

来源于腌干鱼的乳酸菌中抗氧化酶及胞外多糖研究

蔡秋杏^{1,2,3}, 吴燕燕¹, 李来好^{1*}, 杨贤庆¹, 赵永强¹, 王悦齐^{1,3}

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业部水产品加工重点实验室,
广东省渔业生态环境重点开放实验室, 广东 广州 510300;

2. 钦州学院食品工程学院,
广西高校北部湾特色海产品资源开发与高值化利用重点实验室, 广西 钦州 535099;

3. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266000)

摘要: 为研究从腌干鱼中获取的乳酸菌在细胞内外起抗氧化作用的主要活性物质, 通过测定菌株胞内的超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和过氧化氢酶(CAT)活性以及提取胞外多糖(EPS)并测定其抗氧化性, 利用超高效液相色谱法(UPLC)分析其结构。结果显示, 9株菌的SOD、GSH-Px和CAT的最高活性分别为44.67、15.26和1.23 U/mg prot, 对应菌株为L21、L4和L21; 9株菌的EPS产量为(5.71±0.18)~(50.33±1.89) mg/L, L21的EPS最高纯度为56.16%±1.08%。L21中EPS的DPPH自由基清除能力和还原能力较高, 综合抗氧化能力相对较强, 结构分析发现其含有甘露糖(Man)、鼠李糖(Rha)、葡萄糖(Glu)和半乳糖(Gal)等4种单糖。研究表明, 分离自腌干鱼的乳酸菌中, 抗氧化能力越强的菌株细胞内表现出越高的抗氧化酶活性, 同时细胞外EPS的产量和纯度也较高, 并且EPS也具有较弱的抗氧化能力。从中筛选出一株综合抗氧化能力最强的L21, 可以进一步作为生物源性抗氧化剂。

关键词: 乳酸菌; 腌干鱼; 超氧化物歧化酶; 谷胱甘肽过氧化物酶; 过氧化氢酶; 胞外多糖

中图分类号: TS 201.3

文献标志码: A

腌干鱼为中国南方地区的传统水产制品, 因其独特的风味而闻名。腌干鱼年产量和市场需求量逐年递增, 2015年中国水产腌干制品总量为163.8万t, 约占水产品加工总量的7.8%, 比2014年增长了5.6%^[1]。近年来, 人们对食品的质量安全问题越来越关注, 水产食品在加工过程(特别是腌制过程)中的脂肪氧化可导致有害过氧化物的产生, 存在的安全隐患尚未得到重视, 对于腌干鱼制品脂肪氧化预防控制技术的研究报导较少, 其他食品则主要通过添加丁基羟基茴香醚(butylated hydroxyanisole, BHA)、二丁基羟基甲苯(butylated hydroxytoluene, BHT)、茶多酚等外源抗氧化剂进行防控, 但这些物质的引入会影响产品的色泽和风味, 且引发一系列的安全

问题^[2]。而利用微生物等生物源性的抗氧化剂是另外一种较安全的食品加工方式^[3]。

乳酸菌是公认的益生菌, 能够作为稳定剂、凝胶剂、填充剂等应用于食品行业, 例如乳制品的发酵^[4], 泡菜、酸菜的腌制^[5], 水产品的腌制^[6]等, 对于其功能的研究主要集中在降解亚硝酸盐^[7]方面, 而对其抗氧化活性的研究也曾受到广泛的关注。Tsai等^[8]用干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)与植物乳杆菌(*L. plantarum*)发酵的牛奶、豆奶混合液喂养小鼠, 与添加2%胆固醇的豆奶相比, 前者更能提高小鼠的超氧化物歧化酶(SOD)活性。Zhang等^[9]发现从植物乳杆菌中提取的胞外多糖(EPS)具有清除氧自由基、提高抗氧化酶活性及降低脂质过氧化反应等功能。

收稿日期: 2017-03-13 修回日期: 2017-04-21

资助项目: 国家现代农业产业技术体系专项(CARS-50); 国家自然科学基金(31571869); 广东省海洋渔业科技与产业发展专项(A201501C02)

通信作者: 李来好, E-mail: laihaoli@163.com

SOD、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)是机体清除自由基的重要抗氧化酶类^[10], EPS是乳酸菌在生长代谢时分泌至细胞壁外的一类多糖, 也具有一定抗氧化活性^[11]。为了解从传统腌干鱼制品中筛选的乳酸菌, 其抗氧化活性物质是否主要基于抗氧化酶和代谢产物胞外多糖。以本课题组分离自带鱼(*Trichiurus lepturus*)、蓝圆鲂(*Decapterus maruadsi*)等腌干鱼制品中的几株抗氧化能力较强的乳酸菌为研究对象, 探究其中的SOD、GSH-Px、CAT和EPS等活性, 为预防控制腌制水产品的氧化提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验对象

7株乳酸菌: 编号依次为L4、L8、L11、L13、L15、L21和L25, 其中抗氧化性较强的L4、L11和L21经法国梅里埃微生物系统及16S rDNA鉴定, 分别为戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*), 植物乳杆菌和干酪乳杆菌, 另外4株经MRS培养基筛选及初步生理生化鉴定为乳酸菌, 但未采用上述方法确定种属; 编号为b和R的菌株则分别为鼠李糖乳杆菌(*L. srthamnosus*)和短乳杆菌(*L. brevis*), 购自广东省微生物菌种保藏中心。

