

益生菌发酵对姜制天麻活性成分及其抗氧化活性的影响

赖岚玉, 李敏, 赵文俊, 黎攀, 杜冰*
(华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

摘要: 该文采用产乳酸芽孢杆菌 *Bacillus* sp. DU-106 和植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* 复合菌种发酵姜制天麻, 对比发酵前后主要活性成分含量变化, 并利用体外抗氧化实验和秀丽隐杆线虫模型进一步探讨益生菌发酵姜制天麻抗氧化活性的变化。实验结果显示, 经发酵能够显著的提高发酵姜天麻 (Fermented *Gastrodia elata* with ginger, FGEG) 的对羟基苯甲醇和总酚含量 ($P<0.05$), 分别为 5.78 mg/g 和 10.15 mg/g, 两种物质相较于未发酵对照组分别增加了 2.54 倍和 1.74 倍。在秀丽隐杆线虫实验中, FGEG 能够显著延长正常生长条件下和急性应激条件下线虫的寿命 ($P<0.01$), 同时降低线虫体内活性氧自由基含量和提高线虫体内过氧化氢酶活性、谷胱甘肽的含量, 并呈现一定剂量依赖效应。同时, FGEG 能够显著降低线虫体内 MDA 的含量和脂褐素相对含量 ($P<0.001$), 与空白组相比分别降低了 87.21% 和 82.53%。与未发酵对照组相比, FGEG 的体内体外抗氧化活性显著提高 ($P<0.05$)。综上, 经发酵后天麻对羟基苯甲醇和总酚含量显著提高, FGEG 相较于未发酵样品抗氧化活性显著提升, 为 FGEG 的开发和利用提供理论支撑。

关键词: 天麻; 对羟基苯甲醇; 抗氧化活性; 秀丽隐杆线虫; 脂褐素

文章编号: 1673-9078(2024)02-91-99

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.2.0331

Effects of Probiotic Fermentation on the Active Constituents and Antioxidant Activity of Ginger-processed *Gastrodia elata*

LAI Lanyu, LI Min, ZHAO Wenjun, LI Pan, DU Bing*

(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Ginger-processed *Gastrodia elata* was fermented using *Bacillus* sp. DU-106 and *Lactobacillus plantarum*, and changes in the content of the main active components before and after fermentation were compared. The antioxidant activity of the probiotic-fermented ginger-processed *G. elata* (FGEG) was further studied using *in vitro* antioxidant experiments and *Caenorhabditis elegans* models. The experimental results suggested that fermentation can significantly increase the *p*-hydroxybenzyl alcohol and total phenol content of FGEG ($P<0.05$), which reached values of 5.78 and 10.15 mg/g, respectively (2.54- and 1.74-fold the values of their unfermented counterparts). In the *C. elegans* model experiments, FGEG significantly extended the life span of *C. elegans* ($P<0.01$) under normal growth and acute stress conditions. Meanwhile, it decreased the

引文格式:

赖岚玉,李敏,赵文俊,等.益生菌发酵对姜制天麻活性成分及其抗氧化活性的影响[J].现代食品科技,2024,40(2):91-99.

LAI Lanyu, LI Min, ZHAO Wenjun, et al. Effects of probiotic fermentation on the active constituents and antioxidant activity of ginger-processed *Gastrodia elata* [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(2): 91-99.

收稿日期: 2023-03-20

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目 (2020B020226008; 2022B0202050001); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系 (CARS-21)

作者简介: 赖岚玉 (1999-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 功能性食品研究, E-mail: lailanyu@163.com

通讯作者: 杜冰 (1973-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 新资源食品与天然功能性原料研究与评价, E-mail: dubing@scau.edu.cn

reactive oxygen radical content and increased the catalase activity and glutathione content in *C. elegans*. Notably, its effects were dose-dependent. FGEG also significantly reduced the MDA and relative lipofuscin content in *C. elegans* by 87.21% and 82.53%, respectively, compared with the control group ($P < 0.001$). Compared with that of the unfermented control group, the antioxidant activity of FGEG was significantly enhanced both in vitro and in vivo ($P < 0.05$). In conclusion, after fermentation, the *p*-hydroxybenzyl alcohol and total phenol content of *G. elata* and the antioxidant activity of FGEG were significantly increased. These findings provide theoretical support for the development and utilization of FGEG.

Key words: *Gastrodia elata*; *p*-hydroxybenzyl alcohol; antioxidant activity; *Caenorhabditis elegans*; lipofuscin

天麻为兰科植物天麻 (*Gastrodia elata* Bl.) 的干燥块茎, 是我国传统名贵中药材, 也是食药同源的一种原料。从 2019 年开始, 国家卫生健康委准许开展有关天麻按照传统既是食品又是中药材的物质生产经营试点工作^[1]。其中天麻中的天麻素 (Gastrodin, GAS) 和对羟基苯甲醇 (*p*-hydroxybenzyl Alcohol, HBA) 是其主要功能活性成分^[2], 被《中国药典》(2020 年版) 记载为天麻的质量指标。现代药理研究和临床应用表明, 天麻具有改善抑郁症^[3,4]、神经炎症^[5]和阿尔兹海默症^[6]等多种药理活性, 在功能性开发方面具有较大的潜力。

鲜天麻原料存在易腐败贮藏期短等原因, 使其产业链短, 产品深加工不足, 附加值低下, 但不同的加工工艺对天麻的活性成分具有较大的影响^[7,8], 因此对鲜天麻的深加工探索极为迫切但同时应兼顾活性成分含量。姜制是天麻重要加工手段, 天麻经姜制后能够提高其功能活性。在张霞^[9]的研究中, 姜制能够提高天麻对于治疗偏头痛的作用。发酵作为一项重要的加工手段, 广泛的应用在食品加工领域。在发酵天麻的研究中, 发酵能使得天麻中的有效成分例如 GAS、HBA、巴利森昔 A、巴利森昔 E 等在微生物作用下相互之间会发生转化, 能够一定程度上提高功能活性^[10,11]。在赵敏等^[12]研究中, 干天麻粉经酵素化后其抗氧化活性显著提高。在蔡倪等^[13]采用酿酒酵母发酵天麻粉体外抗氧化活性有所提升。在 Gao 等^[3]的研究中发酵鲜天麻具有抗抑郁的效果。但目前对于姜制和发酵复合加工的工艺, 尚未见有报道。

