

1 株具抑菌和抗氧化活性乳酸菌的筛选及鉴定

张香美, 赵玉星, 闫晓晶, 崔娜

(河北经贸大学生物科学与工程学院, 河北 石家庄 050061)

摘要: 从市售酸泡菜中分离纯化乳酸菌, 以植物乳杆菌PL2、大肠杆菌As1.184等为指示菌筛选具有抑菌活性的乳酸菌; 以对1,1-二苯基-2-苦基肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除率为指标, 进一步筛选高抗氧化活性菌株。结果表明: 从市售酸泡菜中分离筛选出8株兼具抑菌活性和抗氧化活性的乳酸菌菌株, 其中菌株b-2的抑菌活性和抗氧化活性最强, 根据生理、生化和分子生物学特征将其鉴定为植物乳杆菌。抗氧化活性测定结果显示, 该菌株的无细胞提取物对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率最高, 为67.6%; 其完整细胞对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除活性最强, 清除率为62.8%; 其无细胞发酵上清液对DPPH自由基清除率高达91.3%。植物乳杆菌b-2具有较好的抑菌能力和抗氧化能力, 作为功能性乳酸菌发酵剂, 具有十分重要的开发潜力。

关键词: 抗氧化; 抑菌; 乳酸菌; 筛选; 鉴定

Screening and Identification of Lactic Acid Bacterium with Antimicrobial and Antioxidant Activity

ZHANG Xiangmei, ZHAO Yuxing, YAN Xiaojing, CUI Na

(College of Biology Science and Engineering, Hebei University of Economics and Business, Shijiazhuang 050061, China)

Abstract: In this study, lactic acid bacteria were isolated from pickle samples. All the isolates were primarily screened for their antimicrobial activity against six indicator strains such as *Lactobacillus plantarum* PL2 and *Escherichia coli* As1.184. Then the scavenging activities against hydroxyl radicals, superoxide anion and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radicals were measured to evaluate antioxidant activity of the isolates with antimicrobial activity. The results showed that eight strains with both antimicrobial and antioxidant activity were screened from pickles. The highest levels of antimicrobial activity and antioxidant activity were recorded in strain b-2, which was identified as *L. plantarum* by its physiological, biochemical and molecular characteristics. According to the results of antioxidant activity, the cell-free extract of b-2 showed the highest hydroxyl radical-scavenging activity, which scavenged 67.6% hydroxyl radical, while the intact cells exhibited the highest superoxide anion-scavenging activity, which scavenge 62.8% superoxide anion radical, and the highest DPPH radical-scavenging activity was seen in the cell-free supernatant, which scavenged 91.3% DPPH radical. To conclude, *L. plantarum* b-2 has good bacteriostatic ability and antioxidant capacity, and holds great potential as a functional lactic acid bacterial starter.

Keywords: antioxidant activity; antimicrobial; lactic acid bacteria; screening; identification

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201802015

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2018)02-0093-06

引文格式:

张香美, 赵玉星, 闫晓晶, 等. 1株具抑菌和抗氧化活性乳酸菌的筛选及鉴定[J]. 食品科学, 2018, 39(2): 93-98.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201802015. <http://www.spkx.net.cn>

ZHANG Xiangmei, ZHAO Yuxing, YAN Xiaojing, et al. Screening and identification of lactic acid bacterium with antimicrobial and antioxidant activity[J]. Food Science, 2018, 39(2): 93-98. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201802015. <http://www.spkx.net.cn>

乳酸菌发酵剂广泛应用于酸奶、泡菜、发酵肉等的生产。具有抑菌能力的乳酸菌发酵剂可以更好地控制发酵过程, 提高食品安全性, 引起国内外研究者的广泛关

注^[1-2]。近年来, 一些研究发现, 某些乳酸菌菌株具有抗氧化、抗衰老等重要生物学功能^[3-6], 在保障食品质量、提高食品品质方面具有重要作用, 是开发功能性乳酸菌

收稿日期: 2017-02-10

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31471707); 河北省高等学校科学技术研究项目(ZD20131091);

河北经贸大学2016年度大学生创新训练计划项目(201611832041)

第一作者简介: 张香美(1972—), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品微生物。E-mail: zxm_bio@126.com

