

植物乳杆菌发酵蓝莓果汁工艺优化 及其抗氧化能力

李虹甫,杨鑫焱,刘昕宇,张宇,满朝新,姜毓君*

(东北农业大学食品学院 乳品科学教育部重点实验室,黑龙江哈尔滨 150030)

摘要:利用植物乳杆菌 LJ26 发酵蓝莓果汁,利用 Box-Behnken 设计响应面试验对发酵工艺进行优化。确认最佳发酵工艺为发酵温度 37 ℃、发酵时间 24 h 和发酵剂接种量 3%,获得的发酵蓝莓果汁中活菌数达 1×10^9 cfu/mL。对发酵前后蓝莓果汁中功能活性物质进行检测,发酵后果汁中酚类物质含量增加了 43.42%,花青素含量提高了 5.88%。通过体外自由基清除试验和 Caco-2 细胞氧化损伤缓解试验检测了发酵前后蓝莓果汁的抗氧化能力变化,结果发现发酵后蓝莓果汁 DPPH 自由基和超氧阴离子自由基清除率显著提高,缓解 Caco-2 细胞氧化损伤能力显著增强,证明植物乳杆菌 LJ26 可以作为提高蓝莓果汁品质的菌株,为蓝莓深加工技术提供了理论基础。

关键词:植物乳杆菌,蓝莓发酵工艺,功能活性物质,抗氧化能力,Caco-2 细胞

Fermentation Process Optimization of Blueberry Juice Fermented by *Lactobacillus plantarum* and Analysis of Antioxidant Capacity

LI Hong-fu, YANG Xin-yan, LIU Xin-yu, ZHANG Yu, MAN Chao-xin, JIANG Yu-jun*

(Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Food College of Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Blueberry juice was fermented by *Lactobacillus plantarum* LJ26, and the fermentation process was optimized by Box-Behnken design response test. The optimized fermentation conditions were as follows: initial inoculum size was 3%, fermentation temperature was 37 ℃ and fermentation time 24 h. Under the optimum conditions, the viable counts of fermented blueberry juice were 1×10^9 cfu/mL. In addition, the functional substances in the blueberry juice were compared before and after the fermentation. The results showed that phenolic content and the anthocyanin content were increased by 43.42% and 5.88%, respectively. The antioxidant capacities of blueberry juice before and after fermentation were detected by *in vitro* free radical scavenging test and Caco-2 cell oxidative damage amelioration test. It was found that the free radical scavenging rate of DPPH and the superoxide anion of blueberry juice increased significantly and the alleviation ability of Caco-2 cell oxidative damage was also significantly elevated after fermentation. These results proved that *L. plantarum* LJ26 could enhance the quality of blueberry juice, and provided a theoretical basis for the deep processing technology of blueberry.

Key words: *Lactobacillus plantarum*; blueberry fermentation technology; functional substances; antioxidant capacity; Caco-2 cell

中图分类号:TS255.1

文献标识码:B

文章编号:1002-0306(2019)17-0127-07

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2019.17.021

引文格式:李虹甫,杨鑫焱,刘昕宇,等.植物乳杆菌发酵蓝莓果汁工艺优化及其抗氧化能力[J].食品工业科技,2019,40(17):127-133.

蓝莓,杜鹃花科越橘属植物,果实富含多种有机酸、维生素及膳食纤维,还含有丰富的酚类物质,使其具有较强的自由基清除能力,对炎症、心血管疾病、癌症都具有良好的预防作用。蓝莓中的多种功能活性物质对氧化损伤的预防和缓解能力也早已得到证实^[1-2]。因此,联合国粮农组织将蓝莓列入“人

类五大健康食品”^[3-4]。蓝莓较高的营养价值也使其经济价值不断升高,但蓝莓成熟期集中于夏季,且果实皮壁轻薄,在贮藏、运输中极易因挤压、震荡造成破损导致腐败酸化,严重的影响其经济价值^[5]。因此,蓝莓深加工技术是有效解决当前问题的最佳手段。

收稿日期:2018-12-21

作者简介:李虹甫(1993-),男,硕士,研究方向:乳品微生物,E-mail:li_hong_fu@qq.com。

*通讯作者:姜毓君(1971-),男,博士,教授,研究方向:食品科学,Email:yujun_jiang@163.com。

基金项目:国家自然科学基金项目(31871828);“国家万人计划”资助项目(810098)。

氧化损伤是人体衰老的主要原因,另外其还可引起高血脂、糖尿病及心脑血管疾病等多种疾病^[6]。大量研究表明,乳酸菌具有较强的抗氧化能力,能够改善人体肠道内的活性氧分子变化,清除氧化应激产生的多种自由基^[7-8],发酵果蔬制品近年来愈发引起人们的关注,为乳糖不耐症人群提供了新的选择^[9],还可避免发酵乳制品中的高胆固醇带来的危害^[10]。本研究将乳酸菌与蓝莓结合,一方面可解决蓝莓鲜果的贮藏问题;另一方面还可将乳酸菌的益生功能与蓝莓中的天然功能物质进行结合,开发新型功能食品。因此,本研究选择本实验室自西藏传统乳制品中分离的一株已证明具有免疫调节功能的植物乳杆菌 LJ26,进行蓝莓果汁发酵工艺的优化,探究在发酵过程中功能活性物质的变化,并通过体外及细胞实验对发酵前后的抗氧化能力进行比较,为蓝莓深加工和生产研究提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

