

# 植物乳杆菌和发酵乳杆菌发酵 对蓝莓花色苷的影响

李思媛<sup>1,2</sup>, 李双健<sup>2</sup>, 张会<sup>2</sup>, 邸清茹<sup>1,2</sup>, 范琳琳<sup>2</sup>, 刘小莉<sup>1,2\*</sup>, 孙炳新<sup>1\*</sup>

(1. 沈阳农业大学 食品学院, 辽宁 沈阳 110086; 2. 江苏省农业科学院农产品加工研究所,  
江苏 南京 210014)

**摘要:** 选用植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) FM-LP-9 和发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*) FM-LP-SR6 分别对蓝莓花色苷进行发酵, 考察发酵过程中菌落总数、pH 值、色差、总黄酮含量、总糖含量、总花色苷含量、单体花色苷含量、有机酸含量等指标的变化规律。结果表明, 经 48 h 发酵后, 两种乳杆菌的菌落总数均能达到 9.0 lg(CFU/mL) 以上, 发酵液的 pH 值降至 3.6, 总糖含量相较于发酵前分别降低了 48.65% 和 58.97%, 总黄酮含量分别增加至 11.4、11.8 mg/L, 总花色苷含量分别降低了 48.63% 和 46.06%, 色差值升高, 颜色变暗。两株乳杆菌均能代谢花色苷和转化酚类物质, 发酵过程中花色苷含量呈下降趋势, 主成分分析得出两株乳杆菌发酵花色苷后的单体花色苷组分差异较大, 主要来自飞燕草素-3-O-葡萄糖苷和矢车菊素-3-O-葡萄糖苷。此外, 两株菌发酵后, 发酵液中的乳酸、乙酸含量升高, 草酸、苹果酸、柠檬酸含量降低。

**关键词:** 蓝莓花色苷; 植物乳杆菌; 发酵乳杆菌; 发酵; 代谢变化

## Effects of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* Fermentation on Anthocyanins in Blueberry

LI Si-yuan<sup>1,2</sup>, LI Shuang-jian<sup>2</sup>, ZHANG Hui<sup>2</sup>, DI Qing-ru<sup>1,2</sup>, FAN Lin-lin<sup>2</sup>, LIU Xiao-li<sup>1,2\*</sup>, SUN Bing-xin<sup>1\*</sup>

(1. College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110086, Liaoning, China; 2. Institute of Agri-products Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, Jiangsu, China)

**Abstract:** *Lactobacillus plantarum* FM-LP-9 and *L. fermentum* FM-LP-SR6 were used to ferment blueberry anthocyanins, respectively. Further studies were carried out to examine the changes of total bacteria count, pH, color difference, total flavonoid content, total sugar content, total anthocyanin content, anthocyanin monomer content and organic acid content during the fermentation. The results showed that the total bacteria counts of both *Lactobacillus* strains were higher than 9.0 lg (CFU/mL) after fermentation for 48 h, the pH of the fermentation broth decreased to 3.6, the total sugar contents decreased by 48.65% and 58.97%, respectively, the total flavonoid contents increased to 11.4 mg/L and 11.8 mg/L, respectively, the total anthocyanin contents decreased by 48.63% and 46.06%, respectively, the color difference increased and the color became darker. Both *Lactobacillus* strains could metabolize anthocyanins and transform phenolic substances, while the content of anthocyanins decreased during the fermentation. Further principal component analysis showed that the anthocyanin monomer components of anthocyanins after the fermentation with *Lactobacillus* strains were significantly different, mainly in delphinin-3-O-glucoside and cyanidin-3-O-glucoside. In addition, the contents of lactic acid and acetic acid in the broth increased, while the contents of oxalic acid, malic acid and acetic acid decreased after fermentation by the two strains.

