

周闯, 宋俊雅, 张华, 等. 克州地区传统发酵乳制品中抗氧化益生菌的筛选 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (2): 54-61.

ZHOU C, SONG J Y, ZHANG H, et al. Screening of probiotics with antioxidant activity in traditional fermented dairy products in the Kezhou area [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (2): 54-61.

克州地区传统发酵乳制品中抗氧化益生菌的筛选

周闯^{1,2}, 宋俊雅¹, 张华^{1,3}, 许志芹¹, 乔怡然¹, 时璐¹,
王星迪¹, 萨吉代姆·麦麦提⁴, 张海彬^{3*}

1. 江苏农林职业技术学院, 江苏 句容 212400;
2. 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃 兰州 730070;
3. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095;
4. 克孜勒苏职业技术学院, 新疆 阿图什 845350

摘要: 旨在从新疆克州传统发酵乳制品中分离出良好抗氧化活性的益生菌菌株。通过耐过氧化氢 (H_2O_2) 试验、自由基清除或抑制试验, 初步筛选出抗氧化活性良好的菌株, 建立 H_2O_2 诱导的猪小肠上皮细胞系 (IPEC-J2) 细胞氧化损伤模型, 通过比较对照组 (正常培养)、模型组 ($400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} H_2O_2$ 处理 3 h) 以及 JK-8+ H_2O_2 组、JK-16+ H_2O_2 组、JK-23+ H_2O_2 组、JK-24+ H_2O_2 组 (分别用菌株 JK-8、JK-16、JK-23、JK-24 无细胞提取物处理 6 h 后 $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} H_2O_2$ 处理 3 h) 细胞存活状态, 筛选出抗氧化效果最好的菌株, 进行 16S rRNA 鉴定。结果: 从 28 株益生菌中筛选出 8 株 H_2O_2 耐受能力强的菌株。复筛发现对 1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 自由基清除能力最强的是 JK-23, 无细胞提取物清除率为 64.93%, 菌体混悬液清除率为 87.10%, 显著高于其他菌株的菌体混悬液 ($P < 0.05$); 抑制羟自由基能力最强的菌体混悬液是 JK-16 且活力为 $43.00 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 最强的无细胞提取物是 JK-24 且活力为 $39.59 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$; 抗超氧阴离子自由基活力最强的菌体混悬液是 JK-23 且活力为 $74.57 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$, 最强的无细胞提取物是 JK-8 且活力为 $118.63 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 。4 株菌均能缓解 H_2O_2 诱导的 IPEC-J2 细胞的氧化损伤, JK-23 缓解效果最好, 细胞存活率显著提高 ($P < 0.05$), 高达 84.59%。经 16S rRNA 分析, JK-23 被鉴定为加纳醋杆菌 (*Acetobacter ghanensis*), 具有较强的抗氧化活性, 能为饲料和食品加工中天然抗氧化剂的开发和应用提供菌种来源。

关键词: 克州; 传统发酵乳制品; 益生菌; 抗氧化

中图分类号: S852.6 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)02-0054-08

Screening of probiotics with antioxidant activity in traditional fermented dairy products in the Kezhou area

ZHOU Chuang^{1,2}, SONG Junya¹, ZHANG Hua^{1,3}, XU Zhiqin¹, QIAO Yiran¹, SHI Lu¹,
WANG Xingdi¹, Sajidaimu Maimaiti⁴, ZHANG Haibin^{3*}

1. Jiangsu Vocational College of Agriculture and Forestry, Jurong 212400, China;
2. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;
3. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;
4. Kizilsu Vocational Technical College, Atushi 845350, China)

Abstract: This study was to screen probiotics with good antioxidant activity from traditional fermented dairy products in the Kezhou area in Xinjiang. The strains with good resistance to hydrogen peroxide were initially screened out through the hydrogen peroxide resistance test and free radical scavenging or inhibition test. A model of H_2O_2 -induced porcine small intestinal epithelial cell line (IPEC-J2) of cell oxidative damage was established. Then, the strains with the best antioxidant effect were screened out by comparing the cell survival status of each group, including the control group (normal culture), the model group (treated with $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} H_2O_2$ for 3 hours), and the JK-8+ H_2O_2 group, JK-16+ H_2O_2 group, JK-23+ H_2O_2 group, JK-24+ H_2O_2 group (treated with cell free extracts of JK-8, JK-16, JK-23 and JK-24,

收稿日期: 2024-08-18; 修回日期: 2024-12-06

基金项目: 江苏农林职业技术学院科技计划项目 (2024kj33); 江苏省高等学校基础科学 (自然科学) 面上项目 (21KJB230002); 2025 年甘肃省高校研究生“创新之星”项目 (2025CXZX-770)

第一作者: 周闯, 男, 讲师, 硕士

* 通信作者: 张海彬, 教授, 主要研究方向为动物中毒病和畜产品安全, E-mail: haibinz@njau.edu.cn.

then treated with $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ for 3 hours, respectively), and the strains were identified by 16S rRNA. Eight strains with strong hydrogen peroxide tolerance were selected from 28 probiotics. Among the 8 strains of probiotics, JK-23 had the best ability to scavenge DPPH free radicals, its cell suspension and cell free extracts were up to 87.10% and 64.93%, respectively; and the cell free extracts of JK-23 were significantly higher than those of the other strains ($P < 0.05$). JK-16 and JK-24 had the best ability to inhibit hydroxyl free radicals. JK-16 had the highest value of $43.00 \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ among the cell suspension of the 8 probiotics, and the cell free extracts of JK-24 had the highest value of $39.59 \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$. JK-8 and JK-23 had the best activity against superoxide anion radicals. JK-23 had the highest value of $74.57 \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ among the cell suspension of the 8 probiotics and JK-8 had the highest value of $118.63 \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ among the cell free extracts of the 8 probiotics. JK-8, JK-16, JK-23 and JK-24 could alleviate the oxidative injury induced by H_2O_2 in IPEC-J2 cells, in which JK-23 showed the best effect, and the cell viability was significantly improved ($P < 0.05$), by up to 84.59%. JK-23 was identified as the *Acetobacter ghanensis* strain by 16S rRNA analysis, which had strong antioxidant activity and provided a strain source for the development and application of natural antioxidants in feed stuff and food processing industry.