发酵剂的重要资源。功能性乳酸菌发酵剂在食品发酵工业中的应用潜力巨大^[7-10]。开发同时具有抑菌和抗氧化功能的乳酸菌发酵剂对于提高食品安全和质量具有重要价值。

具有多重功能的乳酸菌的筛选已成为微生物发酵剂研究的新趋势。Arasu等^[11]从传统泡菜中分离到1株短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*) P68, 该菌株具有抗真菌和抗氧化活性, 并具有益生特性。Mikelsaar等^[12]报道了1株具有抑菌和抗氧化双重功能的发酵乳杆菌(*L. fermentum*) ME-3, 该菌株可以增加血清的抗氧化能力并具有显著的抗动脉粥样硬化作用, 其产品已在波罗的海国家和芬兰成功上市销售, 但国内尚鲜见相关的报道。本研究拟从发酵泡菜样品中分离筛选具有抑菌和抗氧化双重活性的乳酸菌菌株, 为乳酸菌功能食品的开发和生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

市售酸菜(阿花酸菜、康师傅老坛酸菜包、雅园菜业四阿哥重庆鱼酸菜)。

植物乳杆菌PL2为中国农业大学食品与营养工程学院李平兰教授赠送; 大肠杆菌As1.184、铜绿假单胞菌P1、普通变形杆菌、蜡样芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌As1.72均来自河北经贸大学微生物实验室。

细菌基因组DNA提取试剂盒(离心柱型) 生工生物工程(上海)股份有限公司; 胶回收试剂盒、2×Taq聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR) StarMix 北京康润诚业生物科技有限公司; 生化鉴定试剂盒 北京陆桥技术有限责任公司; pEASY-T3 Cloning Kit、Trans1-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell 北京全式金生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

759CKT紫外-可见分光光度计 上海菁华科技仪器有限公司; CX41-32L02型光学显微镜 日本Olympus公司; Veriti 96 Well Thermal Cycler 美国ABI公司。

1.3 方法

1.3.1 乳酸菌分离纯化

称取样品25 g, 加入到225 mL的无菌生理盐水中, 振荡均匀, 用无菌生理盐水10倍稀释, 选择3个适宜稀释度, 分别取200 μL稀释液涂布于MRS(含0.5%碳酸钙)培养基平板上, 37℃培养24~48 h。挑取具有溶钙圈的单菌落, 反复多次划线直至获得纯培养。

1.3.2 产细菌素乳酸菌的筛选

1.3.2.1 初筛

将纯化的乳酸菌菌株, 以1%的接种量(终浓度为10⁷ CFU/mL)接种于MRS液体培养基中, 37℃培养24 h, 10 000×g离心5 min, 取上清液, 经0.22 μm

微孔滤膜过滤器过滤, 即为无细胞上清液(cell-free supernatants, CFS), 以植物乳杆菌PL2为指示菌, 采用杯碟方法测定该CFS的抑菌活性^[13]。

1.3.2.2 复筛

将初筛获得的抑菌效果好的乳酸菌菌株, 按1.3.2.1节方法制备无细胞发酵上清液, 参照张旭等^[14]方法制备抑菌物质粗提物。以植物乳杆菌PL2、大肠杆菌As1.184、铜绿假单胞菌P1、普通变形杆菌、蜡样芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌As1.72为指示菌。植物乳杆菌PL2用MRS培养基培养, 其他指示菌用LB培养基培养。用无菌生理盐水将活化好的各指示菌活菌数调整为10⁶ CFU/mL, 采用杯碟方法测定各菌株抑菌物质粗提物的抑菌活性, 对菌株进行复筛。

1.3.3 具有抗氧化活性乳酸菌的筛选及抗氧化活性测定

将经上述步骤筛选到的具有抑菌活性的乳酸菌菌株, 接种于MRS液体培养基中, 37℃培养24 h, 10 000×g离心5 min, 分别收集上清液和菌体沉淀。CFS的制备参照1.3.2.1节方法。将菌体沉淀用无菌水洗涤2次, 重悬菌体细胞, 调整菌体浓度为10⁹ CFU/mL。将所得菌悬液分为两组, 一组用作完整细胞(intact cells, IC), 另一组用超声冰浴破碎, 镜检没有完整菌体后, 在4℃条件下10 000×g离心10 min, 收集上清液即为无细胞提取物(cell free extracts, CFE)。

