



一株 Kefir 源乳酸菌 MA2 的鉴定及对大鼠肠道菌群的影响

许 女, 王艳萍, 习傲登, 李 超

(食品营养与安全教育部重点实验室, 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 对从西藏 Kefir 粒中分离出来的乳酸菌 MA2 进行了形态学、生理生化和 16S rDNA 分子生物学鉴定, 确定其为植物乳杆菌。酸和胆盐耐受性实验显示, 植物乳杆菌 MA2 在 pH 2.0、胆盐浓度为 0.3% 的情况下具有较好的耐受能力。动物实验证明, 植物乳杆菌 MA2 显著促进了双歧杆菌和乳酸菌的生长, 调节了肠道菌群的平衡, 是一株潜在的、具有实际应用价值的益生菌。

关键词: Kefir; 植物乳杆菌 MA2; 肠道菌群

中图分类号: Q93-3

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2009)05-0001-05

Identification of Lactic Acid Bacteria MA2 Strain from Kefir Grains and Effect on Rat Intestinal Flora

XU Nü, WANG Yan-ping, XI Ao-deng, LI Chao

(Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Lactic acid bacteria MA2 from Tibet kefir grain was identified as *Lactobacillus plantarum* by morphology, physiological and biochemistry methods and 16S rDNA sequencing. The results of tolerance of acid and bile salt show that MA2 strain has strong acid tolerance and bile salt tolerance at pH 2.0 and 0.3% oxgall concentration. The results of animal test indicate that MA2 can increase the amount of lactic acid bacteria and bifidobacteria in feces of rats, and improve the balance of intestinal flora. MA2 is a kind of potential probiotic with practical application.

Keywords: Kefir; *Lactobacillus plantarum* MA2; intestinal flora

1989年, Fuller R^[1]将益生菌定义为“益生菌是补充摄入的具有活性的微生物, 可通过改善肠道菌群的平衡, 对宿主产生良好的健康效应”。乳酸菌作为一类主要的益生菌, 是人及动物肠道中极为重要的生理菌群之一, 具有调节菌群、防止腹泻、提高机体免疫力、降低血清胆固醇和血压及抗癌等生理功能^[2]。肠道微生物生态系统是人体最大、最复杂的微生态系统, 其中存在着大量不同类型、含量多少不一的各种细菌。在正常生理状态下, 肠道含有400~500种不同类型的细菌^[3], 分为生理性细菌、条件致病菌和病原菌三大类, 在诸多细菌共存情况下, 不同菌种之间存在拮抗

作用, 宿主与细菌之间借助对营养物质的吸收和利用, 在消化道中形成相互作用的关系, 维系着消化道微生物生态系统的平衡。益生菌进入肠道后, 与其复杂的微生态环境中的正常菌群相互作用, 出现共生、互生、竞争或吞噬等复杂关系, 调整并平衡胃肠道的微生态环境。

Kefir粒作为重要的益生菌源, 在欧洲许多国家早已被广泛地用来预防和治疗肠易激综合症、溃疡性结肠炎、便秘等肠道疾病^[4]。本文对分离于西藏 Kefir 粒中的一株益生菌 MA2 进行生理生化及分子生物学的菌种鉴定, 并对其耐酸、耐胆盐的特性进行研究, 考察

收稿日期: 2009-04-22; 修回日期: 2009-06-16

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD04A06)

作者简介: 许 女(1979—), 女, 天津人, 博士研究生; 通信作者: 王艳萍, 教授, ypwang@tust.edu.cn.

其对大鼠肠道菌群的调节作用,为研究与开发益生菌 MA2 菌株的生产、应用奠定理论基础。

1 材料与方 法

1.1 主要实验材料

1.1.1 菌种及培养基

MA2 菌株,分离于西藏传统乳制品 Kefir 乳;保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*)、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)均来源于食品营养与安全教育部重点实验室。

乳杆菌选择培养基(LBS)、大肠杆菌选择性培养基(EMB),北京陆桥技术有限责任公司;双歧杆菌选择培养基(BSM),配制方法参考文献[5]。

1.1.2 实验动物

清洁级 SD(Sprague-Dawley)大鼠 20 只,雄性,4 周龄,体重 140~160 g,购买自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心,合格证号:SCXK-(军)0010276。

