

## 传统发酵酸鱼中乳酸菌的分离筛选及其表型分析

孙海鑫<sup>1</sup>, 李志勇<sup>2</sup>, 陈智慧<sup>3</sup>, 赵新强<sup>1</sup>, 亢春雨<sup>1</sup>, 孙纪录<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>河北农业大学食品科技学院 河北保定 07100

<sup>2</sup>河北师范大学国有资产委员会办公室 石家庄 050024

<sup>3</sup>云南省曲靖农业学校生物技术部 云南曲靖 655000

**摘要** 为了从传统发酵酸鱼中筛选出具有良好发酵性能和益生性能的乳酸菌,采用高通量测序技术分析 2 个产区的 16 份酸鱼样品的细菌多样性。采用透明圈法筛选乳酸菌,通过生理生化试验和 16S rDNA 序列分析进行鉴定。对获得菌株的发酵性能(产酸速率、耐酸性、耐盐性、氨基酸脱羧酶活性)和益生性能(耐胆盐、疏水性、自聚集性、耐药性、抑菌性)进行系统分析。结果表明,乳杆菌属、四联球菌属和魏斯氏菌属是酸鱼中的优势菌属,相对丰度分别为 40.73%、34.27%和 6.42%。共筛选出 24 株乳酸菌,包括 13 株植物乳植杆菌,1 株福菜乳杆菌,2 株福菜伴生乳杆菌,3 株消化伴生乳杆菌,3 株粪肠球菌,1 株粪肠球菌和 1 株戊糖片球菌。其中,福菜乳杆菌和福菜伴生乳杆菌 *C. futsaii* 为在酸鱼中首次分离到。所得乳酸菌菌株的表型差异显著,其中植物乳植杆菌 S18、S21 和福菜伴生乳杆菌 S20 具备较好的发酵性能,菌株 S18 和 S21 具有良好的益生性能。菌株 S18、S20 与 S21 有潜力作为酸鱼的发酵剂。

**关键词** 酸鱼; 乳酸菌; 分离; 鉴定; 发酵性能; 益生性能

**文章编号** 1009-7848(2024)06-0380-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.06.033

酸鱼是我国贵州、湖南等地的传统发酵食品,通常由整条鱼或鱼块发酵而成,因地区喜好和原料差异而导致发酵工艺有所不同,具有一定的地域特色<sup>[1]</sup>。传统发酵酸鱼多采用小规模家庭作坊式的生产方式,发酵过程不受控制,产品稳定性和安全性难以得到有效保障<sup>[2]</sup>。为了提高和稳定发酵酸鱼品质,筛选优良的本土菌株作为发酵剂进行接种发酵,是保证酸鱼品质稳定的有效措施。研究表明,自然发酵酸鱼中乳酸菌数量丰富,在发酵过程中起着重要作用。不同产品中乳酸菌组成也略有不同,主要包括植物乳植杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)、戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)、魏斯氏菌(*Weissella*)、消化乳杆菌(*Lactobacillus alimentarius*)、短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)等<sup>[3-5]</sup>。乳酸菌在发酵过程中能够利用碳水化合物,促进蛋白质和脂肪的分解,产生有机酸和醇、醛、酮等风味物质,快速酸化食品基质,促进风味形成<sup>[6]</sup>。

目前,对酸鱼中乳酸菌的研究主要集中在菌群组成和发酵特性方面<sup>[7]</sup>,而对酸鱼中乳酸菌的益生特性报道较少。许多研究从其它发酵肉或发酵鱼制品中筛选乳酸菌,分析其益生特性,并筛选出以植物乳植杆菌为代表的多种耐胆盐、黏附性好、安全性高的益生型乳酸菌<sup>[8-9]</sup>。益生菌的 3 个核心特征是:足够数量、活菌状态和有益健康功能<sup>[10]</sup>。筛选益生乳酸菌时要选择生长能力受环境影响小,能黏附肠道发挥益生作用,具有一定抑菌和耐药能力的菌株。

本研究以富含乳酸菌的酸鱼为对象,通过高通量测序技术分析酸鱼中的细菌群落多样性,对分离筛选出的乳酸菌进行生理生化试验和基因鉴定,测定菌株的产酸速率、耐酸性、耐盐性及氨基酸脱羧酶活性等发酵特性和耐胆盐性、菌株疏水性和自聚集性、耐药性及抑菌性等益生特性。同时结合主成分分析(principal component analysis, PCA)方法,筛选出综合性能优异的发酵剂候选菌株,为发酵剂制备提供更多菌株选择,提高发酵产品质量,缩短发酵周期。本研究结果以期为酸鱼标准化生产提供一定的理论依据。

收稿日期: 2023-06-26

基金项目: 河北省现代农业产业技术体系淡水养殖创新团队建设项目(HBCT2024300207)

第一作者: 孙海鑫,男,硕士生

通信作者: 孙纪录 E-mail: fm1311sun@163.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

传统发酵酸鱼,采集自湖南、贵州当地的农户家中,均采用当地传统发酵工艺制作,4℃条件下转移至实验室。

MRS肉汤,琼脂,猪胆盐,北京索莱宝科技有限公司;溴甲酚紫,北京博奥拓达科技有限公司;细菌生化鉴定管,青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;药敏片,常德比克曼生物科技有限公司;细菌基因组DNA提取试剂盒,北京博迈德基因技术有限公司;琼脂糖,BIOWEST公司。

### 1.2 设备与仪器

SW-CJ-1FD超洁净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;LDZX-50KBS高压蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂;ZWY-2102C恒温培养振荡器,上海智城分析仪器制造有限公司;Eppendorf AG 22331 Hamburg离心机,西安恒科总公司;TC-96/G/H(b)C聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)基因扩增仪,杭州博日科技有限公司;UV752N紫外-可见分光光度计,上海佑科仪器仪表有限公司;ECLIPSE E100尼康电子显微镜,尼康仪器有限公司。

### 1.3 方法

1.3.1 样品预处理 将收集到的酸鱼样品保留鱼身,去除鱼鳞、鱼刺和辅料,鱼肉搅碎成鱼糜,依次将处理好的酸鱼样品编号(湖南样品编号H1-H8,贵州样品编号G1-G8)。样品于-80℃条件下储存备用。

#### 1.3.2 高通量测序

1.3.2.1 细菌总DNA提取及PCR扩增 使用E.Z.N.A.® soil DNA试剂盒(Omega Bio-tek, Norcross, GA, USA)从酸鱼样品中提取总细菌DNA。使用通用引物(338F:5'-ACTCCTACG-GAGGGCAGCAG-3'和806R:5'-GGAC TACHVGGGTWTCTAAT-3')扩增细菌16S rRNA的V3-V4区域。细菌PCR反应体系包括5×FastPfu Buffer 4 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL, 正向引物(5 μmol/L) 0.8 μL, 反向引物(5 μmol/L) 0.8 μL, FastPfu Polymerase 0.4 μL, BSA 0.2 μL, Template DNA 10 ng, 最后用ddH<sub>2</sub>O补充总体积至20 μL。PCR扩增程序如下:95℃预变性3 min;

