



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 117084411 B

(45) 授权公告日 2024. 07. 05

(21) 申请号 202311011337.8

(22) 申请日 2023.08.11

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 117084411 A

(43) 申请公布日 2023.11.21

(83) 生物保藏信息
CGMCC No.26684 2023.02.27

(73) 专利权人 宁夏塞尚乳业有限公司
地址 750299 宁夏回族自治区银川市贺兰
工业园区怡园路5号
专利权人 江南大学

(72) 发明人 李恒 孙艳芳 候智兴 周泽红
杜学贤 卢俭 闫建国 钱建瑛
史劲松 许正宏

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限
公司 44102
专利代理师 彭晓勤

(51) Int.Cl.
A23L 33/135 (2016.01)
C12P 21/06 (2006.01)
A61K 35/747 (2015.01)
A61P 39/06 (2006.01)
A23L 33/19 (2016.01)

(56) 对比文件
CN 102618456 A, 2012.08.01
CN 111849836 A, 2020.10.30

审查员 徐小虎

权利要求书1页 说明书9页
序列表(电子公布) 附图3页

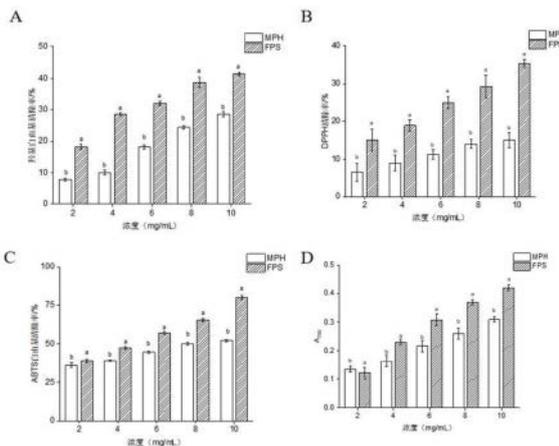
(54) 发明名称

一种提高乳蛋白水解物抗氧化活性的方法
及鼠李糖乳杆菌发酵产品

(57) 摘要

本发明公开了一种提高乳蛋白水解物抗氧化活性的方法及鼠李糖乳杆菌发酵产品。该方法以蛋白酶水解乳蛋白得到的乳蛋白水解物为发酵底物,以鼠李糖乳杆菌为发酵菌进行发酵,得到鼠李糖乳杆菌发酵产物。本发明以乳蛋白水解物为底物的鼠李糖乳杆菌发酵产物,与乳蛋白水解物相比,可显著提升清除DPPH自由基、羟基自由基、ABTS自由基和还原铁离子的能力,显著提高了乳蛋白水解物抗氧化活性;且可降低乳蛋白水解物分子量和增加乳蛋白水解物中游离氨基酸;另外,可以同时促进氧化损伤细胞Nrf2、SOD1、GPX1、HO-1抗氧化基因转录,防止氧化损伤。该鼠李糖乳杆菌发酵产物可应用于制备抗氧化、缓解氧化应激或改善氧化损伤的食品、保健品或药物。

CN 117084411 B



1. 鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) 在提高乳蛋白水解物抗氧化活性或生产抗氧化活性提高的乳蛋白制品中的应用, 其特征在于, 应用方法是以乳蛋白水解物为原料进行鼠李糖乳杆菌发酵, 所述乳蛋白水解物为以蛋白酶水解乳蛋白得到;

所述鼠李糖乳杆菌发酵包括如下步骤:

S1. 用蛋白酶将乳蛋白水解, 水解完毕后, 高温灭活, 得到乳蛋白水解物;

S2. 将鼠李糖乳杆菌接种至含有乳蛋白水解物的培养基中发酵培养, 发酵完成后, 即为鼠李糖乳杆菌发酵产物; 所述鼠李糖乳杆菌的接种量为1~3%; 发酵条件为: 在温度35~38 °C下, 发酵12~50 h;

所述鼠李糖乳杆菌为鼠李糖乳杆菌ST, 该菌于2023年02月27日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏编号为CGMCC No.26684。

2. 一种以乳蛋白水解物为底物的鼠李糖乳杆菌发酵产物, 其特征在于, 所述鼠李糖乳杆菌发酵产物是以蛋白酶水解乳蛋白得到的乳蛋白水解物为发酵底物, 以鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) 为发酵菌进行发酵得到;

所述发酵包括如下步骤:

S1. 用蛋白酶将乳蛋白水解, 水解完毕后, 高温灭活, 得到乳蛋白水解物;

S2. 将鼠李糖乳杆菌接种至含有乳蛋白水解物的培养基中发酵培养, 发酵完成后, 即为鼠李糖乳杆菌发酵产物; 所述鼠李糖乳杆菌的接种量为1~3%; 发酵条件为: 在温度35~38 °C下, 发酵12~50 h;

所述鼠李糖乳杆菌为鼠李糖乳杆菌ST, 该菌于2023年02月27日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏编号为CGMCC No.26684。

3. 根据权利要求2所述鼠李糖乳杆菌发酵产物, 其特征在于, 步骤S1所述用蛋白酶将乳蛋白水解, 其方法为将体积百分比浓度为2~6%的乳蛋白水溶液和蛋白酶混合, 使得混合后溶液中蛋白酶的酶底比为2000~4000 U/g, 所述蛋白酶为碱性蛋白酶。

4. 根据权利要求2所述鼠李糖乳杆菌发酵产物, 其特征在于, 步骤S2所述含有乳蛋白水解物的培养基其制备方法为: 将MRS培养基与去除水分的乳蛋白水解物混合得到, 混合后乳蛋白水解物的质量体积浓度为20-30 g/L。