1.2 实验方法

1.2.1 Kefir 粒及 Kefir 发酵乳中乳酸菌的分离

将西藏 Kefir 粒加一定量的生理盐水于灭菌研钵中研磨破碎,用无菌生理盐水适当稀释后,各取 100 μ L 涂布在 MRS 固体培养基上,37 $^{\circ}$ C 培养 48 h,观察记录菌落特征并挑取不同形态单个菌落,再分别划线接种于 MRS 固体培养基上,重复几次纯化乳酸菌,得到纯菌株,然后进行革兰氏染色和过氧化氢实验,对具有革兰氏染色阳性和过氧化氢实验阴性的菌株,初步鉴定为乳酸菌,进行斜面保藏。

1.2.2 菌种鉴定

(1) 菌株 MA2 的形态学观察

将菌株 MA2 划线接种于 MRS 固体培养基上,37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 48 h,记录菌落特征。同时在显微镜下观察记录菌体的形态特征。

(2) 菌株 MA2 的生理生化鉴定

对菌株 MA2 进行过氧化氢酶、硝酸盐还原、硫化氢生成、明胶液化、运动性、糖发酵和 10 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C 生长及 6.5%的 NaCl 生长等实验^[6]。

(3) 16S rDNA 的分子生物学鉴定

菌株 MA2 基因组 DNA 的提取方法参照文献[7]改进后的方法。16S rDNA 扩增使用的引物序列分别为 8 f(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1512 r(5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')^[8]。扩增程序:

94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min,循环 30 次;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分析,胶回收送北京奥科公司进行测序,测序结果与 GenBank 中的标准株序列(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)进行同源性比较。

1.2.3 菌株 MA2 的酸耐受性和胆盐耐受性检验

(1) 酸耐受性实验^[9]

将菌株 MA2 于 MRS 液体培养基中活化后按 4% 的接种量接种于 200 mL 的 MRS 液体培养基(pH 2.0)中,37 $^{\circ}$ C 厌氧静置培养,于 0、30、60、90、120 min 分别取样,采用 MRS 固体培养基进行活菌计数。

(2) 胆盐耐受性实验^[10]

将菌株 MA2 于 MRS 液体培养基中活化后按 4% 的接种量接种于 200 mL 分别含有 0.3% 的牛胆盐和 0.3% 牛磺胆酸钠的 MRS 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 厌氧静置培养,每隔一定时间取样,测定其在 600 nm 下吸光度值升高 0.3 所需要的时间,以不含胆盐的 MRS 液体培养基作为对照。

1.2.4 动物实验

20 只 SD 雄性大鼠,按体重分成 A、B 两组。A 组为对照组,给予普通饲料(购自北京康桥饲料公司,组分:蛋白质 32%,脂肪 5%,纤维素 2%,Ca 1.8%,P 1.2%,无氮提取物 58%);B 组为 MA2 组,给予普通饲料和 MA2 灌胃液。两组均自由摄取食物和水,动物房温度(22 \pm 2) $^{\circ}$ C,湿度(56 \pm 5)% ,饲养 40 d。每 4 d 无菌收集新鲜粪便,测定其活菌数。乳酸菌和双歧杆菌均采用 37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 48 h,而大肠杆菌则采用 37 $^{\circ}$ C 有氧培养 24 h。

灌胃液制备:将活化好的菌株 MA2 按 4% 的接种量接到 MRS 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 18 h 后,4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 20 min,收集菌体,按菌泥与脱脂乳(15 g/mL)质量比为 1:3 的比例重悬菌体,真空冷冻干燥得菌粉,用生理盐水配制成 10¹¹ mL⁻¹ 的菌悬液,灌胃备用。

1.3 统计学处理

使用 SPSS 10.5 软件统计分析所得结果,各组数据均以平均数 \pm 标准差表示,并进行方差分析和 *t* 检验。

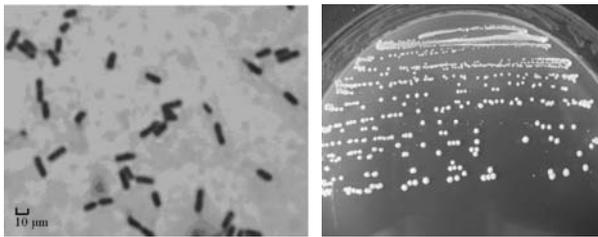
2 结果与讨论

2.1 菌种鉴定

2.1.1 个体形态及菌落特征

MA2 菌株染色呈革兰氏阳性,短小杆状,单独存

在或呈短链状排列. 在 MRS 平板上表现为圆形、低凸起、边缘整齐、表面光滑、乳白色的光滑型菌落(图 1).