1,1-二苯基-2-苦基肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基清除率的测定参考文献[4,15]的方法。取1 mL样品, 加入浓度为0.2 mmol/L的DPPH无水乙醇溶液2 mL, 混匀后在室温下避光反应30 min, 并在10 000 r/min离心1 min, 取上清液在517 nm波长处测定吸光度。空白组以等体积无水乙醇代替DPPH溶液, 对照组以等体积蒸馏水代替样品溶液。DPPH自由基清除率计算见式(1):

$$\text{DPPH自由基清除率}/\% = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100 \quad (1)$$

式中: A_0 为对照组吸光度; A_i 为样品组吸光度; A_j 为空白组吸光度。

羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除率的测定参照文献[16]的方法, 稍加改进。取邻菲罗啉(0.75 mmol/L) 1 mL于试管中, 依次加入PBS(pH 7.4) 2 mL, 蒸馏水1 mL, 充分混匀后, 加入FeSO₄溶液(2.5 mmol/L) 1 mL, 混匀加H₂O₂(质量分数为0.12%) 1 mL, 在37℃水浴1.5 h后在536 nm波长处测定其吸光度 A_p ; 用1 mL蒸馏水代替1 mL H₂O₂测定其吸光度 A_b ; 用1 mL样品代替1 mL的蒸馏水测定其吸光度 A_s 。 $\cdot\text{OH}$ 清除率计算见式(2):

$$\cdot\text{OH清除率}/\% = \frac{A_s - A_p}{A_b - A_p} \times 100 \quad (2)$$

超氧阴离子自由基 ($O_2^- \cdot$) 清除率的测定参考文献[17-18]的方法, 略有改进。取3 mL 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.2) 于试管中, 依次加入1 mL 3 mmol/L二乙三胺五乙酸、1 mL 1.2 mmol/L邻苯三酚, 充分混匀, 加入0.5 mL所测样品, 混匀。于25 °C反应10 min后, 在325 nm波长处测吸光度。 $O_2^- \cdot$ 清除率计算见式(3):

$$O_2^- \cdot \text{清除率}/\% = (1 - \frac{A_{11} - A_{10}}{A_{01} - A_{00}}) \times 100 \quad (3)$$

式中: A_{00} 为不含样品和邻苯三酚吸光度; A_{01} 为不含样品、含邻苯三酚吸光度; A_{10} 为含样品、不含邻苯三酚吸光度; A_{11} 为含样品和邻苯三酚吸光度。

以上抗氧化活性测定, 每个样品设3个重复, 取平均值。

1.3.4 菌株的鉴定

1.3.4.1 形态学鉴定

挑取少量的目标菌株于MRS固体培养基平板上划线, 37 °C培养24 h观察菌落形态, 并进行革兰氏染色, 观察个体形态。

1.3.4.2 生理生化鉴定

采用生化鉴定试剂盒进行糖醇发酵实验, 参照《常见细菌系统鉴定手册》^[19]对菌株进行初步鉴定。

1.3.4.3 16S rDNA鉴定

采用TIANamp Bacteria DNA kit (天根生化科技(北京)有限公司)提取基因组DNA。以菌株的基因组DNA为模板, 采用通用引物序列LPW57: 5'-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; LPW205: 5'-CTTGTACGACTTCACCC-3'进行PCR扩增。PCR体系及反应条件参见文献[20]。将PCR产物进行电泳检测, 回收纯化目的片段, 连接pEASY-T3载体, 转化大肠杆菌Trans1-T1感受态细胞。将经菌落PCR鉴定正确的重组子送交生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将PCR产物序列测定结果用BLAST软件与GenBank中已知的16S rDNA序列进行同源性比较。从GenBank中选择近缘菌株的16S rDNA基因序列, 用MEGA 6.06软件构建系统发育树。

1.3.4.4 基于recA基因的PCR鉴定

以菌株总基因组DNA为模板, 参照Torriani等^[21]方法进行多重PCR扩增recA基因, 以植物乳杆菌PL2和类植物乳杆菌L-ZS9基因组DNA为模板作对照。将PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的分离

从3种市售酸菜中共分离纯化到83株溶钙圈较大的菌株, 编号为a-1、a-2……a-27, b-1、b-2……b-28, c-1、c-2……c-28。具有溶钙圈菌落见图1。