一种提高乳蛋白水解物抗氧化活性的方法及鼠李糖乳杆菌发酵产品

技术领域

[0001] 本发明属于微生物技术领域,更具体地,涉及一种提高乳蛋白水解物抗氧化活性的方法及鼠李糖乳杆菌发酵产品。

背景技术

[0002] 乳蛋白是牛乳中占比最高的营养组分,是国民健康饮食的重要组成。乳蛋白中丰富的酪蛋白、乳清蛋白等多种蛋白,是天然功能蛋白的优质来源。研究表明,乳蛋白在抗氧化、免疫调节、缓解疲劳、维持肠道健康等方面均具有良好的生理作用。其中,抗氧化能力是各类生物活性的基础,长期的氧化应激会导致各种威胁生命的病理状况,例如衰老,心脏病,糖尿病,自身免疫性疾病,癌症,神经系统疾病等。因此,提高乳蛋白或其制品的抗氧化活性,具有重要意义。

[0003] 目前,常采用生物加工的方法处理乳蛋白,来提高乳蛋白或其制品的抗氧化活性。比如公告号为CN 111903761 A的中国发明专利公开了一种具有抗氧化功能酸奶及其制备方法,该方法使用具有强抗氧化性的植物乳杆菌,与蛋白水解能力强的乳酸菌协同发酵制备酸奶,同时运用蛋白酶对原料乳进行适当酶解提高原料乳蛋白水解度,不仅可以解决植物乳杆菌在乳中生长不佳的问题,还可以提高产品的抗氧化活性。另外,公开号为CN 114271328 A的中国发明专利公开了一种富含鼠李糖乳杆菌酸奶及其制备方法,其通过Nurica乳糖酶对浓缩原料乳酶解后,添加鼠李糖乳杆菌进行发酵得到一种富含鼠李糖乳杆菌酸奶,该发酵品补充益生菌来润肠通便;该方案利用了酶解和鼠李糖发酵的作用,但其目的是使鼠李糖乳杆菌能利用蛋白且增加酸奶中的益生菌数量;而并不涉及如何提升提高乳蛋白或其制品的抗氧化活性。

[0004] 由于不同微生物产生的代谢产物及活性差异较大,且底物也会直接影响微生物的生长繁殖和代谢产物的形成和积累。因此,探究乳蛋白抗氧化活性提升的生物技术具有重要的意义。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提高乳蛋白或其制品的抗氧化活性,提供一种提高乳蛋白水解物抗氧化活性的方法及产品,该方法及产品可以显著提高乳蛋白或其制品的抗氧化活性。

[0006] 本发明为了实现上述目的,采用以下技术方案:

[0007] 鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)在提高乳蛋白水解物抗氧化活性或生产抗氧化活性提高的乳蛋白制品中的应用,应用方法是以乳蛋白水解物为原料进行鼠李糖乳杆菌发酵,所述乳蛋白水解物为以蛋白酶水解乳蛋白得到。

[0008] 本发明以乳蛋白水解物为底物的鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)发酵产物,可显著清除DPPH自由基、羟基自由基和ABTS自由基和还原铁离子,显著提高了乳蛋白水解物抗氧化活性;且可降低乳蛋白水解物分子量和增加乳蛋白水解物中游离氨基酸;另

外,可以同时促进*Nrf2*、*SOD1*、*GPX1*、*HO-1*抗氧化基因的转录,保护 H_2O_2 诱导的氧化损伤。

[0009] 本发明提供了一种以乳蛋白水解物为底物的鼠李糖乳杆菌发酵产物,所述鼠李糖乳杆菌发酵产物是以蛋白酶水解乳蛋白得到的乳蛋白水解物为发酵底物,以鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)为发酵菌进行发酵,得到的鼠李糖乳杆菌发酵产物。

[0010] 上述以乳蛋白水解物为底物的鼠李糖乳杆菌发酵产物,按照如下方法制备:

[0011] S1.用蛋白酶将乳蛋白水解,水解完毕高温灭活后,得到乳蛋白水解物;

[0012] S2.将鼠李糖乳杆菌接种至含有乳蛋白水解物的培养基中发酵培养,发酵完成后,即为鼠李糖乳杆菌发酵产物。

[0013] 进一步地,步骤S1所述蛋白酶选自:酸性蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶、菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶。

[0014] 进一步地,步骤S1所述用蛋白酶将乳蛋白水解,其方法为将体积百分比浓度为2~6%的乳蛋白水溶液和蛋白酶混合,使得混合后溶液中蛋白酶的酶底比为2000~4000 U/g,所述蛋白酶为碱性蛋白酶。

[0015] 进一步地,步骤S1所述水解,其条件为:在温度50~60 °C下,pH为7.0~9.0,水解2~4 h。

[0016] 优选地,步骤S1所述高温灭活其条件为:在温度90~100 °C下,加热8~10 min。

[0017] 进一步地,步骤S1所述高温灭活后,还需进行超滤除去杂质,所述超滤采用分子量为2000~4000 Da的超滤膜,于温度2~6 °C下进行。

[0018] 进一步地,步骤S1所述超滤除去杂质后还需将超滤滤液去除水分。

[0019] 优选地,步骤S1所述超滤滤液去除水分采用冷冻干燥。

[0020] 进一步地,步骤S2所述含有乳蛋白水解物的培养基其制备方法为将MRS培养基与去除水分的乳蛋白水解物混合得到,所述乳蛋白水解物混合后的质量体积浓度为20-30 g/L。

[0021] 进一步地,步骤S2所述鼠李糖乳杆菌其接种量为1~3%。

[0022] 进一步地,步骤S2所述鼠李糖乳杆菌在接种前,需要在MRS培养基中活化培养三代,每代活化10~15 h。

[0023] 进一步地,步骤S2所述发酵,其发酵条件为:在温度35~38 °C下,发酵12~50 h。

[0024] 进一步地,步骤S2所述发酵完成后,还需对得到的发酵液进行离心除杂,其条件为将于发酵液于4000~8000 r/min 离心10~30 min。

[0025] 进一步地,所述鼠李糖乳杆菌为鼠李糖乳杆菌ST,该菌于2023年02月27日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC No.26684。