因此本研究以鲜天麻为原料, 采用本实验室所有的菌株产乳酸芽孢杆菌 *Bacillus* sp. DU-106 和植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* 并加入小黄姜为辅料复合进行加工的工艺, 对比了发酵前后主要活性成分变化和体内体外抗氧化活性的变化, 初步对以姜为辅料发酵鲜天麻 (Fermented *Gastrodia elata* with Ginger, FGEG) 的抗氧化活性和功能性食品开发潜力进行评价。为 FGEG 这种新型功能性产品的

开发与应用提供技术参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鲜红天麻, 产地为湖北省宜昌市; 小黄姜, 产地为云南罗平; 产乳酸芽孢杆菌 *Bacillus* sp. DU-106 和植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* 存放于华南农业大学新资源食品及功能性原料评价中心; GAS 和 HBA (HPLC $\geq 98\%$)、维生素 C (HPLC $\geq 99\%$), 上海源叶科技生物有限公司; 野生型 N2 秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*) (下述简称线虫) 和缺陷型大肠杆菌 *Escherichia coli* OP50 (下述简称大肠杆菌 OP50), 上海南方模式生物科技股份有限公司; 5- 氟尿嘧啶和 2',7'- 二氯荧光素二乙酸酯 (H₂DCF-DA)、1,1- 二苯基 -2- 三硝基苯肼 (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl, DPPH), 美国西格玛奥德里奇公司; 丙二醛 (Malondialdehyde, MDA)、过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 和谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) 等生化分析试剂盒南京建成生物工程研究所。

1.2 仪器与设备

LC-20A 高效液相色谱仪, 日本岛津公司; Mshot MZ101 体式显微镜, 广州市明美科技有限公司; SPX-150B-Z 型生化培养箱, 上海博迅实业有限公司; Labserv K₃ 型酶标仪, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; HZQ-B 恒温振荡器, 苏州威尔实验用品有限公司; MF53-N 荧光倒置显微镜, 上海蔡康光学仪器有限公司。

1.3 样品制备

姜汁的制备: 取无腐烂, 无虫眼的小黄姜洗净, 切成小块置于榨汁机中, 按料液比 3:100 (g/mL) 加入灭菌蒸馏水, 榨汁 1 min。过 80 目筛网得到姜汁备用。

FGEG 粉制备: 鲜天麻洗净切成均匀片, 放

置蒸笼上蒸制 5 min 后, 置于榨汁机中, 按料液比 1:1 (g/mL) 加入姜汁榨汁得到匀浆。分装至 500 mL 具挡板三角摇瓶, 按质量分数 1% 添加食用葡萄糖和食用盐, 并按质量分数 0.1% 接种活化好的复合菌液, 封上滤菌膜, 置于恒温振荡器中, 温度 30 °C, 转速 120 r/min, 发酵 8 d。待发酵结束后, 真空旋蒸浓缩, 再低温冷冻真空干燥、研磨, 得到 FGEG 冻干粉。

以姜为辅料鲜天麻 (*Gastrodia elata* with Ginger, GEG) 粉制备: 在 FGEG 粉制备未中, 省略接种和发酵步骤, 即得到 GEG 冻干粉。

上述 FGEG 粉和 GEG 粉制备中的姜汁替换成灭菌一级水, 分别得到天麻冻干粉和发酵天麻冻干粉。

1.4 GAS和HBA含量测定

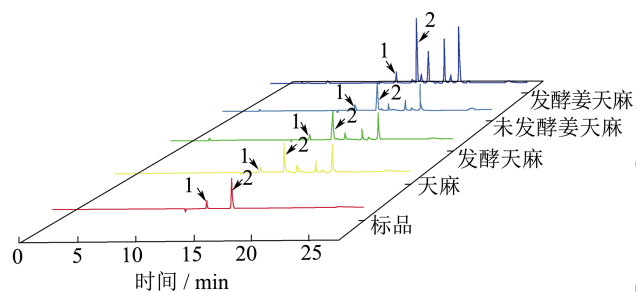


图 1 标品和样品色谱图

Fig.1 Chromatograms of standard and sample

注: 1 为天麻素; 2 为对羟基苯甲醇。

该部分测定方法, 根据《药典》^[2]的测定方法进行了部分的修改。精确称取样品 1.00 g 置于塞锥形瓶, 加入体积分数为 30% 乙醇 50 mL 称定质量, 超声处理 (功率 120 W, 频率 50 kHz) 30 min, 再称定质量用 30% 乙醇补足至原质量; 用滤纸过滤残渣后, 精密量取 10 mL 置于烧杯中, 浓缩至无醇味转移至 25 mL 容量瓶中, 用乙腈: 水 (3:97) 溶液进行溶解和定容, 混匀后过 0.22 μm 有机膜装入进样瓶中待用。色谱条件为: 色谱柱为 Agilent Zorbaxsb-C18 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 (A) -0.1% 磷酸 (B); 梯度洗脱 (0~7 min, 3%→10% A; 7~16 min, 10%→12% A; 16~25 min, 12%→95%; 25~28 min, 12%→3%); 检测波长为 220 nm。GAS 的出峰时间为 13.593 min, HBA 出峰时间为 15.827 min; 色谱图见图 1; GAS 标曲 $y=21\ 714x-14.713$ ($R^2=0.999\ 8$), HBA 标曲: $y=40\ 271x-20.604$ ($R^2=0.999\ 9$)。