95℃变性30 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸45 s, 共27个循环;72℃延伸10 min。用2%琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物,扩增产物送至上海美吉生物医药科技有限公司进行测序。

1.3.2.2 Illumina MiSeq测序数据分析 根据测序平台标准程序构建PE 2×300 bp库。鉴定文库后,在Illumina MiSeq平台上对细菌序列进行测序。

提取原始序列,根据重叠关系,使用Flash(v.1.2.11)软件对pair-end双端序列进行拼接,使用Fastp(v.0.19.6)软件对原始序列进行质控后获得优化序列。使用Uparse(v.7.0.1090)软件基于优化后的序列,根据97%相似度的进行OTU聚类并去除嵌合体。使用RDP Classifier(v.2.11)软件注释序列。比对SILVA(v.130)数据库和UNITE(v.8.0)数据库,对细菌进行物种分类注释。Alpha多样性使用Mothur(v.1.30.2)软件评估。

1.3.3 菌株分离、纯化 通过无菌操作称取25 g经预处理后的酸鱼样品,使用无菌生理盐水梯度稀释,吸取合适稀释梯度的稀释液各200 μL涂布于含0.75%碳酸钙的MRS平板上,每个稀释梯度做3个平行,37℃培养48 h。培养完成后,观察菌落,挑取产生透明圈的菌落进行划线纯化。

1.3.4 菌株的初步鉴定 观察纯化后的菌落特征,根据相关鉴定标准进行生理生化实验,对疑似乳酸菌菌株进行初步鉴定<sup>[11]</sup>。

过氧化氢酶试验、葡萄糖产酸产气试验依据林城杏<sup>[9]</sup>的方法进行测定。

硝酸盐还原试验、硫化氢试验和明胶液化试验使用细菌生化鉴定管进行测定。

1.3.5 菌株的基因鉴定 将经过初步鉴定的24株菌株接入MRS液体培养基中,使用博迈德细菌基因组DNA快速提取试剂盒提取菌株DNA。采用细菌通用引物扩增16S rDNA,正向引物27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物1492R:5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'。PCR扩增体系(50 μL)包括通用引物27F与1492R各2 μL,模板DNA 3 μL, 2×Taq PCR Master Mix 25 μL,最后使用ddH<sub>2</sub>O补充至50 μL。PCR反应条件:95℃预变性5 min;95℃变性1 min,60℃退火1 min,72℃延伸2 min,共30个循环;72℃延伸

10 min。用1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物,PCR扩增产物送至上海生物工程股份有限公司进行测序,测序结果经NCBI网站比对获得菌株同源性结果。

### 1.3.6 乳酸菌的发酵性能

**1.3.6.1 产酸速率** 鱼肉预处理:新鲜鲤鱼宰杀后,去头去尾,除去鱼鳞、鱼刺,将鱼肉绞碎成肉糜。根据Liu等<sup>[12]</sup>的方法测定乳酸菌菌株的产酸速率,稍作修改。将30 g鱼糜、2.5 g氯化钠、2 g葡萄糖、1 g蛋白胨和65 mL蒸馏水混合,调整pH值为6.5,制成鱼肉汁培养基。将活化菌液按1%(体积分数)的比例接种至鱼肉汁培养基中,37℃培养,分别在0,4,8,12,24,36,48 h时取样,测定pH值。

**1.3.6.2 耐酸性** 根据Liu等<sup>[12]</sup>报道的方法,并稍作修改。使用1 mol/L的乳酸调节MRS液体培养基pH值分别至5,4.5,4,3.5,3,121℃灭菌15 min,按1%的比例接种活化后的菌液,37℃培养24 h后,测定菌液的OD<sub>600nm</sub>值。

以菌株密度比来衡量菌株在不同环境中的耐受能力,按下式计算菌株密度比。

$$\text{菌株密度比}(\%) = (A_i/A_0) \times 100$$

式中: $A_i$ 为不同浓度环境培养基中菌液OD<sub>600nm</sub>值; $A_0$ 为正常培养基中菌液OD<sub>600nm</sub>值。

**1.3.6.3 耐盐性** 根据Liu等<sup>[12]</sup>报道的方法,并稍作修改。分别向MRS液体培养基中加入0%,5%,10%,15%,20% NaCl,121℃灭菌15 min,按1%的比例接种活化后菌液,37℃培养24 h后,测定菌液的OD<sub>600nm</sub>值。

以菌株密度比来衡量菌株在不同环境中的耐受能力,按照1.3.6.2节公式计算菌株密度比。

**1.3.6.4 氨基酸脱羧酶活性** 根据刘璐等<sup>[13]</sup>的方法并稍作修改,分别制作含1%赖氨酸、精氨酸、组氨酸、酪氨酸和0.6 g/L溴甲酚紫的MRS液体培养基,过滤灭菌,将1%(体积分数)的活化菌液分别接种至4种MRS液体培养基中,空白液体培养基为对照组,37℃培养4 d,培养基黄色为阴性,变为紫色则为阳性。

### 1.3.7 优势乳酸菌的益生性能

**1.3.7.1 耐胆盐性** 制作含不同比例(0.1%,0.2%,0.3%)猪胆盐的MRS液体培养基,对照不

加猪胆盐,按1%的比例接种活化菌液,37℃培养24 h,测定菌液的OD<sub>600nm</sub>值。

以菌株密度比来衡量菌株在不同环境中的耐受能力,按照1.3.6.2节公式计算菌株密度比。

**1.3.7.2 耐药性** 使用药敏片扩散法对筛选出的菌株进行药敏试验。根据Parlindungan等<sup>[14]</sup>的方法测定菌株对不同抗生素的耐药性,稍作修改。将活化后的菌液均匀涂布到MRS琼脂培养基上,将抗生素纸片间隔放在琼脂培养基上,37℃培养72 h。根据抑菌圈直径对菌株的抗生素耐药性进行等级划分。

**1.3.7.3 表面疏水性** 根据Topçu等<sup>[8]</sup>的方法测定菌株的表面疏水性,稍作修改。菌液活化24 h后,在12 330 g条件下离心15 min,使用1×磷酸盐缓冲液(pH 7.2)洗涤沉淀2次,将沉淀重悬于缓冲液中,涡旋,调整OD<sub>600nm</sub>值至0.6~0.7( $A_0$ )。将1 mL二甲苯与3 mL细胞悬浮液混合均匀,在室温下涡旋2 min,静置30 min。分离水相,并在600 nm处测量其OD值( $A_1$ )。

依下式计算表面疏水性:

$$\text{表面疏水性}(H\%) = (1 - A_1/A_0) \times 100 \quad (1)$$

**1.3.7.4 自聚集性** 参考Xiong等<sup>[15]</sup>的方法测定乳酸菌菌株的自聚集能力,稍作修改。菌液活化24 h后,在12 330 g条件下离心15 min,将沉淀重悬于磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.2)中,涡旋,调整OD<sub>600nm</sub>值至0.55~0.65( $A_0$ )。在室温下静置,在24 h后收集上悬液并测量OD<sub>600nm</sub>值( $A_1$ , $t$ 指测量时间)。