[0026] 由于本鼠李糖乳杆菌发酵产物可显著清除DPPH自由基、羟基自由基和ABTS自由基药物和还原铁离子,且可以同时促进*Nrf2*、*SOD1*、*GPX1*、*HO-1*抗氧化基因的转录,保护 H_2O_2 诱导的氧化损伤,因此本发明请求保护以下应用

[0027] 上述鼠李糖乳杆菌发酵产物在制备抗氧化、缓解氧化应激或改善氧化损伤的食品、保健品或药物中的应用。

[0028] 本发明还提供了一种提高乳蛋白水解物抗氧化活性的方法,将乳蛋白水解物进行乳酸菌发酵,所述乳酸菌为鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*),所述乳蛋白水解物为乳蛋白的蛋白酶水解物。

[0029] 本发明还请求保护鼠李糖乳杆菌在降低乳蛋白水解物分子量和增加乳蛋白水解物中游离氨基酸中的应用,所述乳蛋白水解物为以蛋白酶水解乳蛋白得到。

[0030] 进一步地,所述游离氨基酸为抗氧化与疏水性氨基酸。

[0031] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0032] (1) 本发明以乳蛋白水解物为底物的鼠李糖乳杆菌发酵产物,相较于乳蛋白水解物,对DPPH自由基、羟基自由基和ABTS自由基的清除率和铁离子还原力有显著提高,具有良好的抗氧化活性。

[0033] (2) 本发明鼠李糖乳杆菌发酵产物,相较于乳蛋白水解物,分子量进一步下降,发酵过程中可将分子量较小的多肽水解,并且产生的游离氨基酸中,Leu、Met、Asp、Ala、Trp、Tyr等抗氧化与疏水性氨基酸的量显著增加。

[0034] (3) 本发明鼠李糖乳杆菌发酵产物不影响RAW264.7细胞增殖,在H₂O₂诱导的RAW264.7细胞氧化损伤模型中,同时促进*Nrf2*、*SOD1*、*GPX1*、*HO-1*等抗氧化基因的转录,剂量依赖关系良好,可以对细胞氧化损伤进行保护。

[0035] (4) 本发明鼠李糖乳杆菌发酵产物可应用于制备抗氧化、缓解氧化应激或改善氧化损伤的食品、保健品或药物、提高乳蛋白水解物抗氧化活性、降低乳蛋白水解物分子量和增加乳蛋白水解物中游离氨基酸中。

附图说明

[0036] 图1不同浓度MPH与FPS抗氧化能力的比较。

[0037] 图1中A为羟基自由基清除率;B为DPPH自由基清除率;C为ABTS自由基清除率;D为铁离子还原能力 $P < 0.05$ 。并且a-b表示同一浓度下,MPH与FPS的差异达到显著水平($P < 0.05$)。

[0038] 图2MPH与FPS的GPC图谱。

[0039] 图3不同浓度FPS对RAW 264.7细胞活力的影响。

[0040] 图4不同浓度FPS对氧化损伤RAW 264.7细胞活力的影响。

[0041] 图4中“#”和“##”分别表示与对照组相比,差异达到显著($P < 0.05$)和差异达到极显著($P < 0.01$);“*”和“**”分别表示与模型组相比,差异达到显著($P < 0.05$)和差异达到极显著($P < 0.01$)。

[0042] 图5 FPS对氧化损伤RAW 264.7细胞中氧化应激相关基因转录水平的影响。图5中a、b、c和d分别表示*Nrf2*、*SOD1*、*HO-1*、*GPX1*相对表达量。

具体实施方式

[0043] 以下结合说明书附图和具体实施例来进一步说明本发明,但实施例并不对本发明做任何形式的限定。除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。

[0044] 除非特别说明,以下实施例所用试剂和材料均为市购。

[0045] 以下实施例所用本鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)菌株ST,来源于泡菜,菌种已于2023年02月27日,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC),菌种保藏地址

为:北京市朝阳区北辰西路1号院3号;菌种保藏编号为CGMCC No.26684。

[0046] 实施例1

[0047] 一种以乳蛋白水解物为底物的鼠李糖乳杆菌发酵产物,按照如下方法制备:

[0048] S1.用中性蛋白酶水解乳蛋白;将配置2%的牛乳蛋白水溶液,按2000 U/g酶底比加入酸性蛋白酶;在温度50 °C水解2 h,过程中用1 mol/L NaOH水溶液调节pH维持在7.0。水解完毕后在温度90 °C加热8 min,对蛋白酶进行高温灭活;高温灭活后,还需进行超滤除去杂质,采用分子量2000 Da的超滤膜在2 °C 下超滤,超滤后,滤液冻干得到乳蛋白水解物(MPH)。

[0049] S2.将鼠李糖乳杆菌ST接种至含有乳蛋白水解物的培养基中发酵培养,发酵完成后,即为鼠李糖乳杆菌发酵产物。

[0050] 将保藏编号为CGMCC No.26684的鼠李糖乳杆菌ST在MRS培养基中活化培养三代,每代活化10 h,将活化后的鼠李糖乳杆菌ST以1%接种量接种至含有乳蛋白水解物的培养基中;含有乳蛋白水解物的培养基其制备方法为将MRS培养基与去除水分的乳蛋白水解物混合得到,乳蛋白水解物混合后的质量体积浓度为20 g/L;所述MRS培养基各包括下述质量体积浓度的组分:柠檬酸氢二胺2 g/L、葡萄糖10 g/L、磷酸氢二钾2 g/L、乙酸钠3 g/L、硫酸镁0.58 g/L、硫酸锰0.25 g/L,余量水。接种鼠李糖乳杆菌ST后,在温度35 °C发酵12 h;发酵完成后,对得到的发酵液进行离心除杂,在4 000 r/min 离心10 min,上清冻干,即为鼠李糖乳杆菌发酵产物(FPS)。

