

# 鼠李糖乳杆菌菌株 LR12 和 LR76 的 抗氧化性研究

王玉华<sup>1</sup>, 王立梅<sup>2</sup>, 冯 印<sup>1</sup>, 高 晶<sup>1</sup>, 胡耀辉<sup>1,\*</sup>

(1. 吉林农业大学食品科学与工程学院, 吉林 长春 130118;

2. 常熟理工学院发酵工程技术研究中心, 江苏 常熟 215500)

**摘 要:** 以耐受过氧化氢实验筛选抗氧化性强鼠李糖乳杆菌菌株, 并对筛选菌株进行过氧化氢耐受能力、清除羟自由基能力和超氧阴离子自由基能力进行表征。结果获得两株抗过氧化氢能力强的鼠李糖乳杆菌菌株——LR12 和 LR76。两菌株在 1.0mmol/L 的过氧化氢溶液中 2h 内具有良好的耐受性; LR12 和 LR76 培养物的羟自由基清除率分别为 48% 和 55%, 超氧化阴离子自由基清除率分别为 57% 和 68%, LR76 菌株清除羟自由基和超氧化阴离子自由基的能力强于阳性对照鼠李糖乳杆菌 LGG, LR76 菌株略低于 LGG。说明两菌株具有高效清除羟自由基和超氧化阴离子自由基能力。表明两菌株起抗氧化作用的活性成分可能与活细胞和细胞内活性成分有密切关系。

**关键词:** 鼠李糖乳杆菌; 抗氧化; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 耐受能力; 羟自由基; 超氧阴离子自由基

## Antioxidant Activity of *Lactobacillus rhamnosus* LR12 and LR76

WANG Yu-hua<sup>1</sup>, WANG Li-mei<sup>2</sup>, FENG Yin<sup>1</sup>, GAO Jing<sup>1</sup>, HU Yao-hui<sup>1,\*</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. Center of Fermentation Engineering Technology Research, Changshu Institute of Technology, Changshu 215500, China)

**Abstract :** In order to screen strains with strong antioxidant activity from *Lactobacillus rhamnosus*, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tolerance capability was applied to evaluate antioxidant activity. Two desired strains (LR12 and LR76) were successfully identified. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tolerance capability, hydroxyl free radical and superoxide anion elimination ability were determined for the characterization of both strains. Results indicated that LR12 and LR76 had excellent tolerance in 1.0 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution up to 2 h. Scavenging efficiencies of LR12 and LR76 were 48% and 55% for hydroxyl free radicals, 57% and 68% for superoxide anions respectively. LR76 had higher efficiency on hydroxyl free radical and superoxide anion scavenging than *L. rhamnosus* LGG, while LR12 was a little lower than LGG. Therefore, antioxidant activity of LR12 and LR76 should be related to active cells or active components in cells.

**Key words :** *Lactobacillus rhamnosus*; antioxidant activity; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tolerance capability; hydroxyl free radical; superoxide anion radicals

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)19-0177-04

氧在体内代谢时会形成自由基, 体内自由基含量过高时, 就会引发疾病, 如动脉硬化、糖尿病、高血压、心血管疾病、癌症等<sup>[1]</sup>。随着年龄增长, 人体的抗氧化防御系统的能力也随之下降, 为了弥补体内抗氧化能力的损失, 可以通过强化体内的抗氧化系统或通过补充抗氧化物质来实现。因此开发不同来源的抗氧化剂对清除氧自由基、保护细胞和组织免受损伤具有重要意义

义<sup>[2]</sup>。研究表明, 一些乳酸菌具有显著的抗氧化活性<sup>[2]</sup>。筛选抗氧化性的乳酸菌成为人们广泛关注的热点。鼠李糖乳杆菌能够调节机体胃肠道正常菌群, 保持微生态平衡、提高食物消化率和生物价、降低血清胆固醇、刺激组织发育, 从而对机体的营养状态、生理功能、细胞感染、药物效应、毒性反应、免疫反应、肿瘤发生、衰老过程和突然的应急反应等产生作用<sup>[3-5]</sup>。但是,

收稿日期: 2008-08-04

基金项目: 吉林省科技引导计划应用基础研究项目; 苏州市科技发展计划(应用基础研究)项目(YJG0903)

作者简介: 王玉华(1972—), 女, 副教授, 博士, 主要从事食品微生物学及功能性食品研究。

E-mail: yuhua-ww@163.com

\* 通讯作者: 胡耀辉(1951—), 男, 教授, 主要从事生物反应器与功能食品研究。E-mail: huyaohui@vip.163.com

对鼠李糖乳杆菌抗氧化研究报道罕见。本研究采用过氧化氢耐受能力实验筛选抗氧化能力较强的乳酸菌菌株,并对其抗氧化机理进行进一步研究,为进一步开发功能性乳酸菌发酵食品提供一定参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

