

功能性乳酸菌的筛选、鉴定及抗氧化性能的初步评价

侯保朝¹, 陈丽娥¹, 陈 苏², 李 理¹, 姜毓君³, 李宝磊¹, 李言郡^{1,*}

(1. 杭州娃哈哈集团有限公司研究院生物工程研究所, 浙江杭州 310018;

2. 浙江工业大学药学院, 浙江杭州 310014;

3. 东北农业大学食品学院乳品科学教育部重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要:为开发功能性乳酸菌发酵剂,对成都地区的自然发酵酸菜进行采集,并分离其中的乳酸菌。经革兰氏染色和过氧化氢酶实验初步鉴定64株分离物均为乳酸杆菌。对64株乳酸杆菌耐酸、耐胆盐和耐H₂O₂的能力进行检测,筛选到了3株耐受性能较好的菌株。比较了3株乳酸菌菌体、发酵上清液和胞内提取物的抗氧化性能,发现发酵上清液的羟自由基和DPPH自由基的清除能力较好,且SC608的羟自由基清除能力明显高于其他两株($p < 0.05$)。对SC608的生长性能进行测定,发现该菌株在4 h时进入对数生长期,12 h时进入稳定期。API50并结合16S rDNA测序分析,鉴定菌株SC608为植物乳杆菌。上述结果显示,植物乳杆菌SC608是开发具有抗氧化功能的功能性乳酸菌发酵剂的理想材料。

关键词:乳酸菌,抗氧化,耐酸,耐胆盐,自由基

Screening, identification and antioxidation evaluation of functional lactic acid bacteria

HOU Bao-chao¹, CHEN Li-e¹, CHEN Su², LI Li¹, JIANG Yu-jun³, LI Bao-lei¹, LI Yan-jun^{1,*}

(1. Research Institute, Bioengineering Lab, Hangzhou Wahaha Group Co., Ltd., Hangzhou 310018, China;

2. College of Pharmacy, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China;

3. Key Lab of Dairy Science, Ministry of Education, College of Food Science and Engineering, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: To develop functional lactic acid bacteria (LAB) starters, natural fermentation Chinese cabbages in Chengdu were collected and LAB were isolated from the collected samples. 64 isolates were preliminarily identified as lactobacillus by gram staining and catalytic test. Three strains of lactobacillus were screened out with good acid, bile salt and H₂O₂ tolerance. The antioxidation activity of bacteria, fermentation supernatant and intracellular extract were determined, and the fermentation supernatant showed the best scavenging activity of hydroxyl radical and DPPH radical. The hydroxyl radical scavenging activity of SC608 was significant better than the other two strains ($p < 0.05$). The growth performance of SC608 was 4 h in logarithmic growth phase and 12 h in stable phase. API CHL and 16S rDNA fragment sequencing were used to identifying SC608 and the results indicated that SC608 was a strain of *Lactobacillus plantarum*. To sum up, the *Lactobacillus plantarum* SC608 was an ideal strain to develop LAB starter with potential antioxidative activity.

Key words: lactic acid bacteria; antioxidants; acid resistance; bile salt resistance; free radicals

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)24-0145-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.24.023

发酵剂是生产发酵制品的基础,乳酸菌由于其快速产酸性能和普遍认可的安全性被广泛地使用在发酵食品中。近年来,消费者越来越关注食品和健康之间的关系,推动具有益生功能的发酵食品快速增长。这些功能性发酵制品中的乳酸菌菌株一般具有

良好的发酵特性和加工性能,不仅能够耐受人体胃肠道消化,还具有调节血压、改善肠道机能、抗氧化等多种益生功能^[1-2]。然而,目前我国使用的乳酸菌发酵剂主要依赖国外进口,这样不仅增加了产品的生产成本,同时也限制了相关产业的发展。因此开发具