依下式计算自聚集能力:

$$\text{自聚集能力}(\%) = (1 - A_1/A_0) \times 100 \quad (2)$$

**1.3.7.5 抑菌性** 参考刘璐等<sup>[13]</sup>的方法测定乳酸菌菌株的抑菌能力,稍作修改。以金黄色葡萄球菌(ATCC25923),大肠杆菌(ATCC25922),鼠伤寒沙门氏菌(CMCC50115),蜡样芽孢杆菌(CICC21290)作为指示菌,吸取100 μL指示菌菌液( $10^6 \sim 10^7$  CFU/mL)至营养琼脂平板上,涂布,放置无菌滤纸片(6 mm),将15 μL活化后的乳酸菌菌液点在无菌纸片上,4℃静置2 h,37℃培养24 h后测量抑菌圈大小。

**1.3.8 数据处理** 试验重复3次,试验结果使用统计软件Origin 2018、Excel 2019与SPSS 23处

理。采用 One-way ANOVA 检验差异显著性。平均值使用邓肯多重范围检验进行事后验证。

## 2 结果与分析

### 2.1 酸鱼中细菌多样性分析

使用高通量测序技术对两个地区传统发酵酸鱼样品中的细菌群落进行了测定,研究了传统发酵酸鱼中乳酸菌的群落相对丰度,结果如图 1 所示。

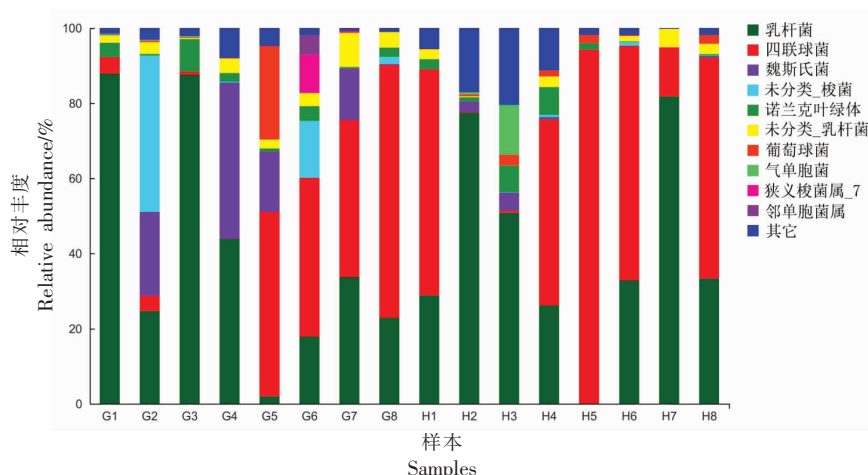


图 1 酸鱼中细菌群落属水平上的相对丰度

Fig.1 Relative abundance of bacteria community in Suanyu at genus levels

如图 1 所示,共鉴定出 10 个属水平上的优势菌属。其中,乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 是酸鱼样品中的第一优势菌属,相对丰度为 40.73%;四联球菌属 (*Tetragenococcus*) 和魏斯氏菌属 (*Weissella*) 分别为第二和第三优势菌属,相对丰度为 34.27% 和 6.42%。该结果与 Liu 等<sup>[12]</sup>研究中传统发酵酸鱼的优势菌属相一致。许多研究中无论酸鱼是否接种发酵剂,乳杆菌属均为第一优势菌属,在不同发酵阶段肠球菌属、乳球菌属、魏斯氏菌属也被鉴定为优势菌属<sup>[16-18]</sup>。以上结果表明,乳酸菌在不同地区的传统发酵酸鱼中均为优势菌属,对酸鱼的发酵过程起着至关重要的作用。此外,在发酵过程中,乳酸菌通过产酸抑制了不耐酸微生物的生长

繁殖,使乳酸菌逐渐成为优势菌属<sup>[16]</sup>。

### 2.2 乳酸菌的分离和鉴定

从 16 个不同酸鱼样本中共分离筛选出 24 株带有明显溶钙圈的疑似乳酸菌菌落,菌落特征主要为透明、半透明,颜色多为白色或乳白色,表面圆润光滑且稍稍隆起。镜检结果多为短杆或长杆状、球状、链状。24 株疑似乳酸菌均为革兰氏染色阳性、过氧化氢酶阴性试验、利用葡萄糖产酸但不产气以及硝酸盐还原阴性菌。根据以上结果,24 株菌符合乳酸菌的生理生化特征。

对经初步鉴定的 24 株乳酸菌进行 DNA 提取及 PCR 扩增,PCR 扩增结果如图 2 所示。

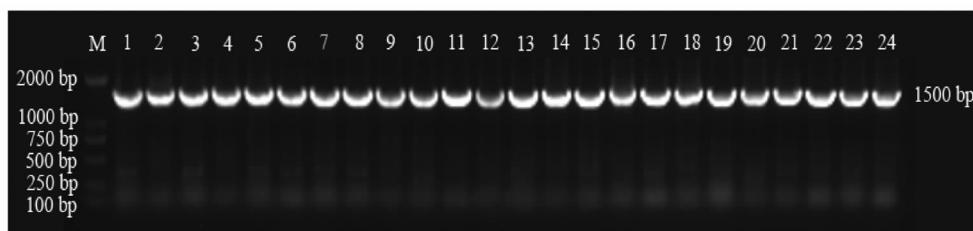


图 2 24 株菌的 PCR 扩增产物电泳图

Fig.2 Electrophoresis of PCR-amplified products of 24 strains

扩增 24 株乳酸菌 16S rDNA,利用 1%琼脂糖凝胶电泳分析发现,24 株菌在 1 500 bp 附近出

现单一明亮条带,扩增产物测序获得基因序列结果在 NCBI 网站上与已知序列进行比对,比对结果

如表1所示。

如表1所示,24株菌种共鉴定出7个菌种,其中包括13株为植物乳植杆菌,占总数的54.17%;1株福菜乳杆菌(*Lactobacillus futsaii*),占总数的4.17%;2株福菜伴生乳杆菌(*Companilactobacillus futsaii*),占总数的8.33%;3株消化伴生乳杆菌(*Companilactobacillus alimentarius*),占总数的12.50%;3株屎肠球菌(*Enterococcus faecium*),占总数的12.50%;1株粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*),占总数的4.17%;1株戊糖片球菌,占总数的4.17%。上述结果表明,植物乳植杆菌在传统发酵酸鱼中是第一优势菌种。同其它发酵鱼制品类似,植物乳植杆菌在鱼酱酸<sup>[13]</sup>、发酵金鲳鱼<sup>[19]</sup>、鱼茶<sup>[20]</sup>、印度发酵鱼 Shidal<sup>[9]</sup>中也被分离鉴定为优势菌种。此外,福菜乳杆菌和福菜伴生乳杆菌占总数的12.50%,为本次研究中发现的第二优势菌种,目前该菌在酸鱼中的报道较少。