Keywords: Kezhou; traditional fermented dairy products; probiotics; antioxidant

在我国新疆等地存在很多传统发酵的乳制品，如酸奶、开菲尔粒、酸奶疙瘩等，这些传统发酵乳制品中蕴藏着丰富的益生菌资源，尤其是位于帕米尔高原的克州地区。迪娜热尔·迪力达西等^[1]从新疆传统发酵乳制品中分离到瑞士乳杆菌、马乳酒样乳杆菌等10株具有益生特性的乳酸菌；Jin等^[2]从新疆马奶中分离得到114株8种不同的乳酸菌，其中15株菌具有耐酸耐胆盐等良好益生特性；伊力夏提·艾热提^[3]以昭苏县农家自制的发酵奶酪为原材料，共分离鉴定出6株乳酸菌株。

新陈代谢过程中机体会产生活性氧（ROS）、 H_2O_2 和自由基等，外源性或内源性ROS和自由基产生的增加会引起氧化应激，从而导致很多疾病和健康障碍^[4-6]。加之现代化养殖多为大规模集约化养殖，畜禽会因受到多种外界因素（温度、湿度、致病菌等）的影响造成氧化应激，从而引起畜禽应激性疾病^[7]。机体自身的抗氧化防御系统（如在酶抗氧化系统和小分子抗氧化物质）能够平衡机体正常代谢过程中产生的ROS和活性氮来减轻氧化损伤^[8]。除了自身抗氧化防御系统外，外源性低分子量抗氧化剂已被广泛研究和应用^[9]，主要分为天然的抗氧化剂（如各种草本植物中的多糖和类黄酮等）和化学合成的抗氧化剂（如多酚、维生素E等），但化学合成的抗氧化剂的安全性和长期有效性受到质疑^[10]。然而，除了小分子抗氧化剂外，益生菌抗氧化作用也被广泛研究。

目前，大量报道了一些具有减轻氧化损伤作用的益生菌^[11-12]，可以作为一种天然抗氧化剂减少机体和细胞的氧化损伤^[13-14]。Izuddin等^[12]研究发现植物乳杆菌可提高断奶后羔羊的血清和瘤胃抗氧化活性，上调肝脏抗氧化酶和瘤胃屏障功能；Dowarah等^[15]研究发现乳酸菌可以增加抗氧化酶的活性，或调节和缓解循环氧化应激，以保护细胞免受氧化应激引起的损伤；田思敏等^[16]研究发现摄入醋酸菌粉末

可以减轻急性摄入酒精引起的肝脂质蓄积和氧化损伤；Allam等^[17]研究发现乳杆菌可通过提高抗氧化酶的活性对肝毒性起缓解作用。新疆克州地区的传统发酵乳制品中蕴藏的乳酸菌和醋酸菌等益生菌资源十分丰富，本研究旨在对分离自克州地区传统发酵乳制品的益生菌进行抗氧化特性评估，为饲料和食品中天然抗氧化剂的进一步开发和应用于缓解动物和人的氧化应激提供理论基础和菌种来源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

28株益生菌菌株均来源于新疆克州地区的传统发酵乳制品；IPEC-J2为猪小肠上皮细胞系，购自广州吉妮欧生物科技有限公司；MRS培养基购自青岛海博生物技术有限公司；1,1-二苯基-2-三硝基苯肼（DPPH）自由基清除能力试剂盒、羟自由基测定试剂盒、抑制和产生超氧阴离子自由基测定试剂盒，购自南京建成生物工程研究所；细菌基因组DNA提取试剂盒购自天根生化科技（北京）有限公司；PCR相关试剂购自生工生物工程（上海）股份有限公司；细胞计数试剂盒-8（CCK-8）购自APEX BIO公司。

1.2 耐 H_2O_2 能力测定

将培养16~24h的菌悬液浓度调整为 $10^8 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，再以体积分数2%接种量分别接种于初始 H_2O_2 浓度为0、1.0、2.0和3.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的MRS肉汤培养基中，37℃培养16h，测定不同 H_2O_2 浓度下 $OD_{600 \text{nm}}$ 值^[18]。

1.3 菌体混悬液和无细胞提取物的制备

将活化后的菌株以2%接种量分别接种于MRS培养基中，置于37℃培养24h，传至3代备用。将备用菌液按照周闯等^[19]的方法制备菌体混悬液和无细胞提取物，备用菌液在4℃、6000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10min获得菌体沉淀，菌体沉淀用无菌生理盐水溶

液洗涤 3 次, 重悬于生理盐水中, 调整浓度为 10^9 CFU · mL⁻¹, 分成两份, 一份作为菌体混悬液备用, 一份置于 -20 °C 冻存, 再解冻并用细胞破碎仪进行冰浴超声破碎 (150 W, 超声 5 s, 间歇 10 s, 破碎 20 min), 反复冻融超声破碎 3 次, 4 °C、12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 收集上清液即为无细胞提取物。