收稿日期: 2015-07-21

作者简介: 侯保朝(1977-),男,博士,高级工程师,研究方向:食品微生物, E-mail: baochao.hou@wahaha.com。

* 通讯作者: 李言郡(1969-),男,硕士,高级工程师,研究方向:食品科学, E-mail: lyj@wahaha.com.cn。

基金项目: 浙江省重点技术创新团队平台项目; 国家高科技研究发展计划(2012BAD31B00); 国家自然科学基金(31171718)。

有良好耐受胃肠道消化同时兼具益生功能的具有自主知识产权的乳酸菌发酵剂,对于我国发酵制品产业的长足发展具有重要而深远的意义。

机体中的氧化代谢过程会产生多种形式的活性氧,当其超过机体的负荷量时就会出现氧化应激,造成氧化损伤^[3]。氧化损伤会增加人体患高血脂、粥样动脉硬化、糖尿病等疾病的风险,然而,通过摄入抗氧化补充剂或食物中天然的抗氧化成分能够有效的缓解氧化损伤,从而对上述疾病起到预防和辅助治疗的作用^[4]。乳酸菌的抗氧化功能一直备受关注,研究表明一些乳酸菌具有较好清除活性氧自由基的能力,例如:羟自由基、超氧阴离子自由基和1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)^[5]。本研究通过考察从成都的自然发酵酸菜中分离到的64株乳酸菌的消化道逆环境耐受能力以及自由基的清除能力,拟筛选出具有良好耐酸、耐胆盐且具有潜在抗氧化能力的乳酸菌。以期为进一步体内评价乳酸菌抗氧化功能提供菌株材料,同时为开发具有抗氧化功能的乳酸菌发酵剂及发酵食品提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

自然发酵酸菜汁 采自成都温江地区,不同农户自制发酵酸菜;改良的MRS液体培养基 5.0 g蛋白胨,5.0 g牛肉膏,5.0 g酵母粉,10.0 g胰蛋白胨,20.0 g葡萄糖,1 mL Tween-80,蒸馏水定容至1000 mL,调节pH至5.8,121 °C高压灭菌15 min;改良MRS固体培养基 在液体培养基中添加1.8%的琼脂;细菌/细胞总RNA提取试剂盒 北京天根生化科技有限公司;API50试剂盒 生物梅里埃中国有限公司;溶菌酶(40000 units/mg) Sigma生物试剂有限公司;过氧化氢、盐酸、氯化钠、牛胆盐、亮绿、硫酸亚铁 国产分析纯试剂。

7000 PCR扩增仪 美国Applied Bio Systems公司;UVP凝胶成像系统 美国UVP公司;DU800紫外分光光度计 美国Beckman公司;DYY-10C型电泳仪 北京市六一仪器厂;Delta320pH计 瑞士梅特勒-托利多有限公司;GL-21M高速冷冻离心机 上海市离心机械研究所;YQC-11型厌氧培养箱 上海海向仪器的设备厂;DNP-111 电热恒温培养箱 上海海向仪器的设备厂。

1.2 实验方法

1.2.1 样品采集 使用一次性无菌注射器吸取25份自然发酵酸泡菜汁,迅速放入已灭菌的容器内,密封并标号,放入低温保温箱中。采集后样品于4 °C冰箱保存备用。

1.2.2 乳酸菌的分离、纯化与保藏 无菌操作:1 mL样品接种于灭菌的生理盐水中进行梯度稀释。经稀释的样品接入MRS固体培养基中,分别置于普通培养箱和厌氧培养箱中,37 °C培养48~72 h。观察并记录菌落特征。

从平板上挑取具有典型乳酸菌特征的单菌落进行革兰氏染色,将G⁺菌株继续划线于MRS平板,直至确定为纯菌。将纯化的菌株再次进行革兰氏染色并

做H₂O₂酶实验。

经分离纯化的菌株的纯培养物接种于MRS液体培养基中,37 °C厌氧培养12 h,连续传代培养3次,加甘油作为保护剂,置于-80 °C冰箱冷冻保存。

1.2.3 乳酸菌耐受能力测定

1.2.3.1 耐酸能力的测定 经活化的菌株按3%(v/v)接种于pH分别为2.0、3.0、4.0、6.0和7.0的MRS液体培养基中,37 °C厌氧培养12 h。测各组培养物在600 nm处的吸光值,平行测量3次。以pH6.0时培养物的OD值为对照。

1.2.3.2 耐胆盐能力的测定 经活化的菌株按3%(v/v)接种于分别含有0%、0.3%、0.5%和1.0%牛胆盐的MRS液体培养基中,37 °C厌氧培养12 h。测各组培养物在600 nm处的吸光值,平行测量3次。以0%牛胆盐培养物的OD值为对照。

1.2.3.3 耐过氧化氢能力的测定 经活化的菌株按3%(v/v)接种于过氧化氢浓度分别为0.4、0.7和1.0 mmol/L的MRS液体培养基中,37 °C厌氧培养12 h。测各组培养物在600 nm处的吸光值,平行测量3次,观察其在不同浓度过氧化氢环境下菌体的生长情况。

1.2.4 乳酸菌不同组分抗氧化能力实验

1.2.4.1 样品制备 发酵上清液:经活化的菌株按3%(v/v)接种于MRS液体培养基中,37 °C厌氧培养12 h。4 °C,6000 r/min离心10 min,收集上清液。