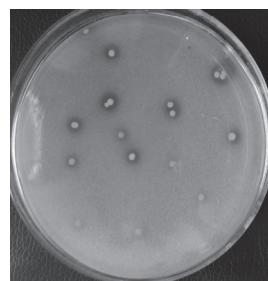


图1 具有溶钙圈菌落图

Fig. 1 Colonies with dissolving calcium carbonate ring

2.2 具有抑菌活性乳酸菌的筛选

以植物乳杆菌PL2为指示菌, 经过初筛共获得具有抑菌活性的乳酸菌18株; 进一步以植物乳杆菌PL2、大肠杆菌As1.184等为指示菌复筛, 得到8株对供试指示菌均呈抑菌活性的乳酸菌菌株, 分别为a-1、b-1、b-2、b-4、b-5、b-6、c-3、c-4, 各菌株对指示菌的抑菌效果见表1, 其中菌株b-2、c-3对供试菌抑菌效果最佳。

表1 各菌株对指示菌的抑菌效果

Table 1 Inhibitory effect of 8 isolates against indicator bacteria

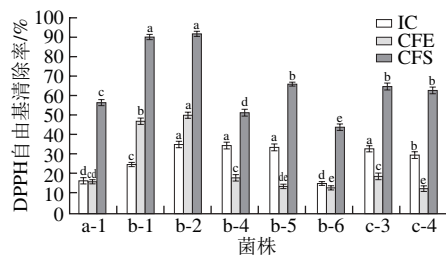
指示菌	菌株	抑菌圈直径/mm	菌株	抑菌圈直径/mm
植物乳杆菌PL2	a-1	15.03±0.11	b-5	21.08±0.18
	b-1	21.23±0.12	b-6	20.01±0.11
	b-2	25.01±0.13	c-3	23.04±0.12
	b-4	22.08±0.12	c-4	22.01±0.14
大肠杆菌As1.184	a-1	15.92±0.15	b-5	14.06±0.13
	b-1	11.50±0.18	b-6	15.53±0.12
	b-2	18.30±0.11	c-3	18.23±0.14
	b-4	12.05±0.12	c-4	15.55±0.11
金黄色葡萄球菌As1.72	a-1	14.26±0.13	b-5	12.30±0.19
	b-1	14.06±0.15	b-6	11.70±0.17
	b-2	15.52±0.12	c-3	15.58±0.11
	b-4	12.08±0.11	c-4	14.43±0.12
铜绿假单胞菌P1	a-1	16.50±0.13	b-5	12.90±0.16
	b-1	13.01±0.17	b-6	15.49±0.11
	b-2	18.00±0.12	c-3	16.40±0.12
	b-4	10.00±0.10	c-4	15.51±0.15
普通变形杆菌	a-1	11.00±0.13	b-5	10.20±0.13
	b-1	10.09±0.11	b-6	12.09±0.13
	b-2	13.01±0.11	c-3	13.04±0.12
	b-4	9.30±0.18	c-4	9.20±0.17
蜡样芽孢杆菌	a-1	11.59±0.01	b-5	12.00±0.09
	b-1	12.00±0.13	b-6	9.08±0.01
	b-2	15.98±0.01	c-3	20.01±0.11
	b-4	9.30±0.04	c-4	10.02±0.10

2.3 具有抗氧化活性乳酸菌的筛选

2.3.1 DPPH自由基清除率测定结果

由图2可知, 本实验筛选出的8株乳酸菌菌株的IC、CFE、CFS组均具有不同程度的DPPH自由基清除能力。IC组DPPH自由基清除能力强的菌株为b-2、b-4、b-5、c-3; CFE组DPPH自由基清除率高的菌株有b-2、b-1;

CFS组DPPH自由基清除能力强的菌株为b-2、b-1。从总体看,菌株b-2对DPPH自由基清除能力最强,其CFS处理组对DPPH自由基清除率可达91.3%,其IC组和CFE组对DPPH自由基清除率分别为34.8%和50%。菌株b-1对DPPH自由基清除能力次之。不同菌株CFS组的DPPH自由基清除能力均远远高于其IC组和CFE组,说明各菌株的DPPH自由基清除能力很可能主要存在于胞外代谢产物中,而其IC和CFE也可起到一定的DPPH自由基清除作用。



