

文章编号:1001-6880(2014)7-1117-03

# 藏灵菇发酵乳清的抗氧化及免疫学活性研究

屈长青<sup>1,2\*</sup>,杜召凤<sup>1</sup>,韦兵<sup>1</sup>,周华艳<sup>1</sup>,姬云涛<sup>1</sup><sup>1</sup>阜阳师范学院生命科学学院; <sup>2</sup>抗衰老中草药安徽省工程技术研究中心,阜阳 236041

**摘要:**藏灵菇培养发酵后,将发酵液加热除去沉淀,获得乳清液,冷冻干燥后得到乳清粉,将其分别配成1%和5%溶液进行小鼠灌胃实验,15 d后,检测昆明种小白鼠力竭游泳时间、血液SOD活性、对鸡红细胞致敏小鼠血清溶血素水平、小鼠腹腔巨噬细胞吞噬活性及对二硝基氟苯诱导小鼠迟发型超敏反应的影响。结果表明:5%剂量组的小鼠力竭游泳时间明显延长、红细胞中SOD的活性也明显提高、并能提高血清溶血素水平( $P < 0.05$ );而且1%和5%剂量组都具有提高腹腔巨噬细胞吞噬率的作用( $P < 0.05$ ),这为开发利用藏灵菇提供了新的思路。

**关键词:**藏灵菇;乳清;抗氧化;免疫学活性

中图分类号:R963

文献标识码:A

## Antioxidant and Immunological Activity of Whey Isolated from Tibetan Kefir Milk

QU Chang-qing<sup>1,2\*</sup>, DU Zhao-feng<sup>1</sup>, WEI bing<sup>1</sup>, ZHOU Hua-yan<sup>1</sup>, JI Yun-tao<sup>1</sup><sup>1</sup>School of Life Science, Fuyang Teachers College; <sup>2</sup>Engineering Technology Research Center of Anti-aging Chinese Herbal Medicine, Fuyang 236041, China

**Abstract:** In this study, the Tibetan kefir was cultured, fermented and was then heated and removed the precipitate to obtain whey. Twenty-four mice were selected and randomly divided into three groups, namely 1% whey group, 5% whey group and blank control group, to perform the corresponding treatments for 15 consecutive days. At the end of administration, the swimming tests were carried out. The fatigue time was observed. The blood SOD, the serum hemolysin level and the phagocytosis of celiac macrophage were detected. It was found that the exhaustive swimming time of the experimental groups were significantly longer than that of blank control group ( $P < 0.05$ ). Compared to blank control group, the content of SOD in mice of the experimental groups were significantly increased ( $P < 0.05$ ), the serum hemolysin level and the ability of phagocytosis of celiac macrophage were enhanced. These results showed that the whey isolated from Tibetan kefir milk significantly increased the activity of antioxidant enzymes in mice. These results will provide a new way of thinking for the development and utilization of Tibetan kefir.

**Key words:** Tibetan kefir; whey; antioxidant; immunological activity

藏灵菇(Tibetan kefir)是源自西藏雪原的特有珍稀菌种,为乳白色、胶质状的块状物,表面和内部栖息着多种微生物(如开菲尔乳杆菌、嗜酸乳杆菌、保加利亚乳杆菌、干酪乳杆菌、发酵乳杆菌、格氏乳杆菌、肠膜明串珠菌、乳酸乳球菌等乳酸菌和啤酒酵母、假丝酵母、克鲁维酵母、单孢酵母等酵母菌<sup>[1]</sup>),长期在牛奶中培养,其个体会逐渐增大,形如盛开的雪莲,所以有“西藏雪莲”之称,在民间常用作制酸奶的发酵剂。藏灵菇制成的酸奶,含有大量的有益活菌,能产生对人体有益的代谢产物,具有多方面的

生理保健功能。研究表明,藏灵菇发酵乳具有调节肠道菌群<sup>[2]</sup>、降低胆固醇水平<sup>[3]</sup>、抑制肿瘤<sup>[4,5]</sup>和抗氧化<sup>[6]</sup>等活性。但是,藏灵菇发酵乳制作奶酪以后,所得乳清的抗疲劳、抗氧化和免疫方面的研究较少。本文旨在通过藏灵菇发酵乳乳清处理昆明小鼠,检测小鼠在抗疲劳、抗氧化和免疫学活性方面指标的变化,为进一步开发利用藏灵菇提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