(a) 个体形态 (b) 菌落形态

图 1 MA2 的个体形态和菌落形态

Fig.1 Cellular and colonial morphology of isolate MA2

2.1.2 生理生化实验结果

由表 1 可知,MA2 革兰氏染色呈阳性、过氧化氢酶实验阴性、硝酸盐还原实验阴性、明胶液化实验阴性、不运动、不产硫化氢、能酸化和凝固牛乳、15 °C 生长、45 °C 下不生长、在 pH 9.2 和 pH 4.8 下均能生长,可以耐受 6.5% NaCl,可确定 MA2 为乳杆菌. 进一步根据糖发酵的实验结果,综合其形态学及生理生化特性,参照《伯杰氏细菌鉴定手册》^[11]、《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》^[6]和相关文献,鉴定结果:MA2 为植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*).

表 1 MA2 的生理生化鉴定实验结果

Tab.1 Physiological and biochemical characteristics of isolate MA2

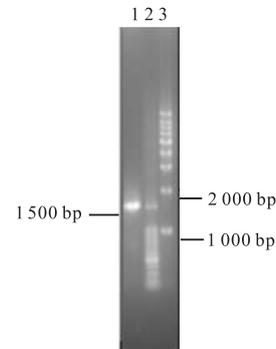
实验项目	实验结果	实验项目	实验结果
革兰氏染色	+	麦芽糖	+
过氧化氢酶实验	-	果糖	+
硝酸盐还原实验	-	阿拉伯糖	+
产硫化氢实验	-	核糖	+
明胶液化实验	-	鼠李糖	-
运动性实验	-	木糖	+
15 °C 生长	+	蜜二糖	+
45 °C 生长	-	甘露醇	+
6.5% 的 NaCl 生长	+	甘露糖	+
pH 9.2 生长	+	蔗糖	+
pH 4.8 生长	+	山梨醇	+
酸化和凝乳	+	海藻糖	+
葡萄糖	+	七叶苷	+
乳糖	+	棉籽糖	+

注:“+”表示菌株为阳性反应;“-”表示菌株为阴性反应.

2.1.3 16S rDNA 的分子生物学鉴定

以 MA2 菌株总 DNA 为模板,利用引物进行 PCR 扩增,经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,获得 1 500 bp 大小的条带,实验结果见图 2,证实成功地扩增出 MA2 菌株的 16S rDNA 片段. 经测序后,登陆 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>),使用 BLAST 在 GenBank 库中进行同源性搜索,比对结果如表 2 所示,菌

株 MA2 与 GenBank 中 11 株植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 的 16S rDNA 序列相似性达到 100%. 因此进一步确认 MA2 为植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*),申请 MA2 菌株的登录号为 FJ 785723.



1. PCR 产物; 2. 100 bp DNA Marker; 3. 1 000 bp DNA Marker

图 2 MA2 的 16S rDNA 的 PCR 产物电泳图

Fig.2 16S rDNA of MA2 amplified by PCR

表 2 菌株 MA2 的 16S rDNA 序列同 GenBank 中细菌菌株同源性分析结果

Tab.2 Analysis results of homology of 16S rDNA sequence of isolate MA2 compared with different strains available in GenBank

菌种名	菌株名	登录号	相似性/%
植物乳杆菌	EW-p	EU 096230.1	100
植物乳杆菌	NRIC 1834	AB 362755.1	100
植物乳杆菌	NRIC 1767	AB 362747.1	100
植物乳杆菌	NRIC 1724	AB 362733.1	100
植物乳杆菌	NRIC 0387	AB 362656.1	100
植物乳杆菌	NRIC 0386	AB 362655.1	100
植物乳杆菌	NRIC 0385	AB 362654.1	100
植物乳杆菌	NRIC 0384	AB 362653.1	100
植物乳杆菌	L 3	DQ 239696.1	100
植物乳杆菌	WCFS 1	AL 935258.1	100
植物乳杆菌	WCFS 1	AL 935253.1	100

