

传统发面面肥中乳酸菌的 分离与鉴定

尹雪¹, 郭雪峰^{1,2,*}, 帕提古丽·毛拉红¹, 刘俊峰^{1,2}, 张秀萍^{1,2}, 席琳乔^{1,2}, 程龙³

(1.塔里木大学动物科学学院, 新疆阿拉尔 843300;

2.新疆生产建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室, 新疆阿拉尔 843300;

3.墨尔本大学兽医与农业科学院, 澳大利亚维多利亚区 3647)

摘要:为改善青贮饲料发酵品质筛选提供乳酸菌资源, 实验采用实验室纯培养方法结合生理生化分析, 对新疆传统发面面肥样品中乳酸菌的种类、形态学及生理生化特性进行研究, 对分离的菌株运用 16S rDNA 基因序列和系统发育研究进行种属鉴定。结果表明, 分离得到三株乳酸菌, 其中 F5 和 F28 两株被鉴定为 *Bacillus* sp., F3 被鉴定为 *Paenibacillus* sp.。3 株菌在 pH4~7 能生长, 在 3% 和 6.5% NaCl 条件下生长状况良好, 在 10~45 °C 温度范围能生长。两株芽孢杆菌中 F5 菌株产酸能力较强, F28 菌株生长速率较快, 并且这两株菌均能利用多种碳源。所以, 实验中筛选出的三株乳酸菌均可选作青贮饲料制作过程中的添加剂。

关键词:发面面肥, 乳酸菌, 分离, 鉴定

Isolation and identification of lactic acid bacteria from Chinese traditional sourdough

YIN Xue¹, GUO Xue-feng^{1,2,*}, Patiguli·Maolahong¹, LIU Jun-feng^{1,2},
ZHANG Xiu-ping^{1,2}, XI Lin-qiao^{1,2}, CHENG Long³

(1.College of Animal Science, Tarim University, Alar 843300, China;

2.Key Laboratory of Animal Husbandry Science and Technology,
Xinjiang Production & Construction Corps, Alar 843300, China;

3.Faculty of Veterinary & Agricultural Sciences, Dookie Campus, the University of Melbourne, Victoria 3647, Australia)

Abstract: To support the growing silage industry, the study adopted the pure culture method from silage microbial analysis, combining with the physiological and biochemical analysis to investigate the species, morphological, physiological-biochemical characteristics of lactic acid bacteria from Chinese traditional sourdough sampled in Xinjiang. The isolated lactic acid bacteria was identified using 16S rDNA gene sequences and phylogenetic studies. Results showed that three strains of lactic acid bacteria were isolated and identified. F5 and F28 were *Bacillus* sp., F3 was *Paenibacillus* sp.. Three strains of lactic acid bacteria were found in the range of pH4~7, and grew well under the condition of 3% and 6.5% concentration of NaCl and the bacteria also grew well between 10 °C and 45 °C. The strain F5 produced the most acid, strain F28 had faster growth rate than strain F5. In conclusion, three strains of lactic acid bacteria from this study might be used as additives in the production of silage.

Key words: sourdough; lactic acid bacteria; isolation; identification

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2017)14-0141-05

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2017.14.028

发面面肥是指面粉和水混合后经微生物(如乳酸菌等)发酵而成的产物^[1]。面团发酵时各种微生物同时作用, 其中, 乳酸菌可以酸化面团, 改善面团质构, 产生包括挥发酸在内的各种风味成分。此外, 乳酸菌产生的抑菌物质可以有效抑制有害细菌和真

菌的生长, 具有延长馒头、面包等的保藏时间等优点^[2]。近年来有越来越多的新的乳酸菌被发现在传统发面面肥中发挥了重要作用并被鉴定出来。Valcheva^[3-4]等从法国面肥中首次发现并鉴定出 *Lactobacillus hammesii* sp.nov. 和 *Lactobacillus nantensis*

收稿日期: 2016-12-12

作者简介: 尹雪(1990-)女, 在读硕士研究生, 研究方向: 抑制青贮饲料中黄曲霉菌生长的乳酸菌筛选和鉴定, E-mail: 1186027456@qq.com。