### 2.3 乳酸菌的发酵性能分析

**2.3.1 产酸速率** 酸鱼是一种酸性发酵产品,酸味是其特色之一,因此筛选的本土乳酸菌应具备快速产酸,降低pH值的能力。此外,选择本土乳酸菌作为发酵剂更适合酸鱼的发酵环境,有利于促进酸鱼风味、色泽的形成,同时快速降低的pH值环境还能有效抑制不耐酸微生物的生长繁殖,保证酸鱼发酵过程中的品质安全。部分菌株产酸速率如图3所示。

图3展示了具有高效产酸速率的6株乳酸菌,将24株乳酸菌产酸速率曲线拟合后得到产酸均值曲线,6株乳酸菌产酸能力均优于所有菌株的产酸均值。6株乳酸菌包括4株植物乳植杆菌(S5、S17、S18、S21)、1株福菜伴生乳杆菌(S20)和1株屎肠球菌(S3)。这6株乳酸菌在前24h快速产酸,在8h内将pH值降至4.5以下,S18和S20在24h内将pH值降至3.9以下;24h后6株菌株产酸速率逐渐稳定,将鱼肉汁培养基的pH值控制在3.70~3.85之间。许多研究发现多数植物乳植杆菌拥有优异的产酸能力<sup>[21-23]</sup>,6株高效产酸菌中植物乳植杆菌占多数,福菜伴生乳杆菌S20也表现出优秀的产酸能力。

**2.3.2 耐酸性** 酸鱼发酵过程中有机酸含量不断增加,发酵环境pH值不断下降,发酵成熟的酸鱼

表1 24株菌的16S rDNA同源性比对结果

Table 1 The results of 16S rDNA homology comparison of 24 strains

菌株编号	基因库中相似度最高的菌种	登录号	同源性/%
S1	屎肠球菌	OM073982.1	99
S2	福菜伴生乳杆菌	CP040736.1	99
S3	屎肠球菌	OK037492.1	99
S4	植物乳植杆菌	MW111121.1	99
S5	植物乳植杆菌	KP230423.1	99
S6	植物乳植杆菌	OM441987.1	99
S7	植物乳植杆菌	MT378128.1	99
S8	植物乳植杆菌	MF405177.1	99
S9	植物乳植杆菌	MN746321.1	99
S10	植物乳植杆菌	MT613640.1	99
S11	戊糖片球菌	AB481102.1	99
S12	消化伴生乳杆菌	ON115339.1	99
S13	消化伴生乳杆菌	ON115358.1	99
S14	消化伴生乳杆菌	ON115335.1	99
S15	植物乳植杆菌	CP055123.1	100
S16	福菜乳杆菌	MH473441.1	99
S17	植物乳植杆菌	KP137381.1	99
S18	植物乳植杆菌	MT613628.1	100
S19	粪肠球菌	FJ804073.1	99
S20	福菜伴生乳杆菌	CP064860.1	99
S21	植物乳植杆菌	KR816164.1	99
S22	植物乳植杆菌	CP055123.1	99
S23	屎肠球菌	OM570327.1	99
S24	植物乳植杆菌	CP052869.1	99

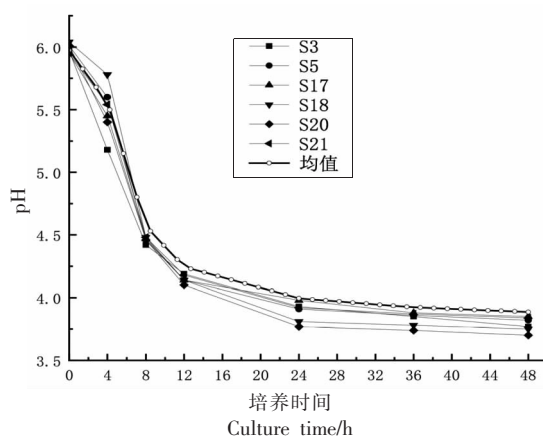


图3 乳酸菌的产酸速率

Fig.3 Acid production rate of lactic acid bacteria

pH值应低于4.6<sup>[5]</sup>,因此所筛选的乳酸菌应具备良好的耐酸能力,这能使其在酸性发酵环境中发挥

发酵特性。菌株耐酸性结果如图4所示。

图4所示的24株乳酸菌的随培养基pH值的下降,菌液光密度值不断下降。其中S1,S19和S23耐酸能力最差,其它菌株在不同pH值培养基中的菌株密度值分别为:pH值为5时,密度比为65.20%~86.92%;pH值为4.5时,15株菌的密度比大于50%,其中包括11株植物乳植杆菌、1株福菜伴生乳杆菌、1株福菜乳杆菌、1株屎肠球菌和1株戊糖片球菌;pH值为4时,5株菌的密度比仍大于10%,包括5株植物乳植杆菌(S7,S8,S10,S18,S22);pH值低于4时,所有菌株密度比低于5%。以上结果表明,在低pH值环境中21株菌株仍有较好的耐受能力,其中以菌株S7,S8,S10,S18,S22的耐酸效果最好。任大勇等<sup>[24]</sup>也在研究中筛选出了具有较强耐酸能力的植物乳植杆菌。此外,有研究认为不但不同乳酸菌菌种的酸耐受性之间有差异,相同菌种的不同菌株之间的酸耐受性差异也非常大<sup>[25]</sup>。

**2.3.3 耐盐性** 传统发酵酸鱼分为高盐酸鱼和低盐酸鱼,因此作为发酵剂的候选菌株应具备一定的耐盐能力。菌株的耐盐性结果如图5所示。

由图5可以看出,随着盐含量不断增加所有菌株的 $OD_{600nm}$ 值不断降低,当盐质量分数到达20%时,所有菌株的 $OD_{600nm}$ 值均低于0.01,该结果与林城杏<sup>[5]</sup>的结果相一致,但仍有20株菌有一定存活率(菌株密度比>1%)。当盐质量分数为5%~10%时,是传统发酵环境中常采用的盐含量。当盐质量分数为5%时,19株乳酸菌能良好的生长,吸光值在1.0以上,菌株密度比>70%;当盐质量分数为10%时,菌株S10,S11,S16,S17,S18,S21,S22和S24仍表现出相对较强的生存能力,菌株密度比>5%。由上述结果可知,盐浓度对乳酸菌的生长有着重要影响,在高盐环境下菌株的生长受到明显的抑制。

**2.3.4 氨基酸脱羧酶活性** 具有氨基酸脱羧酶活性的微生物作用于氨基酸使其脱羧,促进了食物中生物胺的形成<sup>[26]</sup>,而传统的发酵鱼加工粗放往往会导致生物胺的累积。因此,筛选无氨基酸脱羧酶活性的菌株作为发酵剂能有效控制生物胺含量,提高发酵安全性。菌株S3,S5,S6,S10,S12为氨基酸脱羧酶阳性,不可用于接种发酵,其它菌株

