

## 研究报告

# 高产 $\gamma$ -氨基丁酸短乳杆菌 D17 的水解燕麦乳发酵特性及安全性评估

周利平<sup>1</sup>, 刘志豪<sup>1</sup>, 向金凤<sup>1</sup>, 万新冉<sup>3</sup>, 余峰<sup>3</sup>, 严海菊<sup>3</sup>, 任聪<sup>\*1,2,3</sup>, 徐岩<sup>1,2,3</sup>

1 江南大学 生物工程学院 酿造微生物学与应用酶学研究室, 江苏 无锡 214122

2 中国轻工业微生物组学与生态酿造技术重点实验室, 江苏 无锡 214122

3 江南大学-广东健力宝股份有限公司联合研究中心, 广东 佛山 528100

周利平, 刘志豪, 向金凤, 万新冉, 余峰, 严海菊, 任聪, 徐岩. 高产  $\gamma$ -氨基丁酸短乳杆菌 D17 的水解燕麦乳发酵特性及安全性评估[J]. 微生物学通报, 2024, 51(8): 3041-3058.

ZHOU Liping, LIU Zhihao, XIANG Jinfeng, WAN Xinran, YU Feng, YAN Haiju, REN Cong, XU Yan. Fermentation characteristics and safety evaluation of high-yield gamma-aminobutyric acid-producing *Lactobacillus brevis* D17 on hydrolyzed oat milk[J]. Microbiology China, 2024, 51(8): 3041-3058.

**摘要:**【背景】短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*) D17 作为一株传统发酵食品来源的高产  $\gamma$ -氨基丁酸(gamma-aminobutyric acid, GABA)菌株, 评估其发酵特性和安全性具有重要意义。【目的】研究短乳杆菌 D17 的发酵特性和安全性, 为进一步开展益生功能研究奠定基础。【方法】基于 MRS 培养基和燕麦乳发酵试验评估菌株的发酵特性; 通过将 D17 全基因组序列与毒力因子数据库(virulence factor database, VFDB)和耐药基因数据库(comprehensive antibiotic resistance database, CARD)进行比对, 分析评估该菌株毒力因子和抗生素抗性基因的存在情况; 抗生素药敏试验评估菌株的抗生素敏感性; 小鼠毒理试验评估菌株的体内安全性。【结果】短乳杆菌 D17 能很好地发酵燕麦乳, 乳酸产量能达到 MRS 培养基的 82.5%, 并且能利用燕麦乳中的内源谷氨酸产生 480 mg/L GABA, 能明显改善燕麦乳的风味特征; 短乳杆菌 D17 无致病的毒力因子和抗生素抗性基因, 虽然存在一些固有的抗生素抗性, 但无可转移的抗生素耐药性风险; 短乳杆菌 D17 能定植于小鼠肠道, 对小鼠不但无致病性, 而且还对小鼠血清指标、肠道菌群具有一定的改善作用。【结论】短乳杆菌 D17 具有良好的植物基基质发酵潜能且为安全菌株, 体现了其良好的益生潜能。

**关键词:** 短乳杆菌; 植物基; 发酵性能; 抗生素抗性; 安全性评估

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFC1604103)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFC1604103).

\*Corresponding author. E-mail: congren@jiangnan.edu.cn

Received: 2024-02-09; Accepted: 2024-03-31

# Fermentation characteristics and safety evaluation of high-yield gamma-aminobutyric acid-producing *Lactobacillus brevis* D17 on hydrolyzed oat milk

ZHOU Liping<sup>1</sup>, LIU Zhihao<sup>1</sup>, XIANG Jinfeng<sup>1</sup>, WAN Xinran<sup>3</sup>, YU Feng<sup>3</sup>, YAN Haiju<sup>3</sup>, REN Cong<sup>\*1,2,3</sup>, XU Yan<sup>1,2,3</sup>

1 Laboratory of Brewing Microbiology and Applied Enzymology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Key Laboratory of Microbiomics and Ecological Brewing Technology in China's Light Industry, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 Jiangnan University-Jianlibao Group Joint Research Center, Foshan 528100, Guangdong, China

**Abstract:** **[Background]** It is of great significance to evaluate the fermentation characteristics and safety of *Lactobacillus brevis* D17, a high gamma-aminobutyric acid (GABA)-producing bacterium from fermented grains for the production of Chinese liquor. **[Objective]** To investigate the fermentation characteristics and evaluate the safety of *L. brevis* D17, laying a foundation for further assessment of probiotic properties. **[Methods]** The MRS medium and hydrolyzed oat milk were used to study the fermentation characteristics of strain D17. The whole genome sequence of D17 was compared with the virulence factor database (VFDB) and the comprehensive antibiotic resistance database (CARD) to assess the presence of virulence genes and antibiotic resistance genes. The antibiotic susceptibility profile of *L. brevis* D17 was established by antibiotic susceptibility tests. The toxicological test in mice was carried out to assess the *in vivo* safety of *L. brevis* D17. **[Results]** *L. brevis* D17 showcased good fermentation performance on oat milk, with the lactate production reaching 82.5% of that in the MRS medium. Moreover, it produced 480 mg/L GABA from the glutamate in oat milk. Additionally, *L. brevis* D17 improved the flavor profile of oat milk. *L. brevis* D17 did not carry virulence genes or antibiotic resistance genes. Despite inherent antibiotic resistance, D17 strain had no risk of resistance transfer. *L. brevis* D17 colonized the mouse intestine without causing any disease or death. Moreover, it exerted positive effects on serum indicators and gut microbiota in mice. **[Conclusion]** *L. brevis* D17 showcased strong potential for fermentation of plant-derived substrates and was confirmed to be safe, demonstrating significant probiotic properties.

**Keywords:** *Lactobacillus brevis*; plant-derived substrate; fermentation performance; antibiotic resistance; safety evaluation

乳酸菌(*Lactobacillus*)是一类产乳酸、不产芽孢、低 G+C 含量、兼性厌氧或厌氧的革兰氏阳性菌,在食品发酵和益生菌制品生产中具有广泛用途<sup>[1-2]</sup>。近年来,将乳酸菌应用于植物基发酵,以改善植物基的风味和口感并增强益生

能力,在食品发酵领域受到越来越多的关注与重视<sup>[3-4]</sup>。例如,一些由豆类制成的植物性饮料通常具有苦味和豆腥味,经乳酸菌发酵后,豆类产品中的脂肪和蛋白质等物质被分解,消除了令人不愉快的气味物质,并产生了二乙酰和

乙酸乙酯等风味物质<sup>[4]</sup>。乳酸菌发酵也可显著提升植物基基质的营养价值,如副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)、乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*)等在发酵豆制品时,可水解豆类蛋白,产生抑制血管紧张素活性的寡肽,对高血压预防有显著作用<sup>[5]</sup>。植物基普遍缺乏 B 族维生素,而植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)或乳酸菌混菌发酵可提高植物基基质中叶酸(VB<sub>9</sub>)的含量<sup>[6-7]</sup>。目前,市面上的全植物基乳酸菌发酵饮料尚不多,销售市场主要在欧美、日本等发达地区,国内这一产业尚处于起步阶段(表 1)。应用于全植物基发酵的乳酸菌包括乳制品来源乳酸菌,如保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*)、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)、副干酪乳杆菌、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*),以及植物来源的乳酸菌,如植物乳杆菌、短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)<sup>[8-9]</sup>。

乳酸菌不管应用于食品发酵还是益生菌制

品,都要首先考虑其安全性。虽然上述多种乳杆菌被列入美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)公认安全(generally recognized as safe, GRAS)认证名录和欧洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)安全资格认证(qualified presumption of safety, QPS)名录<sup>[11-12]</sup>,但有少量报道表明某些乳杆菌菌株仍然存在一定的安全隐患,如发酵乳杆菌 5-1 携带可转移的四环素、红霉素抗性基因<sup>[13]</sup>。此外,也有部分临床证据表明某些乳杆菌菌株在某些特殊情况下会变成条件致病菌,如极少数干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)和鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)在免疫力低下的儿童和老人中存在引发心内膜炎和败血症的风险<sup>[14-15]</sup>。因此,在菌株水平明确安全性极为重要,如表 1 中的 *L. plantarum* 299v、*L. brevis* KB290 也都经过了严格的安全性评估<sup>[16-17]</sup>。

谷氨酸脱羧酶系统是乳杆菌广泛采用的酸抵抗系统,该系统通过谷氨酸/ $\gamma$ -氨基丁酸

表 1 已商业化乳酸菌发酵全植物基代表饮品

Table 1 Representative products of lactic acid bacteria-fermented whole plant-derived substrate beverages

Company	Product	Plant-derived substrate	Lactic acid bacteria	References
OATLY (Sweden)	Oatgurt Plain	Oat milk	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i>	[8]
ProViva (Sweden)	Blueberry	Blueberry juice	<i>Lactobacillus plantarum</i> 299v	[8]
UAB ProBIOduktai (Lithuania)	AVIZO Oat yeast	Organic oats	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i>	[8]
Nancy's (USA)	Oat milk Plain	Oat milk	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> BB-12	[9]
Lifeway (USA)	Lifeway oat	Organic oats	<i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium animalis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>	[9]
KAGOME (Japan)	Labre series of plant-based lactic acid bacteria	Soy juice, Apple juice	<i>Lactobacillus brevis</i> KB290	[10]

