

姚杰玢,郭云霞,郝庆红,等. 8 株乳酸菌的体外抗氧化能力[J]. 江苏农业科学,2015,43(5):295-297.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.05.098

8 株乳酸菌的体外抗氧化能力

姚杰玢¹, 郭云霞^{1,2}, 郝庆红¹, 马向莹¹, 韩愈杰¹, 吴国江¹

(1. 河北农业大学生命科学学院, 河北保定 071001; 2. 河北农业大学动物科技学院, 河北保定 071001)

摘要:为了获得高抗氧化活性乳酸菌,测定了 8 株乳酸菌对 DPPH·、羟自由基($\cdot\text{OH}$)和超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)3 种自由基的清除能力,并对 R36 和 R39 组合的协同抗氧化能力进行了测定。结果表明,8 株乳酸菌不同组分都有一定的抗氧化能力,乳酸菌的发酵上清液对自由基的清除能力均高于完整细胞和无细胞提取物,其中 R36 和 R39 对 3 种自由基的清除能力均较高,分别为 51.09%、67.86%、72.02% 和 50.26%、67.67%、72.16%。二者组合时,发酵上清液对 3 种自由基的清除能力均显著提高,分别为 59.36%、77.36%、81.02%。通过对自由基清除能力分析得出,R36 和 R39 具有较高抗氧化活性,2 者具有协同抗氧化能力。

关键词:乳酸菌;抗氧化;协同;自由基

中图分类号: Q939.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)05-0295-03

乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)是广泛存在于人和动物的肠道和其他与外界相通的生理环境中,形态、代谢和生理特征不完全相同,可以发酵多种碳水化合物并生成乳酸的一类细菌总称。目前,乳酸菌已在食品、畜牧中广泛应用,研究发现其具有抗癌、降低胆固醇、降解亚硝酸盐、抑菌、改变肠道微

生物环境、提高机体免疫力等作用^[1-5]。

生物氧化是生物机体的一个重要生理过程,当人体中的活性氧及其他自由基超过一定数量时,就会攻击细胞膜,与血清抗蛋白酶发生反应,甚至跟基因抢电子,影响细胞活性,对机体造成伤害,导致肿瘤、关节炎、心血管疾病等,最终导致衰老^[6-8]。目前,常用 BHA、BHT、PG 等合成抗氧化剂存在抗氧化性弱和食品安全问题。为了更好地增强机体的抗氧化能力,延缓衰老,开发天然抗氧化剂具有非常重要的意义^[9]。乳酸菌作为肠道常驻菌群,可以直接在机体氧化损伤的重点部位——肠道发挥抗氧化作用,而且乳酸菌在肠道定植后能够不断增殖,产生更多的乳酸菌,源源不断地在肠道清除自由基。因此乳酸菌作为一种益生菌越来越受到人们的青睐。近

收稿日期:2014-11-20

基金项目:河北农业大学青年科学基金(编号:QJ201228);河北省高等学校科学技术研究项目(编号:Z2013166)。

作者简介:姚杰玢(1994—),女,河北新乐人,主要从事生物技术研究。E-mail:1034364473@qq.com。

通信作者:郭云霞,博士研究生,主要从事动物营养研究。E-mail:gyx310@163.com。

表 7 模式识别结果的 t 检验

类型	相关性		配对 t 检验(P 值)
	显著性(P 值)	相关系数	
建模样品	0.985	0.000	0.069
外部验证	0.846	0.001	0.137

步判别的方法比较近红外谱图、化学成分在烟叶种植区域、品种、部位等烟叶信息方面的模式识别能力。结果表明,近红外光谱模式识别的效果与化学成分模式识别的效果差异不显著。相对于化学成分的获得,近红外光谱技术有着巨大的优势,近红外光谱谱图由近红外光谱仪扫描获得,样品不需预处理、操作简单、人员要求低,无浪费、无污染。在烟叶种植区域、品种、部位模式识别中使用近红外谱图能够替代化学成分。

参考文献:

- [1] 毛多斌,马宇平,梅业安. 卷烟配方和香精香料[M]. 北京:化学工业出版社,2001.
- [2] Davis D L, Nielsen M T. 烟草生产、化学和技术[M]. 北京:化学工业出版社,2003.

