

豆汁源屎肠球菌 DZ 的发酵特性及其安全性评估

袁钰¹, 王子荣¹, 罗红霞²

(1. 新疆农业大学食品科学与药学院, 新疆乌鲁木齐 830001)

(2. 北京农业职业学院食品与生物工程系, 北京 102400)

摘要: 本文以豆汁源屎肠球菌 DZ 为研究对象, 从生长曲线、产酸能力、产粘能力及模拟人体胃肠道耐受性等方面探究其特性; 通过吲哚实验, 溶血实验, 硝酸还原酶检测等实验探究其安全性, 并进一步探究其发酵产品的安全性。结果表明, 屎肠球菌 DZ 在 1 h-4 h 时菌落生长较快; 在 pH 3.0 的人工胃液中可存活, 之后进入肠道可增殖; 豆汁接菌发酵 16 h 时, 酸度值达 43.69 °T, 接菌发酵的豆汁酸度值差异极显著 ($p < 0.01$); 发酵时间为 16 h 时, 粘度值达 5.50 mPa·s 且差异极显著 ($p < 0.01$); 在安全性探究实验中, 硝酸还原酶检测及吲哚实验均为阴性, 溶血性实验表明屎肠球菌 DZ 为 γ -溶血; 其发酵产品均未检出黄曲霉毒素、呕吐毒素等有害物质。结论说明, 屎肠球菌 DZ 具备在极低 pH 值情况下存活的能力, 产酸能力良好, 且具备一定的产粘能力; 该菌不分解色氨酸, 不溶血, 其代谢产物中不含硝酸还原酶, 具有一定安全性。

关键词: 屎肠球菌; 耐受性; 安全性

文章编号: 1673-9078(2020)05-185-191

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.5.025

Characteristics and Safety Evaluation of *Enterococcus faecium* DZ from Fermented Soya-bean Milk

YUAN Yu¹, WANG Zi-rong¹, LOU Hong-xia²

(1. College of Food Science and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830001, China) (2. Department of Food and Biological Engineering Information, Beijing Vocational College of Agriculture, Beijing 102400, China)

Abstract: The features of growth curve, acid-producing capacity, viscosity-producing capacity and stimulated human gastrointestinal tolerance of *Enterococcus faecium* DZ from fermented soya-bean milk were studied. The safety of *Enterococcus faecium* DZ was explored using indole test, hemolysis test and nitrate reductase assay, and the safety of its fermented product was further investigated. The results showed that the colony growth of *Enterococcus faecium* DZ was rapid in 1 h-4 h. It could survive in simulated gastric juice with pH of 3.0, and then enter the intestine for proliferation. The acidity of fermented soya-bean milk by bacterial inoculation for 16 h was 43.69 °T. The acidity of fermented soya-bean milk by bacterial inoculation presented a significant difference ($p < 0.01$). After fermentation for 16 h, the viscosity was 5.50 mPa·s and its difference was extremely significant ($p < 0.01$). In the exploration of safety, nitrate reductase assay showed negative results. Indole test presented negative results. Hemolysis test showed that *Enterococcus faecium* DZ was γ -hemolysis. The results demonstrates that *Enterococcus faecium* DZ has the capacity to survive at very low pH, good acid-producing capacity, and certain viscosity-producing capacity; it does not decompose tryptophan, does not hemolyze, and its metabolites does not contain nitrate reductase, which has certain safety.

Key words: *Enterococcus faecium*; survivability; safety

引文格式:

袁钰, 王子荣, 罗红霞. 豆汁源屎肠球菌 DZ 的发酵特性及其安全性评估[J]. 现代食品科技, 2020, 36(5): 185-191

YUAN Yu, WANG Zi-Rong, LOU Hong-Xia. Characteristics and safety evaluation of *Enterococcus faecium* DZ from fermented soya-bean milk [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(5): 185-191

收稿日期: 2019-12-19

基金项目: 北京市教委科技项目 (KM201812448001); 万人计划教学名师特殊支持项目 (20181215); 教育部食品营养与安全应用技术协同创新中心 (XM-16-H23); 北京市财政支持特高校建设专项 (PXM2020-157102-000025)

作者简介: 袁钰 (1995-), 女, 研究生, 研究方向: 食品营养与安全

通讯作者: 王子荣 (1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品营养与安全; 共同通讯作者: 罗红霞 (1962-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品加工与安全

豆汁是北京特有传统小吃,主要由多种乳酸菌发酵而来,其风味独特,颇受百姓喜爱^[1-4]。实验室从自然发酵的豆汁中分离出一株菌,通过 16S rDNA 鉴定该菌为屎肠球菌(*Enterococcus faecium*),将豆汁源屎肠球菌命名为屎肠球菌 *Enterococcus faecium* DZ,甘油冻存备用^[5]。

