



研究报告

风干羊肉中乳酸菌的体内外抗氧化特性

李权威¹ 张开屏² 赵艳红¹ 马牧然¹ 曹凯慧¹ 马俊杰¹ 田建军*¹ 靳焯¹

1 内蒙古农业大学食品科学与工程学院 内蒙古 呼和浩特 010018

2 内蒙古商贸职业学院食品工程系 内蒙古 呼和浩特 010070

摘要:【背景】机体的衰老和一些疾病多与氧化作用有关,随着对抗氧化制剂研究的深入,人工合成抗氧化剂的安全性受到质疑,因此寻找天然抗氧化制剂的研究已成为热点。【目的】从风干羊肉中筛选抗氧化活性较高的乳酸菌,分析肉源乳酸菌体内外抗氧化能力。【方法】以24株肉源乳酸菌为研究对象,以自由基清除能力、亚铁离子螯合能力、还原能力及抗脂质过氧化能力为体外抗氧化能力分析指标,筛选出体外抗氧化活性较强的乳酸菌,运用16S rRNA基因序列同源性分析进行菌种鉴定,通过小鼠试验研究其体内抗氧化能力。【结果】试验所测24株乳酸菌均具有一定的体外抗氧化能力,其中菌株TR13为24株乳酸菌中体外抗氧化能力较强的菌株,其超氧阴离子自由基($\cdot\text{O}_2^-$)清除率为54.29%,羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除率为90.84%,1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)清除率为99.38%,亚铁离子螯合率为55.85%,还原能力达1.345,抗脂质过氧化率为39.99%。通过16S rRNA基因鉴定,菌株TR13为一株瑞士乳杆菌。通过给D-半乳糖诱导的衰老型小鼠饲喂TR13菌液,验证了TR13对小鼠的肝脏、肾脏及血液组织中谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)活性、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性、过氧化氢酶(catalase, CAT)活性均有显著的提升作用($P < 0.05$),且TR13组的GSH-Px活性显著高于维生素C(Vc)组($P < 0.05$)。【结论】菌株TR13对机体的氧化具有一定的防御作用,研究结果可为乳酸菌抗氧化制剂的研究提供参考依据。

关键词: 乳酸菌, 抗氧化, 16S rRNA 基因, 氧化衰老, 酶活力

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31960514); Science and Technology Plan Program of Inner Mongolia Autonomous Region (2019GG239); Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (2019CG066); Major Special projects of Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (2020ZD11); Inner Mongolia Agricultural University Excellent Doctoral Talents Research Start Project (NDYB2019-37)

*Corresponding author: E-mail: imaut@163.com

Received: 11-02-2020; **Accepted:** 24-03-2020; **Published online:** 12-05-2020

基金项目: 国家自然科学基金地区项目(31960514); 内蒙古自治区科技计划项目(2019GG239); 内蒙古自治区科技成果转化专项项目(2019CG066); 内蒙古自治区自然科学基金重大专项项目(2020ZD11); 内蒙古农业大学优秀博士人才科研启动项目(NDYB2019-37)

*通信作者: E-mail: imaut@163.com

收稿日期: 2020-02-11; **接受日期:** 2020-03-24; **网络首发日期:** 2020-05-12

Antioxidation properties *in vitro* and *in vivo* of *Lactobacillus* in air-dried mutton

LI Quan-Wei¹ ZHANG Kai-Ping² ZHAO Yan-Hong¹ MA Mu-Ran¹ CAO Kai-Hui¹
MA Jun-Jie¹ TIAN Jian-Jun^{*1} JIN Ye¹

¹ College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China

² Department of Food Engineering, Inner Mongolia Business Vocational College, Hohhot, Inner Mongolia 010070, China

Abstract: [Background] Aging and some diseases of organism are mostly related to oxidation, with the further research of antioxidant, the safety of synthetic antioxidants is called into question. So the research for natural antioxidants has become a hot topic. [Objective] To screen for *Lactobacillus* with high antioxidant activity from air dried mutton and to analyze their antioxidant capacity *in vivo* and *in vitro*. [Methods] Taking 24 strains of meat-derived *Lactobacillus* as research objects, the ability of scavenging free-radical, chelating ferrous ion, reducing and anti-lipid peroxidation were used as the indexes for analyzing the antioxidant capacity *in vitro*. The 16S rRNA gene sequence homology analysis was used to identify the species, and its antioxidant activity *in vivo* was studied in mice. [Results] All of strains that we tested had anti-oxidation ability *in vitro*, among them, strain of TR13 had the strongest anti-oxidation ability, its scavenging activity of $\cdot\text{O}_2^-$ was 54.29%, and scavenging activity of hydroxyl radical was 90.84%, the scavenging activity of DPPH radical was 99.38%, the chelation rate of ferrous ion was 55.85%, the ability to reduce was 1.345, the rate of detecting anti-lipid peroxidation was 39.99%. The strain of TR13 was identified as *Lactobacillus helveticus* according to the 16S rRNA gene identification. Feeding D-galactose-induced aging mice with TR13 bacterial solution verified that TR13 could promote the activity of glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in liver, kidney, and blood tissues of mice significantly, and the GSH-Px activity of TR13 group was significantly higher than that of vitamin C (Vc) group. [Conclusion] The strain of TR13 can effectively prevent oxidative aging for body, and the result can provide reference for researching *Lactobacillus* antioxidants.