蓝莓 产地辽宁大连,采摘时间 2018 年 8 月,4℃保存;植物乳杆菌 LJ26 分离自西藏传统发酵乳制品;人结肠癌 Caco-2 细胞 中科院上海细胞库;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、氯化硝基四氮唑蓝(Nitrotetrazolium Blue chloride, NBT)、超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒、还原性谷胱甘肽(GSH)含量检测试剂盒等 北京索莱宝有限公司。

SPX-70B 生化培养箱 斯必克冷却技术有限公司;苏泊尔 SJ201A-250 型榨汁机 浙江苏泊尔股份有限公司;YXQ-LS-50S II 立式压力蒸汽灭菌器 上海博讯实业有限公司医疗设备厂;UV3000 型紫外分光光度计 日本岛津公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 蓝莓果汁样品制备 解冻经清洗处理后的蓝莓果实,果实与灭菌后纯净水比例 1:2 (w/w) 充分打浆后,95℃灭菌 10 min,然后冷却至室温后采用 80 目滤网过滤后备用^[11]。

1.2.2 单因素实验

1.2.2.1 发酵剂接种量的确定 准备 5 组果汁样品,补充 6% 葡萄糖(g/L),3% 脱脂乳粉(g/L)后分别按 1%、2%、3%、4% 和 5% 对果汁进行接种植物乳杆菌 LJ26(1×10^8 cfu/mL, v/v),随后置于 37℃ 发酵 24 h 后于 4℃ 静置 2 h 以停止发酵,以活菌数为指标对样品进行检测,确认最佳接种量^[11]。

1.2.2.2 发酵温度的确定 准备 5 组果汁样品,添加 6% 葡萄糖(g/L),3% 脱脂乳粉(g/L)后接种 3% 植物乳杆菌 LJ26 (1×10^8 cfu/mL, v/v),分别置于 31、34、37、40、43℃ 下发酵 24 h。然后于 4℃ 静置 2 h 以停止发酵。以活菌数为指标对各组样品进行检测,确认最优发酵温度^[12]。

1.2.2.3 发酵时间的确定 准备 5 组果汁样品,添加 6% 葡萄糖(g/L),3% 脱脂乳粉(g/L)后,接种 3% 植物乳杆菌 LJ26 (1×10^8 cfu/mL, v/v),分别置于 37℃ 下分别发酵 0、12、24、36 和 48 h。然后于 4℃ 静置

2 h 以停止发酵。在发酵完成后以活菌数为指标对各组样品进行检测,确认最优发酵时间^[12]。

1.2.3 响应面优化试验 发酵工艺参数响应面试验:根据单因素试验的结果,利用 Box-Behnken 进行试验设计,以感官评价分数为响应值,对发酵温度(A)、发酵时间(B)、发酵剂接种量(C)三个自变量因素进行优化试验,试验因子水平编码见表 1。

表 1 Box-Behnken 中心试验因素水平编码
Table 1 Factors and levels of Box-Behnken design

水平	因素		
	A 发酵温度(℃)	B 发酵时间(h)	C 发酵剂接种起始量(%)
-1	34	12	2
0	37	24	3
1	40	36	4

1.2.4 功能物质检测

1.2.4.1 酚类物质含量检测 采用福林酚比色法对总酚量进行检测,参考张洋婷等人方法略有改动^[13]。移取待测样品 1 mL 于试管中,加入等体积稀释后的福林酚试剂充分混匀后静置 5 min 后,加入 2 mL 质量分数 7.5% 的 Na_2CO_3 溶液混匀静置 5 min,45℃ 避光水浴 10 min 后,于波长 765 nm 处检测吸光度。以没食子酸($1 \sim 6 \mu\text{g/mL}$)为对照品作标准曲线,检测结果以没食子酸当量表示。

1.2.4.2 花青素含量检测 采用 pH 示差法对总花青素量进行检测,参考 Lee 等^[14]的方法略有改动。样品稀释 10 倍后分别移取 1 mL 样品于两个试管中,分别加入 9 mL 的 0.025 mol/L 氯化钾溶液(pH = 1)和 0.4 mol/L 乙酸钠溶液(pH = 4.5),于 520 和 700 nm 处进行吸光度检测。总花青素量按如下公式进行计算。

$$\text{花青素含量}(\text{mg/L}) = \frac{A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 10^3}{\varepsilon \times l}$$

式中:A = $(A_{520} - A_{700})_{\text{pH}1} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}4.5}$; MW = 449.2; DF = 溶液稀释倍数; $\varepsilon = 26900$ 花青素- α -D-葡萄糖苷的摩尔消光系数;l 为路径长度常数。