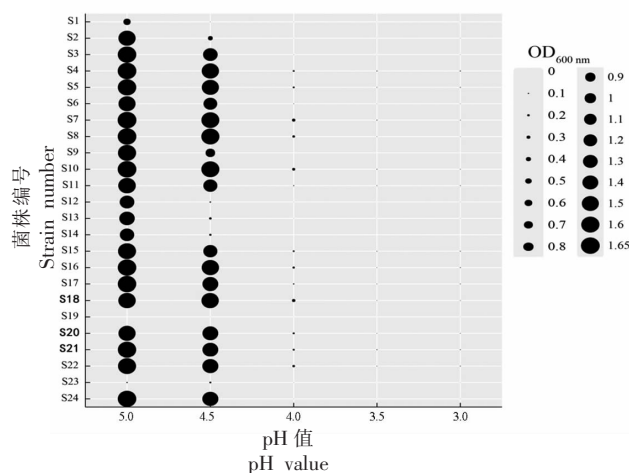


图4 24株乳酸菌的耐酸能力

Fig.4 Acid tolerance of 24 lactic acid bacteria

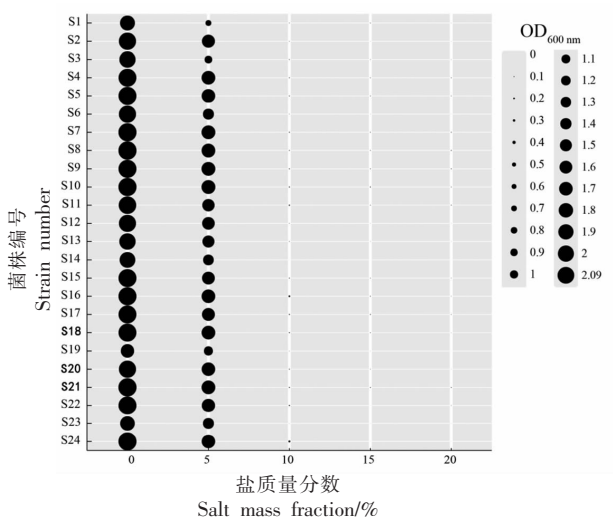


图5 24株乳酸菌的耐盐能力

Fig.5 Salt tolerance of 24 lactic acid bacteria

均为氨基酸脱羧酶阴性,可作为发酵剂候选菌株。

## 2.4 乳酸菌的益生性能分析

**2.4.1 耐胆盐性** 对胆盐的耐受能力是选择益生菌菌株的重要因素<sup>[8]</sup>。人体肠道内的胆盐质量分数约为0.3%<sup>[13]</sup>,若使益生菌在人体内发挥益生作用,则所选菌株应具备一定的耐胆盐能力。菌株的耐胆盐性结果如图6所示。

研究中,24株乳酸菌能在0.1%,0.2%,0.3%的胆盐浓度中生长,但随着的胆盐浓度不断增加其生长能力不断被抑制。其中,5株植物乳植杆菌S5,S9,S10,S17,S18和1株戊糖片球菌S11表现出良好的耐胆盐能力。胆盐质量分数为0.1%时,6

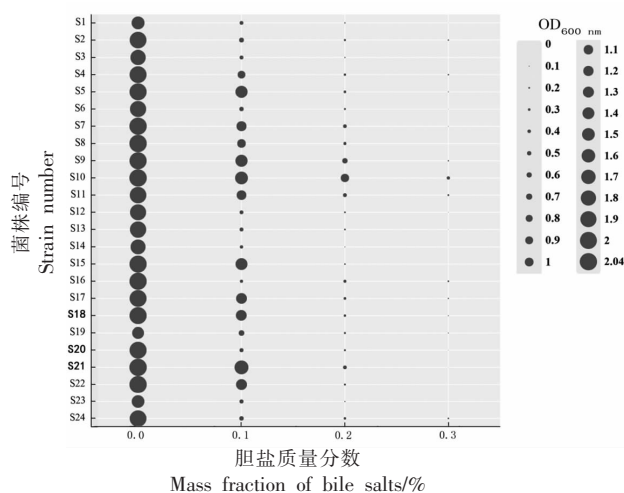


图6 24株乳酸菌的耐胆盐能力

Fig.6 Bile tolerance of 24 lactic acid bacteria

菌株的  $OD_{600nm}$  值  $>1.0$ , 菌株密度比  $>50\%$ ; 胆盐质量分数为  $0.3\%$  时, 6 株菌的  $OD_{600nm}$  值  $>0.1$ , 菌株密度比大于  $5\%$ , 这些分离株的耐受强度与先前研究结果基本相似<sup>[5,13]</sup>。此外, 相关研究发现多数乳酸菌能在  $0.2\% \sim 0.5\%$  的胆盐浓度下生长, 少数菌株能耐受更高的胆盐浓度<sup>[8,13,27]</sup>, 这可能与乳酸菌中的脂肪酸构成<sup>[28]</sup>和自身所分泌的胆盐水解酶有关。

**2.4.2 耐药性** 根据研究报道, 通常两类抗生素常被用于益生性菌株的评价指标, 一类是细胞壁合成抑制剂, 包括氨苄西林和万古霉素; 另一类是蛋白质合成抑制剂, 包括氯霉素、庆大霉素、克林霉素、红霉素、链霉素、卡那霉素和四环素<sup>[9]</sup>。结合多数研究中的常见抗生素, 选择氨苄西林 ( $10 \mu\text{g}$ )、万古霉素 ( $30 \mu\text{g}$ )、庆大霉素 ( $10 \mu\text{g}$ )、链霉素 ( $10 \mu\text{g}$ )、四环素 ( $30 \mu\text{g}$ )、红霉素 ( $15 \mu\text{g}$ ) 进行耐药性试验, 按照相关研究标准将敏感性等级划分为抗性 (Resistant, R)、中介 (Intermediate, I) 和敏感 (Susceptible, S) 3 种<sup>[29]</sup>, 结果如表 2 所示。

由表 1 可知, 多数菌株对氨苄西林、四环素和红霉素敏感, 对万古霉素、庆大霉素和链霉素有抗性, 原因可能是乳杆菌属对万古霉素、庆大霉素和链霉素具有内在的抗药性所导致的<sup>[30-31]</sup>。与该结果相类似的, Parlindungan 等<sup>[14]</sup>从发酵肉制品中分离筛选出的 22 株乳酸菌普遍对万古霉素、庆大霉素和链霉素具有抗药性; Shubham 等<sup>[9]</sup>从发酵鱼肉中分离出的 40 株乳酸菌中 35 株对万古霉素有抗药