同一处理的不同小写字母表示处理内的差异显著 ($P<0.05$), 下同。

图2 各菌株对DPPH自由基的清除效果

Fig. 2 DPPH radical-scavenging ability of 8 screened strains

2.3.2 $\cdot\text{OH}$ 清除率测定结果

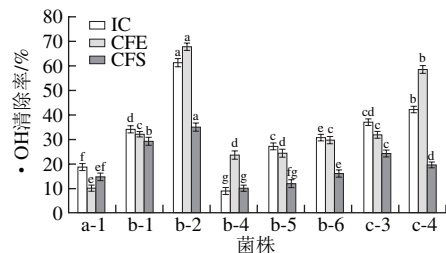


图3 各菌株对 $\cdot\text{OH}$ 的清除效果

Fig. 3 Hydroxyl radical-scavenging ability of 8 screened strains

由图3可知, b-2菌株对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率最高, 其次是c-4菌株。b-2菌株的CFE组对 $\cdot\text{OH}$ 清除率(67.6%)远超出其他菌株。IC组中, b-2菌株对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率最高, 为60.9%; 其次是c-4菌株, 为42.2%。CFS组中, b-2对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率最高, 为34.8%; 其次为b-1, $\cdot\text{OH}$ 清除率为29.2%。从总体看, 不同处理对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力有很大差异, b-2及c-4菌株CFE、IC组的 $\cdot\text{OH}$ 清除能力高于CFS组, 说明这两株菌的 $\cdot\text{OH}$ 清除活性成分主要存在于其胞内成分和完整菌体中。

2.3.3 O_2^- 清除率测定结果

从图4可以看出, 供试8株菌的不同处理组均具有 O_2^- 清除能力。IC组 O_2^- 清除率较高的菌株依次为b-2、c-3、b-5; CFE组 O_2^- 清除能力强的菌株依次为b-2、a-1、b-4; CFS组中 O_2^- 清除能力强的菌株依次为c-3、c-4。不同菌株对 O_2^- 的清除能力有很大差异, b-2菌株的IC组对 O_2^- 的清除率最高(62.8%), CFE组次之(45.9%), 但其CFS组对 O_2^- 清除率较低; c-3菌株

的 O_2^- 清除效果也较为显著, 其CFS组对 O_2^- 的清除率高达66.5%, IC组对 O_2^- 的清除率仅次于b-2菌株, 但其CFE组对 O_2^- 清除率最差, 仅为14.7%。菌株b-2、a-1、b-4的IC组和CFE组对 O_2^- 的清除能力比其CFS组强, 说明这几株菌清除 O_2^- 的活性物质大部分存在于完整菌体和胞内。

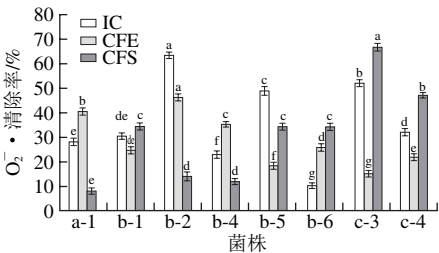


图4 各菌株对 O_2^- 的清除效果

Fig. 4 Superoxide anion radical-scavenging ability of 8 selected strains

综合抑菌性能和抗氧化性能测定结果, 选择b-2菌株进行后续实验。

2.4 菌株鉴定结果

2.4.1 形态及生理生化鉴定结果

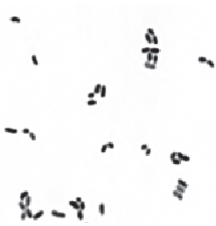


图5 菌株b-2形态

Fig. 5 Morphology of strain b-2

菌株b-2呈乳白色圆形菌落, 直径1~2 mm, 表面光滑凸起; 菌株b-2为革兰氏阳性直的或弯的短杆菌, 单个、成对或成短链状, 无鞭毛, 无芽孢, 兼性厌氧。菌株b-2个体形态见图5。该菌株触酶实验阴性、硝酸盐还原试验阴性、不液化明胶、不产生硫化氢气体、吲哚实验阴性、无运动性, 结果见表2。根据以上结果, 对照《常见细菌系统鉴定手册》初步将b-2菌株鉴定为乳杆菌属细菌。