1.4 清除或抑制自由基活性测定

根据南京建成生物工程研究所 DPPH 自由基清除能力试剂盒、比色法抑制和产生超氧阴离子自由基测定试剂盒和比色法羟自由基测定试剂盒说明书完成对无细胞提取物和菌体混悬液的体外抗氧化指标测定。

1.5 H₂O₂ 氧化应激模型建立与分组

将细胞分为 6 组: 对照组, IPEC-J2 细胞培养 24 h 贴壁后, 换完全培养基, 不添加无细胞提取物, 不经 H₂O₂ 损伤处理; 模型组, IPEC-J2 细胞培养 24 h 贴壁后, 换完全培养基, 6 h 后加入 H₂O₂ 使浓度为 400 μmol · L⁻¹ 处理 3 h; JK-8+H₂O₂ 组、JK-16+H₂O₂ 组、JK-23+H₂O₂ 组和 JK-24+H₂O₂ 组, IPEC-J2 细胞培养 24 h 贴壁后, 分别换成含 10^9 CFU · mL⁻¹ 菌株 JK-8、JK-16、JK-23 和 JK-24 的无细胞提取物培养基预处理 6 h, 再加入 400 μmol · L⁻¹ H₂O₂ 处理 3 h。

将 IPEC-J2 细胞接种于含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 中, 于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。将处于对数期的 IPEC-J2 细胞接种到培养板中, 在

37 °C 和 5% CO₂ 的培养箱中培养, 待细胞融合度 50%~60% 时加入处理好的各菌株无细胞提取物进行 6 h 预处理, 然后加入 400 μmol · L⁻¹ 的 H₂O₂ 刺激 3 h。

1.6 IPEC-J2 细胞观察和存活率检测

IPEC-J2 细胞在加入 H₂O₂ 处理 3 h 后在倒置显微镜下观察并拍照记录, 细胞活性参照 CCK-8 细胞增殖-毒性检测试剂盒完成检测。

1.7 益生菌菌种鉴定

提取纯化菌株 DNA, PCR 扩增后将扩增产物送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行 16S rRNA 序列分析。

1.8 数据统计与分析

试验数据使用 SPSS 17.0 中的 One-way ANOVA 进行显著性分析, Graphpad Prism 9 进行处理并绘图, $P < 0.05$ 表示差异显著。菌株 16S rRNA 测序结果在 NCBI 数据库中进行同源性比较, 用 MAGE 10.0 软件构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 菌株的耐 H₂O₂ 能力分析

由表 1 可知, 菌株的 $OD_{600\text{ nm}}$ 值随着 H₂O₂ 浓度的增高而降低。相比于 0 mmol · L⁻¹ 组, 3.0 mmol · L⁻¹ 组有 20 株菌株 $OD_{600\text{ nm}}$ 值显著降低 ($P < 0.05$), 8 株菌株无显著差异 ($P > 0.05$)。因此, 通过耐 H₂O₂ 试验初筛出 8 株菌株, 分别为 JK-1、JK-8、JK-12、JK-15、JK-16、JK-23、JK-24、JK-25。

表 1 不同菌株对不同浓度过氧 H₂O₂ 化氢的耐受性 ($OD_{600\text{ nm}}$ 值)

菌株	初始 H ₂ O ₂ 浓度 / (mmol · L ⁻¹)			
	0	1	2	3
JK-1	0.67±0.015	0.66±0.010	0.65±0.011	0.65±0.012
JK-2	0.62±0.071 ^a	0.51±0.039 ^b	0.46±0.061 ^b	0.23±0.037 ^c
JK-3	0.62±0.083 ^a	0.24±0.029 ^b	0.22±0.014 ^b	0.18±0.015 ^b
JK-4	0.45±0.012 ^a	0.34±0.010 ^b	0.25±0.075 ^c	0.19±0.068 ^c
JK-5	0.55±0.016 ^a	0.38±0.011 ^b	0.26±0.026 ^c	0.19±0.022 ^d
JK-6	0.66±0.041 ^a	0.30±0.062 ^b	0.27±0.051 ^b	0.16±0.029 ^c
JK-7	0.68±0.034 ^a	0.39±0.043 ^b	0.22±0.012 ^c	0.17±0.030 ^d
JK-8	1.42±0.093	1.37±0.092	1.41±0.079	1.30±0.096
JK-9	0.46±0.004 ^a	0.35±0.042 ^b	0.12±0.008 ^c	0.11±0.004 ^d
JK-10	0.44±0.014 ^a	0.25±0.013 ^b	0.12±0.009 ^c	0.11±0.004 ^c
JK-11	0.67±0.018 ^a	0.41±0.056 ^b	0.21±0.008 ^c	0.19±0.012 ^c
JK-12	0.74±0.010 ^b	0.77±0.022 ^a	0.78±0.027 ^a	0.71±0.015 ^b
JK-13	1.27±0.089 ^b	1.44±0.079 ^a	0.70±0.052 ^c	0.30±0.063 ^d
JK-14	0.65±0.007 ^a	0.36±0.050 ^b	0.25±0.010 ^c	0.22±0.005 ^c
JK-15	0.69±0.009 ^b	0.71±0.007 ^a	0.70±0.009 ^a	0.68±0.004 ^b