1.5 多糖含量测定

参照 DB 22/T 1685-2012 《人参中人参多糖的测定 分光光度法》对样品中多糖含量进行测定; 其中葡萄糖标曲 $y=13.159x+0.020\ 7$ ($R^2=0.999\ 3$)。

1.6 总酚含量测定

参照 T/NAIA097-2021 《枸杞中总酚含量的测定 分光光度法》对样品中总酚含量进行测定; 其中没食子酸标曲 $y=5.396\ 9x-0.000\ 3$ ($R^2=0.999\ 7$)。

1.7 体外抗氧化测定方法

该部分参照李婷等^[4]、罗星等^[5]的方法略有修改进行, 实验中选用维生素 C 作为阳性对照。

1.7.1 DPPH 自由基清除能力的测定

取 1 mL 不同质量浓度的样品于试管中, 加入 1 mL 0.2 mmol/L 的 DPPH 溶液, 充分摇匀, 4 000 r/min 离心 6 min, 静置 30 min, 以无水乙醇为参比组调零, 在 517 nm 处测定其吸光度 (A_s)。对照组用无水乙醇替代 DPPH 溶液; 空白组用无水乙醇替代样品溶液。每组样品重复 3 次, 按照式 (1) 计算 DPPH 自由基清除率。

$$Y = \left(1 - \frac{A_s - A_c}{A_0}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中:

Y——自由基清除率, %;

A_s ——样品吸光值;

A_c ——对照组吸光值;

A_0 ——空白组吸光值。

1.7.2 羟自由基清除能力的测定

取 1 mL 不同质量浓度的样品于试管中, 依次加入 6 mmol/L 的 FeSO_4 溶液和 6 mmol/L H_2O_2 溶液各 1 mL, 摇匀后静置 10 min, 再加入 6 mmol/L 的水杨酸 1 mL, 摇匀后室温避光静置 30 min, 在 510 nm 测其吸光度, 空白组用蒸馏水替代样品, 对照组用蒸馏水替代水杨酸, 按照羟自由基的清除率按式 (1) 计算。

1.7.3 总还原能力

取 1 mL 不同质量浓度的样品于试管中, 依次加入 pH 值为 6.6 磷酸盐缓冲液和质量分数为 5% $\text{K}[\text{Fe}(\text{CN})]$ 溶液各 1 mL, 摇匀后于 50 °C 下水浴 20 min, 再加入质量分数为 10% 的三氯乙酸溶液 1 mL, 充分摇匀后以 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 2.5 mL, 加入等体积的蒸馏水和质量分数为

0.1%的FeCl₃溶液,摇匀后静置10 min,在700 nm测其吸光度,空白组用无水乙醇替代样品稀释液。还原能力按式(2)计算。

$$X = A_i - A_j \quad (2)$$

式中:

X—样品总还原力;

A_i—样品吸光值;

A_j—空白组吸光值。

1.8 体内抗氧化测定

线虫相关试验参照 Won 等^[16]、严静等^[17]、安苗青等^[18]的方法稍有进行修改。

1.8.1 线虫培养

本实验所用线虫均为经过高氯酸钠漂白裂解法进行同期化处理的L4期线虫。培养采用线虫生长培养基(Nematode Growth Medium, NGM),在表面涂布有大肠杆菌OP50作为线虫食物,置于20℃恒温恒湿培养箱中培养。各实验组不同样品在试验前12 h滴在NGM以备使用。

1.8.2 样品制备

分别称量3 g FGEG冻干粉和GEG冻干粉,溶于40 mL蒸馏水中,涡旋5 min使得充分溶解,与活化后的大肠杆菌OP50菌液按照1:2、1:1、2:1比例混合,得到25 mg/mL(低剂量组,FGEGL)、37.5 mg/mL(中剂量组,FGEGM/GEGM)、50 mg/mL(高剂量组,FGEGH)的样品。空白组则用蒸馏水:大肠杆菌OP50菌液按1:1进行配比。

1.8.3 正常和急性应激环境寿命试验

正常环境下寿命试验:随机挑取同期化至L4期的线虫到各组NGM上(每组5个平板,每个平板20条线虫)。从转移时刻起记录各组线虫的存活天数,每24 h转移线虫至新NGM中,产卵期结束后可每两天转一次。每天记录线虫存活和死亡数并将死亡的虫挑出,当所有组别中的线虫均死亡时,则实验结束。实验重复3次。

H₂O₂氧化应激试验:随机挑取同期化的L4期线虫到各组NGM上(每组5个平板,每个平板20条)继续干预7 d,试验开始时,转移至按体积比加入0.05% φ=30%的H₂O₂并且不含大肠杆菌OP50的NGM中,每隔1 h记录线虫的存活及死亡个数,并绘制生存曲线,直至所有线虫死亡。实验重复3次。

紫外和热应激试验:随机挑取同期化的L4期线虫到各组NGM上(每组5个平板,每个平板20条)

继续干预7 d,转移到不含大肠杆菌OP50的NGM中,分别放置在紫外照射环境和37℃恒温环境中培养,每隔2 h记录线虫的存活及死亡个数,并绘制生存曲线,直至所有线虫死亡。实验重复3次。

1.8.4 线虫体内抗氧化酶和MDA测定

随机挑取同期化L4期线虫至各组NGM上,干预7 d,用M9缓冲溶液冲洗培养皿并收集各板上的成虫。冷冻研磨后离心,取上清得到线虫匀浆,参照相关试剂盒进行SOD、CAT、GSH-Px活力和MDA含量的测定,并用BCA蛋白试剂盒测定上清液中蛋白质浓度进行标准化。实验重复3次。

1.8.5 线虫体内活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)测定

随机挑取同期化L4期线虫至各组NGM上,干预7 d,用M9缓冲溶液冲洗培养皿并收集各板上的成虫。冷冻研磨后离心,取上清备用。吸取50 μL上清液和50 μL H₂DCF-DA于96孔板中避光混匀后,在激发波长485 nm、发射波长530 nm的荧光显微镜下每20 min进行1次荧光强度测定。连续测定8次,并用BCA蛋白试剂盒测定上清液中蛋白质浓度进行相对荧光强度标准化处理。实验重复3次。