Keywords: *Lactobacillus*, Antioxidant, 16S rRNA gene, Oxidative aging, Activity of enzyme

近年来, 研究发现自由基及其引发的脂质过氧化与疾病和衰老的关系密切, 当血脂升高时, 机体内自由基的产出平衡会严重破坏, 自由基清除剂的活性会急速降低, 自由基将无法正常代谢而过度沉积, 使机体出现氧化应激, 组织器官的功能下降、老化速度加快, 进而引发衰老、癌症、动脉粥样硬化等一系列疾病^[1]。衰老与许多疾病密切相关, 包括高血压、II型糖尿病、阿尔茨海默症等, 这些疾病均可通过延缓衰老而得以减轻^[2-3]。可见脂质的过度氧化对机体存在极大的威胁, 因此实现对脂肪氧化的调控一直以来都是科学领域的研究热点。

乳酸菌的益生作用已得到了人们的广泛认可^[4]。有研究表明, 乳酸菌具有调节肠道菌群平衡、降胆固醇、抗肿瘤、抗氧化的能力^[5]。乳酸菌不仅可以阻止活性氧和自由基的生成、清除已经形成的活性氧和自由基、防御活性氧和自由基对细胞的进一步损伤, 还具有氧化损伤修复系统, 该系统是通过调节 DNA 水平上相关蛋白的表达来修复氧化损伤, 可对细胞损伤部分进行直接或间接修复^[6-7]。乳酸菌的抗氧化机制一是自身含有的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)以及还原型辅酶 I (nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)等协同作

用,消除活性氧和自由基;二是乳酸菌中的氧化还原系统,主要包括 Trx、GSH 和 NADH 氧化酶/NADH 过氧化酶系统^[8]。此外,锰离子和巯基化合物等物质是乳酸菌起抗氧化作用的另外两种主要成分^[9]。

本试验以分离自传统风干羊肉中的 24 株乳酸菌为研究对象,通过体外抗氧化能力分析,筛选出抗氧化活性较好的目标菌株,通过喂食目标菌株给用 D-半乳糖诱导的氧化衰老小鼠,研究目标菌株对衰老小鼠体内抗氧化酶系统的影响,验证乳酸菌在体内对脂质过度氧化的预防作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和试验动物

根据乳酸菌形态学特征及生理生化特征,从风干羊肉中筛选出了 24 株过氧化氢酶阴性、革兰氏阳性、杆状、分解碳水化合物代谢产物以乳酸为主的乳酸菌^[10],以这 24 株菌作为研究对象进行体外抗氧化特性筛选试验。

动物试验中所用小鼠购买于内蒙古大学动物实验中心,共 24 只,均为清洁级、6 周昆明种小鼠,雌雄各半。

1.1.2 主要试剂和仪器及培养基

亚油酸,连云港丰泰生物科技有限公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯胍(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH),上海振品化工有限公司;抗氧化酶活性试剂盒,南京建成科技有限公司;细菌 DNA 提取试剂盒,北京天根生化试剂有限公司。酶标仪, BioTek Instruments 公司;普通 PCR 仪, Bio-Rad 公司;恒温水浴锅,上海一恒科学仪器有限公司;高速冷冻离心机,安徽中科科学仪器有限公司。MRS 液体培养基购于广东环凯微生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 乳酸菌的培养与供试菌株的制备

参考文献^[11],将活化好的乳酸菌在 MRS 液

体培养基中 37 °C 培养 24 h,连续传代 3 次,用生理盐水调整菌悬液的浓度统一为 10⁹ CFU/mL,作为供试菌液。

1.2.2 菌株自由基清除能力测定

(1) 清除超氧阴离子自由基能力分析

在 1 mL Tirs-HCl (150 mmol/L, pH 8.20)中加入 1 mL 二乙三胺五乙酸(3 mmol/L),1 mL 邻苯三酚(1.20 mmol/L)和 0.50 mL 待测样品,25 °C 水浴 10 min,在 325 nm 处测定培养液的吸光值^[12]。清除率计算公式:

$$\text{超氧阴离子清除率(\%)}=[1-(A_3-A_2)/(A_1-A_0)]\times 100$$

其中, A_0 为不含样品和邻苯三酚条件下的 OD_{325} 值; A_1 为不含样品含邻苯三酚条件下的 OD_{325} 值; A_2 为含样品不含邻苯三酚条件下的 OD_{325} 值; A_3 为含样品和邻苯三酚条件下的 OD_{325} 值。

(2) 羟自由基清除能力分析

取 1 mL 邻菲罗啉(2.50 mmol/L),加入 1 mL PBS 缓冲溶液(0.02 mol/L pH 7.40),蒸馏水 1 mL,混匀后加入 1 mL 硫酸亚铁(2.50 mmol/L),再次混匀,加入 1 mL H₂O₂ (20 mmol/L),37 °C 恒温水浴 1.5 h,在 536 nm 处测得吸光值为 A_p ,用 1 mL 蒸馏水代替 1 mL H₂O₂ 为空白组,记为 A_b ,用 1 mL 待测样品代替 1 mL 的蒸馏水为样品组,记作 A_s ^[12]。羟自由基清除率($\%$)= $[(A_s-A_p)/(A_b-A_p)]\times 100$ 。

(3) DPPH 自由基清除能力分析

参照文献^[13],向 1 mL 待测样品中加入 0.20 mmol/L 的 DPPH 无水乙醇溶液 1 mL,充分混匀后室温下避光反应 30 min,6 000 r/min 离心 10 min,取上清液在 517 nm 处测定吸光值。清除率计算公式:

$$\text{DPPH 自由基清除率(\%)}=[1-(A_1-A_2)/A_0]\times 100$$

其中, A_1 为含有 1 mL DPPH 和 1 mL 样品的溶液的吸光值; A_2 为含有 1 mL 无水乙醇和 1 mL 样品的溶液的吸光值; A_0 为含有 1 mL DPPH 和 1 mL 无水乙醇溶液的吸光值。

1.2.3 亚铁离子(Fe^{2+})螯合能力分析

将 1 mL 菌液与 0.05 mL FeCl_2 (2 mmol/L) 混合, 室温孵育 5 min。向混合物中加入 0.20 mL 铁啉 (5 mmol/L) 及 2.35 mL 蒸馏水, 摇匀, 室温孵育 10 min, 8 000 r/min 离心 10 min, 562 nm 处测定上清液的吸光度^[14]。计算公式:

$$\text{亚铁离子螯合率}(\%) = [1 - (A_s - A_b) / A_c] \times 100$$

其中, A_s 为反应液吸光度; A_b 为 1 mL 样品+3 mL 蒸馏水的吸光度; A_c 为单独加蒸馏水的吸光度。

1.2.4 还原能力分析

参照文献[15], 在 0.50 mL 待测样品加入 0.50 mL PBS (0.20 mol/L pH 6.60) 及 0.50 mL 铁氰化钾 (1%, 质量体积比) 混匀后于 50 °C 水浴 20 min, 反应后急速冷却, 再加入 0.50 mL 三氯乙酸 (10%, 质量体积比), 4 000 r/min 离心 10 min, 取 1 mL 上清液, 加入蒸馏水及三氯化铁 (0.10%, 质量体积比) 各 1 mL, 混匀后静置 10 min, 在 700 nm 处测定吸光值, 所得吸光值越高则说明还原能力越强。