* 通讯作者: 郭雪峰(1980-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 反刍动物瘤胃营养调控技术, E-mail: gxfdky@126.com。

基金项目: 科技创新中青年领军人才项目(2016BC001); 兵团畜牧科技重点实验室项目(HS201613)。

sp.nov.; Scheirlinck^[5-6]等从比利时两个小麦发面面肥中首次发现并鉴定出 *Lactobacillus crustorum sp.nov.* 和 *Lactobacillus namurensis sp.nov.*; Gu Chuntao^[7]等从中国黑龙江当地的腌菜和面肥中首次发现并鉴定出 *Lactobacillus mudanjiangensis sp. nov.*, *Lactobacillus songhuajiangensis sp. nov.* 和 *Lactobacillus nenjiangensis sp.nov.*。我国各地区发面面肥的制作工艺具有一定差异,导致面肥的菌群组成也不相同,除了 Zhang Jiachao^[8]、吴斯日古冷^[9]等采用传统微生物培养方法和分子生物学技术相结合对内蒙地区的传统面肥做了比较系统的乳酸菌菌群的鉴定之外,张国华^[10]也对我国不同地区发酵酸面团的菌群组成进行了研究,其中华东地区优势菌为 *Leuconostoe*, 华中地区、华北地区、西北地区及东北地区均以 *Lactobacillus* 为优势菌。随着研究人员对传统发面面肥的研究兴趣日益增加,关于面肥的研究逐渐从表征的理化指标转向更加深入的分子生物学技术。如今随着分子生物学技术的不断发展,乳酸菌的鉴定过程将变得简单、快速,结果也将更加准确。但对于新疆地区发面面肥微生物组成研究的报道较少。本研究的主要目的是通过实验室培养和 16S rDNA 基因序列分析方法,对新疆传统发面面肥中的乳酸菌进行分离鉴定,以期抑制霉菌改善青贮饲料发酵品质筛选提供乳酸菌资源。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

发面面肥样品 2016年7月从本地区随机采集发面面肥样品,将面肥样品封于密封袋中,样品贴上标签标明采样时间和地点后运回实验室,于4℃条件下,由塔里木大学畜牧科技重点实验室草食家畜营养研究室保存备用;乳酸菌培养基 MRS 培养基;10× Buffer、2.5 mmol/L dNTP Mixture、X-gal、IPTG、蛋白酶 K(30 U/mg)、过硫酸铵、丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、尿素、去离子甲酰胺 Sigma 公司;T4 连接盒、5 U/μL Tap 酶、DNA 细菌基因组提取试剂盒、通用型 DNA 纯化回收试剂盒、DNA Markers、质粒小提试剂 Tian Gen;琼脂糖;氨苄青霉素、溶菌酶(70000 U/mg) Takara公司;大肠杆菌(DH5α)来自新疆生产建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室;引物 FA-27F:(5'-GCA GAG TTC TCG GAG TCA CGA AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3');RA-1495R:(5'-AGC GGA TCA CTT CAC ACA GGA CTA CGG GTA CCT TGT TAC GA-3') 北京英俊生物技术公司;蛋白胨水 实验室配制。

SW-CJ-2FD 型超净工作台 上海博迅实业有限公司;XP603S 电子天平 瑞士梅特勒-托利多中国公司;SX-500 型高压灭菌锅 上海法润科学仪器有限公司;DNP9162 型电热恒温培养箱 上海精宏实验设备有限公司;T6 型紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司;Mastercycler nexus PCR 仪、MiniSpin 离心机 德国艾本德股份公司;HMS-350 型旋涡振荡仪 金坛市科析仪器有限公司;JY-300C 电泳仪 北京君意东方电泳设备有

限公司;GEL DOC XR+ 型凝胶成像系统 北京赛百奥科技有限公司;PHSJ-5 实验室 pH 计 上海仪电科学仪器有限公司;-70℃超低温冰箱 海尔集团公司。