(gamma-aminobutyric acid, GABA)反转运蛋白将胞外的谷氨酸转入细胞,经谷氨酸脱羧酶脱羧产生 GABA,同时消耗  $H^+$ ,以抵抗酸胁迫<sup>[18]</sup>。GABA 是一种重要的中枢神经系统抑制性神经递质,具有激活脑内葡萄糖代谢、促进乙酰胆碱合成、抗肥胖、抗惊厥、降血压、改善大脑机能和安定精神等多种生理功能<sup>[19-20]</sup>,高效产生 GABA 是乳酸菌体现其益生功能的重要指标之一<sup>[21]</sup>。高酸度酿造环境,如泡菜、白酒、食醋生产环境是获得高耐酸乳杆菌的重要筛选源<sup>[22]</sup>。短乳杆菌 D17 是从高酸性白酒发酵酒醅中筛选出的高耐酸乳酸菌,在不控 pH 发酵条件下能产 26.1 g/L GABA,高于参考菌株短乳杆菌 ATCC 367 2.3 倍,在控制 pH 条件下,GABA 产量高达 177.74 g/L<sup>[23]</sup>。体外测试表明,短乳杆菌 D17 在产生低浓度( $<1$  mmol/L) GABA 情况下即可表现出远高于非产 GABA 菌株的酸抵抗能力<sup>[23]</sup>。本研究旨在考察短乳杆菌 D17 菌株在典型植物基的生长代谢能力,考察其抗酸、抗胆碱、抗生素耐受等益生菌评估关键指标,并采用动物模型评估该菌株的体内安全性和肠道定殖能力。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 样 品

短乳杆菌 D17 菌株保存于本实验室<sup>[23]</sup>。20 只 6-8 周龄的 SPF 级 BALB/c 小鼠,雄鼠和雌鼠各 10 只,北京维通利华实验动物技术有限公司。通过江南大学实验动物伦理委员会批准,伦理批准编号为 JN.No.20220315b0300601。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

Co60 辐照实验鼠维持饲料,购自江苏协同医药生物工程有限责任公司;谷氨酸、GABA、乳酸、乙酸和乙醇等标品,国药集团化学试剂有限公司;水解燕麦乳粉,广东健力宝股份有

限公司;胃蛋白酶(1:10 000)、胰蛋白酶(1:250)和 0.3%牛胆盐,上海麦克林生化科技股份有限公司;药敏纸片购自杭州微生物试剂有限公司;血清检测商品试剂盒,南京建成生物工程研究所;PowerSoil DNA 提取试剂盒,Qiagen 公司;QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit, Qiagen 公司。冷冻离心机,Beckman Coulter 公司;高效液相色谱仪(HPLC),Agilent 公司;电子分析天平,Mettler Toledo 公司;酶标仪,BioTek 公司。

#### 1.1.3 培养基

MRS 培养基参考文献<sup>[23]</sup>配制。

### 1.2 菌株活化与种子液的制备

将保藏于甘油管中的短乳杆菌 D17 接种于液体 MRS 培养基,37 °C 静置培养 24 h,活化 3 次后将活化好的菌液以 10%接种量接种于 100 mL 液体 MRS 培养基,37 °C、200 r/min 培养 1-12 h 至对数生长中期( $OD_{600}=2.0$ ),将培养液稀释至  $1 \times 10^9$  CFU/mL 作为发酵种子液。

### 1.3 基于 MRS 培养基的发酵

将种子液以 10%接种量接种于 100 mL 液体 MRS 培养基,37 °C、200 r/min 发酵 24 h,每 4 h 取一次样,利用酶标仪测定  $OD_{600}$ 。采用 HPLC 检测发酵液中葡萄糖、麦芽糖、乳酸、乙酸、乙醇、谷氨酸和 GABA 的含量。有机酸的测定参考 Liu 等的方法<sup>[24]</sup>,色谱柱采用 300 mm Aminex HPX-87H,柱温设置为 60 °C,流动相为 5 mmol/L  $H_2SO_4$ ,流速为 0.6 mL/min,检测器采用 Agilent G1362 示差检测器,分析时间为 30 min。GABA 和谷氨酸含量的测定参考 Rea 等的方法<sup>[25]</sup>:通过柱前邻苯二甲醛试剂衍生,色谱柱为 C18 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m),紫外检测波长 338 nm,柱温 40 °C。

### 1.4 基于水解燕麦乳的发酵

将种子液以 10%的接种量接种于水解燕麦乳,37 °C、200 r/min 发酵 24 h,每 4 h 取 1 次

样。利用二硝基水杨酸(dinitrosalicylic acid, DNS)法测定发酵液中的总还原糖<sup>[26]</sup>, 发酵液中葡萄糖、麦芽糖、有机酸和氨基酸含量的测定方法同 1.3。采用顶空-固相微萃取-气相色谱-质谱(headspace solid phase micro-extraction gas chromatography-mass spectrometry, HS-SPME-GC-MS)分析发酵液的风味物质<sup>[27]</sup>: 气相色谱为 GC7890, 分析柱为 DB-Wax column; 质谱条件为 EI 电离源, 电子能量设为 70 eV, 离子源温度为 230 °C, 扫描范围为 35–350 amu。

### 1.5 模拟胃液和肠液耐受性试验

模拟胃液的制备方法为在无菌生理盐水中加入胃蛋白酶使其终浓度为 3 g/L, 并调 pH 值至 2.5。模拟肠液的制备方法为在无菌生理盐水中加入胰蛋白酶使其终浓度为 1 g/L, 并调 pH 值至 8.0, 再加入 0.3%的牛胆盐。模拟胃液和肠液经 0.22  $\mu\text{m}$  无菌滤膜过滤除菌<sup>[28-29]</sup>。参考 Gong 等<sup>[23]</sup>分析菌株耐酸性测试的时序处理方法, 将短乳杆菌 D17 种子液以 1 mL 菌液量分装于若干份无菌 EP 管中, 8 000 r/min 离心 10 min。将离心得到的菌体在 37 °C 分别静置培养 0、1、2 和 2.5 h 时, 立即加入等量的模拟胃液混合均匀, 继续静置培养至 3 h 结束。然后 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 并用等量无菌生理盐水重悬菌体。最后将 1 mL 生理盐水重悬菌液全部接种于新鲜的 10 mL MRS 液体培养基中, 并于 37 °C 培养 48 h, 测定培养液的  $OD_{600}$ 。将胁迫后的  $OD_{600}$  值除以未胁迫处理的  $OD_{600}$  值, 计算得到恢复率。模拟肠液耐受性试验方法与模拟胃液类似, 区别在于模拟肠液的处理时间间隔为 0、1、2、3 和 4 h, 培养至 5 h 结束。

### 1.6 毒力因子和耐药基因预测

将种子液在 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 利用 PowerSoil DNA 提取试剂盒提取菌体 DNA。采用二代 Illumina NovaSeq PE150

平台(北京诺禾致源科技股份有限公司)与三代 NanoPore 平台(江南大学酿造微生物学与应用酶学实验室)对 D17 菌株的全基因组进行联合测序。

乳酸菌安全性最重要的评估内容是毒力因子分析和耐药性评估<sup>[30]</sup>。将短乳杆菌 D17 的基因组序列(登录号为 CP144556)与毒力因子数据库(virulence factor database, VFDB)和耐药基因数据库(comprehensive antibiotic resistance database, CARD)进行比对, 参考欧洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)中的相关指南, 以同一性(identity)大于 80%、覆盖度(coverage)大于 70%和  $E$  值小于  $1 \times 10^{-10}$  为筛选标准, 预测毒力因子和耐药基因<sup>[31]</sup>。

### 1.7 药敏试验

采用 K-B 纸片扩散法判定短乳杆菌 D17 对 12 种常用抗生素的抗性, 依据美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institutes, CLSI)的抑菌圈直径判定标准对抗生素的抗性进行判定<sup>[32]</sup>。

### 1.8 体内安全性评估

#### 1.8.1 灌胃菌悬液的制备

将种子液于 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 菌体用无菌生理盐水洗 3 遍后再用无菌生理盐水重悬并稀释至菌液浓度为  $1 \times 10^9$  CFU/mL, 每天制备新鲜的菌悬液。

#### 1.8.2 动物试验设计

将 20 只 6–8 周龄的 SPF 级 BALB/c 小鼠置于 12 h 光暗循环, 环境温度( $22 \pm 2$ ) °C, 湿度( $55 \pm 2$ )%, 自由摄食、饮水。动物试验分组和性别设计主要参考文献<sup>[33]</sup>。小鼠适应 1 周后被随机分成 2 组, 每组 10 只(雌鼠雄鼠各 5 只, 并分开饲养), 分组如下: (1) SD 组(对照组): 小鼠饲喂标准饲料和 200  $\mu\text{L}$  无菌生理盐水; (2) D17 组: 在饲喂标准饲料的基础上补充 200  $\mu\text{L}$  含  $1 \times 10^9$  CFU/mL 的短乳杆菌 D17 菌悬液。每

日灌胃,共持续 28 d。灌胃期间每日称量小鼠体重,观察记录小鼠的摄食、饮水、活动状态和精神状态<sup>[34-35]</sup>。收集 0 (灌胃前 1 天)、14 和 28 d 的小鼠粪便用于后续肠道微生物研究。灌胃期最后一天,所有小鼠禁食过夜,经眼眶采血后采用二氧化碳法安乐死小鼠。随后立即摘取肝脏、脾脏、肾脏和结肠进行后续分析。

### 1.8.3 脏器指数测定

将取出的肝脏、脾脏和肾脏用生理盐水冲洗,滤纸吸干后称重,进行脏器指数(脏器重量/体重)的测定。

### 1.8.4 血清生化指标检测

使用血清检测商品试剂盒检测谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、甘油三酯(triglyceride, TG)和低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)含量。

### 1.8.5 组织形态学观察

取肝脏、脾脏和结肠的组织切片,经 4%多聚甲醛固定后脱水、包埋、切片和苏木素-伊红染色,最后在光学显微镜下观察组织形态。

### 1.8.6 肠道微生物检测

按照 QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit 说明书提取小鼠粪便的 DNA。采用引物 515Fmod F (5'-GTGYCAGCMGCCGCGTAA-3')和 806Rmod R (5'-G GACTACNVGGGTWTCTAAT-3')扩增 16S rRNA 基因 V4 区,PCR 反应体系和条件参考张会敏等的方法<sup>[36]</sup>。将扩增产物送广东美格基因科技有限公司测序,并将结果上传至 NCBI,获得 Sequence Read Archive (SRA) 编号为 PRJNA1070263。