1.2.5 抗脂质过氧化能力分析

参照文献[15], 用 0.5 mL 的 PBS 溶液 (0.02 mol/L, pH 7.40) 与 1 mL 亚油酸混合形成乳化液, 加入 FeSO_4 (0.01%, 质量体积比) 和 H_2O_2 进行催化氧化反应, 测定离心后上清液在 532 nm 处的吸光值。以 PBS 作为空白对照。实验结果按公式计算样品的抗脂质过氧化能力。

$$\text{抗脂质过氧化率} = (1 - A_{\text{样品}} / A_{\text{空白}}) \times 100\%$$

1.2.6 具有高抗氧化特性乳酸菌的鉴定

(1) 具有高抗氧化特性的乳酸菌菌株鉴定

根据 DNA 提取试剂盒说明书提取菌株的总

DNA, 运用 16S rRNA 基因通用引物进行 PCR 扩增。上游引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 下游引物 1492R: 5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'。PCR 反应体系 (25 μL): 上、下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , DNA 2 μL , $2 \times \text{EasyTaq Super Mix}$ 12.5 μL , R/D 水 8.5 μL 。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳分析。

将测定序列在 NCBI BLAST 数据库 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 中进行相似性比对, 运用 MEGA 5.2 构建系统发育树, 完成鉴定^[16]。

1.2.7 氧化衰老型动物模型试验

将购买的 24 只昆明种小鼠在本实验室饲养环境下饲养 1 周, 使其适应饲养环境后进行分组, 每组 6 只, 具体分组方法如表 1 所示。在饲养的前 4 周正常组和衰老组不进行任何灌胃, 乳酸菌组饲喂 0.5 mL TR13 菌液, 灌胃浓度为 10^9 CFU/mL, Vc 组饲喂 0.5 mL Vc 溶液, 灌胃浓度为 1 mmol/L。4 周后, 对衰老组、乳酸菌组、Vc 组进行 D-半乳糖溶液 (浓度为: 650 mg/kg) 注射 6 周, 在注射 D-半乳糖溶液期间, 乳酸菌组及 Vc 组继续灌胃与之前浓度一致的乳酸菌菌液及 Vc 溶液。之后禁食 24 h, 以颈椎脱位方法致死, 采心脏处血液, 肝脏组织及肾脏组织进行后续试验。

运用抗氧化酶活性测定试剂盒, 对小鼠肝脏组织中的抗氧化酶活性进行测定。

1.3 数据分析

运用 SPSS 21 对数据进行显著性差异分析, 运

表 1 动物实验分组情况

Table 1 The group of animal test

Group	Injection (mg/kg)	Injection metering (mL/10 g)	Feed	Feed amount (mL)
Normal group	Saline	0.2	Distilled water	0.5
Aging group	650 D-galactose solution	0.2	Distilled water	0.5
TR13 group	650 D-galactose solution	0.2	10^9 CFU/mL culture medium	0.5
Vc group	650 D-galactose solution	0.2	1 mmol/L Vc	0.5

用 NCBI BLAST 数据库及 MEGA 5.2 对菌株鉴定结果进行相似性比对及系统发育树分析, 运用 Origin 2018 进行图表绘制。

2 结果与讨论

2.1 自由基清除能力

自由基, 化学上也称为“游离基”, 是含有一个不成对电子的原子团。目前存在较多且较活跃的自由基主要有超氧阴离子自由基($\cdot\text{O}_2^-$)、羟自由基($\cdot\text{OH}$)及 DPPH 自由基, 因此对这 3 种自由基的清除能力成为评价乳酸菌调控脂类氧化、防止脂类过度氧化能力的主要依据^[17]。

对 24 株乳酸菌的超氧阴离子清除能力的测定结果如表 2 所示。24 株乳酸菌均具有一定的超氧阴离子清除能力, 清除率在 54.29%–10.55% 之间, 平均清除率为 23.87%, 个别菌株之间清除能力差异显著($P<0.05$)。其中清除率最高的菌株为 TR13, 清除率高达 54.29%, 显著高于其他菌株($P<0.05$)。清除能力最弱的为菌株 TE2401, 清除率为 10.55%, 仅相当于 TR13 的 19.43%。张香美等运用邻苯三酚法研究了一株植物乳杆菌无细胞上清液、完整细胞菌悬液及破碎细胞菌悬液的抗氧化活性, 结果表明完整细胞的菌悬液清除率最高, 达到 62.8%, 破碎细胞菌悬液的清除率为 45.9%^[18]。本试验直接对菌株培养液进行测定, 菌株的清除率与其相当, 存在的微小差异可能是测定菌株之间存在差异性导致的。黄珊珊等也研究了不同菌株完整细胞悬浮液、无细胞提取液及灭活细胞悬浮液在相同体外试验条件下对超氧阴离子的清除能力, 发现完整细胞悬浮液的清除率同样高于无细胞提取液^[19]。与张香美等^[18]的研究结果一致。

菌株清除羟自由基能力测试结果如表 2 所示。测试的 24 株菌均具有一定的羟自由基清除能力, 清除率在 31.81%–99.60% 之间, 平均清除率为 79.19%, 清除率高于平均水平的菌种有 15 株, 清