1.2.5 体外抗氧化能力检测

1.2.5.1 DPPH 自由基清除能力 首先将 DPPH 溶于甲醇溶液,配制成 0.1 mmol/L 的 DPPH 溶液,取此溶液 2 mL 分别与 1 mL 果汁及发酵果汁,室温避光孵育 30 min,在 517 nm 处测量吸光值^[15]。

$$\text{DPPH 自由基清除活性}(\%) = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

其中, A_s 为样品组吸光值; A_c 为对照组吸光值(用蒸馏水取代样品)。

1.2.5.2 清除超氧阴离子自由基能力比较 使用 100 mmol/L PBS(pH 7.4)分别配制 300 $\mu\text{mol/L}$ NBT, 936 $\mu\text{mol/L}$ NADH 及 120 $\mu\text{mol/L}$ PMS。取上述试剂各 50 μL 加入 96 孔板,再加入 50 μL 果汁或发酵果汁。混匀后室温静置 5 min 于 560 nm 处检测吸光度^[16]。

$$\text{超氧阴离子自由基清除活性}(\%) = \frac{A_s - A_c}{A_s} \times 100$$

其中,As 为样品组吸光值;Ac 为对照组吸光值(用蒸馏水取代样品)。

1.2.6 细胞氧化损伤缓解试验

1.2.6.1 氧化损伤模型构建 采用 H₂O₂ 处理 Caco-2 细胞构建氧化损伤模型,通过细胞存活率判断模型构建情况,一般选择细胞存活率 95% 时的 H₂O₂ 浓度作为氧化损伤模型的构建浓度,以 MTT 法确定适合 H₂O₂ 浓度^[17],试验操作如下:活化后的 Caco-2 细胞以 1 × 10⁵ 浓度接种至 96 孔板,待细胞达到单层贴壁后,开始试验。配制 0、25、50、100、150、250、500、1000、1500 μmol/L 的 H₂O₂,每孔加入 100 μL 培养 30 min,移除 H₂O₂ 后每孔再加入 20 μL MTT 试剂培养。4 h 后每孔加入 150 μL 二甲基亚砷,振荡混匀后于 490 nm 处检测吸光度。

1.2.6.2 细胞抗氧化酶活性测定 首先将 Caco-2 细胞以 3 × 10⁵ 浓度接种于 6 孔板中培养至单层贴壁状态,随后将细胞进行分组试验。分组情况及处理方法如下:空白组:不经氧化损伤处理;损伤组:根据 1.2.6.1 结果,每孔中加入 3 mL 浓度为 500 μmol/L 的 H₂O₂,构建氧化损伤模型后移除剩余 H₂O₂,每孔加入 3 mL 不含双抗及胎牛血清的 DMEM 处理 4 h;阳性对照组:氧化损伤处理后移除 H₂O₂,每孔加入 3 mL 0.01% (w/v) V_c 溶液处理 4 h;试验组:氧化损伤处理后移除 H₂O₂,加入 3 mL 未发酵蓝莓果汁或发酵蓝莓果汁处理 4 h。试验结束后,收集细胞,无菌 PBS 清洗 3 次后,根据试剂盒方法对细胞 SOD 活性、GSH 含量进行检测。

1.2.7 感官评价 选取 7 名人员对发酵蓝莓果汁进行感官评价,以滋味(30 分)、气味(30 分)、色泽(20 分)、质地状态(20 分)为评价项目,具体评分标准如下表所示^[18]。

表 2 发酵蓝莓果汁感官评价标准
Table 2 Sensory evaluation criteria of fermented blueberry juice sensory evaluation criteria

评价项目	评分标准	分数
滋味 (30 分)	口感均匀细腻,风味平衡,酸甜适中	20~30
	风味偏酸或偏甜,无苦、涩等异味	10~19
	风味不佳,过酸或过甜,有苦、涩等异味	≤9
气味 (30 分)	果香味和发酵香气浓郁适宜	20~30
	果香味和发酵香气较淡,无异嗅	10~19
	无果香,有异嗅(类似化学品、药物等刺激性气味)	≤9
质地状态 (20 分)	质地均匀一致,无分层,流动性良好	15~20
	质地较均匀,流动性较好	10~14
	质地不均匀,分层结块明显	≤9
色泽 (20 分)	色泽均一,紫红色	10~20
	色泽不均一,有其他颜色或果汁褪色严重	≤9

1.3 数据处理

以上实验每组设置 3 个平行,结果值以平均值 ± 标准差的形式表示,利用 ANOVA 方法分析组间显

著性,以 $p \leq 0.05$ 为标准进行统计分析。所有数据和图表均相应用 SPSS 软件(19.0 版)和 Origin 软件(8.0 版)进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 初始接种量的确定 如图 1 所示,在初始接种量较低时,随初始接种量的增多,发酵蓝莓果汁的活菌数越高。当初始接种量达到 3% 及以上时,发酵蓝莓果汁的活菌数变化趋近平缓,因此选择初始接种量 3%~5% 进行后续研究。