纯牛奶 市售;鼠李糖乳杆菌 LGG ATCC 公司;鼠李糖乳杆菌菌株 LR12 和 LR76 由婴儿粪便分离得到;MRS 培养基用于鼠李糖乳杆菌的培养。

MgSO<sub>4</sub>、柠檬酸铵、硫酸锰、乙酸钠、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、过氧化氢、硫酸亚铁、抗坏血酸、水杨酸-乙醇、双氧水溶液、二乙三胺五乙酸、邻苯三酚均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

PH211 台式酸度离子计 意大利哈纳公司;UV-2600 型紫外分光光度计 尤尼柯(上海)有限公司;MCO-15AC Heraeus CO<sub>2</sub> 培养箱、Biofuge(r) Stratos Heraeus 台式冷冻离心机 德国科峻仪器公司;ZHWY-211C 落地式自动开启型大容量全温度恒温培养振荡器 上海智城分析仪器制造有限公司;92-IID 超声波细胞破碎仪 宁波新芝生物科技股份有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 鼠李糖乳杆菌的培养及无细胞抽提液、活细胞菌体和破碎细胞菌体制备

采用传代 3 次的鼠李糖乳杆菌种子培养液按 3% 的接种量接种于 1000ml 培养基中于 37℃ 培养 24h, 经 8000r/min、4℃ 离心 10min, 分离得到无细胞抽提液备用;收集菌体经生理盐水三次洗涤离心后, 将菌体细胞重悬浮于生理盐水中, 调整细胞菌落数为 10<sup>8</sup> 个/ml, 所得到的菌悬液分为两组, 一组作为活细胞菌体备用, 一组用于破碎菌体的制备, 采用超声破碎细胞后, 收集即为破碎细胞备用。

#### 1.3.2 过氧化氢耐受能力筛选实验

取含 5ml 的 MRS 培养基的灭菌试管, 分别添加过氧化氢溶液, 使培养基中的起始过氧化氢浓度分别为 0.4、0.7、1.0mmol/L, 并按 2% 的接种量接种鼠李糖乳杆菌菌株培养液, 置于 37℃ 恒温培养箱中培养 24h, 取样测定 OD<sub>600nm</sub> 值。

#### 1.3.3 鼠李糖乳杆菌对过氧化氢的耐受实验

将筛选过氧化氢耐受菌株加入到浓度为 1.0mmol/L 的过氧化氢溶液后 37℃ 温育, 每隔 0.5h 取样稀释, 用浇注法于 MRS 固体培养基中 37℃ 培养 4h, 计算活菌数。

#### 1.3.4 清除羟自由基(•OH)能力的测定

在试管中依次加入浓度为 5mmol/L 的硫酸亚铁溶液 1ml, 5mmol/L 水杨酸-乙醇溶液 1ml, 3mmol/L 双氧水

溶液 1ml 混合均匀后加入不同体积(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5ml) 的待测样品(以鼠李糖乳杆菌 LGG 做阳性对照), 在 (37 ± 0.1)℃ 的恒温水浴中反应 15min 后, 6000r/min 离心 10min, 在 510nm 波长处测定吸光度<sup>[6]</sup>。清除率计算公式为:

$$\bullet\text{OH 清除率}(\%) = \frac{A_i - A_j}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

式中: A<sub>0</sub> 为对照组吸光度; A<sub>i</sub> 为样品组吸光度; A<sub>j</sub> 为空白组吸光度。

#### 1.3.5 清除超氧阴离子自由基(O<sub>2</sub><sup>-</sup>•)能力的测定

反应体系包括 1ml 浓度为 150mmol/L(pH8.2)的 Tris-HCl, 1ml 浓度为 3mmol/L 的二乙三胺五乙酸, 1ml 1.2mmol/L 的邻苯三酚和 0.5ml 样品(以鼠李糖乳杆菌 LGG 做阳性对照), 总反应体系为 3.5ml。25℃ 恒温水浴反应 10min 后在波长 325nm 处测吸光度<sup>[7]</sup>。清除率公式计算如下:

$$\text{O}_2^{\bullet-} \text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_{11} - A_{10}}{A_{01} - A_{00}}\right) \times 100 \quad (2)$$

式中: A<sub>00</sub> 为不含样品和邻苯三酚的体系的吸光度; A<sub>01</sub> 为不含样品含邻苯三酚的体系的吸光度; A<sub>10</sub> 为含样品不含邻苯三酚的体系的吸光度; A<sub>11</sub> 为含样品和邻苯三酚的体系的吸光度。