除率达 90% 以上的菌株有 7 株, 其中清除率最高的菌株为 ZF12, 清除率高达 99.60%±0.02%, 显著高于其他菌株($P<0.05$), 其次为菌株 RQ3-1-7, 清除率达到 99.40%±0.11%、菌株 TR13 的清除率也达 90.84%±0.04%。菌株 BZ2 的清除率最低为 31.81%±0.02%, 显著低于其他菌株($P<0.05$), 其降解能力仅为最高菌株的 31.93%。Ren 等测定了 9 株乳酸菌的无细胞悬液对于羟自由基的清除能力, 发现清除率最高的菌株可达到 94.26%, 而最低的清除率仅为 10.37%^[20], 与本试验结果基本相符。王曦等发现一株植物乳杆菌的破碎细胞悬浮液的羟自由基清除率最高为 67.6%, 其次为完整细胞悬浮液, 清除率为 60.9%^[21], 低于本试验菌株清除率的平均水平, 原因可能是乳酸菌对于羟自由基的清除能力是多方面协同作用的结果, 王曦等仅测定了某一部分对羟自由基的清除能力^[21], 与本试验的测定对象不同, 因此结果有所差异。

24 株乳酸菌对 DPPH 自由基清除能力如表 2 所示。测定的 24 株乳酸菌均具有一定的 DPPH 自由基清除能力, 清除率在 27.20%–99.38% 之间, 平均清除率为 81.58%, 有 17 株乳酸菌的清除率在平均值以上, 其中清除率达 95% 以上的菌株共有 7 株, 分别为 TR13、ZF12、TF122-1、TF1302、TF3201、F16、HT9, 菌株 TR13 的清除率最高, 为 99.38%±0.05%, 显著高于其他菌株($P<0.05$)。清除率最低的菌株为 BZ1, 清除率仅为 27.20%±0.02%, 仅达到最高清除率的 27.37%, 显著低于其他菌株($P<0.05$)。李晓军等研究发现, 双歧杆菌 NQ1501 对 DPPH 自由基清除率为 65.38%^[22], 与本试验测定结果有些差距, 这可能与所试菌种之间的差异以及菌株来源有关, 本试验菌株均来自于肉制品中, 由于其生活环境的不同也会导致菌株具有某些较为突出的功能特性。

2.2 亚铁离子螯合能力

24 株乳酸菌的亚铁离子螯合能力测定结果如表 3 所示。

表 2 菌株清除自由基能力

Table 2 Scavenging effect of strains on free-radical

No.	Strain	$\cdot\text{O}_2^-$ clearance (%)	$\cdot\text{OH}$ clearance (%)	DPPH clearance (%)
1	BZ1	21.37±0.07efg	79.62±0.09abcde	27.20±0.02c
2	BZ2	24.23±0.07defg	31.81±0.02g	69.63±0.04abc
3	HT9	51.31±0.06ab	51.43±0.05efg	98.48±0.57ab
4	36T	35.71±0.15cd	86.29±0.02abcd	55.03±0.01abc
5	RB4-1-5	20.87±0.08efg	83.24±0.08abcd	78.58±0.13ab
6	ZF16	39.95±0.14bc	76.32±0.04abcde	84.50±0.12ab
7	TF1302	25.13±0.08def	87.94±0.08abcd	97.87±0.35ab
8	BZ3	42.05±0.09abc	90.49±0.05abc	94.90±0.33ab
9	F16	25.37±0.10def	82.41±0.02abcd	95.39±0.14ab
10	1-4ET7301	29.26±0.20cde	69.97±0.05cde	53.03±0.28abc
11	TR13	54.29±0.04a	90.84±0.04abc	99.38±0.05a
12	ZF22	21.44±0.05efg	90.06±0.01abc	80.37±0.41ab
13	TR1-1-1	12.90±0.01fg	70.98±0.04bcde	86.23±0.07ab
14	RB20-1-5	14.84±0.01fg	63.49±0.09def	81.82±0.11ab
15	RB36-1-3	13.96±0.01fg	95.10±0.02ab	89.19±0.14ab
16	RQ3-1-7	15.66±0.01efg	99.40±0.11a	83.54±0.17ab
17	TE2401	10.55±0.01g	72.76±0.06bcde	84.16±0.19ab
18	TB3303-2	15.46±0.00efg	72.70±0.03bcde	86.43±0.08ab
19	TF3201	11.22±0.01fg	87.17±0.02abcd	97.52±0.30ab
20	1-8XC	15.09±0.01efg	38.41±0.03fg	49.59±0.28bc
21	05-97	15.09±0.00efg	36.32±0.03fg	83.88±0.10ab
22	TF122-1	23.56±0.01defg	86.48±0.01abcd	96.97±0.10ab
23	ZF12	18.06±0.01efg	99.60±0.02a	96.90±0.48ab
24	F42	15.41±0.01efg	90.41±0.02abc	87.33±0.29ab

注: 不同字母表示不同菌株之间的差异显著性($P<0.05$).

Note: Significant difference at $P<0.05$ level was reflected in different lowercase letters.

由表 3 可知, 24 株乳酸菌的螯合率在 22.20%–59.97%之间, 平均螯合率为 45.78%, 有 13 株菌的螯合能力在平均能力以上, 其中螯合率在 55%以上的菌株共有 3 株, 分别为 ZF12、ZF22 及 TR13, 螯合率为 59.97%±0.02%、56.10%±0.04%、55.85%±0.04%, 显著高于其他菌株($P<0.05$).