原始序列使用 Trimmomatic 软件进行质量过滤,利用 QIIME 2 (v2021.11)中的 DADA2 程

序对获得的双端序列去噪、合并和聚类为扩增子序列变体(amplicon sequence variants, ASV)。

基于 Silva 138 99% OTUs 数据库,使用 QIIME 2 训练的朴素贝叶斯分类器对得到的 ASV 序列进行分类注释,生成能体现物种丰度的标准化 ASV 表格。基于 ASV 表格,使用 QIIME 2 计算  $\alpha$  多样性和  $\beta$  多样性指数以及对肠道菌群组成进行分析。

### 1.9 统计学分析

数据以平均值 $\pm$ 标准偏差表示,显著性检验采用 *t* 检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 短乳杆菌 D17 的发酵特性

MRS 培养基富含高浓度氮源,是培养乳杆菌常用的培养基。由细菌生长曲线测定可知,短乳杆菌 D17 在 MRS 培养基中生长良好,发酵 4 h 进入对数生长期,20 h 开始进入生长平稳期(图 1A)。菌株 D17 利用葡萄糖进行异型发酵,在 24 h 的发酵周期中,经检测发现 20 g/L 的葡萄糖被基本消耗完,产生乳酸、乙酸和乙醇分别为 13.41、6.84 和 1.86 g/L。在培养基中添加 10 g/L 的谷氨酸钠后,菌株 D17 能发挥其高产 GABA 的特性,GABA 产量为 7.62 g/L(图 1B),并且观测到菌株 D17 产 GABA 与其生长相耦连。

菌株 D17 在燕麦乳中生长良好,发酵过程 pH 值从 5.29 降到 3.71,利用葡萄糖 7.56 g/L、麦芽糖 5.3 g/L,产生乳酸、乙酸和乙醇分别为 11.06、3.97 和 1.06 g/L(图 1C),共能利用 24.82 g/L 还原糖(图 1D)。即使在燕麦乳这种较低浓度氮源基质上的乳酸产量也能达到 MRS 培养基中的 82.5%,表明短乳杆菌 D17 具有较强的发酵燕麦乳能力。此外,短乳杆菌 D17 也能利用燕麦乳中的游离谷氨酸产生 GABA, GABA 产量为 480 mg/L(图 1E)。其 GABA 产量远低于 MRS

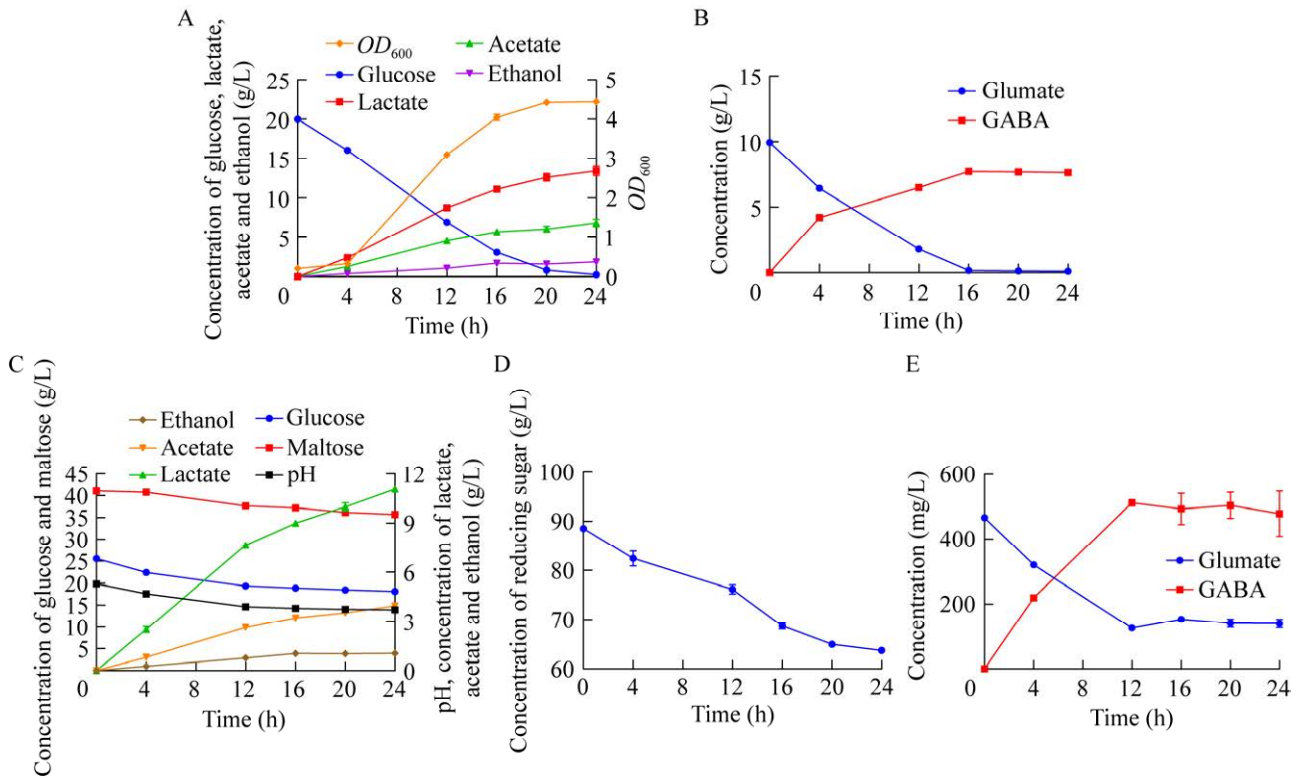


图1 短乳杆菌 D17 基于 MRS 培养基和水解燕麦乳发酵的发酵特性 A: MRS 培养基中的生长、底物利用和有机酸生成. B: MRS 培养基中的 GABA 生成. C: 水解燕麦乳中的底物利用、有机酸生成. D: 水解燕麦乳中的还原糖利用. E: 水解燕麦乳中的 GABA 生成

Figure 1 The fermentation characteristics of *Lactobacillus brevis* D17 in MRS medium and hydrolyzed oat milk. A: Growth, substrate utilization, and organic acid generation in MRS medium. B: GABA generation in MRS medium. C: Substrate utilization, organic acid generation in hydrolyzed oat milk. D: Utilization of reducing sugars in hydrolyzed oat milk. E: GABA generation in hydrolyzed oat milk.

培养基中的 GABA 产量, 推测主要原因为燕麦乳中的游离谷氨酸含量很低, 发酵前燕麦乳中的游离谷氨酸含量为 500 mg/L。

燕麦乳经短乳杆菌 D17 发酵后的风味也得到了明显改善。如表 2 所示, 短乳杆菌 D17 发酵后, 不但消除了燕麦乳中呈豆腥味的正己醛 (hexanal)<sup>[37]</sup>, 而且使发酵后的燕麦乳风味多达 11 种, 涵盖醇类、醛类、酯类、酮类和呋喃类。其中, 正己醇(hexanol)、1-壬醇(nonanol)、3,5-辛二烯酮 (3,5-octadien-2-one) 和丙位壬内酯 (gamma-nonalactone) 等具有果香和椰子香的风味物质含量显著增加, 赋予了发酵燕麦乳香气。

以上结果表明短乳杆菌 D17 具有很好的植物基质燕麦乳发酵特性, 不仅能利用水解燕麦乳产生生物学功能成分 GABA, 同时还能消除燕麦乳中的不良风味, 并赋予产品多元复合香气。

## 2.2 短乳杆菌 D17 在模拟胃液和肠液中的耐受能力

经 3 h 的模拟胃液胁迫, 短乳杆菌 D17 的恢复率为 29.3% (图 2A); 经 5 h 的模拟肠液胁迫, 短乳杆菌 D17 的恢复率为 18.2% (图 2B)。短乳杆菌 D17 在耐受模拟胃肠液胁迫环境 0.5–1.0 h 内的恢复率急剧下降, 表明刚接触胁迫环境的阶段对短乳杆菌 D17 伤害最大, 但当

表 2 短乳杆菌 D17 发酵水解燕麦乳前后的微量风味物质

Table 2 Trace flavor compounds in hydrolyzed oats fermented by *L. brevis* D17

Volatile compound category	Volatile compound	Concentration in hydrolyzed oat milk ( $\mu\text{g/L}$ )	Concentration in fermented hydrolyzed oat milk ( $\mu\text{g/L}$ )
Alcohols	Hexanol	0.00 $\pm$ 0.00	44.37 $\pm$ 14.49
	Trans-2-octen-1-ol	0.00 $\pm$ 0.00	9.87 $\pm$ 3.21
	Nonanol	0.00 $\pm$ 0.00	9.48 $\pm$ 3.67
	Trans-2-decen-1-ol	0.00 $\pm$ 0.00	6.37 $\pm$ 2.02
	2,4-decadien-1-ol	0.00 $\pm$ 0.00	50.77 $\pm$ 14.03
Aldehyde	Hexanal	16.71 $\pm$ 1.15	0.00 $\pm$ 0.00
	Trans-2,4-decadienal	59.07 $\pm$ 5.19	7.64 $\pm$ 2.31
	2,4-dimethylbenzaldehyde	0.00 $\pm$ 0.00	66.60 $\pm$ 20.26
Esters	Gamma-nonalactone	0.00 $\pm$ 0.00	63.85 $\pm$ 24.56
	Octyl formate	0.00 $\pm$ 0.00	7.23 $\pm$ 2.50
Ketones	3,5-octadien-2-one	0.00 $\pm$ 0.00	19.38 $\pm$ 6.71
Furan	2-pentylfuran	8.37 $\pm$ 0.86	5.30 $\pm$ 2.33

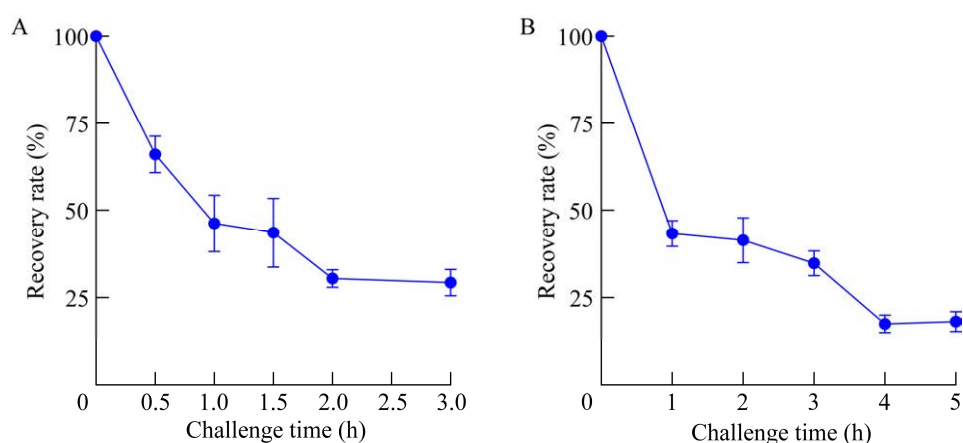


图 2 短乳杆菌 D17 在模拟胃液(A)和模拟肠液(B)中的耐受率

Figure 2 The recovery rate of *Lactobacillus brevis* D17 in simulated gastric fluid (A) and in simulated intestinal fluid (B).

