

钟正丹,何义国,赵兴秀,等.白酒酒糟中抗氧化乳酸菌的筛选及培养基优化[J].江苏农业科学,2016,44(7):533-536.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.151

# 白酒酒糟中抗氧化乳酸菌的筛选及培养基优化

钟正丹<sup>1</sup>,何义国<sup>1</sup>,赵兴秀<sup>1</sup>,赵长青<sup>1</sup>,周 军<sup>2</sup>

(1. 四川理工学院生物工程学院,四川自贡 643000;2. 泸州老窖股份有限公司,四川泸州 646000)

**摘要:**采用稀释涂布法结合革兰氏染色、纸层析法从四川泸州老窖浓香型白酒酒糟中分离乳酸菌,通过测定抗脂质过氧化率、超氧阴离子清除率、DPPH 自由基清除率系统评价筛选的 12 株乳酸菌的抗氧化能力,旨在筛选出高抗氧化活性的乳酸菌,为天然抗氧化剂的开发及乳酸菌在功能性食品中的应用提供理论依据,并对其中 1 株抗氧化活性较高的 4#菌株进行培养基优化。结果表明:共得到 12 株乳酸菌,其中 4#菌株在上述 3 种评价体系中均表现出较强的抗氧化能力。对菌株 4#进行培养基优化,其结果为牛肉膏 20 g/L、葡萄糖 15 g/L、pH 值 6,装液量为 60 mL,且优化后 4#菌株抗氧化能力提高了 43.73 百分点,这将为抗氧化菌株的进一步应用以及抗氧化产品的开发提供一定的理论依据。

**关键词:**酒糟;乳酸菌;抗氧化;培养基优化

**中图分类号:** TS261.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)07-0533-04

乳酸菌广泛存在于泡菜、食醋、白酒、乳制品等发酵食品中,可改善食品风味,为发酵食品提供丰富的营养成分,提高食品附加值。有大量研究表明,乳酸菌具有调节肠道菌群、降低胆固醇、抑菌、抗癌、抗衰老、抗氧化等多种生理功能<sup>[1]</sup>。消费者对食品安全和食品生理功能日益关注,而乳酸菌具有天然无毒、保健益生等特性<sup>[2]</sup>,是一种天然抗氧化剂,这使其抗氧化能力研究成为食品工业的重点与热点<sup>[3]</sup>。

在食品科学领域,抗氧化乳酸菌可防止食品中油脂酸败,清除自由基从而阻止自由基连锁反应。研究表明,机体内自由基与机体衰老、癌症、心血管等疾病<sup>[4-5]</sup>也密切相关,开发抗氧化产品对抗衰老、预防疾病有着重要意义。目前,已有研究者针对抗氧化乳酸菌的筛选、体内外试验、作用机制<sup>[6-7]</sup>、有效成分等方面进行了相应研究。如张书文通过体外试验筛选抗氧化乳酸菌进行抗氧化效果研究<sup>[8]</sup>;刘天祯等从泡菜汁、鹅肠等原料中筛得 2 株抗氧化活性较高的干酪乳杆菌<sup>[9]</sup>。但对于抗氧化乳酸的研究仍处于初级阶段,应用范围还有待扩展。目前,抗氧化乳酸菌主要用于酸奶、抗氧化剂等方面,而在保健食品、酒类及饮料、化妆品等行业仍须不断地开发及创新。

本研究从四川泸州老窖浓香型白酒酒糟中分离抗氧化乳酸菌,以抗脂质过氧化率、超氧阴离子清除率、DPPH 自由基清除率评价菌株抗氧化能力,得到抗氧化能力较强的乳酸菌,并可适应白酒生产过程中复杂的环境,这将对抗氧化酒品及其乙醇饮料开发创新有一定的意义。

