

DOI:10.13652/j.issn.1003-5788.2020.06.008

# 高海拔地区传统牦牛酥油中抗氧化乳酸菌的筛选

Screening of *Lactobacillus* with antioxidant properties from traditional yak ghee in high altitude area of Tibet

李丹丹<sup>1</sup> 蒋婷婷<sup>1</sup> 张炎<sup>2</sup> 罗章<sup>1</sup>

LI Dan-dan<sup>1</sup> JIANG Ting-ting<sup>1</sup> ZHANG Yan<sup>2</sup> LUO Zhang<sup>1</sup>

(1. 西藏农牧学院食品科学学院, 西藏 林芝 860000;

2. 甘肃农业大学食品科学与工程学院, 甘肃 兰州 730070)

(1. Department of Food Science, Xizang Agricultural and Animal Husbandry College, Nyingchi, Xizang 860000, China; 2. College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

**摘要:**以耐酸、耐过氧化氢为耐受性指标, DPPH 自由基、OH 自由基和超氧阴离子自由基的清除能力为抗氧化指标, 对采集自西藏不同海拔的牦牛酥油中的乳酸菌进行筛选。结果表明: 西藏牦牛酥油中分离得到的 61 株乳酸菌, 有 7 株既耐低酸环境又对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 具有较好耐受性, 其中 C19 (*Lactobacillus plantarum*) 的 DPPH 自由基和超氧阴离子自由基清除力最优, 分别为 30.84% 和 26.91%, E1 (*Lactobacillus rhamnosus*) 的 OH 自由基清除力最优, 为 57.60%。菌株的 DPPH 自由基、OH 自由基和超氧阴离子自由基清除率无对应关系, 并且海拔与乳酸菌的抗氧化活性呈非正比关系。C19 和 E1 两株乳酸菌具备开发成为天然抗氧化发酵剂的潜力。

**关键词:** 酥油; 牦牛; 乳酸菌; 耐酸; 耐过氧化氢; 抗氧化

**Abstract:** *Lactobacillus* in yak ghee at different altitudes in Tibet was screened through tolerance index of resistance to acid, hydrogen peroxide, and antioxidant indicators of scavenging capacity of DPPH free radicals, OH free radicals and superoxide anions. The results showed that 61 strains of bacteria were acquired from Tibet yak ghee, and 7 strains of them were well-tolerated to circumstances of low-acid and hydrogen peroxide. Among the 7 strains, C19 (*Lactobacillus plantarum*) had the highest scavenging capacity of DPPH free radicals and superoxide anions with the rate of 30.84% and 26.91% respectively. E1 (*Lactobacillus*

*rhamnosus*) had the highest scavenging capacity of OH free radicals with the rate of 57.60%. No correspondence of scavenging capacity of DPPH free radicals, OH free radicals and superoxide anions was found, and altitude was not directly proportional to the antioxidant activity of *Lactobacillus*. C19 and E1 had potential in the research and development of natural antioxidants starter.

**Keywords:** ghee; yak; *Lactobacillus*; acid resistance; hydrogen peroxide resistance; antioxidant activity

近年来, 乳酸菌作为天然抗氧化剂, 其缓解因氧化应激引发的各种疾病成为研究热点<sup>[1]</sup>。氧化应激即机体生成或清除自由基的能力失衡, 导致机体氧化损伤, 出现衰老或病变的现象<sup>[2]</sup>, 摄入外源性抗氧化剂是缓解机体氧化应激的重要途径<sup>[3]</sup>。经过长期的自然选择, 西藏传统乳制品中富含优良的乳酸菌, 蒋厚阳等<sup>[4]</sup>从西藏奶酪、酸奶中筛选得到 12 个乳酸菌菌种, 验证了乳制品中乳酸菌的多样性。青藏高原严寒缺氧、强紫外辐射的恶劣环境胁迫机体长期处于氧化应激状态<sup>[5]</sup>, 近年来对西藏牦牛酸乳中抗氧化乳酸菌的研究较多, 陈明等<sup>[6]</sup>从青藏高原牦牛酸乳中筛选出 3 株乳酸菌, 对 DPPH 自由基、OH 自由基及超氧阴离子自由基均有较高的清除力。由此表明, 西藏传统乳制品中含有丰富的抗氧化乳酸菌。

牦牛酥油是藏区人民日常生活中必不可少的食物<sup>[7]</sup>。相较于牦牛酸乳中乳酸菌抗氧化活性的若干研究<sup>[8-9]</sup>, 对同为西藏传统牦牛乳制品的酥油中抗氧化乳酸菌的研究却未见报道, 并且酥油低温加工的方式对乳酸菌的多样性具有保护作用。试验拟对采集自西藏高海拔地区牦牛酥油中的乳酸菌进行分离鉴定, 筛选具备天然抗氧化发酵剂开发潜力的乳酸菌, 以期丰富西藏牦牛