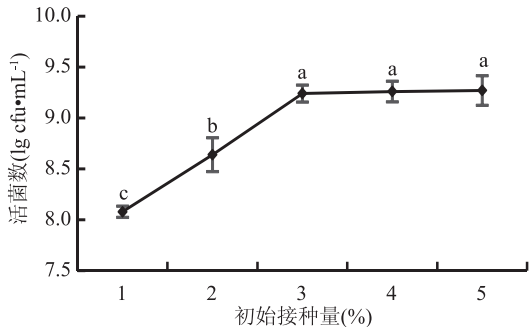


图 1 初始接种量对活菌数的影响

Fig.1 Selection of the initial inoculum size

注:图中不同字母间表示存在

显著性差异($P < 0.05$);图 2、图 3 同。

2.1.2 发酵温度的确定 植物乳杆菌 LJ26 在不同温度下生长情况呈现先增加后减少的趋势,在 37 °C 左右生长时,其活菌数可达 1 × 10⁹ cfu/mL,因此选择 34~40 °C 进行后续研究。此外,在本研究选择的 5 个温度梯度内植物乳杆菌 LJ26 均可正常生长,活菌数可达到 1 × 10⁸ cfu/mL 以上,证明了植物乳杆菌 LJ26 良好的温度耐受性。

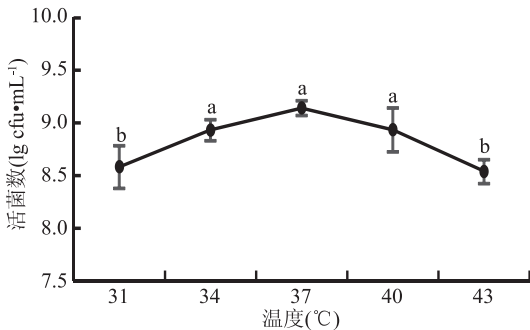


图 2 发酵温度对活菌数的影响

Fig.2 Selection of fermented temperature

2.1.3 发酵时间的确定 由图 3 可知,在本研究选择的 5 个发酵时间中,发酵 12 h 蓝莓果汁中的活菌数达 1 × 10⁸ cfu/mL 以上。发酵 24 h 时活菌数达到峰值(9.25lg cfu/mL),继续进行发酵,活菌数则会出现下降现象。过长的发酵时间不符合生产工艺的实际需求,因此应将发酵时间维持于 24 h 左右,因此选择 12~36 h 进行后续研究。

2.1.4 响应面优化发酵工艺优化结果 根据 Box-Benhknken 试验设计进行响应面优化试验,结果见表 3。

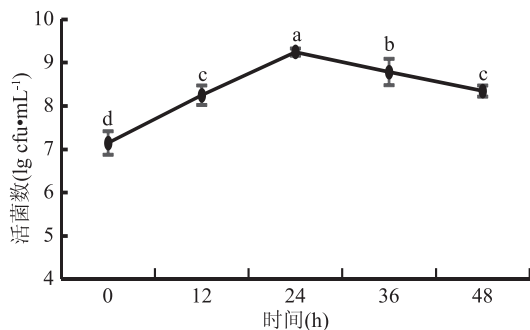


图3 发酵时间对活菌数的影响

Fig.3 Selection of fermented time

表3 响应面试验设计及结果

Table 3 Design and results of response surface experiments

试验号	A	B	C	Y 感官分数
1	-1	-1	0	71.60 ± 0.55
2	0	0	0	89.60 ± 1.14
3	0	0	0	92.00 ± 1.58
4	0	0	0	91.00 ± 1.58
5	0	0	0	92.30 ± 1.57
6	0	0	0	92.60 ± 0.89
7	-1	0	-1	75.30 ± 1.20
8	-1	1	0	70.60 ± 2.07
9	0	-1	1	77.30 ± 1.99
10	1	0	1	83.00 ± 2.65
11	0	-1	-1	72.00 ± 2.55
12	1	1	0	72.60 ± 1.52
13	1	-1	0	70.60 ± 2.07
14	0	1	-1	74.60 ± 1.52
15	0	1	1	67.60 ± 0.89
16	-1	0	1	82.60 ± 1.14
17	1	0	-1	86.10 ± 1.75

根据回归模型方差分析,得感官评价分数对自变量发酵温度(A)、发酵时间(B)及发酵剂起始量(C)的二次多项回归方程为:

表4 回归模型方差分析

Table 4 Variance analysis of regression model

差异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P	显著性
模型	1266.89	9	140.77	39.42	<0.0001	**
A	18.61	1	18.61	0.90	0.0816	
B	4.65	1	4.65	60.34	0.3433	
C	0.78	1	0.78	1.86	0.6895	
AB	2.25	1	2.25	0.35	0.5025	
AC	27.04	1	27.04	0.046	0.0441	*
BC	37.82	1	37.82	1.94	0.0230	*
A ²	133.82	1	133.82	100.89	0.0010	**
B ²	886.79	1	886.79	119.34	<0.0001	**
C ²	71.21	1	71.21	40.46	0.0053	**
失拟项	25.56	3	8.52	5.72	0.0627	
纯误差	5.96	4	1.49			
总和	1298.40	16				