屎肠球菌是人类及动物肠道中的一类正常菌群,可产生乳酸,也是一类重要的乳酸菌^[6]。目前屎肠球菌的应用涉及许多领域。在畜牧养殖领域,将屎肠球菌作为微生物添加剂加入饲料中较为多见。敖翔等^[7]人研究发现,将屎肠球菌添加到不同营养水平的饲料中,可改善断奶仔猪的养分消化率。徐巧云等^[8]人在泌乳中期奶牛的饲料中添加屎肠球菌制剂,研究该制剂对其抗氧化和免疫指标等方面的影响,发现饲料中添加屎肠球菌可增加红细胞数量,提高抗肿瘤因子的浓度,有利于降低乳酸脱氢酶的浓度,助于增强免疫力。SUN Peng 等^[9]人研究发现,喂养屎肠球菌 SF68 的小鼠粪便中,肠道细菌数量减少,总厌氧菌和乳酸菌数量均有所增加,该研究认为屎肠球菌 SF68 对肠道微生物有影响,对机体免疫功能有调节作用,并且具有良好的益生菌特性。在食品领域,屎肠球菌多应用于发酵食品中。夏玉等^[10]从新疆酸奶疙瘩中分离出一株屎肠球菌,在乳制品应用中体现出潜在的益生价值,在产酸、产香和降解酪蛋白等方面表现突出。陈志娜等^[11]从泡菜中分离筛选出屎肠球菌 *E. faecium* R2,可高效利用黄浆水发酵产酸,与乳酸菌相比,产酸较快且培养条件简单,推进了酸浆豆干(腐)的规范化生产。屎肠球菌安全性方面的研究,李彬彬等^[12]采用溶血实验、药敏实验及毒力基因 PCR 扩增等对屎肠球菌 Ef2 进行安全性评估,该实验结果表明,该菌溶血实验呈阴性,对庆大霉素、链霉素等不敏感,而对万古霉素等其他大部分抗生素抗菌药物敏感,无毒力基因检出,该菌株的安全性得到了初步判定。王黎文^[13]等提出了欧洲食品安全局动物饲料添加剂和饲料产品委员会关于动物营养中屎肠球菌的安全性评估指南,认为当屎肠球菌菌株对氨苄青霉素的抗性 ≤ 2 mg/L,且检测不到 IS16、hyl Ef1m 和 esp 三个遗传元件中的任意一种时,该菌株作为饲料添加剂使用可认为是安全的。

本文主要对豆汁源屎肠球菌 DZ 的产酸产粘能力、耐受性及安全性等方面进行探究,以期充分利用其特性推进发酵食品的发展。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

绿豆,市售;屎肠球菌 *Enterococcus faecium* DZ,本实验豆汁中分离鉴定;MRS 肉汤培养基、MRS 培养基、蛋白胨水(色氨酸肉汤)培养基、LB 肉汤培养基及血琼脂基础培养基,北京奥博星生物技术有限责任公司;黄曲霉毒素 B1 快速检测卡、呕吐毒素快速检测卡、硝酸盐检测试剂及亚硝酸盐检测试剂,北京智云达科技有限公司;吡啶试剂、胃蛋白酶及胰蛋白酶,北京酷来搏科技有限公司;其它化学试剂均为国产分析纯。

硝酸盐培养基制备:将 0.02 g 的 KNO_3 加入 100 mL MRS 培养基中,调 pH 至 7.4,灭菌备用。

血平板培养基制备:将 100 mL 血琼脂基础培养基灭菌后冷却至 50 °C,加入 5 mL 实验室采集无菌兔血,混匀后倒平板,置于 4 °C 冰箱备用。

模拟胃酸溶液制备:在适量 0.2% NaCl 溶液中,按 1 g/100 mL 的比例加入胃蛋白酶,用浓度为 1 mol/mL 的稀盐酸分别将 pH 调至 1.5 和 3.0。混匀、定容,用 0.22 μm 的无菌滤膜过滤备用。

人工肠液的制备:将 0.2 mol/L 的 PBS 溶液用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 6.8,定容至 500 mL 容量瓶中,按 0.1 g/L 的比例加入胰蛋白酶,充分溶解后用孔径 0.22 μm 的无菌滤膜过滤备用。

1.2 仪器与设备

SPX-150B-Z 型生化培养箱,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;HR/T16M 台式高速冷冻离心机,湖南赫西仪器装备有限公司;UV-2550 紫外分光光度计,岛津;FTC TMS-PRO 质构仪,北京盈盛恒泰科技有限责任公司;超净工作台,北京王堂蓝翼科技有限公司;ZK-1 漩涡混合器,常州亿通分析仪器制造有限公司;LDZF-30KB-II 立式压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂。