2.2 植物乳杆菌 MA2 的酸耐受性和胆盐耐受性

菌株的酸和胆盐耐受性是益生菌筛选的一个重要指标^[12]. 对宿主有生理功能的益生菌很多,实际被应用的却很少,因为所摄入的益生菌必须能够耐受胃酸、胆汁,以存活的状态到达肠道,定殖,进而成功地发挥生理功能. 所以本文考察了植物乳杆菌 MA2 的酸和胆盐耐受性,并与保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌、嗜酸乳杆菌等商业常用发酵剂菌株进行比较,实验结果见表 3 和表 4. 由表 3 可知,被检测的 4 株菌株对酸表现出了不同程度的耐受性,其中,嗜酸乳杆菌和植物乳杆菌 MA2 具有较强的耐酸性,在 pH 2.0 的环境中,2 h 后仅下降了 2 个数量级,而保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌却下降了 4 个数量级. 另外,表 4 实验结果

看出,相比于其他3种菌(在牛胆盐中的生长延滞时间:保加利亚乳杆菌,0.81 h;嗜热链球菌,1.11 h;嗜酸乳杆菌,1.04 h),MA2显示出很强的胆盐耐受性(生长延滞时间:0.5 h),而且对混合牛胆盐的耐受性要强于

牛磺胆酸钠.综上所述,本实验中的Kefir源植物乳杆菌的耐酸特性和耐胆盐特性显著强于吕利军等人^[13]报道的植物乳杆菌 ACCC 211118,因此具有益生菌应用的潜力.

表3 植物乳杆菌 MA2在 pH 2.0时的酸耐受性 (n=3)

Tab.3 Effect of pH 2.0 on viability of *Lactobacillus plantarum* MA2 (n=3)

菌株	活菌数/mL ⁻¹				
	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
<i>Lactobacillus plantarum</i> MA2	(1.12±1.02)×10 ⁸	(7.94±2.04)×10 ⁷	(7.07±1.58)×10 ⁶	(3.16±1.07)×10 ⁶	(1.00±1.12)×10 ⁶
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	(2.88±1.07)×10 ⁸	(3.63±2.08)×10 ⁷ **	(7.41±1.12)×10 ⁶ *	(2.69±1.69)×10 ⁵ **	(2.81±1.09)×10 ⁴ **
<i>Streptococcus thermophilus</i>	(1.32±1.58)×10 ⁸	(4.68±1.05)×10 ⁷ *	(7.76±1.09)×10 ⁶	(8.91±1.07)×10 ⁵ **	(4.68±1.07)×10 ⁴ **
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	(3.47±1.12)×10 ⁸	(4.68±1.07)×10 ⁷ *	(1.07±1.05)×10 ⁷	(7.24±1.07)×10 ⁶	(3.31±1.07)×10 ⁶

注: *P<0.05, **P<0.01.

表4 植物乳杆菌 MA2对不同胆盐耐受性 (n=3)

Tab.4 Tolerance to bile salts by *Lactobacillus plantarum* MA2 (n=3)

菌株	600 nm 吸光度值升高 0.3 所需的时间/h		
	对照	牛胆盐	牛磺胆酸钠
<i>Lactobacillus plantarum</i> MA2	2.30 ± 0.03	2.81 ± 0.05	3.12 ± 0.03
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	3.53 ± 0.02	4.34 ± 0.15 **	4.76 ± 0.34 *
<i>Streptococcus thermophilus</i>	3.45 ± 0.01	4.56 ± 0.03 **	5.00 ± 0.03 **
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4.56 ± 0.05	5.60 ± 0.45 **	6.66 ± 0.02 **

注: *P<0.05, **P<0.01.

2.3 植物乳杆菌 MA2 对大鼠肠道中菌群的影响

由表5可知,在40 d内植物乳杆菌 MA2 对大鼠肠道菌群的影响,在整个实验期间,两组大鼠的大肠杆菌的数目基本没有呈现出明显的变化,波动范围保持在 10⁸ ~ 10⁹ g⁻¹ 之间,证明 MA2 菌株在体内对大肠

杆菌的生长没有明显的抑制作用.而摄入 MA2 菌株大鼠体内的乳杆菌和双歧杆菌的数目却明显升高,升高幅度分别是 10⁹ ~ 10¹¹ g⁻¹ 和 10⁸ ~ 10⁹ g⁻¹.表明植物乳杆菌 MA2 可能到达肠道,定殖,发挥其调节肠道菌群的生理功能.

