光度。

1.2.12 感官评分标准 为进行发酵枸杞汁的感官评价, 由 12 名均具有食品感官研究背景的老师和学生

表 1 感官评分标准

Table 1 Sensory scoring criteria

项目	评分标准	分数
色泽	鲜红色	6~10
	深红色, 略无光泽	1~5
口感	酸甜适中, 黏稠性适中	6~10
	滋味协调性好, 有一定的黏稠性	1~5
香气	枸杞香味足, 无异味	6~10
	枸杞香味较小, 无异味	1~5
组织状态	质地均匀, 稳定性较好, 无分层	6~10
	稳定性较好, 略有分层	1~5

组成感官评定小组, 对发酵枸杞汁的色泽、口感、香气、组织状态等进行 1~10 分评定, 评分标准如表 1 所示。

1.3 数据处理

实验重复三次以上, 实验结果以平均值 \pm 标准差表示, 采用 MEGA-X 软件构建系统发育树; Excel 2020 进行数据统计分析; 用 Graph Pad Prism 8.0.1 软件对实验数据作图。

2 结果与分析

2.1 人肠道乳酸菌的分离和鉴定

2.1.1 菌株形态 从 MRS 平板上获得 3 株单菌。图 1A 是三株单菌的单菌落图, 可以看出菌落均呈乳白色、菌落较小、圆形、表面湿润且光滑, 边缘整齐, 用接种环容易挑起, 为片球菌属。本研究还通过革兰氏染色分析了细菌形态, 如图 1B 所示, 这三种菌株均为革兰氏阳性细菌, 其细胞壁厚, 革兰氏染色后均为紫色, 与李慧芬等^[34]的研究结果一致, 在显微镜下均为球状或杆状, 成对、成链或聚团状排列, 无芽孢。

2.1.2 分子生物学鉴定 提取菌株的基因组 DNA, 利用特异性引物扩增 16s rDNA。如图 2 所示, 对所提取的菌株基因组 DNA 进行扩增, 在 1600 bp 附近观察到了目的产物, 条带整齐, 表明 PCR 产物可用于测序分析。

通过 16s rDNA 第一代基因测序, 经 NCBI 数据库进行比对, 经鉴定三株菌株均为乳酸片球菌, 分别命名为 NXU_220218、NXU_220219、NXU_220220。根据系统进化树结果可知(图 3), 菌株 NXU_220218 与 *Pediococcus acidilactici* SRCM103367 同源性最高, NXU_220219 与 NXU_220220 同 *Pediococcus acidilactici* SRCM102732 同源性最高, 相似