续表1

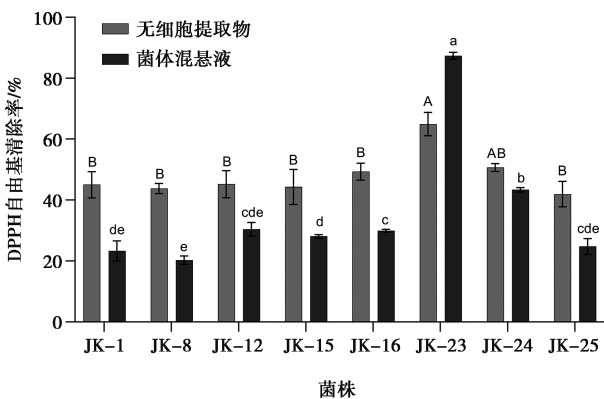
菌株	初始 H ₂ O ₂ 浓度/ (mmol · L ⁻¹)			
	0	1	2	3
JK-16	0.81±0.005 ^b	0.87±0.030 ^a	0.88±0.033 ^a	0.80±0.010 ^b
JK-17	0.73±0.013 ^a	0.74±0.026 ^a	0.33±0.014 ^b	0.27±0.023 ^c
JK-18	0.63±0.006 ^a	0.33±0.006 ^b	0.31±0.012 ^c	0.13±0.006 ^d
JK-19	0.64±0.009 ^a	0.45±0.012 ^b	0.23±0.010 ^c	0.14±0.007 ^d
JK-20	0.54±0.009 ^a	0.54±0.013 ^a	0.23±0.013 ^b	0.15±0.008 ^c
JK-21	0.72±0.057 ^a	0.75±0.081 ^a	0.34±0.012 ^b	0.26±0.008 ^b
JK-22	0.81±0.023 ^a	0.67±0.017 ^b	0.39±0.010 ^c	0.24±0.033 ^d
JK-23	0.73±0.023 ^b	0.82±0.057 ^a	0.74±0.016 ^b	0.71±0.018 ^b
JK-24	1.12±0.051	1.15±0.032	1.19±0.077	1.12±0.033
JK-25	0.78±0.022 ^b	0.85±0.056 ^a	0.78±0.037 ^b	0.74±0.034 ^b
JK-26	0.76±0.016 ^a	0.47±0.012 ^b	0.15±0.009 ^c	0.14±0.031 ^c
JK-27	0.64±0.014 ^a	0.32±0.005 ^b	0.26±0.025 ^c	0.22±0.008 ^d
JK-28	0.63±0.012 ^a	0.37±0.061 ^b	0.25±0.040 ^c	0.15±0.030 ^d

注：同行数据肩标不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2.2 菌株不同组分清除/抑制自由基活性分析

2.2.1 菌株的 DPPH 自由基清除能力分析

如图 1 所示，无论是无细胞提取物还是菌体混悬液，JK-23 的 DPPH 自由基清除率都是最高的。JK-23 无细胞提取物的 DPPH 自由基清除率高达 64.93%，显著高于除 JK-24 以外的其他菌株 ($P < 0.05$)，JK-23 菌体混悬液的 DPPH 自由基清除率高达 87.10%，显著高于其他菌株菌体混悬液的 DPPH 自由基清除率 ($P < 0.05$)。



无细胞提取物间标注不同大写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)，菌体混悬液间标注不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)，下同。

图 1 8 株菌株各分离组分的 DPPH 自由基清除率

2.2.2 菌株抑制羟自由基能力分析

如图 2 所示，在所有菌株的无细胞提取物中 JK-24 的羟自由基抑制能力最强，高达 39.59 U · mL⁻¹，显著高于其他菌株 ($P < 0.05$)。菌体混悬液中 JK-16

的羟自由基抑制能力最强，高达 43.00 U · mL⁻¹，显著高于其他菌株菌体混悬液的羟自由基抑制能力 ($P < 0.05$)。

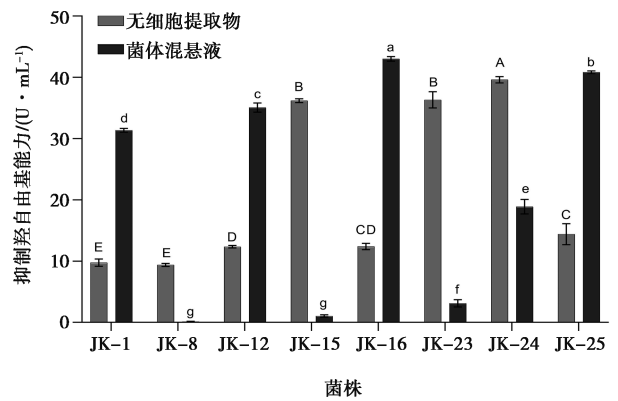


图 2 8 株菌株各分离组分的抑制羟自由基能力

2.2.3 菌株抗超氧阴离子自由基能力分析

如图 3 所示，在所有菌株的无细胞提取物中 JK-8 的抗超氧阴离子自由基能力高达 118.63 U · L⁻¹，显著高于其他菌株 ($P < 0.05$)，JK-8 两种组分的抗超氧阴离子的能力差距较大；菌体混悬液中 JK-23 的抗超氧阴离子能力最强，高达 74.57 U · L⁻¹，显著高于其他菌株菌体混悬液的抗超氧阴离子能力 ($P < 0.05$)，且 JK-23 的无细胞提取物的抗超氧阴离子能力仅次于 JK-8，高达 60.72 U · L⁻¹，相对其他菌株，JK-23 无细胞提取物和菌体混悬液的抗超氧阴离子能力比较接近。