1.3 试验方法

1.3.1 发酵剂菌株特性分析

1.3.1.1 生长曲线

以屎肠球菌 DZ 作为单菌发酵剂,在 37 °C 恒温发酵 16 h 制得豆汁。为观测豆汁中不同发酵时间段屎肠球菌 DZ 的生长情况,分别从发酵 13 h、14 h、15 h、16 h、17 h 的豆汁中取样,再分别接入 MRS 液体培养基中培养,运用紫外分光光度计在 $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ 处测定吸光值,从接入 0 h 开始,每隔 1 h 测定一次。

1.3.1.2 模拟人体胃肠道耐受性测定

将屎肠球菌 DZ 菌悬液用 MRS 液体培养基调整菌落总数至 10^9 CFU/mL, 以 2% 的接种量分别加入 pH 1.5 和 pH 3.0 的人工胃液中, 处理 2 h 和 3 h, 再转接至人工肠液中分别处理 1 h、2 h、3 h 和 4 h 后涂布, 在 MRS 培养基 37 °C 条件下涂布培养 48 h, 计算菌落总数。

1.3.1.3 产酸能力测定

酸度值检测方法参照 GB 5009.239-2016 中电位滴定法。将菌落总数为 10^9 CFU/mL 屎肠球菌 DZ 菌悬液, 以 3% 的接种量加入 200 mL 待发酵豆汁中, 分别发酵 13 h、14 h、15 h、16 h 和 17 h, 测定酸度。以自然发酵的豆汁作为对照组。

1.3.1.4 产粘能力测定

粘度值检测方法参照 GB/T 10247-2008 进行。将菌落总数为 10^9 CFU/mL 屎肠球菌 DZ 菌悬液, 按 3% 的接种量接入 200 mL 待发酵豆汁中, 分别发酵 13 h、14 h、15 h、16 h 和 17 h, 测定其粘度。以自然发酵的豆汁作为对照组。

使用 FTC TMS-PRO 质构仪进一步测定豆汁的粘附性, 以自然发酵的豆汁作为对照组。

1.3.2 安全性检测

1.3.2.1 硝酸还原酶检测

在无菌条件下, 吸取屎肠球菌 DZ 菌悬液至硝酸盐培养基中, 接种量为 2% (V/V), 37 °C 静置培养 48 h; 培养结束后, 先滴加约 10 滴 5% 的 KI 溶液, 再滴加约 10 滴 5% 的淀粉溶液, 用漩涡混合器涡动 2 min, 观察颜色变化^[14,15], 以不接菌的作为对照组。

1.3.2.2 吲哚实验

在无菌条件下, 吸取屎肠球菌 DZ 菌悬液至蛋白胨水 (色氨酸肉汤) 培养基中, 接种量为 2% (V/V), 37 °C 静置培养 48 h; 加入 2 mL 乙醚、10 滴吲哚试剂后静置, 观察液面交界处颜色变化, 以不接菌的作为对照组。

1.3.2.3 溶血实验

在无菌条件下, 挑取屎肠球菌 DZ 菌悬液至血平板培养基上划线, 37 °C 倒置培养 48 h; 观察菌落周围有无溶血圈, 以金黄色葡萄球菌作为对照组。

1.3.2.4 发酵产品安全性检测

(1) 黄曲霉毒素 B1 检测

样本提取液的制备: 量取 70 mL 甲醇与 30 mL 去离子水混匀, 备用。

量取 5 mL 豆汁, 加入 10 mL 样本提取液, 用漩涡混合器涡动 3 min; 取 0.5 mL 混合溶液至 1.5 mL 离心管中, 室温离心 3 min; 取 50 μ L 上层清液, 加入

0.125 mL 黄曲霉毒素 B1 样本稀释液, 稀释至 5 μ g/L; 取约 3 滴样品液于检测卡加样孔中, 5 min 后判读。

(2) 呕吐毒素检测

称取 5 g 豆汁, 加入 25 mL 去离子水, 用漩涡混合器涡动 3 min; 取 0.5 mL 混合溶液至 1.5 mL 离心管, 室温离心 3 min; 取 50 μ L 上清液, 加入 0.1 mL 呕吐毒素样本稀释液, 稀释至 500 μ g/L; 取约 3 滴样品液于检测卡加样孔中, 5 min 后判读。

(3) 硝酸盐检测

各称取 50 mg 硝酸盐检测试剂 A、硝酸盐检测试剂 B 于试管中, 加入样品观察颜色变化。以等量的蒸馏水作为对照组。

(4) 亚硝酸盐检测

各称取 0.4 mL 亚硝酸盐 A 溶液、亚硝酸盐 B 溶液于试管中, 加入样品观察颜色变化。以等量的蒸馏水作为对照组。

1.4 数据处理

结果以均值 $\pm$ 标准偏差表示, 采用 Microsoft Excel 2010、SPSS 20.0 进行数据处理、分析及绘图。 $p < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 菌株特性分析