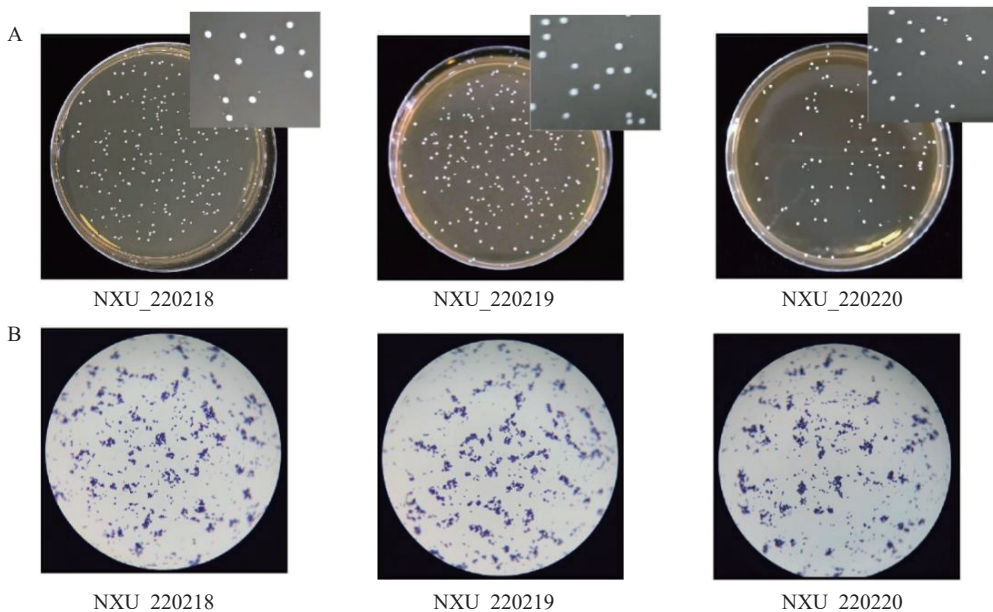


图 1 乳酸菌菌落形态和革兰氏染色分析

Fig.1 Lactic acid bacteria colony morphology and Gram stain analysis

注: A 为乳酸片球菌形态学, B 为乳酸片球菌革兰氏染色结果。

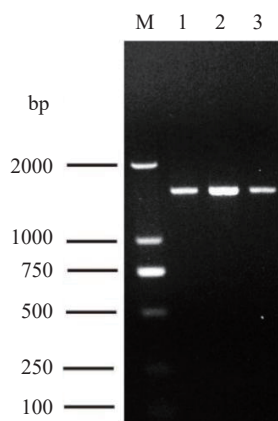


图 2 16s rDNA 扩增产物电泳图

Fig.2 16s rDNA amplification product electrophoresis

注: M 为 2000 DNA Maker, 1 为乳酸片球菌菌株 NXU_220218, 2 为乳酸片球菌菌株 NXU_220219, 3 为乳酸片球菌菌株 NXU_220220。

度均达到 99% 以上。结合其形态学确定三株菌均为乳酸片球菌种(*Pediococcus lactis*)。

2.2 3 株乳酸片球菌的生长能力

接着比较了三株细菌的生长特征。由图 4 可知, 三株乳酸片球菌在 2~8 h 间处于对数生长期, 30 h 后进入稳定期。此外, NXU_220218 的生长能力最好, 三株细菌平稳期时在波长为 600 nm 时测定的

OD 值均在 1.0 左右, 由此可知, 乳酸片球菌可以在 MRS 液体培养基中生长的很好, 并且存活率较高, 而 NXU_220219 和 NXU_220220 生长速度无显著性差异, 其 48 h 内生长趋势与陈亚男等^[35] 研究结果相似。

2.3 3 株乳酸片球菌的产酸能力分析

如图 5 所示, 0~2 h 菌株处于生长适应期, 产酸较少, 代谢缓慢, 在对数期产酸较多, 菌株代谢加快, pH 下降迅速。三株细菌在 24 h 后产酸基本进入稳定期, 其中, NXU_220218 产酸速度较其余两株菌较快, 但三株细菌产酸能力并无显著性差异。

2.4 3 株乳酸片球菌的耐酸、耐胆盐性能分析

耐酸耐胆盐为探究乳酸菌耐受性的重要指标。通常耐酸耐胆盐能力越好, 细菌定植于人体肠道的能力就越强。从图 6A 可以看出, 于 pH 为 2 的酸性培养基培养 4 h 后, 三株菌对酸均有一定的耐受能力。其中, NXU_220218 菌株的存活率较高于其余两株细菌, 其存活率达到了 67%, 表现出对酸较强的耐受性。

从图 6B 中可以看出, 在浓度为 0.3% 的牛胆盐液体培养基中, 所有菌株的存活率均较高, 三株细菌中 NXU_220218 的存活率较高, 达到了 65%, 其余两株菌存活率达到了 50%。在浓度为 0.5% 的牛胆

