DOI:10.12441/spyswjs.20240307001 [文章编号] 1673-1689(2026)02-0163-10

兰州甜胚子中乳酸菌的分离鉴定及益生特性研究

李成庚 许飘然 马莎莎 高丹丹 刘珊珊*

(西北民族大学生命科学与工程学院,甘肃 兰州 730030)

摘要:【目的】筛选优质的食源性乳酸菌。**【方法】**采用传统微生物培养方法结合16S rRNA测序对兰州甜胚子中的乳酸菌进行分离、纯化及鉴定,并从酸及胆盐耐受性、抗生素敏感性、抑菌活性和体外抗氧化活性等方面综合评价其益生特性。**【结果】**从兰州甜胚子中共分离鉴定出6株乳酸菌,分别为副干酪乳酪杆菌(*Lacticaseibacillus paracasei*)PR6、发酵粘液乳杆菌(*Limosilactobacillus fermentum*)PR10、类肠膜魏斯氏菌(*Weissella paramesenteroides*)PR13、戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)PR15、乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*)PR17和融合魏斯氏菌(*Weissella confusa*)PR18。益生特性结果表明,菌株PR10在酸性(pH 2.5和3.0)、胆盐环境下均有较高的存活率,对环丙沙星、氨苄西林、四环素和青霉素等常用抗生素具有中高度敏感性,且可有效抑制食源性致病菌(金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌);菌株PR18具有较好的抗氧化活性,其1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除率和还原能力分别为67.6%和42.7%,且菌株PR18的酸及胆盐耐受性仅次于菌株PR10。**【结论】**发酵粘液乳杆菌PR10和融合魏斯氏菌PR18具有潜在的益生特性,可作为候选菌株开展进一步研究。

关键词:甜胚子;乳酸菌;筛选;益生特性

Isolation, Identification, and Probiotic Property Characterization of Lactic Acid Bacteria from Fermented Sweet Oats (Tianpeizi) in Lanzhou

*LI Chenggeng XU Piaoran MA Shasha GAO Dandan LIU Shanshan**

(School of Life Sciences and Engineering, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to screen high-quality food-borne lactic acid bacteria. [**Method**] Lactic acid bacteria were isolated, purified, and identified from traditional fermented sweet oats (Tianpeizi) in Lanzhou by conventional microbial culture methods combined with 16S rRNA gene sequencing. The probiotic properties of the isolates were comprehensively evaluated based on acid and bile salt tolerance, antibiotic susceptibility, antibacterial activity, and *in vitro* antioxidant capacity. [**Result**] A total of six strains of lactic acid bacteria were isolated and identified from Tianpeizi in Lanzhou, including *Lacticaseibacillus paracasei* (*L. paracasei*) PR6, *Limosilactobacillus fermentum* (*L. fermentum*) PR10, *Weissella paramesenteroides* (*W. paramesenteroides*) PR13, *Pediococcus pentosaceus* (*P. pentosaceus*) PR15, *Pediococcus acidilactici* (*P. acidilactici*) PR17, and *Weissella confusa* (*W. confusa*) PR18. The probiotic property assay showed that strain PR10 exhibited high survival rates under acidic conditions (pH 2.5 and 3.0) and in the presence of bile salts. It showed moderate to high susceptibility to commonly used antibiotics, including ciprofloxacin, ampicillin, tetracycline, and penicillin, and demonstrated strong inhibitory activity against foodborne pathogens (*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*). Strain PR18 displayed notable antioxidant activity, with 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine (DPPH) free radical scavenging rate and reducing power of 67.6% and 42.7%, respectively. In addition, strain PR18 showed

基金项目:西北民族大学引进人才项目(xbmuyjrc202222,xbmuyjrc202223);中央高校基本科研业务费项目(31920230059);甘肃省青年科技基金项目(22JR11RA238)。

通信作者:刘珊珊(1991—),女,讲师,博士,主要从事分子生物学研究。E-mail:liushsh@xbmu.edu.cn

收稿日期:2024-03-07 **修回日期:**2024-04-25

good acid and bile salt tolerance, second only to strain PR10. [**Conclusion**] *L. fermentum PR10* and *W. confusa* PR18 exhibit promising probiotic potential and may serve as candidate strains for further studies.

Keywords: fermented sweet oats (Tianpeizi); lactic acid bacterium; screening; probiotic property

甜胚子，即酒醅子，是一种广泛流传于我国西北地区的传统特色美食，主要以莜麦和青稞作为原材料自然发酵而成。甜胚子具有鲜明的地域特色，早在几个世纪之前我国甘肃地区就有制作和食用甜胚子的传统。兰州甜胚子作为甜胚子的典型代表，具有悠久的酿造历史，其口感酸甜、酒香浓郁、清凉解暑。此外，甜胚子还是兰州地区清明和端午的节日食品，是兰州传统饮食文化的重要组成部分[1]。甜胚子和醪糟的制作原理有异曲同工之妙，两者都是由酒曲发酵而成，但在风味、口感和营养价值方面具有较大差异，除了原料不同外，其根本原因在于发酵食品风味物质的形成过程中微生物的丰度不同。

相较于工业化生产，传统发酵食品微生物多样性更高，发酵风味更加独特，是研究不同地域及民族特色饮食的天然菌种库。发酵食品中最主要的微生物是乳酸菌，由于地理位置、食品基质、工艺流程等方面的差异，不同发酵食品的乳酸菌种类及性能具有较大差异。近年来，越来越多的学者将研究焦点转向传统发酵食品醪糟或米酒。例如，党辉等[2]对礼泉醪糟中的微生物多样性进行分析，发现乳杆菌属（*Lactobacillus*）是优势细菌属，占比可达 85.25%；向凡舒等[3]对湖北孝感和四川成都米酒曲发酵制作的米酒进行了乳酸菌多样性研究，发现大部分乳酸菌隶属于乳杆菌属（*Lactobacillus*）、片球菌属（*Pediococcus*）和魏斯氏菌属（*Weissella*）等。乳酸菌在发酵过程产生的有机酸、双乙酰和酮类等风味物质，对这些传统发酵食品的感官品质起到了关键作用[4]。虽然甜胚子是西北地区的特色传统发酵美食之一，但目前以甜胚子为分离源的乳酸菌研究较少，其丰富的微生物菌种资源未得到有效开发利用。