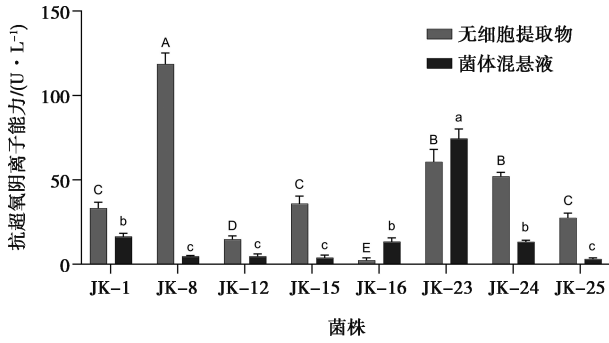
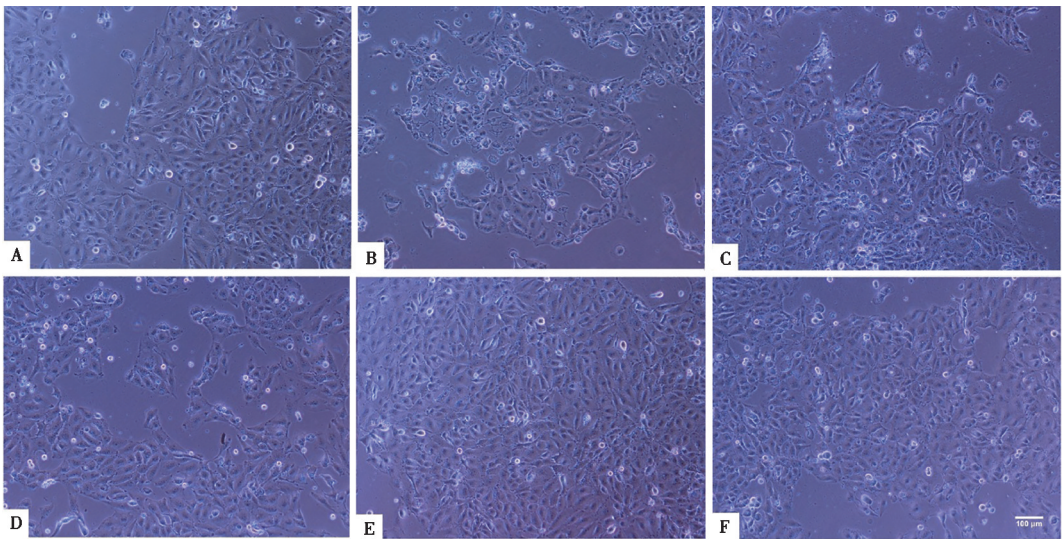


图3 8株菌株各分离组分的抗超氧阴离子能力

2.3 菌株对 H₂O₂ 诱导的细胞氧化损伤的缓解作用

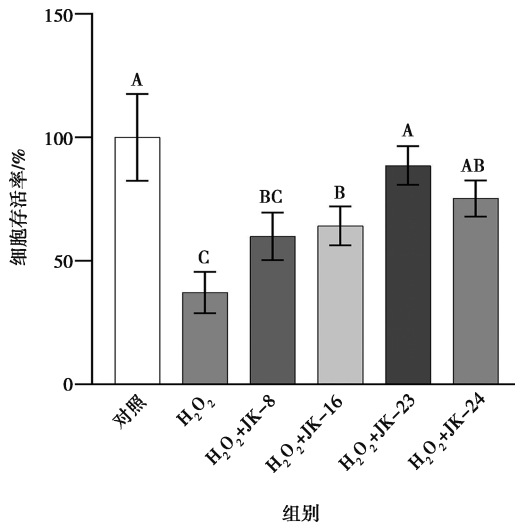
如图4所示,与对照组比较,H₂O₂组细胞数量

明显减少,细胞形态由长梭形转变为皱缩、扁圆甚至椭圆形的状态,细胞核明显增大;与H₂O₂组相比,H₂O₂+JK-8、H₂O₂+JK-16、H₂O₂+JK-23和H₂O₂+JK-24组细胞数量增加,且细胞的皱缩等形态变化现象有所减轻。如图5所示,与对照组相比,H₂O₂组细胞存活率显著下降(P<0.05);与H₂O₂组相比,H₂O₂+JK-16、H₂O₂+JK-23和H₂O₂+JK-24组细胞存活率显著增加(P<0.05),其中H₂O₂+JK-23组细胞存活率最高为84.59%,显著高于H₂O₂+JK-8和H₂O₂+JK-16组(P<0.05),与对照组细胞存活率无显著差异(P>0.05)。