2.1.1 生长曲线

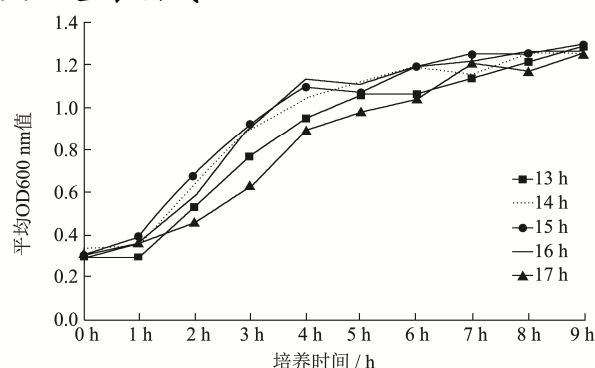


图1 屎肠球菌 DZ 生长曲线

Fig.1 Growth Curve of *Enterococcus faecium* DZ

由图 1 看出, 不同发酵时间豆汁中屎肠球菌 DZ 的生长情况趋同, 在 0 h~1 h 时, 吸光值较为平缓, 生长缓慢; 1 h~4 h 时菌落生长较快, 是屎肠球菌 DZ 的活跃期; 4 h~8 h 时生长放缓; 8 h~9 h 时又趋于平缓。

2.1.2 在模拟人体胃肠道中的耐受性

图 2 为屎肠球菌 DZ 在 pH 3.0 的人工胃液中分别处理 2 h、3 h 后转至肠液处理的耐受性实验结果。通

常人体空腹时胃液 pH 可达 1.5; 进食后 pH 达 3.0 左右, 消化时间约 3 h^[16]。由图 2 可知, 肠液处理 0 h 的菌落总数对数值分别为 8.20 logCFU/mL、7.99 logCFU/mL, 说明屎肠球菌 DZ 在前期人工胃液处理中至少耐受 3 h, 表明该菌具备较好的耐酸性; 肠液处理 1 h~4 h 可看出, 随肠液处理时间的增加菌落总数呈上升趋势, 说明屎肠球菌 DZ 具有较好的胆盐耐受能力, 肠液处理 4 h 的菌落总数对数值分别达到 7.83 logCFU/mL、7.66 logCFU/mL。在 pH 1.5 的模拟胃酸中处理后转至肠液的实验中, 均未有菌落出现, 而在 pH 3.0 的模拟胃酸中菌落总数如图 2 所示均不为 0, 这与单春乔^[17]、StrompfováV^[18]等研究结果基本一致。由此得出, 屎肠球菌 DZ 在非空腹条件下的人体胃液中可存活, 具备在极低 pH 值情况下存活的能力; 进入肠道后可以增殖, 具备良好的耐胆盐能力。

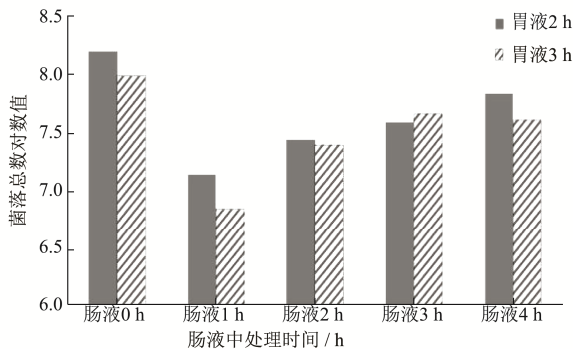


图 2 在模拟人工胃肠道中耐受性实验结果

Fig.2 Experimental Results of Tolerance in Simulated Artificial Gastrointestinal Tract

2.1.3 产酸能力

屎肠球菌 DZ 发酵豆汁的酸度值与自然发酵豆汁酸度值的数据对比见表 1。通过对比接菌(屎肠球菌 DZ)发酵豆汁与自然发酵豆汁的酸度值, 反应屎肠球菌 DZ 的产酸能力。如表 1, 在相同的发酵时间内,

接菌发酵豆汁的酸度均高于自然发酵豆汁的酸度, 随发酵时间的增加, 酸度值呈递增趋势发展, 在 16 h 出现峰值, 酸度值达 43.69 ± 1.07 °T; 接菌发酵的豆汁酸度值差异性显著 ($p < 0.05$), 说明发酵时间的变化对屎肠球菌 DZ 产酸能力的影响较大。以自然发酵为对照组, 横向分析, 接菌发酵的豆汁酸度值差异极显著 ($p < 0.01$), 说明接菌发酵对豆汁酸度影响较强, 屎肠球菌 DZ 产酸能力较好。自然发酵豆汁酸度值达 48.06 ± 0.42 °T 时需发酵 24 h, 而接菌发酵在 16 h 时, 酸度值达 43.69 ± 1.07 °T, 可有效缩短豆汁发酵时间, 进一步说明屎肠球菌 DZ 产酸能力良好。夏玉等^[10]同样发现屎肠球菌具备良好的产酸能力, 在发酵脱脂乳中, 可使 pH 下降较快, 滴定酸度增长较快; 陈志娜等^[11]研究也揭示了屎肠球菌的这一特性并运用于酸浆豆干加工中, 发酵过程中无需补充碳源, 且在发酵结束后无需补充醋酸即可达到适宜的酸度, 有效降低了生产成本。