表2 b-2菌株生理生化鉴定结果

Table 2 Physiological and biochemical identification of strain b-2

实验项目	结果	实验项目	结果
葡萄糖	+	乳糖	+
麦芽糖	+	蔗糖	+
棉子糖	+	木糖	+
蜜二糖	+	果糖	+
甘露糖	+	阿拉伯糖	+
纤维二糖	+	山梨醇	+
半乳糖	+	甘露醇	+
鼠李糖	-	核糖	+
从Arg ⁺ 中NH ₃	-	H ₂ O ₂ 酶实验	-
V-P实验	+	产H ₂ S实验	-
明胶液化	-	硝酸盐还原	-

注: +.阳性; -.阴性。

2.4.2 分子生物学鉴定结果

经连接pEASY-T3载体测序, 得到长度为1 520 bp的b-2菌株16S rDNA序列 (GenBank accession No. SUB2181920 Strain KY357305)。用BLAST进行序列同源性比对, 并利用MEGA 6.06构建系统发育树, 结果见图6。由系统发育树可知, b-2菌株与植物乳杆菌处于同一个小分支, 亲缘关系最近, 这与形态及生化鉴定结果一致, 由此可以进一步将b-2菌株归属于植物乳杆菌 (*L. plantarum*)。

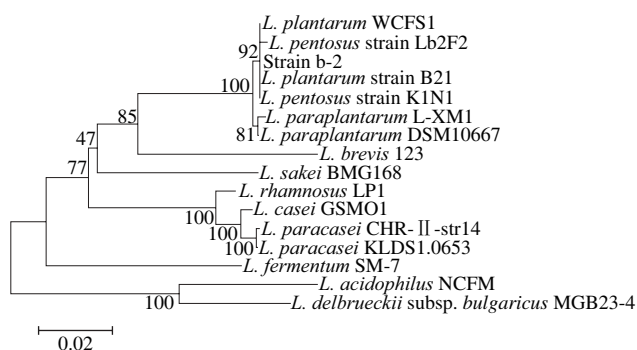
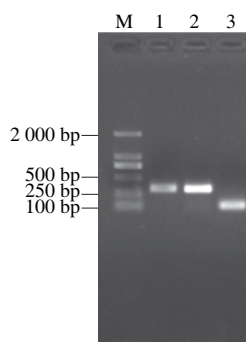


图6 菌株b-2基于16S rDNA系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree of strain b-2 based on 16S rDNA gene sequences

以b-2菌株基因组DNA为模板, 经多重PCR扩增 *recA* 基因, 获得约与植物乳杆菌PL2 *recA* 基因PCR产物 (318 bp) 处于同一位置的条带 (图7), 而对照菌株类植物乳杆菌 L-ZS9的PCR产物 (107 bp) 也与预期结果一致。综合以上实验结果, 将b-2菌株鉴定为植物乳杆菌。



M. BM2000 Marker; 1. 植物乳杆菌PL2 *recA* 基因;
2. 菌株b-2 *recA* 基因; 3. 类植物乳杆菌L-ZS9 *recA* 基因。

图7 *recA* 基因PCR扩增结果

Fig. 7 Electrophoresis of PCR amplified *recA*

3 讨论

功能性乳酸菌发酵剂在改善食品的品质和风味、增加食品的营养保健功效、提高食品的安全性、延长食品的货架期等方面具有独特的优势^[22-25], 在发酵工业中应用

潜力巨大, 从传统发酵食品中分离功能性乳酸菌已经成为新的研究热点。

报道显示^[26], 许多乳酸菌, 如嗜酸乳杆菌 (*L. acidophilus*)、噬淀粉乳杆菌 (*L. amylovorus*)、短乳杆菌 (*L. brevis*)、棒状乳杆菌 (*L. coryniformis*)、瑞士乳杆菌 (*L. helveticus*)、植物乳杆菌 (*L. plantarum*) 以及罗伊氏乳杆菌 (*L. reuteri*)、发酵乳杆菌 (*L. fermentum*) 等均具有抗氧化活性, 但同时具有抑菌活性的菌株则仅见短乳杆菌P68和发酵乳杆菌ME-3。具有抗菌和抗氧化双重功能的乳酸菌的在食品工业中具有非常重要的价值, 因为它们在作为发酵剂的同时还具有抑菌防腐及抗氧化功能, 一方面可以稳定产品质量, 提高食品安全性, 另一方面, 又可赋予食品营养保健功能, 在取代食品添加剂方面具有潜在优势。