## 1 材料与方法

收稿日期:2016-01-08

基金项目:泸州老窖科研奖学金项目(编号:13ljzk05);酿酒生物技术及应用四川省重点实验室项目(编号:NJ2012-16);四川省自贡市科技局项目(编号:2013ZC10)。

作者简介:钟正丹(1991—),女,四川内江人,硕士研究生,研究方向为食品生物技术及代谢调控。E-mail:zzdan\_dan@163.com。

通信作者:赵兴秀,硕士,副教授,研究方向为食品生物技术。E-mail:zhaoxingxiu@sohu.com。

### 1.1 材料与试剂

浓香型白酒酒糟由四川泸州老窖股份有限公司提供。

吐温-80、氯化钠、葡萄糖、琼脂粉、正丁醇、焦性没食子酸、三羟甲基氨基甲烷等均为分析纯(成都市科龙化工试剂厂);硫代巴比妥酸(上海科丰化学试剂有限公司)。

### 1.2 试验仪器

55i + Ds-5M-UI 正置生物显微镜(日本 SONY 公司);UV2400 紫外可见分光光度计(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);UP400S 手提式超声波细胞粉碎机(宁波新生物科技股份有限公司);FL-2 可调式封闭电炉(北京市永光明医疗器械有限公司)。

### 1.3 培养基

MRS 固体培养基:蛋白胨 10.0 g,牛肉膏 10.0 g,酵母膏 5.0 g,柠檬酸氢二铵 2.0 g,葡萄糖 20.0 g,吐温-80 1.0 mL,乙酸钠 5.0 g,磷酸氢二钾 2.0 g,硫酸镁 0.58 g,硫酸锰 0.25 g,琼脂 18.0 g,用蒸馏水补足至 1 L,pH 值 6.5。

初始培养基:蛋白胨 25 g/L,葡萄糖 20 g/L,柠檬酸氢二钠 2 g/L,磷酸氢二钾 2 g/L,乙酸钠 5 g/L,硫酸锰 0.28 g/L,硫酸镁 0.58 g/L,吐温-80 1 mL/L,装液量 50 mL(250 mL 三角瓶),pH 值 6.5。

### 1.4 方法

1.4.1 乳酸菌的分离纯化 称取 5 g 酒糟于 50 mL 离心管中,加入 50 mL 0.8% 生理盐水(加有玻璃珠),涡旋振荡,静置 10 min,取 1 mL 上清液加入 100 mL MRS 液体培养基中,37 ℃ 静置培养 24 h。取 1 mL 培养液进行 10 倍梯度稀释至 10<sup>-7</sup> 浓度,取 0.1 mL 不同浓度稀释液进行涂布,37 ℃ 静置培养 24 h,挑取乳白色、圆形、较小、表面光滑、边缘整齐、中央隆起的菌落进行划线分离纯化,并观察其菌落形态。挑取培养时间为 12 h 的单菌落进行革兰氏染色,观察其显微镜下个体形态。将纯化后菌株接种于 MRS 斜面,于 4 ℃ 冰箱保藏。

1.4.2 过氧化氢试验 挑取 1 环已纯化菌株于洁净试管内,滴加 3% 过氧化氢溶液 2 mL,观察结果。于 0.5 min 内发生气泡者为阳性,不发生气泡者为阴性<sup>[10]</sup>。

1.4.3 乳酸菌定性试验 采用纸层析法<sup>[11]</sup>。

1.4.4 抗氧化乳酸菌的筛选

1.4.4.1 样品前处理 无菌体发酵液(CFE):挑取 1 环纯化菌株接种于 MRS 液体培养基中活化,以 2% 接种量接入 MRS 液体培养基中,37 ℃ 静置培养 24 h 后,4 000 r/min 离心 20 min,收集菌体沉淀,取上清液进行无菌体细胞发酵液抗氧化能力的测定。