## 2 结果与分析

### 2.1 具过氧化氢耐受能力鼠李糖乳杆菌的筛选

将所有乳酸菌菌株分别接种于含有不同浓度的过氧化氢培养基, 37℃ 培养 24h, 观察其菌体密度, 结果见表 1。

表 1 含有不同 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 培养基中鼠李糖乳杆菌的菌体密度  
Table 1 Density of LR12 and LR76 in media with various H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations

菌株	OD <sub>600nm</sub>			
	0mmol/L	0.4mmol/L	0.7mmol/L	1.0mmol/L
LGG	1.57	1.55	1.58	1.43
LR12	1.45	1.59	1.47	1.46
LR76	1.67	1.82	1.78	1.73

由表 1 可见, 在过氧化氢浓度为 0.4、0.7mmol/L 条件下, 所有菌株菌体密度变化不明显, 当过氧化氢 1.0mmol/L 时, 不同菌株的菌体密度发生明显差异。其中 LR12 和 LR76 在浓度为 1.0mmol/L 的过氧化氢溶液中的培养液的 OD 值跟空白溶液中的 OD 值没有太大的变化。而且, LR12 和 LR76 在过氧化氢得生长趋势与对照鼠李糖乳杆菌菌株 LGG 基本一致。

### 2.2 LR12 和 LR76 菌株对过氧化氢的耐受实验

为了了解筛选菌株活细胞对过氧化氢的耐受能力,将筛选菌株 LR12 和 LR76 与对照菌株 LGG 分别接种含 1.0mmol/L 的过氧化氢生理盐水中, 37℃ 保温, 不同时间取样, 观察其活菌数情况(图 1)。

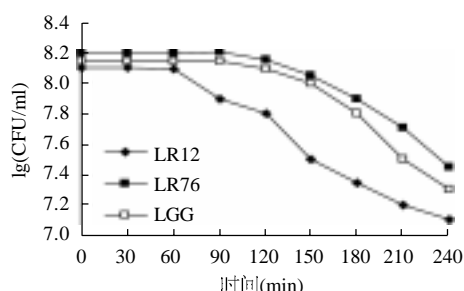


图 1 筛选菌株 LR12 和 LR76 在浓度为 1.0mmol/L  $H_2O_2$  的体系中的存活情况

Fig.1 Survival rate of LR12 and LR76 in 1.0 mmol/L  $H_2O_2$

由图 1 可见, 在 1.0mmol/L 的过氧化氢溶液中, 1h 内 LR12 活菌数变化不显著( $P > 0.05$ ); LR76 和 LGG 在 2h 后活菌数变化不显著( $P > 0.05$ ); 4h 后, LR12 活菌数发生 1 个数量级变化, 活菌数降低了 90%, LR76 和 LGG 活菌数降低了约 80%, 在保存过程中筛选菌株 LR12 和 LR76 与对照菌株 LGG 对 1.0mmol/L 过氧化氢耐受能力相似, 其中 LR76 与 LGG 耐受过氧化氢能力接近, LR12 略逊于 LGG。

### 2.3 LR12 和 LR76 菌株培养物清除羟自由基和超氧阴离子自由基表征

羟自由基和超氧阴离子自由基是体内氧化性很强的自由基, 会对生物细胞大分子损伤而影响细胞的正常功能。因此, 清除羟自由基和超氧阴离子自由基能力是抗氧化性能的主要指标<sup>[8]</sup>。采用不同浓度 LR12 和 LR76MRS 培养物与 LGG 培养物 (阳性对照) 对羟自由基和超氧阴离子自由基的清除作用进行研究, 结果如图 2 所示。

由图 2 可见, LR12 和 LR76 培养物表现出显著的清除羟自由基和超氧阴离子自由基能力, 随着菌体浓度的增加, 清除羟自由基和超氧阴离子自由基的能力也随之增强。LR76 菌株清除羟自由基和超氧阴离子自由基的能力与 LGG 基本相当, LR12 菌株略低于 LGG。

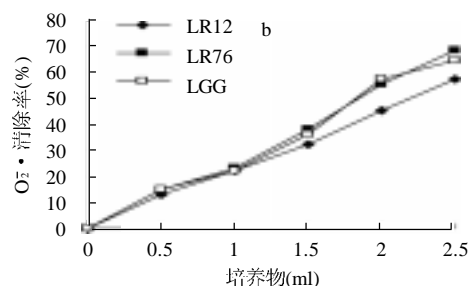
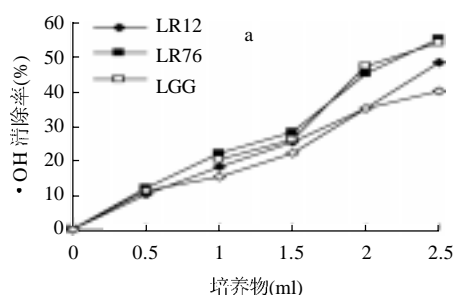