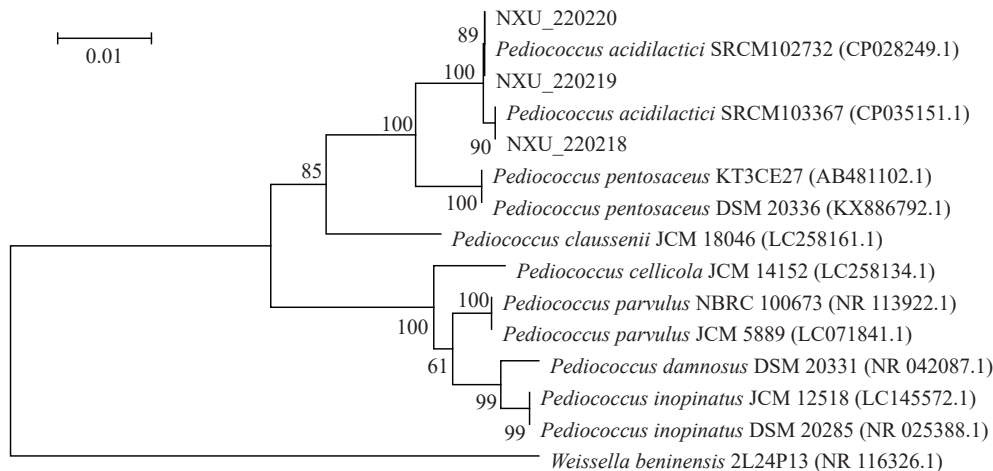


图 3 菌株系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of strains

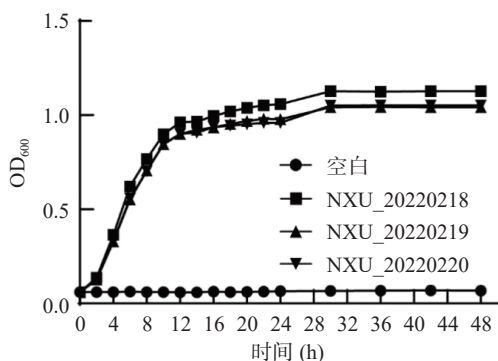


图 4 乳酸片球菌生长曲线

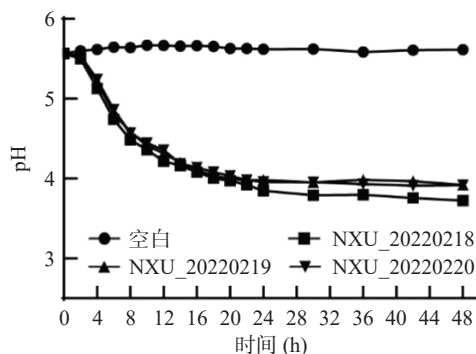
Fig.4 Growth curve of *Pediococcus lactis*

图 5 乳酸片球菌产酸曲线

Fig.5 Acid production curve of *Pasciococcus lactis*

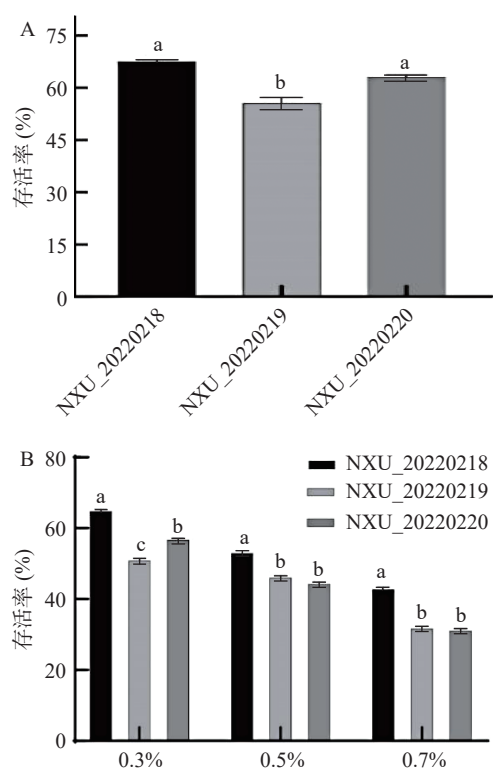


图6 乳酸菌菌株耐酸、耐胆盐能力检测

Fig.6 Lactic acid bacteria strain acid resistance and bile salt resistance test

注: A 为菌株 NXU_20220218、NXU_20220219、NXU_20220220 在 pH 为 2 条件下的活菌存活率; B 为菌株 NXU_20220218、NXU_20220219、NXU_20220220 在浓度为 0.3%、0.5%、0.7% 的胆盐中的活菌存活率; 不同小写字母表示菌株之间差异显著 ($P < 0.05$); 图 7 同。

盐液体培养基中, 所有菌株的存活率明显降低, 但均在 40% 以上, 在此浓度下 NXU_20220218 的存活率较高, 达到了 53%, 其余两株菌存活率达到了 45%。在浓度为 0.7% 的牛胆盐液体培养基中, 三株菌株的存活率进一步降低, 三株细菌中 NXU_20220218 的存活率相对较高, 其存活率达到了 43%, 而其余两株菌存活率达到了 32%。

2.5 3 株乳酸片球菌的对人工胃液和肠液的耐受能力分析

益生菌经口服进入机体后, 先后接触胃肠道的内环境。肠道中细菌的生长受 pH、消化液、营养成分等多种因素的影响。小肠中 pH 约为 7.6, 一般食物在小肠中停留时间为 3~18 h。因此, 微生物若要定植肠道发挥作用, 需耐受小肠中的胰蛋白酶及碱性环境。本研究人工肠液 pH 为 8.0, 通过菌落计数检测菌株对人工肠液的耐受性, 结果如图 7 所示。由图 7A 可以看出, 三株乳酸片球菌在人工胃液中均具有一定的耐受力, 存活率均在 60% 以上, 其中 NXU_20220218 的耐受能力最强。由图 7B 可以看出, 三株乳酸菌在人工肠液中存活率均较高, 达到了 85%。三株细菌之间并无显著性差异, 说明乳酸片球菌可能具有更强的肠道定植能力。