本课题组分离到的菌株b-2对供试的大肠杆菌、铜绿假单胞菌、蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌等均具有较强抑菌效果, 其CFE对 $\cdot\text{OH}$ 清除率为67.6%, 其IC对 O_2^- 的清除率为62.8%; 其CFS对DPPH自由基清除率则高达91.3%, 在同类特性菌株中具有显著优势, 在食品、生物发酵等领域具有重要的价值, 应用潜力巨大。菌株b-2的体内抗氧化效果还有待于进一步测定。

DPPH自由基、 O_2^- 及 $\cdot\text{OH}$ 清除率是评价抗氧化性能的重要指标, 在一定程度上反映菌株的抗氧化能力^[27-29]。本研究结果表明, a-1、b-1、b-2、b-4、b-5、b-6、c-3、c-4菌株对DPPH自由基、 O_2^- 及 $\cdot\text{OH}$ 都有不同程度的清除能力。综合考虑这8株菌的抗氧化活性, 菌株b-2相对较好, 经鉴定其为植物乳杆菌, 可作为新资源食品进一步开发。a-1、b-1、b-2、b-4、b-5、b-6、c-3、c-4菌株的IC、CFE及CFS对DPPH自由基、 $\cdot\text{OH}$ 、 O_2^- 3种自由基的清除能力互有大小, 这与以往报道^[15-16]一致, 这可能与菌株本身的特性有关。

研究发现菌株b-2的IC、CFE及CFS对DPPH自由基、 O_2^- 、 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力存在较大差异, 这可能是因为不同的抗氧化活性成分存在于不同处理组中; 也可能与不同自由基的清除机理各不相同有关, 吴祖芳等^[30]认为乳酸菌的抗氧化性能可能是因其不同且相对独立的抗氧化机制所致。菌株b-2的DPPH自由基清除活性主要存在于其胞外代谢产物中, 其 $\cdot\text{OH}$ 清除活性成分主要存在于胞内成分和菌体中, 其清除 O_2^- 的活性物质主要存在于完整菌体, 菌株b-2的抗氧化活性成分及其抗氧化机理还有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] O'SULLIVAN L, ROSS R P, HILL C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality[J]. Biochimie, 2002, 84(5): 593-604. DOI:10.1016/S0300-9084(02)01457-8.