1.2 实验试剂

GSH-Px试剂盒、CAT试剂盒、SOD试剂盒和蛋白浓度测定试剂盒, 南京建成生物研究所; MRS (De Man, Rogosa, Sharpe)肉汤及固体培养基, 广东环凯微生物科技有限公司; 溶菌酶, 美国Omega公司; 饱和酚, 北京双翔达生化试剂公司; 氯仿、无水乙醇、氢氧化钠(NaOH)、盐酸(HCl)、丙酮、石油醚、苯酚、甲醇(分析纯)、三氟乙酸(TFA)(高级纯), 广州化学试剂厂; 1-苯基-3-甲基-5-吡啶酮(PMP)(色谱纯), 美国Across Organics公司; 单糖标准品: 阿拉伯糖(Ara)、岩藻糖(Fuc)、半乳糖(Gal)、木糖(Xyl)、鼠李糖(Rha)、葡萄糖(Glu)、乳糖(Lac)、甘露糖(Man)(色谱纯), 上海安谱实验科技股份有限公司; 亚油酸(高级纯), 美国Sigma aldrich公司。

1.3 实验仪器与设备

Acquity H (UPLC)色谱仪, 美国Waters公司; UV-2550紫外分光光度计, 日本岛津公司; RE-2000A旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; Avanti

J-26 XP离心机, 美国Beckman Coulter有限公司; SHP-150生化培养箱, 上海精宏设备有限公司; SA-900-1JZ超净工作台, 上海稼丰有限公司; Sunrise-basic TACAN吸光酶标仪, 美国BioTek公司; SQ510C高压灭菌锅, 日本Yamato公司; Alpha 1-4 Lsc冷冻干燥机, 德国Christ公司。

1.4 实验方法

活化增菌 9株乳酸菌分别于MRS培养基平板划线, 传至第3代扩大培养至菌体浓度约为 1×10^9 cfu/mL, 以10 000 r/min离心20 min。发酵上清液留存制备多糖, 菌体沉淀用磷酸盐缓冲液(PBS)(pH 7.4)洗涤后重悬, 置于冰水浴中研磨3 min, 获得胞内提取物, 测酶活备用。

抗氧化酶酶活测定 SOD、GSH-Px和CAT活性测定按照南京建成生物研究所的试剂盒操作说明进行, 最后都采用酶标仪, 分别于550, 412和405 nm处进行比色, 蛋白含量测定采用二喹啉甲酸(BCA)法。

EPS的粗提 根据Xu等^[12]的方法略作修改, 发酵上清液经过减压旋转蒸发浓缩, 醇沉过夜后, sevag液(氯仿: 正丁醇=4: 1, V/V)反复除蛋白, 高速离心后获得沉淀, 依次采用无水乙醇、丙酮和石油醚抽滤洗涤沉淀, 透析2~3 d后, 冷冻干燥得到EPS粗品并干燥至恒重, 将粗品溶于25 mL的去离子水中制成溶液。

EPS产量及纯度的测定 参考孟庆勇等^[13]的方法进行, 采用苯酚—硫酸法并略作修改。以0.1 mg/mL的葡萄糖标准溶液作标准曲线, 取“EPS的粗提”中制备的样品溶液10 μ L, 补水至500 μ L, 然后依次加6%的苯酚溶液300 μ L和浓硫酸1.5 mL, 于490 nm处测定吸光值, 从标准曲线求出EPS的产量, 再对比粗品质量求出糖的纯度。

EPS的·DPPH清除能力测定 参考Rajapakse^[14]等的测定方法并略作修改: 将含1 mg/mL EPS的样品液1 mL中依次加入1 mL 2×10^{-4} mol/L ·DPPH乙醇溶液与0.5 mL去离子水, 作为样品组; 1 mL去离子水加1 mL无水乙醇作为空白组, 1 mL去离子水加1 mL ·DPPH溶液作为对照组, 室温下避光反应30 min, 采用吸光酶标仪在517 nm波长处测量吸光值变化。·DPPH清除率(A)的计算公式:

$$A(\%) = [1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100$$

式中, A_i 、 A_j 、 A_0 分别为样品组、空白组、对照组的吸光值。

EPS还原力的测定 参照Hayat等^[15]的方法并加以修改。取含1 mg/mL EPS的样品液1 mL, 加入PBS (pH=6.6)和1%的铁氰化钾溶液各1 mL, 50 °C水浴保温20 min, 再加入10%(W/V)的三氯乙酸溶液1 mL, 5000 r/min离心10 min, 吸取上清液1 mL, 加入1 mL去离子水和0.2 mL 0.1%(W/V)的氯化铁溶液, 置于50 °C保温10 min, 在700 nm波长处测定吸光值。吸光值代表多糖的还原能力, 吸光值越大, 则还原力越强, 并以去离子水代替样品作空白对照。