表 2 乳酸菌的抗生素敏感性

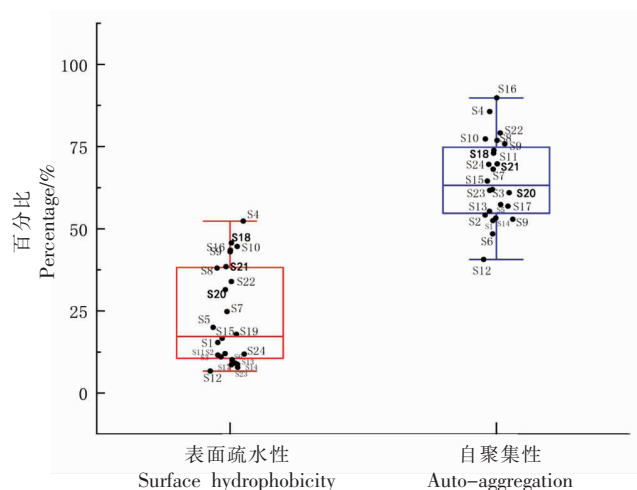
Table 2 Antibiotic susceptibility of lactic acid bacteria

菌株 编号	氨苄 西林	万古 霉素	庆大 霉素	链霉 素	四环 素	红霉 素
S1	I	S	R	R	S	R
S2	S	R	R	R	I	R
S3	S	R	R	R	S	R
S4	S	R	R	R	R	S
S5	S	R	R	R	R	S
S6	I	R	R	R	I	R
S7	R	R	R	R	R	S
S8	R	R	R	R	R	S
S9	I	R	R	R	R	S
S10	I	R	R	R	R	S
S11	R	R	R	R	I	S
S12	R	S	R	R	S	R
S13	R	S	R	R	S	R
S14	S	S	R	R	S	R
S15	S	R	R	R	R	R
S16	I	R	R	R	R	S
S17	R	R	R	R	I	S
S18	S	R	R	R	S	S
S19	S	R	R	R	S	I
S20	S	R	R	R	S	S
S21	S	R	R	R	S	S
S22	R	R	R	R	R	S
S23	R	S	R	R	S	R
S24	R	R	R	R	I	R

注: R, 抗性; I, 中介; S, 敏感。

性, 28 株对庆大霉素有抗药性, 37 株对链霉素有抗药性; 许女等<sup>[32]</sup>从发酵食品中分离出的 97 株乳酸菌也发现类似的耐药性结果。除万古霉素、庆大霉素和链霉素之外, 10 株植物乳植杆菌对红霉素敏感, 8 株对氨苄西林敏感, 分别约占总数  $77\%$  和  $62\%$ ; 所有消化伴生乳杆菌对四环素敏感; 2 株屎肠球菌对氨苄西林和四环素敏感; 所有福菜乳杆菌与福菜伴生乳杆菌对氨苄西林敏感, 2 株对四环素敏感; 其中菌株 S18、S19、S20 和 S21 对 3 种抗生素敏感, 12 株菌对 2 种抗生素敏感。

**2.4.3 表面疏水性与自聚集性** 菌株表面疏水性和自聚集性是评价菌株黏附能力的两个重要指标<sup>[33]</sup>, 益生菌的这种黏附特性决定了它们在胃肠道中存活和持续存在的能力, 进而能够发挥对宿主的有益作用。菌株的表面疏水性和自聚集性结果如图 7 所示。



注:A:表面疏水性(粉色箱图);B:自聚集性(蓝色箱图)。

图 7 24 株乳酸菌的黏附能力

Fig.7 Adhesion ability of 24 lactic acid bacteria

所有菌株的表面疏水性范围为 6.65% 至 52.32%。根据菌株表面疏水性标准,71%~100%为强疏水性,36%~70%为中疏水性,低于 35%为弱疏水性<sup>[34]</sup>。其中,植物乳植杆菌 S4、S9、S10、S18、S21(38.41%~52.32%),福菜乳杆菌 S16(42.96%)的表面疏水性较好,达到中疏水性水平。福菜伴生乳杆菌 S20 疏水性为 31.41%,接近中疏水性标准;所有菌株的自聚集性范围为 40.66%至 89.80%。其中,植物乳植杆菌 S18、S21(69.71%、73.79%)、福菜伴生乳杆菌 S20(60.90%)、福菜乳杆菌 S16(89.80%)的自聚集性较好,与其它研究中益生菌候选菌株的自聚集水平相似或略高<sup>[14-15,27]</sup>。上述菌株中,植物乳植杆菌和福菜乳杆菌比其它菌株表现出更强的菌株疏水性和自聚集性。Shubham 等<sup>[9]</sup>从发酵鱼 Shidal 中筛选出的植物乳植杆菌疏水性均值为 56.12%,自聚集性均值为 30.7%。

2.4.4 抑菌性 评估了 24 株乳酸菌对 4 种标准菌株(金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌和蜡样芽孢杆菌)的抑菌效果,结果如表 3 所示。

由表 3 可知,共有 11 株乳酸菌能够抑制 2 种标准菌株的生长,菌株 S10 能够抑制金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌的生长。24 株受试菌株均能对金黄色葡萄球菌产生抑制作用,对蜡样芽孢杆菌和大肠杆菌的抑菌圈直径不明显。乳酸菌的抗菌能力与菌株产生的抗菌物质有

表 3 24 株乳酸菌的抑菌性

Table 3 Antibacterial activity of 24 lactic acid bacteria

菌株编号	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	鼠伤寒沙门氏菌	蜡样芽孢杆菌
S1	++	—	—	—
S2	++	—	—	—
S3	++	—	—	—
S4	++	—	+	—
S5	++	—	—	—
S6	++	—	—	—
S7	++	—	+	—
S8	++	—	+	—
S9	++	—	+	—
S10	++	+	+	—
S11	++	—	++	—
S12	++	—	+	—
S13	++	—	+	—
S14	++	—	+	—
S15	++	—	++	—
S16	++	—	++	—
S17	++	—	—	—
S18	++	—	—	—
S19	++	—	—	—
S20	++	—	—	—
S21	++	—	++	—
S22	++	—	—	—
S23	++	—	—	—
S24	++	—	—	—

注:—:抑菌圈不明显;+:抑菌圈直径<8 mm; ++:8 mm≤抑菌圈直径<10 mm; +++:抑菌圈直径≥10 mm。

关,如有机酸、过氧化氢和细菌肽<sup>[35]</sup>。试验结果由未经处理的菌液直接测试获得,因此菌液中的抗菌化合物还应通过后续试验进一步测定。

### 2.5 基于 PCA 的菌株表型综合分析

通多基于 PCA 的表型综合分析对分离菌株的综合性能进行了评估,以发酵性能和益生性能为指标绘制了主成分分析图,结果如图 8 所示。

PCA 图解释了 58.3%的总方差,表明受试菌株的表型存在显著差异。图中按照表型的相似性划分了 3 个组别,A 组中的菌株综合表现较好。A 组中,菌株 S3 与 S5 为氨基酸脱羧酶阳性菌株,不可用于接种发酵;菌株 S23 耐酸能力较差,无法快