**Key words:** blueberry anthocyanin; *Lactobacillus plantarum*; *L. fermentum*; fermentation; metabolic changes

基金项目: 江苏省重点研发计划项目(BE2022367、BE2020380)

作者简介: 李思媛(1998—), 女(汉), 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术。

\* 通信作者: 刘小莉(1981—), 女, 研究员, 博士, 研究方向: 食品生物技术; 孙炳新(1981—), 男, 副教授, 博士, 研究方向: 食品包装与农产品贮藏保鲜。

引文格式:

李思媛,李双健,张会,等.植物乳杆菌和发酵乳杆菌发酵对蓝莓花色苷的影响[J].食品研究与开发,2023,44(8):30-37.

LI Siyuan, LI Shuangjian, ZHANG Hui, et al. Effects of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* Fermentation on Anthocyanins in Blueberry[J]. Food Research and Development, 2023, 44(8): 30-37.

益生菌通过改善肠道菌群平衡,从而促进对人体健康有益的活性微生物的产生,其活菌数量(不少于 $10^7$  CFU/g)是其功效发挥的先决条件。乳杆菌(*Lactobacillus*)作为益生菌,对人类和动物健康有着重要的促进作用,如调节胃肠道生态平衡、增强免疫力、降低胆固醇、降血压和抑制肿瘤前体物质形成等<sup>[1]</sup>,其常被用于发酵乳制品,但对牛奶蛋白过敏、乳糖不耐症、高胆固醇等人群不适宜饮用<sup>[2]</sup>。因此,需要探索非乳制品基质作为益生菌载体的替代品<sup>[3]</sup>。而果蔬汁因富含维生素、膳食纤维、甾醇等营养物质,且具有更清爽的口感备受消费者喜爱。因此,将益生菌与果蔬汁结合,开发益生菌发酵果蔬汁是十分必要的<sup>[4]</sup>。Hashemi等<sup>[5]</sup>利用植物乳杆菌LS5发酵甜柠檬汁,结果表明样品的pH值、乳酸和抗氧化能力增加,葡萄糖和果糖含量、总酸度、柠檬酸和酚类物质含量下降。杨立启等<sup>[6]</sup>探讨了4种不同柑橘全果汁经植物乳杆菌发酵前后主要成分变化规律,结果表明伴随着总酸含量的增加,总糖、还原糖和总黄酮含量总体下降。Zhang等<sup>[7]</sup>利用植物乳杆菌J26发酵蓝莓果汁,结果显示发酵后蓝莓果汁的DPPH自由基、超氧阴离子自由基和羟自由基的清除能力明显增强,对Caco-2细胞(人结直肠腺癌细胞)的氧化损伤也有一定的减轻作用。由此可见,乳杆菌对发酵果蔬汁的组分及营养特性有显著改善效果,这可能与乳杆菌对果蔬组分的代谢有关。

蓝莓果蔬汁富含酚类化合物,酚类化合物是植物次生代谢物的主要类型之一,它直接关系到果蔬汁的色泽、风味等感官品质<sup>[8]</sup>。此外,多酚的化学结构使果蔬汁具有抗氧化、清除自由基、抗癌、抗炎等活性。其中花色苷属于小分子的水溶性酚类物质,易被人体吸收,具有较强的清除自由基能力,是有效的纯天然抗氧化剂。目前对于发酵蓝莓汁的工艺及其产品风味研究较多,但对于该过程中花色苷的变化规律研究较少。

本研究选取植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) FM-LP-9和发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*) FM-LP-SR6对蓝莓花色苷提取液进行发酵,研究发酵过程中微生物的发酵特性以及单体花色苷的衍变,以期为益生菌发酵富含花色苷类果蔬制品的研究提供参考数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

蓝莓冻果(品种“灿烂”,属兔眼系列):南京悠维有

机食品有限公司;植物乳杆菌 FM-LP-9(保藏号 CGM-CC16701)、发酵乳杆菌 FM-LP-SR6(保藏号 CGM-CC24329):保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心;MRS肉汤培养基:北京奥博星生物技术有限公司;琼脂粉:广州赛国生物科技有限公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、福林酚(Folin-Ciocalteu):上海麦克林生化科技有限公司;总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)测定试剂盒:南京建成生物工程研究所;无水乙醇、没食子酸、芦丁、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、碳酸钠、苯酚、浓硫酸(均为分析纯):国药集团化学试剂有限公司。