- [3] 王瑞新. 烟草化学[M]. 北京:中国农业出版社,2003.
- [4] 韩富根. 烟草化学[M]. 北京:中国农业出版社,2010.
- [5] 徐安传,胡巍耀,王超,等. 应用近红外技术直接检测烟丝常规化学成分的研究[J]. 激光与红外,2012,42(4):393-398.
- [6] 严衍禄. 近红外光谱分析基础与应用[M]. 北京:中国轻工业出版社,2005.
- [7] 王国东,束茹欣,张建平,等. 不同产地国产烤烟近红外光谱的特征分析及其模式识别[J]. 烟草科技,2006(5):36-40.
- [8] 张建平,陈江华,束茹欣,等. 近红外信息用于烟叶风格识别及卷烟配方的初步探索[J]. 中国烟草学报,2007,13(5):1-5.
- [9] 束茹欣,王国东,张建平,等. 国产烤烟烟叶的 NIRS 模式识别[J]. 烟草科技,2006(8):12-15.
- [10] Maha H, McClure W F. Applying artificial neural networks. II. Using near infrared data to classify tobacco types and identify native grown tobacco[J]. J Near Infrared Spectra,1997(5):19-25.
- [11] YC/Z 240—2008 烟草及烟草制品标准体系[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [12] 唐启义. DPS 数据处理系统:实验设计、统计分析及数据挖掘[M]. 北京:科学出版社,2010.
- [13] 王彦亭,谢剑平,李志宏. 中国烟草种植区划[M]. 北京:科学出版社,2010.

些年,经过体内外试验发现不同乳酸菌存在不同抗氧化特性,如黄玉军等对不同来源 58 株乳酸菌抗氧化特性进行了比较,筛选出了抗氧化性能较好的菌株^[10];张文书从 43 株乳酸菌中筛选出 2 株具有较强抗氧化能力的菌株,并对 *D*-半乳糖诱导的衰老模型小鼠进行饲喂,发现这 2 个菌株可以增强抗氧化酶活性,减少脂质过氧化物含量,有效提高小鼠体内抗氧化水平^[11];Li 等对 11 株植物乳杆菌体内外抗氧化能力进行了研究,发现植物乳杆菌 *C*₈₈可以降低 *D*-半乳糖诱导的小鼠氧化应激作用^[12];Kullisaar 等利用人体试验表明发酵乳杆菌 ME-3 具有抗氧化活性^[13];胡晓丽等对乳酸菌在体外结肠环境清除羟自由基进行研究,发现乳酸菌可通过产生抗氧化酶来清除羟自由基^[14];黄玉军等对 6 株人源乳酸菌的体外抗氧化活性进行比较,发现菌株不同对自由基的清除力不同,发酵上清液清除能力相对较强^[15]。

但目前所筛选的抗氧化活性乳酸菌多是对某一种自由基有较强清除作用,而对其他自由基的清除能力相对较低。有关乳酸菌对多种自由基具有较强清除作用的研究和乳酸菌之间的协同清除自由基作用鲜见报道。本研究对实验室分离的 8 株乳酸菌的不同组分的抗氧化能力及其协同作用进行研究,为其抗氧化作用在饲料、食品行业的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要设备与试剂 主要试剂有二苯基苦基苯肼自由基(DPPH)、无水乙醇溶液、磷酸盐缓冲液、硫酸亚铁、过氧化氢溶液、*L*-半胱氨酸。

主要仪器有 LS-3020 型高压灭菌锅(SANYO 公司);SK1200H 型超声波振荡仪(上海科导超声仪器有限公司);721 分光光度计(上海光谱仪器有限公司);VS-840K-U 型超净工作台(苏净集团安泰公司制造厂);ZC-X10041-00 型电热鼓风干燥箱(天津市华北实验仪器有限公司);DPH-2000 型电热恒温培养箱(天津市瑞金特化学品有限公司)。