A. 对照组; B. H₂O₂组; C. JK-8+H₂O₂组; D. JK-16+H₂O₂组; E. JK-23+H₂O₂组; F. JK-24+H₂O₂组。

图4 菌株对 H₂O₂ 诱导的氧化损伤细胞模型 IPEC-J2 细胞形态和数量的影响



不同大写字母表示 P<0.05。

图5 菌株对 H₂O₂ 诱导的氧化损伤细胞模型 IPEC-J2 细胞存活率的影响

2.4 菌株分子生物学鉴定

JK-23 菌株经 16S rRNA 基因扩增测序得到长度为 1 395 bp 的序列，通过邻接法对测序结果进行系统

发育树构建（如图 6 所示），该菌株与 NCBI 上已发布的加纳醋杆菌（*Acetobacter ghanensis*）同源性极高，因此鉴定该菌株为加纳醋杆菌。

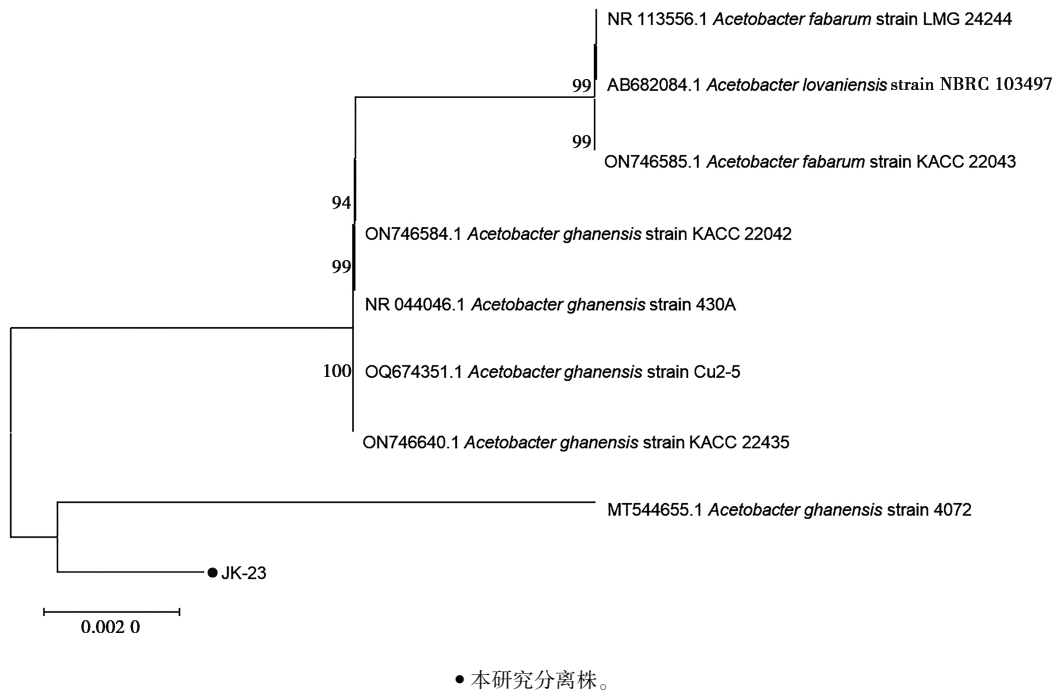


图 6 根据 16S rRNA 构建的 JK-23 菌株系统发育树

3 讨论

本研究对分离自新疆克州地区的传统发酵乳制品中的 28 株益生菌进行了抗氧化活性的筛选。虽然已经有很多学者报道了新疆地区乳制品中抗氧化活性益生菌的筛选情况，如马新森等^[20]从新疆哈萨克传统发酵酸马奶中筛选到具有高抗氧化活性的鼠李糖乳杆菌（*L. rhamnosus*）M2 菌株；王佳敏等^[21]从新疆传统奶酪中分离到的 161 株乳酸菌中分离到 8 株具有良好抗氧化活性的益生菌。然而，这些研究报道中筛选具有抗氧化活性益生菌的方法大多采用的是自由基清除试验等化学方法，很少采用细胞氧化损伤模型等其他方法。本研究则是先通过耐 H₂O₂ 试验来初筛，再通过自由基清除或抑制试验等化学方法进行复筛，最后通过细胞氧化损伤模型验证得到目标菌株。

H₂O₂ 是一种强氧化物，有研究认为益生菌对 H₂O₂ 的耐受能力可以作为初步衡量益生菌具有高抗氧化能力的一个指标，即益生菌的抗氧化能力与其对 H₂O₂ 的耐受能力呈正相关^[22]。已有多篇报道通过耐 H₂O₂ 能力测试来完成抗氧化益生菌的初筛^[23-24]。

DPPH 自由基清除试验是最常见的体外评价抗氧化活性方法，若菌株能将 DPPH 自由基清除，则具有一定的抗氧化性^[25-26]。该研究中，DPPH 自由基

清除试验中大部分菌株无细胞提取物的清除能力高于菌体混悬液，而 JK-23 菌体混悬液的清除能力高于其无细胞提取物，也高于马新森等^[20]分离到的 M2 菌株的无细胞提取物的清除能力（61.35%），说明 JK-23 菌体表面可能附着一些活性物质能中和 DPPH 自由基。羟自由基造成的氧化损伤主要源自 Fe²⁺ 和 Cu²⁺ 等过渡金属离子存在时的芬顿反应（Fenton 反应），而 Fe²⁺ 通过 Fenton 反应生成羟自由基，从染色质中释放的 Cu²⁺ 也可以催化羟自由基的生成，抗氧化剂可以通过螯合这些离子从而抑制羟自由基的产生，现已发现多种益生菌对 Fe²⁺ 和 Cu²⁺ 都具有很强的螯合能力^[27-28]，继而表现出良好的抑制羟自由基能力。该研究中 8 株菌不同组分抑制羟自由基的能力差异较大，这说明不同菌株螯合 Fe²⁺ 和 Cu²⁺ 的活性成分所在位置有所差异，JK-16 主要在细胞表面，JK-24 主要在细胞内。有研究表明超氧阴离子清除能力与代谢产生的超氧化物歧化酶等抗氧化酶有关^[29]，表明 JK-8 和 JK-23 等抗超氧阴离子能力较强的菌株可能会产生某种抗氧化酶。该研究中 8 株菌株菌体混悬液和无细胞提取物对 3 种自由基的抑制/清除能力各不相同，且无对应关系。这与李丹丹^[18]的观点一致，既与每株菌产生或含有的主要抗氧化活性成分不同有关，也与这些主要抗氧化成分所在位置不同有关，抗