有研究表明铁离子是导致人体出现动脉粥样硬化和其他脂代谢引起的相关疾病的主要因素, 因此抗氧化防御的一个主要方面是尽量减少过渡金属离子对其他自由基反应的催化作用^[23]。Lin 等测定了 19 株乳酸菌的无细胞上清液对铁离子的螯合能力, 从中发现了两株长双歧杆菌 *B. longum* B6

表 3 菌株亚铁离子螯合能力

Table 3 Scavenging effect of strains on ferrous ion chelating

No.	Strains	Chelating ability (%)
1	HT9	50.22±0.12abcd
2	TR13	55.85±0.04ab
3	TF1302	46.47±0.04bcdef
4	BZ3	37.84±0.12efg
5	RQ3-1-7	45.34±0.10bcdef
6	ZF16	45.09±0.02bcdef
7	F16	41.96±0.03cdefg
8	BZ1	49.47±0.01abcde
9	TF122-1	45.47±0.10bcdef
10	F42	52.10±0.07abcd
11	ZF22	56.10±0.04ab
12	ZF12	59.97±0.02a
13	1-8XC	46.97±0.05bcde
14	TF3201	54.22±0.04abc
15	TE2401	40.46±0.06defg
16	RB4-1-5	46.22±0.07bcdef
17	RB20-1-5	31.21±0.06gh
18	05-97	34.58±0.06fg
19	1-4ET7301	50.09±0.02abcde
20	36T	49.22±0.04abcde
21	TR1-1-1	42.71±0.04cdefg
22	BZ2	22.20±0.03h
23	RB36-1-3	44.34±0.04bcdef
24	TB3303-2	50.59±0.09abcd

注: 不同字母表示不同菌株之间的差异显著性($P<0.05$).

Note: Significant difference at $P<0.05$ level was reflected in different lowercase letters.

和 *B. longum* 15708 的无细胞上清液亚铁离子螯合能力最强, 分别为 40.7 mg/L 和 26.6 mg/L^[13]。Zhang 等测试了 19 株酒球菌的亚铁离子螯合能力, 其最高的螯合量为仅为 34.66 mg/L^[12]。

2.3 还原能力

有研究表明, 有机物的抗氧化能力与其还原电位的高低有关, 甚至明确证明了两之间呈正相关的关系^[24]。铁氰化钾会与乳酸菌中的抗氧化物质发生化学反应, 产生一种蓝色物质, 在波长为 700 nm 处有最大吸光值, 吸光值越大说明其产生的抗氧化物质越多, 菌株的还原能力也就越强。本试验测定菌株还原能力试验结果如表 4 所示。

表 4 菌株还原能力

Table 4 Scavenging effect of strains on reducing activities

No.	Strains	OD_{700}
1	HT9	1.128±0.003c
2	F16	1.178±0.030bc
3	TR13	1.345±0.184a
4	BZ1	1.216±0.079abc
5	05-97	1.220±0.041abc
6	ZF22	1.197±0.014abc
7	RB36-1-3	1.146±0.040bc
8	TB3303-2	1.221±0.063abc
9	TF1302	1.170±0.014bc
10	TF122-1	1.218±0.044abc
11	TF3201	1.249±0.044abc
12	1-8XC	1.304±0.075ab
13	1-4ET7301	1.207±0.049abc
14	ZF12	1.173±0.020bc
15	TE2401	1.203±0.048abc
16	F42	1.101±0.074c
17	RB4-1-5	1.17411 3±0.009bc
18	TR1-1-1	1.239±0.079abc
19	BZ2	1.172±0.143bc
20	RQ3-1-7	1.203±0.111abc
21	36T	1.149±0.019bc
22	BZ3	1.166±0.082bc
23	RB20-1-5	1.213±0.187abc
24	ZF16	1.178±0.017bc

注：不同字母表示不同菌株之间的差异显著性($P<0.05$)。

Note: Significant difference at $P<0.05$ level was reflected in different lowercase letters.

由表 4 可知, 24 株菌均具有一定的还原能力, 还原能力在 1.345–1.101 之间, 平均还原力为 1.199, 还原能力最强的菌株为 TR13, 还原能力达 1.345±0.184, 与其他菌株差异显著($P<0.05$), 其次为菌株 1-8XC, 还原能力为 1.304±0.075, 还原能力最弱的菌株是 F42, 还原能力仅为 1.101±0.074, 与最高还原力相差 0.244。

王帅等从自然发酵的泡菜中筛选了具有高抗氧化活性的菌株, 结果表明最高的完整细胞悬浮液的还原能力高达 214.52 $\mu\text{mol/L}$, 而破碎细胞悬浮液的还原能力仅为 66.34 $\mu\text{mol/L}$, 远低于完整细胞悬浮液的还原能力^[25], 与李晓军等^[22]的研究结果一致, 说明菌株的还原能力主要决定于乳酸菌

的完整细胞。

2.4 抗脂质过氧化能力

抗脂质过氧化能力测试结果如表 5 所示。由表 5 可知, 测试的 24 株菌均具有一定的抗脂质过氧化能力, 抗脂质过氧化能力在 9.51%–39.99% 之间, 平均值为 24.45%, 有 9 株菌的抗脂质过氧化能力在平均能力之上。其中菌株 TR13、ZF22 及 ZF12 的抗脂质过氧化能力较强分别为 39.99%±5.34%、38.45%±5.92% 及 39.30%±3.73%, 与其他菌株差异显著($P<0.05$); 而菌株 1-4ET 的抗脂质过氧化能力显著低于其他菌株($P<0.05$), 仅为 9.51%±1.68%, 占最高抗脂质过氧化率的 23.78%。

表 5 菌株抗脂质过氧化能力

Table 5 Scavenging effect of strains on anti-lipid peroxidation

No.	Strains	Clearance (%)
1	HT9	21.75±0.62d
2	F16	30.55±1.29bc
3	TR13	39.99±5.34a
4	BZ1	17.08±3.40def
5	05-97	17.95±1.93def
6	ZF22	38.45±5.92a
7	RB36-1-3	12.20±4.37fg
8	TB3303-2	19.89±2.62de
9	TF1302	22.67±1.06d
10	TF122-1	36.28±6.73ab
11	TF3201	14.15±3.01efg
12	1-8XC	29.61±0.52c
13	1-4ET	9.51±1.68g
14	ZF12	39.30±3.73a
15	TE2401	33.71±3.38abc
16	F42	29.44±7.43c
17	RB4-1-5	14.32±3.46efg
18	TR1-1-1	21.42±0.80d
19	BZ2	23.26±0.68d
20	RQ3-1-7	34.94±4.94abc
21	36T	18.26±2.79def
22	BZ3	23.07±1.55d
23	RB20-1-5	18.00±2.33fg
24	ZF16	20.90±0.91fg

注：不同字母表示不同菌株之间的差异显著性($P<0.05$)。

Note: Significant difference at $P<0.05$ level was reflected in different lowercase letters.