**基金项目:** 西藏农牧学院研究生创新项目(编号: YJS2019-13); 西藏农牧学院食品科学与工程重点学科建设(编号: 502218009); 国家科技部重点研发计划(编号: 2018YFD0400102)

**作者简介:** 李丹丹, 女, 西藏农牧学院在读硕士研究生。

**通信作者:** 罗章(1965—), 男, 西藏农牧学院教授, 博士。

E-mail: luozhang1759@sohu.com

**收稿日期:** 2020-03-10

酥油中乳酸菌的相关研究。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料、试剂与培养基

西藏牦牛酥(样品详细信息见表1):采集自西藏地区;

细菌基因组DNA提取试剂盒:天根生化试剂公司;

MRS培养基(MRS固体培养基在MRS培养基基础上添加1.5%的琼脂;含7.5% CaCO<sub>3</sub>的MRS固体培养基是在MRS培养基基础上添加7.5% CaCO<sub>3</sub>和1.5%的琼脂):北京奥博星生物技术有限责任公司;

DPPH无水乙醇溶液(0.2 mmol/L)、邻菲罗啉溶液(2.5 mmol/L)、pH 8.2 Tris-HCl(0.05 mol/L)、邻苯三酚(0.05 mol/L):上海源叶生物科技有限公司;

硫酸亚铁溶液(2.5 mmol/L)、pH 7.4 磷酸缓冲液(PBS)、过氧化氢溶液(20 mmol/L):北京易秀博谷生物科技有限公司。

### 1.2 仪器与amp;设备

紫外分光光度计:UV-1800型,上海美谱达仪器有限公司;

超声波破碎仪:JY88-IIIN型,宁波新芝生物科技股份有限公司;

高速冷冻离心机:5810R型,德国Eppendorf公司;

PCR仪:BC-C57型,北京天林恒泰科技有限公司;

琼脂糖水平电泳仪:DYCP-31DN型,北京六一仪器厂;

凝胶成像系统:Tanon 1600型,上海天能科技有限公司。

### 1.3 方法

1.3.1 乳酸菌的分离与amp;纯化 精确称取酥油样品5.00 g,置入装有45 mL生理盐水的无菌均质袋中,使用拍击式均质器拍打1~2 min(拍击速度6次/s)制成1:9(g/mL)的样品匀液。将梯度稀释后的样液在含有7.5% CaCO<sub>3</sub>的MRS固体培养基上均匀涂布,置于37℃培养箱中恒温培养48 h,选取有溶钙圈现象的单菌落进行镜检和革兰氏染色,将革兰氏阳性菌纯培养,置于-80℃保存备用<sup>[10]</sup>。

#### 1.3.2 菌株分子生物学鉴定

(1) DNA提取:利用细菌DNA试剂盒提取分离得到

的纯菌落菌株DNA。

(2) PCR扩增及amp;测序:根据文献[11],修改如下:

PCR体系(25 μL):PCR Buffer 2.5 μL,d NTP 2 μL,DNA模板1 μL,Taq酶0.3 μL,上游引物1 μL,下游引物1 μL,用超纯水定容至25 μL,备用。

PCR扩增条件:95℃预变性3 min,95℃变性45 s,50℃退火30 s,72℃延伸35 s(40次循环),最后72℃延伸5 min。

(3) 序列分析:利用Nucleotide Blast对比分析测序结果。

1.3.3 乳酸菌的耐酸性测定 将-80℃保存菌株以2%接种量接种于MRS液体培养基中,37℃培养16 h,获得试验菌株。调整其细胞浓度为1×10<sup>8</sup> CFU/mL,以体积分数3%的接种量分别接种于初始pH为2.0,3.0,4.0,5.0,6.0的MRS液体培养基中,37℃培养16 h,测其不同pH值下600 nm处的OD值<sup>[12]</sup>。

1.3.4 乳酸菌耐过氧化氢性能测定 将-80℃保存菌株以2%接种量接种于MRS液体培养基中,37℃培养16 h,获得试验菌株。调整其细胞浓度为1×10<sup>8</sup> CFU/mL,以体积分数1%的接种量分别接种于初始H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度为0.0,1.0,2.0,3.0 mmol/L的MRS液体培养基中,37℃培养8 h,测其不同H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度下600 nm处的OD值<sup>[13]</sup>。