菌悬液:离心后菌体经PBS缓冲液(pH=7.4)洗涤3次,4 °C,6000 r/min离心5 min。菌体重悬于PBS缓冲液中并调整菌体浓度为10⁹ CFU/mL。

胞内提取物:菌悬液冰浴超声破碎菌体细胞(功率400 W、处理5 s、间隔5 s、60次),4 °C,10000 r/min离心15 min,收集上清液。

1.2.4.2 羟自由基清除能力测定 对李茂昌等^[6]方法做适当改进:1 mL亮绿溶液(0.435 mmol/L)和1 mL三种样品充分混匀;再加入2 mL FeSO₄溶液(0.5 mmol/L)和1.5 mL H₂O₂溶液(3%, w/v),室温静止20 min后624 nm处测量反应液吸光值,记为A_s。其他条件不变,以等体积蒸馏水替换H₂O₂测量吸光值,记为A_b;以等体积蒸馏水替换样品测量吸光值,记为A_c。

羟自由基清除率(%)=(A_s-A_c)/(A_b-A_c)×100,其中,A_s为样品组吸光值;A_c为对照组吸光值;A_b为空白组吸光值。

1.2.4.3 DPPH自由基清除能力测定 无水乙醇配制0.2 mmol/L的DPPH溶液。1 mL DPPH溶液与1 mL三种样品充分混匀,避光室温反应30 min,6000 r/min离心10 min,取上清于517 nm处测定吸光值,记为A_s。以等体积无水乙醇替换DPPH溶液测量吸光值,记为A_b;以等体积蒸馏水替换样品测量吸光值,记为A_c。

DPPH自由基清除率(%)=[1-(A_s-A_b)/A_c]×100,其中,A_s为样品组吸光值;A_c为对照组吸光值;A_b为空白组吸光值。

1.2.5 抗氧化菌株的生长特征及鉴定

1.2.5.1 生长曲线测定 经活化的菌株按3%比例接种于MRS液体培养基中,每隔2 h取样,10倍梯度稀释,取10⁻⁶~10⁻⁹平板涂布,37 °C培养36 h后进行平板计

数。以时间为横坐标,活菌数为纵坐标建立生长曲线。同时监测培养基中葡萄糖及pH的变化情况。

1.2.5.2 生理生化鉴定 乳酸菌菌株的生理生化鉴定采用API 50 CHL标准系统进行,具体操作方法依据试剂盒说明书及Dilek等^[7]的报道,反应结果用API Lab软件进行分析。

1.2.5.3 16S rDNA鉴定 取适量对数生长期的菌株纯培养物,试剂盒法提取总菌体DNA。采用乳酸菌16S片段通用引物:正义链引物27F:5'-AGTCTCTGATCATGCCTCAG-3',反义链引物1492R:5'-AAGGAGGTGCTCCAGCC-3',按夏雪娟等^[8]的方法进行PCR扩增。PCR产物送至上海生工生物工程有限公司进行测序,将测序结果采用DNAMAN软件双向拼接后,结果通过NCBI网站(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)中的BLAST功能进行序列相似性比对分析。

1.2.6 统计分析 测定指标均表示为3次平行实验的平均值±标准偏差。显著性分析采用SPSS 17.0软件中的Duncan's多重比较检验法进行分析,显著水平设置为0.05。

2 结果与讨论

2.1 乳酸菌的分离鉴定

从25份自然发酵酸菜中分离到64株菌,革兰氏染色镜检均呈现阳性,H₂O₂酶实验均呈阴性,初步鉴定这64株杆状分离物为乳酸菌。革兰氏染色后镜下观察64株乳杆菌分离株的细胞形态不同,分别为长杆状或短杆状,大多单个呈现,如图1所示。