白明等也对 41 株乳酸菌无细胞菌悬液体外抗脂质过氧化能力进行过研究, 结果发现最高抗脂质过氧化率可达 68.36%左右^[26], 与黄珊珊等^[19]的研究结果相似, 说明胞内物质是抗脂质过氧化的主要作用物质。

综合菌株的自由基清除能力、亚铁离子螯合能力、还原能力以及抗脂质过氧化能力分析, 菌株 TR13 具有较强的体外抗氧化能力, 对其进行 16S rRNA 基因分子鉴定, 同时作为下一步体内试验的饲喂菌。

2.5 菌株 TR13 的 16S rRNA 基因鉴定

根据细菌 DNA 提取试剂盒中所述方法提取了菌株 TR13 的 DNA, 其浓度在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上, 且 A_{260}/A_{280} 为 1.93, 可用于下一步试验。运用通用引物进行 PCR 扩增, 扩增产物在 1% 的琼脂糖凝胶电泳中的条带位置在 1 500 bp 左右, 与预期结果相符。将 PCR 产物送至上海桑尼生物科技有限公司进行序列测定, 所得碱基序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 相似性比对并建立系统发育树, 结果如图 1 所示, 菌株 TR13 (登录号 MT043813) 为瑞士乳杆菌, 相似性可达 98% 以上。

2.6 菌株 TR13 的体内试验

小鼠饲喂 8 周后, 正常组体重从 28.21 g 增长至 38.06 g, 而衰老组体重从实验前的 28.21 g 增长

至 36.32 g, 增量显著小于正常组 ($P < 0.05$), 说明 D-半乳糖诱导衰老模型成功。

2.6.1 小鼠肝脏、肾脏、血清中谷胱甘肽过氧化物酶活力

各组小鼠在肝脏、肾脏及血液中 GSH-Px 活力测定结果如图 2 所示。TR13 组小鼠 3 个不同组织的 GSH-Px 活性均显著高于其他 3 组 ($P < 0.05$)。在肝脏中各组小鼠的 GSH-Px 活性差异显著, 其中 TR13 组的 GSH-Px 活性最高, 且显著高于其他 3 组 ($P < 0.05$); 衰老组的活性最低, 与 TR13 组形成极显著差异 ($P < 0.01$)。各组小鼠的肾脏中 GSH-Px 活性与肝脏中的规律一致。在血清中, TR13 组的 GSH-Px 活性仍显著高于其他组 ($P < 0.05$), 但其他 3 组的差异并不显著。同时, 3 个组织中 TR13 组的 GSH-Px 活性均显著高于 Vc 组 ($P < 0.05$), 足以证明瑞士乳杆菌 TR13 对于体内 GSH-Px 活性具有一定的提升作用。

2.6.2 小鼠肝脏、肾脏、血清中超氧化物歧化酶活力

各组小鼠在肝脏、肾脏及血液中 SOD 活力测定结果如图 3 所示。肝脏组织的 SOD 活力整体高于其他两个组织中的 SOD 活力, 这可能与肝脏是机体代谢的主要器官有关。在肝脏中, 各组小鼠之间的 SOD 活性差异显著, TR13 组小鼠的 SOD

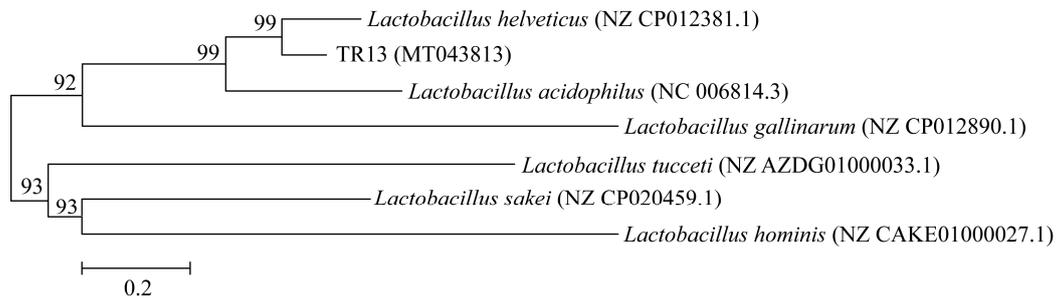


图 1 菌株 TR13 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Figure 1 The phylogenetic trees of strain TR13 via 16S rRNA gene sequence

注: 分支上的数字表示构建系统发育树时 1 000 次计算形成该节点的百分比; 分支的长度代表进化距离, 系数为 0.2; 括号内的序号为已知菌株的 GenBank 登录号。

Note: Numbers at the branch nodes are bootstrap values, expressed as percentages of 1 000 replicates; The length of branch represents the evolutionary distance and the coefficient is 0.2; The number in parentheses is the GenBank accession number of a known strain.

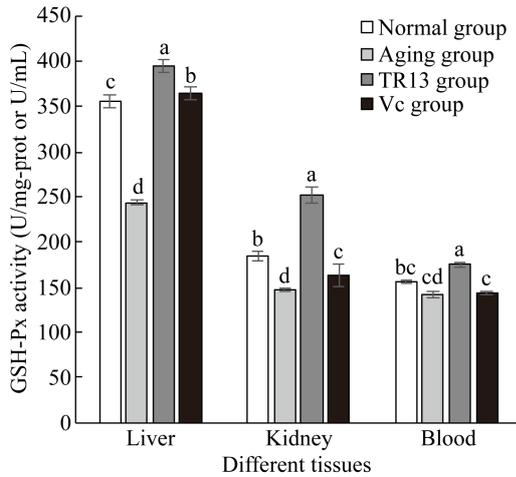


图2 不同组小鼠肝脏、肾脏、血清中 GSH-Px 活性
Figure 2 The activity of GSH-Px in different parts of mice

注: 不同字母表示同一组织不同组别之间的差异显著性 ($P < 0.05$).

Note: Significant difference at $P < 0.05$ level was reflected in different lowercase letters.