1.1.2 培养基 MRS 培养基:胰蛋白胨 10 g,牛肉膏 10 g,酵母膏 5 g,葡萄糖 20 g,柠檬酸铵 5 g,KH₂PO₄ 2 g,乙酸钠 5 g,吐温 80(Tween80) 1 g,MgSO₄ 0.58 g,MnSO₄ 0.25 g,蒸馏水 1 000 mL,调 pH 值 6.0~6.5,于 121 ℃灭菌 20 min。

1.1.3 菌株 乳酸菌均来自河北农业大学生命科学学院制药工程实验室。

1.2 方法

1.2.1 乳酸菌发酵上清液、完整细胞和无细胞提取物的制备 将乳酸菌接种于 MRS 液体培养基中,37 ℃培养 24 h,连续传代 3 次。发酵液经 4 000 r/min 4 ℃离心 15 min,收集发酵上清液及菌体。菌体用无菌水反复洗涤 3 次,重悬于无菌水中,调整菌数为 109 CFU/mL。所得菌悬液分为 2 组,一组作为完整细胞组,另一组用于细胞破碎物的制备,采用冰浴超声破碎细胞后,6 000 r/min 4 ℃离心 15 min,收集上清液即为无细胞提取物^[13]。

1.2.2 DPPH 自由基清除能力测定 参考文献[15]所述方法,加入样品量均为 1 mL。

1.2.3 羟自由基(·OH)清除能力测定 参考文献[16]所述方法,加入样品量均为 1 mL。

1.2.4 超氧阴离子(O₂⁻·)清除能力测定 参考文献[7-8]所述方法,加入样品量均为 1 mL。

1.2.5 乳酸菌协同抗氧化能力测定 参考文献[17],采用直接比较法测定 R36 和 R39 组合的协同抗氧化能力,测试方法同“1.2.2”“1.2.3”“1.2.4”节,取样量均为 0.5 mL。

2 结果与分析

2.1 不同菌株对 DPPH 自由基的清除能力

DPPH 自由基是一种以氮为中心的、很稳定的大分子自由基,通过检测乳酸菌对该自由基的清除能力可以表示乳酸菌的抗氧化能力。试验结果表明,8 株乳酸菌对 DPPH 自由基均有一定的清除作用(表 1),发酵上清液的清除能力要高于完整细胞菌悬液和无细胞提取物,发酵上清液中 R36 清除能力最高,其次是 R39,分别为 51.09%、50.26%;完整细胞菌悬液中 R14、R36、R12、R39 的清除能力较高,分别为 43.28%、42.38%、41.63%和 41.31%;无细胞提取物中 R36、R39、R14 的清除能力较高,分别为 36.44%、35.27%和 32.58%。由此可见,乳酸菌各种组分对 DPPH 自由基的清除能力不同,组分之间清除能力不完全相关。

表 1 乳酸菌对 DPPH 自由基清除能力

菌株	清除率(%)		
	发酵上清液	完整细胞菌悬液	无细胞提取物
R7	40.13±0.12	30.02±0.17	17.43±0.08
R12	46.36±0.10	41.63±0.16	29.20±0.07
R14	48.71±0.11	43.28±0.11	32.58±0.08
R16	43.02±0.06	31.72±0.07	22.78±0.06
R17	42.11±0.10	31.25±0.08	23.14±0.08
R32	33.36±0.07	29.79±0.07	19.34±0.07
R36	51.09±0.11	42.38±0.09	36.44±0.04
R39	50.26±0.07	41.31±0.10	35.27±0.11