其适应这种压力后(>1.0 h 胁迫), 其受伤害的程度则会显著减弱。短乳杆菌 D17 对胃肠液模拟环境体现出了一定的耐受性。

### 2.3 短乳杆菌 D17 的毒力因子、抗生素抗性基因预测和药敏试验结果

短乳杆菌是小基因组微生物, D17 菌株(登录号为 CP144556)的染色体基因组大小为 2.28 Mb, 略小于短乳杆菌参考菌株 LMT1-73 (2.48 Mb), 但含有的两个质粒(46.7 kb, 登录号为 CP144557;

42.4 kb, 登录号为 CP144558)大于菌株 LMT1-73 的质粒 DNA。经毒力因子数据库(VFDB)和耐药基因数据库(CARD)比对, 短乳杆菌 D17 无潜在的毒力因子和耐药基因。结合耐药基因预测和市面上的应用, 我们一共选择了 12 种抗生素进行耐药性评估。如表 3 所示, 短乳杆菌 D17 对青霉素 G、红霉素、氯霉素、氨苄西林、头孢唑林和庆大霉素敏感; 对四环素和复方新诺明中介敏感; 对阿米卡星、诺氟沙星、环丙沙



表 3 短乳杆菌 D17 的抗生素药敏结果

Table 3 The antibiotic sensitivity of *Lactobacillus brevis* D17

Antibiotic	Inhibition zone diameter (mm)	<i>L. brevis</i> D17 in this study	<i>L. brevis</i> HSP-LB6 <sup>[38]</sup>	<i>L. plantarum</i> WD-1 <sup>[39]</sup>	Evaluation criteria (mm) <sup>[32]</sup>		
					S	I	R
Penicillin G	15.2±0.3	S	R	R	≥15		≤14
Erythromycin	25.3±0.2	S	S	S	≥23	14–22	≤13
Norfloracin	0.0±0.0	R	R	R	≥17	13–16	≤12
Ciprofloxacin	0.0±0.0	R	R	R	≥21	16–20	≤15
Chloramphenicol	27.7±0.4	S	R	S	≥18	13–17	≤12
Compound sulfamethoxazole	15.1±0.2	I	–	S	≥16	11–15	≤10
Ampicillin	24.6±0.5	S	S	S	≥17	14–16	≤13
Cefazolin	23.1±1.4	S	–	S	≥18	15–17	≤14
Gentamicin	16.6±0.4	S	R	R	≥15	13–14	≤12
Amikacin	13.2±0.9	R	–	R	≥17	15–16	≤14
Tetracycline	17.8±0.7	I	–	I	≥19	15–18	≤14
Vancomycin	0.0±0.0	R	R	R	≥17	15–16	≤14

S: 敏感; I: 中介敏感; R: 耐药; –: 未检测

S: Sensitive; I: Intermediary sensitive; R: Resistant. –: Not detected.

星和万古霉素耐药。乳杆菌对阿米卡星、诺氟沙星、环丙沙星和万古霉素耐药是常见的<sup>[38,40]</sup>, 一般认为对这些抗生素的抗性不会影响其安全性<sup>[41]</sup>。值得注意的是, 短乳杆菌 D17 并未预测出耐药基因, 但仍检测出了耐药表型, 表明在对乳杆菌进行抗生素耐药性评估时, 单纯的抗生素抗性基因预测往往是不可靠的, 需要与药敏试验相结合。

## 2.4 短乳杆菌 D17 的体内安全性评估结果

### 2.4.1 短乳杆菌 D17 对小鼠的表现指标影响

在 28 d 的小鼠毒理试验中, 没有一只小鼠死亡, 也未出现精神萎靡等其他健康上的不良表现, 食欲、精神状态、小鼠皮肤、被毛等均表现正常。饲喂短乳杆菌 D17 后, 小鼠体重呈逐渐增长的状态, 并且雄鼠的增重和进食量高于雌鼠, 符合正常规律(图 3A、3B)。菌株 D17 对小鼠肝脏、肾脏和脾脏指数无显著影响, 表明其不会引起小鼠肝、肾、脾的异常重量变化(图 3C–3E)。菌株 D17 对小鼠血清的 ALT、AST、MDA、TG 和 LDL 均无显著影响,

并且还显著升高了 SOD 水平(图 3F–3K)。SOD 是一种生物体内清除超氧阴离子自由基的重要抗氧化酶, 可保护细胞免受氧自由基的损害<sup>[42]</sup>。通过对肝脏、脾脏和结肠的组织形态进行观察, 可以发现菌株 D17 组小鼠肝、脾和结肠组织形态正常, 与对照组(SD)相似, 肝脾细胞及结肠组织均无组织病理异常(图 3L), 进一步表明饲喂菌株 D17 不会对小鼠内脏和肠组织产生负面影响。

### 2.4.2 短乳杆菌 D17 对小鼠肠道微生物多样性的影响

$\alpha$  多样性指数分析发现 Chao1 指数(反映物种数目)和 Shannon 指数(反映物种丰度与均匀度)无显著变化, 说明饲喂短乳杆菌 D17 不会影响肠道微生物的丰富度和多样性(图 4A、4B)。基于主成分分析(principal component analysis, PCA)的肠道微生物  $\beta$  多样性指数发现, D17 组的小鼠肠道微生物聚类与 SD 组无显著差异, 表明饲喂短乳杆菌 D17 对小鼠肠道微生物结构不会产生显著影响(图 4C、4D)。

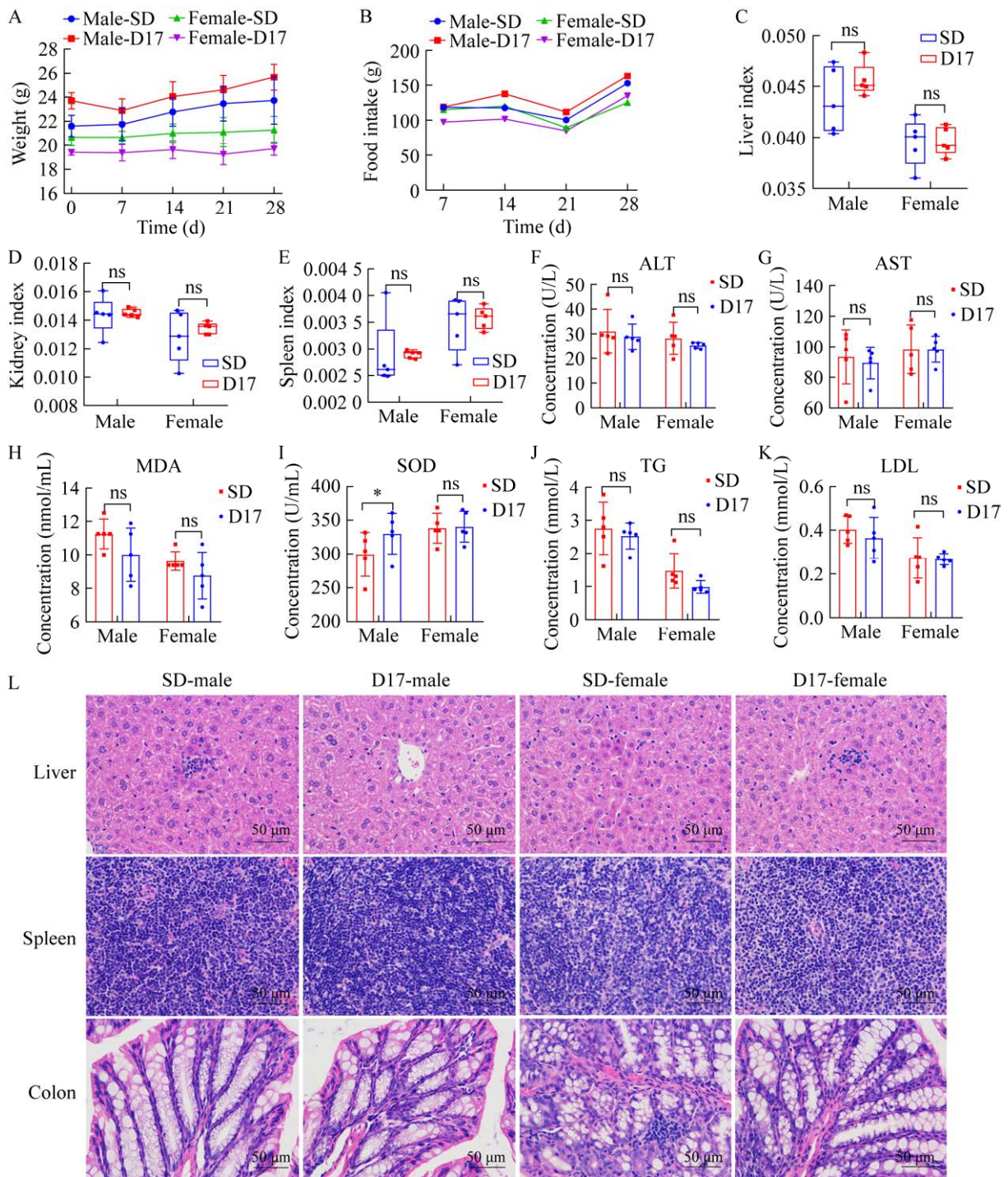


图3 短乳杆菌 D17 菌株对小鼠表型指标的影响 A: 小鼠体重. B: 小鼠摄食量. C-E: 小鼠脏器指数. F-K: 小鼠血清指标含量. L: 小鼠代表脏器组织显微结构

Figure 3 The impacts of *Lactobacillus brevis* D17 on phenotypic indicators in mice. A: Body weight. B: Food intake. C: Liver index. D: Kidney index. E: Spleen index. F-K: Serum indicators. L: Histomicrographs of the top layer (liver), middle layer (spleen) and bottom layer (colon). The data are presented as mean±SD from five independent replicates. *P* values are shown from a two-tailed, unpaired *t* test. ns: No significance. \*: *P*<0.05.