藏灵菇(Tibetan kefir),经阜阳师范学院生命科学学院姜双林教授鉴定,抗衰老中草药安徽省工程技术研究中心保存;牛奶,伊利全脂灭菌牛乳;健康昆明小鼠(8周龄,体重20~25 g),由安徽医科大学

收稿日期:2013-11-04 接受日期:2014-02-25

基金项目:国家自然科学基金项目(31172182,31201788);安徽省高校自然基金项目(KJ2012Z315,KJ2013A206);安徽省省级科研平台委托专项项目(2013KSLZX04,2014KSLZX03)

\*通讯作者 E-mail: queq518@163.com

实验动物中心提供,合格证号:皖医实动字001号。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 藏灵菇培养及乳清制作

参照郭志华等方法<sup>[2]</sup>并进行改进。灭菌乳中低温(4℃)保藏的藏灵菇,先用无菌水反复冲洗干净,之后按5%的量接种至灭菌乳中,25℃培养,24 h后将藏灵菇用无菌滤网滤出,将发酵液60℃加热处理,不断轻轻搅拌,过滤除去酪蛋白后得到乳清液,真空冻干(-55℃/48 h)得产物,分别配制1%和5%溶液备用。

### 1.2.2 实验动物及分组

取小白鼠30只,随机分为3组,光暗周期为12 h:12 h,温度为20~27℃,湿度为40%~65%。每组小鼠饲喂同样的饲料,且饮水相同。在适应性喂养1 w后进行一次适应性游泳,剔除不会游泳的小鼠,共选出符合实验要求的24只小鼠,并且按体重随机分为3组(生理盐水组、1%剂量组和5%剂量组),进行力竭游泳实验和SOD活性检测。

另选取昆明小白鼠36只,随机分为4组(生理盐水组、1%剂量组、5%剂量组和维生素B<sub>4</sub>组),分别灌胃0.4 mL相应的溶液15 d,进行迟发型超敏反应、血清溶血素和巨噬细胞吞噬率的测定。

### 1.2.3 发酵乳乳清对小鼠体重和力竭游泳时间的影响

将生理盐水、1%剂量和5%剂量3组小鼠连续给药15 d(每日一次),末次给药1 h后将小鼠进行力竭游泳实验(水深35 cm、水温25℃)。判断小鼠力竭的标准为小鼠沉水中10 s没有上浮,记录力竭时间。

### 1.2.4 发酵乳乳清对小鼠血液SOD活性的影响

上述3组小鼠力竭游泳后休息1 h,断尾取血(肝素钠抗凝),分离血清和红细胞,邻苯三酚自氧化法测小鼠血清及红细胞SOD活性。

### 1.2.5 二硝基氟苯(DNFB)诱导小鼠迟发型超敏反应(DTH)实验

连续给药15 d后,剃去鼠腹部毛(2 cm×3 cm),取1%的DNFB溶液50 μL均匀涂于剃毛处使之致敏,3 d后再用1%的DNFB溶液10 μL的均匀涂于小鼠的左耳,右耳涂生理盐水作为空白对照。24 h后颈椎脱臼法处死小鼠,取下左右耳片(直径8 mm),称重。

### 1.2.6 溶血素测定

连续给药第13 d时,给小鼠腹腔注射鸡红细胞(20%)悬液0.2 mL进行免疫,第16 d断尾取血,分

离血清并用生理盐水稀释200倍,取稀释血清1 mL与20%的鸡红细胞悬液0.5 mL混合,以不加血清为空白对照,37℃温育10 min,冰浴10 min终止反应,离心,取上清液1 mL,加入3 mL蒸馏水,10 min后测定OD<sub>540</sub>。另取20%的鸡红细胞悬液0.25 mL加入4 mL蒸馏水中,摇匀、静置10 min,测定OD<sub>540</sub>,作为半数溶血值。小鼠血清溶血素抗体含量以样品半数溶血值(HC<sub>50</sub>)表示。