EPS的·OH清除率测定 参照李颖等^[16]的方法, 在含1 mg/mL EPS的1 mL样品液中分别加入9.0 mmol/L FeSO₄、10.0 mmol/L水杨酸—乙醇溶液和6.0 mmol/L H₂O₂各0.5 mL, 对照组以0.5 mL去离子水代替水杨酸—乙醇溶液, 空白组则以相同体积去离子水代替样品, 37 °C水浴中反应10 min, 510 nm波长处测定吸光值, 计算公式:

$$\cdot\text{OH清除率}(\%)=[1-(B_i-B_j)/B_0]\times 100$$

式中, B_i 、 B_j 、 B_0 分别为样品组、空白组、对照组的吸光值。

干酪乳杆菌(L21)中EPS单糖组分的UPLC分析 参照李薇等^[17]的柱前PMP衍生法略作修改, 8种单糖标准品(Ara、Fuc、Gal、Xyl、Rha、Glu、Lac、Man)分别配制成0.5 mg/mL的甲醇溶液, 各取50 μL配混标, 同时取5.0 mg EPS粗品加入TFA溶液中, 110 °C水解并挥发至干, 各加入0.5 mol/L PMP甲醇溶液, 70 °C水浴反应100 min后中和, 加入氯仿振荡萃取3次, 上清液用0.45 μm微孔滤膜过滤, 取10 μL进样, 同时以空白MRS培养基代替样品以扣除背景。采用UPLC测定, 色谱柱: 20RBA×3 dipse×DB-C₁₈分离柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相: A相为乙腈, B相为5 mmol/L甲酸铵; 检测器: 紫外检测器(250 nm); 流速: 0.30 mL/min; 柱温: 25 °C; 梯度洗脱程序: 0~6 min, A相23%; 6~9 min, A相23%→50%; 9~10 min, A相50%→23%, 维持3 min。

1.5 数据处理

每组数据测定3组平行, 均值及标准差(mean±SD)计算采用Excel 2010(Microsoft公司, 美国); 数据处理采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)以及Tukey-Kramer HSD双重比较分析差异性; 数据差异性于 $P<0.05$ 水平进行比较, 采用JMP 15.0软件(SAS公司, 美国); 采用OriginPro 8.5软件作图(OriginLab公司, 美国)。

2 结果

2.1 乳酸菌抗氧化酶活性

9株乳酸菌的胞内提取物均检测出3种抗氧化酶活性, 总体而言, 活性从高至低依次为SOD、GSH-Px和CAT。Tukey-Kramer HSD比较分析表明, SOD活性在9株乳酸菌间没有显著性差异($P>0.05$), 而GSH-Px和CAT活性在9株菌中都存在显著性差异($P<0.05$)。

SOD具有较强的自由基清除能力和还原性, 它可以将机体产生的O₂⁻转化为氧化活性较小的H₂O₂和O₂, 在机体抗氧化系统中的作用至关重要。L21的SOD活性最高, 为(44.28±2.28) U/mg; L4的SOD活性最低, 仅为(9.44±1.28) U/mg。

GSH-Px可将SOD转化生成的H₂O₂进一步转化为无毒的水分子, 以及将还原型谷胱甘肽(GSH)转化成氧化型谷胱甘肽(GSSG)。在9株乳酸菌中, L4的GSH-Px活性最高, 为(15.26±0.78) U/mg; 而R的GSH-Px活性最低, 为(1.06±0.09) U/mg。根据显著性差异分析结果, L4、L21、L25和L11的GSH-Px活性无显著性差异($P>0.05$), 且活性较高; L8、L13、L15及b的酶活也无显著性差异($P>0.05$), 但活性较低; 而R的酶活最低。

CAT在体内发挥的抗氧化作用与GSH-Px的作用相当, 其可将机体代谢产生的H₂O₂转化为H₂O和O₂, 且功能比GSH-Px更强。L21的CAT活性最高, 为(1.23±0.07) U/mg; L8和L21的CAT活性无显著性差异, 且酶活较高; 其次为L11、L13、L15及L4, 这4株菌的CAT活性也无显著性差异; b的CAT活性最低, 只有(0.13±0.03) U/mg。3种抗氧化酶主要存在于乳酸菌的胞内提取物中, 而分泌于发酵上清液的胞外活性物质则通过提取EPS进行研究。

2.2 乳酸菌EPS产量及纯度

本研究采用了苯酚—硫酸法明确EPS产量较高的菌株。结果显示, Glu含量与其吸光值呈现良好的线性关系, 其线性回归方程: $y=0.012x-0.005$, 拟合度 $R^2=0.9963$ 。由Tukey-Kramer HSD双重比较分析, EPS的产量和纯度在9株乳酸菌间都存在显著性差异($P<0.05$)。

L11的EPS产量最高; 其次为L25; L8、L21和R的EPS产量无显著性差异($P>0.05$), 且含量较高; L4、L13、L15及b的EPS产量差异也不显著($P>0.05$), 但含量最低(图1)。9株菌EPS的产

表 1 乳酸菌抗氧化酶活性
Tab. 1 Antioxidase activity of lactic acid bacteria

菌株名称 strain	菌株代号 code	超氧化物歧化酶 SOD	谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px	过氧化氢酶 CAT
戊糖片球菌 <i>Pediococcus pentosaceus</i>	L4	9.44±1.28 ^a	15.26±0.78 ^a	1.15±0.13 ^b
未知 unknown	L8	16.09±0.17 ^a	8.88±0.02 ^{cd}	1.15±0.07 ^a
植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i>	L11	18.48±0.00 ^a	11.28±1.01 ^{bc}	0.81±0.01 ^b
未知 unknown	L13	27.18±1.09 ^a	6.69±0.04 ^d	0.60±0.16 ^b
未知 unknown	L15	18.07±0.78 ^a	6.80±0.12 ^d	0.66±0.03 ^b
干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus casei</i>	L21	44.28±2.28 ^a	12.80±0.09 ^{ab}	1.23±0.07 ^a
未知 unknown	L25	12.31±0.02 ^a	6.77±0.45 ^{ab}	0.74±0.02 ^c
鼠李糖乳杆菌 <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	b	30.81±2.58 ^a	7.14±0.08 ^d	0.13±0.03 ^c
短乳杆菌 <i>Lactobacillus brevis</i>	R	29.50±0.50 ^a	1.06±0.09 ^c	0.19±0.02 ^c