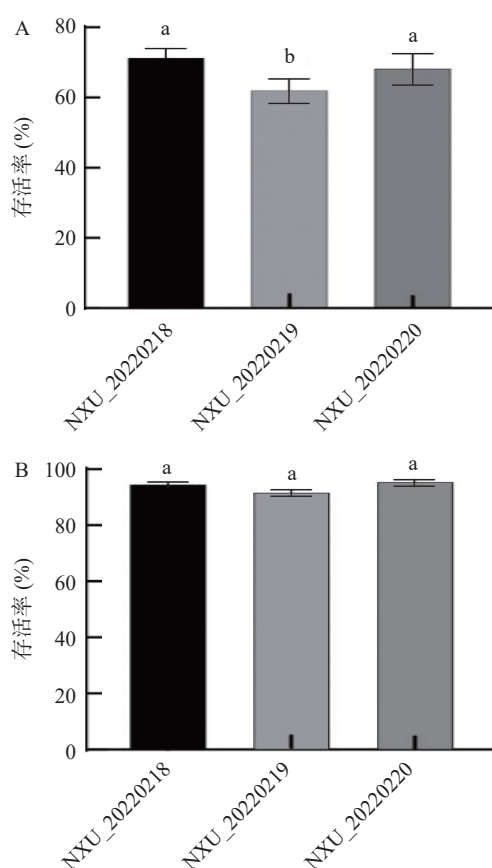


图7 乳酸片球菌对人工胃液、肠液耐受能力分析

Fig.7 Analysis of the tolerance of *Pasciocooccus lactis* to artificial gastric juice and intestinal fluid

注: A 为乳酸片球菌对人工胃液耐受能力, B 为乳酸片球菌对人工肠液耐受能力。

2.6 乳酸片球菌 NXU_220218 对枸杞汁的发酵性能研究

枸杞多糖 (*Lycium barbarum polysaccharide*, LBP) 是枸杞活性成分中的一种水溶性多糖, 具有促进免疫、抗氧化、降血糖血脂等作用^[36], 然而作为一种高分子聚合物, 大多数植物多糖口服后不能被人体细胞直接降解利用, 而是通过肠道微生物分解代谢发挥作用, 微生物将多糖降解为还原性低聚糖和单糖, 故本研究通过测定枸杞中多糖和还原糖含量来评价菌种的发酵能力。

由图 8A 可以看出, 三株细菌均能利用枸杞多糖进行发酵, 与空白组相比, 菌株发酵后, 枸杞多糖含量显著降低。0~6 h, 菌株利用枸杞多糖的含量达到最大, 说明此时菌株利用多糖的能力最强, 6~48 h, 随着发酵时间的延长, 多糖的含量逐渐降低, 最终趋于平稳, 说明此时菌株利用多糖的能力达到最大, 证明多糖含量降低与菌株息息相关, 菌株利用枸杞多糖进行发酵, 其研究结果与王艳萍等^[37]研究结果一致。但是, 三株乳酸片球菌利用多糖的能力无显著差异, 此外, 本研究还检测了发酵液中还原糖含量的动态变化。图 8B 显示, 菌株接种至枸杞汁中使其还原糖含量显著下降, 枸杞汁中的还原糖浓度在前 12 h 快速

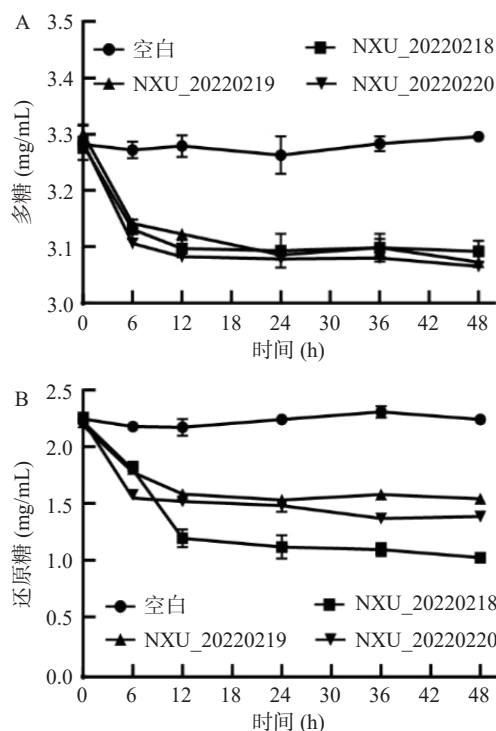


图 8 枸杞汁乳酸菌发酵液中多糖、还原糖浓度的动态监测
Fig.8 Dynamic monitoring of total sugar and reducing sugar concentration in fermentation broth of lactic acid bacteria in goji berry juice

下降;说明此时菌株分解代谢多糖后利用了还原糖,故还原糖也由刚开始的最高含量逐渐降低,12~48 h,随着发酵时间的延长,还原糖的含量逐渐降低,最终趋于平稳,说明此时菌株利用还原糖的能力达到最大,其研究结果与王艳萍等^[37]研究结果一致。而三株菌中 NXU_220218 利用还原糖的速率较其余两株细菌。