2.2 不同菌株对羟自由基(·OH)的清除能力

羟自由基在体内是一种氧化性很强的自由基,对生物细胞大分子造成损伤进而影响细胞的正常功能。因此,对羟基自由基的清除能力是抗氧化性能的一个主要指标。由表 2 可见,8 株乳酸菌对羟自由基均有一定的清除能力,其发酵上清液的清除能力高于完整细胞菌悬液和无细胞提取物,发酵上清液中 R36、R39 的清除能力较高,分别为 67.86%、67.67%;完整细胞菌悬液中 R12、R36、R39 的清除能力较高,分别为 30.30%、32.66%、32.71%;无细胞提取物中 R36、R39、R12 的清除能力较高,分别为 23.76%、24.70%、28.21%。由此可见乳酸菌的各种组分对羟自由基的清除能力不同,而且各组分之间清除能力不完全相关。

表 2 乳酸菌对羟自由基(·OH)清除能力

菌株	清除率(%)		
	发酵上清液	完整细胞菌悬液	无细胞提取物
R7	60.02±0.12	23.26±0.12	20.11±0.12
R12	61.63±0.18	30.30±0.13	28.21±0.10
R14	53.28±0.11	21.30±0.11	17.67±0.09
R16	51.72±0.08	25.76±0.06	20.11±0.08
R17	57.00±0.14	22.61±0.16	19.60±0.10
R32	58.65±0.13	22.80±0.13	22.81±0.07
R36	67.86±0.07	32.66±0.10	23.76±0.06
R39	67.67±0.12	32.71±0.09	24.70±0.10

2.3 不同菌株对超氧阴离子(O₂⁻·)的清除能力

氧气是大自然中需氧生物的必需品,而氧气在生物体内生成自由基时,首先生成超氧阴离子,超氧阴离子对植物组织有毒性,还可以通过反应生成对生物体损害更大的自由基,例如羟自由基。因此,对超氧阴离子自由基的研究也是抗氧化性能的一个主要指标。由表 3 可见,8 株乳酸菌对超氧阴离子自由基均有一定的清除能力,其发酵上清液的清除能力也是高于完整细胞菌悬液和无细胞提取物,发酵上清液中 R36、R39、R32 的清除能力较高,分别为 72. 02%、72. 16. %、73. 70%;完整细胞菌悬液中 R32、R36、R39 的清除能力较高,分别为 48. 36%、49. 06%、50. 12%;无细胞提取物中 R36、R39、R7 的清除能力较高,分别为 27. 70%、28. 38%、29. 06%。由此可知,乳酸菌的各种组分对超氧阴离子自由基的清除能力不同,而且各组分之间在清除能力方面不完全相关。

表 3 乳酸菌对超氧阴离子(O₂⁻·)清除能力

菌株	清除率(%)		
	发酵上清液	完整细胞菌悬液	无细胞提取物
R7	70. 02 ± 0. 15	44. 63 ± 0. 06	29. 06 ± 0. 09
R12	69. 63 ± 0. 08	45. 95 ± 0. 07	24. 75 ± 0. 06
R14	63. 28 ± 0. 12	36. 39 ± 0. 06	21. 46 ± 0. 08
R16	71. 72 ± 0. 08	46. 16 ± 0. 05	22. 87 ± 0. 07
R17	69. 05 ± 0. 10	43. 36 ± 0. 08	25. 78 ± 0. 05
R32	73. 70 ± 0. 08	48. 36 ± 0. 04	23. 90 ± 0. 04
R36	72. 02 ± 0. 04	49. 06 ± 0. 06	27. 70 ± 0. 06
R39	72. 16 ± 0. 03	50. 12 ± 0. 03	28. 38 ± 0. 05

2.4 协同抗氧化能力

由表 1、表 2、表 3 可知,8 株乳酸菌中 R36、R39 对 DPPH 自由基、羟自由基和超氧阴离子自由基的清除能力较高,而且清除能力相近。采用直接比较法测定 R36 和 R39 组合的协同抗氧化活性,由表 4 可知,R36 和 R39 发酵上清液组合抗氧化活性高于等量时的 R36 和 R39 的抗氧化活性,分别为 59. 36%、77. 36%、81. 02%,其无细胞提取物组合对 DPPH 自由基的清除能力高于等量时的 R36 和 R39 的清除能力,而对超氧阴离子的清除能力还降低了,其余没有明显变化。