1.3.5 菌株抗氧化能力的复筛 吸取15 mL试验菌株培养液与15 mL PBS缓冲液(pH 7.4)旋涡混匀,离心(4℃,5 000 r/min,10 min)洗涤3次,制得菌悬液,调整细胞浓度至10<sup>9</sup> CFU/mL。将调整好细胞浓度的菌悬液平均分为两份,其中一份菌悬液为乳酸菌完整细胞组,将另一份菌悬液利用超声波破碎仪(变幅杆Φ 6 mm,超声开1 s,超声关1 s,功率33%)冰浴破碎处理,取上清,即无细胞提取物。

(1) DPPH自由基清除力试验方法:根据文献[14],取1 mL待测样品(完整细胞组和无细胞提取物组),加入1 mL DPPH无水乙醇溶液(0.2 mmol/L),充分混匀后,室温下避光静置30 min,6 000 r/min离心10 min。取上清液,517 nm下测定吸光度记录数值为A。用1 mL无水乙醇代替1 mL待测样品,测定吸光度值为A<sub>0</sub>。用1 mL无水乙醇代替1 mL DPPH无水乙醇溶液,测定吸光度值为A<sub>1</sub>。按式(1)计算DPPH自由基清除率。

$$X = \left(1 - \frac{A - A_1}{A_0}\right) \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

X——DPPH自由基清除率,%;

A——样品组吸光度;

A<sub>0</sub>——对照组吸光度;

A<sub>1</sub>——空白组吸光度。

(2) OH自由基清除力试验方法:根据文献[15],取

表1 样品信息

Table 1 Sample information

样品编号	来源	产地海拔/m
1	那曲市班戈县	4 708±50
2	拉萨市当雄县	4 250±50
3	拉萨市堆龙德庆区	3 790±50
4	林芝市米林县	3 700±50

1 mL 邻菲罗啉溶液 (2.5 mmol/L), 依次加入 1 mL PBS 缓冲液 (pH=7.4), 1 mL 待测样品 (完整细胞组和无细胞提取物组), 充分混匀后加入 1 mL 硫酸亚铁溶液 (2.5 mmol/L), 混匀, 加入 1 mL 过氧化氢溶液 (20 mmol/L), 37 °C 恒温水浴 1.5 h, 536 nm 下测定吸光度记录数值为  $A_1$ 。用 1 mL 蒸馏水代替 1 mL 过氧化氢溶液, 测定吸光度值记录为  $A_0$ 。用 1 mL 蒸馏水代替 1 mL 待测样品, 测定吸光度值记录为  $A_2$ 。按式 (2) 计算 OH 自由基清除率。

$$X = \frac{A_1 - A_2}{A_0 - A_2} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

X——OH 自由基清除率, %;

$A_0$ ——空白组吸光度;

$A_1$ ——样品组吸光度;

$A_2$ ——对照组吸光度。

(3) 超氧阴离子自由基清除力试验方法: 根据文献 [16], 取 0.1 mL 待测样品 (完整细胞组和无细胞提取物组), 加入 4.5 mL Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0), 充分混合均匀后, 置于 25 °C 水浴预热 20 min, 加入 0.4 mL 邻苯三酚 (25 mmol/L), 再次于 25 °C 水浴 5 min 后, 立即滴入 2 滴 HCl (8 mol/L) 用以终止反应, 320 nm 下测定吸光度记录数值为  $A$ 。用 0.1 mL 蒸馏水代替 0.1 mL 待测样品, 测定吸光度值记录为  $A_0$ 。按式 (3) 计算超氧阴离子自由基清除率。

$$X = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

X——超氧阴离子自由基清除率, %;

$A_0$ ——空白组吸光度;

$A$ ——样品组吸光度。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的分离和初步鉴定结果

利用溶钙圈法从样品中分离得到 61 株菌株, 对纯菌株进行革兰氏染色、镜检, 菌株菌落形态为直径 0.7~3.0 mm、圆形或椭圆形、白色或乳白色、湿润、突起或微隆起、边缘整齐; 革兰氏染色无芽孢、均为阳性, 溶钙圈为阳性; 检出多为长杆状或短杆状, 符合乳酸菌的特征。部分微生物菌落形态如图 1 所示。

### 2.2 菌株分子生物学鉴定结果及系统发育分析

采用试剂盒法分离得到的单菌落纯菌株的 DNA, 部分纯菌株凝胶电泳图如图 2 所示。分离得到的 61 株菌株的电泳条带长度均在 1 500~1 750 bp, 符合细菌电泳条带长度要求。