1.2 实验方法

1.2.1 乳酸菌的分离 在超净工作台中称取 10 g 发面面肥样品放入 90 mL 无菌蛋白胨水中,密封,置于摇床上以 120 r/min 摇动 2 h,吸取 1 mL 上清液加入到 9 mL 无菌蛋白胨水中,漩涡振荡,以此稀释成 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 四个梯度,分别取 4 个梯度的菌液 100 μL 涂布于固体 MRS 平板培养基上,30℃培养 48~72 h,根据菌落颜色、大小、光泽、是否有透明圈等挑取单菌落,在 MRS 固体培养基上划线,恒温培养 30℃,48~72 h,重复划线分离培养 3 次,得到纯化的单菌株。用 MRS 液体培养基富集(30℃,24 h),与等体积的甘油混合,封装,-70℃保存备用^[11]。

1.2.2 产酸速率测定 将乳酸菌菌悬液以 3% 的接种量接种到 pH6.5 的 MRS 液体培养基中,培养温度 37℃,恒温培养时间 12 h。每隔 2 h 测定发酵液 pH,每次测三组平行样并计算平均值,根据不同发酵时间对应的发酵 pH 平均值的变化绘制产酸速率曲线^[12]。

1.2.3 测定生长曲线 将乳酸菌菌液以 6.0% 的接种量接种于 MRS 液体培养基中,37℃恒温培养。每隔 2 h 测其 OD 值,波长 620 nm,每次测三组平行样,测定时间为 0~12 h。测定完成后取三组平行实验所测结果,计算平均值绘制统计图^[12]。

1.2.4 乳酸菌的鉴定

1.2.4.1 生理生化鉴定 将保存备用的菌株活化 24 h,进行革兰氏染色,观察菌落的颜色、形态及大小等。参照《伯杰氏细菌鉴定手册》和《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》进行乳酸菌生理生化特性鉴定^[13-14];葡萄糖发酵产气实验、碳源发酵实验采用细菌微量生化反应进行鉴定;耐盐实验、耐酸实验、温度生长实验参考文献[10-11]进行。

1.2.4.2 提取细菌 DNA 凡是革兰氏染色阳性、过氧化氢酶阴性的菌株初步认定为乳酸菌,对所得菌液提取 DNA。取细菌培养液 2 mL,10000 r/min 离心,弃上清液,向沉淀中加入 200 μL 缓冲液 GA 重新悬浮细菌,再加入 180 μL 含有溶菌酶的缓冲液,37℃处理 30 min 以上。取出离心管,加入 20 μL 蛋白酶 K 溶液,混匀后加入 220 μL GB 缓冲液,振荡 15 s,70℃水浴 10 min,此时溶液变得清亮,简短离心 15 s 后加入 220 μL 无水乙醇,充分振荡 15 s,简短离心 15 s,将所得溶液溶液中加入吸附柱,12000 r/min 离心 30 s 倒掉液体,向吸附柱中加入 500 μL GD 缓冲液,12000 r/min 离心 30 s,弃废液,向吸附柱中加入 600 μL 漂洗液 PW,12000 r/min 离心 30 s,弃废液,重复前面步骤一次。将吸附柱放回收集管中 12000 r/min 离心 2 min,弃废液。将吸附柱置于室温放置数分钟,以彻底晾干残余缓冲液。将吸附柱放入一个干净的离心管中,悬空向吸附膜中间部位滴加 50~200 μL 洗脱液 TE,室温放置 2~5 min,

表1 发面面肥中乳酸菌的形态特征

Table 1 Morphological characteristics of lactic acid bacteria fertilizer in sourdough

	菌落特征				菌体特征				革兰氏染色	触酶实验
	形状	表面状态	菌落颜色	边缘情况	质地	透明度	形态	排列		
F3	圆形	不平	黄色	不整齐	粘稠	不透明	短杆	单个	紫色	阴性
F5	圆形	光滑	白色	整齐	粘稠	不透明	球状	成对	紫色	阴性
F28	圆形	光滑	白色	整齐	粘稠	不透明	球状	成对	紫色	阴性