表 1 屎肠球菌 DZ 产酸能力

Table 1 Acid production capacity of *Enterococcus faecium* DZ

发酵时间/h	接菌发酵豆汁酸度值/°T	自然发酵豆汁酸度值/°T
13	$31.33 \pm 0.01^{c**}$	19.35 ± 0.67^b
14	$35.38 \pm 0.66^{b**}$	18.88 ± 2.66^b
15	$36.00 \pm 1.41^{b**}$	20.76 ± 1.33^{ab}
16	$43.69 \pm 1.07^{a**}$	22.18 ± 0.67^{ab}
17	$41.47 \pm 0.60^{a**}$	24.06 ± 0.66^a

注: 同一列不同字母表示显著性差异 ($p < 0.05$, $n=2$); 同一行*表示显著性差异 ($p < 0.05$, $n=2$), **表示差异极显著 ($p < 0.01$, $n=2$)。

2.1.4 产粘能力

屎肠球菌 DZ 发酵豆汁的粘度值与自然发酵豆汁粘度值的数据对比见表 2。

表 2 屎肠球菌 DZ 产粘能力

Table 2 Viscosity producing ability of *Enterococcus faecium* DZ

发酵时间/h	接菌发酵豆汁粘度值/mPa·s	自然发酵豆汁粘度值/mPa·s
13	5.33 ± 0.06^a	5.13 ± 0.15^a
14	5.27 ± 0.06^a	5.03 ± 0.21^a
15	$5.40 \pm 0.26^{a*}$	5.07 ± 0.15^a
16	$5.50 \pm 0.10^{a**}$	5.07 ± 0.06^a
17	$5.43 \pm 0.23^{a*}$	5.10 ± 0.20^a

注: 同一列不同字母表示显著性差异 ($p < 0.05$, $n=3$); 同一行*表示显著性差异 ($p < 0.05$, $n=3$), **表示差异极显著 ($p < 0.01$, $n=3$)。

通过对比接菌(屎肠球菌 DZ)发酵豆汁与自然发酵豆汁的粘度值, 考察屎肠球菌 DZ 的产粘能力。如表 2, 接菌发酵豆汁的粘度值差异不显著 ($p > 0.05$), 说明发酵时间的变化对屎肠球菌 DZ 产粘能力的影响

不大。以自然发酵为对照组, 横向分析, 在发酵时间为 15 h 和 17 h 时, 粘度值分别为 5.40 ± 0.26 mPa·s、 5.43 ± 0.23 mPa·s, 接菌发酵豆汁的粘度值差异显著 ($p < 0.05$), 说明在该时间段接菌发酵对豆汁的粘度产

生一定影响；在发酵时间为 16 h 时差异极显著 ($p<0.01$)，则表明该时间段接菌发酵对豆汁粘度的影响较强，此时屎肠球菌 DZ 产粘能力较佳，粘度值为 5.50 ± 0.10 mPa·s。

使用 FTC TMS-PRO 质构仪测出接菌发酵豆汁粘附性为 0.08 ± 0.01 N.mm，自然发酵豆汁粘附性为 0.06 ± 0.00 N.mm，且差异显著 ($p<0.05$)，说明接菌发酵豆汁粘附性较自然发酵豆汁粘附性强，进一步说明屎肠球菌 DZ 具备一定的产粘能力。

2.2 安全性检测

2.2.1 硝酸还原酶检测

图 3a 是屎肠球菌 DZ 硝酸还原酶检测的实验结果。硝酸还原酶是一种氧化还原酶，可催化硝酸离子还原成亚硝酸离子，使硝酸盐转换成亚硝酸盐，而亚硝酸盐对人体有致癌、致畸和急性中毒等危害^[19-22]。如图 3a，对照组没有变化，实验组变浑浊且未变蓝色，是阴性反应，说明屎肠球菌 DZ 的代谢产物中不含硝酸还原酶或硝酸还原酶无活性，不能将硝酸盐转换成亚硝酸盐而危害人体健康。