将 61 株菌株测序结果利用 NCBI 中的 Nucleotide-Blast 数据库进行比对分析。鉴定结果表明, 从牦牛酥油

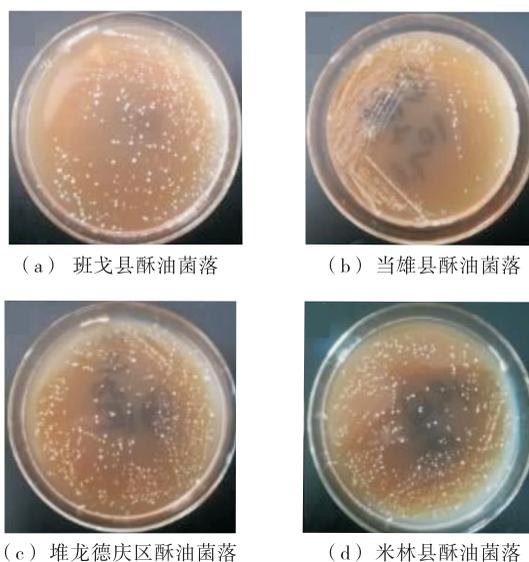
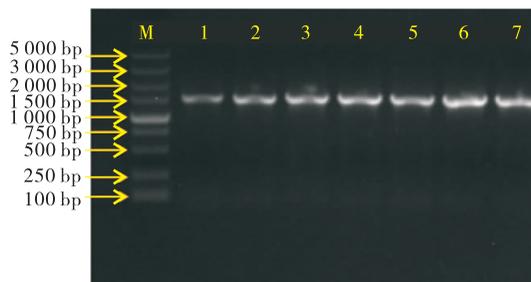


图 1 部分微生物的菌落形态

Figure 1 Colony morphology of partial microorganisms



M. DL5000 DNA Marker 1~7. 分别代表不同菌株

图 2 菌株 16S rDNA 基因扩增电泳图

Figure 2 Amplified electrophoresis of strain 16S rDNA

中分离得到的 61 株菌分属乳酸菌属的 7 个种, 其中副干酪乳杆菌亚种 (*Lactobacillus paracasei subsp. tolerans*) 9 株; 副干酪乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei*) 26 株; 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 21 株; 德氏乳杆菌 (*Lactobacillus delbrueckii*) 3 株; 鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) 2 株。菌株同源性均为 99%。

将菌株测序结果, 利用 Mega 7.0 软件构建菌株系统发育树如图 3 所示。由图 3 可知, 菌株 A4 和 B5, C10、C19 和 C20, D1、D2 和 D3 等遗传距离较近, 表明这些菌株的亲缘关系比较接近, 而其他菌株的遗传距离较远, 说明这些菌株之间差异较大。此外, 通过系统发育树验证西藏牦牛酥油中乳酸菌的多样性。

### 2.3 菌株耐受性试验初筛

2.3.1 菌株耐酸性试验 乳酸菌耐低酸特性是其发挥抗氧化作用的重要前提 [17]。对分离得到的 61 株乳酸菌进行耐酸性试验, 筛选出耐酸性能较好的 16 株乳酸菌, 这 16 株乳酸菌在不同酸性条件下的生长情况见表 2。

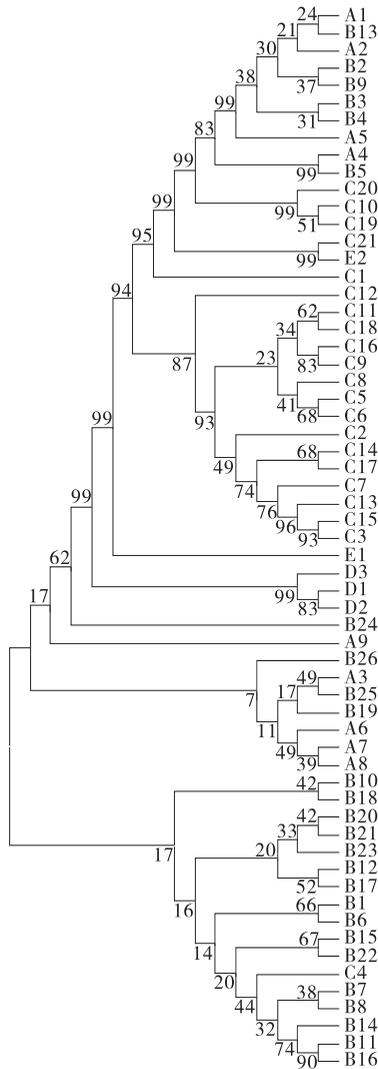


图3 牦牛酥油中微生物的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree for microbials in yak ghee