[0051] 本实施例步骤S1制备的乳蛋白水解物MPH中多肽含量采用双缩脲法进行测定,以水解后所得多肽质量与初始牛乳蛋白质量的比值计算MPH得率,MPH得率为70.46 %。

[0052] 实施例2

[0053] 一种以乳蛋白水解物为底物的鼠李糖乳杆菌发酵产物,按照如下方法制备:

[0054] S1.用蛋白酶将乳蛋白水解,水解完毕高温灭活后,得到乳蛋白水解物;

[0055] 用碱性蛋白酶水解乳蛋白;将配置4%的牛乳蛋白水溶液,按3000 U/g酶底比加入碱性蛋白酶;在温度55 °C水解3 h,过程中用1 mol/L NaOH水溶液调节pH维持在8.0。水解完毕后在温度100 °C加热10 min,对蛋白酶酶进行高温灭活;高温灭活后,还需进行超滤除去杂质,采用分子量3000 Da的超滤膜在4 °C 下超滤,超滤,滤液冻干得到乳蛋白水解物(MPH)。

[0056] S2.将鼠李糖乳杆菌ST接种至含有乳蛋白水解物的培养基中发酵培养,发酵完成后,即为鼠李糖乳杆菌发酵产物。

[0057] 将保藏编号为CGMCC No.26684的鼠李糖乳杆菌ST在MRS培养基中活化培养三代,每代活化12 h,将活化后的鼠李糖乳杆菌ST以2%接种量接种至含有乳蛋白水解物的培养基中;含有乳蛋白水解物的培养基其制备方法为将MRS培养基与去除水分的乳蛋白水解物混合得到,乳蛋白水解物混合后的质量体积浓度为25 g/L;所述MRS培养基与实施例1相同。接种鼠李糖乳杆菌ST后,在温度37 °C发酵48 h;发酵完成后,对得到的发酵液进行离心除杂,在6 000 r/min 离心20 min,上清冻干,即为鼠李糖乳杆菌发酵产物(FPS)。

[0058] 本实施例步骤S1制备的乳蛋白水解物MPH中多肽含量采用双缩脲法进行测定,以水解后所得多肽质量与初始牛乳蛋白质量的比值计算MPH得率,MPH得率为78.34%。

[0059] 实施例3

[0060] 一种以乳蛋白水解物为底物的鼠李糖乳杆菌发酵产物,按照如下方法制备:

[0061] S1.用蛋白酶将乳蛋白水解,水解完毕高温灭活后,得到乳蛋白水解物;

[0062] 用木瓜蛋白酶水解乳蛋白;将配置6%的牛乳蛋白水溶液,按4000 U/g酶底比加入木瓜蛋白酶;在温度60 °C水解4 h,过程中用1 mol/L NaOH水溶液调节pH维持在9.0。水解完毕后在温度100 °C加热10 min,对蛋白酶进行高温灭活;高温灭活后,还需进行超滤除去杂质,采用分子量4000 Da的超滤膜在6 °C 下超滤,超滤后,滤液冻干得到乳蛋白水解物(MPH)。

[0063] S2.将鼠李糖乳杆菌ST接种至含有乳蛋白水解物的培养基中发酵培养,发酵完成后,即为鼠李糖乳杆菌发酵产物。

[0064] 将保藏编号为CGMCC No.26684的鼠李糖乳杆菌ST在MRS培养基中活化培养三代,每代活化15 h,将活化后的鼠李糖乳杆菌ST以3%接种量接种至含有乳蛋白水解物的培养基中;含有乳蛋白水解物的培养基其制备方法为将MRS培养基与去除水分的乳蛋白水解物混合得到,乳蛋白水解物混合后的质量体积浓度为30 g/L;所述MRS培养基配方同实施例1。接种鼠李糖乳杆菌ST后,在温度38 °C发酵50 h;发酵完成后,对得到的发酵液进行离心除杂,在8 000 r/min 离心30 min,上清冻干,即为鼠李糖乳杆菌发酵产物(FPS)。

[0065] 本实施例步骤S1制备的乳蛋白水解物MPH中多肽含量采用双缩脲法进行测定,以水解后所得多肽质量与初始牛乳蛋白质量的比值计算MPH得率,MPH得率为77.34%。

[0066] 实施例4鼠李糖乳杆菌ST与其他菌株发酵产物的抗氧化能力比较

[0067] 1.实验方法

[0068] 从泡菜样本中分离筛选获得3株鼠李糖乳酸菌ST、LST01、LST02,以模式菌株鼠李糖乳杆菌LGG作为对照菌株,评价不同鼠李糖乳杆菌菌株的抗氧化能力。

[0069] 具体步骤如下:

[0070] (1)配制发酵培养基:

[0071] 乳蛋白水解物25 g、柠檬酸氢二胺2 g、葡萄糖10 g、磷酸氢二钾2 g、乙酸钠3 g、硫酸镁0.58 g、硫酸锰0.25 g,加入去离子水至1 L,100 °C灭菌10 min。

[0072] (2)发酵产物制备

[0073] 将分离自泡菜的3株鼠李糖乳杆菌在MRS培养基中活化培养三代,每代活化12 h,以2%接种量接种至含MPH的发酵培养基,37 °C发酵48 h。发酵液6 000 r/min 离心20 min,上清冻干得到不同乳酸菌发酵乳蛋白水解物用于筛选评价。