2.7 乳酸片球菌 NXU_220218 发酵枸杞汁的 DPPH 自由基及超氧阴离子自由基清除率分析

为了更好地验证乳酸菌发酵枸杞汁后酚类物质的抗氧化能力,故检测了乳酸菌发酵对枸杞汁 DPPH 和超氧阴离子自由基清除能力的影响。如图 9A 所示,与空白组相比,三株细菌均对发酵枸杞汁的 DPPH 自由基清除能力有一定的影响,0~12 h,随着发酵时间的增加,发酵液的 DPPH 自由基清除率逐渐升高,在 12 h 时, NXU_220218 发酵的枸杞汁中的酚类物质对 DPPH 自由基的清除率达到最大,为 57%,此结果与黄宁馨等^[38]研究结果相似。NXU_220218 和 NXU_220219 的 DPPH 自由基清除率较强,12 h 后, NXU_220218 和 NXU_220219 的 DPPH 自由基清除率没有显著变化。但是 NXU_220220 呈现不同的变化趋势,其 DPPH 自由基清除率在 12~36 h 仍然维持上升趋势,36~48 h, DPPH 自由基清除率不再改变,说明枸杞发酵液可以有效清除 DPPH 自由基,稳定后三株菌发酵的枸杞汁 DPPH 自由基清除能力不变,可能是三株菌属于同一菌种,故代谢产物差异较小。

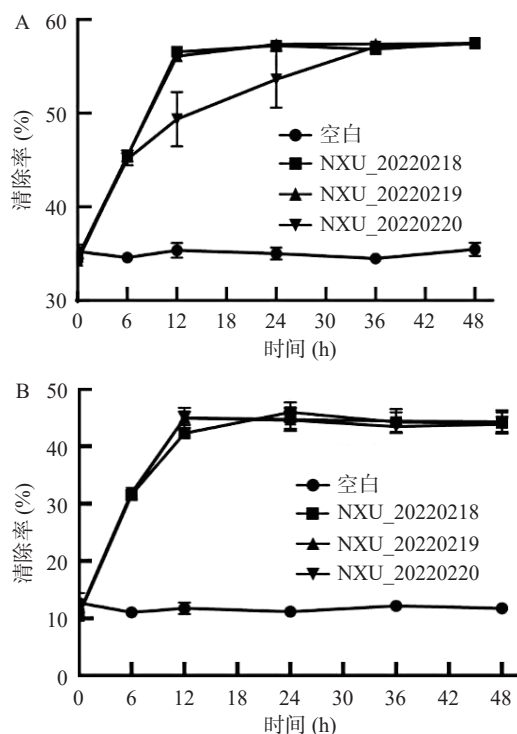


图 9 乳酸菌发酵枸杞汁的 DPPH 自由基及超氧阴离子自由基清除率分析

Fig.9 Analysis of DPPH radical and superoxide anion radical scavenging rate of lactic acid bacteria fermented goji berry juice
注: A 为发酵枸杞汁对 DPPH 自由基的清除作用, B 为发酵枸杞汁对超氧阴离子自由基的清除作用。

图 9B 所示,与空白组相比,三株细菌对发酵枸杞汁对超氧阴离子自由基的清除能力有一定影响,说明枸杞成分可以有效清除超氧离子自由基,0~12 h,随着发酵时间的增加,发酵液的超氧阴离子自由基清除率逐渐升高,这可能是乳酸菌发酵过程中的酶(如 β -半乳糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶等)将高分子质量的酚类化合物转化为游离酚类物质,以及高分子质量的多糖降解而暴露出更多的活性基团。在 12 h 时, NXU_220218 发酵的枸杞汁中的酚类物质对超氧阴离子自由基的清除率最大达 42%,这与张金兰等^[39]研究结果类似;12 h 后,三组样品的超氧阴离子自由基清除率不再受发酵时间影响,且无显著性差异,可能是三株菌同属同一菌种,其代谢物间差异较小。

2.8 3 种乳酸片球菌发酵枸杞汁感官评价

在评价指导员的指导下筛选出 12 位接受过“食品感官评定”课程并参与训练的评价员进行感官品评。由图 10 可知,不同菌株发酵对枸杞汁的感官品质影响不同。菌株 NXU_220218 发酵枸杞汁的色泽、口感、香气、组织状态强于其余两株菌,其中色泽、香气、组织状态达到 8 分; NXU_220219 的色泽强于 NXU_220220,而未发酵的枸杞汁与发酵的枸杞汁相比,经过菌株发酵的枸杞汁其色泽、口感、香气、组织状态均强于未发酵的枸杞汁,说明经过菌株发酵,产生了乙醇,且酮类物质含量与种类的增加,赋予了枸杞香味。