注:“**”表示对结果有极显著影响(P<0.01);“*”表示对结果有显著影响(P<0.05)。

$$Y = 91.50 + 1.53A - 0.76B + 0.31C + 0.75AB - 2.60AC - 3.07BC - 5.64A^2 - 14.51B^2 - 4.11C^2$$

由表4可知,本研究建立的响应面模型极显著($P < 0.0001$),模型失拟项的 F 值和 p 值分别为5.72和0.0627,并不显著($P > 0.05$),证明此回归方程对试验拟合性较好。决定系数 $R^2 = 0.9757$,校正决定系数 $R^2_{Adj} = 0.9445$,说明该模型能解释94.45%响应值的变化。模拟方程中二次项AC、BC对结果存在显著影响, A^2 、 B^2 及 C^2 对结果存在极显著影响,说明发酵温度、发酵时间和初始接种量对发酵蓝莓果汁感官评价的复杂影响。初始接种量过低、发酵时间过短或发酵温度不适宜都会导致发酵不彻底,缺乏风味;初始接种量过高或发酵时间过长则会导致乳酸含量过高,影响口感。如图4所示,发酵蓝莓果汁感官评价受初始接种量影响较大,相关响应面曲面均较陡,也因此当初始接种量一定时,发酵温度和发酵时间的协同作用对感官评价分数的影响较小,响应面曲面较为平缓。而当发酵时间一定,发酵温度与初始接种量的协同作用对感官评价分数有较大的影响,响应面曲面较陡,与方差分析结果一致。发酵温度一定,初始接种量和发酵时间的协同作用会导致风味不足或乳酸积累过多,从而较大程度的影响感官评价,其响应面曲面结果与方差分析结果一致。根据模拟方程可以计算得到 Y 的最大估计值为91.61,此时的发酵温度为37.40℃,发酵时间为23.72h,初始接种量3.01%。结合实际情况考虑,发酵蓝莓果汁的最佳工艺条件为:发酵温度37℃、发酵时间24h、发酵剂起始量3%,在此条件下进行验证实验,发现此条件下发酵蓝莓果汁口感细腻,酸甜适宜,风味明显;果香、发酵香气清晰;质地均一,略有沉淀,无结块;色泽呈紫红色。最终感官评分为90.76,与模型预测基本一致。

2.2 功能性物质的含量

加工工艺中温度和pH的变化往往会导致植物源性的功能活性物质损失,因此本研究选择蓝莓中含丰富的酚类和花青素等功能性物质含量为研究指

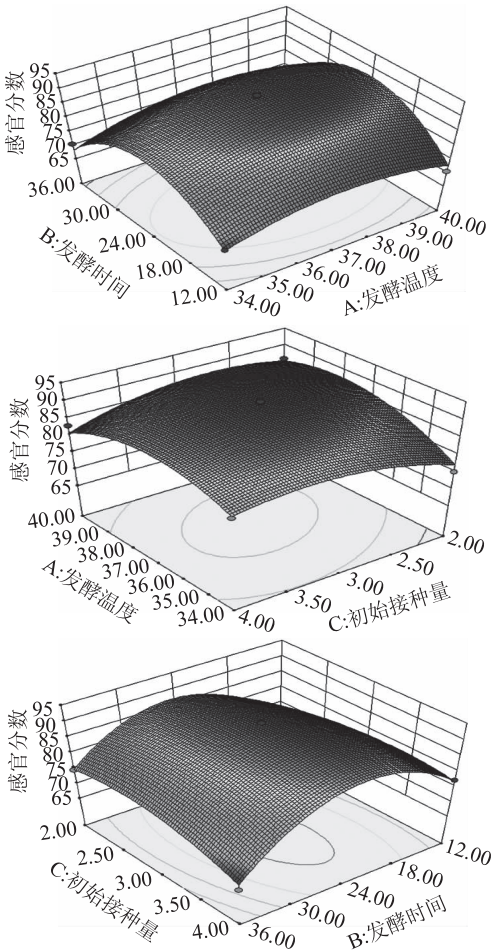


图4 响应面交互作用

Fig.4 Interaction results of surface response

标,探究植物乳杆菌 LJ26 对蓝莓果汁中功能性物质含量的影响。酚类物质含量的测定首先进行标准曲线的绘制。本研究选择使用没食子酸作为标准参照,所得标准曲线方程为 $y = 0.0932x + 0.0096$, 相关系数 $R^2 = 0.9982$, 满足后续实验要求。

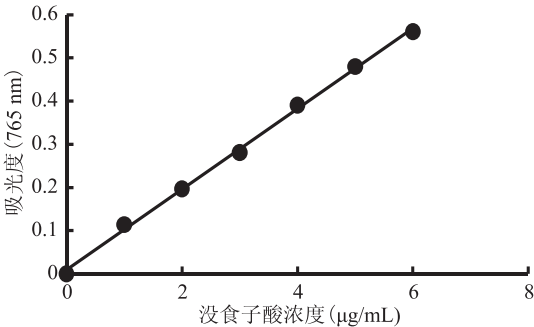


图5 没食子酸标准曲线

Fig.5 Gallic acid standard curve

进行发酵后,将实验组(发酵蓝莓果汁)与对照组(未蓝莓果汁)进行酚类物质含量检测。试验结果如表5。

试验结果发现,利用植物乳杆菌 LJ26 发酵蓝莓果汁,蓝莓果汁在发酵后其酚类物质含量显著增加 ($P < 0.05$)。利用植物乳杆菌、嗜酸乳杆菌及干酪乳杆菌对桑葚果汁进行发酵,其试验结果变化趋势与

表5 发酵前后功能物质比较

Table 5 Comparison of functional substances before and after fermentation

检测指标	发酵前	发酵后
酚类物质含量($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	122.79 ± 2.11^a	176.11 ± 1.58^b
花青素含量($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	56.55 ± 0.94^a	61.99 ± 1.32^b