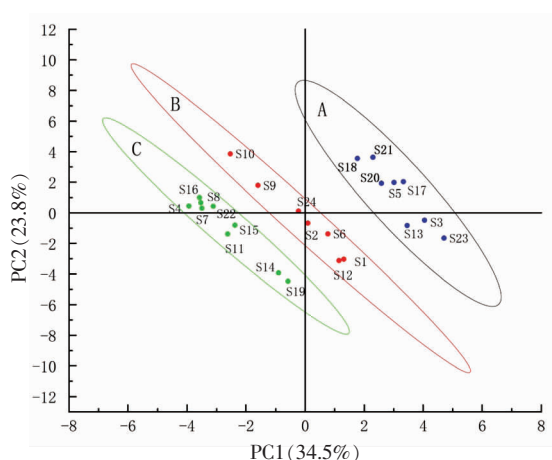


图8 基于PCA筛选潜在优良菌株

Fig.8 Screening potential excellent strains based on PCA

速适应酸鱼的发酵环境及发挥益生作用；菌株S13、S17、S23在耐胆盐、表面疏水性和自聚集性等方面相较于同组内其它菌株各自表现出不同的劣势；菌株S18、S20、S21在产酸、耐酸、耐盐、无氨基酸脱羧酶活性等发酵性能上综合表现较佳；菌株S18、S21在耐胆盐、耐药、表面疏水性和自聚集性等益生性能上也有良好的能力。因此，菌株S18、S20、S21可作为潜在的发酵剂候选菌株。

### 3 结论

本研究通过高通量测序技术分析了两个地区酸鱼中的细菌群落多样性,发现乳杆菌属、四联球菌属和魏斯氏菌属等为优势菌属,分离筛选出24株符合乳酸菌生理生化特征的菌株。利用16S rDNA序列比对,发现植物乳植杆菌是酸鱼中的优势乳酸菌,占分离菌株数量的54%。

对24株乳酸菌进行发酵特性和益生特性试验,最后利用主成分分析法筛选得到3株产酸速率高、耐酸、耐盐、无氨基酸脱羧酶活性的福菜伴生乳杆菌S20和植物乳植杆菌S18、S21,其中菌株S18和S21也表现出较好的耐胆盐、耐药及表面疏水性和自聚集性能力。

综上所述,菌株S18、S20与S21在表型上的优秀表现,有一定潜力作为优良发酵剂候选菌株。本研究筛选的本土乳酸菌更加适合酸鱼的发酵环境,为酸鱼品质提升和工业化生产提供了一定理论依据。

### 参考文献

- [1] ZENG X F, XIA W S, JIANG Q X, et al. Effect of autochthonous starter cultures on microbiological and physicochemical characteristics of Suanyu, a traditional Chinese low salt fermented fish[J]. Food Control, 2013, 33(2): 344-351.
- [2] ZANG J H, XU Y S, XIA W S, et al. Correlations between microbiota succession and flavor formation during fermentation of Chinese low-salt fermented common carp (*Cyprinus carpio* L.) inoculated with mixed starter cultures[J]. Food Microbiology, 2020, 90: 103487.
- [3] 曾雪峰. 淡水鱼发酵对酸鱼品质影响的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013: 13-21.  
ZENG X F. Study on the effect of suan yu property of fermented freshwater fish[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2013: 13-21.
- [4] ZENG X F, ZHANG W, ZHU Q J. Effect of starter cultures on the quality of Suanyu, a Chinese traditional fermented freshwater fish[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2016, 51(8): 1774-1786.
- [5] 林城杏. 传统高盐发酵酸鱼乳酸菌菌群结构及强化发酵作用研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2019: 28-29.  
LIN C X. Lactic acid bacteria community structure of traditional high-salt fermented fish (Suanyu) and enhanced fermentation[D]. Guiyang: Guizhou University, 2019: 28-29.
- [6] HU Y Y, ZHANG L, WEN R X, et al. Role of lactic acid bacteria in flavor development in traditional Chinese fermented foods: A review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020, 62(10): 2741-2755.
- [7] 彭小珍, 卢星军, 蒋立文. 酸鱼的研究现状与研究进展[J]. 中国酿造, 2020, 39(8): 13-16.  
PENG X Z, LU X J, JIANG L W. Research status and progress of Suanyu[J]. China Brewing, 2020, 39(8): 13-16.
- [8] TOPÇU K C, KAYA M, KABAN G. Probiotic properties of lactic acid bacteria strains isolated from pastırma[J]. Lwt, 2020, 134: 110216.
- [9] SHUBHAM G, UPASANA M, RANENDRA K M. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from traditional fermented fish product Shidal of In-

- dia with reference to their probiotic potential [J]. *Lwt*, 2021, 146: 111641.
- [10] 中国食品科学技术学会益生菌分会. 益生菌的科学共识 (2020年版)[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(5): 303-307.
- Probiotics Society of the Chinese Institute of Food Science and Technology. Scientific consensus on probiotics (2020)[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(5): 303-307.
- [11] 凌代文. 乳酸菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999(1): 117-129.
- LING D W. Classification and identification of lactic acid bacteria and experimental methods[M]. Beijing: China Light Industry Press, 1999(1): 117-129.
- [12] LIU J G, LIN C X, ZHANG W, et al. Exploring the bacterial community for starters in traditional high-salt fermented Chinese fish (Suanyu)[J]. *Food Chemistry*, 2021, 358: 129863.
- [13] 刘璐, 吴江丽, 杨金桃, 等. 发酵鱼酱酸产 GABA 乳酸菌的分离筛选及发酵特性[J]. *食品科学*, 2021, 42(18): 73-79.
- LIU L, WU J L, YANG J T, et al. Isolation and fermentation characteristics of GABA-producing lactic acid bacteria from fermented Yu jiang suan[J]. *Food Science*, 2021, 42(18): 73-79.
- [14] PARLINDUNGAN E, LUGLI G A, VENTURA M, et al. Lactic acid bacteria diversity and characterization of probiotic candidates in fermented meats [J]. *Foods*, 2021, 10(7): 1519.
- [15] XIONG T, LIN J X, ZHEN P, et al. Novel lactic acid bacteria with anti-hyperuricemia ability: Screening and in vitro probiotic characteristics [J]. *Food Bioscience*, 2022, 49: 101840.
- [16] ZANG J H, XU Y S, XIA W S, et al. Dynamics and diversity of microbial community succession during fermentation of suanyu, a Chinese traditional fermented fish, determined by high throughput sequencing [J]. *Food Research International*, 2018, 111: 565-573.
- [17] LIN C X, ZHANG F R, YANG Q, et al. Microorganism and physiochemical characteristic of high-salt (Suan Yu), a traditional Chinese fermented fish[J]. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2021, 30(8): 916-931.
- [18] 于美娟, 谭欢, 马美湖, 等. 传统固态发酵鱼中细菌群落多样性与品质特征分析[J]. *食品科学*, 2017, 38(8): 86-95.
- YU M J, TAN H, MA M H, et al. Bacterial community diversity and quality characteristics in traditional solid-fermented fish[J]. *Food Science*, 2017, 38(8): 86-95.
- [19] 苏伟明, 胡梦杰, 沈会连, 等. 金鲳鱼发酵菌株筛选及其生物学特性与风味形成评价[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(4): 148-154.
- SU W M, HU M J, SHEN H L, et al. Screening of fermentation strains of *Trachinotus ovatus* and biological characteristic and flavor formation evaluation [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(4): 148-154.
- [20] 韩静. 鱼茶中乳酸菌发酵剂的筛选及其对产品品质的影响[D]. 大连: 大连工业大学, 2018: 10-24.
- HAN J. Screening of lactic acid bacteria starters from 'Yucha' and evaluation of their application[D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2018: 10-24.
- [21] 林城杏, 黄瑶, 周迎春, 等. 传统淡水鱼发酵制品中乳酸菌的分离筛选及发酵特性[J]. *肉类研究*, 2019, 33(5): 13-18.
- LIN C X, HUANG Y, ZHOU Y C, et al. Isolation and fermentation characteristics of lactic acid bacteria from traditional fermented freshwater fish in China[J]. *Meat Research*, 2019, 33(5): 13-18.
- [22] HAN J, ZHANG J B, LIN X P, et al. Effect of autochthonous lactic acid bacteria on fermented Yucha quality[J]. *Lwt*, 2020, 123: 109060.
- [23] 郭志华, 王聪, 陈红玲. 红茶菌中降解亚硝酸盐乳酸菌的筛选、鉴定及其功能特性[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(8): 309-316.
- GUO Z H, WANG C, CHEN H L. Studies on screening, identification and functional properties of nitrite degrading lactic acid bacteria in *Kombucha*[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(8): 309-316.
- [24] 任大勇, 宫圣洁, 周亭亭, 等. 朝鲜族辣白菜中益生性乳酸菌的筛选及其功能特性[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(7): 76-82.
- REN D Y, GONG S J, ZHOU T T, et al. Screening and functional characteristics of *Lactobacillus* from spicy cabbage[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2018, 18(7): 76-82.
- [25] 王惋, 卢佳音, 焦月华, 等. 东北酸菜中乳酸菌的