由表2可知,当培养基初始pH为5.0和6.0时,菌株OD值均较高,表示pH 5.0~6.0的培养基环境适宜菌株生长。其中E1和C19在pH 6.0时活性最高,OD<sub>600 nm</sub>分别为2.62和2.59。pH为5.0时,E1和C19的OD<sub>600 nm</sub>分别为2.48和2.46,活性仍然高于其他菌株。pH为4.0时,16株乳酸菌活性显著降低,OD<sub>600 nm</sub>均在0.96以上,其中A1、C19和E1活性较好,OD<sub>600 nm</sub>均在1.90以上。pH为3.0时,虽然其生长活性受到了抑制,但16株乳酸菌仍然可以生长,pH为2.0时,全部菌株无法正常生长。经过耐酸性试验筛选后发现:从西藏牦牛酥油中分离得到的61株乳酸菌中,有16株对低酸环境具有较好的耐受性,可进入下一阶段试验。

2.3.2 菌株耐过氧化氢试验 对上述16株乳酸菌进行不同H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度的耐受性试验,筛选得到7株H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>耐受能力较好的乳酸菌,这7株乳酸菌在不同H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度下的生长情况见表3。

由表3可知,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度变化对乳酸菌的生长产生显著性影响。当H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度为3 mmol/L时,7株乳酸菌均无法正常生长。当H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度为2 mmol/L时,5株乳酸菌生长情况较优,OD<sub>600 nm</sub>平均值为1.90,其中A1生长情况最好,OD<sub>600 nm</sub>为2.04。当H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度为0.1 mmol/L时,乳酸菌生长情况普遍较好且差异不显著,7株乳酸菌OD<sub>600 nm</sub>平均值分别为2.29,2.20。经过耐H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>试验筛选后,发现从西藏牦牛酥油中分离得到的16株耐低酸的乳酸菌中有7株对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>有较好的耐受性。对这7株乳酸菌的抗氧化性能进行研究,以期找到具有较好抗氧化性能的乳酸菌,为乳酸菌天然抗氧化发酵剂的研究提供基础。

2.4 菌株抗氧化试验复筛

2.4.1 清除DPPH自由基能力 由图4可知,大多数乳酸菌的完整细胞组的DPPH自由基清除率大于无细胞提

表2 初始pH对菌株生长的影响†

Table 2 Effects of different initial pH values on strain growth

pH值	A1	A4	A7	B1	B23	B26	C1	C2
2.0	0.22±0.02 <sup>d</sup>	0.16±0.03 <sup>e</sup>	0.13±0.02 <sup>e</sup>	0.13±0.03 <sup>e</sup>	0.12±0.03 <sup>e</sup>	0.17±0.03 <sup>e</sup>	0.17±0.03 <sup>d</sup>	0.15±0.02 <sup>e</sup>
3.0	0.65±0.06 <sup>e</sup>	0.51±0.02 <sup>d</sup>	0.50±0.03 <sup>d</sup>	0.14±0.02 <sup>d</sup>	0.25±0.02 <sup>d</sup>	0.38±0.02 <sup>d</sup>	0.22±0.03 <sup>c</sup>	0.22±0.03 <sup>d</sup>
4.0	1.96±0.14 <sup>b</sup>	1.53±0.02 <sup>c</sup>	1.52±0.02 <sup>c</sup>	0.96±0.11 <sup>c</sup>	1.60±0.02 <sup>c</sup>	1.68±0.12 <sup>c</sup>	1.70±0.02 <sup>b</sup>	1.63±0.02 <sup>c</sup>
5.0	2.38±0.14 <sup>a</sup>	1.99±0.15 <sup>b</sup>	1.98±0.12 <sup>b</sup>	2.01±0.12 <sup>b</sup>	2.09±0.12 <sup>b</sup>	2.10±0.15 <sup>b</sup>	2.23±0.12 <sup>a</sup>	2.13±0.10 <sup>b</sup>
6.0	2.41±0.14 <sup>a</sup>	2.11±0.03 <sup>a</sup>	2.10±0.15 <sup>a</sup>	2.50±0.02 <sup>a</sup>	2.20±0.15 <sup>a</sup>	2.21±0.11 <sup>a</sup>	2.30±0.12 <sup>a</sup>	2.24±0.10 <sup>a</sup>
pH值	C8	C10	C12	C16	C19	D1	D3	E1
2.0	0.14±0.03 <sup>e</sup>	0.15±0.03 <sup>e</sup>	0.18±0.03 <sup>e</sup>	0.17±0.04 <sup>e</sup>	0.23±0.03 <sup>d</sup>	0.18±0.02 <sup>e</sup>	0.19±0.02 <sup>e</sup>	0.25±0.02 <sup>e</sup>
3.0	0.24±0.02 <sup>d</sup>	0.17±0.03 <sup>d</sup>	0.20±0.03 <sup>d</sup>	0.21±0.03 <sup>d</sup>	0.47±0.05 <sup>c</sup>	0.19±0.02 <sup>d</sup>	0.29±0.05 <sup>d</sup>	0.45±0.05 <sup>d</sup>
4.0	1.62±0.02 <sup>c</sup>	1.56±0.11 <sup>c</sup>	1.58±0.13 <sup>c</sup>	1.53±0.12 <sup>c</sup>	2.02±0.11 <sup>b</sup>	1.60±0.11 <sup>c</sup>	1.52±0.02 <sup>c</sup>	2.05±0.13 <sup>c</sup>
5.0	2.13±0.11 <sup>b</sup>	2.06±0.12 <sup>b</sup>	2.08±0.15 <sup>b</sup>	2.13±0.10 <sup>b</sup>	2.46±0.15 <sup>a</sup>	2.10±0.14 <sup>b</sup>	2.02±0.03 <sup>b</sup>	2.48±0.13 <sup>b</sup>
6.0	2.24±0.11 <sup>a</sup>	2.18±0.12 <sup>a</sup>	2.20±0.12 <sup>a</sup>	2.33±0.12 <sup>a</sup>	2.59±0.12 <sup>a</sup>	2.22±0.11 <sup>a</sup>	2.21±0.12 <sup>a</sup>	2.62±0.13 <sup>a</sup>

