

马奶及其制品中肠球菌属乳酸菌的安全性评价

王梦姣¹, 李少英^{1,*}, 李淑芬², 贺文英³, 宋晓敏¹, 马春艳¹, 李 贞¹, 骆 袁⁴

(1.内蒙古农业大学食品科学与工程学院, 内蒙古 呼和浩特 010018; 2.内蒙古农业大学生命科学学院, 内蒙古 呼和浩特 010018;

3.内蒙古农业大学理学院, 内蒙古 呼和浩特 010018; 4.呼和浩特铁路局, 内蒙古 呼和浩特 010057)

摘 要:目的: 为使具有民族特色和特殊功效的马奶及其制品中的有益乳酸菌应用于食品发酵工业, 确保分离自内蒙古牧区靠自然发酵制作的马奶及其制品中的乳酸菌的安全性, 对分离自马奶及其制品中的乳酸菌进行安全性评价。方法: 通过吲哚实验、硝酸盐还原酶实验、氨基脱羧酶实验、溶血实验、D-乳酸检测及质粒提取实验, 确定菌株是否含有有害代谢产物及有无耐药性。结果: 菌株的吲哚实验、硝酸盐还原酶实验、氨基脱羧酶实验、溶血实验均为阴性, 在菌株JHZ9、JHZ15、JHZ25、JNN1中检出了少量的D-乳酸, 菌株对实验所选药品无耐药性且未检测到可转移的耐药质粒。结论: 7株肠球菌属的乳酸菌在代谢活动中不产生有害代谢产物, 不存在可转移的耐药质粒。

关键词: 乳酸菌; 安全性; 有害代谢产物; 耐药性; 质粒

Safety Assessment of *Enterococcus* Isolated from Mare's Milk and Its Products

WANG Meng-jiao¹, LI Shao-ying^{1,*}, LI Shu-fen², HE Wen-ying³, SONG Xiao-min¹, MA Chun-yan¹, LI Zhen¹, LUO Yuan⁴

(1. College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China; 2. College of Life

Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China; 3. College of Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China; 4. Huhhot Railway Administration, Hohhot 010057, China)

Abstract: Objective: This study aimed to isolate lactic acid bacteria (LAB) from mare's milk and its products, which have nationality characteristics and special functions. The mare's milk and its products were made by natural fermentation in pastoral areas of Inner Mongolia. In order to ensure their safe application in the food fermentation industry, it is necessary to assess the safety of LAB isolated from mare's milk and koumiss. Methods: Indole test, nitrate reductase assay, amino decarboxylase test, hemolysis test, D-lactic acid assay and plasmid extraction were performed to identify whether harmful metabolites or drug resistance exists in the tested strains. Results: Negative results were observed in all tests except for D-lactic acid, which was detected in small amounts in strains JHZ9, JHZ15, JHZ25 and JNN1. Neither resistance to the tested drugs nor transferable resistant plasmid was detected in seven tested strains. Conclusion: Neither harmful metabolites nor drug resistant plasmids has been detected in the seven strains, which belong to *Enterococcus*.

Key words: lactic acid bacteria; safety; harmful metabolites; drug resistance; plasmids

中图分类号: Q935

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2014) 17-0204-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201417039

酸马奶是一种传统的发酵奶产品, 起源于中亚草原, 其生产和消费在东欧和中亚国家有着悠久的历史^[1]。酸马奶又称熟马奶^[2], 可改善人体消化功能、降血压、降血脂、提高免疫力、改善心血管类疾病等^[3-4]。马奶较其他畜类奶含有丰富的蛋白质、乳糖、维生素和矿物质, 且马奶中的马乳蛋白易被人体消化^[5], 马奶中还含有丰富的牛磺酸、乳糖和必需脂肪酸。马奶及酸马奶的功效、独特的风味口感与其中的微生物有必然联系, 因此对从中分离出的乳酸菌的研究十分必要。