注: 同一列数据标注不同上标字母表示酶活在不同菌株间存在显著性差异($P<0.05$)

Notes: different letters in the same line indicate significant difference at $P<0.05$

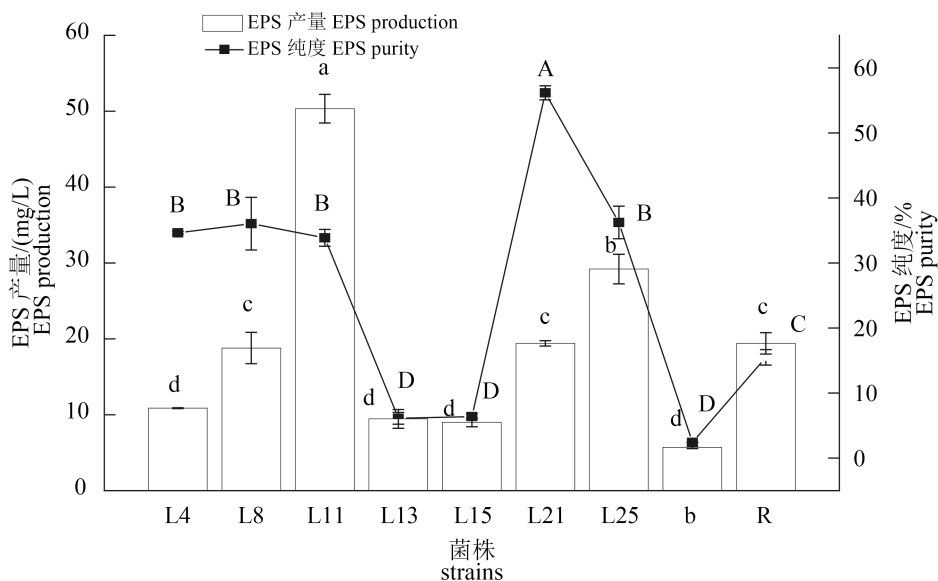


图 1 乳酸菌胞外多糖EPS产量及纯度

柱形图及线性图上标不同字母a~d及A~D分别表示存在显著性差异($P<0.05$)

Fig. 1 The production and purity of EPS extracted from lactic acid bacteria

Different letters on the column (a-d) and line (A-D) indicate significant difference at $P<0.05$, respectively

量为(5.71±0.18)~(50.33±1.89) mg/L。就EPS的纯度而言, L21最高; 其次为L4、L8、L11和L25, 这4株菌的EPS纯度无显著性差异($P>0.05$), 且纯度较高; 再次为R; L13、L15及b的EPS产量差异也不显著($P>0.05$), 但纯度最低。9株菌EPS的纯度为(2.43%±0.09%)~(56.16%±1.08%)。

2.3 9株乳酸菌EPS的抗氧化能力

9株乳酸菌所提取EPS的抗氧化性结果中, 只有L21、L13和L8具有·DPPH清除能力, 且

L21能力最强, 为42.36%±0.65%; L21的·OH清除率仅次于最强的L25; 还原力最强的3株菌分别为L25、L13和L21(表2)。因此, L21所产的EPS抗氧化能力较强。综上, L21的抗氧化酶活性最强、提取的EPS纯度最高且EPS产量不低, 并具有较强的抗氧化能力。因此, 有进一步探究其EPS结构的意义。

2.4 L21的EPS粗品中单糖组成的UPLC分析

采用柱前PMP衍生UPLC法测定EPS的单糖

表 2 乳酸菌EPS的抗氧化能力

Tab. 2 Antioxidant capacity of EPS of lactic acid bacteria

提取EPS菌株名称 strain of EPS	代号 code	·DPPH清除率/% ·DPPH clearance	还原能力 reducing power	·OH清除率/% ·OH clearance
戊糖片球菌 <i>Pediococcus pentosaceus</i>	L4	n.d.	0.26±0.00	15.08±1.32
未知 unknown	L8	13.99±2.21	0.25±0.02	56.74±1.62
植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i>	L11	n.d.	0.46±0.01	31.78±1.75
未知 unknown	L13	28.22±1.85	0.86±0.01	46.95±0.64
未知 unknown	L15	n.d.	0.16±0.02	23.98±0.24
干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus casei</i>	L21	42.36±0.65	0.75±0.03	66.06±3.54
未知 unknown	L25	n.d.	0.92±0.06	93.26±2.46
鼠李糖乳杆菌 <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	b	n.d.	0.32±0.01	15.68±0.24
短乳杆菌 <i>Lactobacillus brevis</i>	R	n.d.	0.64±0.02	42.29±0.48

注: n.d. 未检出

Notes: n.d.. not detected

组成, 空白培养基色谱图显示, 除了PMP外, 在1.82~2.54 min还形成了3个小峰, 此外没有产生任何单糖衍生峰(图2)。

Man、Rha、Lac、Glu、Gal、Ara、Xyl和Fuc的保留时间分别为2.54、3.50、4.05、4.92、5.25、5.85、6.18和7.23 min。PMP衍生杂质(<1 min)与单糖衍生物(>2 min)的保留时间的差距, 可使样品得到有效分离(图3)。