本研究使用传统微生物培养方法及 16S rRNA 测序对兰州甜胚子中的乳酸菌进行分离、纯化及鉴定，从耐酸及耐胆盐性能、抗氧化活性及抑菌性能等方面进行评价，综合分析乳酸菌的益生特性，筛选出甜胚子中的优良菌株，为甜胚子中微生物资源的开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料

从兰州市区不同的农贸市场采集 17 份传统发酵的甜胚子样品，将样品置于无菌采样管中，低温运送至实验室，于 4 ℃储存备用。

1.1.2 试剂

MRS 培养基、革兰氏染色试剂盒、2,2-联苯基-1-苦基肼基（DPPH）、LB 液体培养基、磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline，PBS）、过硫酸钾、2,2’-联氮-双（3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸）二铵盐（ABTS）、指示菌（埃希氏大肠杆菌 ATCC25922、枯草芽孢杆菌 CMCC（B）63501、金黄色葡萄球菌 ATCC25923）：青岛海博生物科技有限公司；牛胆盐试剂：杭州微生物试剂有限公司；MRS 肉汤琼脂培养基：北京陆桥技术股份有限公司；四环素、青霉素、环丙沙星、氨苄西林：上海麦克林生化科技股份有限公司；细菌基因组 DNA 提取试剂盒（DP302）：天根生化科技（北京）有限公司；其他有机试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

双人单面循环净化工作台：VS-1300-U 型，中国苏州智净净化设备有限公司；立式高压蒸汽灭菌器：LDZM-60L-I 型，上海申安医疗器械厂；恒温电子水浴锅：SCG-4 型，宁波新芝生物科技股份有限公司；电子天平：FA1204B 型，上海精密科学仪器有限公司；恒温培养箱：DHP-9032T 型，上海一恒科技有限公司；紫外-可见分光光度计：UV2355 型，尤尼柯（上海）仪器有限公司；高速台式离心机：H1650 型，长沙湘仪离心机仪器有限公司；倒置生物显微镜：LK-90 型，天津徕科光学仪器有限公司；梯度 PCR 仪：VeritiPro 型，美国赛默飞世尔科技公司。

1.3 方法

1.3.1 乳酸菌的分离与鉴定

将低温保存的样品取出，在超净台中用移液枪吸取适量均匀澄清的样品，用 10 倍梯度稀释法，利用灭菌生理盐水对样品进行稀释。选取 1×10^{-3}、

1×10^{-4}、1×10^{-5}浓度梯度的稀释液各0.1 mL，分别涂布于含有碳酸钙的无菌MRS固体培养基上，于37 ℃恒温培养48 h。挑取具有溶钙圈的菌落，在平板上进行反复划线7~8次，直至得到单菌落，将得到的菌落制作成菌悬液备用[5]。

将纯化培养得到的单菌落接种于MRS固体培养基上，于37 ℃培养24 h后，采用革兰氏染色法对其进行染色鉴定，通过细胞形状、大小、革兰氏染色等形态学分类特征进行初步鉴定。同时，挑取少量MRS固体培养基上的菌落，置于洁净的玻片上，滴加体积分数3%的过氧化氢溶液1~2滴。静置1 min内产生大量气泡则为过氧化氢酶阳性，反之则为过氧化氢酶阴性。对过氧化氢阴性且革兰氏染色阳性的菌株进行传代培养，冷冻干燥后保存备用。

1.3.2 16S rRNA序列分析

用细菌基因组DNA提取试剂盒（DP302）提取菌液样品的总DNA，具体操作流程参照试剂盒说明书。用超微量紫外-可见分光光度计测定DNA的浓度和纯度。随后，对提取得到的不同菌株DNA进行16S rRNA基因扩增[6]，选用通用引物27F（5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′）和1492R（5′-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3′）进行PCR扩增。扩增条件为：95 ℃预变性5 min；95 ℃变性30 s，60 ℃退火30 s，72 ℃延伸1 min，进行30个循环；72 ℃末端延伸5 min。使用1 g/dL的琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行定量检测。将检验合格的扩增产物送至武汉金开瑞生物工程有限公司进行测序。测序结果提交至GenBank数据库，利用BLAST分析序列同源性，选择相似性最高的同源菌株在MEGA 11中进行系统发育分析，对分离所得菌株进行分子生物学鉴定。

1.3.3 耐酸、耐胆盐试验

按照接种体积分数2%将活化后的菌悬液[7]分别接种于pH 2.5和pH 3.0（由1 mol/L的硫酸配制）的MRS肉汤培养基中，于37 ℃静置培养3 h，分别在0、3、6 h时取样并进行梯度稀释，选取合适浓度的菌悬液涂布在平板上，观察菌落生长状况，采用平板计数法计算活菌数，并按照式（1）计算菌株存活率。

$$S=A/B\times100\% \quad (1)$$

式中：

S——菌株存活率，%；

A——分别培养3、6 h的活菌浓度，CFU/mL；

B——初始（0 h）菌浓度，CFU/mL。

分别取100 μL体积分数2%的活化后的菌悬液，接种于含不同牛胆盐质量浓度（2、5、10、20 g/L）的MRS肉汤培养基中，于37 ℃恒温培养3 h，使用紫外-可见分光光度计分别检测0、3 h培养液的OD_{600}值，按照式（2）计算菌株存活率。

$$S_1=C/D\times100\% \quad (2)$$

式中：

S_1——菌株存活率，%；

C——培养3 h的OD_{600}值；

D——0 h的OD_{600}值。

1.3.4 抗生素敏感性试验

使用滤纸片扩散法[8]检测筛选菌株的抗生素敏感性。取100 μL体积分数2%的菌悬液涂布于MRS培养基平板上，将含有标准剂量抗生素的药敏纸片置于平板表面，于37 ℃培养24 h。根据美国临床和实验室标准协会（Clinical and Laboratory Standards Institute，CLSI）标准，通过抑菌圈直径确定菌株的抗生素敏感性。