12000 r/min离心 2 min, 将液体收集到离心管中, -20 °C 保存备用。

1.2.4.3 PCR 扩增和 16S rDNA 基因序列分析 用 PCR 仪对各个菌株的 DNA 进行扩增, 扩增引物为 27f 和 1495r, 所使用扩增反应的体系为 50 μL, 体系如下: 5 μL 10 × Buffer, 4 μL dNTP Mixture, 0.5 μL Taq 酶, 2 μL DNA 模板, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, 无菌超纯水补足至 50 μL 后进行 PCR 扩增反应。反应条件: 95 °C, 3 min; 94 °C, 1 min; 53 °C, 1 min; 72 °C 延伸 90 s, 30 个循环, 72 °C 延伸 8 min, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳对扩增的 PCR 产物进行检测。将 PCR 产物回收后, 连接 p MD-18T 载体并转化 *E.coli* DH5α, 经蓝白斑筛选为阳性克隆后送上海生工生物工程技术有限公司测序。测序结果在 Gen Bank 中进行 BLAST 分析。

2 结果与讨论

2.1 乳酸菌菌株形态特征分析

菌落形态特征是鉴定菌株的首要指标, 菌落特征是菌种在培养基中的生长情况, 乳酸菌大多数为圆形菌落, 菌落颜色基本为黄色、微黄色、灰白色和乳白色。根据《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》所描述的乳酸菌菌株形态进行乳酸菌菌株分离鉴定。乳酸菌是指能够利用碳水化合物并产生大量乳酸的细菌总称^[13]。这类细菌具有一些基本特征: 革兰氏阳性, 不运动或极少运动, 过氧化氢酶阴性; 可发酵葡萄糖产生乳酸, 产酸和耐酸能力强; 为厌氧或兼性厌氧菌^[15-16]。目前我国乳酸菌的分类主要依照凌代文的报道, 主要包括乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 等 23 个属^[13]。本实验根据菌落特征筛选出 30 株符合特征的乳酸菌, 编号为 F1~F30, 挑取单菌落经革兰氏染色后镜检, 再根据菌体特征和接触酶反应, 初步确定以下三株菌为乳酸菌, 如表 1 所示。

2.2 乳酸菌菌株的生理生化特性

青贮饲料目前在畜牧业生产中使用较为广泛, 现已成为反刍动物不可缺少的基础饲料^[17]。在青贮饲料发酵过程中, 随着厌氧条件的加深, 一些有害菌的生长活动受到限制。乳酸菌在整个发酵过程中起驱动作用, 不仅可以抑制霉菌等有害菌的生长, 还能利用饲料中的可溶性糖, 提高青贮的发酵品质。产酸速率和生长速率是筛选优良乳酸菌的重要指标, 从图 1 中可见, 本实验分离得到的三株乳酸菌的产酸能力较强, 在 12 h 之内菌株的 pH 均能降到 4.5 左右, 其中菌株 F5 产酸能力较强。在 0~4 h 时产酸速

率较快, 4~12 h 时产酸速率变化平缓, 菌株 F5 的 pH 在 12 h 的时候低于 4.5, 其他两株菌的 pH 在 12 h 的时候均接近 4.5, 因此, 可以看出各菌株产酸能力强弱依次为 F5、F3、F28。从图 2 中可见, 在 0~2 h 时菌株 F3 与菌株 F28 的繁殖速率一致, 2~12 h 时菌株 F28 的生长速度较快。F5 菌株的繁殖速率稍低于其他两株菌。因此, 可以看出各菌株繁殖速率强弱依次为 F28、F3、F5。