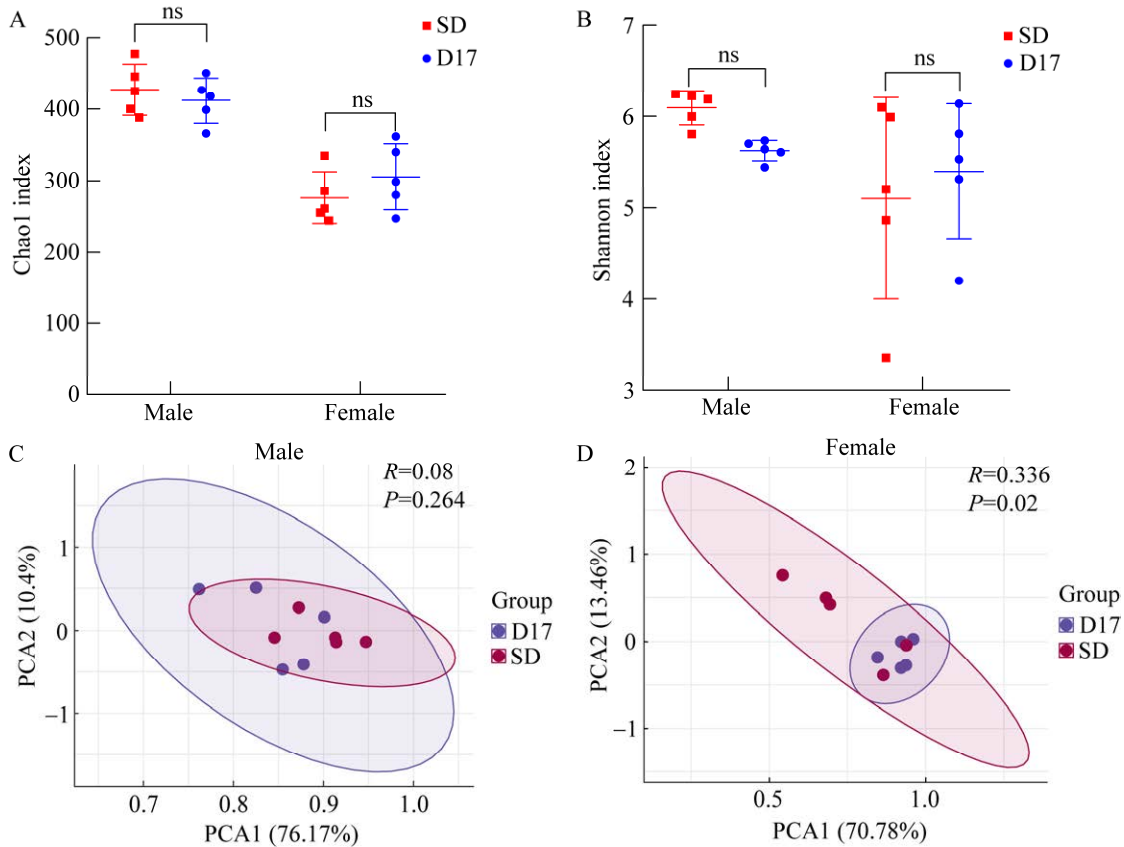


图 4 短乳杆菌 D17 对肠道微生物多样性的影响 A 和 B: Chao1 指数和 Shannon 指数( $\alpha$ 多样性指标); C 和 D: 雄鼠和雌鼠的主成分分析图( $\beta$ 多样性指标)

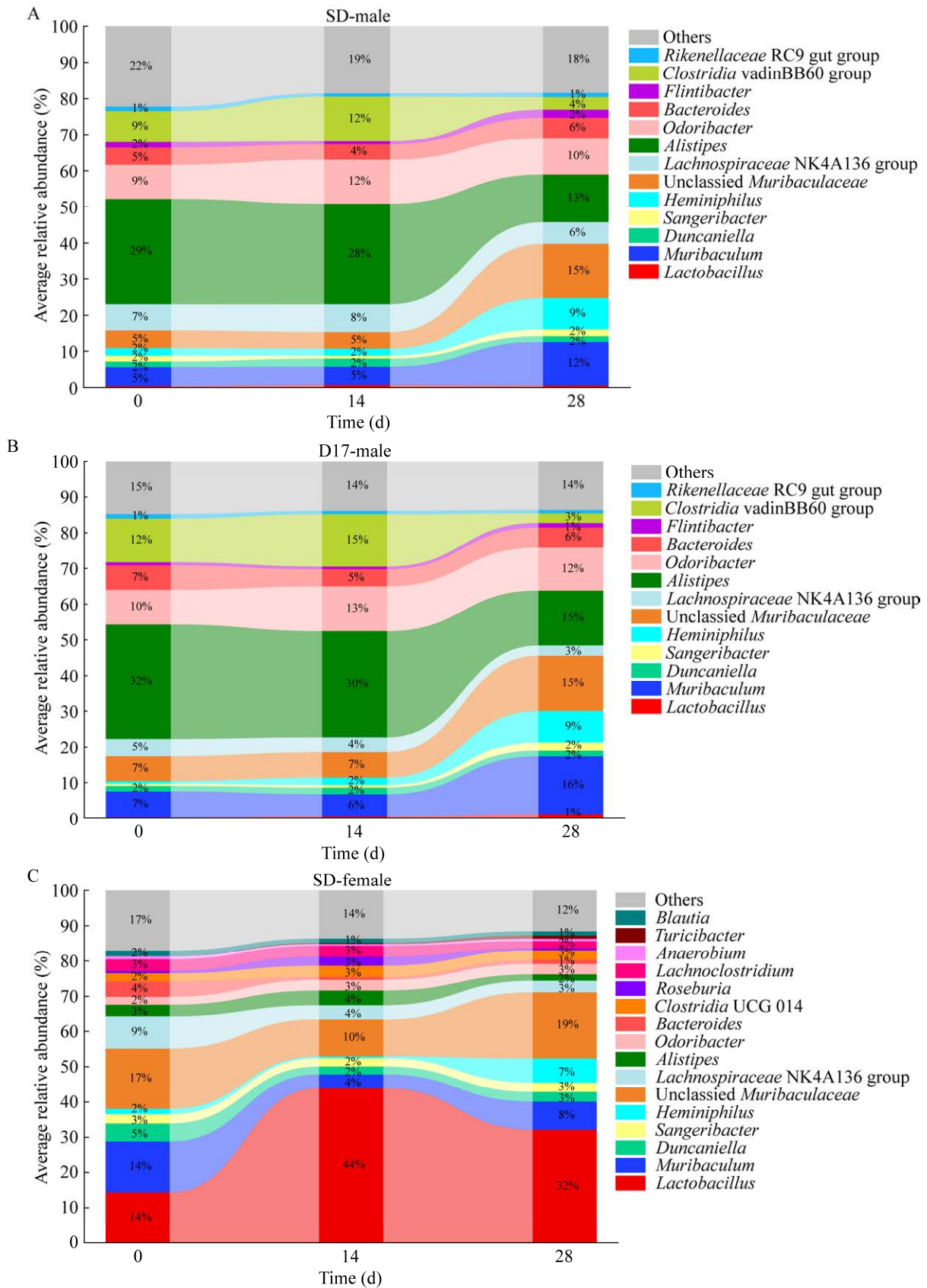
Figure 4 The effects of *Lactobacillus brevis* D17 intervention on gut microbiota diversities. A and B:  $\alpha$  diversity is indicated by Chao1 index (A) and Shannon index (B). C and D: The principal component analysis (PCA) of male mice (C) and female mice (D). The data are presented as mean $\pm$ SD from five independent replicates. *P* values are shown from a two-tailed, unpaired *t* test. ns: No significance.