1.8.6 线虫体内脂褐质水平测定

随机挑取同期化的L4期幼虫到新的各组培养板上(每组4个平板,每个平板20条)干预7 d,用质量分数为0.1%叠氮化钠溶液将其麻醉,随即转移载玻片盖上盖玻片,通过荧光倒置显微镜(激发波长365 nm、发射波长420 nm)获取荧光图像并用Image J软件对荧光强度和线虫表面积进行数据化处理和得到脂褐质相对荧光强度。实验重复3次。

1.9 数据分析

文中数据均使用“平均值±标准差”表示,统计分析通过软件SPSS 26.0中t检验和单因素分析完成, P<0.05为具有差异性。

2 结果与分析

2.1 益生菌发酵前后姜制天麻活性成分变化

不同加工工艺对天麻主要活性成分含量的影响实验结果见表1,结果显示,加姜对天麻的主要活性成分不产生影响(P>0.05)。发酵不加辅料姜能够显著提高(P<0.05)HBA、多糖、总酚的含量,但使得GAS含量显著降低(P<0.05)。发酵姜制天麻,相较于天麻和未发酵姜天麻,HBA、多糖、总

酚的含量显著提高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), GAS 含量略有下降但不呈现显著性差异 ($P > 0.05$)。在赵敏等^[12]研究中, 干天麻经酶化后, 其 HBA 含量相较于未发酵样品提高了 1.82 倍。在蔡倪等^[13]采用保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌对天麻粉进行发酵, 相较于未发酵样品 HBA 含量提高了 2.57 倍。本实验中 FGEG 相较于 GEG, HBA 含量提高了 2.54 倍, 与先前的研究具有一致性。实验结果表明, 益生菌发酵姜制天麻能够显著提高 ($P < 0.05$) 天麻的 HBA 和总酚含量。这可能是由天麻中的巴利森苷物质在微生物作用下发生转化有关^[12,13], 后续研究中可通过测定 FGEG 中的巴利森苷物质的含量论证是否由其转化至的 HBA 含量提升。

表 1 不同加工工艺对天麻主要活性成分含量的影响

Table 1 Effects of different processes on the content of main active components of *Gastrodia elata* (mg/g)

| 样品名称 | GAS | HBA | 多糖 | 总酚 |
|------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 天麻 | 3.08 ± 0.10 ^a | 2.11 ± 0.53 ^c | 71.34 ± 0.45 ^c | 5.23 ± 0.29 ^c |
| GEG | 3.03 ± 0.04 ^a | 2.17 ± 0.3 ^{7c} | 71.64 ± 1.21 ^c | 5.84 ± 0.78 ^c |
| 发酵天麻 | 2.80 ± 0.13 ^b | 3.08 ± 0.73 ^b | 73.27 ± 0.72 ^b | 7.51 ± 0.39 ^b |
| FGEG | 3.10 ± 0.64 ^a | 5.78 ± 0.88 ^a | 76.71 ± 1.98 ^a | 10.15 ± 0.72 ^a |

注: 表中每竖列不同小写字母来表示统计学存在差异, $P < 0.05$ 。

2.2 FGEG体外抗氧化实验结果

DPPH 是一种稳定的自由基, 其醇溶液在波长为 517 nm 下具有最大吸收, 当遇到自由基清除剂能够使得在最大吸收波长处的吸光值下降。DPPH 自由基清除、羟自由基清除和总还原能力法常用于测定生物试样的体外抗氧化能力^[19,20]。由图 2 可知在 7.5~37.5 mg/mL 质量浓度范围内的 GEG 和 FGEG 样品的 DPPH 自由基清除能力 (图 2a)、羟自由基清除能力 (图 2b)、总还原能力 (图 2c) 都随着随样品质量浓度的增加而增强, 呈现出剂量依赖效应。其中 FGEG 和 GEG 总还原力的半数有效量 IC_{50} 为 9.51、10.91 mg/mL, 表明 FGEG 的抗氧化活性高于 GEG。在相同质量浓度下, FGEG 抗氧化能力都要显著强于 GEG ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 这可能与 FGEG 的总酚含量高于 GEG 有关。大量研究证明^[9], 酚类物质具有较强的抗氧化活性。在赵敏等^[21]的研究中, 经过益生菌发酵干天麻体外抗氧化活性显著提升, 与本实验的结果较为一致。结果表明经过益生菌发酵对姜制天麻的体外抗氧化活性得到提升。