[0074] 其中,以筛选所得的乳酸菌发酵MPH所得发酵产物命名为FPS。

[0075] (3)发酵产物的抗氧化活性测定和评价

[0076] 将各菌株发酵后的样品分别配制成8mg/mL溶液。与发酵前的样品MPH进行对比,测定每个测试样品的抗氧化活性并进行比较。每组设置3组平行。

[0077] A. DPPH自由基清除率的测定

[0078] 配制0.08 mg/mL的 DPPH 溶液,将该溶液与样品溶液1:1(v:v)涡旋混匀,避光孵育30 min 后,在517 nm处测量吸光度。DPPH 自由基清除率按照公式(I)计算:

[0079] $E/\% = (1 - A_i/A_0) \times 100\%$ (I)

[0080] 式中:E表示清除率; A_0 表示对照组吸光值; A_i 表示待测样品吸光值。

[0081] B. 羟基自由基清除率的测定

[0082] 将0.2 mL不同浓度的样品溶液依次与9 mmol/L FeSO₄溶液、1 mL 8.8 mmol/L H₂O₂混合,室温反应10 min后加入1 mL 9 mmol/L水杨酸乙醇溶液,37°C水浴反应30 min后在510 nm处测定吸光值。参照公式(I)计算羟基自由基清除率。

[0083] C. ABTS自由基清除率的测定

[0084] 将7 mmol/L的ABTS溶液与2.45 mmol/L过硫酸钾以1:1混合摇匀后室温避光静置12 h制得ABTS储备液;用10 mmol/L pH 7.4的PBS溶液稀释ABTS储备液,使其在734 nm下吸光度为0.70±0.05时制得ABTS工作液。取20 μL不同浓度样品和200 μL ABTS工作液混合摇匀,室温避光静置10 min,于734 nm处测定吸光值。参照公式(I)计算ABTS自由基清除率。

[0085] D. 铁离子还原力的测定

[0086] 取1 mL不同浓度样品溶液与2 mL PBS溶液(0.2 mol/L,pH 6.6)、2.5 mL 1%(w/v)铁氰化钾溶液混合,50 °C反应20 min,冷却至室温后加入2.5 mL三氯乙酸溶液(10%,w/w)混匀,3 000 r/min离心10 min后取2.5 mL上清,加入2.5 mL去离子水和0.5 mL FeCl₃溶液(0.1%,w/w)于37°C水浴30 min,于700 nm处测定吸光值。

[0087] 2. 实验结果

[0088] 实验结果如表1所示,相比于模式菌株LGG以及其他两株筛选得到的鼠李糖乳杆菌LST01和LST02,鼠李糖乳杆菌ST发酵产物的抗氧化活性最强,鼠李糖乳杆菌ST相较于鼠李糖乳杆菌LGG,羟基自由基清除率提高了20.1%;DPPH自由基清除率提升了23.6%;铁离子还原力提升了27.8%,因此,选定鼠李糖乳杆菌ST作为进一步评价的目标菌株。

[0089] 表1乳酸菌发酵牛乳水解物的抗氧化能力结果

乳酸菌编号	羟基自由基清除率 (%)	ABTS自由基清除率 (%)	DPPH自由基清除率 (%)	铁离子还原力 (A ₇₀₀)
鼠李糖乳杆菌ST	38.73±1.62	65.60±0.98	29.20±3.08	0.37±0.01
鼠李糖乳杆菌LGG	32.24±1.57	63.71±2.86	23.61±2.33	0.36±0.02
鼠李糖乳杆菌LST01	33.09±1.13	58.63±1.78	18.56±2.64	0.36±0.02
鼠李糖乳杆菌LST02	31.07±1.44	51.07±2.17	14.11±2.19	0.33±0.01

[0091] 实施例5MPH和FPS抗氧化活性测定

[0092] 1. 实验方法

[0093] 以实施例2中鼠李糖乳杆菌ST发酵前后的MPH样品和FPS样品分别配制成2、4、6、8、10 mg/mL溶液;以等量去离子水作为对照,每个测试样品设置3组平行。

[0094] 发酵前后的MPH样品的配制、各样品对自由基的清除能力和铁离子还原力的测定方法同实施例4。

[0095] 2. 实验结果

[0096] 实验结果如图1所示。随着浓度增加,FPS对三种自由基清除率和铁离子还原力逐渐增加,有良好的剂量依赖关系。与发酵前相比,当FPS浓度为10 mg/mL时,DPPH自由基、羟基自由基和ABTS自由基的清除率均有显著提高(图1A、图1 B、图1 C和图1 D),说明MPH经ST发酵后显著提高了抗氧化活性。

[0097] 实施例6MPH与FPS游离氨基酸含量分析

[0098] 1. 实验方法

[0099] 游离氨基酸含量分析方法如下:分别取实施例2中MPH样品和FPS样品2.0 g,用5% (w/v)的三氟乙酸于50 mL容量瓶中定容,超声1 h后抽滤,滤液在10000 r/min离心30 min,上清用0.22 μm 滤膜过滤,采用高效液相色谱(HPLC)分析游离氨基酸含量,色谱柱为Agilent Hypersil ODS,柱温40 $^{\circ}\text{C}$,紫外检测波长338 nm,流动相为甲醇:乙腈:醋酸钠=1:2:2(v:v:v),流速1.0 mL/min,进样量10 μL ,分析游离氨基酸含量。

[0100] 2. 实验结果

[0101] 结果如表2所示。发酵后,游离氨基酸总量由32.6 mg/g上升至52.7 mg/g;含量最高的Leu由11.1 mg/g 增加到16.3 mg/g;Met、Asp和Ala浓度显著升高,约是发酵前的4-6倍。