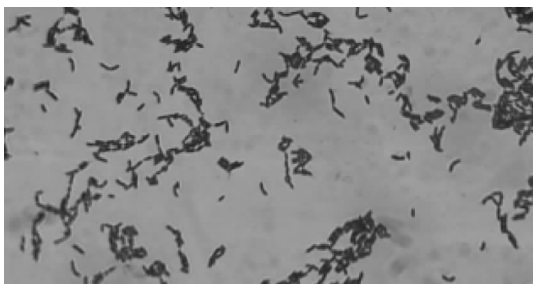


图1 乳酸杆菌革兰氏染色镜检形态图

Fig.1 Gram-staining pattern diagram of lactic acid bacilli

2.2 乳酸菌的耐酸能力

胃液环境是乳酸菌被机体摄入后首先经历的消化道逆环境,乳酸菌应需要具备良好的酸耐受能力,在较强的酸性环境下能够维持良好的生存能力。本研究考察了64株乳酸菌在不同pH条件下的生长情况,发现其中3株乳酸菌SC608、SC592和SC574对酸性环境的耐受能力较好,如图2所示。当pH为6.0时,乳酸菌的生存能力最高,且3株菌的生存能力无明显差异($p > 0.05$),随pH降低,菌体的生长能力逐渐减弱。以pH6.0为参照,pH为4.0时,3株乳酸菌的相对存活率分别为80.06%、65.74%和68.56%,且此时SC608的生存能力已明显高于另外两株乳酸菌($p < 0.05$)。当pH下降到3.0时,SC608的生存能力仍然明显高于另外两株乳酸菌($p < 0.05$)。pH继续下降到2.0时,3株乳酸菌的生存能力已下降到菌体未生长时的初始水

平,虽然SC608的存活率较高,但与其他两株菌的差异不显著($p > 0.05$)。正常人体胃液的pH在1.5~4.5之间波动变化,本实验结果显示,SC608在pH为3~4的条件下能够维持较高的存活率,说明该菌株具有一定的酸耐受能力。

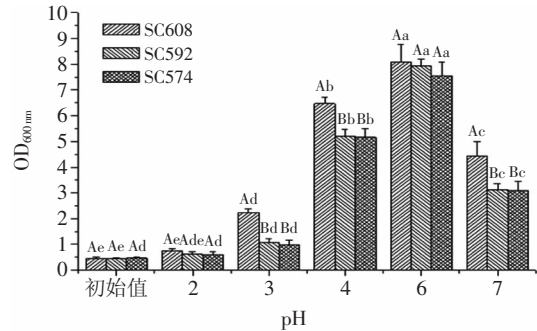


图2 三株乳酸菌在不同pH条件下的生长情况

Fig.2 The growth of three strains of lactic acid bacteria in different pH conditions

注:大写字母表示同一pH下不同菌株存活率显著性分析,小写字母表示同一菌株在不同pH下存活率显著性分析;相同字母表示差异不显著,不同字母表示差异显著($p < 0.05$);图3同。

2.3 乳酸菌的耐胆盐能力

SC608具有较好的酸耐受能力,经过胃液消化后能够保证一定数量的活菌顺利进入到肠道内。小肠中胆盐成分对乳酸菌有一定的降解能力,正常肠道中胆盐的质量分数在0.03%~0.3%之间波动变化,乳酸菌只有能够在此胆盐浓度下保持较高的生存能力才有可能最终在肠道内成功的定殖下来^[9]。本实验以SC608为主要研究对象,考察其在不同胆盐浓度条件的存活能力,并与SC592和SC574进行对比。

如图3所示,以胆盐质量分数为0%时为参照,当胆盐质量分数为0.3%时,3株乳酸菌的相对存活率分别为63.56%、56.87%和50.9%,SC608存活率显著($p < 0.05$)高于其他两菌。当胆盐质量分数升高到0.5%时,SC608的耐受胆盐能力显著高于其他两株乳酸菌($p < 0.05$),相对存活率仍然可以达到59.14%。胆盐质量分数继续升高至1%时,3株乳酸菌的存活能力均大幅度下降,但SC608的相对存活率仍明显高于其他两株菌($p < 0.05$)。目前,国际上虽然没有对乳酸菌耐

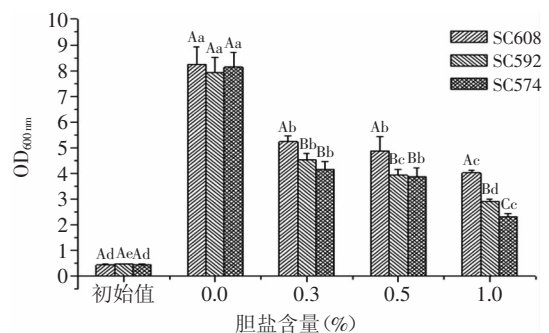


图3 三株乳酸菌在不同胆盐含量条件下的生长情况

Fig.3 The growth of three strains of lactic acid bacteria in different concentrations of bile salt

受胆盐的程度给出明确、科学的统一标准,但国内外一些相似研究的结果显示,若乳酸菌在胆盐质量分数为0.5%的条件下能够维持一定的存活率,就可以间接反映出菌株具备了较好的胆盐耐受能力^[10-11]。综合耐酸性研究结果,SC608具备了较好的耐酸、耐胆盐能力,是进行益生功能评价的良好菌株材料。