- [2] SWETWIWATHANA A, VISESSANGUAN W. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for safety improvements of traditional Thai fermented meat and human health[J]. Meat Science, 2015, 109: 101-105. DOI:10.1016/j.meatsci.2015.05.030.
- [3] GHANY E, ABD K, ELHAFEZ E A, et al. Evaluation of antioxidant and antitumor activities of *Lactobacillus acidophilus* bacteria isolated from Egyptian infants[J]. International Journal of Pharmacology, 2014, 10(5): 282-288. DOI:10.3923/ijp.2014.282.288.
- [4] LI S, ZHAO Y, ZHANG L, et al. Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods[J]. Food Chemistry, 2012, 135(3): 1914-1919. DOI:10.1016/j.foodchem.2012.06.048.
- [5] JI K, JANG N Y, KIM Y T. Isolation of lactic acid bacteria showing antioxidative and probiotic activities from Kimchi and infant feces[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 25(9): 1568-1577. DOI:10.4014/jmb.1501.01077.
- [6] CHEN Q, KONG B, SUN Q, et al. Antioxidant potential of a unique LAB culture isolated from Harbin dry sausage: *in vitro* and in a sausage model[J]. Meat Science, 2015, 110: 180-188. DOI:10.1016/j.meatsci.2015.07.021.
- [7] 李元莉, 吕欣, 陈晓红, 等. 功能性乳酸菌发酵剂在食品发酵工业中的应用[J]. 中国乳品工业, 2006, 34(1): 35-38.
- [8] LEROY F, DE VUYST L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry[J]. Trends in Food Science & Technology, 2004, 15(2): 67-78. DOI:10.1016/j.tifs.2003.09.004.
- [9] RUBIO R, JOFRÉ A, MARTARTÍN B, et al. Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages[J]. Food Microbiology, 2014, 38: 303-311. DOI:10.1016/j.fm.2013.07.015.
- [10] WATERS D M, MAUCH A, COFFEY A, et al. Lactic acid bacteria as a cell factory for the delivery of functional biomolecules and ingredients in cereal-based beverages: a review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2015, 55(4): 503-520. DOI:10.1080/10408398.2012.660251.
- [11] ARASU M V, AL-DHABI N A, REJINIEMON T S, et al. Identification and characterization of *Lactobacillus brevis* P68 with antifungal, antioxidant and probiotic functional properties[J]. Indian Journal of Microbiology, 2015, 55(1): 19-28. DOI:10.1007/s12088-014-0495-3.
- [12] MIKELSAAR M, ZILMER M. *Lactobacillus fermentum* ME-3-an antimicrobial and antioxidative probiotic[J]. Microbial Ecology in Health and Disease, 2009, 21(1): 1-27. DOI:10.1080/08910600902815561.
- [13] MAYR-HARTING A, HEDGES A J, BERKELEY R C W. Methods for studying bacteriocins[M]. New York: Academic Press, 1972: 315-342.
- [14] 张旭, 赵斌, 张香美, 等. 产细菌素乳酸菌的筛选及细菌素相关基因的分析[J]. 中国农业大学学报, 2013, 18(4): 168-177.
- [15] 张凤敏, 田丰伟, 陈卫, 等. 具抗氧化活性乳酸菌的筛选[J]. 中国乳品工业, 2007, 35(2): 4-7.
- [16] 张天博, 宁喜斌. 乳酸菌对自由基清除能力的研究[J]. 中国乳品工业, 2007, 35(4): 10-12.
- [17] 张江巍, 曹郁生, 李海星, 等. 乳酸菌抗氧化活性及检测方法[J]. 中国乳品工业, 2005, 33(9): 53-55.
- [18] ZHANG S, LIU L, SU Y, et al. Antioxidative activity of lactic acid bacteria in yogurt[J]. African Journal of Microbiology Research, 2011, 5(29): 5194-5201. DOI:10.5897/AJMR11.997.
- [19] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 292.
- [20] 张香美. 类植物乳杆菌L-XM1细菌素合成的群体感应调控机制研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2012: 20.
- [21] TORRIANI S, FELIS G E, DELLAGLIO F. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(8): 3450-3454. DOI:10.1128/AEM.67.8.3450-3454.2001.
- [22] PEYER L C, ZANNINI E, ARENDT E K. Lactic acid bacteria as sensory biomodulators for fermented cereal-based beverages[J]. Trends in Food Science & Technology, 2016, 54: 17-25. DOI:10.1016/j.tifs.2016.05.009.
- [23] 龙强, 聂乾忠, 刘成国. 发酵肉制品功能性发酵剂研究现状[J]. 食品科学, 2016, 37(17): 263-269. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201617044.
- [24] IRANMANESH M, EZZATPANAH H, MOJGANI N. Antibacterial activity and cholesterol assimilation of lactic acid bacteria isolated from traditional Iranian dairy products[J]. LWT-Food Science and Technology, 2014, 58(2): 355-359. DOI:10.1016/j.lwt.2013.10.005.
- [25] 梁小波, 王智能, 杨伟伟, 等. 抗氧化活性乳酸菌的分离鉴定及其在泡菜发酵中的应用[J]. 现代食品科技, 2016, 32(12): 225-233. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.12.035.
- [26] REJINIEMON T S, HUSSAIN R R, RAJAMANI B. *In vitro* functional properties of *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented ragi malt[J]. South Indian Journal of Biological Sciences, 2015, 1(1): 15-23. DOI:10.22205/sijbs/2015/v1/i1/100437.
- [27] 陈明, 柯文灿, 保安安, 等. 青藏高原牦牛酸奶中具高抗氧化能力乳酸菌的筛选[J]. 食品工业科技, 2016, 37(8): 201-205. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2016.08.033.
- [28] LAI Y J, TSAI S H, LEE M Y. Isolation of exopolysaccharide producing *Lactobacillus* strains from sorghum distillery residues pickled cabbage and their antioxidant properties[J]. Food Science and Biotechnology, 2014, 23(4): 1231-1236. DOI:10.1007/s10068-014-0168-3.
- [29] LIN M Y, CHANG F J. Antioxidative Effect of Intestinal Bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356[J]. Digestive Diseases and Sciences, 2000, 45(8): 1617. DOI:10.1023/A:1005577330695.
- [30] 吴祖芳, 洪松虎, 沈锡权, 等. 乳酸菌高抗氧化活性菌株的筛选及鉴定[J]. 中国食品学报, 2010, 10(1): 73-78. DOI:10.16429/j.1009-7848.2010.01.023.