表5 植物乳杆菌 MA2对大鼠肠道中大肠杆菌、乳杆菌和双歧杆菌数量的影响 (n=3)

Tab.5 Effect of MA2 on number of *Escherichia coli*, lactic acid bacteria and bifidobacteria from fecal of rats (n=3)

时间/ d	大肠杆菌/g ⁻¹		乳杆菌/g ⁻¹		双歧杆菌/g ⁻¹	
	对照组	MA2 组	对照组	MA2 组	对照组	MA2 组
4	(3.50±0.57)×10 ⁷	(4.30±1.13)×10 ⁷	(2.20±0.70)×10 ⁹	(2.20±0.14)×10 ⁹	(3.00±0.84)×10 ⁸	(2.02±0.14)×10 ⁸
8	(2.30±0.57)×10 ⁸	(1.81±1.13)×10 ⁸	(6.52±1.48)×10 ⁹	(4.00±0.42)×10 ⁹	(3.42±0.98)×10 ⁸	(2.23±0.42)×10 ⁸
12	(1.51±0.56)×10 ⁸	(4.60±0.42)×10 ⁸	(2.61±0.28)×10 ⁹	(4.42±0.42)×10 ⁹	(6.01±0.42)×10 ⁸	(3.51±0.28)×10 ⁸
16	(4.40±0.99)×10 ⁸	(4.76±0.79)×10 ⁸	(2.70±0.77)×10 ⁹	(4.50±0.43)×10 ⁹	(6.00±0.84)×10 ⁸	(8.12±0.28)×10 ⁸
20	(4.70±0.14)×10 ⁸	(7.56±0.16)×10 ⁸	(2.00±0.28)×10 ⁹	(1.29±0.02)×10 ¹⁰ **	(7.82±0.56)×10 ⁸	(9.50±5.35)×10 ⁸
24	(7.01±0.98)×10 ⁸	(7.20±1.41)×10 ⁸	(3.51±0.30)×10 ⁹	(1.44±0.08)×10 ¹¹ **	(1.31±0.05)×10 ⁸	(3.91±1.27)×10 ⁹ *
28	(7.90±0.42)×10 ⁸	(7.81±1.56)×10 ⁸	(4.00±0.14)×10 ⁹	(2.60±0.28)×10 ¹¹ **	(8.90±4.80)×10 ⁸	(4.00±0.70)×10 ⁹ **
32	(4.30±0.57)×10 ⁸	(2.00±0.42)×10 ⁸	(3.80±0.42)×10 ⁹	(3.40±0.57)×10 ¹¹ **	(8.60±0.99)×10 ⁸	(4.60±0.42)×10 ⁹ **
36	(4.50±1.13)×10 ⁸	(3.00±0.14)×10 ⁸	(4.60±0.84)×10 ⁹	(2.42±0.14)×10 ¹¹ **	(7.82±0.57)×10 ⁸	(6.02±0.56)×10 ⁹ **
40	(5.01±0.42)×10 ⁸	(5.20±1.27)×10 ⁸	(3.40±0.71)×10 ⁹	(3.41±0.70)×10 ¹¹ **	(7.02±1.13)×10 ⁸	(6.00±0.14)×10 ⁹ **

注: *P<0.05, **P<0.01.

乳酸菌调整并平衡胃肠道的微生态环境的作用方式主要有三方面^[12]: (1)乳酸菌的黏附机理,乳酸菌表面有能与肠黏膜细胞牢固结合的特异性物质,如磷脂壁酸、肽聚糖或细胞表层蛋白等,这些物质使乳酸菌黏附在肠道上皮上,构成了肠道定殖抗力,从而可

以起到阻止病原菌的定殖和入侵作用; (2)乳酸菌产生抑菌物质机理,乳酸菌可以产生细菌素、类细菌素拮抗物质、过氧化氢、乳酸、乙酸等一系列抑菌物质,抑制肠道内有害菌的繁殖、代谢,进而起到调节肠道菌群的作用; (3)营养物质竞争机理,在营养物质有限