图 2 LR12 和 LR76 清除羟自由基 (a) 和超氧阴离子自由基 (b) 能力的表征  
Fig.2 Characterization of LR12 and LR76 for scavenging hydroxyl free radicals and superoxide anion radicals

### 2.4 LR12 和 LR76 菌株培养物不同组分清除羟自由基和超氧阴离子自由基的表征

为考察筛选菌株清除羟自由基和超氧阴离子自由基能力及抗氧化机理, 本研究分别对两株鼠李糖乳杆菌 LR76 和 LR12 的无细胞抽提液、活细胞菌体、破碎菌体清除羟自由基和超氧阴离子自由基的能力进行表征(表 2)。

表 2 LR76 和 LR12 菌株不同抽提物的  $\cdot OH$  和  $O_2\cdot^-$  清除率

Table 2 Scavenging efficiencies of different extracts from LR76 and LR12 for hydroxyl free radicals and superoxide anion radicals

自由基清除率(%)	无细胞抽提液		活细胞菌体		破碎菌体	
	LR76	LR12	LR76	LR12	LR76	LR12
$\cdot OH$	32	12	70	60	68	17
$O_2\cdot^-$	48	35	76	56	73	11

由表 2 可见, 菌株 LR76 和 LR12 的对羟自由基清除率顺序均依次是活细胞 > 破碎菌体 > 无细胞抽提液。LR76 菌株对超氧阴离子自由基清除率的顺序依次是活细胞 > 破碎菌体 > 无细胞抽提液; LR12 菌株对超氧阴离子自由基清除率的顺序依次是活细胞 > 无细胞抽提液 > 破碎菌体。而且 LR76 菌株的无细胞抽提液、活细胞菌体和破碎菌体对羟自由基和超氧阴离子自由基清除率均分别明显高于 LR12 菌株( $P < 0.05$ )。LR76 菌株活细胞和破碎菌体对羟自由基和超氧阴离子自由基清除率差异不显著( $P > 0.05$ ), 但二者均明显高于无细胞抽提液( $P < 0.05$ ); LR12 活菌体对羟自由基清除率显著高于无细胞抽提液和破碎菌体( $P < 0.05$ ); LR12 活菌体对超氧阴离子自由基清除率高于无细胞抽提液, 二者显著高于破碎菌体( $P < 0.05$ )。由此可见, 同种鼠李糖乳杆菌不同菌株抗氧化性具有差异, 同菌株不同组分抗氧化性也存在较大差异。

## 3 结论

本研究以耐过氧化氢能力为菌体抗氧化活性的指标筛选出两株对过氧化氢耐受能力较强的鼠李糖乳杆菌

LR76 菌株和 LR12 菌株, 两菌株在 1.0mmol/L 的过氧化氢溶液中具有良好的耐受性, 具有高效清除羟自由基和超氧化阴离子自由基能力。结果表明起抗氧化作用的活性成分可能是活细胞或细胞内活性成分, 应进一步对其抗氧化机理进行深入研究, 为 LR12 和 LR76 在功能性发酵食品中的应用提供更加充分的理论依据。

#### 参考文献:

- [1] 田亚平. 自由基生命科学进展[M]. 北京: 原子能出版社, 1993: 14-15.
- [2] 魏涛, 唐粉芳, 王卫平. 金属硫蛋白抗氧化及增强免疫作用的研究[J]. 中国食品添加剂, 2000(2): 74-77.
- [3] 钱程, 霍贵程, 马微. 鼠李糖乳杆菌(LGG)的功能特性及其应用前景[J]. 食品科技, 2005, 9(4): 94-99.
- [4] KORPELAR R, PEUHKUPI K, LAHTENMAKI T, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG shows antioxidative properties in vascular endothelial cell culture[J]. *Milchwi-Memchaft*, 1997, 52: 503-505.
- [5] JEREMY A, JAMES V. *Lactobacillus rhamnosus* GG decreases TNF- $\alpha$  production in lipopolysaccharide-activated marine macrophages by a contact-independent mechanism[J]. *Cellular Microbiology*, 2003, 5(4): 277-285.
- [6] TEISMANN P, FERGER B. The salicylate hydroxylation assay to measure hydroxyl free radicals induced by local application of glutamate *in vivo* or induced by the fenton reaction *in vitro*[J]. *Brain Research Protocols*, 2000, 5(2): 204-210.
- [7] KULLISAAR T, SONGISEPPE, MIKELSAAR M, et al. Antioxidative probiotic fermented goats milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects[J]. *Br J Nutr*, 2003, 90: 449-456.
- [8] 张江巍, 曹郁生, 刘晓华, 等. 抗氧化乳酸菌 L4 的 SOD 活性及其发酵乳的抗氧化作用[J]. *中国乳品工业*, 2006, 34(11): 12-15.