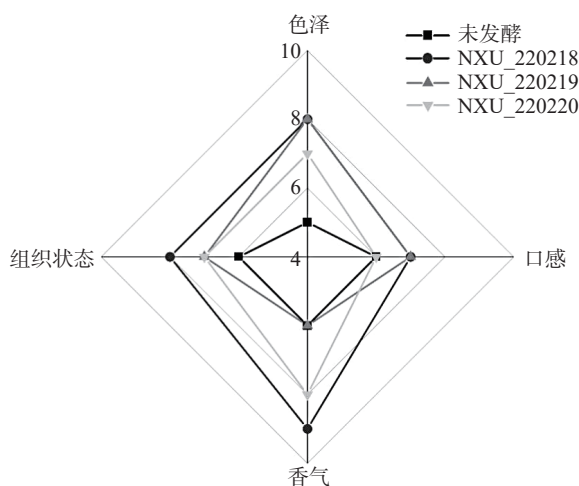


图 10 感官评价图

Fig.10 Sensory evaluation diagram

3 结论

本研究通过从人肠道中分离出发酵性能优良的乳酸菌,通过形态和 16s rDNA 分子生物学方法对菌株进行鉴定。共筛选得到三株乳酸菌分别为乳酸片球菌 NXU_220218、乳酸片球菌 NXU_220219、乳酸片球菌 NXU_220220。根据生长能力、产酸能力及耐酸、耐胆盐、耐人工胃液肠液能力相关实验结果分析,其中 NXU_220218 生长速度最快,产酸能力最强,在酸性条件下存活率达到 67%,在 0.3% 的牛胆盐中存活率达到 65%,在人工胃液中其存活率达到了 72%,而在人工肠液中其存活率达到了 95%,且能够使枸杞汁中的还原糖含量显著性降低,能显著提高枸杞汁对 DPPH 和超氧阴离子自由基的清除率。结果表明, NXU_220218 在人体内的定植能力较强,发酵性能良好。说明通过发酵作用肠道微生物可以代谢枸杞中的多糖,体外抗氧化实验结果表明发酵后的枸杞汁抗氧化活性总体显著增高,说明肠道菌发酵枸杞汁过程生成有抗氧化性的产物,综上,来源于人肠道的乳酸片球菌 NXU_220218 可发酵利用枸杞多糖,可为解释多糖的潜在作用机制和多糖的更好利用提供合理参考,但详细的机制还需要进一步研究,同时本研究也为从人肠道分离筛选出其他新型发酵剂提供了理论支撑,为开发富含活菌和多种活性成分的枸杞发酵产品工业化生产提供了参考依据。

参考文献

- [1] 周学义, 朱文昭, 张蕾蕾, 等. 乳酸菌发酵枸杞饮料制作工艺优化的研究[J]. 酿酒科技, 2021(1): 59-64. [ZHOU X Y, ZHU W Z, ZHANG L L, et al. Red wolfberry optimization of production process of fermented Gouqi beverage with lactic acid bacteria[J]. Wine Science and Technology, 2021(1): 59-64.]
- [2] QIAN D, ZHAO Y X, YANG G, et al. Systematic review of chemical constituents in the genus[J]. *Molecules*, 2017, 22(6): 911-944.
- [3] 杨建平, 郭建来, 聂芙蓉, 等. 枸杞叶发酵物生物活性成分及营养成分的变化研究[J]. 中国饲料, 2018(12): 36-40. [YANG J P, GUO J L, NIE F R, et al. Changes of bioactive components and