菌体细胞提取物(IC):使用磷酸缓冲液(pH 值 7.0)洗涤菌体沉淀 2 次后,用无菌水调整为  $2 \times 10^9$  个/mL 的菌悬液,然后进行冰浴超声波破碎(功率 400 W、工作时间 5 s、间隔时间 5 s、破碎时间 30 min),破碎液于 8 000 r/min 离心 20 min,取上清液进行菌体细胞提取物抗氧化能力的测定。

1.4.4.2 抗脂质过氧化率测定<sup>[12]</sup> 在试管中依次添加 0.5 mL PBS、1 mL 亚油酸、1 mL FeSO<sub>4</sub>、0.54 mL 样品。37 ℃ 水浴 1.5 h,再添加 0.2 mL 三氯乙酸、2 mL 硫代巴比妥酸,沸水浴 30 min 后迅速冷却,4 000 r/min 离心 20 min 后过滤,收集上清液,测定  $D_{532\text{ nm}}$ 。以无菌水代替样品反应为空白组。抗脂质清除率的计算公式如下:

抗脂质过氧化率 =  $(1 - D_{532\text{ nm}}/D_{532\text{ nm}}(\text{空白})) \times 100\%$ 。

1.4.4.3 超氧阴离子自由基清除率测定 采用邻苯三酚法<sup>[13]</sup>。

1.4.4.4 DPPH 自由基清除率的测定<sup>[14]</sup> 在试管中依次添加 4 mL DPPH、2 mL 样品、1 mL 50% 乙醇,在暗处反应 60 min,离心 20 min,取上清液,测定  $D_{517\text{ nm}}$ 。其计算公式如下:

DPPH 自由基清除率 =  $(1 - D_{517\text{ nm}}/D_{517\text{ nm}}(\text{空白})) \times 100\%$ 。

1.4.5 抗氧化乳酸菌的培养条件优化 挑取 1 环抗氧化较强的菌株 9#,接种于初始培养基中,37 ℃ 静置培养 24 h 备用。以 DPPH 自由基清除率为评价指标,分别研究不同碳源种类(葡萄糖、蔗糖、淀粉)、氮源种类(牛肉膏、蛋白胨、酵母膏)、碳源添加量(15、20、25、30 g/L)、氮源添加量(20、25、30、35 g/L)、pH 值(4.0、5.0、6.0、7.0)、装液量(40、50、60、70 mL)对 DPPH 自由基清除率的影响,从而得到最优培养基组合。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的分离纯化

从浓香型白酒酒糟中共分离出 12 株乳酸菌,分别编号为 1~12#,通过观察其菌落形态、个体形态,12 株过氧化氢试验结果均为阴性,故初步鉴定为乳酸菌。其菌落形态、个体形态以 4#为例,如图 1 所示。

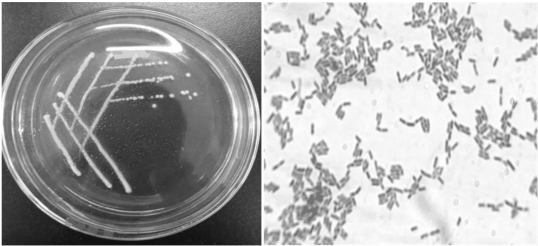


图1 4#菌落形态(左)以及革兰氏镜检结果(右)

2.2 乳酸菌定性试验

将 12 株菌株分别接种至 MRS 液体培养基中,于 37 ℃、150 r/min 培养 24 h,离心取上清液进行纸层析,计算各菌株

$R_f$  值,其结果见表 1。由表 1 可知,乳酸的  $R_f$  值为 0.53,各菌株  $R_f$  值均为 0.53 左右,故 12 株菌株可确定为乳酸菌。

表 1 乳酸菌纸层析结果

| 菌株  | $R_f$ 值 |
|-----|---------|
| 1#  | 0.53    |
| 2#  | 0.53    |
| 3#  | 0.54    |
| 4#  | 0.53    |
| 5#  | 0.53    |
| 6#  | 0.54    |
| 7#  | 0.53    |
| 8#  | 0.52    |
| 9#  | 0.53    |
| 10# | 0.53    |
| 11# | 0.53    |
| 12# | 0.51    |
| 乳酸  | 0.53    |
| 空白  | 0       |