氧化成分并非仅存在于细胞内或细胞外,影响因素较为复杂。本试验通过3项清除/抑制自由基等体外化学方法,每种方法里挑选出自由基抑制或清除能力较强的菌株,最终筛选出4株抗氧化能力较强的菌株,分别为JK-8、JK-16、JK-23和JK-24。

通过化学试验筛选出来的具有优良抗氧化活性的菌株,可以通过体外细胞氧化损伤模型来进一步验证,这种方法被称为细胞内抗氧化法 (cellular antioxidant activity),是Wolfe等^[30]开发的一种用于量化植物、食物提取物和膳食补充剂的抗氧化活性的试验方法。丁锐等^[31]通过CAA法开展不同来源虾青素抗氧化能力差异性的研究,苏林浩等^[32]和石韵佳^[33]分别利用人肝癌细胞系HepG2和猪IPEC-J2完成了具有良好抗氧化能力益生菌的筛选。本试验利用H₂O₂诱导建立的IPEC-J2细胞氧化应激模型来对经化学抗氧化试验筛选出来的4株菌进行细胞内抗氧化能力分析,结果表明JK-8、JK-16、JK-23和JK-24对H₂O₂诱导的IPEC-J2细胞氧化损伤均具有缓解作用,其中JK-23的缓解效果最佳,表明JK-23的无细胞提取物中的有效活性成分可能通过穿过细胞膜在IPEC-J2细胞内发挥较强的抗氧化作用。有报道称Nrf2是益生菌抗氧化机制中最重要的途径之一^[34-35],所以也有可能是JK-23无细胞提取物中的某种成分通过激活Nrf2信号通路,上调了细胞内的抗氧化酶活性来体现其抗氧化功能。后续我们将围绕其无细胞提取物中的活性成分鉴定和其对细胞信号通路相关基因、蛋白的表达变化的研究来进一步探索JK-23的抗氧化分子机制。

JK-23经鉴定为加纳醋杆菌。到目前为止,从传统发酵乳制品中分离到乳酸菌、酵母菌等文献报道较多,但分离到醋酸菌的文献较为罕见,尤其是从新疆传统发酵乳制品中筛选到具有良好抗氧化活性的加纳醋杆菌的文献更为罕见,而醋酸菌在抗氧化、解酒、护肝和食醋酿造等方面研究和应用广泛^[16,36]。

综上,本研究从分离自新疆克州地区的传统发酵乳制品的28株益生菌中,筛选出1株具有较强抗氧化活性的加纳醋杆菌,其不仅具有良好的清除/抑制自由基,又能对H₂O₂诱导的IPEC-J2细胞氧化损伤具有良好的缓解作用。从新疆传统发酵乳制品中筛选出具有良好抗氧化能力的加纳醋杆菌罕见报道,其抗氧化作用机制尚不清楚,今后将会结合细胞试验和动物在体试验对该菌的抗氧化作用和机制做更深入的研究,为天然抗氧化剂的进一步开发和在饲料和食品工业的应用提供新的思路和菌种来源。

参考文献:

- [1] 迪娜热尔·迪力达西,刘璐,加勒哈斯别克·塞力克,等. 新疆传统发酵乳品中乳酸菌与酵母菌的益生特性 [J]. 中国微生物生态学杂志, 2018, 30 (1): 5-9.
- [2] JIN Y, LUO B, CAI J, et al. Evaluation of indigenous lactic acid bacteria of raw mare milk from pastoral areas in Xinjiang, China, for potential use in probiotic fermented dairy products [J]. J Dairy Sci, 2021, 104 (5): 5166-5184.
- [3] 伊力夏提·艾热提. 新疆昭苏县传统发酵奶酪中乳酸菌的筛选及其对盐酸/乙醇胃损伤保护作用的研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2021.
- [4] 朱赫,王亚梅,胡恒,等. 富氨水对肉鸡生长性能、抗氧化能力、肉品质和盲肠微生物的影响 [J]. 南京农业大学学报, 2025, 48 (1): 180-189.
- [5] JOMOVA K, RAPTOVA R, ALOMAR S Y, et al. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging [J]. Arch Toxicol, 2023, 97 (10): 2499-2574.
- [6] VONA R, PALLOTTA L, CAPPELLETTI M, et al. The impact of oxidative stress in human pathology: focus on gastrointestinal disorders [J]. Antioxidants (Basel), 2021, 10 (2): 201.
- [7] 王闰宇. 紫大薯粗提物对H₂O₂诱导IPEC-J2细胞氧化损伤的预保护与作用机制研究 [D]. 海口: 海南大学, 2021.
- [8] DEMIRCI-ÇEKIC S, ÖZKAN G, AVAN A N, et al. Biomarkers of oxidative stress and antioxidant defense [J]. J Pharm Biomed Anal, 2022, 209: 114477.
- [9] JOMOVA K, ALOMAR S Y, ALWASEL S H, et al. Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants [J]. Arch Toxicol, 2024, 98 (5): 1323-1367.
- [10] WANG W, XIONG P, ZHANG H, et al. Analysis, occurrence, toxicity and environmental health risks of synthetic phenolic antioxidants: a review [J]. Environ Res, 2021, 201: 111531.
- [11] KUMAR H, DHALARIA R, GULERIA S, et al. Anti-oxidant potential of plants and probiotic spp. in alleviating oxidative stress induced by H₂O₂ [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 165: 115022.
- [12] IZUDDIN W I, HUMAN A M, LOH T C, et al. Dietary postbiotic *Lactobacillus plantarum* improves serum and ruminal antioxidant activity and upregulates hepatic antioxidant enzymes and ruminal barrier function in post-weaning lambs [J]. Antioxidants (Basel), 2020, 9 (3): 250.
- [13] 贺驭,孔祥峰,王振勇,等. 益生菌抗氧化机制的研究进展 [J]. 中国家禽, 2017, 39 (24): 41-44.
- [14] WANG G, HAO M, LIU Q, et al. Protective effect of recombinant *Lactobacillus plantarum* against H₂O₂-induced oxidative stress in HUVEC cells [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2021, 22 (5): 348-365.
- [15] DOWARAH R, VERMA A K, AGARWAL N, et al. Selection and characterization of probiotic lactic acid bacteria and its impact on growth, nutrient digestibility, health and antioxidant status in