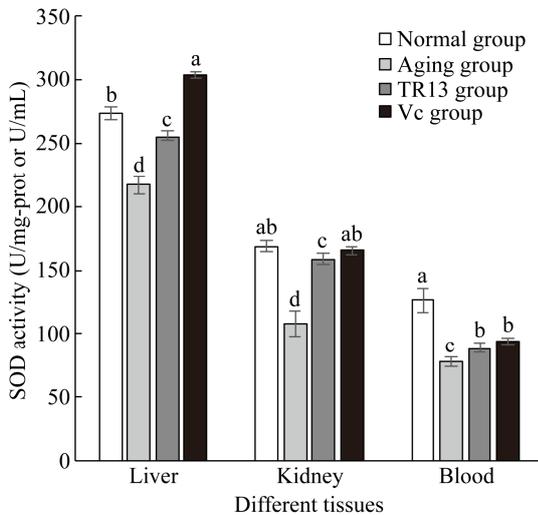


图3 不同组小鼠肝脏、肾脏、血清中 SOD 活性
Figure 3 The activity of SOD in different parts of mice

注: 不同字母表示同一组织不同组别之间的差异显著性 ($P < 0.05$).

Note: Significant difference at $P < 0.05$ level was reflected in different lowercase letters.

活性显著高于衰老型 ($P < 0.05$), 但却显著低于正常组 ($P < 0.05$), 与 Zhao 等^[27]的研究结果一致; 同时 TR13 组的 SOD 活性也显著低于 Vc 组 ($P < 0.05$), 这与 Zhao 等^[27]的研究结果相反, 分析原因可能是饲

喂菌种及试验所用小鼠品种的差异所致。各组小鼠肾脏中的 SOD 活力规律与肝脏中一致, TR13 组显著高于衰老组 ($P < 0.05$), 正常组及 Vc 组要高于 TR13 组。各组小鼠血液中的 SOD 活力为 3 个组织中最底的, 但规律与前两个组织相同。

2.6.3 小鼠肝脏、肾脏、血清中过氧化氢酶活力

不同组小鼠 3 个组织中 CAT 活力测定结果如图 4 所示。由图 4 可知, 各组小鼠肝脏中 CAT 活力测定结果为正常组最高, 其次为 TR13 组, TR13 组与 Vc 组活性相当, 与衰老组形成极显著差异 ($P < 0.01$)。在肾脏组织中, Vc 组的 CAT 活力最高, TR13 组的活力与 Vc 组相当, 显著高于衰老组 ($P < 0.05$)。血清中的 CAT 活力仍是 3 组中最底的, 但 TR13 组的 CAT 活力最强, 显著高于衰老组和正常组 ($P < 0.05$)。3 个组织中的 CAT 活力均与 Vc 组的活力相当, 说明一定剂量的乳酸菌 TR13 可以提升机体内的 CAT 活力且抗氧化能力与 Vc 的抗氧化能力相当。

由图 2-4 可知, 衰老组小鼠的 SOD 活性、CAT 活性、GSH-Px 活性均显著低于正常组, 说明

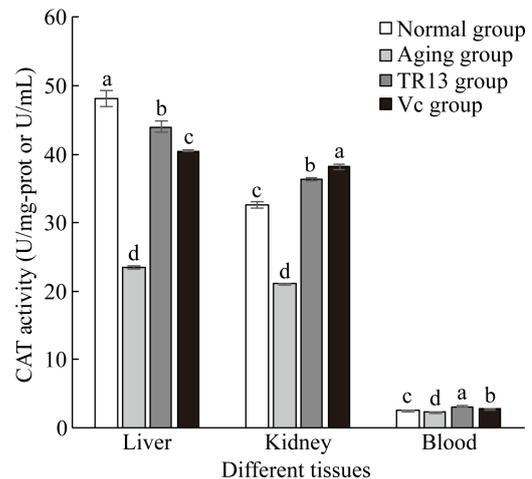


图4 不同组小鼠肝脏、肾脏、血清中 CAT 活性
Figure 4 The activity of CAT in different groups of mice

注: 不同字母表示同一组织不同组别之间的差异显著性 ($P < 0.05$).

Note: Significant difference at $P < 0.05$ level was reflected in different lowercase letters.

由 D-半乳糖引起的衰老模型成功, TR13 组的 3 种酶活力均显著高于衰老组($P < 0.05$), 直观地表明一定剂量的乳酸菌 TR13 饲喂确实对小鼠体内抗氧化酶活力有提升作用, 也可表明乳酸菌 TR13 在小鼠体内仍能发挥出一定的抗氧化作用。

3 结论

(1) 通过对 24 株乳酸菌的体外自由基清除能力、亚铁离子螯合能力、还原能力及抗脂质过氧化能力的分析研究, 筛选出了一株抗氧化活性较高的乳酸菌 TR13, 对其进行 16S rRNA 基因分子鉴定, 最终确定菌株 TR13 为瑞士乳杆菌。

(2) 饲喂一定剂量的瑞士乳杆菌 TR13, 使小鼠肝脏、肾脏、血液中的 SOD 活性、CAT 活性、GSH-Px 活性与饲喂 Vc 组小鼠体内的抗氧化酶活力相当, 且显著高于衰老模型组($P < 0.05$), 表明该菌具有作为抗氧化制剂的潜力。