1.3.5 抑菌试验

使用牛津杯法[9]检测菌株的抑菌活性。将致病性金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌活化后接种到LB液体培养基中，于37 ℃培养18 h，取100 μL菌悬液分别稀释到1×10^5~1×10^6 CFU/mL。取100 μL稀释后的致病菌菌悬液均匀涂布于LB固体培养基上，然后将牛津杯置于其中。将活化后的乳酸菌菌株以接种体积分数2%接种于MRS培养基中，于37 ℃培养24 h后，再于4 ℃、6 000 r/min条件下离心10 min，获得乳酸菌上清液。在每个致病菌培养基的牛津杯中加入150 μL乳酸菌上清液，以无菌MRS培养基作为空白对照，于37 ℃静置培养18~24 h，观察并记录抑菌圈直径。

1.3.6 抗氧化活性的测定

通过测定菌株的还原能力和DPPH自由基、$ABTS^+$自由基清除能力评价菌株的抗氧化活性。参考杨博等[10]的方法制备抗氧化活性样品。

1）还原能力的测定：将0.5 mL 0.2 mol/L的PBS和0.5 mL 1 g/100 mL的铁氰化钾溶液混合均匀，加入0.5 mL菌悬液，摇匀后于50 ℃反应20 min，迅速冷却。再加入0.5 mL 10 g/100 mL的

三氯乙酸溶液，于 4 000 r/min 离心 5 min。分别取 1 mL 乳酸菌上清液、1 mL 蒸馏水和 1 mL 0.1 g/100 mL 的三氯化铁混合均匀，反应 10 min 后，在波长 700 nm 处测定溶液的 OD_{700} 值，按照式（3）计算还原能力。

$$R=\frac{B_1-B_0}{B_0}\times 100\% \quad (3)$$

式中：

R——菌株的还原能力，%；

B_0——PBS 的 OD_{700} 值；

B_1——待测样品的 OD_{700} 值。

2）$ABTS^+$ 自由基清除率的测定：参考 Jia 等[11]的方法并稍加修改。取 2.5 mL 7 mmol/L 的 ABTS 溶液，加入 45 μL 140 mmol/L 的过硫酸钾溶液，混合均匀后置于室温、避光条件下反应 12 h，制备 ABTS 储备液。使用 20 mmol/L、pH 7.4 的 PBS 稀释 ABTS 储备液，制备 ABTS 工作液，使工作液的吸光度为 0.700±0.002。分别将 30 μL 待测菌悬液与 3.0 mL ABTS 工作液充分混合，反应 8 min 后测定其 OD_{734} 值，并按照式（4）计算 $ABTS^+$ 自由基清除率。

$$F_1=\left(1-\frac{C_1-C_2}{C_0}\right)\times 100\% \quad (4)$$

式中：

F_1——$ABTS^+$ 自由基清除率，%；

C_1——待测样品与 $ABTS^+$ 工作液反应后的吸光度；

C_2——待测样品与 PBS 反应后的吸光度；

C_0——$ABTS^+$ 工作液与 PBS 反应后的吸光度。

3）DPPH 自由基清除率的测定[12]：在 2 mL 菌悬液中加入 1 mL 0.2 mmol/L 的 DPPH-乙醇溶液，作为样品组；在 2 mL 菌悬液中加入 1 mL 无水乙醇溶液，作为空白组；在 2 mL 蒸馏水中加入 1 mL 0.2 mmol/L 的 DPPH-乙醇溶液，作为对照组。于 37 ℃避光反应 30 min，6 000 r/min 离心 10 min，取上清液。分别在波长 517 nm 处测量样品组、空白组和对照组的吸光度，按照式（5）计算 DPPH 自由基清除率。

$$F_2=\left(1-\frac{D_1-D_2}{D_0}\right)\times 100\% \quad (5)$$

式中：

F_2——DPPH 自由基清除率，%；

D_1——样品组的吸光度；

D_2——对照组的吸光度；

D_0——空白组的吸光度。

1.3.7 数据处理与统计分析

使用 SPSS 25.0 及 Excel 2019 软件进行数据处理及显著性分析，每个处理组分别进行 3 次平行试验，数据结果表示为平均值±标准差，采用 GraphPad 10.0 软件绘图。

2 结果与讨论

2.1 乳酸菌初筛鉴定结果

通过对含有溶钙圈的菌株进行多次划线纯化，从样品中共分离纯化得到 21 株纯培养物。使用革兰氏染色对初筛菌株进行形态学观察，共得到 9 株革兰氏阳性细菌。这些初筛菌落大小不一，颜色多呈白色、乳白色至浅黄色，形状圆滑，边缘完整。镜检结果显示，菌株细胞呈杆状或球杆状，以单个、成对或链状排列，无芽孢，见图 1。