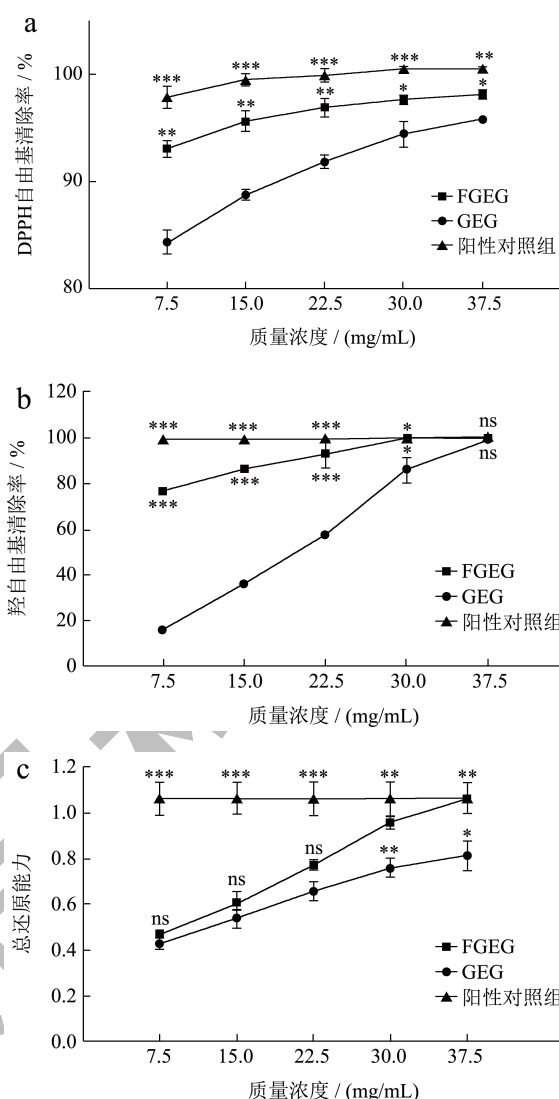


图 2 FGEG 和 GEG 体外抗氧化实验结果

Fig.2 Results of *in vitro* antioxidant experiments of FEGE and GEG

注: FEGE 与相同质量浓度的 GEG 比较差异性, 其中 * 表示与未发酵组相比 $P < 0.05$, 差异性具有显著性; ** 表示 $P < 0.01$, 差异性十分显著; *** 表示 $P < 0.001$, 差异性极其显著。

2.3 FGEG体内抗氧化实验结果

2.3.1 FGEG对线虫正常条件下和急性应激条件下寿命的影响

线虫的寿命是评价样品干预下发挥体内抗氧化活性的重要指标^[22,23]。FGEG 和 GEG 对线虫寿命的影响结果如图 3a 所示, 与空白组相比, FGEG 各剂量组干预后均显著提高了 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 并呈现剂量依赖效应。其中, FGEG 低、中、高剂量组线虫的平均寿命分别延长了 28.21%、34.17% 和 36.15%。并且 FGEG 各剂量组对于延长线虫的寿命优于 GEGM。结果表明, FGEG 能够有效地正常