注:同行不同字母间表示存在显著性差异($P < 0.05$)。

本研究试验结果基本一致。酚类物质增加的原因可能是因为是在乳酸菌发酵过程中,其代谢过程可以将糖基化的酚类物质去糖基化,从而释放出小分子酚类物质^[18]。Filannino 等利用植物乳杆菌能够将樱桃汁中的原儿茶酸分解为邻苯二酚^[19]。另一研究中发现植物乳杆菌可将黄酮苷转化为相应的糖基配体^[20]。并且乳酸菌发酵导致的 pH 变化也会引起酚类物质的结构变化^[21]。但在另外一些研究中却发现利用乳酸菌发酵果汁的过程中酚类物质含量反而会减少^[22-23]。就目前的不同研究分析表明,底物基质、发酵工艺及发酵菌株间均存在一定差异,因此,菌株发酵对植物源性的酚类物质影响原理仍需研究。花青素作为一种黄酮类抗氧化剂广泛的应用于医疗保健,食品营养添加剂等领域中,但其稳定性极差,极易受温度、pH 甚至光照等外界环境影响而导致降解^[24]。在大量的发酵果蔬研究中,发酵后花青素含量都会产生一定程度的降解^[25-26],而在本研究中,发酵后蓝莓果汁中的花青素含量存在显著性增长。E Kwaw 等^[18]利用三种乳酸菌对桑葚果汁进行发酵,其试验结果发现发酵后果汁中花青素含量有显著性的提高。目前虽无法确定导致花青素等黄酮类物质含量变化的原因,但乳酸菌发酵对于花青素的保护作用是不容置疑的,乳酸菌发酵可以维持底物基质中的酸性环境,这对于酚类物质以及花青素都有着积极的保护作用^[27-28]。

2.3 抗氧化能力比较

2.3.1 体外抗氧化能力比较 由于 DPPH 自由基纯物质呈深紫色,具有单电子结构,自由基清除物质结合其单电子导致其显色降低,利用这一原理对其清除率进行检测。而超氧阴离子自由基能够将 NBT 还原为紫色的甲瓚^[29],其在 560 nm 处具有最强吸收峰,因此,在反应过程中加入果汁或发酵果汁可以降低甲瓚的生成,从而获得果汁及发酵果汁超氧阴离子自由基清除率^[29]。如图 5 所示,实验组的两种自由基清除率都高于对照组,且均存在显著性差异,对照组的 DPPH 自由基和超氧阴离子自由基清除率为 72.21% 和 32.57%,发酵后提高为 87.32% 和 43.73%,显示出了植物乳杆菌发酵对蓝莓果汁抗氧化能力的增强。Mousavi 等^[29]利用植物乳杆菌和嗜酸乳杆菌发酵石榴果汁发现,植物乳杆菌能够有效的提高石榴果汁的 DPPH 自由基清除能力;Park 等^[30]也发现经乳酸菌发酵后混合浆果汁的抗氧化能力显著增强。分析其机理,首先是由于乳酸菌对果蔬基质中天然功能活性物质的转化,使大分子物质转化为小分子,增强了抗氧化活性^[29-30];其二是因为一些乳酸菌自身能够产生胞外多糖,这一类多糖能够通过自

身结构特性清除自由基带来的氧化损伤^[31]。

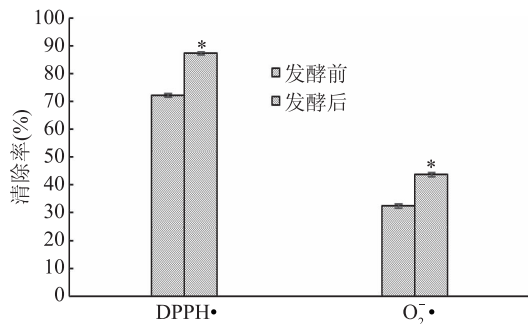


图6 体外抗氧化能力比较

Fig.6 Comparison of antioxidant capacity *in vitro*

注: * :表示发酵前后同一自由基清除能力存在显著性差异($P < 0.05$)。

2.3.2 氧化损伤缓解能力比较 首先选择不同浓度的 H_2O_2 构建氧化损伤模型,结果如图6所示。随 H_2O_2 浓度升高,细胞存活率呈现先升高后降低的趋势。当 H_2O_2 浓度较低时,细胞的存活率有一定程度的升高,这证实了较轻程度的氧化应激反应会刺激细胞增殖^[32]。在本研究中为满足后续试验要求,需要细胞维持单层贴壁状态,而较高浓度的 H_2O_2 则会导致细胞脱壁,导致细胞大量死亡,因此一般选择细胞存活率为95%时的 H_2O_2 浓度作为氧化损伤模型的构建浓度^[33]。因此根据试验结果,选择 $500 \mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 进行后续试验。