- 分离鉴定与耐酸性菌株的筛选[J]. 食品科学, 2019, 40(10): 99–105.
- WANG W, LU J Y, JIAO Y H, et al. Isolation, identification and screening of acid tolerant lactic acid bacteria from Chinese Sauerkraut[J]. Food Science, 2019, 40(10): 99–105.
- [26] MENG J, YANG Q, WAN W Y, et al. Physico-chemical properties and adaptability of amine-producing *Enterobacteriaceae* isolated from traditional Chinese fermented fish (Suanyu)[J]. Food Chemistry, 2022, 369: 130885.
- [27] SUJIT D, BIRENDRA K M, SUBROTA H. Techno-functional characterization of indigenous *Lactobacillus* isolates from the traditional fermented foods of Meghalaya, India[J]. Current Research in Food Science, 2020, 3: 9–18.
- [28] 胡斌, 田丰伟, 张灏, 等. 植物乳杆菌脂肪酸构成与胆盐耐受性的相关性分析[J]. 中国食品学报, 2017, 17(9): 32–37.
- HU B, TIAN F W, ZHANG H, et al. Correlation analysis of the relationship between fatty acid composition and bile resistance in *Lactobacillus plantarum* strains[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(9): 32–37.
- [29] CHARTERIS W P, KELLY P M, MORELLI L, et al. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species[J]. Journal of Food Protection, 1998, 61(12): 1636–1643.
- [30] BLANDINO G, MILAZZO I, FAZIO D. Antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products available in Italy[J]. Microbial Ecology in Health and Disease, 2008, 20(4): 199–203.
- [31] KASTNER S, PERRETEN V, BLEULER H, et al. Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria used in food[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2006, 29(2): 145–155.
- [32] 许女, 李雅茹, 王超宇, 等. 传统发酵食品中乳酸菌的抗生素耐药性评估及耐药基因分析[J]. 中国食品学报, 2020, 20(7): 160–171.
- XU N, LI Y R, WANG C Y, et al. Antimicrobial resistance evaluation and resistant gene profiles of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(7): 160–171.
- [33] SUN Y W, ZHANG S Y, LI H, et al. Assessments of probiotic potentials of *Lactiplantibacillus plantarum* strains isolated from Chinese traditional fermented food: Phenotypic and genomic analysis[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 895132.
- [34] 白慧慧. 母乳婴儿源益生菌筛选鉴定及其潜在益生特性研究[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2022: 40.
- BAI H H. Screening and identification of breast-feeding probiotics and their potential probiotics[D]. Lanzhou: Lanzhou University of Technology, 2022: 40.
- [35] RATHOD N B, PHADKE G G, TABANELLI G, et al. Recent advances in bio-preservatives impacts of lactic acid bacteria and their metabolites on aquatic food products[J]. Food Bioscience, 2021, 44(B): 101440.

### Isolation, Screening and Phenotypic Analysis of Lactic Acid Bacteria from Traditional Fermented Suanyu

Sun Haixin<sup>1</sup>, Li Zhiyong<sup>2</sup>, Chen Zhihui<sup>3</sup>, Zhao Xinqiang<sup>1</sup>, Kang Chunyu<sup>1</sup>, Sun Jilu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei

<sup>2</sup>Office of the State Assets Committee, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050024

<sup>3</sup>Department of Food Technology, Qujing Agricultural School of Yunnan, Qujing 655000, Yunnan)

**Abstract** In order to screen lactic acid bacteria with good fermentation and probiotic properties from traditionally fermented Suanyu. The diversity of bacteria in Suanyu from 2 production areas was examined through high throughput sequencing technology. Lactic acid bacteria were screened by transparent circle method, and identified by physiological and biochemical experiments and 16S rDNA sequence analysis. The fermentation properties (acid production rate, acid tolerance, salt tolerance, amino acid decarboxylase activities) and probiotic properties (bile salt tolerance, hydrophobicity,

auto-aggregation, antibiotic sensitivity, antibacterial activity) of the obtained strains were systematically analyzed. Results showed that *Lactobacillus*, *Tetragenococcus* and *Weissella* were the dominant bacteria in Suanyu, and three relative abundances were 40.73%, 34.27% and 6.42%, respectively. 24 strains of lactic acid bacteria were screened, including 13 strains of *Lactiplantibacillus plantarum*, 1 strain of *L. futsaii*, 2 strains of *Companilactobacillus futsaii*, 3 strains of *Companilactobacillus alimentarius*, 3 strains of *Enterococcus faecium*, 1 strain of *Enterococcus faecalis* and 1 strain of *Pediococcus pentosaceus*. Among them, *L. futsaii* and *C. futsaii* were isolated from Suanyu for the first time. Significant differences in phenotypic characteristics of 24 strains of lactic acid bacteria. Among them, *L. plantarum* S18, S21 and *C. futsaii* S20 have good fermentation properties, and strains S18 and S21 also have good probiotic properties. Strains S18, S20 and S21 have the potential to be used as starters of Suanyu.

**Keywords** Suanyu; lactic acid bacteria; isolation; identification; fermentation properties; probiotic properties