生长条件下延长线虫寿命，具有一定的抗衰老、抗氧化活性。

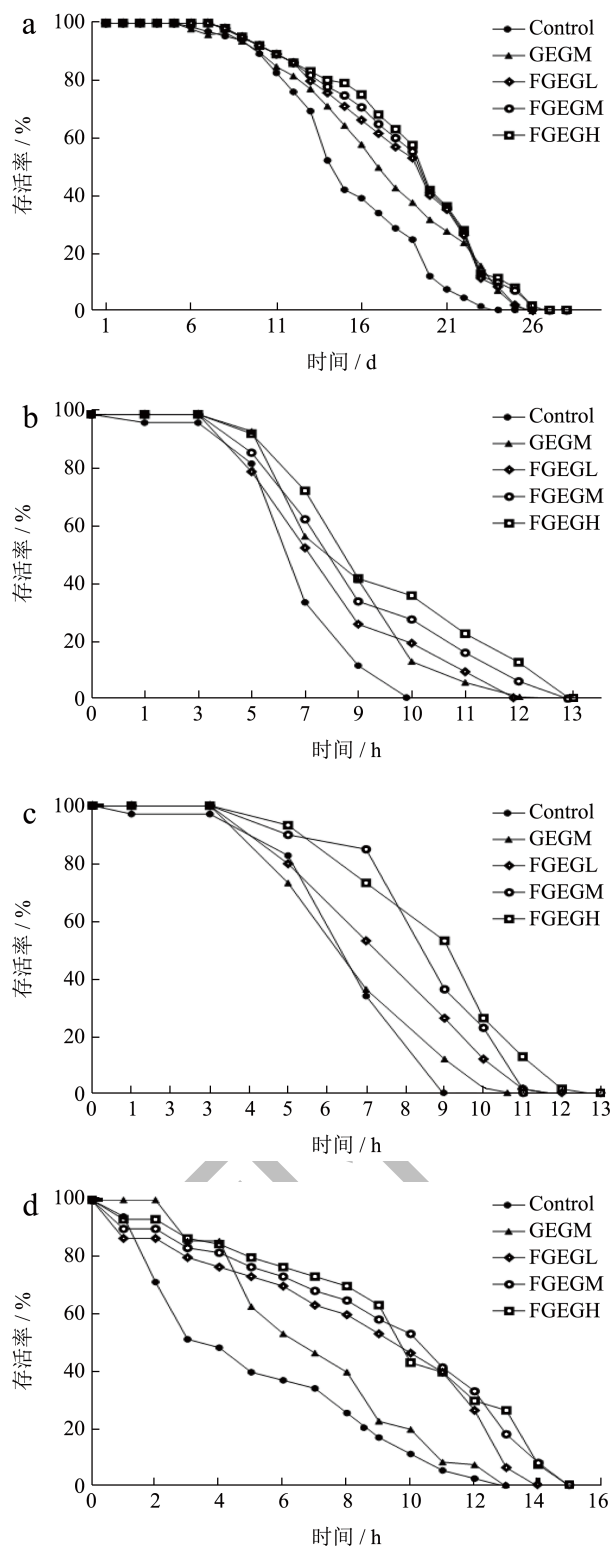


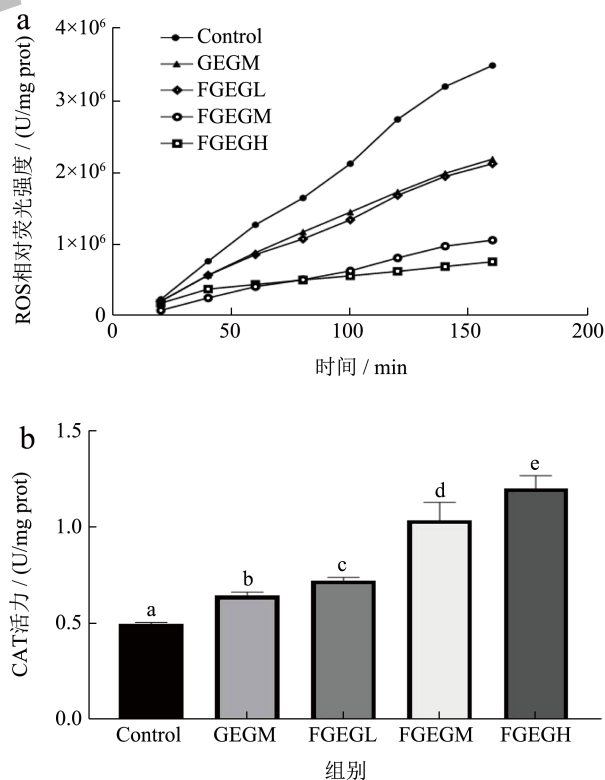
图3 FGEG对线虫急性应激能力的影响

Fig.3 Effects of FGEG on acute stress ability of *C. elegans*

注：(a) 正常环境寿命实验；(b) 紫外应激寿命实验；(c) 紫外应激寿命实验；(d) H₂O₂ 应激寿命实验。

在正常情况下，线虫机体内 ROS 产生和去除的速率是平衡，当受到急性环境的刺激，机体会产生大量自由基发生氧化反应，破坏细胞从而导致寿命的缩短^[24,25]。因此常用急性环境下的线虫寿命评价其应对急性应激能力。FGEG 对线虫急性应激能力的影响结果如图 3b、3c 和 3d 所示。在三个应激实验中，与空白组相比，FGEG 各剂量组的曲线明显向右移动，线虫平均寿命显著提高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。在紫外应激实验中，FGEG 低、中、高剂量组，相较于空白组平均寿命分别能够提高 13.03%、16.19%、18.52%。在热应激实验中，FGEG 低、中、高剂量组，相较于空白组平均寿命分别能够提高 11.79%、26.21%、28.43%。在 H₂O₂ 应激实验中，FGEG 低、中、高剂量组，相较于空白组平均寿命分别能够提高 61.21%、73.35%、77.76%。在三个应激实验中，FGEG 各剂量组优于未发酵对照组。综上，FGEG 能够提高线虫对不良环境的耐受性和抗氧化应激的能力，说明 FGEG 中具有优良抗氧化和自由基清除能力的活性物质。在李红丹等^[26]的研究中，相较于空白组益生菌发酵的大豆酸奶具有能够延长线虫寿命和提高线虫抗急性氧化应激能力，与本实验中实验结果具有一致性。

2.3.2 FGEG对线虫体内抗氧化相关指标的影响



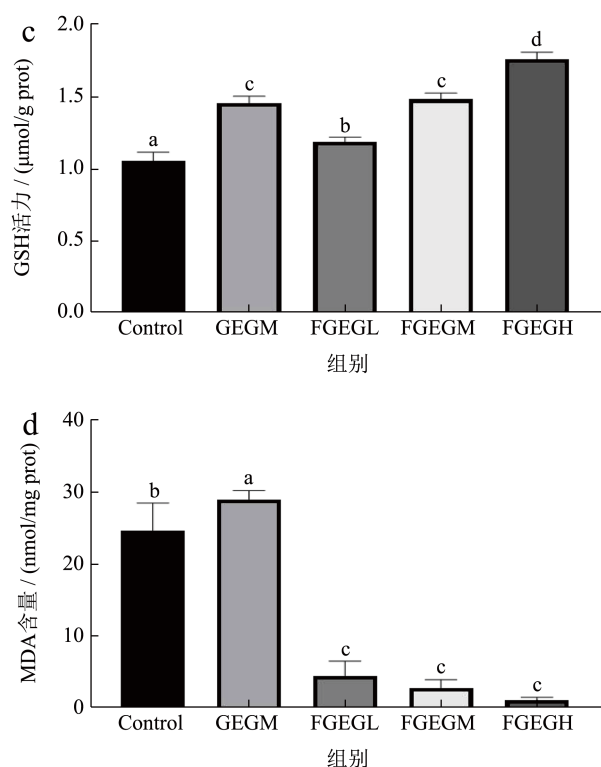


图4 FGEG对线虫抗氧化相关指标影响

Fig. 4 Effects of FGEG on antioxidant related indexes in *C. elegans*

注: 柱上不同小写字母表示各组间存在差异, $P < 0.05$ 。

ROS是导致衰老的重要因素之一^[27], 体内ROS的清除有赖于各种抗氧化酶作用, 当ROS过度积累会导致机体氧化系统失衡造成一系列的氧化损伤。FGEG对线虫体内抗氧化相关指标的影响结果如图4。与空白组相比, FGEG各剂量组能够使得线虫的ROS相对含量显著降低($P < 0.001$)和抗氧化酶CAT和GSH含量显著提高($P < 0.001$), 并呈现出剂量依赖效应。相比于GEG对照组, FGEG更加显著抑制了线虫体内的ROS积累和提升抗氧化酶活性。MDA是评价线虫氧化损伤的重要指标。FGEG对线虫体内MDA含量的影响结果如图4d, 与空白组相比, FGEG各剂量组干预线虫的MDA相对含量极其显著降低($P < 0.001$)。结果表明经过FGEG干预能够清除衰老线虫体内的自由基, 减少氧化损伤从而达到抗氧化效果, 说明FGEG具有良好的抗氧化活性。

2.3.3 FGEG对线虫体内脂褐质水平的影响

脂褐素是线虫机体衰老过程中细胞损伤的标志物, 其积累水平可以进一步反映线虫的衰老状况^[18]。FGEG对线虫体内脂褐素的影响如图5所示, 与空白组相比, FGEG各剂量组的荧光强度较弱, 表明

线虫体内的脂褐素含量具有明显的差异。对图片进行量化处理见图5f, 与空白组和GEGM相比, FGEG各剂量组线虫体内脂褐质水平显著降低($P < 0.001$)。结果表明FGEG能够显著减少氧化对机体的造成地损伤。线虫体内MDA与脂褐素有着密切的关系。在机体中发生氧化应激产生MDA, MDA会损害细胞产生脂褐素, 脂褐素积累会损害细胞造成氧化应激, 这样就形成了“雪崩效应”导致加快衰老^[28,29]。在本文2.3.2中经过FGEG干预后的线虫体内MDA含量相较于空白组显著减少, 这与脂褐素实验结果具有一致性。