### 1.2 仪器与设备

RE-3000 旋转蒸发器:上海亚荣生化仪器厂;HH-4 恒温水浴锅:常州国华电器有限公司;SX-50 高压灭菌锅:日本 TOMY 公司;LRH-150F 生化培养箱:上海一恒科学仪器有限公司;1260 高效液相色谱仪:美国 Agilent 公司;E-poch 酶标仪:美国 Bio-Tek 公司;P5 紫外/可见分光光度计:上海美谱达仪器有限公司;CR-400 色差分析仪:日本柯尼卡美能达公司;ZD-2 自动电位滴定仪:上海仪电科学仪器股份有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 花色苷的提取

取蓝莓冻果于4℃下解冻12h后打浆、5000 r/min离心15 min,得到上清液。上清液与乙醇以1:3的体积比混匀后静置过夜,40℃下旋转蒸发去除乙醇,得花色苷粗提液。旋蒸后的花色苷粗提液采用大孔树脂AB-8纯化,得到花色苷提取液备用。

#### 1.3.2 菌种活化

取冻存于-80℃下的植物乳杆菌 FM-LP-9 和发酵乳杆菌 FM-LP-SR6,于室温解冻后,以1%接种量接种在 MRS 肉汤培养基并于37℃活化,用平板划线法接种于 MRS 固体培养基,37℃培养24 h 获得单菌落,挑取单菌落于3 mL MRS 肉汤培养基中,37℃培养24 h 获得菌悬液备用。

#### 1.3.3 蓝莓花色苷发酵

采用无菌滤膜对提取的花色苷提取液过滤除菌,并用 MRS 培养基调整两株菌初始花色苷总浓度一致。将 *L. plantarum* FM-LP-9 和 *L. fermentum* FM-LP-SR6 菌悬液以2%接种量接种于样品,37℃静置发酵48 h,前18 h内每4 h 取样进行菌落计数,随后每8 h 取样

进行理化及微生物指标分析。以未添加菌悬液蓝莓花色苷培养液为对照组。

### 1.3.4 指标测定

#### 1.3.4.1 菌落总数与发酵液 pH 值

采用 GB 4789.2—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》测定发酵过程中益生菌的菌落总数<sup>[9]</sup>。pH 值采用自动电位滴定仪进行测定。

#### 1.3.4.2 色差的测定

色差采用色差分析仪进行测定,其中  $L^*$  代表亮度,  $a^*$  代表红(+)或绿(-),  $b^*$  代表黄(+)或蓝(-),  $\Delta E$  表示花色苷发酵液与花色苷和培养基的色度差,根据以下公式进行计算<sup>[10]</sup>。

$$\Delta E = [(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2]^{1/2}$$

式中:  $L_0^*$  为未添加菌悬液蓝莓花色苷培养液的亮度;  $a_0^*$  为未添加菌悬液蓝莓花色苷培养液红绿颜色的亮度;  $b_0^*$  为未添加菌悬液蓝莓花色苷培养液黄蓝颜色的亮度。

#### 1.3.4.3 总黄酮含量

参考杨赞<sup>[11]</sup>的方法,以芦丁为标准品,绘制标准曲线,并将测得的吸光值代入标准曲线回归方程  $y = 3.6902x + 0.0344$  中,计算样品中总黄酮含量。

#### 1.3.4.4 总糖含量

参考刘志明等<sup>[12]</sup>的方法,以葡萄糖为标准品,绘制标准曲线,并将测得的吸光值代入标准曲线回归方程  $y = 5.862x + 0.296$  中,计算得到总糖含量。

#### 1.3.4.5 总酚含量

参考 Herken 等<sup>[13]</sup>的方法,以没食子酸为标准品,绘制标准曲线,代入标准曲线回归方程  $y = 0.0131x + 0.1508$  中,获得总酚含量。