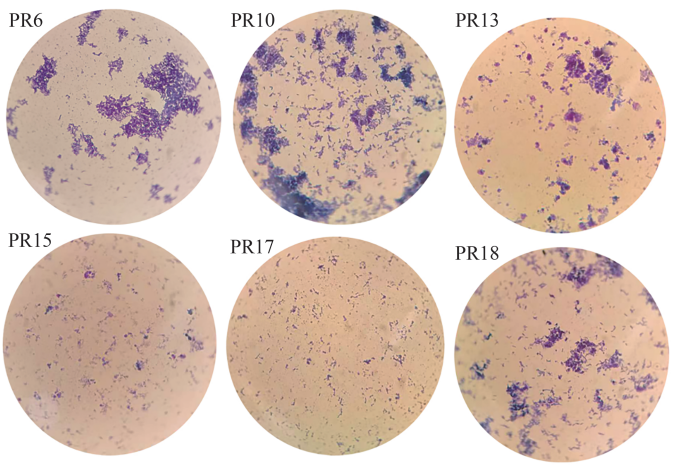


图 1 初筛菌株的镜检结果

Fig. 1 Microscopic images of the initially screened strains

将9株疑似菌株进行过氧化氢酶试验，结果显示，菌株PR11、PR12、PR16为革兰氏阳性菌，其余均为革兰氏阴性菌。因此初步筛选鉴定出6株乳酸菌。

2.2　16S rRNA序列鉴定结果

使用形态学观察结合分子生物学手段能够快速鉴定菌种。本研究对初筛的6株乳酸菌的16S rRNA基因的V3—V4区进行PCR扩增，结果见图2。6个样品均扩增得到1 500 bp左右的目的条带，纯化回收后进行目的基因测序。利用Genbank数据库进行菌株目的序列的同源性比对，选择序列相似度最高的菌株构建系统发育树。

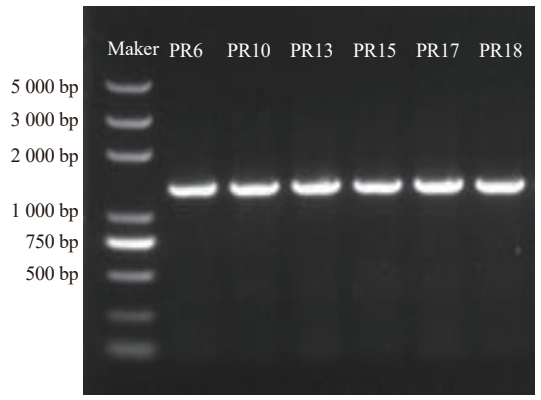


图2　乳酸菌16S rRNA基因片段PCR扩增电泳结果

Fig. 2　Electrophoresis of PCR products of 16S rRNA gene fragment of lactic acid bacteria

系统发育树结果表明，PR6、PR10、PR13、PR15、PR17、PR18分别与副干酪乳酪杆菌（*L. paracasei*）、发酵粘液乳杆菌（*L. fermentum*）、类肠膜魏斯氏菌（*W. paramesenteroides*）、戊糖片球菌（*P. pentosaceus*）、乳酸片球菌（*P. acidilactici*）和融合魏斯氏菌（*W. confusa*）的亲缘关系最近，可聚为同一分支，且均有较高的支持率，见图3。如表1所示，BLAST检索的序列相似度高达99.50%~100.00%，因此，以上初筛菌株可确定与相应的模式菌株为同一菌种。

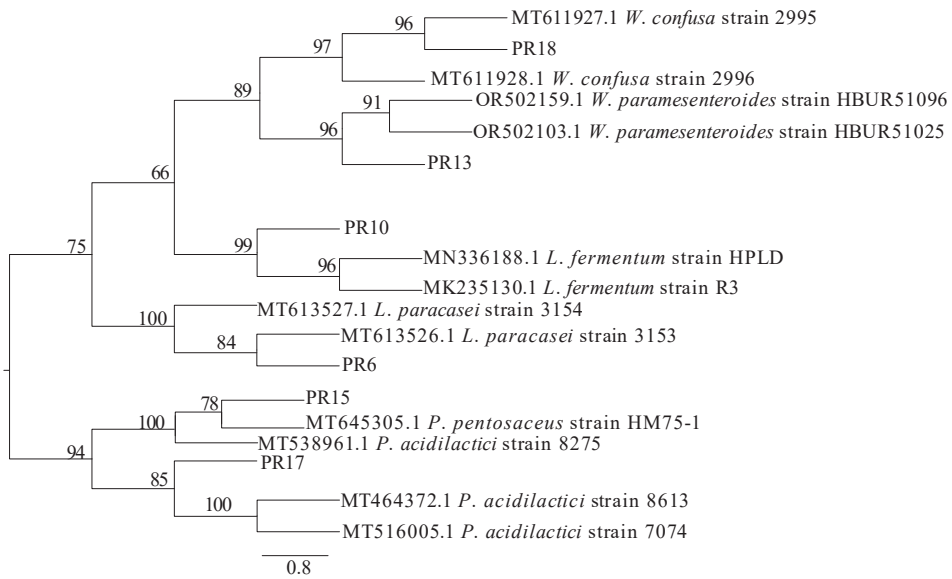


图3　系统发育树

Fig. 3　Phylogenetic tree

表1　菌种鉴定结果

Table 1　Results of bacterial identification

菌株编号	同源菌株	相似度/%
PR6	副干酪乳酪杆菌（*L. paracasei*）	100.00
PR10	发酵粘液乳杆菌（*L. fermentum*）	99.90
PR13	类肠膜魏斯氏菌（*W. paramesenteroides*）	100.00
PR15	戊糖片球菌（*P. pentosaceus*）	99.50
PR17	乳酸片球菌（*P. acidilactici*）	100.00
PR18	融合魏斯氏菌（*W. confusa*）	100.00