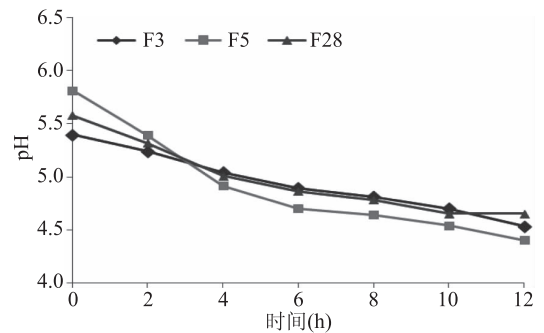


图1 乳酸菌菌株产酸速率曲线

Fig.1 Acid-producing rate curve of lactic acid bacterium strains

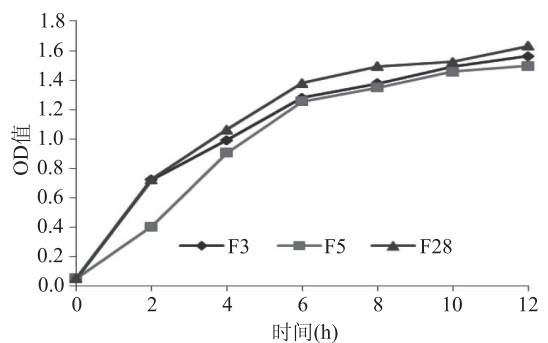


图2 乳酸菌菌株生长曲线

Fig.2 Growth curve of lactic acid bacterium strains

对 3 株乳酸菌生理生化指标及碳源利用方式进行鉴定, 结果见表 2 和表 3。由表 2 可看出, 在产气实验中 3 株乳酸菌发酵葡萄糖均不能产气, 为同型发酵乳酸菌。在 5 °C 条件下均生长较弱; 在 10 °C 条件下除菌株 F3 生长较弱, 其余 2 株菌均生长良好; 在 40 °C 和 45 °C 条件下, 3 株乳酸菌的生长良好; NaCl 浓度为 3% 和 6.5% 时 3 株菌均能生长; 在 pH3 条件下 3 株乳酸菌均不能生长; 在 pH4 条件下菌株 F5 和 F28 生长良好, 菌株 F3 生长较弱; pH 为 5~7 时 3 株菌生长状况良好。由表 3 可知, 3 株菌均可利用 D-葡萄糖、D-麦芽糖、D-甘露糖、D-松二糖、纤维二糖、D-甘露醇、D-海藻糖、D-果糖、蔗糖、D-山梨醇; F3 菌株不能发酵乳糖、D-半乳糖、L-山梨糖、D-松

三糖、木糖醇、D-棉籽糖、L-鼠李糖、D-木糖、D-蜜二糖；F5 和 F28 菌株均不能利用 L-山梨糖、D-松三糖、龙胆二糖、L-鼠李糖。

表 2 乳酸菌生理生化鉴定

Table 2 Physiological and biochemical property of lactic acid bacterium strains

鉴定项目	菌株编号		
	F3	F5	F28
产气	-	-	-
发酵类型	同型	同型	同型
5 °C	W	W	W
10 °C	W	+	+
40 °C	+	+	+
45 °C	+	+	+
3% NaCl	+	+	+
6.5% NaCl	+	+	+
pH3	-	-	-
pH4	W	+	+
pH5	+	+	+
pH6	+	+	+
pH7	+	+	+

注：“+”表示生长，“-”表示不生长，“W”表示弱生长。表 3 同。

2.3 分子生物学鉴定

芽孢杆菌属是一类需氧或兼性厌氧、能形成内生孢子的细菌，革兰氏染色呈阳性，且对逆性环境的耐受性强^[18]。现有研究表明，当动物食用添加了芽孢杆菌的饲料后，芽孢进入动物肠道，其萌发和生长会消耗大量的氧气，从而抑制有害微生物的生长，且动物的生产性能和抗病力都有所提高^[19]。据报道，

表 3 乳酸菌碳源同化实验结果

Table 3 Carbon source of fermentation experiments to lactic acid bacterium

鉴定项目	菌株编号		
	F3	F5	F28
D-葡萄糖	+	+	+
D-麦芽糖	+	+	+
乳糖	-	+	+
D-甘露糖	+	+	+
D-半乳糖	-	+	+
L-山梨糖	-	-	-
D-松二糖	+	+	+
D-松三糖	-	-	-
龙胆二糖	+	-	-
纤维二糖	+	+	+
木糖醇	-	+	+
D-棉籽糖	-	+	+
D-甘露醇	+	+	+
D-海藻糖	+	+	+
D-果糖	+	+	+
蔗糖	+	+	+
L-鼠李糖	-	-	-
D-木糖	-	+	+
D-山梨醇	+	+	+
D-蜜二糖	-	+	+

凝结芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、环状芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌等都可作为饲料添加剂^[20]。本实验对筛选出的乳酸菌提取基因组 DNA，采用细菌通用引物对其 16S rDNA 序列扩增，片段大小为 1500 bp 左右。测序获得的 16S rDNA 序列通过 BLAST 与 GenBank