[0102] 表2 MPH与FPS的游离氨基酸含量(10^{-1}mg/g)

氨基酸	MPH	FPS
Asp	5.68±0.33	31.40±1.64
Glu	46.40±0.53	64.40±1.25
Ser	2.03±0.08	6.73±0.30
His	7.37±0.55	7.06±0.11
Gly	3.02±0.23	9.01±0.02
Thr	6.49±0.10	9.48±0.24
Arg	10.07±0.42	6.20±0.40
Ala	8.97±0.71	35.27±1.96
Tyr	37.53±0.23	49.07±0.81
Cys	4.92±0.95	2.05±0.15
Val	15.51±1.15	37.73±1.62
Met	7.55±0.75	30.93±0.92
Phe	11.18±0.37	48.20±2.27
Ile	15.29±0.10	20.73±0.50
Leu	110.53±2.20	162.66±3.40
Lys	17.07±1.44	15.53±0.11
Pro	2.65±0.13	0.86±0.0042
Trp	13.40±0.57	29.82±0.59

[0103] 实施例7:MPH与FPS分子量变化

[0104] 1. 实验方法

[0105] 配制溶液水:乙腈:三氟乙酸=60:40:0.1(v:v:v),加入实施例2中MPH样品和FPS样品配制成20 mg/mL溶液,10000 r/min离心10 min后取过0.22 μm 滤膜用于测定。分子量分布的测定方法如下:采用凝胶渗透色谱(GPC)测定样品分子量分布,色谱柱为TSKgel G2000SWXL,柱温30 $^{\circ}\text{C}$,紫外检测波长220 nm,流动相为水:乙腈:三氟乙酸=60:40:0.1(v:v:v),流速0.5 mL/min、进样量10 μL 。

[0106] 2. 实验结果

[0107] MPH与FPS的分子量分布情况结果如表4及GPC如图2所示,MPH重均分子量为425 Da,经发酵后,FSP重均分子量相比MPH下降至396 Da,其中,分子量500-180 Da的组分减少

最为显著,为7.43%,分子量低于180 Da组分增加了8.66%,说明鼠李糖乳杆菌ST发酵过程中可将分子量较小的多肽进一步水解。

[0109] 表4 MPH与FPS的分子量分布情况

分子量 (Da)	组分占比 (%)	
	MPH	FPS
>10000	0.057±0.0208	0.043±0.0231
10000-5000	0.013±0.0058	0.013±0.0058
5000-3000	0.023±0.0058	0.073±0.0058
3000-2000	0.46±0.0100	0.637±0.0058
2000-1000	6.590±0.0200	6.297±0.0153
1000-500	18.203±0.0702	17.06±0.0551
500-180	50.22±0.1097	42.783±0.0252
<180	24.43±0.2207	33.09±0.1185

[0111] 实施例8:FPS对H₂O₂诱导RAW 264.7 巨噬细胞氧化损伤的保护作用

[0112] 1. 实验方法

[0113] (1) FPS对RAW264.7细胞活力的影响

[0114] 以实施例2中配制质量浓度为50μg/mL、100μg/mL、200μg/mL、400 μg/mL的FPS作为实验组,以不加FPS培养孔作为对照,每组5个平行,利用公式计算细胞存活率。细胞存活率测定方法如下:

[0115] RAW264.7细胞在含10%血清和1%双抗的DMEM培养基中,于37 °C、5% CO₂的湿润环境培养。细胞(1×10⁴个/孔)培养于96孔板中至完全贴壁后,添加不同浓度FPS的新鲜培养基继续孵育24 h。再次吸去培养基并用pH 7.5的PBS溶液淋洗3遍后,加入含有10 % CCK-8溶液的等体积无血清培养基,避光孵育2 h后于450 nm波长下测量吸光值。根据公式(III)计算细胞存活率。

[0116] 细胞存活率/%=(A_i-A₀)/(A₁-A₀)×100%(III)

[0117] A₁表示对照组吸光值;A_i表示实验组吸光值;A₀表示空白组吸光值。

[0118] (2) FPS对氧化损伤RAW 264.7细胞存活率的影响

[0119] 采用H₂O₂诱导巨噬细胞RAW264.7建立氧化损伤模型,以实施例2中FPS配制质量浓度为50μg/mL、100μg/mL、200μg/mL、400 μg/mL的FPS为实验组(模型组),以不加FPS的培养孔为对照组,无细胞的培养孔为空白组,每组5个平行。对细胞氧化损伤的保护作用测定方法如下:

[0120] 取对数生长期的细胞(1×10⁴个/孔)在96孔板中培养24 h后,添加含不同浓度FPS的新鲜培养基。孵育24 h后用PBS溶液洗涤3次,更换含有400 μmol/L H₂O₂的无血清培养基培养12 h后,加入含有10% CCK-8溶液的等体积无血清培养基,避光孵育2 h后于450 nm测量吸光值。参照公式(III)计算细胞存活率。

[0121] (3) FPS对巨噬细胞RAW264.7抗氧化酶基因mRNA水平的影响

[0122] 将对数生长期的细胞按5×10⁴个/孔接种于6孔板中至完全贴壁,以实施例2中FPS

配制质量浓度为50μg/mL、100μg/mL、200μg/mL、400 μg/mL的FPS为实验组,加入不同浓度的FPS培养24 h,PBS洗涤3次。之后除空白组以外,更换为含有400 μmol/L H₂O₂的无血清培养基培养,培养12 h后用PBS洗涤3次,弃去PBS后转移至无RNA酶的离心管中,裂解细胞,提取RNA进行PCR反转录。