### 2.4.3 短乳杆菌 D17 对小鼠肠道菌群组成的影响

由图 5 可知,小鼠的肠道菌群在整个进程中呈现动态变化规律且与性别显著相关。短乳杆菌 D17 的补充会在一定程度上影响属水平的时序变化,如短乳杆菌 D17 的补充会使雄鼠中乳杆菌属(*Lactobacillus*)和鼠杆状菌属(*Muribaculum*)随时序的增幅更大,其增幅分别为 0.9%和 9.0%,高于 SD 组的 0.2%和 7.0% (图 5B)。同时,不同于 SD 组的变化趋势,短乳杆菌 D17 的补充也会使雌鼠中 *Lactobacillus* 的相对丰度从灌胃前的 48%下降到灌胃末期的 32%,而拉克氏梭

状芽孢杆菌属(*Lachnoclostridium*)的相对丰度从灌胃前的 2%增加到灌胃末期的 9% (图 5D)。

进一步,按一组中至少有一只小鼠的肠道微生物属水平相对丰度大于 1%的筛选标准确定优势微生物,对补充菌株 D17 的肠道菌群结构影响进行了统计分析(图 6A–6I)。除 *Muribaculum* 和毛螺菌科(*Lachnospiraceae*) NK4A136 群为雌雄小鼠中共同的高丰度微生物外,其余优势肠道微生物均显示出了性别差异。相较于 SD 组,短乳杆菌 D17 的补充会显著增加雌性小鼠中 *Lachnoclostridium* 的相对丰度,从(2.01 $\pm$ 0.65)%增加到(8.64 $\pm$ 4.15)%;



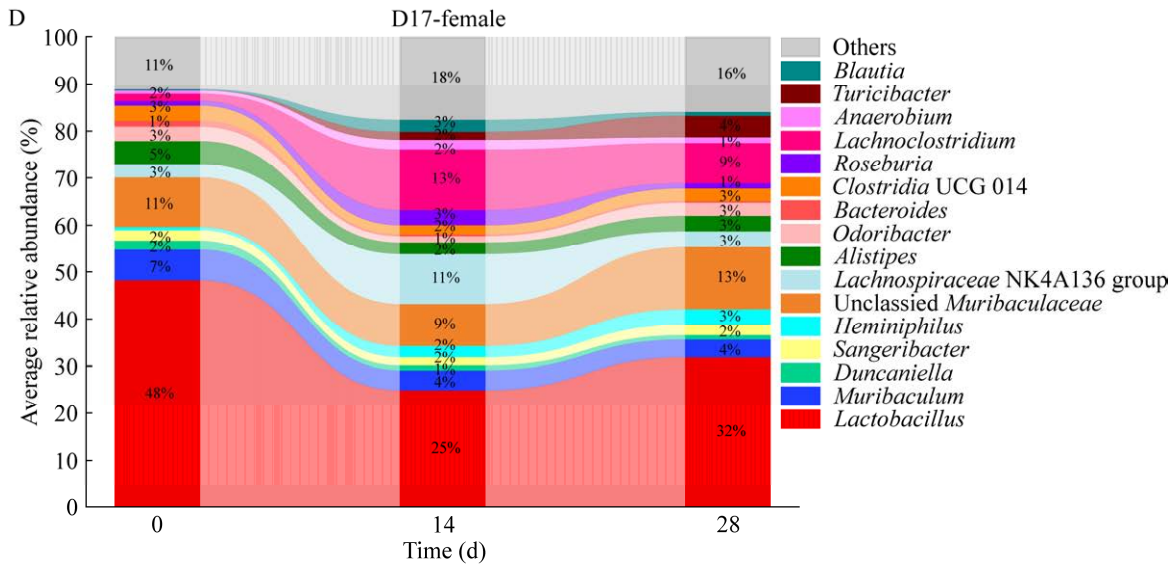


图 5 短乳杆菌 D17 对小鼠肠道菌群时序组成的影响 A 和 B: 雄鼠肠道菌群的属水平时序变化; C 和 D: 雌鼠肠道菌群的属水平时序变化

Figure 5 The effects of *Lactobacillus brevis* D17 on the temporal compositions of intestinal microbiota in mice. The temporal changes of microbiotas at the genus level in male mice (A and B) and in female mice (C and D).

而显著降低雄性小鼠中弗林特杆菌属 (*Flintibacter*) 的相对丰度, 从  $(2.21 \pm 0.69)\%$  降低到  $(1.25 \pm 0.17)\%$ 。此外, 短乳杆菌 D17 的补充对其他优势肠道微生物并无显著影响。另外, 雄鼠和雌鼠中都检测到了灌胃菌株短乳杆菌 D17, 并且雄鼠中的 D17 从中期就能检测到, 表明短乳杆菌 D17 能在小鼠肠道中有效定殖(图 6J)。

### 3 讨论与结论

短乳杆菌 D17 在发酵燕麦乳过程中对葡萄糖和麦芽糖的利用少于总还原糖的消耗量, 表明短乳杆菌 D17 还能利用燕麦乳中的其他糖类, 之前有报道过短乳杆菌能在玉米糊基质中利用木糖发酵产乳酸和乙酸<sup>[43]</sup>。目前尚无短乳杆菌发酵燕麦乳产 GABA 的相关报道, 但在一项短乳杆菌 JCM 1059 发酵椰枣渣的研究中, 在无外源添加谷氨酸钠的前提下, 即使椰枣渣经过酶解, 短乳杆菌 JCM 1059 的 GABA 产量也

只有  $103 \text{ mg/L}$ <sup>[44]</sup>, 远低于本研究中短乳杆菌 D17 发酵水解燕麦乳的 GABA 产量 ( $480 \text{ mg/L}$ )。短乳杆菌 D17 在发酵燕麦乳过程中对谷氨酸的消耗量为产生 GABA 所需谷氨酸的 70%, 这可能是因为短乳杆菌 D17 在发酵过程可同时酶解燕麦乳中的蛋白或多肽, 进而生成游离谷氨酸。短乳杆菌 D17 在燕麦乳基质中发酵 12 h 就不再继续合成 GABA, 其他的代谢产物生成速率也会显著减慢, 这可能是因为短乳杆菌 D17 在燕麦乳基质中难以达到在营养更为丰富的 MRS 培养基中培养的菌体浓度。表明短乳杆菌 D17 在燕麦乳基质中适合短时发酵, 不适合长时发酵, 适合直投式菌剂所需的短时发酵工艺。

短乳杆菌 D17 虽然对一些抗生素如诺氟沙星、环丙沙星、阿米卡星和万古霉素具有抗性, 但多数乳杆菌如植物乳杆菌、短乳杆菌等对氟喹诺酮类(诺氟沙星、环丙沙星)、氨基糖苷类抗生素(阿米卡星)和万古霉素都具有内在耐药性<sup>[38,40]</sup>。

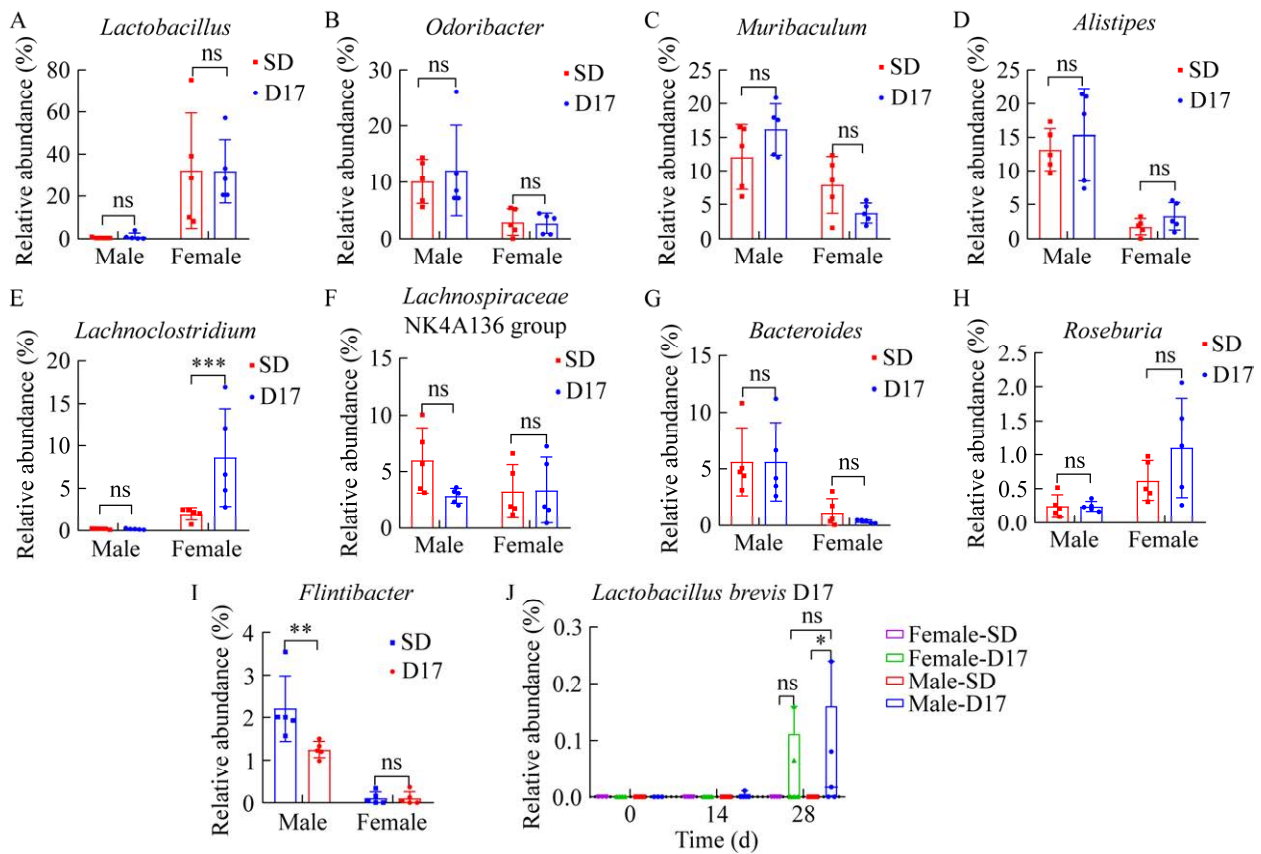


图6 短乳杆菌 D17 对小鼠优势肠道微生物组成的影响 A-I: 在末期(28 d)相对丰度大于 1% 的肠道优势属. J: 短乳杆菌 D17 的时序变化

Figure 6 The effects of *Lactobacillus brevis* D17 on the compositions of dominant intestinal microbiota in mice. A-I: Key genera with relative abundance greater than 1% at 28 d. J: The temporal changes of *L. brevis* D17. The data are presented as mean $\pm$ SD from five independent replicates. *P* values are shown from a two-tailed, unpaired *t* test. ns: No significance; \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

特别是万古霉素,大多数能耐氧生存的乳杆菌如植物乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、发酵乳杆菌和短乳杆菌等都对万古霉素具有高水平的天然耐药性,而像卷曲乳杆菌(*Lactobacillus convolvulus*)、约氏乳杆菌(*Lactobacillus yoelii*)等不耐受氧气的乳杆菌则对其较为敏感<sup>[11,45]</sup>。美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)和欧洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)明确指出乳杆菌的内生耐药一般不会引起安全问题<sup>[41]</sup>。抗生素耐药性的主要危害在于抗生素抗性基因的转移,有