#### 1.3.4.6 体外抗氧化能力

DPPH 自由基清除能力测定采用 Lee 等<sup>[14]</sup>的方法,取 2 mL 花色苷发酵液,加入 2 mL DPPH 溶液,混合均匀后,置于室温下遮光反应 30 min,在 517 nm 处测定样品组吸光值,以无水乙醇为对照组, DPPH 自由基清除率按下式计算。

$$\text{DPPH 自由基清除率}/\% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

式中:  $A_1$  为样品组吸光值;  $A_0$  为对照组吸光值。

按 T-AOC 测定试剂盒说明书方法测定总抗氧化能力,在 37℃ 下反应 10 min 后,520 nm 处测定吸光值,以双蒸水为对照组,总抗氧化能力计算公式如下。

$$\text{总抗氧化能力}/(\text{U/mL}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{0.01} \div T \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}}} \times N$$

式中:  $A_{\text{测定}}$  为样品在 520 nm 下的吸光值;  $A_{\text{对照}}$  为对照组在 520 nm 下的吸光值;  $T$  为反应时间, min;  $V_{\text{反应}}$  为反应体系总体积, mL;  $V_{\text{样}}$  为取样量, mL;  $N$  为样品测

试前稀释倍数。

#### 1.3.4.7 花色苷含量

采用 pH 示差法<sup>[15]</sup>测定发酵前后样品中的花色苷含量,分别吸取 1.0 mL 样品,用 pH1.0 和 pH4.5 的缓冲液稀释至 10 mL,混匀。以 1.0 mL 花色苷样品发酵液和 9.0 mL 相应缓冲液混合作为空白,分别在 520 nm 和 700 nm 处测定吸光值。花色苷含量按下列公式计算。

$$\Delta A = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH1.0}} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH4.5}}$$

$$\text{花色苷含量}/(\text{mg/L}) = \frac{\Delta A \times M_w \times DF \times 1000}{\epsilon \times L}$$

式中:  $\Delta A$  为吸光值差值;  $A_{520}$  为 520 nm 处吸光值;  $A_{700}$  为 700 nm 处吸光值;  $M_w$  为矢车菊素-3-O-葡萄糖苷的摩尔质量, 449.2 g/mol;  $\epsilon$  为矢车菊素-3-O-葡萄糖苷的消光系数, 26 900 L/(mol·cm);  $DF$  为稀释倍数;  $L$  为比色皿光程, 1 cm。

#### 1.3.4.8 单体花色苷含量

单体花色苷的含量测定采用高效液相色谱-质谱联用 (high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS) 技术<sup>[16]</sup>。HPLC-MS 测定参数如下。

色谱柱型号: Agilent Poroshell 120 EC-C18 柱 (3.0 mm×100 mm, 2.7 μm); 流动相: A 相为 0.1% 乙酸, B 相为乙腈。梯度洗脱程序参数: 0~5 min, 5% B, 5 min~20 min, 40% B, 20 min~22 min, 40%~95% A, 22 min~24 min, 95% B; 流速: 0.35 mL/min; 进样量: 2 μL。

MS 采用电喷雾离子源, 正离子扫描模式, 扫描范围为  $m/z$  50~1 200; 干燥气温度 350℃; 氮气流速 1.5 L/min; 干燥器压力 133.0 kPa; 喷射电压 4 kV; 扫描一级质谱和二级质谱, 源温度 120℃, 源电流 0.24 μA, 毛细管电压 2.0 V。应用 Masslynx 4.1 和 UNIFI 收集和处理数据。

#### 1.3.4.9 有机酸含量

花色苷发酵前后有机酸变化的测定采用高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 法<sup>[17]</sup>。色谱柱型号: Waters Atlantis T3 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 0.02 mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH2.7; 流速: 0.9 mL/min; 进样量: 10 μL; 柱温: 35℃; 波长: 210 nm。

## 1.4 数据处理

试验均重复 3 次, 结果以平均值±标准差表示, 采用 Origin 2021 软件作图。使用 IBM SPSS Statistics 26 对试验数据进行单因素显著性分析,  $P < 0.05$  代表差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌落总数与发酵液 pH 值的变化