2.3 抗氧化乳酸菌的筛选

2.3.1 抗脂质过氧化率测定 12 株菌分别接种于 MRS 液体培养基中,于 37 ℃ 150 r/min 培养 24 h,经样品处理后得到无菌体发酵液和菌体细胞提取物,分别测定抗脂质过氧化清除率,其结果如表 2 所示。

表 2 乳酸菌菌体及发酵液抗脂质过氧化率的检测

| 菌株编号 | 无菌体发酵液清除率(%) | 菌体细胞提取物清除率(%) |
|------|--------------|---------------|
| 1    | 10.07        | 44.28         |
| 2    | 13.09        | 31.68         |
| 3    | 11.12        | 37.02         |
| 4    | 10.23        | 47.71         |
| 5    | 9.31         | 27.10         |
| 6    | 8.14         | 11.03         |
| 7    | 9.31         | 38.64         |
| 8    | 5.76         | 16.73         |
| 9    | 10.07        | 47.33         |
| 10   | 2.42         | 38.17         |
| 11   | 3.23         | 41.60         |
| 12   | 4.79         | 19.85         |

由表 2 可知,不同乳酸菌的发酵液和菌体细胞提取物的抗脂质过氧化率差异很大。其中,发酵液的抗脂质过氧化清除率较高的有 1#、2#、3#、4#、9#,分别为 10.07%、13.09%、11.12%、10.23%、10.07%。菌体细胞提取物的抗脂质过氧化清除率较高的有 1#、4#、9#、11#,分别为 44.28%、47.71%、47.33%、41.60%。无菌体发酵液和菌体细胞提取物的抗脂质过氧化清除率均较高的为 1#、4#、9#。

2.3.2 超氧阴离子自由基清除能力的比较 12 株菌分别接种于 MRS 液体培养基中,于 37 ℃、150 r/min 培养 24 h,经样品处理后,得到无菌体发酵液和菌体细胞提取物,通过邻苯三酚法分别对各菌株的超氧阴离子自由基清除能力进行研究,结果如表 3 所示。

由表 3 可知,无菌体发酵液的超氧阴离子清除率较高的有 2#、3#、4#、9#,分别为 32.47%、35.12%、43.76%、35.01%。菌体细胞提取物的超氧阴离子清除率较高的有 4#、5#、9#,分别为 37.56%、40.88%、42.29%。无菌体发酵液和菌体细胞提取物的超氧阴离子清除率均较高的为 4#、9#。

表 3 乳酸菌菌体及发酵液对超氧阴离子的清除率

| 菌株编号 | 无菌体发酵液清除率(%) | 菌体细胞提取物清除率(%) |
|------|--------------|---------------|
| 1    | 12.63        | 31.58         |
| 2    | 32.47        | 25.58         |
| 3    | 35.12        | 19.24         |
| 4    | 43.76        | 37.56         |
| 5    | 2.07         | 40.88         |
| 6    | 8.21         | 26.10         |
| 7    | 12.52        | 13.90         |
| 8    | 11.81        | 33.16         |
| 9    | 35.01        | 42.29         |
| 10   | 11.10        | 10.02         |
| 11   | 12.57        | 24.78         |
| 12   | 13.64        | 27.15         |

2.3.3 DPPH 自由基清除率的比较 12 株菌分别接种于 MRS 液体培养基中,于 37 ℃、150 r/min 培养 24 h,经样品处理后,得到无菌体发酵液和菌体细胞提取物,分别对各菌株的 DPPH 自由基清除能力进行研究,结果如表 4 所示。