些耐药基因如四环素抗性基因 *tet* 和红霉素抗性基因 *erm* 能通过质粒进行水平基因转移,从而导致一些致病菌获得多重耐药性,具有较大的安全隐患<sup>[46]</sup>。如表 1 中已经商用的 *L. brevis* KB290 经抗生素抗性试验表明其虽然有环丙沙星、万古霉素等抗生素抗性,但无可转移的耐药风险<sup>[47]</sup>。本研究的短乳杆菌 D17 (包括两个质粒)并未检测到抗生素抗性耐药基因,表明短乳杆菌 D17 不具有潜在抗生素抗性基因转移风险。此外,对乳杆菌的首选耐药评估要求只有青霉素和氨基西林<sup>[46,48]</sup>,而本研究的短乳杆菌 D17 对青霉素

和氨苄西林都敏感。综上,短乳杆菌 D17 在抗生素抗性基因转移和抗生素耐药问题上符合对乳杆菌耐药性的要求。

ALT 和 AST 是评估肝功能的重要指标,其值偏高则表明肝功能异常<sup>[49]</sup>。本研究发现短乳杆菌 D17 的补充不但对小鼠大部分血清指标无显著影响,而且还能显著提高血清 SOD 的含量,具有改善机体氧化应激的潜力。短乳杆菌 D17 的补充还会使血清中的 TG 和 LDL 有一定程度的下降, TG 和 LDL 的升高与动脉粥样硬化、肥胖等疾病密切相关,其中 LDL 又被认为是动脉粥样硬化的主要致病因子<sup>[50-51]</sup>,表明短乳杆菌 D17 可能有助于改善脂质代谢。

已有的研究证实不同性别展现出了不同的肠道菌群构成和演变方式,这可能与性激素、遗传差异、免疫系统差异和生活方式的不同有关<sup>[52-53]</sup>。在本研究中发现短乳杆菌 D17 的补充对肠道菌群有一定程度的改善作用,增加了有益菌群的相对丰度,如显著增加雌鼠中 *Lachnoclostridium* 的相对丰度, *Lachnoclostridium* 能产短链脂肪酸,具有抗炎作用<sup>[54]</sup>;同时,显著降低雄鼠中 *Flintibacter* 的相对丰度, *Flintibacter* 是一种潜在的有害菌属,可作为功能性消化不良的肠道微生物标志物<sup>[55]</sup>。短乳杆菌 D17 还能一定程度地提高有益属 *Muribaculum*、臭气杆菌属(*Odoribacter*)和罗斯拜瑞氏菌属(*Roseburia*)的相对丰度,有研究表明 *Muribaculum* 具有抗炎特性,可能对肥胖延缓有利<sup>[56]</sup>; *Odoribacter* 和 *Roseburia* 都是肠道中的丁酸产生菌,具有抗炎特性,对血脂控制具有一定的促进作用,能修复有益菌群<sup>[57-58]</sup>。另外,短乳杆菌 D17 虽然没有很突出的耐受胃肠环境胁迫的能力,但仍能定殖于肠道,这可能有两方面的原因:一方面,短乳杆菌 D17 在压力暴露后会进入一个存活但不可培养状态,在这种

情况下,存活率的量化就会被低估<sup>[59]</sup>;另一方面,短乳杆菌 D17 可能在肠道内能更好地与宿主进行相互作用,如通过调节宿主的免疫反应使肠道内形成一个更有利于短乳杆菌 D17 生存定殖的环境<sup>[60]</sup>。

综上所述,短乳杆菌 D17 具有发酵植物基质的优异能力,不仅能异型发酵燕麦乳产乳酸、乙酸和乙醇,还能利用燕麦乳基质中的谷氨酸产 GABA,同时还能改善燕麦乳风味,具有良好的发酵应用潜力。全基因组分析和抗生素抗性试验表明短乳杆菌 D17 无安全隐患的毒力因子、抗生素抗性基因,耐药安全性符合多项评估规范。体内安全性评估表明短乳杆菌 D17 对小鼠无毒害,并且还能改善小鼠的血清指标、肠道菌群等指标。这些结果表明短乳杆菌 D17 是安全可用的菌株,而且还可能具有降低血脂的有益功效,是未来研究须重点关注的方向。

## REFERENCES

- [1] RAJ T, CHANDRASEKHAR K, KUMAR AN, KIM SH. Recent biotechnological trends in lactic acid bacterial fermentation for food processing industries[J]. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 2022, 2(1): 14-40.
- [2] DORDEVIĆ D, JANČIKOVÁ S, VÍTĚZOVÁ M, KUSHKEVYCH I. Hydrogen sulfide toxicity in the gut environment: meta-analysis of sulfate-reducing and lactic acid bacteria in inflammatory processes[J]. *Journal of Advanced Research*, 2021, 27: 55-69.
- [3] HORLACHER N, OEY I, AGYEI D. Learning from tradition: health-promoting potential of traditional lactic acid fermentation to drive innovation in fermented plant-based dairy alternatives[J]. *Fermentation*, 2023, 9(5): 452.
- [4] KACZMARSKA KT, CHANDRA-HIOE MV, FRANK D, ARCOT J. Aroma characteristics of lupin and soybean after germination and effect of fermentation on lupin aroma[J]. *LWT- Food Science and Technology*, 2018, 87: 225-233.
- [5] S VALLABHA V, TIKU PK. Antihypertensive peptides derived from soy protein by fermentation[J]. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2014, 20(2): 161-168.

- [6] ALBUQUERQUE MAC, BEDANI R, LEBLANC JG, SAAD SMI. Passion fruit by-product and fructooligosaccharides stimulate the growth and folate production by starter and probiotic cultures in fermented soymilk[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 261: 35-41.
- [7] ZHANG J, CAI DY, YANG M, HAO YJ, ZHU YH, CHEN ZX, AZIZ T, SARWAR A, YANG ZN. Screening of folate-producing lactic acid bacteria and modulatory effects of folate-biofortified yogurt on gut dysbacteriosis of folate-deficient rats[J]. *Food & Function*, 2020, 11(7): 6308-6318.
- [8] DJORGBENOO R, HU JJ, HU CL, SANG SM. Fermented oats as a novel functional food[J]. *Nutrients*, 2023, 15(16): 3521.
- [9] YU Q, QIAN JQ, GUO YH, QIAN H, YAO WR, CHENG YL. Applicable strains, processing techniques and health benefits of fermented oat beverages: a review[J]. *Foods*, 2023, 12(8): 1708.
- [10] SATOMI S, WAKI N, ARAKAWA C, FUJISAWA K, SUZUKI S, SUGANUMA H. Effects of heat-killed *Levilactobacillus brevis* KB290 in combination with  $\beta$ -carotene on influenza virus infection in healthy adults: a randomized controlled trial[J]. *Nutrients*, 2021, 13(9): 3039.
- [11] COLAUTTI A, ARNOLDI M, COMI G, IACUMIN L. Antibiotic resistance and virulence factors in lactobacilli: Something to carefully consider[J]. *Food Microbiology*, 2022, 103: 103934.
- [12] EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA: Opinion of the Scientific Committee[J]. *EFSA Journal*, 2007, 5(12): 587.
- [13] ANISIMOVA EA, YARULLINA DR. Antibiotic resistance and the mobility of its genetic determinants in *Lactobacillus fermentum*[J]. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 2020, 35(4): 202-209.
- [14] KOTHARI D, PATEL S, KIM SK. Probiotic supplements might not be universally-effective and safe: a review[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 111: 537-547.
- [15] CANNON JP, LEE TA, BOLANOS JT, DANZIGER LH. Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases[J]. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2005, 24(1): 31-40.
- [16] NORDSTRÖM EA, TEIXEIRA C, MONTELIUS C, JEPPSSON B, LARSSON N. *Lactiplantibacillus plantarum* 299v (LP299V<sup>®</sup>): three decades of research[J]. *Beneficial Microbes*, 2021, 12(5): 441-465.
- [17] YAKABE T, MOORE EL, YOKOTA S, SUI H, NOBUTA Y, FUKAO M, PALMER H, YAJIMA N. Safety assessment of *Lactobacillus brevis* KB290 as a probiotic strain[J]. *Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 2009, 47(10): 2450-2453.
- [18] LAROUTE V, AUBRY N, AUDONNET M, MERCIER-BONIN M, DAVERAN-MINGOT ML, COCAIGN-BOUSQUET M. Natural diversity of lactococci in  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) production and genetic and phenotypic determinants[J]. *Microbial Cell Factories*, 2023, 22(1): 178.
- [19] O'LEARY OF, FELICE D, GALIMBERTI S, SAVIGNAC HM, BRAVO JA, CROWLEY T, EL YACOUBI M, VAUGEUIS JM, GASSMANN M, BETTLER B, DINAN TG, CRYAN JF. GABAB(1) receptor subunit isoforms differentially regulate stress resilience[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(42): 15232-15237.
- [20] HWANG I, JO K, SHIN KC, KIM JI, JI Y, PARK YJ, PARK J, JEON YG, KA S, SUK S, NOH HL, CHOE SS, ALFADDA AA, KIM JK, KIM S, KIM JB. GABA-stimulated adipose-derived stem cells suppress subcutaneous adipose inflammation in obesity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(24): 11936-11945.
- [21] YOGESWARA IBA, MANEERAT S, HALTRICH D. Glutamate decarboxylase from lactic acid bacteria-a key enzyme in GABA synthesis[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(12): 1923.
- [22] 任聪, 杜海, 徐岩. 中国传统发酵食品微生物组研究进展[J]. *微生物学报*, 2017, 57(6): 885-898.
- REN C, DU H, XU Y. Advances in microbiome study of traditional Chinese fermented foods[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(6): 885-898 (in Chinese).
- [23] GONG LC, REN C, XU Y. Deciphering the crucial roles of transcriptional regulator GadR on gamma-aminobutyric acid production and acid resistance in *Lactobacillus brevis*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 108.
- [24] LIU SQ, SKINNER-NEMEC KA, LEATHERS TD. *Lactobacillus buchneri* strain NRRL B-30929 converts a concentrated mixture of xylose and glucose into ethanol and other products[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2008, 35(2): 75-81.