内蒙古牧区的酸马奶采用家庭手工制作、自然发酵的方式获取, 其产品风味独特, 倍受人们的青睐。其中的有益乳酸菌更是研究者关注的焦点, 目前对乳酸菌的研究主要集中在产品的开发上, 而这其中乳酸菌的安全性研究就显得尤为重要。乳酸菌的安全性评价从受试对象上分类包括: 体外实验、动物实验、临床实验^[6]。体外实验主要是关于乳酸菌代谢活动和细胞特性的研究。代谢活动研究主要是确定乳酸菌是否含有胺、氨、吲哚、苯酚、致癌亚胆酸和降解黏膜的酶, 细胞特性要确定乳

收稿日期: 2013-11-14

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (31060014)

作者简介: 王梦姣 (1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品科学。E-mail: wmj603320463@sina.com

*通信作者: 李少英 (1961—), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品科学。E-mail: nmglshy@126.com

酸菌株有没有耐药性^[6]。本实验在课题组前期对马奶及其制品酸马奶中的乳酸菌进行了分离鉴定及初步的生化特性、抗菌特性的研究的基础上^[7-10],对从马奶及其制品中分离出来的7株肠球菌属乳酸菌进行体外安全性实验,包括有害代谢产物实验和菌株耐药性实验,确定7株肠球菌属的乳酸菌在发酵过程中是否会产生有害代谢产物、是否带有耐药基因、耐药基因是否存在于质粒,从而对其安全性进行评价。

1 材料与方法

1.1 菌株、培养基与试剂

肠球菌JHZ9、JHZ15、JHZ17、JHZ22、JHZ25、JHZ28均来源于内蒙古锡林郭勒牧区酸马奶中,肠球菌JNN1来源于内蒙古锡林郭勒牧区马奶中,大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) ATCC 25922,均由国家自然科学基金课题组(No.31060014)提供。标准菌株为粪肠球菌(*E. faecalis*) CICC23658,购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。

MRS液体培养基、MRS琼脂培养基、脱脂乳培养基、蛋白胨水培养基、硝酸盐培养基、Taylor氏脱羧酶实验培养基等培养基按照文献[6,11-12]进行配制。

血琼脂平板 广东环凯微生物科技有限公司;
D-*L*-乳酸检测试剂盒 爱尔兰Megazyme公司; DL2000 DNA Marker、6×Loading buffer 宝生物工程(大连)有限公司;质粒小提试剂盒 天根生化科技有限公司;琼脂糖、Tris-Base 美国Sigma公司;乙二胺四乙酸、硼酸 天津市北方天医化学试剂厂。

1.2 仪器与设备

分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司;
DYY-6D型电泳仪电源、DYCP-31DN型电泳仪 北京市六一仪器厂;图像记录分析仪 普洛麦格(北京)生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株的活化

将菌株接种于MRS液体培养基中,37℃恒温培养22 h,活化3代。

1.3.2 产乳酸实验

1.3.2.1 凝乳实验

将活化好的第3代菌液3 000 r/min离心10 min,弃掉上清液。加入与培养液等体积的无菌生理盐水,3 000 r/min离心10 min,弃掉上清液,如此重复离心洗涤3次后加入与培养液等体积的生理盐水制成供试菌液,将供试菌液按3%的接菌量接入无菌脱脂乳中,37℃培养7 d,期间观察记录。

1.3.2.2 酸度滴定

将上述培养7 d的乳酸菌,按照GB 5413.34—2010《乳和乳制品酸度的测定》进行酸度测定。

1.3.3 有害代谢产物评价实验

1.3.3.1 吡啶实验

在无菌条件下,将活化好的8株菌株按3%的接菌量分别接入到蛋白胨水培养基中。37℃培养72 h,加入吡啶试剂8~10滴,观察实验结果。同时做空白实验。

1.3.3.2 硝酸盐还原酶活性检测

在无菌条件下,将活化好的8株菌株按3%的接菌量分别接入到硝酸盐培养基中37℃培养5 d后,滴加碘化钾溶液和淀粉溶液各10滴,观察实验结果。同时做空白实验^[12]。

1.3.3.3 溶血实验

在无菌条件下,将活化好的8株菌株用灭菌的接菌环划线和穿刺于血琼脂平板中,37℃培养48 h,观察有无溶血圈出现。同时做空白实验^[13-14]。

1.3.3.4 氨基脱羧酶活性检测

在无菌条件下,将活化好的8株菌株按3%的接菌量分别接入Taylor氏脱羧酶实验培养基(鸟氨酸、精氨酸、赖氨酸),37℃培养72 h,观察记录结果。同时做空白实验^[11]。