[0123] 其中反应体系:200 ng RNA,5 nM上下游引物,1 μL One Step SYBR Green Enzyme Mix,10 μL 2 × One Step SYBR Green Mix,并在95 °C,10 s;60 °C,30 s条件下运行40个循环。通过RT-PCR系统测定靶基因*Nrf2*、*SOD1*、*HO-1*、*GPX1*的相对转录水平,并用2^{- (ΔΔCT)}方法进行分析。各引物序列如表5所示,序列编号为SEQIDNO:1-8,测定的目标基因为每组平行3个复孔,实验重复3次。

[0124] 表5 引物序列

引物名称	引物位置	引物序列 (5'-3')	引物编号
上游	F	CTTTTGGATTTGAGAGAGAGAGGTTG	SEQIDNO:1
下游	R	GAGGATCTGAGCTGCGAAGGAGAC	SEQIDNO:2
上游	F	TGAGGACTCTGTCGTCGTCCTT	SEQIDNO:3
下游	R	CGAGTGGACTTAAAGGATGAGTA	SEQIDNO:4
上游	F	CAATGTTTCTACCTTAACTAA	SEQIDNO:5
下游	R	AGCTCCAGTGAAGAGGCTCTTCA	SEQIDNO:6
上游	F	TGAGCTGATGATGCTTGGGCT	SEQIDNO:7
下游	R	GAGATTTGATTTTCAAGAGAGT	SEQIDNO:8

[0126] 注:F表示正向引物;R表示反向引物。

[0127] 2. 实验结果

[0128] RAW264.7细胞活力结果如图3所示,在浓度为50 - 400 μg/mL时,FPS对细胞活力无显著影响。因此,后续实验即在此浓度范围内考查FPS对细胞氧化应激状态的影响。

[0129] FPS对氧化损伤RAW 264.7细胞存活率的影响结果如图4所示,经H₂O₂处理后,模型组细胞存活率为65.79%;给药FPS后,与模型组相比,细胞存活率随FPS浓度的增加而增加,并具有良好的剂量依赖性;当FPS浓度为400 μg/mL时,细胞存活率上升了31.48%,且与对照组无显著差异。说明FPS对H₂O₂诱导的细胞损伤具有良好的保护作用。

[0130] 结果如图5所示,在H₂O₂诱导的RAW264.7巨噬细胞氧化损伤模型中,*Nrf2*、*SOD1*、*HO-1*、*GPX1*基因转录水平均显著下降;给药FPS后,随剂量的增加,FPS均明显提高如上抗氧化基因的转录水平,当浓度为100-400 μg/mL时有显著差异,且呈剂量依赖关系。

[0131] 结果表明,FPS可显著促进氧化损伤细胞中抗氧化基因的转录,改善氧化应激并发挥保护作用。

[0132] 最后应说明的是:以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,对于本领域的技术人员来说,其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