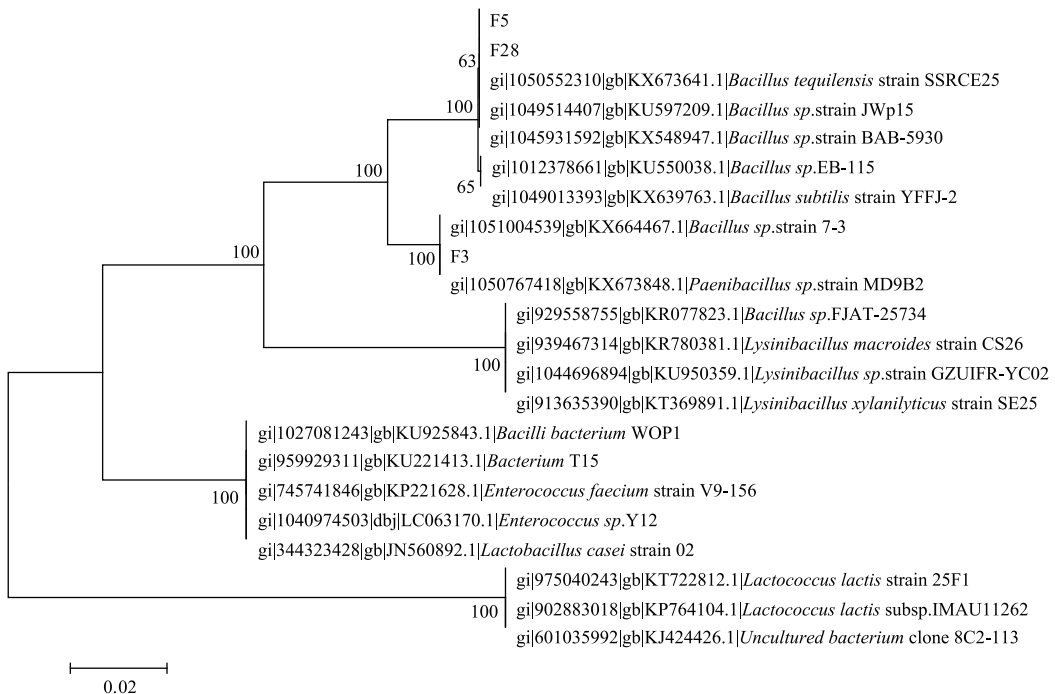


图 3 乳酸菌基于 16S rDNA 的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of the lactic bacterium strains according to 16S rDNA sequences

数据库中已知序列进行比对分析见图3,菌株F3与数据库中的*Paenibacillus sp.* 同源性为100%,故将其鉴定为类芽孢杆菌。菌株F5、F28与数据库中*Bacillus sp.* 同源性为100%,故将其鉴定为芽孢杆菌。

3 结论

通过实验室纯培养的方法对新疆传统的发面肥样品进行乳酸菌的分离,对分离的菌株运用16S rDNA基因序列和系统发育研究进行种属鉴定。首次从新疆传统发面肥中分离得到三株乳酸菌,其中2株菌株F5和F28被鉴定为*Bacillus sp.*,1株菌株F3被鉴定为*Paenibacillus sp.*。本实验分离的三株芽孢杆菌的生长性能和产酸速率都处于良好水平,其中菌株F5产酸能力较好,菌株F28的繁殖速度较快,并且两株乳酸菌均能利用多种碳水化合物。计划后期在制作青贮过程中将F5和F28两株菌同时添加,并对此次分离出的乳酸菌菌株的发酵条件、抑菌能力及其应用于青贮中的效果进行进一步研究,望其能成为对动物有益的新的饲料添加剂。