1.3.3.5 乳酸旋光性检测

使用爱尔兰Megazyme公司的*D*-*L*-乳酸检测试剂盒对*D*-乳酸进行检测。

1.4 耐药性检测

1.4.1 药敏实验

利用纸片法进行药敏实验,药敏纸片:诺氟沙星、氧氟沙星、环丙沙星、红霉素、阿莫西林、氨苄西林和链霉素^[15]。

1.4.2 质粒提取

取0.2 g琼脂糖加1×TBE(Tris-硼酸)电泳缓冲液20 mL溶解降温至60℃,加入1 μL核酸染料,混匀,倒入电泳槽制胶。

取1.5 mL培养好的菌液,使用质粒小提试剂盒提取质粒。取提取的液体5 μL,加入1 μL 6×Loading buffer,点样于制备好的琼脂糖凝胶,电泳液为1×TBE溶液,电压设定110 V,工作30 min。用图像记录分析系统对琼脂糖凝胶进行分析。

以大肠埃希氏菌ATCC 25922作为阳性对照。

2 结果与分析

2.1 产乳酸实验

2.1.1 凝乳实验

实验结果显示8株菌株37℃恒温培养3 d,除标准菌

株CICC23658外,接入其他7株菌株的脱脂乳均凝乳。牛乳中的酪蛋白遇胃酸后结成的凝块较硬,而乳酸菌发酵产生乳酸使蛋白质形成微细的凝乳,使凝块变软,更利于人体消化^[6]。实验结果表明,7株菌株凝乳效果均较好。

2.1.2 酸度滴定

标定后NaOH溶液浓度为0.104 7 mol/L,8株菌株酸度滴定结果如表1所示。

表1 菌株酸度滴定结果

Table 1 Titratable acidity produced by eight tested strains

菌株	JHZ9	JHZ15	JHZ17	JHZ22	JHZ25	JHZ28	JNN1	CICC23658
酸度/°T	72.73	70.35	67.78	72.44	69.31	69.45	57.47	26.80

由表1可知,菌株JHZ9、JHZ15、JHZ22经发酵后的酸度均 $\geq 70^{\circ}\text{T}$,菌株JHZ17、JHZ25、JHZ28酸度略低于 70°T ,但接近 70°T ,菌株JNN1和CICC23658酸度较低。

乳酸菌的产酸能力是其能否用于发酵制品的重要指标。GB 19301—2010《食品安全国家标准 生乳》规定,发酵乳的理化指标中酸度 $\geq 70^{\circ}\text{T}$ 。结果说明菌株JHZ9、JHZ15、JHZ17、JHZ22、JHZ25、JHZ28发酵能力较好,其发酵乳的酸度基本符合国家发酵乳标准要求。

2.2 有害代谢产物评价实验

2.2.1 吲哚实验

8株菌株吲哚实验结果均为阴性,向培养好的菌液中滴加指示剂,均未出现红色圆环,说明未产生吲哚类物质。

吲哚实验可以检测菌株是否能分解蛋白质中的色氨酸。色氨酸为人体必需氨基酸,参与人体蛋白质合成、调节免疫功能和促进消化。色氨酸代谢过程发生障碍会引起肝功能衰退、恶性肿瘤等^[16]。吲哚实验结果表明菌株不会分解色氨酸产生吲哚。