2.3　乳酸菌的益生特性

2.3.1　耐酸及耐胆盐特性

乳酸菌发挥益生作用的前提是能够在宿主胃肠道上皮表面黏附和定植。因此，对胃的酸性及肠道胆盐环境的耐受性是其发挥生态调节功能的关键[13]。分别在pH 2.5和3.0的条件下对分离菌株进行培养，以测定其耐酸及耐胆盐特性。如表2

所示，在 pH 为 3.0 时菌株均能存活，培养 3 h 后菌株 PR13 的存活率最高，可达（144.10±1.33）%，而菌株 PR15 仅为（49.84±0.27）%；培养 6 h 后，所有菌株的存活率均下降，菌株 PR15 和 PR17 的存活率下降至 40% 以下，而菌株 PR10 和 PR13 还能达到 115% 以上。而在 pH 为 2.5 的培养基中，培养 3 h 后所有菌株的存活率均明显下降，菌株 PR10 的存活率为（94.03±3.05）%，显著高于其他菌株，菌株 PR13 的存活率降至（26.39±3.86）%，表明该菌株对于酸性环境的变化较为敏感；培养 6 h 后，菌株 PR6 的存活率下降至（11.72±1.93）%，而其他菌株下降不明显，存活率均在 20% 以上。其中菌株 PR17 在 pH 为 3.0 和 2.5 时的存活率差异较小，该菌株与菌株 PR13 相反，对酸的变化不太敏感。综上，菌株 PR10 对强酸环境的耐受能力较好，能更好地适应胃液环境，从而发挥其益生作用。

表 2　菌株酸耐受性试验结果

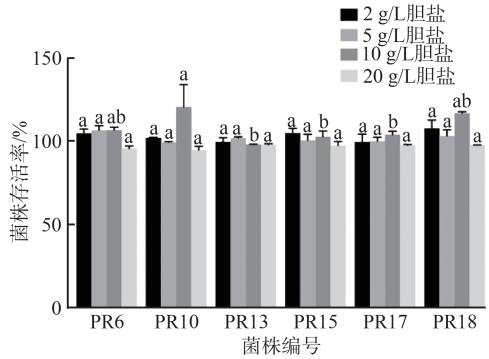
Table 2　Results of acid tolerance test for lactic acid bacteria

菌株编号	pH 3.0		pH 2.5	
	培养 3 h 的存活率/%	培养 6 h 的存活率/%	培养 3 h 的存活率/%	培养 6 h 的存活率/%
PR6	69.01±2.69	49.68±1.52	21.46±1.07	11.72±1.93
PR10	140.70±1.46	129.50±2.31	94.03±3.05	88.51±1.19
PR13	144.10±1.33	118.5±3.15	26.39±3.86	23.19±2.29
PR15	49.84±0.27	35.07±1.63	45.68±2.88	39.69±1.63
PR17	52.02±1.39	38.38±1.86	35.63±3.15	35.10±1.05
PR18	104.24±2.00	88.19±3.50	46.58±2.98	37.74±0.04

乳酸菌进入消化道后，其活力往往会受到胃肠液中胆盐的影响，从而影响其益生作用[14]。因此，胆盐的耐受能力是决定菌种活性的核心指标[15]。如图 4 所示，使用 2、5、10、20 g/L 胆盐处理 6 株乳酸菌 3 h 后，所有菌株都能存活，胆盐耐受能力无明显差异；20 g/L 胆盐处理时，菌株存活率开始下降。值得注意的是，使用 10 g/L 胆盐处理 3 h 后，菌株 PR10 存活率不降反升，显著高于菌株 PR13、PR15 和 PR17。综合耐酸性测定结果，菌株 PR10 具有较好的耐酸及耐胆盐特性。

2.3.2　抗生素敏感性

乳酸菌作为食品工业中的重要菌种，一直是公认安全的食品用微生物之一。然而，抗生素的不当使用可能会使乳酸菌产生耐药性，耐药基因可水平转移至其他肠道细菌甚至是致病菌，从而危害人体健康[16]。因此，乳酸菌的抗生素敏感性也是评价其益生特性的重要指标之一。使用环丙沙星、四环素等 4 种常见的抗生素对 6 株乳酸菌进行药物敏感性试验，参考 CLSI 标准进行结果判定。由表 3 可知，菌株 PR10、PR15 和 PR18 均对 4 种抗生素呈现出中高度敏感性，说明其可被这几种抗生素抑制，具有一定安全性。而菌株 PR6、PR13 和 PR17 则表现出中度敏感，甚至产生了耐药性。



同一处理条件下不同字母表示差异显著（P<0.05）。

图 4　乳酸菌胆盐耐受性试验结果

Fig. 4　Results of bile salt tolerance test for lactic acid bacteria

表 3　乳酸菌的抗生素敏感性

Table 3　Antibiotic sensitivity of lactic acid bacteria

菌株编号	抗生素敏感性			
	环丙沙星	氨苄西林	四环素	青霉素
PR6	I	R	R	I
PR10	I	S	S	S
PR13	R	R	S	R
PR15	I	I	I	I
PR17	I	R	I	R
PR18	I	I	I	I

注：“S”表示乳酸菌对抗生素高度敏感；“I”表示乳酸菌对抗生素中度敏感；“R”表示乳酸菌对抗生素耐药。

2.3.3　抑菌性能

乳酸菌在宿主肠道定植后能够产生H_2O_2、有机酸及细菌素等化合物，这些物质是其抑菌活性的主要来源[17-18]。使用常见的食源性致病菌检测6株乳酸菌的抑菌性能。如表4所示，这些乳酸菌对致病菌具有不同程度的抑制作用。其中，菌株PR6和PR10对金黄色葡萄球菌的抑制作用显著高于其他菌株，而对枯草芽孢杆菌的抑制作用较弱。菌株PR10对于大肠埃希菌的抑制作用最强。综合比较发现，菌株PR13、PR15和PR17对3种致病菌的抑制作用较强。