的情况下,乳酸菌可以通过其优势生长,竞争性消耗潜在致病菌的营养素,改善并决定肠道菌群的分布。本实验中的植物乳杆菌 MA2,虽然提高了乳酸菌和双歧杆菌的数量,却对大肠杆菌没有明显的抑制作用,这与先前的体外抑菌实验结果一致,而在 Liong^[9]的研究报道中,添加了低聚果糖等益生元的 *L.casei* ASCC 292 菌粉则显著地抑制了大鼠肠道中大肠杆菌的生长,推测原因:(1)菌种的不同,植物乳杆菌 MA2 不能产生细菌素类物质,所以不能抑制大肠杆菌的生长,而 *L.casei* ASCC 292 则可能产生细菌素等物质;(2)益生元的添加,低聚果糖等益生元的添加为 *L.casei* ASCC 292 发酵产酸提供了丰富的底物,从而抑制了大肠杆菌的生长。综上所述,推测植物乳杆菌 MA2 是通过营养竞争作用来促进乳杆菌和双歧杆菌的生长,进而起到调节和优化肠道菌群的目的。虽然 MA2 对大鼠体内大肠杆菌的数目没有显著影响,但是并非对其他的肠道有害菌没有作用,所以,今后需要对肠道内其他潜在的有害菌的分布进行研究,例如:肠球菌、产气荚膜梭菌等。关于 MA2 的黏附定殖特性需要作进一步研究,虽然大鼠和人体的肠道结构比较接近,但还是有一定的差距,需进行人体临床实验,研究该菌对人体肠道的准确作用。

3 结 论

(1)对从西藏 Kefir 粒中分离出来的一株益生菌 MA2 进行形态学、生理生化和分子生物学鉴定,最终确定其为植物乳杆菌。

(2)植物乳杆菌 MA2 的耐酸和耐胆盐实验显示,其在 pH 2.0、胆盐浓度为 0.3%的情况下具有较好的耐受能力,可以成功地到达肠道,正常发挥其生理功能。

(3)植物乳杆菌 MA2 显著促进双歧杆菌和乳杆菌的生长,具有良好的调节肠道菌群平衡的益生作用,而且由于该菌是从西藏传统乳制品 Kefir 粒中分离出来的,其安全性可以得到保证,具有实际应用价值。

参考文献:

- [1] Fuller R. Probiotics in man and animals [J]. Appl Bacteriol, 1989, 66(5): 365-378.
- [2] 余焕玲, 宴萍. 乳酸菌的生理功能及在食品中的应用 [J]. 饮料工业, 2000, 3(4): 10-13.
- [3] Guarner F, Malagelada J R. Gut flora in health and disease [J]. Lancet, 2003, 361(9356): 512-519.
- [4] Stonge M P, Farnworth E R, Savard T, et al. Kefir consumption does not alter plasma lipid levels or cholesterol fractional synthesis rates relative to milk in hyperlipemic men: a randomized controlled trial [J]. BMC Complement Altern Med, 2002, 2(1): 1-7.
- [5] 谢彩虹. 嗜酸乳杆菌对抗生素诱导小鼠肠道菌群失调的调整作用[D]. 重庆: 第三军医大学, 2007.
- [6] 凌代文, 东秀珠. 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: 4-37.
- [7] CHEN Hsi-chia, WANG Sheng-yao, CHEN Ming-ju. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods [J]. Food Microb, 2008, 25(3): 492-501.
- [8] Coenye T, Falsen E, Vancanneyt M, et al. Classification of alcaligenes faecalis-like isolates from the environment and human clinical samples as *Ralstonia gilardii* sp. Nov [J]. Int J Syst Bacteriol, 1999, 49(2): 405-413.
- [9] Liong M T, Shah N P. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of *lactobacilli* strains [J]. J Dairy Sci, 2005, 88(1): 55-66.
- [10] Pereira D I A, Gibson G R. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut [J]. Appl Environ Microb, 2002, 68(9): 4689-4693.
- [11] Buchanan R E, Gibbens N E. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 北京: 北京科学出版社, 1984: 797-807.
- [12] 徐致远. 乳杆菌的肠道定殖和菌群调节作用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2006.
- [13] 吕利军, 季海峰, 张董燕. 植物乳杆菌微胶囊化的研究 [J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35(12): 20-23.