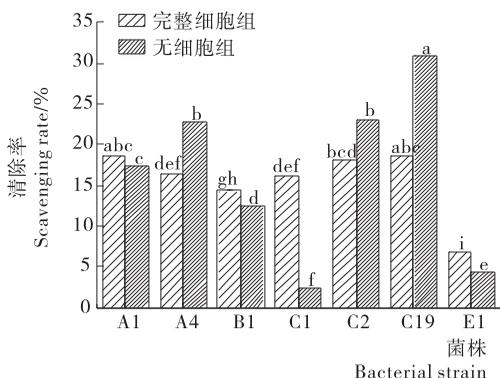
† 同列字母不同表示差异显著(P<0.05)。

表 3 过氧化氢对菌株生长的影响<sup>†</sup>

Table 3 Effects of hydrogen peroxide on the growth of the strain

初始 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 浓度/ (mmol · L <sup>-1</sup> )	A1	A6	B1	C1	C2	C54	D15
0	2.26±0.14 <sup>a</sup>	2.22±0.20 <sup>a</sup>	2.56±0.12 <sup>a</sup>	2.17±0.12 <sup>a</sup>	2.25±0.15 <sup>a</sup>	2.32±0.10 <sup>a</sup>	2.24±0.13 <sup>a</sup>
1	2.18±0.14 <sup>a</sup>	2.12±0.02 <sup>b</sup>	2.10±0.12 <sup>b</sup>	2.16±0.12 <sup>a</sup>	2.25±0.13 <sup>a</sup>	2.29±0.02 <sup>a</sup>	2.29±0.02 <sup>a</sup>
2	2.04±0.06 <sup>ab</sup>	0.59±0.02 <sup>c</sup>	0.56±0.03 <sup>c</sup>	1.67±0.02 <sup>b</sup>	2.01±0.03 <sup>b</sup>	1.99±0.03 <sup>b</sup>	1.79±0.05 <sup>b</sup>
3	0.11±0.02 <sup>b</sup>	0.05±0.03 <sup>d</sup>	0.08±0.02 <sup>d</sup>	0.08±0.03 <sup>c</sup>	0.09±0.02 <sup>c</sup>	0.10±0.02 <sup>c</sup>	0.10±0.02 <sup>c</sup>

† 同行字母不同表示差异显著(P<0.05)。



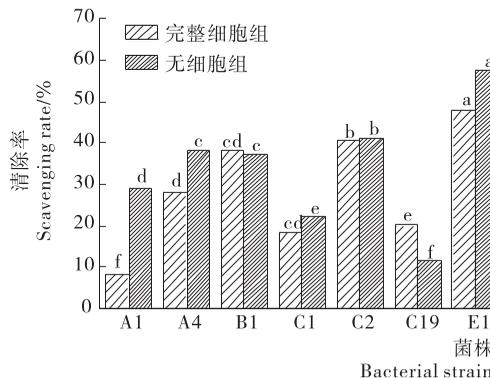
字母不同表示差异显著(P<0.05)  
图 4 菌株对 DPPH 自由基的清除率