$$HC_{50} = \frac{\text{样品 OD 值} \times \text{稀释倍数}}{\text{鸡红细胞半数溶血 OD 值}}$$

### 1.2.7 巨噬细胞吞噬指数测定

于末次给药1 h后,小鼠腹腔注射鸡红细胞悬液0.2 mL,4 h后颈椎脱臼法处死小鼠,向腹腔注入生理盐水2 mL,腹腔推揉1 min后,剖开腹腔,用吸管吸取腹腔洗液滴于载玻片上,37℃温育30 min,然后用生理盐水漂洗,晾干。用甲醇丙酮溶液(1:1)固定,4%的Giemsa-磷酸缓冲液染色5 min,再用蒸馏水漂洗,晾干。油镜下计数100个巨噬细胞及吞噬红细胞的巨噬细胞数目。按下式计算吞噬率。

$$\text{吞噬率}(\%) = \frac{\text{吞噬红细胞的巨噬细胞数}}{\text{计数的巨噬细胞数}} \times 100\%$$

### 1.2.8 统计学处理

实验结果用( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用统计软件SPSS13.0对实验数据进行统计分析。

## 2 实验结果

### 2.1 藏灵菇发酵乳乳清对小鼠体重和力竭游泳时间的影响

由表1可知,灌服乳清组小鼠体重增加量明显高于生理盐水组( $P < 0.05$ ),表明藏灵菇发酵乳乳清可以增加小鼠体重,且剂量越大作用越明显。低剂量组、高剂量组小鼠力竭游泳时间都比生理盐水组长,且高剂量组力竭游泳时间明显长于生理盐水组( $P < 0.05$ ),表明高剂量藏灵菇发酵乳乳清具有提高小鼠运动耐力的作用。

表1 发酵乳乳清对小鼠游泳力竭时间的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effects of whey isolated from Tibetan kefir milk on the mice swimming time ( $\bar{x} \pm s$ )

项目 Items	对照组 Control group	1% 剂量组 1% whey group	5% 剂量组 5% whey group
平均时间(min) Time	130.00 ± 6.06	155.00 ± 8.73	163.00 ± 9.06*

注:与空白对照组比较,\* $P < 0.05$ 。

Note: Compared with blank control group, \* $P < 0.05$ .

## 2.2 发酵乳清对小鼠血液 SOD 活性的影响

由下表可知,高剂量组血清、低剂量组红细胞和高剂量组红细胞中 SOD 的活性都明显高于生理盐水组( $P < 0.01$ )。

表 2 小鼠体内 SOD 活性变化(  $\bar{x} \pm s$  )

Table 2 Effects of whey isolated from Tibetan kefir milk on the SOD activity (  $\bar{x} \pm s$  )

组别 Group	SOD 活性 SOD activity ( U/mL )	
	血清 Serum	红细胞 RBC
生理盐水组 Control group	10.05 ± 2.05	2.17 ± 0.54
1% 剂量组 1% whey group	14.93 ± 0.69	13.15 ± 1.21 * *
5% 剂量组 5% whey group	32.40 ± 1.37 * *	32.33 ± 2.72 * *

注:与空白对照组比较, \* \*  $P < 0.01$ 。

Note: Compare with blank control group, \* \*  $P < 0.01$ .

## 2.3 发酵乳清对小鼠免疫力的影响

由表 3 可知,1% 和 5% 剂量组对小鼠耳片肿胀与空白对照组相比均无显著性差异,表明其在增强小鼠 DTH 上几乎没有作用。而 5% 剂量组的  $HC_{50}$  与空白对照组相比差异显著( $P < 0.05$ )。1% 和 5% 剂量组的腹腔巨噬细胞吞噬率都有所增加,并且与空白对照组相比差异显著,而阳性对照(维生素 B<sub>4</sub> 组)与空白对照组相比差异极显著( $P < 0.01$ )。

表 3 藏灵菇发酵乳清对小鼠免疫学指标的影响(  $\bar{x} \pm s$  )

Table 3 Effects of whey isolated from Tibetan kefir milk on the immunological activity (  $\bar{x} \pm s$  )

组别 Group	耳片增重 Ear gaining weight(g)	$HC_{50}$ (%)	吞噬率 Phagocytosis rate (%)
1% 剂量组 1% whey group	13.5 ± 2.06	168 ± 1.7	46.3 ± 1.5 *
5% 剂量组 5% whey group	12.3 ± 1.32	179 ± 2.5 *	48.7 ± 1.8 *
维生素 B <sub>4</sub> 组 Vitamin B <sub>4</sub> group	14.8 ± 0.65 *	172 ± 1.0	54.7 ± 1.1 *
生理盐水组 Control group	12.3 ± 1.41	165 ± 1.3	42.3 ± 1.4

注:与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; \* \*  $P < 0.01$ 。

Note: Compare with control, \*  $P < 0.05$ ; \* \*  $P < 0.01$ .