参考文献

- [1] Röcken W, Voysey P A. Sourdough fermentation in bread making [J]. Journal of Applied Bacterium Symposium Supplement, 1995, 79: 38-48.
- [2] 刘同杰, 李云, 吴诗榕, 等. 传统酸面团中细菌与酵母菌的分离与鉴定[J]. 现代食品科技, 2014(9): 114-120, 148.
- [3] Valcheva R, Korakli M, Onno B, et al. *Lactobacillus hammesii* sp. nov., isolated from French sourdough [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55 (2): 763-767.
- [4] Valcheva R, Ferchichi MF, Korakli M, et al. *Lactobacillus nantensis* sp. nov., isolated from French wheat sourdough [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56(3): 587-591.
- [5] Scheirlinck I, Van der Meulen R, Van Schoor A, et al. *Lactobacillus namurensis* sp. nov., isolated from a traditional Belgian sourdough [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(2): 223-227.
- [6] Scheirlinck I, Van der Meulen R, Van Schoor A, et al. *Lactobacillus crustorum* sp. nov., isolated from two traditional

- Belgian wheat sourdoughs [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(7): 1461-1467.
- [7] Gu C T, Li C Y, Yang L J, et al. *Lactobacillus mudanjiangensis* sp. nov., *Lactobacillus songhuajiangensis* sp. nov. and *Lactobacillus nenjiangensis* sp. nov., isolated from Chinese traditional pickle and sourdough [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63(12): 4698-4706.
- [8] Zhang J C, Liu W J, Sun Z, et al. Diversity of lactic acid bacteria and yeasts in traditional sourdoughs collected from western region in Inner Mongolia of China [J]. Food Control, 2011, 22(5): 767-774.
- [9] 吴斯日古冷. 内蒙古西部地区酸面团中酵母菌和乳酸菌的分离鉴定及其生物多样性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2011: 9-17.
- [10] 张国华. 不同地区传统面食发酵剂中菌群结构及优势菌种代谢的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2014: 40-55.
- [11] 刘慧. 现代食品微生物学实验技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2011: 260-284.
- [12] 席琳乔, 吴书奇, 马春晖, 等. 青贮玉米优良乳酸菌的分离与筛选[J]. 贵州农业科学, 2016(3): 102-105.
- [13] 凌代文. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 117-127.
- [14] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 364-370.
- [15] 张刚. 乳酸细菌—基础、技术和应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 40-43.
- [16] Balciunas E M, Martinez F A C, Todorov S D, et al. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review [J]. Food Control, 2013, 32(1): 134-142.
- [17] 许庆方, 韩建国, 玉柱. 青贮渗出液的研究进展[J]. 草业科学, 2005(11): 90-95.
- [18] 刘国红, 刘波, 林乃铨, 等. 芽孢杆菌的系统进化及其属分类学特征[J]. 福建农业学报, 2008(4): 436-449.
- [19] 李春风, 林显华, 谷巍. 枯草芽孢杆菌在饲料生产及环境防治中的应用[J]. 中国饲料, 2013(1): 10-12, 17.
- [20] 孔高飞, 金敏, 朱莲莲, 等. 一种短小芽孢杆菌分离鉴定及培养条件研究[J]. 浙江理工大学学报, 2014(7): 467-473, 480.

(上接第140页)

的选择性培养基[J]. 微生物学报, 2014, 54(4): 433-441.

[7] 冉域辰. 金银花水提物对双歧杆菌、乳酸杆菌的作用[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2005.

[8] Xiong T, Huang X, Huang J, et al. High-density cultivation of *Lactobacillus plantarum* NCU116 in an ammonium and glucose fed-batch system [J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(38): 7518-7525.

[9] Cardelle - Cobas A, Corzo N, Olano A, et al. Galactooligosaccharides derived from lactose and lactulose: Influence of structure on *Lactobacillus*, *Streptococcus*, and *Bifidobacterium*, growth [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 149(1): 81-87.

[10] Baranyi J, Roberts T A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food [J]. International Journal of Food Microbiology, 1994, 23(3-4): 277-294.

[11] Blumenkrantz N, Asboe - Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acids [J]. Analytical Biochemistry, 1973, 54(2): 484-489.

[12] Meseguer I, Aguilar V, González M J, et al. Extraction and Colorimetric Quantification of Uronic Acids of the Pectic Fraction in Fruit and Vegetables [J]. Journal of Food Composition & Analysis, 1998, 11(4): 285-291.

[13] 白文. 青春双歧杆菌高密度培养方法及冻干工艺的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2006.