L21菌株EPS的色谱图显示包含Man、Rha、Glu和Gal, 并分别于2.53、3.36、4.93和5.16 min出峰(图4), 虽然空白培养基在2.54 min也形成了小峰, 可能含有少量Man, 但L21的EPS中的Man含量明显高于空白培养基。有研究表明, 尽管乳酸菌EPS的种类很多, 但它们的单糖组成较简单, 一般含有D-Gal、D-Glu、L-Rha, 但三者

的比例不尽相同, 例如从嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)BTC和480这2株菌中提取的EPS就不含有Rha, 从副干酪乳杆菌(*L. paracasei*)34-1提取的EPS只含有Gal^[18-20], 这与本研究结果基本相符。

3 讨论

3.1 乳酸菌的抗氧化酶活性

综上, L21的SOD和CAT的活性皆为最高, 而L4的GSH-Px活性也最高, 2株菌均分离自腌干鱼。由王悦齐等^[21]研究结果可知, 抗脂质过氧化率、·OH清除率及还原力实验中, 无论是发酵上清液还是胞内提取物, 效果最好的都是L4、L11及L21, 且与其他菌株存在显著性差异($P<0.05$),

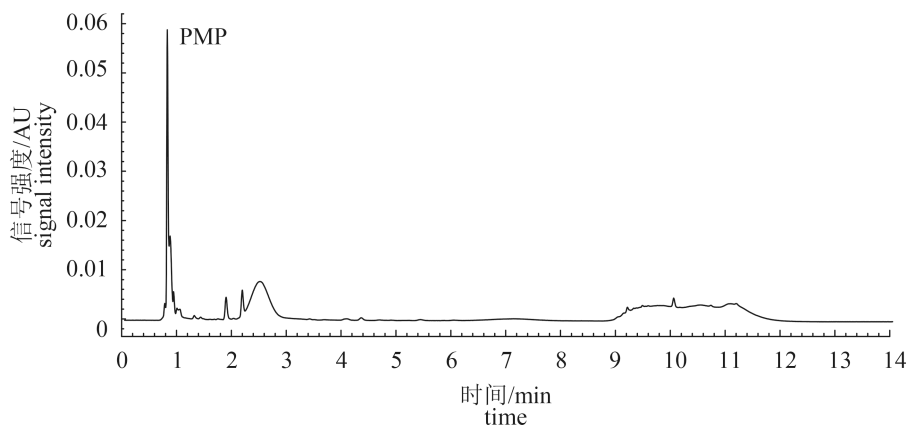


图 2 空白培养基的PMP衍生产品的UPLC色谱图

Fig. 2 UPLC chromatogram of blank contrast medium in PMP derived products

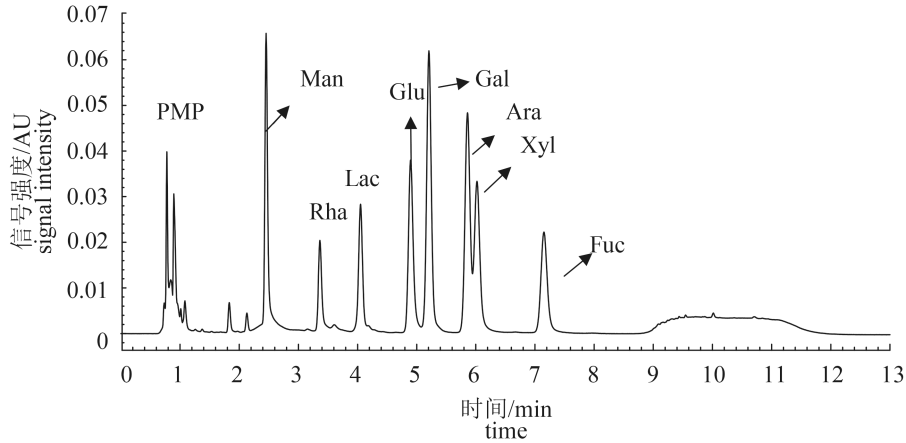


图3 8种单糖混合标准品PMP衍生产品的UPLC色谱图

Fig. 3 UPLC chromatogram of 8 kinds of mixed standard in PMP derived products

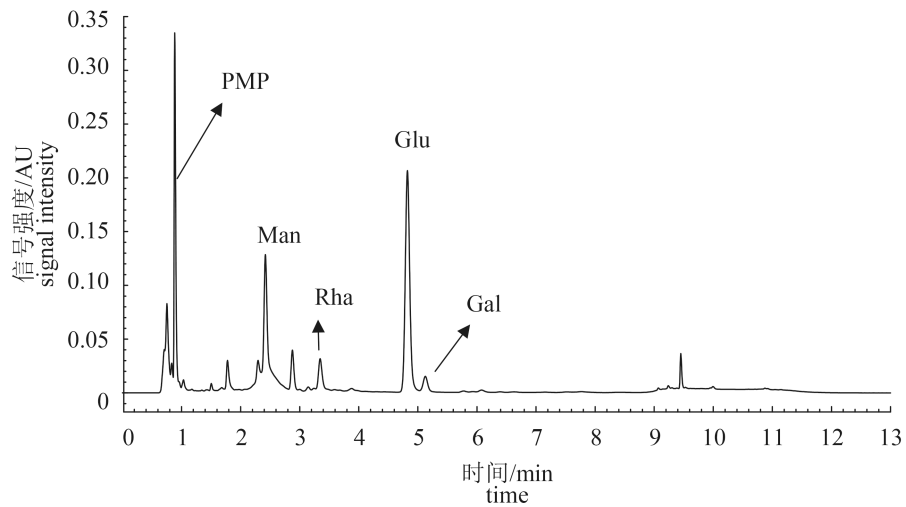


图4 L21菌株EPS粗品PMP衍生产品的UPLC色谱图

Fig. 4 UPLC chromatogram of EPS crude product of L21 strain in PMP derived products