- [25] REA K, CREMERS TIFH, WESTERINK BHC. HPLC conditions are critical for the detection of GABA by microdialysis[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2005, 94(3): 672-679.
- [26] HAO MJ, WU D, XU Y, TAO XM, LI N, YU XW. A novel endo-polygalacturonase from *Penicillium rolfii* with prebiotics production potential: cloning, characterization and application[J]. *Foods*, 2022, 11(21): 3469.
- [27] JI M, DU H, XU Y. Structural and metabolic performance of *p*-cresol producing microbiota in different carbon sources[J]. *Food Research International*, 2020, 132: 109049.
- [28] 靳旭, 于上富, 李柏良, 李娜, 闫芬芬, 霍贵成. 植物乳杆菌 KLDS 1.0386 对 C57BL/6 小鼠胆固醇代谢的影响[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(23): 275-279, 283. JIN D, YU SF, LI BL, LI N, YAN FF, HUO GC. Effect of *Lactobacillus plantarum* KLDS 1.0386 on the cholesterol metabolism in C57BL/6 mice[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(23): 275-279, 283 (in Chinese).
- [29] HYRONIMUS B, LE MARREC C, SASSI AH, DESCHAMPS A. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 61(2/3): 193-197.
- [30] 中国食品科学技术学会. 食品用益生菌通则: T/CIFST 009—2022[S]. 北京: 中国食品科学技术学会, 2022. Chinese Institute of Food Science and Technology. General standard of probiotics for food use: T/CIFST 009—2022[S]. Beijing: Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022 (in Chinese).
- [31] European Food Safety Authority (EFSA). EFSA statement on the requirements for whole genome sequence analysis of microorganisms intentionally used in the food chain[J]. *EFSA Journal*, 2021, 19(7): e06506.
- [32] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-eighth informational supplement: M100-S28[S]. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.
- [33] Organisation for Economic Co-operation and Development. Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents[M]. Paris: OECD Publishing, 2008.
- [34] XU HY, HUANG WQ, HOU QC, KWOK LY, SUN ZH, MA HM, ZHAO FY, LEE YK, ZHANG HP. The effects of probiotics administration on the milk production, milk components and fecal bacteria microbiota of dairy cows[J]. *Science Bulletin*, 2017, 62(11): 767-774.
- [35] XU HY, HUANG WQ, HOU QC, KWOK LY, LAGA WR, WANG YJ, MA HM, SUN ZH, ZHANG HP. Oral administration of compound probiotics improved canine feed intake, weight gain, immunity and intestinal microbiota[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 666.
- [36] 张会敏, 孟雅静, 王艳丽, 李安军, 刘国英, 袁志强, 张严, 邢新会. 新老窖池黄水的差异性及静置培养对其影响[J]. *食品科学*, 2020, 41(2): 215-222. ZHANG HM, MENG YJ, WANG YL, LI AJ, LIU GY, YUAN ZQ, ZHANG Y, XING XH. Differences between huangshui from old and young mud pits of Chinese strong-flavor liquor and effect of static culture on it[J]. *Food Science*, 2020, 41(2): 215-222 (in Chinese).
- [37] BLAGDEN TD, GILLILAND SE. Reduction of levels of volatile components associated with the “beany” flavor in soymilk by lactobacilli and streptococci[J]. *Journal of Food Science*, 2006, 70(3): M186-M189.
- [38] WANG J, WEI XY, FAN MT. Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria and coagulase-negative staphylococci isolated from Hunan smoked pork, a naturally fermented meat product in China[J]. *Journal of Food Science*, 2018, 83(6): 1707-1715.
- [39] 黄晓棠, 姚妞妞, 周璇, 郭润芳, 于宏伟. 5 株发酵食品源乳酸菌的抗药性分析[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(8): 111-116. HUANG XT, YAO NN, ZHOU X, GUO RF, YU HW. Antimicrobial resistance analysis of 5 lactic acid bacteria isolated from fermented foods[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(8): 111-116 (in Chinese).
- [40] ABRIQUEL H, DEL CARMEN CASADO MUÑOZ M, LERMA LL, MONTORO BP, BOCKELMANN W, PICHNER R, KABISCH J, CHO GS, FRANZ CMAP, GÁLVEZ A, BENOMAR N. New insights in antibiotic resistance of *Lactobacillus* species from fermented foods[J]. *Food Research International*, 2015, 78: 465-481.
- [41] DAS DJ, SHANKAR A, JOHNSON JB, THOMAS S. Critical insights into antibiotic resistance transferability in probiotic *Lactobacillus*[J]. *Nutrition*, 2020, 69: 110567.
- [42] RAUF A, IMRAN M, ORHAN IE, BAWAZEER S. Health perspectives of a bioactive compound curcumin: a review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2018, 74: 33-45.
- [43] CUI FJ, LI YB, WAN CX. Lactic acid production from corn stover using mixed cultures of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus brevis*[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(2): 1831-1836.

- [44] HASEGAWA M, YAMANE D, FUNATO K, YOSHIDA A, SAMBONGI Y. Gamma-aminobutyric acid fermentation with date residue by a lactic acid bacterium, *Lactobacillus brevis*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2018, 125(3): 316-319.
- [45] FLÓREZ AB, LADERO V, ÁLVAREZ-MARTÍN P, AMMOR MS, ÁLVAREZ MÁ, MAYO B. Acquired macrolide resistance in the human intestinal strain *Lactobacillus rhamnosus* E41 associated with a transition mutation in 23S rRNA genes[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2007, 30(4): 341-344.
- [46] 宋可, 王俊豪, 万晓宝, 郝海红. 乳杆菌耐药风险及其药敏检测标准[J]. 中国抗生素杂志, 2023, 48(12): 1321-1333.
- SONG K, WANG JH, WAN XB, HAO HH. Risk of *Lactobacillus* drug resistance and standards for its antibiotic susceptibility test[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2023, 48(12): 1321-1333 (in Chinese).
- [47] FUKAO M, TOMITA H, YAKABE T, NOMURA T, IKE Y, YAJIMA N. Assessment of antibiotic resistance in probiotic strain *Lactobacillus brevis* KB290[J]. Journal of Food Protection, 2009, 72(9): 1923-1929.
- [48] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 抗菌药物敏感性试验的技术要求: WS/T 639—2018[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.
- National Health Commission of the People's Republic of China. Technical specification on antimicrobial susceptibility tests: WS/T 639—2018[S]. Beijing: Standards Press of China, 2018 (in Chinese).
- [49] PARKER HM, JOHNSON NA, BURDON CA, COHN JS, O'CONNOR HT, GEORGE J. Omega-3 supplementation and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis[J]. Journal of Hepatology, 2012, 56(4): 944-951.
- [50] FERENC BA, GINSBERG HN, GRAHAM I, RAY KK, PACKARD CJ, BRUCKERT E, HEGELE RA, KRAUSS RM, RAAL FJ, SCHUNKERT H, WATTS GF, BORÉN J, FAZIO S, HORTON JD, MASANA L, NICHOLLS SJ, NORDESTGAARD BG, van de SLUIS B, TASKINEN MR, TOKGÖZOGLU L, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel[J]. European Heart Journal, 2017, 38(32): 2459-2472.
- [51] YUAN F, DONG H, GONG J, WANG DK, HU ML, HUANG WY, FANG K, QIN X, QIU X, YANG XP, LU FE. A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials on the effects of turmeric and curcuminoids on blood lipids in adults with metabolic diseases[J]. Advances in Nutrition, 2019, 10(5): 791-802.
- [52] FRANSEN F, van BEEK AA, BORGHUIS T, MEIJER B, HUGENHOLTZ F, VAN DER GAAST-DE JONGH C, SAVELKOUL HF, de JONGE MI, FAAS MM, BOEKSCHOTEN MV, SMIDT H, EL AIDY S, de VOS P. The impact of gut microbiota on gender-specific differences in immunity[J]. Frontiers in Immunology, 2017, 8: 754.
- [53] YOON K, KIM N. Roles of sex hormones and gender in the gut microbiota[J]. Journal of Neurogastroenterology and Motility, 2021, 27(3): 314-325.
- [54] YIN XQ, AN YX, YU CG, KE J, ZHAO D, YU K. The association between fecal short-chain fatty acids, gut microbiota, and visceral fat in monozygotic twin pairs[J]. Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy, 2022, 15: 359-368.
- [55] LUO L, HU MH, LI Y, CHEN YX, ZHANG SB, CHEN JH, WANG YY, LU BY, XIE ZY, LIAO QF. Association between metabolic profile and microbiomic changes in rats with functional dyspepsia[J]. RSC Advances, 2018, 8(36): 20166-20181.
- [56] HUANG YL, YING N, ZHAO QH, CHEN JL, TEOW SY, DONG W, LIN MJ, JIANG LL, ZHENG H. Amelioration of obesity-related disorders in high-fat diet-fed mice following fecal microbiota transplantation from inulin-dosed mice[J]. Molecules, 2023, 28(10): 3997.
- [57] ETXEBERRIA U, HIJONA E, AGUIRRE L, MILAGRO FI, BUJANDA L, RIMANDO AM, MARTÍNEZ JA, PORTILLO MP. Pterostilbene-induced changes in gut microbiota composition in relation to obesity[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2017, 61(1). DOI: 10.1002/mnfr.201500906.
- [58] TAMANAI-SHACOORI Z, SMIDA I, BOUSARGHIN L, LOREAL O, MEURIC V, FONG SB, BONNAURE-MALLET M, JOLIVET-GOUGEON A. *Roseburia* spp.: a marker of health?[J]. Future Microbiology, 2017, 12: 157-170.
- [59] DERRIEN M, van HYLCKAMA VLIEG JET. Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota[J]. Trends in Microbiology, 2015, 23(6): 354-366.
- [60] WELLS JM. Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli[J]. Microbial Cell Factories, 2011, 10(Suppl 1): S17.