## 3 讨论

近年来,具有多方面生理保健功能的藏灵菇发酵乳已成为人们研究的热点,但主要研究藏灵菇发酵乳(包括或不包括藏灵菇)的生理功能<sup>[5,6]</sup>、藏灵菇的微生物组成<sup>[1]</sup>和来源于藏灵菇部分菌株的生理功能<sup>[3]</sup>等方面。岳丽红等也研究证明了藏灵菇酸奶具有增强衰老模型小鼠清除氧自由基的能力,可以提高抗氧化酶活性<sup>[6]</sup>。

乳清是干酪生产过程中产生的副产品。乳清蛋白主要包括 A-乳白蛋白、B-乳球蛋白、血清白蛋白和免疫球蛋白等。乳清蛋白的主要成分 B-乳球蛋

白(B-Lg)是导致婴儿牛乳过敏的主要致敏因子,通过对乳清蛋白的酶降解能够有效破坏 B-Lg 的致敏结构,从而降低或消除其致敏性,已有研究表明,乳清分离蛋白(WPI)的酶解物可以用作天然抗氧化剂<sup>[7]</sup>。但对藏灵菇发酵乳清的抗氧化特性尚未见文献报道。本文主要研究了藏灵菇发酵乳清的抗疲劳、抗氧化和免疫调节活性,结果表明:5% 的藏灵菇发酵乳清具有提高小鼠抗疲劳的能力( $P < 0.05$ );同时发酵乳清也具有抗氧化的功能,小鼠在给药后 5% 剂量组血清、1% 和 5% 剂量组红细胞中 SOD 的活性都明显增加( $P < 0.01$ )。另外,本实验从多个角度对藏灵菇乳清的免疫活性进行了研究,证明 5% 剂量组的藏灵菇乳清具有提高血清溶血素水平的能力( $P < 0.05$ ),1% 和 5% 剂量组的藏灵菇乳清都具有提高腹腔巨噬细胞吞噬率的作用( $P < 0.05$ ),这为研究与开发藏灵菇提供了新的思路,下一步将研究藏灵菇乳清在外源药物引起免疫能力低下的情况下,是否具有修复或恢复能力。

致谢:本实验部分内容在南京农业大学食品科技学院完成,并得到徐幸莲教授指导,在此表示感谢。

## 参考文献

- Zhou JZ(周剑忠), Dong MS(董明盛), Jiang HH(江江湖). Screen of dominating microbial species isolated from Tibetan Kefir using an integrated approach of PCR-DGGE and culture-dependent methods. *Sci Agric Sin*(中国农业科学), 2006, 39:1632-1638.
- Guo ZH(郭志华), Yang H(杨洪). Study on the probiotic of lactic acid bacteria from Tibet kefir. *Food Fermn Ind*(食品与发酵工业), 2013, 39:151-154.
- Ran R(冉冉), Wang SP(王世平), Liu H(刘慧). Study on the cholesterol-reducing effects of complex bacteria leaven from kefir grain milk yoghurt in rats. *Nutri Sin*(营养学报), 2009, 1(31):59-62.
- Maalouf K, Baydoun E, Rizk S. Kefir induces cell-cycle arrest and apoptosis in HTLV-1-negative malignant T-lymphocytes. *Cancer Manag Res*, 2011, 3:39-47.
- Gao J, Gu FY, Ruan H, et al. Induction of apoptosis of gastric cancer cells SGC7901 *in vitro* by a cell-free fraction of Tibetan kefir. *Int Dairy J*, 2013, 30:14-18.
- Yue LH(岳丽红), Cheng GD(程广东), Wang CP(王长平). Study on antioxidative effect of tibet linggu fungus yogurt on subacute aging model mice. *J Jiamusi Univ*(佳木斯大学学报), 2008, 26:430.
- Liu ZD(刘志东), Guo BH(郭本恒), Wang YY(王荫榆). Antioxidant activety of the hydrolysates of whey protein isolates. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2007, 19: 477-480.