表4　乳酸菌的抗菌性能

Table 4　Antibacterial activity of lactic acid bacteria

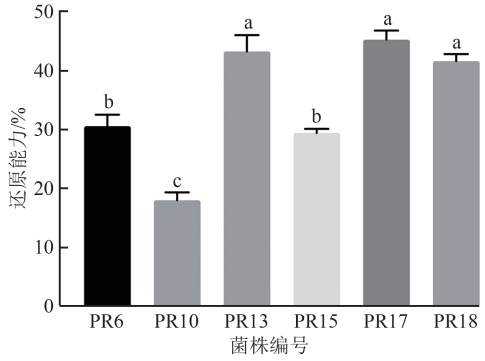
菌株编号	抑菌圈直径/mm		
	金黄色葡萄球菌	大肠埃希菌	枯草芽孢杆菌
PR6	13.51±0.01	9.83±0.01	6.56±0.02
PR10	13.23±0.02	13.15±0.02	7.86±0.03
PR13	11.25±0.03	12.31±0.15	12.19±0.01
PR15	11.17±0.01	11.77±0.20	14.32±0.02
PR17	12.43±0.15	11.51±0.10	11.72±0.15
PR18	12.32±0.20	10.61±0.01	6.85±0.08

2.3.4　菌株的抗氧化活性

乳酸菌作为天然的抗氧化微生物，不仅可以清除有机体内的活性氧和自由基，还能够通过氧化还原调控系统缓解机体的氧化损伤。因此，可以通过测定菌株的还原能力及自由基清除能力来评价其抗氧化活性[19-20]。

乳酸菌中的抗氧化物质可以与铁氰化钾反应生成蓝色的亚铁氰化铁，该物质在波长700 nm处有最大OD值，可以通过测定亚铁氰化铁的水平来测定待测菌株的还原能力。如图5所示，菌株PR13、PR17和PR18的还原能力均为40%以上，显著高于菌株PR6、PR10和PR15，而菌株PR10的还原能力在20%以下，说明不同菌株的抗氧化物质水平存在差异。

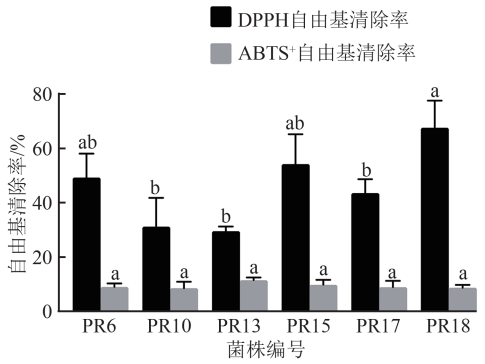
机体内的自由基有很强的氧化性，会损伤蛋白质、核酸及脂质等生物分子，严重时会引起机体氧化损伤[21]。比较不同菌株的$ABTS^+$自由基清除率和DPPH自由基清除率，结果见图6。6种菌株的$ABTS^+$自由基清除率普遍偏低，为9.0%~11.4%，菌株之间没有显著差异。而6种菌株的DPPH自由基清除率为29.6%~67.6%，除了菌株PR13外，其他菌株的DPPH自由基清除率均超过30%，且菌株PR18的DPPH自由基清除率明显高于其他菌株。总体而言，菌株PR18的抗氧化活性较好，可以作为开发保健食品、药品等的潜在菌株，用于研究氧化应激相关疾病。



不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$）。

图5　乳酸菌的还原能力

Fig. 5　Reducing ability of lactic acid bacteria



同一指标不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$）。

图6　乳酸菌的自由基清除率

Fig. 6　Free radical scavenging rate of lactic acid bacteria

3　讨论

食品发酵是最古老的食品加工和保存方法之一，在中国已有数千年的历史。发酵过程中微生物的代谢活动会产生多种化合物，不仅能够延长食品的保质期、改善食品风味[22]，还能提高食品消化率和营养价值。传统发酵食品基质主要有乳制品、蔬菜和肉类等[23]，通过自然发酵，可形成优势菌群及不同的微生物群落。不同国家、地区及不同种类的传统发酵食品的微生物多样性存在差异。因此，研究不同地域传统特色发酵食品对发掘食源性乳酸菌菌株具有重要意义。

兰州甜胚子主要以莜麦和青稞为原料发酵而成，与以糯米为原料制作的醪糟和甜酒有本质区别，因此甜胚子可能蕴含较为丰富和独特的乳酸菌菌种。本研究通过形态学及分子生物学方法筛选并鉴定出6株乳酸菌，分别为副干酪乳酪杆菌PR6、发酵粘液乳杆菌PR10、戊糖片球菌PR15、乳酸片球菌PR17、类肠膜魏斯氏菌PR13和融合魏斯氏菌PR18，分别隶属于3个属：乳杆菌属、片球菌属及魏斯氏菌属。乳酸菌在发酵中过程中具有重要作用，不同的制作环境会对菌落结构产生影响。有研究发现，礼泉醪糟[23]和南宁地区的酒曲均以乳杆菌属为优势细菌属，而孝感地区的酒曲则以魏斯氏菌属为主[24]。乳酸菌在发酵过程中通过代谢活动能够产生乳酸、乙酸、丁酸、醇类和醛类等多种有机物，从而赋予发酵食品独特的口感[25]。

本研究分离鉴定出一株对酸和胆盐耐受性较强的发酵粘液乳杆菌PR10，该菌株在pH 2.5、胆盐质量浓度10 g/L的条件下仍有较高的存活率。有研究表明，从兰州浆水中分离出的发酵粘液乳杆菌JL-3（*Limosilactobacillus fermentum* JL-3）能够在体外分解尿酸，在体内调节肠道菌群失调，可有效降低小鼠尿酸水平[26]。乳酸菌进入机体后对胃肠条件是否有足够的耐受性是其维持细胞活性以发挥益生特性的关键。菌株PR10不仅耐酸及耐胆盐，还具有较好的抗生素敏感性，可进一步开展菌株PR10在保健食品及药品中的研究。