表 4 乳酸菌菌体及发酵液对 DPPH 自由基清除率

| 菌株编号 | 无菌体发酵液清除率(%) | 菌体细胞提取物清除率(%) |
|------|--------------|---------------|
| 1    | 6.49         | 33.04         |
| 2    | 15.05        | 38.41         |
| 3    | 16.52        | 23.66         |
| 4    | 23.96        | 41.07         |
| 5    | 9.14         | 35.28         |
| 6    | 8.85         | 15.36         |
| 7    | 13.86        | 11.16         |
| 8    | 11.51        | 24.55         |
| 9    | 25.96        | 33.21         |
| 10   | 19.76        | 12.95         |
| 11   | 18.88        | 19.20         |
| 12   | 16.81        | 32.59         |

由表 4 可知,无菌体发酵液的 DPPH 自由基清除率较高的有 4#、9#、10#,分别为 23.96%、25.96%、19.76%;菌体细胞提取物的 DPPH 自由基清除率较高的有 1#、2#、4#、5#、9#,分别为 33.04%、38.41%、41.07%、35.28%、33.21%。无菌体发酵液和菌体细胞提取物的 DPPH 自由基清除率均较高的为 4#、9#。

综上所述,菌株 4#、9#的抗氧化能力最强,且其菌体细胞提取物的抗氧化能力均高于无菌体发酵液,后续试验选择 4#菌株作为出发菌进行研究。

2.4 抗氧化乳酸菌的培养基优化

2.4.1 不同碳源及碳源添加量对抗氧化能力的影响 选取抗氧化性较强的乳酸菌 4#,分别接入不同碳源(葡萄糖、蔗糖、淀粉)和不同碳源添加量(15、20、25、30 g/L) MRS 液体培养基中培养,测定无菌体发酵液对 DPPH 自由基清除率,结果如图 2 和图 3 所示。

由图 2 和图 3 可知,以葡萄糖为碳源时,无菌体发酵液对 DPPH 自由基清除率最高,达到 21.36%;葡萄糖添加量为 15 g/L,清除率达到最高,为 47.5%,并随着添加量的增加,清除率缓慢下降后在 20~25 g/L 时急剧下降。故菌株 4#最佳

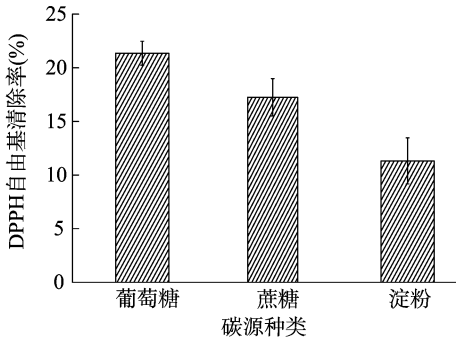


图2 碳源种类对抗氧化能力的影响

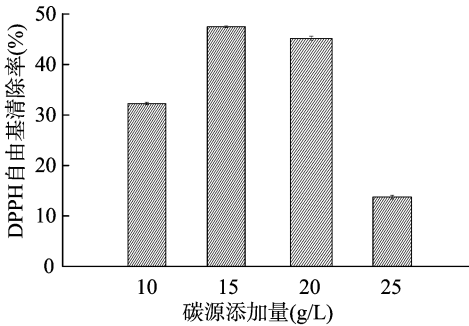


图3 碳源浓度对抗氧化能力的影响

碳源为葡萄糖,最佳添加量为 15 g/L。

2.4.2 不同氮源及氮源添加量对抗氧化能力的影响 将乳酸菌 4#分别接入不同氮源(牛肉膏、蛋白胨、酵母膏)和不同氮源添加量(20、25、30、35 g/L) MRS 液体培养基中培养,测定无菌体发酵液对 DPPH 自由基清除率,其结果如图 4、图 5 所示。