菌落总数可直接反映乳杆菌在含有花色苷培养

液中的生长代谢情况,可作为发酵过程的重要指标<sup>[18]</sup>。*Lactobacillus plantarum* FM-LP-9 和 *L. fermentum* FM-LP-SR6 在花色苷发酵液中的菌落总数和 pH 值变化如图 1 所示。

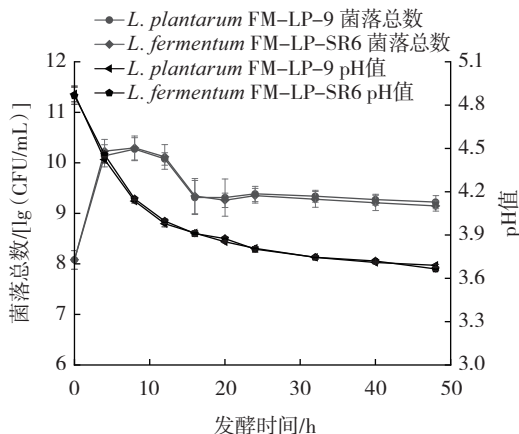


图 1 发酵过程中菌落总数、pH 值变化情况

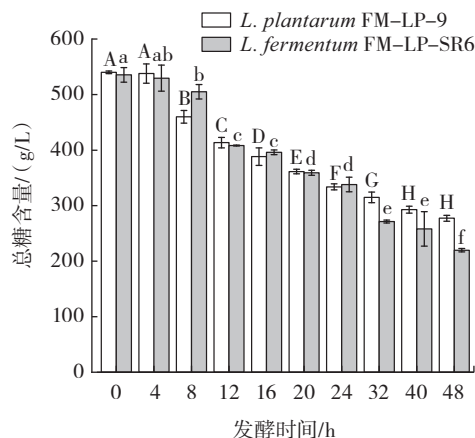
Fig.1 Changes in the total number of colonies and pH during the fermentation

由图 1 可知,两株菌的初始浓度约为  $8.0 \lg(\text{CFU/mL})$ ,随着乳杆菌发酵时间的延长,菌落总数呈现出先上升后下降最终趋于稳定的变化趋势。这是由于发酵初始阶段,营养基质丰富,乳杆菌迅速增殖,在发酵 8 h 时菌落总数达到最高值,分别为  $(10.27 \pm 0.23) \lg(\text{CFU/mL})$  和  $(10.29 \pm 0.24) \lg(\text{CFU/mL})$ 。16 h 后随着发酵时间的延长,菌体生长趋于平稳,发酵 48 h 时,两株菌的菌落总数分别下降至  $(9.22 \pm 0.12) \lg(\text{CFU/mL})$  和  $(9.14 \pm 0.10) \lg(\text{CFU/mL})$ ,但均能达到益生菌发挥作用的国家标准限量  $[7.0 \lg(\text{CFU/mL})]$ <sup>[19]</sup>。随着发酵时间的延长,pH 值呈现逐渐下降的变化趋势。发酵前花色苷培养基体系的 pH 值为 4.88 和 4.87,经 *L. plantarum* FM-LP-9 和 *L. fermentum* FM-LP-SR6 发酵 48 h,pH 值分别降至 3.69 和 3.66。综上,菌落总数降低可能是由于高酸环境抑制了乳杆菌的增长,随着 pH 值趋于稳定,菌落总数也逐渐稳定,两种益生菌均能在添加蓝莓花色苷的培养基体系中较好生长<sup>[20]</sup>。

## 2.2 发酵过程中发酵液总糖含量的变化

乳杆菌发酵过程中发酵液总糖含量的变化如图 2 所示。

由图 2 可知,*L. plantarum* FM-LP-9 和 *L. fermentum* FM-LP-SR6 发酵 8 h~48 h,随着发酵时间延长总糖含量与初始时间相比均显著下降。这是因为在发酵过程中未添加碳源情况下,糖类物质为主要碳源物质,随着发酵的进行总糖含量减少。然而,两株乳杆菌发酵过程中总糖含量下降幅度存在差异,经 37 °C 发酵 48 h,*L. plantarum* FM-LP-9 和 *L. fermentum* FM-LP-