说明这3株菌的抗氧化能力最强, 而其中L21的SOD及CAT、L4的GSH-Px活性最高, 说明乳酸菌抗氧化能力的强弱主要基于抗氧化酶的活性。洪松虎等^[22]也指出上述3种抗氧化酶的存在是乳酸菌抗氧化的机理之一。刘洋等^[23]比较了发酵乳杆菌(*L. fermenti*)等4种乳酸菌的抗氧化酶活性, 胞内提取物的SOD活性为15.52~49.96 U/mg, 而GSH-Px活性为10.73~14.72 U/mg, 本研究结果与之基本相符。黄玉军等^[24]分析的6株人源乳酸菌胞内提取物中, SOD活性在10 U/mg以内, GSH-Px活性为5~25 U/mg, 含3株发酵乳杆菌、2株干酪乳杆菌和1株屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)。说明不同来源和亚种的乳酸菌, 其抗氧化酶活性差异较大, 并且各菌株的抗氧化酶

之间无必然联系, 因此可能存在另外的抗氧化活性物质。

3.2 乳酸菌EPS的抗氧化性

田丰伟等^[25]从发酵牛奶和蔬菜中筛选的产胞外多糖的多株乳酸菌中, 产量最高的是的鼠李糖乳杆菌, 为189.95 mg/L, 但大部分乳酸菌的EPS产量都在100 mg/L以内; 唐血梅等^[26]从新疆酸马奶中分离的干酪乳杆菌的EPS产量为80~120 mg/L; 本研究中9株乳酸菌的EPS产量并不突出, 但自行分离的菌株的EPS产量优于本研究所选的2株商业乳酸菌b和R。郭守东^[27]研究的16种微生物胞外多糖的糖含量(纯度)为54.2%~94.7%, 表示EPS粗品除含有糖类外, 还含有多肽、蛋白质等

其他杂质, 而本研究中的9株菌纯度最高的仅达到56.16%, 还有必要作进一步的纯化。由于9株菌的相对EPS产量和纯度都不明显, 因此后续进一步考察EPS是否具有抗氧化特性, 以明确胞外的主要抗氧化活性物质。

近年来, 越来越多的证据表明, 乳酸菌EPS同样具有一定的抗氧化能力。Pan等^[28]从乳酸乳球菌(*L. lactis* 12)分离纯化得到的EPS, 在5 mg/mL时其 O_2^- 和 $\cdot OH$ 清除率都约为60%。Li等^[29]从瑞士乳杆菌(*L. helveticus* MB2-1)中分离得到了3种EPS组分, 实验结果表明都具有很强的自由基($\cdot DPPH$ 、 $\cdot OH$ 和 O_2^-)的清除能力以及铁离子的螯合作用。Ke等^[30]从链球菌(*Streptococcus* sp.)中提取出一种EPS, 当它的浓度为1.2 mg/mL时, $\cdot DPPH$ 的清除率达到46.83%, $\cdot OH$ 的清除率为76.60%。本研究中的L21也有类似的 $\cdot DPPH$ 清除率, 而 $\cdot OH$ 清除率略低。本课题组前期研究表明^[21], 发酵上清液的3组抗氧化指标的结果皆远高于胞内提取物; 黄玉军等^[24]的研究也表明乳酸菌中的抗氧化活性物质主要分布在发酵上清液中; 梅秀明等^[31]研究表明, 乳酸菌的EPS具有显著的抗氧化能力。

4 结论

9株乳酸菌的胞内抗氧化酶活性中, L21的SOD和CAT活性最高, 而L4的GSH-Px活性最高, 而胞外发酵液提取的EPS中, 仅3株具有一定的 $\cdot DPPH$ 清除率, 但全部都表现出一定的还原能力和 $\cdot OH$ 清除率, 其中综合抗氧化能力最强的EPS源自干酪乳杆菌L21, 并且L21的EPS的产量及纯度也较高, L21为前期研究筛选出来的抗氧化活性较高的乳酸菌。因此, 从腌干鱼中分离的乳酸菌, 抗氧化能力越强的菌株细胞内表现出较高的抗氧化酶活性, 同时细胞外EPS的产量和纯度也较高, 并且EPS也具有较强的抗氧化能力。

参考文献:

- [1] 农业部渔业渔政管理局. 2016中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2016.
China's Fishery and Fishery Administration. 2016 China Fishery Statistical Yearbook[M]. Beijing: China Agriculture press, 2016 (in Chinese).
- [2] Sanches-Silva A, Costa D, Albuquerque T G, *et al.* Trends in the use of natural antioxidants in active food packaging: a review[J]. Food Additives & Contaminants Part A, 2014, 31(3): 374-395.
- [3] 曾雪峰. 淡水鱼发酵对酸鱼品质影响的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013: 13-21.
Zeng X F. Study on the effect of Suanyu property of fermented freshwater fish[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2013: 13-21 (in Chinese).
- [4] 魏艳, 曾小群, 潘道东, 等. 新疆地区不同酸奶中优势乳酸菌的分离与鉴定[J]. 中国食品学报, 2012, 12(12): 161-166.
Wei Y, Zeng X Q, Pan D D, *et al.* Identification of dominant lactic acid bacteria isolated from different fermented milk in Xinjiang of China[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012, 12(12): 161-166(in Chinese).
- [5] 李欣, 武俊瑞, 田甜, 等. 大庆自然发酵酸菜中乳酸菌的分离鉴定及耐酸菌株初步筛选[J]. 食品科学, 2014, 35(1): 150-154.
Li X, Wu J R, Tian T, *et al.* Isolation, Identification and preliminary screening of acid-tolerant Lactic Acid Bacteria from naturally fermented pickle Juices from Daqing[J]. Food Science, 2014, 35(1): 150-154(in Chinese).
- [6] 吴燕燕, 游刚, 李来好, 等. 低盐乳酸菌法与传统法腌干鱼制品的风味比较[J]. 水产学报, 2014, 38(4): 601-612.
Wu Y Y, You G, Li L H, *et al.* Comparison of flavor components between low-salt lactic acid fermented fish and traditional salted fish[J]. Journal of fisheries of China, 2014, 38(4): 601-612(in Chinese).
- [7] 游刚, 吴燕燕, 李来好, 等. 添加复合乳酸菌再发酵对腌干鱼肉微生物、亚硝酸盐和亚硝胺的影响[J]. 南方水产科学, 2015, 11(4): 109-115.
You G, Wu Y Y, Li L H, *et al.* Effect of inoculating compound lactic acid bacteria on microbial, nitrites and nitrosamines of salted fish[J]. South China Fisheries Science, 2015, 11(4): 109-115(in Chinese).
- [8] Tsai T Y, Chu L H, Lee C L, *et al.* Atherosclerosis-preventing activity of lactic acid bacteria-fermented milk-soymilk supplemented with *Momordica charantia*[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2009, 57(5): 2065-2071.
- [9] Zhang L, Liu C H, Li D, *et al.* Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus*

- plantarum* C88[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 54(1): 270-275.
- [10] 许友卿, 王培培, 丁兆坤. 多环芳烃对水生动物抗氧化酶的影响、机理及防治研究进展[J]. 水产科学, 2013, 32(3): 183-186.
- Xu Y Q, Wang P P, Ding Z K. Research progress of impacts, mechanism, and prevention of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on antioxidase in aquatic animals[J]. Fisheries Science, 2013, 32(3): 183-186(in Chinese).
- [11] Welman A D, Maddox I S, Archer R H. Metabolism associated with raised metabolic flux to sugar nucleotide precursors of exopolysaccharides in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2006, 33(33): 391-400.
- [12] Xu H S, Yao L, Sun H X, *et al.* Chemical composition and antitumor activity of different polysaccharides from the roots of *Actinidia eriantha*[J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 78(2): 316-322.
- [13] 孟庆勇, 王亚飞, 揭新明, 等. 粗江蓠多糖的提取及光谱分析[J]. 光谱学及光谱分析, 2006, 26(10): 1903-1906.
- Meng Q Y, Wang Y F, Jie X M, *et al.* Extraction and analysis of *Gracilaria gigas* harvey polysaccharides[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2006, 26(10): 1903-1906(in Chinese).
- [14] Rajapakse N, Mendis E, Byun H G, *et al.* Purification and *in vitro* antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2005, 16(9): 562-569.
- [15] Hayat K, Zhang X M, Farooq U, *et al.* Effect of microwave treatment on phenolic content and antioxidant activity of citrus mandarin pomace[J]. Food Chemistry, 2010, 123(2): 423-429.
- [16] 李颖, 李庆典. 桑葚多糖抗氧化作用的研究[J]. 中国酿造, 2010, 29(4): 59-61.
- Li Y, Li Q D. Antioxidant activity of mulberry polysaccharide[J]. China Brewing, 2010, 29(4): 59-61(in Chinese).
- [17] 李薇, 夏晴, 孙成荣, 等. 柱前衍生(PMP)-HPLC法测定不同品种甘草多糖中单糖组成[J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(1): 56-58.
- Li W, Xia Q, Sun C R, *et al.* Analysis of monosaccharide compositions of various kinds of liquorice polysaccharide by HPLC precolumn derivatization[J]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2014, 16(1): 56-58(in Chinese).
- [18] Yamamoto Y, Murosaki S, Yamauchi R, *et al.* Structural study on an exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* TY1-2[J]. Carbohydrate Research, 1994, 261(1): 67-78.
- [19] Yang Z N, Staaf M, Huttunen E, *et al.* Structure of a viscous exopolysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* K16[J]. Carbohydrate Research, 2000, 329(2): 465-469.
- [20] Faber E J, Kamerling J P, Vliegthart J F G. Structure of the extracellular polysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*291[J]. Carbohydrate Research, 2001, 331(2): 183-194.
- [21] 王悦齐, 李来好, 蔡秋杏, 等. 分离自腌干鱼的抗氧化发酵菌株的筛选及鉴定[J]. 南方水产科学, 2016, 12(3): 74-83.
- Wang Y Q, Li L H, Cai Q X, *et al.* Screening and identification of antioxidant starter culture strains from salted dried fish[J]. South China Fisheries Science, 2016, 12(3): 74-83(in Chinese).
- [22] 洪松虎, 吴祖芳. 乳酸菌抗氧化作用研究进展[J]. 宁波大学学报(理工版), 2010, 23(2): 17-22.
- Hong S H, Wu Z F. Research progress on antioxidative mechanisms of Lactic Acid Bacteria[J]. Journal of Ningbo University (Natural Science & Engineering Edition), 2010, 23(2): 17-22(in Chinese).
- [23] 刘洋, 郭宇星, 潘道东. 4种乳酸菌体外抗氧化能力的比较研究[J]. 食品科学, 2012, 33(11): 25-29.
- Liu Y, Guo S X, Pan D D. Comparative antioxidant activity of four species of lactic acid bacteria *in vitro*[J]. Food Science, 2012, 33(11): 25-29(in Chinese).
- [24] 黄玉军, 刘冬, 赵兰凤, 等. 6株人源乳酸菌体外抗氧化活性的比较[J]. 现代食品科技, 2013, 29(7): 1518-1522.
- Huang Y J, Liu D, Zhao L F, *et al.* *In vitro* antioxidant activities of six lactic acid bacteria isolated from human intestinal tract[J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(7): 1518-1522(in Chinese).
- [25] 田丰伟, 丁虎生, 丁纳, 等. 产胞外多糖的乳酸菌的简便筛选与鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(3): 15-19.
- Tian F W, Ding H S, Ding N, *et al.* Fast Screening and identification of exopolysaccharide-producing lactic acid