2.2.2 硝酸盐还原酶活性检测

细菌如果产生硝酸盐还原酶,会将硝酸盐还原为亚硝酸盐,与碘化钾溶液反应会置换出碘单质,滴加淀粉溶液培养基会变为蓝色。实验结果显示所有菌液均未变蓝,为阴性反应。

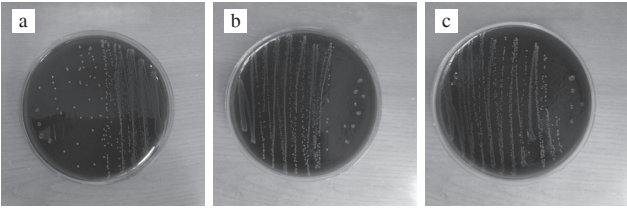
硝酸盐还原酶可以将食物中含有的硝酸盐还原为亚硝酸盐,亚硝酸盐是强致癌物亚硝胺的前体物质,与食品中蛋白质分解中间产物仲胺反应形成亚硝胺,后者可诱发多种癌症如肝癌、胃癌、食道癌和咽癌等^[17]。结果说明菌株代谢产物中不含有硝酸还原酶或硝酸还原酶无活性。

2.2.3 氨基脱羧酶活性检测

具有氨基酸脱羧酶的细菌,能分解氨基酸使其脱羧生成胺(赖氨酸 $\rightarrow$ 尸胺,鸟氨酸 $\rightarrow$ 腐胺,精氨酸 $\rightarrow$ 精胺)和二氧化碳,使培养基变碱性,滴加指示剂(溴甲酚紫),呈黄色为阴性,呈紫色为阳性。实验结果显示测定管呈黄色,为阴性。

一些乳酸菌具有氨基酸脱羧酶活性,能够将食品中的氨基酸脱羧还原成生物胺类物质,若胺类在体内聚积过多,则会引起中毒症状^[18]。检测结果说明乳酸菌代谢产物中不含有氨基脱羧酶。

2.2.4 溶血实验



a. JHZ28; b. JHZ9; c. JHZ25。

图1 溶血实验结果

Fig.1 The results of hemolysis test

如图1所示,在培养的生长物周围的琼脂未显示绿色,说明没有产生 α -溶血;在穿刺物和划线琼脂的周围未出现透明圈,说明没有产生 β -溶血。实验结果均为 γ -溶血,即对溶血无作用或不溶血^[13]。

溶血是指红细胞破裂溶解现象,可由多种理化因素和毒素引起。如某些溶血性链球菌和产气荚膜杆菌可导致败血症,疟原虫破坏红细胞和某些溶血性蛇毒含卵磷脂酶,使血浆或红细胞的卵磷脂转变为溶血卵磷脂,使红细胞膜分解^[19]。本实验7株菌株均无溶血现象发生(图1只列出其中3株),说明菌株不是溶血细菌。

2.2.5 乳酸旋光性检测

表2 菌株D-/L-乳酸含量检测结果

Table 2 D-/L- lactic acid contents produced by eight tested strains

菌株	D-乳酸含量/(g/L)	L-乳酸含量/(g/L)
JHZ9	0.002	0.41
JHZ15	0.010	0.45
JHZ17	—	0.47
JHZ22	—	0.37
JHZ25	0.015	0.40
JHZ28	—	0.37
JNN1	0.035	0.21
CICC23658	0.056	0.36
空白	—	—

注:—,未检测出。

在菌株JHZ9、JHZ15、JHZ25、JNN1和CICC23658中检出了少量的D-乳酸,结果如表2所示。乳酸菌发酵后产生的乳酸分为D-乳酸和L-乳酸两种。人体只具有代谢L-乳酸的L-乳酸脱氢酶,因此只有L-乳酸能被人体完全代谢利用。而D-乳酸和DL-乳酸过量摄入则有可能引起代谢紊乱甚至导致中毒。世界卫生组织明确规定,成人每天摄入D-乳酸的量不得超过100 mg/kg体质量,对于3个月以下的婴儿食品中不应加入D-乳酸,而对于L-乳酸则未加限制^[20]。在菌株JHZ9、JHZ15、JHZ25、JNN1和

CICC23658中检测出了含量很少的D-乳酸,但长期食用是否会对人体产生不良影响还有待进一步研究。

2.3 耐药性检测

2.3.1 药敏实验

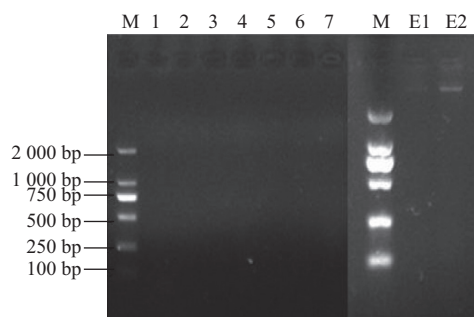
表3 菌株对7种抗菌药的敏感性结果^[20]
Table 3 Antimicrobial resistance of the seven strains isolated in this study to seven antimicrobial drugs^[20]