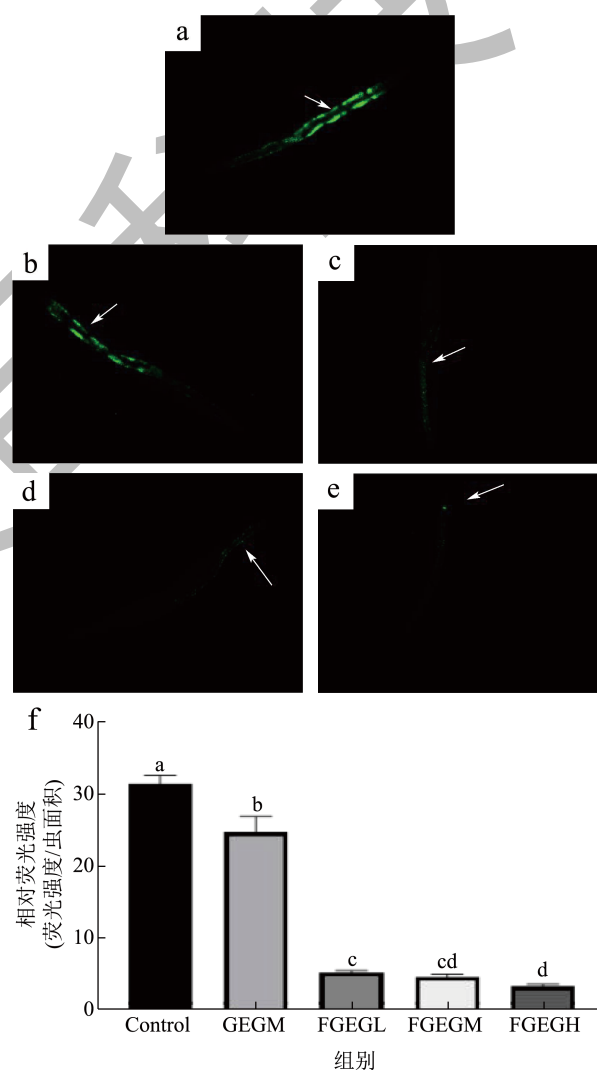


图5 FGEG对线虫脂褐素含量的影响

Fig. 5 Effects of FGEG on lipofuscin content in *C. elegans*

注: a图为空白组线虫, b图为GEGM组线虫, c图为FGEGL组线虫, d图为FGEGM组线虫, e图为FGEGH组线虫, f为对照片数据进行量化处理得到各实验组的相对荧光强度, f图中柱上用不同小写字母来表示各组平均值之间的差异, $P < 0.05$ 。

综合线虫实验结果, FGEG 能够延长线虫在正常状态和急性环境下的寿命, 提高线虫体内 CAT 活性和 GSH 含量, 降低线虫体内 ROS 含量和减轻氧化损伤, 并呈现一定剂量依赖效应。与未发酵对照组相比, FGEG 的体内体外抗氧化活性显著提高。FGEG 具有表现出良好的抗氧化活性, 可能与发酵后 HBA 含量提高存在一定的联系。在 Liu 等^[6]研究中, HBA 可使 N2 线虫的正常生产条件下的平均寿命延长 25% 以上以及提高了线虫在急性环境下的存活率。与本文的实验结果具有一致性。现代药理研究发现, HBA 改善对失眠^[30]、退行性神经疾病^[6]、大脑损伤^[31]等方面有重要的作用。在余星霖等^[32]研究中, 能够改善脑缺血造成损伤。在 Liu 等^[6]的研究中 HBA 能够抗压能力和预防与衰老相关的疾病。这为 FGEG 下一步的研究指明了方向。

抗氧化活性是评价功能性食品和保健食品活性的重要指标, 不仅对其功能活性的评价至关重要, 而且能够提高对研究其在预防和治疗与氧化应激相关的疾病方面的效率。综合体内体外抗氧化数据表明, FGEG 具有较好的抗氧化活性, 具有成为功能性食品和保健食品潜力。

3 结论

本文采用产乳酸芽孢杆菌 *Bacillus* sp. DU-106 和植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* 复合菌种发酵姜制天麻, 有效提高了天麻中 HBA 和总酚含量, 相较于未发酵对照组分别增加了 2.54 倍和 1.74 倍。在体外体内抗氧化活性实验发现, 发酵后样品 DPPH 自由基清除能力、羟自由基清除能力和总还原力显著提升。FGEG 能够延长正常生长条件下和急性应激条件下线虫的寿命, 同时降低线虫体内活性氧自由基含量和提高抗氧化酶活力, 并减轻氧化应激损伤。本研究为姜制和发酵复合加工鲜天麻的功能活性开发和利用提供了理论基础, 也为鲜天麻的深加工提供一项新的工艺。FGEG 表现出具有较好的抗氧化活性, 后期研究中应抓住发酵后能够提高天麻中 HBA 的含量这一特点, 结合 HBA 的药理活性进一步深入开发 FGEG 的功能活性, 进一步深入研究天麻姜制和发酵复合加工过程中的目标代谢产物, 为促进天麻的深加工发展提供理论支撑。

参考文献

[1] 上官晨虹, 赵博, 陈琛. 药食两用天麻的安全性评价研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(18): 5946-5954.

- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典2020年版 一部[Z]. 北京: 中国医药科技出版社, 59-60.
- [3] GAO M, WU Y, YANG L S, et al. Anti-depressant-like effect of fermented *Gastrodia elata* Bl. by regulating monoamine levels and BDNF/NMDAR pathways in mice [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2023, 301: 115832.
- [4] LIN Y E, CHOU S T, LIN S H, et al. Antidepressant-like effects of water extract of *Gastrodia elata* blume on neurotrophic regulation in a chronic social defeat stress model [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2018, 215: 132-139.
- [5] CHEN F, JIANG N, ZHANG Y W, et al. Protective effect of *Gastrodia elata* blume ameliorates simulated weightlessness-induced cognitive impairment in mice [J]. *Life Sciences in Space Research*, 2023, 36: 1-7.
- [6] LIU Y, LU Y Y, HUANG L, et al. Para-hydroxybenzyl alcohol delays the progression of neurodegenerative diseases in models of *Caenorhabditis elegans* through activating multiple cellular protective pathways [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 2022: e8986287.
- [7] WAN F C, FENG C F, LUO K Y, et al. Effect of steam explosion on phenolics and antioxidant activity in plants: A review [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2022, 124: 13-24.
- [8] WU Z, GAO R P, LI H, et al. How steaming and drying processes affect the active compounds and antioxidant types of *Gastrodia elata* Bl. f. *glaucula* S. chow [J]. *Food Research International*, 2022, 157: 111277.
- [9] 张霞. 江西“建昌帮”姜制天麻成分变化及对对偏头痛作用机理研究[D]. 江西: 江西中医药大学, 2021.
- [10] 田紫平, 肖慧, 冯舒涵, 等. 天麻有效成分巴利森苷的降解规律分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(23): 18-21.
- [11] 李佳阳, 吴国真, 王新茗, 等. 鲜天麻中酶对巴利森苷A的降解作用研究[J]. 中国现代中药, 2022, 24(3): 459-465.
- [12] 赵敏, 王瑜, 杨娟, 等. 天麻醇素的发酵工艺优化与品质评价[J]. 中国酿造, 2022, 41(10): 177-182.
- [13] 蔡倪, 许译文, 张东亚, 等. 酵母、乳酸菌作为发酵剂对天麻总酚含量及还原能力的影响[J]. 现代食品, 2020, 20: 193-197.
- [14] 李婷, 刘蕾, 黄敏, 等. 负载姜黄素的玉米醇溶蛋白-羧甲基壳聚糖纳米复合物的制备表征、体外消化及其抗氧化活性[J]. 现代食品科技, 2022, 38(12): 110-117.
- [15] 罗星, 李晓敏, 薛帆正, 等. 银耳菌糠黑色素的理化性质及抗氧化和抑菌活性[J]. 菌物学报, 2023, 42(2): 539-552.
- [16] WON S, CHA H, YI S, et al. *Tenebrio molitor* extracts modulate the response to environmental stressors and extend lifespan in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Journal of Medicinal Food*, 2016, 19(10): 938-944.
- [17] 严静, 薛秋艳, 王昉, 等. 发酵米芽对高脂肪秀丽隐杆线虫的降脂及抗氧化作用[J]. 食品工业科技, 2023, 44(6): 8-15.

- [18] 安苗青,徐雅囡,卓倩婷,等. 龟鹿二仙胶对秀丽隐杆线虫体内抗衰老作用研究[J]. 广州中医药大学学报, 2022, 39(8):1863-1870.
- [19] 李浩然,刘伟,王晓文,等. 野生櫻桃李酵素的主要成分及其抗氧化性能分析[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(3):176-183.
- [20] YING L, KONG D, GAO Y Y, et al. *In vitro* antioxidant activity of phenolic-enriched extracts from Zhangping Narcissus tea cake and their inhibition on growth and metastatic capacity of 4T1 murine breast cancer cells [J]. Journal of Zhejiang University-Science B, 2018, 19(3): 199-210.
- [21] 赵敏,王瑜,李立郎,等. 天麻醇素化过程中风味物质及抗氧化活性动态变化[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(22):92-98.
- [22] MULLA S, LUDLAM A R, ELRAGIG A, et al. A biphasic model of lifespan in nematode *Caenorhabditis elegans* worm [J]. Royal Society Open Science, 2023, 10(2): 220991.
- [23] KIM S S, SOHN J, LEE S V. Immunosenescence in *Caenorhabditis elegans* [J]. Immun Ageing, 2022, 19(1): 56.
- [24] YU Y J, CHEN H B, HUA X, et al. Long-term toxicity of lindane through oxidative stress and cell apoptosis in *Caenorhabditis elegans* [J]. Environmental Pollution, 2021, 272: 116036.
- [25] JIANG S Q, DENG N, ZHENG B S, et al. Rhodiola extract promotes longevity and stress resistance of *Caenorhabditis elegans* via DAF-16 and SKN-1 [J]. Food & Function, 2021, 12(10): 4471-4483.
- [26] 李红丹,王洁,廖振林,等. 大豆酸奶对秀丽隐杆线虫体内抗氧化和寿命的影响[J]. 现代食品科技, 2023, 39(4):7-12.
- [27] ZHANG H, QIN J W, LAN X Q, et al. Handelin extends lifespan and healthspan of *Caenorhabditis elegans* by reducing ROS generation and improving motor function [J]. Biogerontology, 2022, 23(1): 115-128.
- [28] 王亚超. 以秀丽隐杆线虫为模型对水果发酵液在抗衰老等生理功效方面的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2022.
- [29] 焦明雅. 脂褐素形成条件及几种天然抗氧化剂对其清除作用研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2020.
- [30] ZHU H Y, ZHANG D, ZHANG Q, et al. 4-Hydroxybenzyl alcohol derivatives and their sedative-hypnotic activities [J]. RSC Advances, 2018, 8(35): 19539-19550.
- [31] YU S S, ZHAO J, LEI S P, et al. 4-Hydroxybenzyl alcohol ameliorates cerebral injury in rats by antioxidant action [J]. Neurochemical Research, 2011, 36(2): 339-346.
- [32] 余星霖,罗苑,杨丽萍,等. 对羟基苯甲醇通过SIRT1/PGC-1 α /TFAM信号通路抗脑缺血再灌注损伤的作用及机制研究[J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(1):42-47.