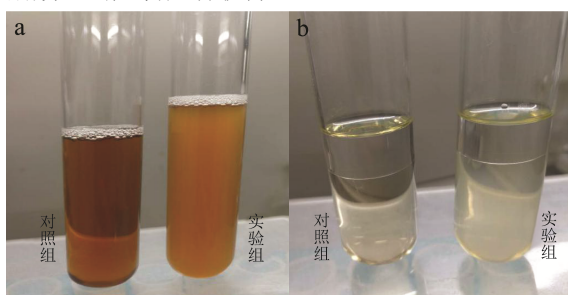


图 3 硝酸还原酶检测及吲哚实验结果

Fig.3 Detection of nitrate reductase and indole test results

注：a-硝酸还原酶检测结果；b-吲哚实验检测结果。

2.2.2 吲哚实验

图 3b 是屎肠球菌 DZ 吲哚实验的结果。色氨酸是人体必需氨基酸之一，可调节蛋白质合成，增强免疫，促进消化^[23]。通过该实验检测屎肠球菌 DZ 是否能够

分解色氨酸产生吲哚。如图 3b，对照组没有变化，实验组变浑浊且液面交界处无颜色变化，是阴性反应，未产生吲哚类物质，说明屎肠球菌 DZ 不分解色氨酸，不会影响色氨酸调节蛋白质合成，增强免疫等功能。

2.2.3 溶血性实验

屎肠球菌 DZ 与金黄色葡萄球菌溶血性实验的结果见图 4。溶血现象是人体非正常反应，是由红细胞破裂，血红蛋白逸出所致；微生物溶血主要分为 α -溶血、 β -溶血和 γ -溶血，产生的溶血素有很强的细胞毒性作用，其中 α -溶血素和 β -溶血素对组织造成的损害最为严重^[24-26]。如图 4，在 37℃ 恒温培养箱中倒置培养 48 h 后，对照组金黄色葡萄球菌的菌落周围出现界限分明且完全透明的溶血环，是 β -溶血；实验组屎肠球菌 DZ 未出现溶血环，是 γ -溶血。表明，屎肠球菌 DZ 不溶血，这与李彬彬^[12]等认为屎肠球菌 Ef2 为非溶血菌株的研究结果一致。

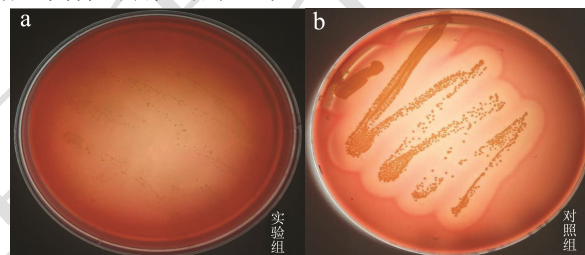


图 4 溶血实验结果

Fig.4 Hemolysis test results

2.2.4 发酵产品安全性检测

屎肠球菌 DZ 发酵产品安全性检测实验结果见表 3。屎肠球菌 DZ 作为发酵剂制作豆汁，并对发酵后的豆汁进行黄曲霉毒素 B1 检测、呕吐毒素检测、硝酸盐检测及亚硝酸盐检测。如表 3 所示，黄曲霉毒素和呕吐毒素均未检出或浓度小于检测限；硝酸盐及亚硝酸盐均未检出。将发酵好的豆汁放置 24 h 后复检，表中四个检测项目均未检出。由此可知，屎肠球菌 DZ 发酵产品具有一定的安全性。

表 3 发酵产品安全性检测结果

Table 3 Safety test results of fermented products

检测项目	实验现象	实验结果
黄曲霉毒素 B1 检测	检测卡 C 线显红色，T 线较 C 线显色深	阴性，无黄曲霉毒素
呕吐毒素检测	检测卡 C 线显红色，T 线较 C 线显色深	阴性，无呕吐毒素
硝酸盐检测	对照组无颜色变化，实验组也无颜色变化	硝酸盐未检出
亚硝酸盐检测	对照组无颜色变化，实验组也无颜色变化	亚硝酸盐未检出

3 结论

豆汁源屎肠球菌 DZ 在 1 h~4 h 生长较快，在人工胃液 (pH 3.0) 中至少耐受 3 h，肠液处理 4 h 的菌落

总数对数值分别达到 7.83 logCFU/mL、7.66 logCFU/mL，推测在人体胃肠道中具有一定活性；豆汁源屎肠球菌 DZ 具有良好的产酸能力、产粘能力等发酵特性，可有效缩短豆汁制作周期；豆汁源屎肠球

菌 DZ 代谢产物中不含硝酸还原酶或硝酸还原酶无活性,不分解色氨酸,表现为 γ -溶血(即不溶血),具有一定的安全性;运用屎肠球菌 DZ 发酵的豆汁中无黄曲霉毒素、无呕吐毒素、未检出硝酸盐及亚硝酸盐,24 h 后复检结果仍相同,说明其发酵制品亦具有一定的安全性。综上所述,可将豆汁源屎肠球菌 DZ 运用于发酵食品中,利用其特性推进发酵食品的发展。