2.4 乳酸菌耐受H₂O₂能力

微生物细胞经适量低浓度的过氧化氢诱导后,菌体细胞会对氧化剂产生一定的适应能力。H₂O₂是一种弱氧化剂,但具有较高的扩散性和较长的作用时间,可直接造成机体氧化损伤。因此,H₂O₂的耐受能力常作为评价乳酸菌抗氧化活性的重要指标之一。本实验通过比较菌体在不同浓度H₂O₂环境下乳酸菌的生长情况,以考察具有良好耐酸、耐胆盐能力的菌株SC608是否具有过氧化氢耐受能力,结果如表1所示。

表1 三株乳酸菌对不同浓度H₂O₂的耐受能力

Table 1 Tolerance of different H₂O₂ concentrations for three strains of lactic acid bacteria

菌株编号	H ₂ O ₂ 浓度 (mmol/L)			
	0.0	0.4	0.7	1.0
SC608	8.67±0.02 ^{ab}	8.69±0.03 ^{ab}	8.69±0.02 ^{ab}	8.76±0.02 ^{ab}
SC592	8.49±0.01 ^{ab}	8.48±0.01 ^{ab}	8.46±0.01 ^{ab}	8.46±0.01 ^{ab}
SC574	8.63±0.02 ^{bc}	8.62±0.01 ^{bc}	8.64±0.01 ^{bc}	8.60±0.02 ^{bc}

注:同行上标大写英文字母表示同一菌株对不同浓度H₂O₂耐受能力的差异显著($p < 0.05$);同列小写英文字母表示相同H₂O₂浓度下不同菌株耐受能力的差异显著($p < 0.05$)。

由表1中结果可知,H₂O₂浓度从0 mmol/L升高至1.0 mmol/L,菌体的生长情况几乎不受影响,与未添加H₂O₂时菌体的生长情况没有显著差异($p > 0.05$),说明在一定浓度范围内,该菌株对H₂O₂并不敏感。张凤敏等^[12]从发酵食品中筛选到两株能够耐受1.0 mmol/L H₂O₂的两株乳酸菌,与*Lb. rhamnosus* GG比较后认为,三株乳酸菌的H₂O₂的耐受能力相当,这说明了本研究筛选到的乳酸菌SC608具备了良好抗氧化活性的潜力。

2.5 乳酸菌不同组分抗氧化能力

2.5.1 羟自由基清除能力 羟自由基能够降解DNA,损伤细胞膜和多糖化合物,是最主要的导致脂质过氧化和多种人体氧化损伤的自由基,这些造成机体氧化损伤的过程大都需要金属离子的参与,乳酸菌能够螯合金属离子,间接减少羟自由基的产生,从而根本抑制脂质过氧化的发生。本实验通过考察乳酸菌对羟自由基的清除能力来评价其抗氧化的效果。结果如图4所示,3株乳酸菌中,SC608羟自由基的清除能力最优。王曦等^[13]认为不同乳酸菌羟自由基的清除能力不同可能是由于清除自由基的活性物质不同或活性物质的含量不同。同时比较了不同组分清除羟自由基的效果发现,发酵上清液的自由基清除效果最好,其次是胞内提取物,而菌体本身的清除效果最差。还有研究报道指出,乳酸菌发挥抗氧化作用

的活性物质所在的位置具有菌株的特异性,本研究筛选到的3株乳酸菌,尤其是菌株SC608,表现出较好羟自由基清除能力的组分为发酵上清液,其原因可能是菌体在生长和代谢过程中向环境中分泌某些金属离子(Cu²⁺和Fe²⁺)的螯合物,从根本上降低羟自由基的含量。

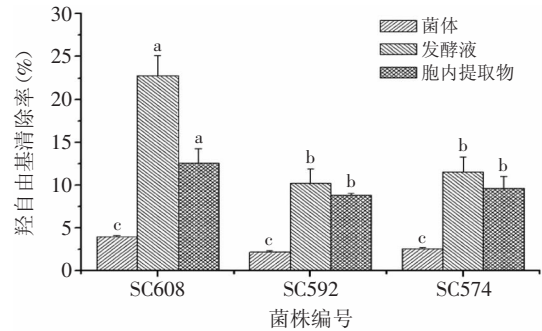


图4 三株乳酸菌的羟自由基清除能力

Fig.4 The hydroxyl radical scavenging activity of three strains of lactic acid bacteria