乳酸菌可以利用自身的抗氧化系统抵御活性氧的损伤，从而应对环境带来的氧化应激反应[27]。王曦等[28]通过比较35株乳酸菌的还原能力及自由基清除能力，鉴定出2株抗氧化性能较高的菌株，分别是乳杆菌属和链球菌属细菌。邹思博等[29]通过对酸菜样品中的菌株进行富集培养及分离纯化，最终鉴定得到了一株具有较强抗氧化活性的植物乳植杆菌，并发现发挥抗氧化作用的关键为菌悬液。本研究筛选出一株抗氧化活性较强的菌株为PR18，鉴定为融合魏斯氏菌。虽然菌株PR18的还原能力比菌株PR13和PR17弱，但差异不显著；而菌株PR18的DPPH自由基清除能力则显著高于PR13和PR17。因此，菌株PR18可作为潜在菌株用于食品抗氧化剂或微生物制剂的开发。

4 结论

本文从兰州地区传统发酵的甜胚子样品中筛选得到的发酵粘液乳杆菌PR10可以抑制肠道主要致病菌、对抗生素敏感并具有较好的酸及胆盐耐受性；融合魏斯氏菌PR18的还原能力可达到40%以上，其DPPH自由基清除率高达67.6%，抗氧化活性较高。这2株乳酸菌具有潜在的益生特性，可作为候选菌株开展进一步研究。

参考文献

[1] ZHANG Y，AI Y Q，WU Q，et al. Optimization of fermentation conditions of mead by response surface methodology[J]. Advanced Materials Research，2014，881/882/883：789-792.

[2] 党辉，陈佩. 礼泉醪糟微生物多样性分析[J]. 食品科学，2023，44(14)：162-168.
DANG H，CHEN P. Microbial diversity of Liquan's Laozao，sweet fermented glutinous rice[J]. Food Science，2023，44(14)：162-168.(in Chinese)

[3] 向凡舒，邓凤，魏冰倩，等. 不同来源酒曲酿制米酒中乳酸菌的分离与鉴定[J]. 中国酿造，2019，38(5)：67-72.
XIANG F S，DENG F，WEI B Q，et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria from rice wine fermented by Jiuqu from different sources[J]. China Brewing，2019，38(5)：67-72.(in Chinese)

[4] 向凡舒，蔡文超，郭壮，等. 大竹米酒滋味品质与细菌类群的关联性分析[J]. 食品科学，2023，44(18)：231-238.
XIANG F S，CAI W C，GUO Z，et al. Correlation between taste quality and bacterial community of Dazhu rice wine[J]. Food Science，2023，44(18)：231-238.(in Chinese)

[5] 达菊庆，武运，吴聪，等. 新疆昌吉奶疙瘩中乳酸菌的分离鉴定及发酵杏酱性能分析[J]. 食品与发酵工业，2024，50(12)：84-91.
DA J Q，WU Y，WU C，et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria from cheese in Changji，Xinjiang and analysis of their fermentation performance in apricot jam[J]. Food and Fermentation Industries，2024，50(12)：84-91.(in Chinese)

[6] 赵圣明，赵岩岩，马汉军，等. 发酵酸菜来源乳酸菌的益生特性及其在发酵乳中的应用[J]. 食品科学，2019，40(6)：187-194.
ZHAO S M，ZHAO Y Y，MA H J，et al. Probiotic properties of lactic acid bacteria from pickled Chinese cabbage and its application in fermented milk[J]. Food

Science，2019，40(6)：187-194.(in Chinese)

[7] 吕欣然，李莹，马欢欢，等. 辽西传统发酵食品中抗单增李斯特菌乳酸菌的筛选与鉴定[J]. 食品工业科技，2016，37(3)：143-148.
LV X R，LI Y，MA H H，et al. Screening and identification of lactic acid bacteria with anti-*Listeria monocytogenes* from traditional fermented food in Western Liaoning Province[J]. Science and Technology of Food Industry，2016，37(3)：143-148.(in Chinese)

[8] 叶陵，李勇，王蓉蓉，等. 剁辣椒中优良乳酸菌的分离鉴定及其生物学特性分析[J]. 食品科学，2018，39(10)：112-117.
YE L，LI Y，WANG R R，et al. Isolation，identification and biological characteristics of excellent lactic acid bacteria from fermented hot pepper[J]. Food Science，2018，39(10)：112-117.(in Chinese)

[9] 钟舒红，彭红艳，李军，等. 不同方法测定益生菌体外抑菌活性的比较研究[J]. 黑龙江畜牧兽医，2022(3)：115-119，138-140.
ZHONG S H，PENG H Y，LI J，et al. Comparative study on different methods for determining the bacteriostatic activity of probiotics *in vitro*[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine，2022(3)：115-119，138-140.(in Chinese)

[10] 杨博，柏吉，靳亚梅，等. 新疆地区驴乳源优良乳酸菌发酵剂的筛选及菌株益生特性[J]. 食品科学，2022，43(2)：224-232.
YANG B，BAI J，JIN Y M，et al. Screening of lactic acid bacteria from donkey milk in Xinjiang for use as starter culture and their probiotic characteristics[J]. Food Science，2022，43(2)：224-232.(in Chinese)

[11] JIA N，XIONG Y L，KONG B H，et al. Radical scavenging activity of black currant (*Ribes nigrum* L.) extract and its inhibitory effect on gastric cancer cell proliferation *via* induction of apoptosis[J]. Journal of Functional Foods，2012，4(1)：382-390.