菌株	氧氟沙星	诺氟沙星	环丙沙星	阿莫西林	链霉素	氨苄西林	红霉素
JHZ9	S	S	S	S	I	S	S
JHZ15	I	I	I	S	R	S	S
JHZ17	S	S	I	S	R	S	S
JHZ22	S	S	S	S	I	S	S
JHZ25	S	S	S	S	I	S	S
JHZ28	S	S	S	S	I	S	S
JNN1	S	S	S	S	S	S	S

注: S. 敏感; I. 中度敏感; R. 耐药。

由表3可知, 7株菌株JHZ9、JHZ15、JHZ17、JHZ22、JHZ25、JHZ28、JNN1对红霉素(大环内酯类药物)敏感, 对氨苄西林、阿莫西林(青霉素类药物)敏感, 除JHZ15对氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星(喹诺酮类药物)中度敏感, JHZ17对环丙沙星中度敏感外, 其余菌株对喹诺酮类药物敏感。JNN1对链霉素敏感, JHZ15、JHZ17对链霉素有抗性, 其余菌株对链霉素(氨基糖苷类药物)中度敏感^[15]。

2.3.2 质粒提取实验



M. Marker; 1. JHZ9; 2. JHZ15; 3. JHZ17; 4. JHZ22; 5. JHZ25; 6. JHZ28; 7. JNN1; E1、E2.大肠杆菌。

图2 质粒提取结果

Fig.2 The results of plasmid extraction test

由图2可知, 通过琼脂糖凝胶电泳对菌株JHZ9、JHZ15、JHZ17、JHZ22、JHZ25、JHZ28、JNN1做质粒检测, 在任何泳道上均未出现条带, 说明在此检测方法下未检测到7株菌株含有质粒。

近年来倍受关注的肠球菌携带的耐药基因, 例如红霉素、万古霉素、四环素、氯霉素和庆大霉素耐药相关的基因都位于质粒和转座子这些可转移性遗传物质上^[21]。Perreten等^[22]在乳酸乳球菌K214中检测到了可转移的耐药质粒(pK214)。但实验中7株菌株均未提取到

耐药质粒, 这种情况可能是由于7株菌株本身并不带有耐药质粒, 也可能是耐药基因存在于细菌DNA上, 即不携带有可转移的耐药基因。

3 结论与讨论

近年来, 乳酸菌安全性问题得到广泛关注, 大量文献证明, 多数乳酸菌菌株或使用乳酸菌进行发酵是安全可行的, 但也有少量研究结果表明能够从一些患者体内分离出乳酸菌^[23], 可能与菌血症、心内膜炎、尿道感染等疾病有关^[24]。因此, 对新筛选出的拟作为益生菌的乳酸菌进行安全性评价是十分必要的, 尤其是用于食品菌株^[25]。尽管我国目前还没有制定乳酸菌安全性评价的相关准则, 但检测乳酸菌菌株的毒性、耐药性、是否产生有害代谢产物以及在体内对机体的影响等变化情况同样必不可少。

2002年, 联合国粮农组织/世界卫生组织联合专家委员会提出了用于食品的益生菌安全性评价指导原则^[26], 建议为确保所使用益生菌菌株的安全性, 至少需要进行下列实验以验证其安全性: 1) 对其耐药性进行评价; 2) 评估某些代谢活性; 3) 对人体实验中出现的副作用进行评估; 4) 商品在市场上销售后, 要对其出现的相关副作用病例进行流行病学调查; 5) 如果所使用的益生菌菌株所隶属的菌种对哺乳动物是一种已知的产毒素菌种, 则被评价的该益生菌菌株必须进行产毒实验; 6) 如果所使用的益生菌菌株所隶属的菌种具潜在的溶血活性, 则被评价的该益生菌菌株必须进行溶血实验。