注:不同字母表示不同菌株间差异显著($p < 0.05$),相同字母表示差异不显著;图5同。

2.5.2 DPPH自由基清除能力 有研究指出,乳酸菌的DPPH自由基清除活性与菌体产生的胞外多糖有关^[5]。乳酸菌产生的胞外多糖通常会以两种形式存在,一种是附着于菌体表面,另一种是分泌到菌体细胞外。本实验测定了3株乳酸菌不同组分对DPPH自由基的清除能力发现,发酵上清液的清除效果最好,其次是菌体,最后是胞内提取物,这样的结果说明了本研究筛选得到的3株乳酸菌可能会产生胞外多糖,而且与其DPPH自由基的清除能力可能存在着某种关系。另外,与羟自由基清除能力不同,菌株SC608胞内提取物的DPPH自由基的清除效果明显低于其他两株乳酸菌($p < 0.05$),而菌体和发酵上清液的差异不显著,说明SC608在清除DPPH自由基的能力略显不足。

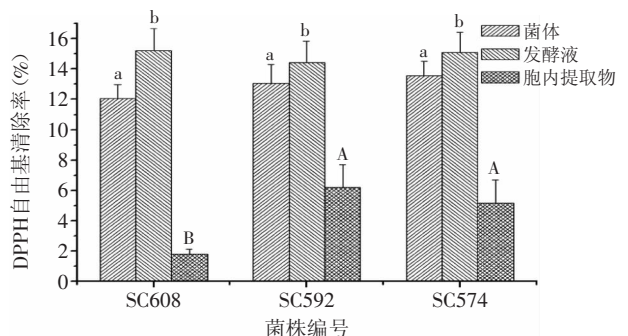


图5 三株乳酸菌的DPPH自由基清除能力

Fig.5 The DPPH radical scavenging activity of three strains of lactic acid bacteria

自由基清除能力是评价乳酸菌抗氧化能力的重要指标,目前,已有大量研究指出了乳酸菌发挥抗氧化作用与其能够有效清除多种自由基存在密切关系。Tuda等^[14]从发酵鱼制品中分离到了75株乳酸菌,

通过检测各株乳酸菌对羟自由基、DPPH自由基和超氧阴离子自由的清除能力来筛选具有抗氧化活性的乳酸菌。以上研究说明,乳酸菌清除自由基的能力能够较好反映其抗氧化的性能。本研究中,菌株SC608表现出良好的羟自由基和DPPH自由基清除能力,说明该菌株也具有较好的抗氧化性能。

2.6 抗氧化菌株的生长性能

对抗氧化性能良好的菌株SC608的生长性能进行测定,结果如图6所示。4 h时菌体生长开始进入对数期,经过8 h的快速生长,活菌数量达到最高的 2.43×10^8 CFU/mL。菌体生长的前8 h,发酵液的pH从6.0下降到4.2;该阶段菌体对碳源的利用也最为活跃,葡萄糖浓度从18.6 g/L下降到7.43 g/L。12 h以后菌体生长进入稳定期,此阶段活菌数量基本保持不变,18 h时活菌数量开始降低,pH和葡萄糖的浓度也下降到较低水平,说明营养物质的消耗和酸性物质的不断产生(菌体代谢利用葡萄糖产生乳酸)造成了菌体活力的减弱,也可能导致了菌体自溶的发生。

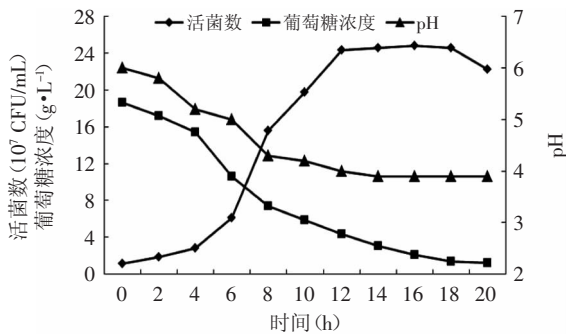


图6 菌株SC608的生长曲线
Fig.6 The growth curve of the strain SC608

2.7 抗氧化菌株的鉴定

首先,对抗氧化性能较好的菌株SC608进行生理生化鉴定结果如表2所示。采用API Lab软件对检测结果分析表明:菌株SC608为植物乳杆菌,其ID值为92.1%,T值为99.3%。

其次,对菌株SC608的16S rDNA扩增,进行分子水平的鉴定,结果如图7所示。由图7中可以看出,扩增片段大小在1500 bp左右,且条带单一,说明为乳酸菌特异性16S rDNA片段。

将16S rDNA片段的PCR扩增产物进行双向测

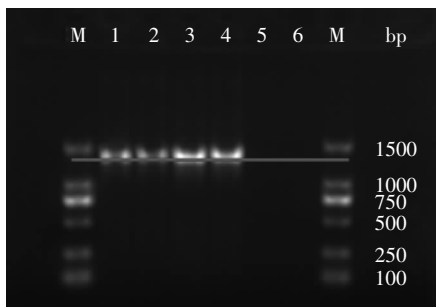


图7 菌株基因组DNA16S片段扩增电泳鉴定

Fig.7 Electrophoresis identification of 16S rDNA of strains
注:M: DNA maker D2000;1~4: 待鉴定菌株;5~6: 阴性对照。