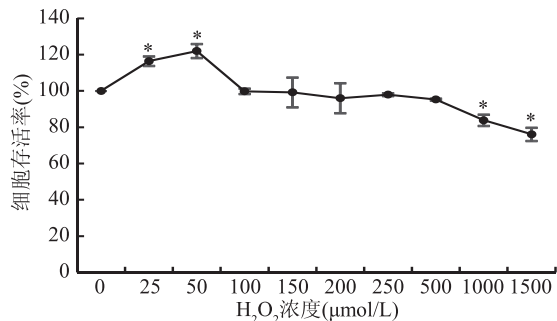


图7 氧化损伤模型 H_2O_2 浓度选择

Fig.7 Oxidative damage model H_2O_2 concentration

注: * 表示与 $0 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 组存在显著性差异($P < 0.05$)。

氧化损伤模型构建后进行发酵前后氧化损伤修复能力的比较试验,结果如表6所示。氧化损伤处理后,损伤组的SOD活性和GSH含量显著降低($P < 0.05$),再一次验证了氧化损伤模型成功构建。与损伤组相比,阳性对照组、未发酵蓝莓果汁组和发酵蓝莓果汁组的SOD活性均有显著性升高($P < 0.05$),证明了V_c、未发酵蓝莓果汁和发酵蓝莓果汁对氧化损伤的改善作用。未发酵蓝莓果汁组与发酵蓝莓果汁组间也存在显著性差异,且发酵蓝莓果汁组的SOD活性与空白组基本持平,证明了发酵蓝莓果汁对氧化损伤的更有效的缓解作用,同时也证明了植物乳杆菌LJ26发酵对蓝莓果汁氧化损伤缓解能力的增强。另外在GSH含量的检测中,所有组别间都存在显著性差异($P < 0.05$)。相较于空白组,除损伤组GSH含量显著降低外($P < 0.05$),其余组别GSH含

量都显著($P < 0.05$)升高。比较未发酵蓝莓果汁组和发酵蓝莓果汁组,经发酵蓝莓果汁处理的细胞GSH含量提高达87.16%,未发酵蓝莓果汁则提高45.52%,这一结果证明了植物乳杆菌LJ26发酵蓝莓果汁能够有效地提高其抗氧化能力,修复氧化应激带来的损伤。

表6 不同组抗氧化酶活性

Table 6 Antioxidant enzyme activities of different group

组别	SOD 活性 (%, 相对于空白组)	GSH 含量 (%, 相对于空白组)
空白组	100 ^a	100 ^d
损伤组	64.15 ± 2.31 ^d	72.24 ± 1.33 ^e
阳性对照组	81.79 ± 1.56 ^c	113.18 ± 1.61 ^c
未发酵蓝莓果汁组	89.21 ± 4.68 ^b	145.52 ± 2.83 ^b
发酵蓝莓果汁组	103.43 ± 6.12 ^a	187.16 ± 1.14 ^a

注:同列不同字母表示组别间存在显著性差异($P < 0.05$)。

3 结论

本研究选择植物乳杆菌LJ26对蓝莓果汁进行发酵,利用Box-Behnken试验设计确定最佳发酵工艺:发酵温度37℃、发酵时间24h和发酵剂起始量3%。在此条件下进行发酵,活菌数可达 1×10^9 cfu/mL以上。此外,在对蓝莓果汁发酵前后的功能活性物质含量结果表明,发酵后酚类物质含量和花青素含量均显著增加。抗氧化能力结果表明,发酵后蓝莓果汁的抗氧化能力显著提升,DPPH自由基清除率和超氧阴离子自由基清除率可达87.32%和43.73%。细胞试验中,发酵蓝莓果汁的SOD活性和GSH含量明显提高,能有效缓解 H_2O_2 造成的氧化损伤,证明了植物乳杆菌LJ26能够显著提升蓝莓果汁抗氧化能力。但对功能物质含量变化仍可继续深入,可利用高效液相色谱、红外光谱和拉曼光谱等其他技术进一步分析其种类变化和变化机理。综上所述,本研究植物乳杆菌发酵的蓝莓果汁为蓝莓产业提供了新的产品类别,对蓝莓深加工技术提供了新的思路。

参考文献

- [1]梁晨,张倩雯,盛启明,等.不同品种蓝莓酒抗氧化能力及其多酚含量分析[J].中国酿造,2013,32(8):46-49.
- [2]Huang W C,Chen Y M,Kan N W,et al.Hypolipidemic effects and safety of *Lactobacillus Reuteri* 263 in a hamster model of hyperlipidemia[J].Nutrients,2015,7(5):3767-3782.
- [3]李亚东,张志东,吴林.蓝莓果实的成分及保健机能[J].中国食物与营养,2002(1):27-28.
- [4]陈介甫,李亚东,徐哲.蓝莓的主要化学成分及生物活性[J].药学学报,2010(4):422-429.
- [5]楚文靖,郇海燕,陈杭君,等.蓝莓贮藏保鲜技术研究进展[J].食品工业,2015(6):253-259.
- [6]Mittler R.Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance[J].Trends in Plant Science,2002,7(9):405-410.
- [7]Amaretti A,Nunzio M,Pompei A,et al.Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria:*In vitro* and *in vivo* activities[J].Applied Microbiology and Biotechnology,2013,97(2):809-817.

[8] Connor A M, Luby J J, Hancock J F, et al. Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold-temperature storage [J]. J Agric Food Chem, 2002, 50 (4): 893-898.