参考文献

- [1] 丁玉振,张绍英,梁尽祎,等.北京传统小吃“豆汁”制作工艺研究[J].食品科学,2010,31(2):280-283
DING Yu-zhen, ZHANG Shao-ying, LIANG Jin-yi, et al. Processing technology of Beijing traditional food “Douzhi” [J]. Food Science, 2010, 31(2): 280-283
- [2] 袁钰,罗红霞,邓毛程,等.基于 16S rDNA 高通量测序技术分析北京豆汁儿微生物多样性和功能预测的研究[J].食品工业科技,2020,41(2):95-100
YUAN Yu, LUO Hong-xia, DENG Mao-cheng, et al. Analysis of microbial diversity and functional prediction of Douzhi based on 16S rDNA high-throughput sequencing technology [J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(2): 95-100
- [3] 苗志伟,刘玉平,孙宝国,等.豆汁熬制过程中挥发性香成分的变化[J].中国食品学报,2013,13(2):199-204
MIAO Zhi-wei, LIU Yu-ping, SUN Bao-guo, et al. Changes of volatile components in soybean juice during boiling [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(2): 199-204
- [4] 陈宇翔,陈历俊,姜铁民.北京豆汁优势菌群的探究及其发酵性能测试[J].食品科技,2013,38(8):67-70
CHEN Yu-xiang, CEN Li-jun, JIANG Tie-min. Explore and fermentation test of fermented soya-bean milk (Beijing Douzhi) advantage bacterium group [J]. Food Science and Technology, 2013, 38(8): 67-70
- [5] 袁钰,李静,罗红霞,等.模糊数学评价与响应面结合优化老北京豆汁儿的发酵工艺[J].安徽农业大学学报, in press
YUAN Yu, LI Jing, LUO Hong-xia, et al. Fuzzy mathematics evaluation combined with response surface to optimize the fermentation process of Beijing Douzhi [J]. Journal of Anhui Agricultural University, in press
- [6] Maia O B, Duarte R, Silva A M, et al. Evaluation of the components of a commercial probiotic in gnotobiotic mice experimentally challenged with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium [J]. Veterinary Microbiology, 2001, 79(2): 183-189
- [7] 敖翔,张立泰,李元凤,等.不同营养水平饲料添加屎肠球菌对断奶仔猪生长性能、养分消化率和粪便有害气体的影响[J].养猪,2019,1:14-16
AO Xiang, ZHANG Li-tai, LI Yuan-feng, et al. Effects of *Enterococcus faecium* on growth performance, nutrient digestibility and fecal harmful gases of weaned piglets [J]. Swine Production, 2019, 1: 14-16
- [8] 徐巧云,王梦芝,霍永久,等.屎肠球菌制剂对泌乳中期奶牛血清生化、抗氧化和免疫指标的影响[J].饲料工业,2018,39(19):22-29
XU Qiao-yun, WANG Meng-zhi, HUO Yong-jiu, et al. Effects of *Enterococcus faecalis* on serum biochemical, antioxidant and immune parameters in mid-lactating dairy cows [J]. Feed Industry, 2018, 39(19): 22-29
- [9] SUN Peng, WANG Jia-qí, JIANG Yan-mei, et al. Effects of *Enterococcus faecium* (SF68) on immune function in mice [J]. Food Chemistry, 2010, 123: 63-68
- [10] 夏玉,郑华,林捷,等.屎肠球菌发酵特性及其功能性研究[J].食品工业科技,2014,35(12):123-126,132
XIA Yu, ZHENG Hua, LIN Jie, et al. Study on the fermentation and function characteristics of *Enterococcus faecium* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(12): 123-126, 132
- [11] 陈志娜,叶韬,丁曼,等.屎肠球菌 *Enterococcus faecium* R2 的分离鉴定及其在酸浆豆干加工中的应用[J].食品与发酵工业,2019,45(8):130-135
CHEN Zhi-na, YE Tao, DING Man, et al. Isolation and identification of *Enterococcus faecium* R2 and its application in sour slurry dried bean curd processing [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(8): 130-135
- [12] 李彬彬,宋桂森,全鑫杰,等.屎肠球菌 E2 的安全性评估及其产生生物胺氧化酶培养和诱导条件的优化[J].食品与发酵工业,2019,45(9):41-48
LI Bin-bin, SONG Gui-sen, QUAN Xin-jie, et al. Safety assessment and optimized cultural and induction conditions for *Enterococcus faecium* E2 producing amine oxidase [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(9): 41-48
- [13] 王黎文.欧洲食品安全局动物饲料添加剂和饲料产品委员会关于动物营养中屎肠球菌的安全性评估指南[J].中国饲料,2014,15:37-40
WANG Li-wen. EFSA animal feed additives and feed products committee guidelines for the safety assessment of *Enterococcus faecium* in animal nutrition [J]. China Feed, 2014, 15: 37-40
- [14] Sakaguchi O, Chen R, Yokota K. Food hygienic studies of