有些乳酸菌可能携带有可转移的耐药基因引起了人们的广泛关注。乳酸菌自身出现耐药性没有危险, 可以使其更好地适应环境生存下来, 发挥功效, 但若耐药基因可以在乳酸菌和病原菌之间进行转移, 使某些病原菌产生耐药性, 后果将不堪设想。目前已经明确乳酸菌存在天然耐药和获得性耐药^[27], 天然耐药为细菌固有耐药, 一般不具有传递性, 乳酸菌对氨基糖苷类药物的耐受就属于天然耐药^[28]。而获得性耐药多数来自抗生素的选择性压力, 这种抗性基因一般存在于菌体的质粒或转座子上, 肠球菌中结合转座子和接合性质粒的存在对抗性基因在细菌之间的转移起着重要作用^[29]。Flórez等^[30]研究发现抗四环素的乳酸乳球菌中含有编码tetM的可转移因子, 使得抗性基因在不含质粒的菌株之间转移。2007年 Hummel等^[31]在没有氯霉素耐药表型的乳酸菌中检测到氯霉素耐药基因(cat), 证明无耐药表型的细菌可能携带耐药基因。秦宇轩等^[32]对市售酸奶进行乳酸菌分离, 在对红霉素和四环素敏感的乳酸菌中检测到了红霉素耐药基因(ermB)和四环素耐药基因(tetM)。这一结果说明对乳酸菌耐药基因的研究不应只局限于对抗生素有

抗性的乳酸菌。本实验对7种抗生素敏感或耐药的菌株进行质粒提取,均未提取到耐药质粒,不存在抗性基因转移危险。

本实验结果表明肠球菌属乳酸菌JHZ9、JHZ15、JHZ17、JHZ22、JHZ25、JHZ28、JNN1均具有良好的凝乳特性,菌株JHZ17、JHZ25、JHZ28、JNN1酸度低于70 °T,其余菌株均≥70 °T。吡啶实验、硝酸盐还原酶实验、氨基脱羧酶实验、溶血实验均为阴性。在菌株JHZ9、JHZ15、JHZ25、JNN1和CICC23658中检出了少量的D-乳酸。菌株JHZ9、JHZ15、JHZ17、JHZ22、JHZ25、JHZ28、JNN1对喹诺酮类(氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星)、大环内酯类(红霉素)、青霉素类(氨苄西林、阿莫西林)药物敏感,除JNN1对链霉素敏感,其他菌株对氨基糖苷类药物(链霉素)有抗性或呈中度敏感,未检测到7株菌株含有质粒。通过体外安全性实验有害代谢产物和耐药性的检测,初步证明7株乳酸菌安全,可为今后菌株应用于发酵生产提供部分安全性理论依据,但仍需进一步结合动物实验和临床实验等安全性实验,对其进行综合评价。

参考文献:

- [1] CHEN Y, WANG Z, CHEN X, et al. Identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from koumiss, a traditional fermented mare's milk[J]. Journal of Dairy Science, 2010, 93(3): 884-892.
- [2] 徐少泽. 马奶、酸马奶的食疗和医用价值[J]. 中国民族医药杂志, 2012, 18(2): 21-22.
- [3] 王瑞珍. 酸马奶的营养成分与保健特性[J]. 养殖技术顾问, 2012(10): 247-248.
- [4] WANG Junguo, CHEN Xia, LIU Wenjun, et al. Identification of *Lactobacillus* from koumiss by conventional and molecular methods[J]. European Food Research and Technology, 2008, 227(5): 1555-1561.
- [5] 刘洪元, 高昆. 马奶及酸马奶(马奶酒)的营养价值和医疗作用[J]. 中国食物与营养, 2003(4): 45-46.
- [6] 张刚. 乳酸细菌: 基础技术和应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 194; 421.
- [7] 贺银凤, 翟光超, 李少英, 等. 酸马奶酒中粪肠球菌H₁₁抑菌物质的提取与纯化研究[J]. 食品科学, 2008, 29(3): 50-52.
- [8] 霍小琰, 李少英, 郭荣荣. 酸马奶中乳酸菌的鉴定及生物学特性的研究[J]. 微生物学通报, 2012, 39(7): 940-948.
- [9] 贺银凤, 王锂樨, 李少英, 等. 酸马奶酒中一株粪肠球菌抑菌物质的粗提及特性研究[J]. 农业工程学报, 2007, 23(1): 264-267.
- [10] 李少英, 乌尼, 李培锋, 等. 内蒙古牧区乳与乳制品中乳酸菌资源及其生态分布[J]. 生态学杂志, 2007, 25(12): 1495-1499.
- [11] 陈天寿. 微生物培养基的制造与应用[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 179-396.
- [12] 内村泰, 岗田早苗. 乳酸菌试验手册(日文版)[M]. 日本东京: 朝仓书店, 1992: 30-73.
- [13] 凌代文. 乳酸细菌分类鉴定及试验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 125-126.
- [14] CARIOLATO D, ANDRIGHETTO C, LOMBARDI A. Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human samples in North Italy[J]. Food Control, 2008, 19(9): 886-892.
- [15] 王梦姣, 李少英, 韦婉, 等. 分离自酸马奶的肠球菌属乳酸菌抗性试验[J]. 食品科技, 2013, 38(10): 7-11.
- [16] 李剑欣, 张绪梅, 徐琪寿. 色氨酸的生理生化作用及其应用[J]. 氨基酸和生物资源, 2005, 27(3): 58-62.
- [17] 龚钢明, 吕玉涛, 管世敏, 等. 乳酸菌亚硝酸盐还原酶制备及酶学性质[J]. 中国酿造, 2011, 30(1): 58-60.
- [18] 周景文, 堵国成, 陈坚. 发酵食品有害氨(胺)类代谢物: 形成机制和消除策略[J]. 中国食品学报, 2011, 11(9): 8-25.
- [19] 窦晓明, 孙高英, 单虎. 乳酸菌胞外产物对副溶血弧菌抑制作用的研究[J]. 海洋科学, 2007, 31(8): 11-14.
- [20] 欧提库尔, 穆斯塔帕, 张志东. L-乳酸的研究进展及其应用前景[J]. 新疆化工, 2005(3): 5-11.
- [21] 张灼阳, 刘畅, 郭晓奎. 乳酸菌耐药性的研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2007, 19(5): 478-480.
- [22] PERRETE N V, SCHWARZ F, CRESTA L, et al. Antibiotic resistance spread in food[J]. Nature, 1997, 389: 801-802.
- [23] 刘小青, 万翠香, 徐锋, 等. 乳酸菌的安全性研究[J]. 中国微生态学杂志, 2009, 21(10): 952-955.
- [24] 杨宝兰, 徐进. 益生菌的安全性[J]. 中国食品卫生杂志, 2004, 16(3): 262-265.
- [25] WASSENAAR T M, KLEIN G. Safety aspects and implications of regulation of probiotic bacteria in food and food supplements[J]. Journal of Food Protection, 2008, 71(8): 1734-1741.
- [26] FAO/WHO Working Group. Guidelines for the evaluation of probiotics in food[R]. London Ontario: FAO/WHO, 2002.
- [27] SAARELA M, MOGENSEN G, FONDÉN R, et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties[J]. Journal of Biotechnology, 2000, 84(3): 197-215.
- [28] 莫非, 黄志卓, 渠巍, 等. 贵州省2009年细菌耐药性监测[J]. 临床检验杂志, 2011, 29(6): 473-474.
- [29] 李姗姗. 潜在益生乳杆菌的抗生素敏感性研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2012.
- [30] FLÓREZ A B, AMMOR M S, MAYO B. Identification of *tet*(M) in two *Lactococcus lactis* strains isolated from a Spanish traditional starter-free cheese made of raw milk and conjugative transfer of tetracycline resistance to lactococci and enterococci[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 121(2): 189-194.
- [31] HUMMEL A S, HERTEL C, HOLZAPFEL W H, et al. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(3): 730-739.
- [32] 秦宇轩, 李晶, 王秋涯, 等. 市售酸奶中乳酸菌的鉴定与耐药性[J]. 微生物学报, 2013, 53(8): 889-897.