- nutrients in goji leaf ferment[J]. *China Feed*, 2018(12): 36-40.]
- [4] KANG Y F, YANG G, ZHANG S M, et al. Goji berry modulates gut microbiota and alleviates colitis in IL-10-deficient mice[J]. *Molecular Nutrition and Food Research*, 2018, 62(22): 1800535.
- [5] SUN Q, DU M, KANG Y F, et al. Prebiotic effects of goji berry in protection against inflammatory bowel disease[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2023, 63(21): 5206-5230.
- [6] 蔺志颖. 乳酸发酵杏鲍菇酱的加工及其风味物质研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018. [LIN Z Y. Study on the processing of lactic acid fermented oyster mushroom paste and its flavor substances[D]. Yangling: Northwest University of Agriculture and Forestry Technology, 2018.]
- [7] 段艳. 乳酸菌的筛选及其对羊肉干发酵香肠品质特性的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2013. [DUAN Y. Screening of lactic acid bacteria and its effect on the quality characteristics of fermented sausages of mutton jerky[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2013.]
- [8] 密更, 李婷婷, 仪淑敏, 等. 人工接种乳酸菌发酵鱼糜的研究进展[J]. 中国食品学报, 2019, 19(5): 302-312. [MI G, LI T T, YI S M, et al. Research progress of fermented surimi by artificial inoculation of lactic acid bacteria[J]. *Journal of Chinese Food Science*, 2019, 19(5): 302-312.]
- [9] 月博文, 赵建新, 张均叶, 等. 复合乳酸菌协同酵母菌发酵对苏打饼干品质特性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(4): 104-113. [YUE B W, ZHAO J X, ZHANG J Y, et al. Effects of fermentation of compound lactic acid bacteria and yeast on quality characteristics of soda biscuits[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2017, 43(4): 104-113.]
- [10] 徐丹. 旧金山乳杆菌对酸面团面包品质影响机理及面包风味改良的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2019. [XU D. Study on the influence mechanism of *Lactobacillus* San Francisco on the quality of sourdough bread and the improvement of bread flavor[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019.]
- [11] 李晓天. 果蔬发酵专用乳酸菌的筛选及其在胡萝卜发酵中的应用研究[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2019. [LI X T. Screening of lactic acid bacteria for fruit and vegetable fermentation and their application in carrot fermentation[D]. Jinan: Qilu University of Technology, 2019.]
- [12] TANG J P, LIU Y T, ZHU L. Optimization of fermentation conditions and purification of cordycepin from cordyceps militaris[J]. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 44(1): 90-106.
- [13] YANG S L, ZHANG H. Optimization of the fermentation process of cordyceps sobolifera Se-CEPS and its ant-tumor activity in vivo[J]. *Journal of Biological Engineering*, 2016, 10(1): 1-9.
- [14] 葛影影, 何国戈, 郑经成, 等. 枸杞的生物学功能及其在动物生产中的应用[J]. 安徽农业科学, 2021, 49(3): 25-27. [GE Y Y, HE G G, ZHENG J C, et al. The biological functions of wolfberry and its application in animal production[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2021, 49(3): 25-27.]
- [15] GAO H, WEN J J, HU J L, et al. Polysaccharide from fermented *Momordica charantia* L. with *Lactobacillus plantarum* NCU116 ameliorates type 2 diabetes in rats[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 201(1): 624-633.
- [16] 李旭阳, 刘慧燕, 潘琳, 等. 宁夏自然发酵泡菜中乳酸菌的分离鉴定及其在枸杞汁发酵中的应用[J]. 食品工业科技, 2021, 42(23): 126-134. [LI X Y, LIU H Y, PAN L, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria from naturally fermented pickles from Ningxia and its application in goji berry juice fermentation