[9] Min M, Bunt C R, Mason S L, et al. Non-dairy probiotic food products: An emerging group of functional foods [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2018; 1-45.

[10] Bansal S, Mangal M, Sharma S K, et al. Non-dairy based probiotics: A healthy treat for intestine [J]. Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 2016, 56(11): 312-334.

[11] 李维妮, 张宇翔, 魏建平, 等. 益生菌发酵苹果汁工艺优化及有机酸的变化[J]. 食品科学, 2017, 38(22): 80-87.

[12] 李思思, 李俊, 何星存, 等. 无甜苷罗汉果汁发酵制备果酒的研究[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(3): 65-70.

[13] 张洋婷, 郝艳丽, 葛红娟, 等. 福林酚比色法测定酸浆宿萼中总多酚含量[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(23): 138-141.

[14] Lee J, Durst R W, Wrolstad R E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study [J]. Journal of Aoac International, 2005, 88 (5): 108-115.

[15] 白雨鑫, 郭斌, 韩冠英, 等. 罗摩果壳多糖提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(20): 278-283.

[16] Wang Y C, Yu R C, Chou C C. Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria [J]. Food Microbiology (London), 2006, 23(2): 128-135.

[17] Babakhani A, Farvin K H S, Jacobsen C. Antioxidative effect of seaweed extracts in chilled storage of minced atlantic mackerel (*Scomber scombrus*): Effect on lipid and protein oxidation [J]. Food & Bioprocess Technology, 2015, 9(2): 1-13.

[18] Kwaw E, Ma Y, Tchabo W, et al. Effect of lactobacillus strains on phenolic profile, color attributes and antioxidant activities of lactic-acid-fermented mulberry juice [J]. Food Chemistry, 2018, 1(2): 186-197.

[19] Filannino P, Bai Y, Di Cagno R, et al. Metabolism of phenolic compounds by *Lactobacillus* spp. during fermentation of cherry juice and broccoli puree [J]. Food Microbiology, 2015, 46: 272-279.

[20] Filannino P, Cavoski I, Thlien N, et al. Lactic acid fermentation of cactus cladodes (*Opuntia ficus-indica* L.) generates flavonoid derivatives with antioxidant and anti-inflammatory properties [J]. Plos One, 2016, 11(3): 52-65.

[21] Gan R, Shah N, Wang M, et al. *Lactobacillus plantarum* WCFS1 fermentation differentially affects antioxidant capacity and

polyphenol content in mung bean (*Vigna radiata*) and soya bean (*Glycine max*) milks [J]. Journal of Food Processing & Preservation, 2016, 41(1): 104-113.

[22] 刘少敏, 周文琦, 李婷, 等. 不同乳酸菌抗氧化能力的比较与分析[J]. 中国乳品工业, 2015, 43(8): 8-12.

[23] 葛英亮, 马艳秋. 响应面法优化蓝莓澄清型果汁饮料工艺[J]. 食品科学, 2012(12): 52-57.

[24] Zhu Y, Du Y. Selective utilization of different carbon sources by microorganism during fermentation [J]. Journal of Biotechnology, 2008, 136(136): 272-284.

[25] Ankolekar C, Pinto M, Greene D, et al. *In vitro* bioassay based screening of antihyperglycemia and antihypertensive activities of *Lactobacillus acidophilus* fermented pear juice [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2012, 13(1): 221-230.

[26] Liao X Y, Guo L Q, Ye Z W, et al. Use of Autochthonous lactic acid bacteria starters to ferment mango juices for promoting its probiotic roles [J]. Prep Biochem Biotechnol, 2016, 46(4): 399-405.

[27] Weber F, Larsen L R. Influence of fruit juice processing on anthocyanin stability. [J]. Food Research International, 2017, 13 (1): 346-361.

[28] 胡廷, 冉旭. 加工工艺对紫薯饮料淀粉转化率和花青素保留率的影响[J]. 食品科技, 2018(5): 108-112.

[29] Mousavi Z, Seyed Mohammad Mousavi, Seyed Hadi Razavi, et al. Effect of fermentation of pomegranate juice by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* on the antioxidant activity and metabolism of sugars, organic acids and phenolic compounds [J]. Food Biotechnology, 2013, 27(1): 13.

[30] Park J B, Lim S H, Sim H S, et al. Changes in antioxidant activities and volatile compounds of mixed berry juice through fermentation by lactic acid bacteria [J]. Food Science and Biotechnology, 2017, 26(2): 441-446.

[31] Yin C, Mao W, Yang Y, et al. Structure and antioxidant activity of an extracellular polysaccharide from coral-associated fungus, *Aspergillus versicolor* LCJ-5-4 [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87(1): 218-226.

[32] 杨瑞华, 海春旭, 李瑞珍, 等. 过氧化氢与细胞生长状态的剂量反应关系研究[J]. 癌变·畸变·突变, 1997(2): 92-99.

[33] Ahamed M, Alhadlaq H A, Alam J, et al. Iron oxide nanoparticle-induced oxidative stress and genotoxicity in human skin epithelial and lung epithelial cell lines [J]. Current Pharmaceutical Design, 2013, 19(37): 104:-110.

欢迎订阅《食品工业科技》