- bacterial[J]. Food and Fermentation Industries, 2008, 34(3): 15-19(in Chinese).
- [26] 唐血梅, 李海英, 赵芳, 等. 新疆酸马奶中高产胞外多糖乳酸菌筛选鉴定及培养条件优化研究[J]. 新疆农业科学, 2012, 49(8): 1540-1545.
- Tang X M, Li H Y, Zhao F, *et al.* Study on screening and identification of a lactic acid bacterium with high EPS-producing capacity and optimization of culture conditions in koumiss in Xinjiang[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2012, 49(8): 1540-1545(in Chinese).
- [27] 郭守东. 微生物胞外多糖的结构及其抗氧化活性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.
- Guo S D. Structural characteristics of microbial exopolysaccharides and their antioxidant activities[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010 (in Chinese).
- [28] Pan Y M, Wang K, Huang S Q, *et al.* Antioxidant activity of microwave-assisted extract of longan (*Dimocarpus Longan* Lour.) peel[J]. Food Chemistry, 2008, 106(3): 1264-1270.
- [29] Li W, Ji J, Chen X H, *et al.* Structural elucidation and antioxidant activities of exopolysaccharides from *Lactobacillus helveticus* MB2-1[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 102(1): 351-359.
- [30] Ke C L, Qiao D L, Gan D, *et al.* Antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* of the capsule polysaccharides from *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*[J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 75(4): 677-682.
- [31] 梅秀明, 潘道东. 乳酸菌胞外多糖的纯化及对小鼠血清和肝组织抗氧化性的影响[J]. 食品科学, 2009, 30(7): 220-224.
- Mei X M, Pan D D. Study on separation and purification of extracellular polysaccharide in fermentation Broth of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and its effects on antioxidant functions of mouse serum and liver[J]. Food Science, 2009, 30(7): 220-224(in Chinese).

Study on antioxidant enzymes and exopolysaccharides of lactic acid bacteria separated from salt-dried fish products

CAI Qiuxing^{1,2,3}, WU Yanyan¹, LI Laihao^{1*}, YANG Xianqing¹,
ZHAO Yongqiang¹, WANG Yueqi^{1,3}

(1. Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture,
Guangdong Provincial Key Lab. of Fishery Ecology Environment, South China Sea Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

2. Guangxi Colleges and Universities Key Laboratory of
Development and High-value Utilization of Beibu Gulf Seafood Resources,
College of Food Engineering, Qinzhou University, Qinzhou 535099, China;

3. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266000, China)

Abstract: In order to study the main active material with anti-oxidative effects of lactic acid bacteria (LAB) from salt-dried fish, the intracellular antioxidant enzymes and extracellular exopolysaccharides (EPS) were investigated. Vitality of superoxide dismutase (T-SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase (CAT) of nine strains were determined and the highest activity were 44.67, 15.26, and 1.23 U/mg prot respectively, which was corresponding to L21, L4 and L21. The crude EPS of LAB was prepared, and the production of nine LABs were between (5.71±0.18)–(50.33±1.89) mg/L, the highest purity of (56.16%±1.08%) was showed in a *Lactobacillus casei* (L21). The antioxidant capacity of EPS was then investigated by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging and reducing power. The compositive antioxidant capacity was the highest in L21. Finally the structure of its EPS was analysed using ultra performance liquid chromatography (UPLC). The EPS of L21 contained four kinds of monosaccharides, namely, mannose (Man), rhamnose (Rha), glucose (Glu) and galactose (Gal). Thus, the nine LABs with high antioxidative capacity isolated from salt-dried fish showed higher antioxidant enzyme activity, and the production and purity of EPS were also high, and could show a certain antioxidant capacity in EPS. Therefore, the strongest comprehensive antioxidant strain was L21, and it could be further used as a biological antioxidant.

Key words: lactic acid bacteria; salt-dried fish; superoxide dismutase; glutathion peroxidase; catalase; exopolysaccharides

Corresponding author: Li Laihao. E-mail: laihaoli@163.com

Funding projects: Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research System (CARS-50); National Natural Science Foundation of China (31571869); Specialized Development of Marine Fishery Science and Industry in Guangdong Province (A201501C02)