- weaned piglets [J]. PLoS One, 2018, 13 (3): e0192978.
- [16] 田思敏, 陈小雪, 韩北忠. 醋酸菌粉末对 ICR 小鼠的酒精性肝脂质蓄积和氧化应激的影响研究 [J]. 中国酿造, 2020, 39 (4): 28-31.
- [17] ALLAM N G, EL-SHEEKH M M, SARHAN N I, et al. A new trend in the medication of hepatocyte cytotoxicity in mice: protective role of probiotic bacteria [J]. Environ Sci Pollut R, 2021, 28 (2): 1555-1564.
- [18] 李丹丹. 西藏传统牦牛乳制品中抗氧化乳酸菌的筛选及发酵性能研究 [D]. 拉萨: 西藏大学, 2020.
- [19] 周闯, 宋俊雅, 叶菁, 等. 1 株马乳酒样乳杆菌的分离鉴定及益生特性研究 [J]. 中国畜牧兽医, 2023, 50 (7): 2974-2986.
- [20] 马新森, 魏敏敏, 张左利, 等. 新疆哈萨克酸奶中功能性乳酸菌菌株的筛选、鉴定及功能评价 [J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15 (7): 151-159.
- [21] 王佳敏, 胡美丽, 李宇辉. 新疆传统奶酪中抗氧化乳酸菌筛选及培养条件优化 [J]. 食品与发酵工业, 2023, 49 (4): 45-51.
- [22] LIU Z, DONG L, JIA K, et al. Sulfonation of *Lactobacillus plantarum* WLPL04 exopolysaccharide amplifies its antioxidant activities *in vitro* and in a Caco-2 cell model [J]. J Dairy Sci, 2019, 102 (7): 5922-5932.
- [23] 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 (1): 42-50.
- [24] LEE M, KIM D, CHOI E J, et al. Transcriptome responses of lactic acid bacteria isolated from kimchi under hydrogen peroxide exposure [J]. Food Res Int, 2023, 168: 112681.
- [25] 丁雨红, 刷柠, 李亚凤, 等. 益生菌复合发酵沙棘酸奶的工艺优化及其体外抗氧化活性研究 [J]. 农业科学研究, 2024, 45 (3): 62-69.
- [26] 丁丽丽, 吕欣然, 高永悦, 等. 鱼肠道中抗氧化活性乳酸菌的筛选及鉴定 [J]. 食品科学, 2021, 42 (10): 127-132.
- [27] CHEN Y, LI Q, XIA C, et al. Effect of selenium supplements on the antioxidant activity and nitrite degradation of lactic acid bacteria [J]. World J Micro Biot, 2019, 35 (4): 61.
- [28] 李思宁, 唐善虎, 任然. 动物双歧杆菌、植物乳杆菌与传统发酵剂共培养对发酵乳抗氧化特性的影响 [J]. 食品科学, 2021, 42 (18): 127-134.
- [29] 冯美琴, 栾晓旭, 孙健. 3 株发酵香肠源乳酸菌体外功能特性的比较 [J]. 食品科学, 2020, 41 (24): 39-45.
- [30] WOLFE K L, LIU R H. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements [J]. J Agric Food Chem, 2007, 55 (22): 8896-8907.
- [31] 丁锐, 冯铭镭, 陈阿琴. 基于 HepG2 细胞评价不同来源虾青素抗氧化能力差异 [J]. 食品与发酵工业, 2023, 49 (13): 172-176.
- [32] 苏林浩, 杜晓娜, 蔡奕贤, 等. 抗氧化菌株的筛选及其对 HepG2 细胞氧化应激损伤的保护作用 [J]. 微生物学通报, 2024, 51 (7): 2690-2701.
- [33] 石韵佳. 抗氧化益生乳酸菌筛选及其对 IPEC-J2 细胞氧化损伤的保护作用 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2018.
- [34] FENG T, WANG J. Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic: a systematic review [J]. Gut Microbes, 2020, 12 (1): 1801944.
- [35] WANG Y, WUY, WANG Y, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* SC06 alleviates the oxidative stress of IPEC-1 via modulating Nrf2/Keap1 signaling pathway and decreasing ROS production [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2017, 101 (7): 3015-3026.
- [36] 王晨, 高煦丹, 唐宁, 等. 醋酸菌的全新保健功能: 对摄入酒精时免疫系统紊乱的影响 [J]. 中国酿造, 2022, 41 (1): 19-24.