表 4 R36 和 R39 组合协同抗氧化能力

自由基	清除率(%)		
	发酵上清液	完整细胞菌悬液	无细胞提取物
DPPH	59. 36 ± 0. 06	41. 16 ± 0. 06	40. 36 ± 0. 06
· OH	77. 36 ± 0. 09	32. 68 ± 0. 10	24. 13 ± 0. 08
O ₂ ⁻ ·	81. 02 ± 0. 06	48. 46 ± 0. 04	26. 68 ± 0. 03

3 讨论

近年来,乳酸菌抗氧化能力的研究引起人们的广泛重视,但关于其抗氧化机理及其协同抗氧化相关报道较少。本研究测定了 8 株乳酸菌的抗氧化活性,研究发现各菌株对 3 种自由基具有不同的清除能力,而且各组分对各自由基的清除能力也不相同,其发酵上清液的清除能力高于完整细胞菌悬液和无细胞提取物,这与黄玉军等的报道结果^[15]一致,其原因

可能与各种乳酸菌胞内清除自由基的抗氧化成分和氧化还原调控系统不同有关。

乳酸菌广泛存在于自然界中,本研究通过测定 8 株乳酸菌的抗氧化活性,筛选出了 2 株对 DPPH 自由基、羟自由基和超氧阴离子自由基均具有较高清除能力的菌株 R36、R39,并测定了 R36、R39 菌株的协同抗氧化活性,通过测定表明 2 株菌的发酵上清液之间存在一定的协同抗氧化能力,但其抗氧化机制和协同机制尚不清楚,还需进一步分离出其主要的抗氧化活性物质,并将其应用于饲料、食品、药品的生产,对推动人们的绿色生活发挥积极作用。

参考文献:

[1]王瑞君. 降解胆固醇乳酸菌的筛选及中草药与乳酸菌的协同作用[J]. 食品科学,2013,34(1):210-214.

[2]Ahire J J,Bhat A A,Thakare J M,et al. Cholesterol assimilation and biotransformation by *Lactobacillus helveticus* [J]. Biotechnol Lett, 2012,34(1):103-107.

[3]顾诗雯,何婷婷,丁少南,等. 乳酸菌降解亚硝酸盐的发酵条件研究[J]. 食品研究与开发,2013,(34)12:97-100.

[4]杨海清,姜铁民,陈历俊. 西藏灵菇中抑真菌乳酸菌的筛选和鉴定[J]. 食品科技,2013,38(8):24-28.

[5]王文梅,许丽,马卓. 乳酸菌制剂的作用机制及其在禽类生产中的应用[J]. 东北农业大学学报,2013,44(3):146-150.

[6]Kim J E,Kim J,Lee K W,et al. Cancer chemopreventive effects of lactic acid bacteria [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007,17(8):1227-1235.

[7]刘长建,刘秋,姜波,等. 猪源乳酸菌的抗氧化活性[J]. 食品科学,2012,33(9):221-223.

[8]蹇宇,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.

[9]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.

[10]黄玉军,王慧晶,刘冬. 不同来源乳酸菌发酵乳抗氧化特性比较研究[J]. 中国乳品工业,2013,41(10):4-6.

[11]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.

[12]Li S Y,Zhao Y J,Zhang L,et al. Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods[J]. Food Chemistry,2012,135:1914-1919

[13]Kullisaar T,Songisepp E,Mikelsaar M,et al. Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects[J]. The British Journal of Nutrition,2003,90:449-456.

[14]胡晓丽,孙进,乐国伟. 抗氧化乳酸菌在体外结肠环境清除羟自由基的研究[J]. 中国微生态学杂志,2009,21(6):488-492.

[15]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.

[16]张书文,吕加平,孟和毕力格,等. 两株乳酸杆菌 SY13 和 LJJ 对活性氧的耐受性[J]. 微生物学报,2009,49(2):257-261.

[17]郝晓丽. 七种抗氧化剂单一抗氧化活性及其协同作用研究[D]. 青岛:青岛大学,2002.