Figure 4 DPPH free radicals scavenging rate of strains

取物组,但也有部分乳酸菌的无细胞提取物组的 DPPH 自由基清除率反而更高。说明每株乳酸菌完整细胞组和无细胞提取物组的 DPPH 自由基清除率无对应关系,即受试乳酸菌清除 DPPH 自由基的活性物质存在于细胞的不同部位。完整细胞组的 DPPH 清除率平均达到 15.59%,其中 A1 和 C19 两株乳酸菌 DPPH 自由基清除率较高,均为 18.68%。无细胞提取物组的 DPPH 自由基清除率平均为 16.18%,虽然平均值低于完整细胞组,但是 C19 的清除率最高为 30.84%。吴石金等<sup>[12]</sup>分离得到的 34 株乳酸菌其 DPPH 自由基清除率最高不超过 30%。针对 DPPH 自由基清除率对 7 株乳酸菌进行筛选,C19 表现最优。

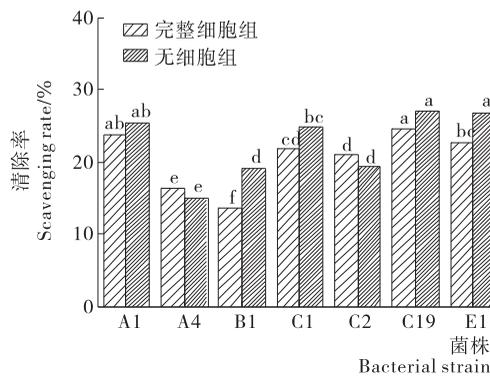
2.4.2 清除 OH 自由基能力 由图 5 可知,与乳酸菌 DPPH 自由基清除率表现相似,菌株完整细胞组和无细胞提取物组的 OH 自由基清除率无对应关系,即说明受试乳酸菌清除 OH 自由基的活性物质存在于细胞的不同部位,而非仅存在于细胞内或细胞外。7 株乳酸菌完整细胞组和无细胞提取物组 OH 自由基清除率之间差异显著。完整细胞组平均清除率达到 28.71%,其中 E1 的自由基清除率最高为 47.87%,A1 的自由基清除率最低仅为 8.08%。

无细胞提取物组的自由基平均清除率为 33.87%,其中 E1 的清除率最高为 57.60%,C19 的 OH 自由基清除



字母不同表示差异显著(P<0.05)  
图 5 菌株对 OH 自由基的清除率

Figure 5 OH free radicals scavenging rate of strains



字母不同表示差异显著(P<0.05)  
图 6 菌株对超氧阴离子自由基的清除率

Figure 6 Superoxide anion free radical scavenging rate of strains

率最低仅为 11.46%。7 株乳酸菌中 E1 的清除率最高为 57.60%。刘亚东等<sup>[18]</sup>对从西藏曲拉、发酵乳中分离得到的 23 株乳酸菌 OH 自由基清除率进行测定,最高仅有 27.62%,远低于试验所得菌株。Ding 等<sup>[19]</sup>对从青藏高原牛乳中分离得到的菌株进行 OH 自由基清除率检测,最高为 59.00%,相较之下,试验筛选得到的乳酸菌 OH 自由基清除率略低。针对 OH 自由基清除率对 7 株乳酸菌进行筛选,E1 表现最优。

2.4.3 清除超氧阴离子自由基能力 由图6可知,受试乳酸菌清除超氧阴离子自由基的活性物质存在于细胞的不同部位。7株乳酸菌完整细胞组和无细胞提取物组的超氧阴离子清除率差异显著。完整细胞组超氧阴离子自由基平均清除率达到20.57%,其中C19的超氧阴离子的清除率最高为24.59%。无细胞提取物组的超氧阴离子自由平均清除率达到22.50%,其中C19的超氧阴离子的清除率最高为26.91%。刘珊春等<sup>[20]</sup>对18株乳酸菌的超氧阴离子自由基清除率进行测定,最高为28.78%。相较之下,试验筛选得到的乳酸菌虽然超氧阴离子自由基清除率略低。针对超氧阴离子自由基清除率对7株乳酸菌进行筛选,C19表现最优。

### 3 结论

对采集自西藏不同海拔的牦牛酥油进行菌株分离,共得到61株菌株,经分子生物学鉴定分别为:副干酪乳杆菌亚种(*L. paracasei subsp. tolerans*)9株;副干酪乳杆菌(*L. paracasei*)26株;植物乳杆菌(*L. plantarum*)21株;德氏乳杆菌(*L. delbrueckii*)3株;鼠李糖乳杆菌(*L. rhamnosus*)2株。