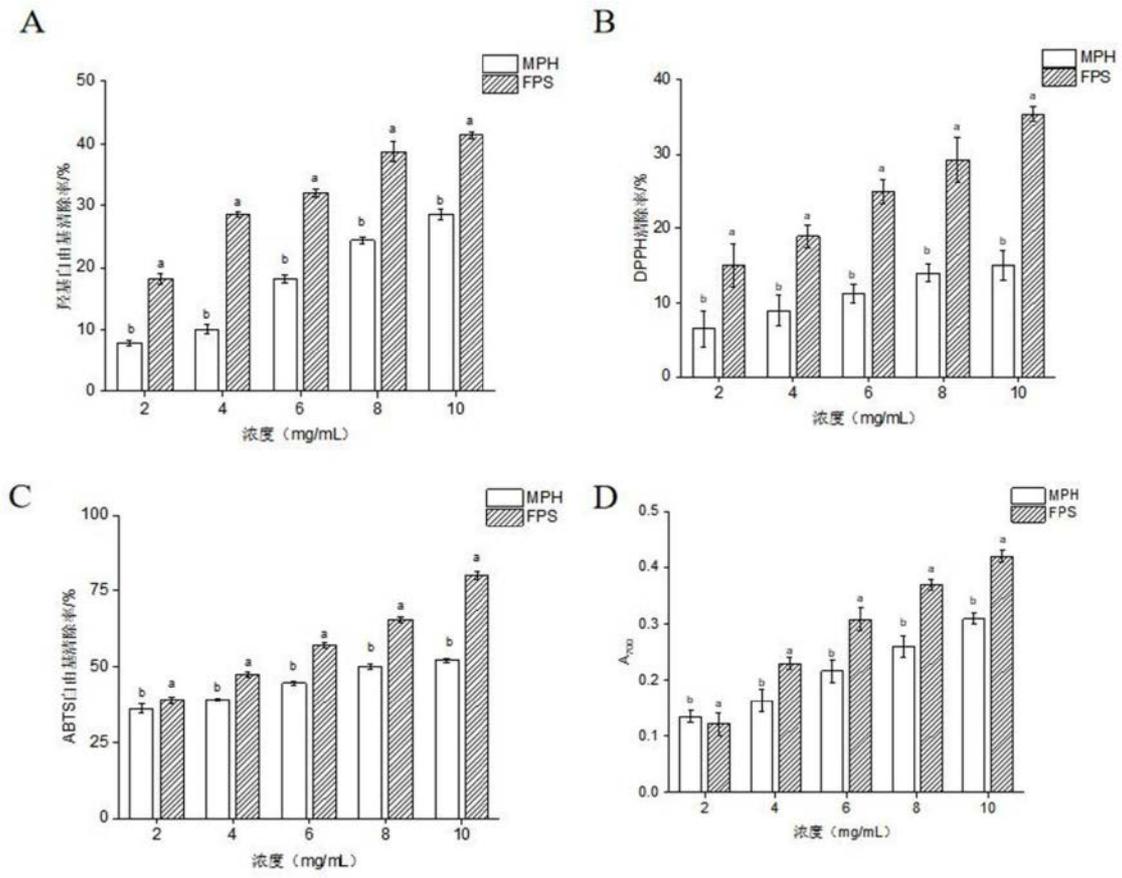


图1

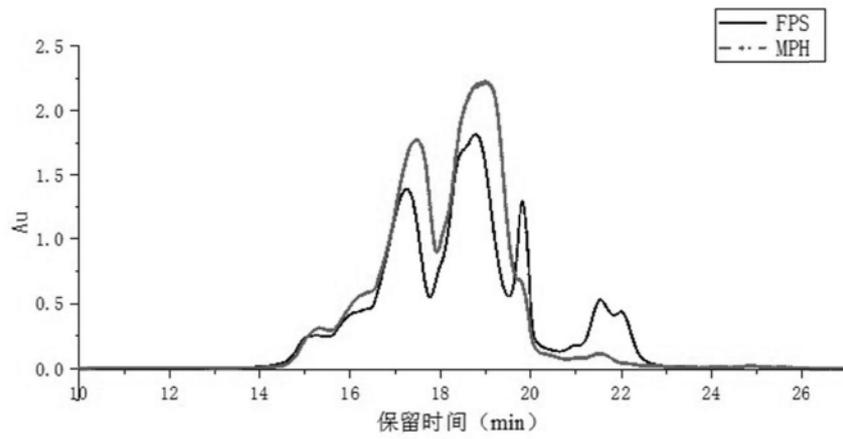


图2

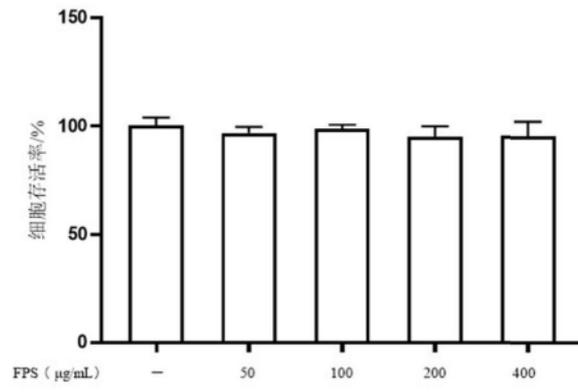


图3

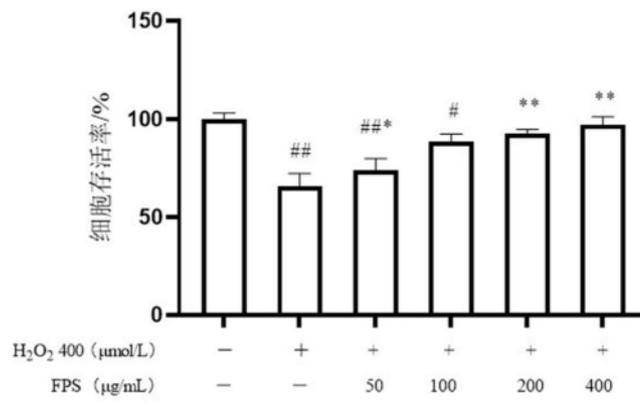


图4

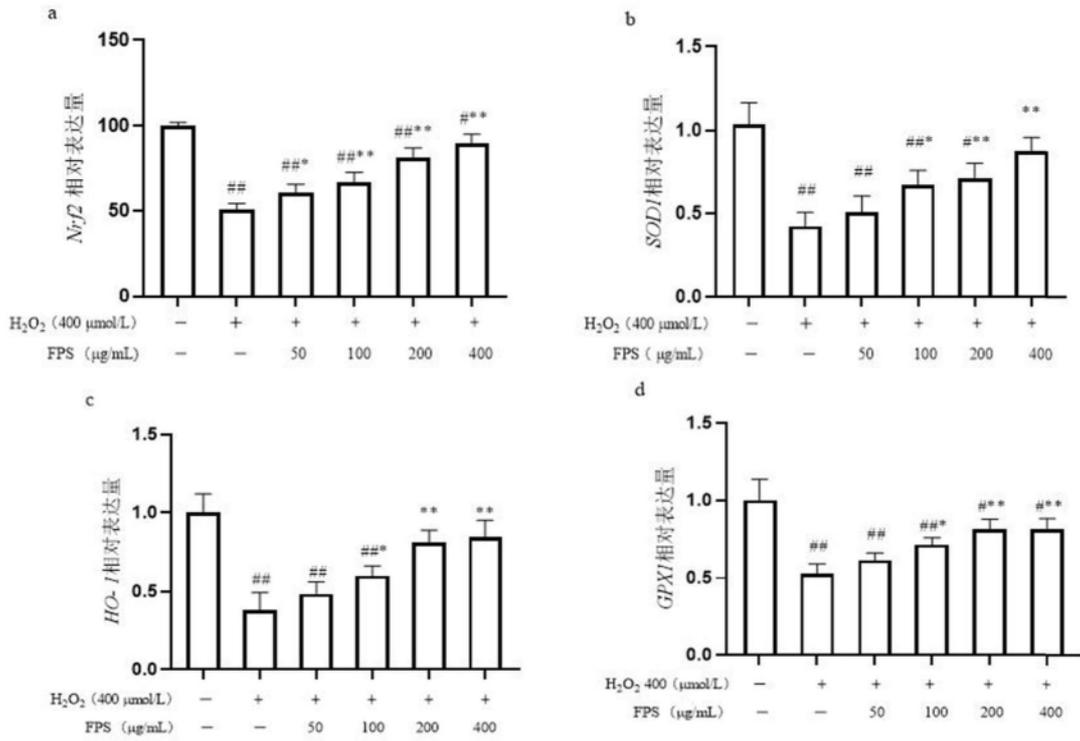


图5