- [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(23): 126–134.]
- [17] 谭啸, 章熙东. 革兰氏染色法观察与区分细菌[J]. 生物学教学, 2019, 44(7): 71–72. [TAN X, ZHANG X D. Observation and differentiation of bacteria by Gram stain[J]. Biology Teaching, 2019, 44(7): 71–72.]
- [18] BUCHANAN R E, GIBBONS N E. 细菌鉴定手册(第八版)[M]. 北京: 科学出版社, 1984: 677–821. [BUCHANAN R E, GIBBONS N E. Manual of bacterial identification (8th Edition)[M]. Beijing: Science Press, 1984: 677–821.]
- [19] 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]. Brewed in China, 2020, 39(12): 113–119.]
- [20] TAMURA K, PETERSON D, STECHER G, et al. Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731–2739.
- [21] GITZENDANNER M A, SOLTIS P S, YI T S, et al. Plastome phylogenetics: 30 years of inferences into plant evolution[M]. Advances in Botanical Research, 2018(85): 293–313.
- [22] 周焯真, 张世豪, 陈嘉仪, 等. 新型冠状病毒 SARS-CoV2 的变异和进化分析[J]. 南方医科大学学报, 2020, 40(2): 152–158. [ZHOU Y Z, ZHANG S H, CHEN J Y, et al. Variation and evolution analysis of the new coronavirus SARS-CoV-2[J]. Journal of Southern Medical University, 2020, 40(2): 152–158.]
- [23] GUSTAW K, MICHALAK M, POLAK-BERECKA M, et al. Isolation and characterization of a new fructophilic *Lactobacillus plantarum* FPL strain from honeydew[J]. Annals of Microbiology, 2018, 68(7): 459–470.
- [24] 杜志琳, 尹望, 李雪平, 等. 一株乳酸片球菌的分离鉴定[J]. 饲料研究, 2017, (3): 18–21. [DU Z L, YIN W, LI X P, et al. Isolation and identification of a strain of *Pediococcus lactis*[J]. Feed Research, 2017, (3): 18–21.]
- [25] 陈纪龙, 朱莉, 高敏杰, 等. 一株耐受低 pH、高浓度硒菌株的筛选鉴定及两阶段 pH 调控高效除硒的研究[J]. 工业微生物, 2017, 47(3): 14–21. [CHEN J L, ZHU L, GAO M J, et al. Screening and identification of a low pH and high concentration selenium strains and a study on two-stage pH regulation and efficient selenium removal[J]. Industrial Microbiology, 2017, 47(3): 14–21.]
- [26] MULAW G, SISAY TESSEMA T, MULETA D, et al. *In vitro* evaluation of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from some traditionally fermented Ethiopian food products[J]. International Journal of Microbiology, 2019(2): 1–11.
- [27] ZHANG M, HANG X M, FAN X B, et al. Characterization and selection of lactobacillus strains for their effect on bile tolerance, taurocholate deconjugation and cholesterol removal[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(1): 7–14.
- [28] 王今雨, 满朝新, 杨相宜, 等. 植物乳杆菌 NDC75017 的降胆固醇作用[J]. 食品科学, 2013, 34(3): 243–247. [WANG J Y, MAN C X, YANG X Y, et al. Cholesterol-lowering effect of *Lactobacillus plantarum* NDC75017[J]. Food Science, 2013, 34(3): 243–247.]
- [29] SONG J B, CHEN M, LI Z Q, et al. Astragalus polysaccharide extends lifespan via mitigating endoplasmic reticulum stress in the silkworm, bombyx mori[J]. Aging Disease, 2019, 10(6): 1187–1198.
- [30] 王彦平, 姜芳慧, 陈月英, 等. 苯酚-硫酸法测定紫山药多糖含量的条件优化[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(4): 170–174. [WANG Y P, LOU F H, CHEN Y Y, et al. Optimizing conditions for the determination of purple yam polysaccharide content by phenol-sulfuric acid method[J]. Food Research and Development, 2021, 42(4): 170–174.]
- [31] 牟佳红, 梁安雯, 覃超琳, 等. 酶解与发酵联合处理对黑木耳还原糖含量及抗氧化性能的影响[J]. 食品工业科技, 2022, 43(7): 139–147. [MU J H, LIANG AN W, QIN C L, et al. Study on the effect of enzymatic hydrolysis combined with fermentation treatment on reducing sugar content and antioxidant performance of auricularia auricula[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(7): 139–147.]
- [32] BAI X L, ZHANG H W, REN S. Antioxidant activity and HPLC analysis of polyphenol-enriched extracts from industrial apple pomace[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013, 93(10): 2502–2506.
- [33] 马妮, 刘慧燕, 方海田, 等. 红枣多酚提取工艺优化、成分及抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2022, 43(16): 246–254. [MA N, LIU H Y, FANG H T, et al. Optimization of polyphenol extraction process, analysis of components and antioxidant activity of jujube[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(16): 246–254.]
- [34] 李慧芬, 王文博, 马成. 一株乳酸片球菌的筛选鉴定及其固态发酵饲料原料的产酸分析[J]. 中国饲料, 2019(17): 43–47. [LI H F, WANG W B, MA C. Screening and identification of a *Pediococcus lactis* and analysis of acid production of solid fermented feed raw materials[J]. China Feed, 2019(17): 43–47.]
- [35] 陈亚男, 郭伟强, 陈翠英, 等. 3 株乳酸片球菌的鉴定及其耐酸耐盐特性和抑菌作用研究[J]. 动物医学进展, 2020, 41(7): 42–47. [CHEN Y N, GUO W Q, CHEN C Y, et al. Identification of 3 strains of *Pediococcus lactis* and their acid and salt resistance characteristics and bacteriostatic effects[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2020, 41(7): 42–47.]
- [36] JIN M L, HUANG Q S, ZHAO K, et al. Biological activities and potential health benefit effects of polysaccharides isolated from *Lycium barbarum* L.[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 54: 16–23.
- [37] 王艳萍, 方海田, 胡海明, 等. 人肠道来源霍氏肠杆菌 4-2-1 的分离及其对枸杞多糖的发酵作用[J]. 食品工业科技, 2022, 43(20): 182–188. [WANG Y P, FANG H T, HU H M, et al. Isolation of *Enterobacter horonii* 4-2-1 from human intestinal origin and its fermentation effect on goji polysaccharides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(20): 182–188.]
- [38] 黄宁馨, 鲁群, 丁士勇, 等. 复合乳酸菌发酵过程中枸杞果汁品质及抗氧化活性变化[J]. 华中农业大学报, 2021, 40(6): 186–194. [HUANG N X, LU Q, DING S Y, et al. Changes in the quality and antioxidant activity of goji berry juice during the fermentation of complex lactic acid bacteria[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2021, 40(6): 186–194.]
- [39] 张金兰, 魏巍, 杨云, 等. 乳酸菌发酵对枸杞果汁体外抗氧化和抗炎活性的影响[J]. 中国酿造, 2023, 42(2): 76–82. [ZHANG J L, WEI W, YANG Y, et al. Effects of lactic acid bacteria fermentation on antioxidant and anti-inflammatory activities of goji berry juice *in vitro*[J]. China Brewing, 2023, 42(2): 76–82.]