通过乳酸菌耐受性试验得到7株既耐低酸环境又对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>具有较好耐受性的乳酸菌,分别为A1、A4、B1、C1、C2、C19、E1。对7株乳酸菌的抗氧化性能分析发现,菌株的DPPH自由基、OH自由基和超氧阴离子自由基清除率无对应关系。C19的DPPH自由基清除力和超氧阴离子自由基清除力最优,分别为30.84%和26.91%,E1的OH自由基清除力最优,为57.60%。此外,C19和E1两株乳酸菌分别来自拉萨市当雄县[海拔(4 250±50) m]和拉萨市堆龙德庆区[海拔(3 790±50) m]的酥油样品中,研究发现,并非海拔越高乳酸菌的抗氧化活性越强。试验得到的C19(*L. plantarum*)和E1(*L. rhamnosus*)两株乳酸菌具备天然抗氧化发酵剂的开发潜力。

### 参考文献

[1] 王明明,王冠,杨桂连,等. 乳酸菌缓解氧化应激的潜在作用及机制研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医,2020(3): 44-47.  
 [2] ALEXANDRA S, JOACHIM J, JOSÉ P C, et al. Oxidative stress in chronic kidney disease[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 2 016(3): 165-179.  
 [3] 张卓睿,毛迪锐,高晗,等. 蓝莓花青素对小鼠抗疲劳及体内抗氧化作用[J]. *食品科学*, 2017, 38(21): 207-211.  
 [4] 蒋厚阳,陈芝兰,赵国华,等. PCR-DGGE法分析西藏传统发酵乳制品中乳酸菌的多样性[J]. *食品科学*, 2014, 35(1): 167-173.  
 [5] DOSEK A, OHNO H, ACS Z, et al. High altitude and oxidative stress[J]. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 2007, 158(2/3): 128-131.

[6] 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.  
 [7] 周雨,孟胜亚,陈锋. 牦牛酥油生产技术规程[J]. *中国乳业*, 2019(11): 19-21.  
 [8] 李潇,谢亮,杨运南,等. 牦牛酸奶中一株具有抗氧化活性乳酸菌的分离及鉴定[J/OL]. *食品工业科技*. [2020-05-09]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1759.TS.20200407.1852.027.html>.  
 [9] 骞宇,赵欣,李银聪,等. 青藏高原自然发酵牦牛酸奶中乳酸菌的抗氧化能力的研究[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(3): 119-122.  
 [10] 中华人民共和国卫生部. GB 4789.35—2016 食品微生物学检验乳酸菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 1-5.  
 [11] 耿晓杰,张玉红,薛洁,等. 西藏青稞小曲中优良微生物的筛选与鉴定[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(15): 66-73.  
 [12] 吴石金,张嘉琳,陈彦霖,等. 发酵食品中抗氧化乳酸菌的筛选与鉴定[J]. *浙江工业大学学报*, 2019, 47(6): 685-691, 698.  
 [13] LI Sheng-yu, ZHAO Yu-juan, ZHANG Li, et al. Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods[J]. *Food Chemistry*, 2012, 135(3): 1 914-1 919.  
 [14] 何书美,刘敬兰,刘会敏. 用清除有机自由基法评价酸奶的抗氧化活性[J]. *中国乳品工业*, 2010, 38(10): 18-20, 38.  
 [15] LIU Jun, LUO Jian-guang, YE Hong, et al. Production, characterization and antioxidant activities *in vitro* of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 78(2): 275-281.  
 [16] LIU Wei, WANG Heng-yu, PANG Xiu-bing, et al. Characterization and antioxidant activity of two low-molecular-weight polysaccharides purified from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2010, 46(4): 455-457.  
 [17] WU Chong-de, HUANG Jun, ZHOU Rong-qing. Regulating acid stress resistance of lactic acid bacteria: A review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(7): 721-727.  
 [18] 刘亚东,张悦,贺银凤,等. 西藏曲拉和发酵乳中抗氧化和益生特性乳酸菌的筛选及鉴定[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(2): 142-147.  
 [19] DING Wu-rong, WANG Lin-a, ZHANG Juan, et al. Characterization of antioxidant properties of lactic acid bacteria isolated from spontaneously fermented yak milk in the Tibetan Plateau[J]. *Journal of Functional Foods*, 2017, 35(8): 481-488.  
 [20] 刘珊春,赵欣,李键,等. 高抗氧化乳酸菌的筛选鉴定[J]. *食品与发酵工业*, 2017, 43(8): 59-66.