表2 菌株SC608的生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of the strain SC608

检测指标	检测结果		检测指标	检测结果	
	48 h	24 h		48 h	24 h
对照	-	-	七叶灵	+	+
甘油	-	-	柳醇	+	+
赤藓醇	-	-	纤维二糖	+	+
D-阿拉伯糖	-	-	麦芽糖	+	+
L-阿拉伯糖	+	+	乳糖	-	-
核糖	+	+	蜜二糖	+	+
D-木糖	-	-	蔗糖	+	+
L-木糖	-	-	海藻糖	+	+
阿东糖	-	-	菊糖	+	+
β-甲基-D-木糖苷	-	-	松三糖	+	+
半乳糖	+	+	棉子糖	+	+
葡萄糖	+	+	淀粉	-	-
果糖	+	+	肝糖	-	-
甘露糖	+	+	木糖醇	-	-
山梨糖	-	-	龙胆二糖	+	+
鼠李糖	-	-	D-松二糖	-	-
卫茅糖	-	-	D-来苏糖	-	-
肌醇	-	-	D-塔格糖	-	-
甘露醇	+	+	D-岩糖	-	-
山梨醇	+	+	L-岩糖	-	-
α-甲基-D-甘露糖苷	-	-	D-阿拉伯糖醇	-	-
α-甲基-D-葡萄糖苷	-	-	L-阿拉伯糖醇	-	-
N-乙酰-葡糖胺	+	+	葡萄糖酸盐	-	-
苦杏仁苷	+	+	2-酮基-葡萄糖酸盐	-	-
熊果苷	+	+	5-酮基-葡萄糖酸盐	-	-

注:+表示反应呈阳性;-表示反应呈阴性。

序,拼接后的序列进行BLAST比对,结果与GenBank数据库多株植物乳杆菌的16S rDNA的同源序列性高达99%~100%(各菌株片段序列号:NC_114567.2,NC_012220.1,NZ_LBHS01000001.1,NZ_JIBX01000028.1)。因此,综合微生物形态(图1),生理生化特征(表2)和16S rDNA序列的比对结果,鉴定菌株SC608为植物乳杆菌。

3 结论

本研究从自然发酵酸菜中筛选到一株具有良好耐酸、耐胆盐能力及抗氧化的效果的乳酸菌,经生理生化实验及16S rDNA序列分析,该菌株被鉴定为植物乳杆菌。由于该菌株表现出了良好的发酵性能和潜在的益生功能,因此该菌株是开发乳酸菌发酵剂的理想材料。

参考文献

[1] Shah N P. Functional cultures and health benefits[J]. International Dairy Journal, 2007, 17(11): 1262-1277.
[2] De Vries M C, Vaughan E E, Kleerebezem M, et al. *Lactobacillus plantarum*-survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract[J]. International Dairy Journal, 2006,

16(9):1018-1028.

[3] Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants[J]. *Experimental physiology*, 1997, 82(2):291-295.

[4] Lin M Y, Yen C L. Antioxidative ability of lactic acid bacteria[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47(4):1460-1466.

[5] Yang J, Ji Y, Park H, et al. Selection of functional lactic acid bacteria as starter cultures for the fermentation of Korean leek (*Allium tuberosum* Rottler ex Sprengel.)[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 191(1):164-171.

[6] 李茂昌, 曹秋娥, 刘亚. 亮绿褪色光度法检测Fenton体系产生的羟自由基[J]. *云南化工*, 2006, 33(4):39-42.

[7] Ozgun D, Vural H C. Identification of *Lactobacillus* strains isolated from faecal specimens of babies and human milk colostrum by API 50 CHL system[J]. *Journal of Medical Genetics Genomics*, 2011, 3(3):46-49.

[8] 夏雪娟, 陈兰芝, 陈宗道, 等. 16S rDNA序列分析法快速鉴定西藏地区传统乳制品中的乳酸菌[J]. *食品科学*, 2013, 34(14):245-249.

[9] Gueimonde M, Salminen S. New methods for selecting and evaluating probiotics[J]. *Digestive Diseases*, 2006, 38(Suppl. 2):S242-S247.

[10] Ramos C L, Thorsen L, Schwan R F, et al. Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products[J]. *Food Microbiology*, 2013, 36(1):22-29.