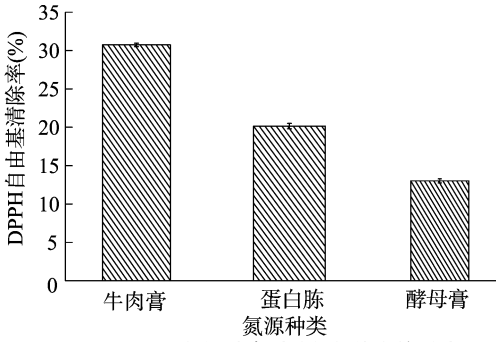


图4 氮源种类对抗氧化能力的影响

由图 4、图 5 可知,氮源为牛肉膏时,其无菌体发酵液对 DPPH 自由基清除率明显高于酵母膏和蛋白胨;同时,清除率随着牛肉膏添加量的增加而先增高后缓慢降低,在 25 g/L 时,DPPH 自由基清除率最高,达到 30.86%,故菌株 4#最佳氮源为牛肉膏,最佳添加量为 25 g/L。

2.4.3 不同 pH 值和装液量对抗氧化的影响 pH 值和装液量是影响菌体生长的重要指标,将乳酸菌 4#分别接入不同 pH 值(4.0、5.0、6.0、7.0)和不同装液量(40、50、60、70 mL) MRS 液体培养基中培养,测定无菌体发酵液对 DPPH 自由基清除率,结果见图 6、图 7。

由图 6、图 7 可知,随着 pH 值上升,DPPH 自由基清除率明显上升后下降;pH 值为 6 时,清除率达到最高,为 47.58%,因此培养基的最优 pH 值为 6。不同装液量的 DPPH

自由基清除率差异明显,随装液量的增加,DPPH 自由基清除率先上升后下降,在装液量为 60 mL 时,DPPH 自由基清除率最高为 42.57%,故菌株最佳装液量为 250 mL 三角瓶中 60 mL。

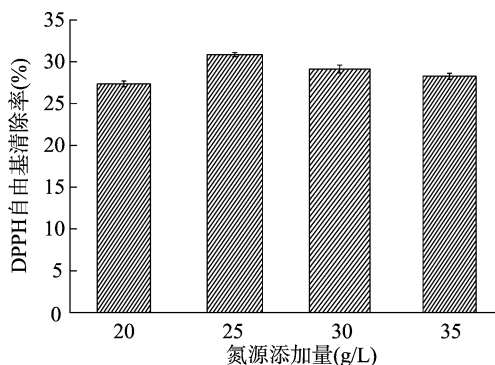


图5 氮源浓度对抗氧化能力的影响

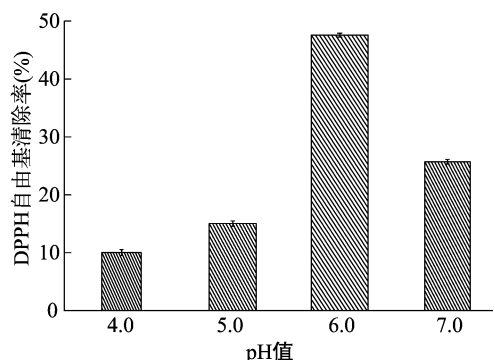


图6 pH值对DPPH自由基清除率的影响

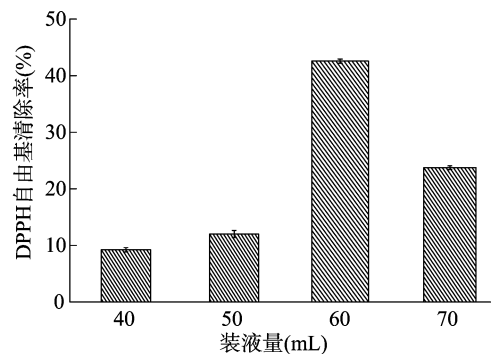


图7 装液量对DPPH自由基清除率的影响

综上所述,菌株4#的最佳培养基条件为:牛肉膏 20 g/L、葡萄糖 15 g/L、柠檬酸氢二钠 2 g/L、磷酸氢二钾 2 g/L、乙酸钠 5 g/L、硫酸锰 0.25 g/L、硫酸镁 0.58 g/L、吐温-80 1 mL/L,pH 值为7,装液量为 60 mL。