REFERENCES

- [1] Liochev SI. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2013, 60: 1-4
- [2] Aung SM, Güler A, Güler Y, et al. Two-dimensional speckle-tracking echocardiography-based left atrial strain parameters predict masked hypertension in patients with hypertensive response to exercise[J]. *Blood Pressure Monitoring*, 2017, 22(1): 27-33
- [3] Chard S, Harris-Wallace B, Roth EG, et al. Successful aging among African American older adults with type 2 diabetes[J]. *The Journals of Gerontology. Series B. Psychological Sciences and Social Sciences*, 2017, 72(2): 319-327
- [4] Liu SN, Han Y, Zhou ZJ. Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods[J]. *Food Research International*, 2011, 44(3): 643-651
- [5] Li SY, Zhao YJ, Zhang L, et al. Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods[J]. *Food Chemistry*, 2012, 135(3): 1914-1919
- [6] Kleniewska P, Hoffmann A, Pniewska E, et al. The influence of probiotic *Lactobacillus casei* in combination with prebiotic inulin on the antioxidant capacity of human plasma[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 2016: 1340903
- [7] Yang J, Ji Y, Park H, et al. Selection of functional lactic acid bacteria as starter cultures for the fermentation of Korean leek (*Allium tuberosum* Rottler ex Sprengel.)[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 191: 164-171
- [8] Arnér ESJ, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267(20): 6102-6109
- [9] Lee J, Hwang KT, Chung MY, et al. Resistance of *Lactobacillus casei* KCTC 3260 to reactive oxygen species (ROS): Role for a metal ion chelating effect[J]. *Journal of Food Science*, 2005, 70(8): M388-M391
- [10] Zhang KP, Tian JJ. Screening of cholesterol-reducing *Lactobacillus* and adverse effects in mice[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2014, 33(11): 1222-1227 (in Chinese)
张开屏, 田建军. 降胆固醇乳酸菌的筛选及其对小白鼠的不良影响[J]. *食品与生物技术学报*, 2014, 33(11): 1222-1227
- [11] Liu LL, Wang JQ, Zeng JH, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria from tofu fermented soybean whey in Jianshui, Yunnan[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2019, 19(11): 239-245 (in Chinese)
刘琳琳, 王嘉琪, 曾剑华, 等. 云南建水豆腐酸浆中乳酸菌的分离与鉴定[J]. *中国食品学报*, 2019, 19(11): 239-245
- [12] Zhang SW, Liu L, Su YL, et al. Antioxidative activity of lactic acid bacteria in yogurt[J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2015, 5(29): 5194-5201
- [13] Lin MY, Chang FJ. Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356[J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 2000, 45(8): 1617-1622
- [14] He ZM, Wang XH, Li GF, et al. Antioxidant activity of prebiotic ginseng polysaccharides combined with potential probiotic *Lactobacillus plantarum* C88[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2015, 50(7): 1673-1682
- [15] Wang YQ, Li LH, Cai QX, 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)
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
- [16] Guo HF, Tian JJ, Jing ZB, et al. Screening and identification of lactic acid bacteria with high antioxidant activity from smoked horse sausage[J]. *Food Science and Technology*, 2017, 42(8): 25-30 (in Chinese)
郭慧芬, 田建军, 景智波, 等. 新疆熏马肠中具有较高抗氧化活性乳酸菌的筛选鉴定[J]. *食品科技*, 2017, 42(8): 25-30
- [17] Hofer T, Jørgensen TØ, Olsen RL. Comparison of food antioxidants and iron chelators in two cellular free radical assays: strong protection by luteolin[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(33): 8402-8410
- [18] Zhang XM, Zhao YX, Yan XJ, et al. Screening and identification of lactic acid bacterium with antimicrobial and antioxidant activity[J]. *Food Science*, 2018, 39(2): 93-98 (in Chinese)

- Chinese)
张香美, 赵玉星, 闫晓晶, 等. 1 株具抑菌和抗氧化活性乳酸菌的筛选及鉴定[J]. 食品科学, 2018, 39(2): 93-98
- [19] Huang SS, Liu J, Zhao Z. Study on antioxidative activity of two lactic acid bacteria[J]. China Dairy Industry, 2010, 38(10): 8-10,27 (in Chinese)
黄珊珊, 刘晶, 赵征. 植物乳杆菌和德氏乳杆菌保加利亚亚种菌体外抗氧化活性的对比研究[J]. 中国乳品工业, 2010, 38(10): 8-10,27
- [20] Ren DY, Li C, Qin YQ, et al. *In vitro* evaluation of the probiotic and functional potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented food and human intestine[J]. Anaerobe, 2014, 30: 1-10
- [21] Wang X, Luo X, Xu XY, et al. Comparative studies on antioxidant activities of different lactic acid bacterial strains[J]. Food Science, 2010, 31(9): 197-201 (in Chinese)
王曦, 罗霞, 徐晓燕, 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
- [22] Li XJ, Ma YY, Gong H, et al. Screening and identification of lactic acid bacteria with high antioxidant capacity[J]. Chinese Journal of Microecology, 2018, 30(6): 663-666 (in Chinese)
李晓军, 马跃英, 龚虹, 等. 具高抗氧化能力乳酸菌菌株的筛选与鉴定[J]. 中国微生态学杂志, 2018, 30(6): 663-666
- [23] Ong WY, Halliwell B. Iron, atherosclerosis, and neurodegeneration: a key role for cholesterol in promoting iron-dependent oxidative damage[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2004, 1012: 51-64
- [24] Truulasu K, Naaber P, Kullisaar T, et al. The influence of antibacterial and antioxidative probiotic lactobacilli on gut mucosa in a mouse model of *Salmonella* infection[J]. Microbial Ecology in Health and Disease, 2004, 16(4): 180-187
- [25] Wang S, He Y, He B. Screening of high antioxidant activity lactic acid bacteria in traditional fermented pickles and its tolerance to simulated gastrointestinal environments[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(22): 93-97 (in Chinese)
王帅, 贺羽, 贺斌. 自然发酵泡菜中高体外抗氧化活性乳酸菌的筛选及其对模拟胃肠道环境的耐受性[J]. 食品工业科技, 2019, 40(22): 93-97
- [26] Bai M, Meng XC. Antioxidative activity of probiotics and their internal correlative antioxidative components[J]. Food and Fermentation Industries, 2009, 35(5): 6-11 (in Chinese)
白明, 孟祥晨. 益生菌抗氧化活性及菌体抗氧化相关成分的分析[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(5): 6-11
- [27] Zhao X, Yi RK, Zhou XR, et al. Preventive effect of *Lactobacillus plantarum* KSFY02 isolated from naturally fermented yogurt from Xinjiang, China, on D-galactose-induced oxidative aging in mice[J]. Journal of Dairy Science, 2019, 102(7): 5899-5912