[12] SZABO M R，IDIŢOIU C，CHAMBRE D，et al. Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay[J]. Chemical Papers，2007，61(3)：214-216.

[13] LIU S N，HAN Y，ZHOU Z J. Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods[J]. Food Research International，2011，44(3)：643-651.

[14] KIMOTO H，NOMURA M，KOBAYASHI M，et al. Identification and probiotic characteristics of *Lactococcus strains* from plant materials[J]. Japan Agricultural Research Quarterly，2004，38(2)：111-117.

[15] ALAMERI F，TARIQUE M，OSAILI T，et al. Lactic acid bacteria isolated from fresh vegetable products：potential probiotic and postbiotic characteristics including immunomodulatory effects[J]. Microorganisms，2022，10(2)：389.

[16] WONG A，SAINT NGU D Y，DAN L A，et al. Detection of antibiotic resistance in probiotics of dietary supplements[J]. Nutrition Journal，2015，14(1)：95.

[17] 宋刚，曹春振，杨志馨，等. 群体感应调控下的乳酸菌细菌素合成[J]. 食品与生物技术学报，2020，39(11)：12-17.
SONG G，CAO C Z，YANG Z X，et al. Bacteriocin synthesis of lactic acid bacteria under quorum sensing[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2020，39(11)：12-17.(in Chinese)

[18] 孙海龙，李佳益，张敏，等. 新疆特色果蔬中乳酸菌分离鉴定及其抑菌活性[J]. 食品与生物技术学报，2018，37(11)：1201-1206.
SUN H L，LI J Y，ZHANG M，et al. Identification and antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from fruits and vegetables collected from different areas in Xinjiang[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2018，37(11)：1201-1206.(in Chinese)

[19] 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.
PENG X Y，YU H Y，LI J，et al. Development and prospect of antioxidant activity of lactic acid bacteria[J]. Food Science，2012，33(23)：370-374.(in Chinese)

[20] 吴雨甍，孙羊羊，尹亚格，等. 酱香型白酒酒醅中乳酸菌的分离鉴定及其益生特性研究[J]. 中国酿造，2023，42(4)：76-82.
WU Y M，SUN Y Y，YIN Y G，et al. Isolation，identification and probiotic characteristics of lactic acid bacteria in fermented grains of sauce-flavor Baijiu[J]. China Brewing，2023，42(4)：76-82.(in Chinese)

[21] 解文利，吴雨炯，白雪，等. 四川传统泡菜中乳酸菌的分离鉴定及抗氧化评估[J]. 食品与发酵科技，2022，58(1)：35-41.
XIE W L，WU Y T，et al. Isolation，identification and antioxidant evaluation of lactic acid bacteria from Sichuan traditional pickles[J]. Food and Fermentation Science &

Technology，2022，58(1)：35-41.(in Chinese)

[22] 杜秋，周晓，覃业优，等. 发酵蔬菜源食品用益生乳酸菌的筛选及降胆固醇能力评价[J]. 食品与生物技术学报，2023，42(11)：63-73.
DU Q，ZHOU X，QIN Y Y，et al. Screening and evaluating with cholesterol-lowering ability of probiotic lactic acid bacteria for food from fermented vegetable[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2023，42(11)：63-73.(in Chinese)

[23] 关倩倩，熊涛，谢明勇. 植物基食品乳酸菌发酵技术研究进展[J]. 食品与生物技术学报，2022，41(7)：1-11.
GUAN Q Q，XIONG T，XIE M Y. Research progress in lactic acid bacteria fermentation technology of plant-based foods[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2022，41(7)：1-11.(in Chinese)

[24] 王文平，熊英梅，陈赛浙，等. 不同地区米酒曲细菌多样性解析及表型预测[J]. 食品工业科技，2021，42(20)：134-139.
WANG W P，XIONG Y M，CHEN S Z，et al. Analysis of bacterial diversity and prediction of phenotype in rice wine koji from different regions [J]. Science and Technology of Food Industry，2021，42(20)：134-139.(in Chinese)

[25] 刘楚海，李文钊，程建凯，等. 饮料用酵母抽提物风味特性分析及应用效果初探[J]. 食品与生物技术学报，2024，43(1)：87-97.
LIU C H，LI W Z，CHENG J K，et al. Preliminary exploration of flavor characteristics and application effects of yeast extracts used in beverage[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2024，43(1)：87-97.(in Chinese)

[26] WU Y，YE Z，FENG P Y，et al. *Limosilactobacillus fermentum* JL-3 isolated from “Jiangshui” ameliorates hyperuricemia by degrading uric acid[J]. Gut Microbes，2021，13(1)：1897211.

[27] 赵佳，赵飞燕，沈馨，等. 乳酸菌抗氧化活性及其应用研究进展[J]. 生物技术通报，2023，39(11)：182-190.
ZHAO J，ZHAO F Y，SHEN X，et al. Advances in the antioxidant activities of lactic acid bacteria and their applications[J]. Biotechnology Bulletin，2023，39(11)：182-190.(in Chinese)

[28] 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.
WANG X，LUO X，XU X Y，et al. Comparative studies on antioxidant activities of different lactic acid bacterial strains[J]. Food Science，2010，31(9)：197-201.(in Chinese)

[29] 邹思博，赵明伟，纪超凡，等. 自然发酵东北酸菜中抗氧化乳酸菌的筛选及其益生性研究[J]. 食品安全质量检测学报，2023，14(1)：42-50.
ZOU S B，ZHAO M W，JI C F，et al. Screening of high antioxidant activity lactic acid bacteria in traditional fermented Suancai of Northeast China and its prebiotic studies[J]. Journal of Food Safety & Quality，2023，14(1)：42-50.(in Chinese)