## 2.5 培养基优化验证试验

将菌株4#分别接入初始培养基和最佳培养基中,测定无菌体发酵液的抗脂质过氧化清除率、超氧阴离子清除率、DPPH 自由基清除率,比较培养基优化效果,其结果如表5所示。

由表5可知,优化后的无菌体发酵液的抗脂质过氧化率、超氧阴离子清除率稍有增高,DPPH 自由基清除率明显增高,分别增加 6.18、8.13、29.42 百分点。结合3种清除率,优化后菌种的抗氧化能力有较大的增长,增量达到 43.73 百分点。

表5 培养基优化验证

| 培养基   | 抗脂质过氧化率(%) | 超氧阴离子清除率(%) | DPPH 自由基清除率(%) | 总计(%)  |
|-------|------------|-------------|----------------|--------|
| 初始培养基 | 10.07      | 35.01       | 25.96          | 71.04  |
| 最佳培养基 | 16.25      | 43.14       | 55.38          | 114.77 |

## 3 结论

以四川泸州老窖浓香型白酒酒糟为原料,采用稀释涂布法结合革兰氏染色、纸层析法分离乳酸菌,测定抗脂质过氧化率、超氧阴离子清除率、DPPH 自由基清除率,以比较菌株抗氧化能力,并采用单因素试验进行培养基优化。结果表明:共得到 12 株乳酸菌,以抗脂质过氧化率、超氧阴离子清除率、清除 DPPH 自由基为抗氧化评价指标,菌株4#、9#抗氧化能力最强。采用单因素试验对4#培养基的碳源、碳源添加量、氮源、氮源添加量、pH 值、装液量进行优化,其优化结果为牛肉膏 20 g/L、葡萄糖 15 g/L、pH 值7,装液量为 60 mL,且优化后4#抗氧化能力提高了 43.73 百分点,这为抗氧化菌株的生产应用、开发相关抗氧化产品提供一定的理论依据。同时,对于该菌株的培养条件优化以及工业应用还有待进一步探索。

## 参考文献:

- [1]彭新颜,于海洋,李杰,等. 乳酸菌抗氧化作用研究进展[J]. 食品科学,2012,33(23):370-374.
- [2]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.
- [3]王曦,罗霞,许晓燕,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):197-201.
- [4]李素云,王立芹,郑稼琳,等. 自由基与衰老的研究进展[J]. 中国老年学杂志,2007,27(20):2046-2048.
- [5]李勇,孔令青,高洪,等. 自由基与疾病研究进展[J]. 动物医学进展,2008,29(4):85-88.
- [6]Kullisaar T, Zilmer M, Miksaar M, et al. Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics[J]. International Journal of Food Microbiology,2002,72(3):215-224.
- [7]Talwalkar A, Kailasapathy K, Hourigan J, et al. An improved method for the determination of NADH oxidase in the presence of NADH peroxidase in lactic acid bacteria[J]. Journal of Microbiological Methods,2003,52(3):333-339.
- [8]张书文. 抗氧化乳酸菌的筛选及其特性研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2009.
- [9]刘天祯,潘道东. 抗氧化活性乳酸菌的筛选[J]. 食品科学,2011,32(19):125-129.
- [10]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.
- [11]中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法[M]. 北京:科学出版社,1978.
- [12]Lee J, Hwang K T, Heo M S, et al. Resistance of *Lactobacillus plantarum* KCTC 3099 from kimchi to oxidative stress[J]. Journal of Medicinal Food,2005,8(3):299-304.
- [13]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.
- [14]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):10-12,19.