- sulfite. V. effects of sulfite on nitrate reductase, nitroreductase and methaemoglobin formation [J]. *Nihon Eiseigaku Zasshi. Japanese Journal of Hygiene*, 1972, 26(6): 492-497
- [15] Shokryazdan P, Jahromi M F, Liang J B, et al. *In vitro* assessment of bioactivities of *Lactobacillus* strains as potential probiotics for humans and chickens [J]. *Journal of Food Science*, 2017, 82(11): 2734-2745
- [16] 李洋,赵欣,张玉,等.牦牛酸乳中耐酸耐胆盐乳酸菌的分离筛选和鉴定[J].食品与机械,2018,34(7):23-28,33
LI Yang, ZHAO Xin, ZHANG Yu, et al. Separation and screening of lactic acid bacteria from the traditional yak yogurt resistant against of acid and bile salts [J]. *Food & Machinery*, 2018, 34(7): 23-28, 33
- [17] 单春乔,冯柳柳,李永幸,等.饲用屎肠球菌 M74 的生物学特性研究[J].畜牧与饲料科学,2017,38(8):6-10
SHAN Chun-qiao, FENG Liu-liu, LI Yong-xing, et al. Biological characterization of *Enterococcus faecium* M74, a strain for feed additive use [J]. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2017, 38(8): 6-10
- [18] StropfováV, Lauková, Ouwehand A C. Selection of enterococci for potential canine probiotic additives [J]. *Vet Microbiol*, 2004, 100: 107-114
- [19] 李敏,朱新枝,张红.幼儿群体性亚硝酸盐食物中毒机制、急救与护理探讨[J].医学动物防制,2011,27(1):93-94
LI Min, ZHU Xin-zhi, ZHANG Hong, et al. Discussion on the first aid and nursing of infant group nitrite food poisoning [J]. *Journal of Medical Pest Control*, 2011, 27(1): 93-94
- [20] 何淑玲,李博,籍保平.泡菜发酵过程中硝酸盐还原酶活性的研究[J].食品科技,2005,1:94-97
HE Shu-ling, LI Bo, JI Bao-ping, et al. Study on nitrate reductase activity during the fermentation of pickled vegetable [J]. *Food Science and Technology*, 2005, 1: 94-97
- [21] 赵静,王娜,冯叙桥,等.蔬菜中硝酸盐和亚硝酸盐检测方法的研究进展[J].食品科学,2014,35(8):42-49
ZHAO Jing, WANG Na, FENG Xu-qiao, et al. Advances in detection methods for nitrate and nitrite in vegetables [J]. *Food Science*, 2014, 35(8): 42-49
- [22] 许苗苗,陈义伦,潘燕,等.菠菜体内硝酸还原酶部分酶学性质及贮藏控制[J].食品与发酵工业,2008,34(11):21-24
XU Miao-miao, CHEN Yi-lun, PAN Yan, et al. Some enzymatic properties and storage control of nitrate reductase of spinach [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2008, 34(11): 21-24
- [23] 张将,唐爱国.色氨酸及其代谢产物检测的临床应用[J].实用预防医学,2012,19(4):633-636
ZHANG Jiang, TANG Ai-guo. Clinical application of determination of tryptophan and its metabolites [J]. *Practical Preventive Medicine*, 2012, 19(4): 633-636
- [24] 卫沛楠,吕国平,徐保红.食源性金黄色葡萄球菌溶血素基因的多重 PCR 检测和聚类分析[J].卫生研究,2012,41(6):934-937
WEI Pei-nan, LU Guo-ping, XU Bao-hong. Genotypic and phenotypic analysis of hemolysis in foodborne *Staphylococcus aureus* [J]. *Journal of Hygiene Research*, 2012, 41(6): 934-937
- [25] H A Elsner, I Sobottka, D Mack, et al. Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates [J]. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2000, 19(1): 39-42
- [26] Yeo S, Lee S, Park H, et al. Development of putative probiotics as feed additives: Validation in a porcine-specific gastrointestinal tract model [J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2016, 100(23): 1-12

(上接第 303 页)

- [19] 迟海泉,张洪娟.蜂胶软胶囊制备工艺及工艺验证试验研究[J].黑龙江中医药,2014,43(1):47-48
CHI Hai-quan, ZHANG Hong-juan. Study on propolis soft capsule preparation process and process validation test [J]. *Traditional Chinese Medicine of Heilongjiang*, 2014, 43(1): 47-48
- [20] 程晓雨,胡福良.我国蜂胶保健食品概况[J].中国蜂业,2015,66(4):45-47
CHENG Xiao-yu, HU Fu-liang. Overview of propolis health food in China [J]. *China Bee Industry*, 2015, 66(4): 45-47