[11] Delgado S, O'sullivan E, Fitzgerald G, et al. Subtractive screening for probiotic properties of *Lactobacillus* species from the human gastrointestinal tract in the search for new probiotics[J]. *Journal of Food Science*, 2007, 72(8):M310-M315.

[12] 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.

[13] 王曦, 罗霞, 徐晓燕, 等. 不同乳酸菌菌株抗氧化能力的比较研究[J]. *食品科学*, 2010, 31(9):197-202.

[14] Kuda T, Kawahara M, Nemoto M, et al. *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory properties of lactic acid bacteria isolated from fish intestines and fermented fish from the Sanriku Satoumi region in Japan[J]. *Food Research International*, 2014, 64:248-255.

(上接第144页)

参考文献

[1] 周光宏. 肉品加工学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2008.

[2] Farouk M M, Wieliczko K J, Merts I. Ultra-fast freezing and low storage temperatures are not necessary to maintain the functional properties of manufacturing beef[J]. *Meat Science*, 2003, 66:171-179.

[3] Xiong Y L. Structure/function relationship of muscle proteins[M]. New York: Marcel Dekker, 1997:21-90.

[4] Sikes A L, Tobin A B, Tume R K. Use of high pressure to reduce cook loss and improve texture of low-salt beef sausage batters[J]. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2009, 10:405-412.

[5] 田锐花, 靳红果, 朱易, 等. 冷却和冷冻对猪背最长肌动态黏弹性和凝胶特性的影响[J]. *食品科学*, 2013, 34(3):128-132.

[6] Bertram H C, Andersen H J, Webb G A. Applications of NMR in meat science[J]. *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, 2004, 53:157-202.

[7] Bertram H C, Andersen H J, Karlsson A H. Comparalivestudy of low-field NMR relaxation measurements and two traditional methods in the determination of water holding capacity of pork[J]. *Meat Science*, 2001, 57(2):125-132.

[8] Zhuang-Li Kang, Peng Wang, Xing-Lian Xu, et al. Effect of beating processing, as a means of reducing salt content in frankfurters[J]. A physico-chemical and Raman spectroscopic study, 2014, 98:171-177.

[9] Zhuang-Li Kang, Yu-Feng Zou, Xing-Lian Xu, et al. Effect of various amounts of pork and chicken meat on the sensory and physicochemical properties of Chinese-style meatball (kung-wan)[J]. *Food Science and Technology Research*, 2013, 19(6):963-970.

[10] Zhuang-Li Kang, Yu-Feng Zou, Xing-Lian Xu, et al. Effect of a beating process, as a means of reducing salt content in Chinese-style meatballs (kung-wan): A physico-chemical and textural study[J]. *Meat Science*, 2014, 96:147-152.

[11] 韩敏义, 费英, 徐幸莲, 等. 低场NMR研究pH对肌原纤维蛋白热诱导凝胶的影响[J]. *中国农业科学*, 2009, 42(6):2098-2104.

[12] 余小颖, 李学斌, 赵辉, 等. 宰后放置时间和冷冻对中式香肠品质的影响[J]. *食品科学*, 2010, 31(7):109-113.

[13] Qiao M, Fletcher D L, Smith D P, et al. The Effect of Broiler Breast Meat Color on pH, Moisture, Water-Holding Capacity, and Emulsification Capacity[J]. *Poultry Science*, 2001, 80:676-680.

[14] Swatland H J. Paleness, softness, and exudation in pork - review[M]. UK: Genetic and Meatbolinc Factors, 1993:273-286.

[15] 牛力, 陈景宜, 黄明, 等. 不同冻藏温度和时间对鸡胸肉食用品质的影响[J]. *南京农业大学学报*, 2012, 35(4):115-120.

[16] Padda G S, Keshri R C, Sharma N, et al. Physico-Chemical and organoleptic properties of patties from hot, chilled and frozen goat meat[J]. *Meat Science*, 1988, 22(4):245-253.

[17] Colmenero F J, Borderias A J. A study of the effects of frozen storage on certain functional properties of meat and fish protein[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 1983, 18(6):731-737.

[18] Bejosano F P, Corke H. Amaranthus and buckwheat protein concentrate effects on an emulsion-type meat product[J]. *Meat Science*, 1998, 50:343-353.

[19] 姜晓文, 韩剑众. 生鲜猪肉持水性的核磁共振研究[J]. *食品工业科技*, 2009(7):128-130.

[20] Pearce K L, Rosenvold K, Andersen H J, et al. Water distribution and mobility in meat during the conversion of muscle to meat and ageing and the impacts on fresh meat quality attributes - A review[J]. *Meat Science*, 2011, 89:111-124.