不同大小写字母表示相同菌株不同发酵时间下存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

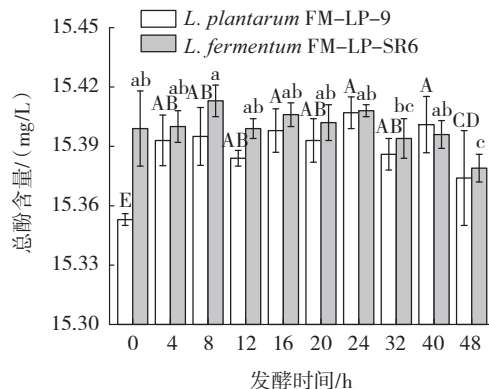
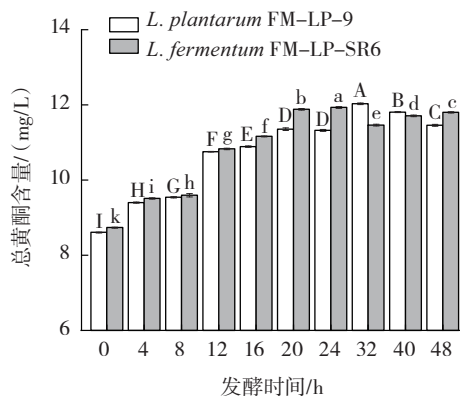
图 2 发酵过程中总糖含量变化情况

Fig.2 Changes in total sugar content during the fermentation

SR6 发酵液中总糖含量相较于发酵前分别降低了 48.65% 和 58.97%。

## 2.3 发酵过程中发酵液总黄酮和总酚含量的变化

黄酮类化合物有着较强的抗氧化能力,常作为评价营养品质的重要指标<sup>[21]</sup>。乳杆菌发酵过程中发酵液总黄酮含量和总酚含量的变化如图 3 所示。



不同大小写字母表示相同菌株不同发酵时间下存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

图 3 发酵过程中总黄酮和总酚含量变化情况

Fig.3 Changes of total flavonoids and total phenols during the fermentation

由图3可知,发酵液中初始总黄酮含量为8.6 mg/L~8.7 mg/L,随着发酵时间的延长,发酵液中总黄酮含量整体呈先上升而后略有降低趋势。*L. plantarum* FM-LP-9 和 *L. fermentum* FM-LP-SR6 发酵48 h,总黄酮含量分别增加至11.4 mg/L 和 11.8 mg/L。经 *L. fermentum* FM-LP-SR6 发酵后总黄酮含量峰值出现的时间(24 h)要早于 *L. plantarum* FM-LP-9(32 h)。宫祥博等<sup>[22]</sup>研究

发现红树莓果酒经发酵后黄酮含量增加,与本试验研究结果相似。两株菌发酵前后总酚含量整体变化不大。王行等<sup>[23]</sup>和黄晓杰等<sup>[24]</sup>研究证实,蓝莓酒发酵过程中总酚含量均无明显变化,与本研究结果一致。

## 2.4 发酵过程中发酵液的色差变化

色泽是评价果蔬汁饮品的重要指标之一。发酵液48 h 内的色差变化如表1所示。

表1 乳杆菌发酵花色苷过程中色差变化

Table 1 Changes of color difference in anthocyanins during *Lactobacillus* fermentation

| 发酵时间/h | <i>L. plantarum</i> FM-LP-9 |            |            |                          | <i>L. fermentum</i> FM-LP-SR6 |            |            |                          |
|--------|-----------------------------|------------|------------|--------------------------|-------------------------------|------------|------------|--------------------------|
|        | <i>L</i> *                  | <i>a</i> * | <i>b</i> * | $\Delta E$               | <i>L</i> *                    | <i>a</i> * | <i>b</i> * | $\Delta E$               |
| 对照组    | 23.73±0.43                  | 40.22±0.03 | 32.58±0.07 |                          | 23.73±0.43                    | 40.22±0.03 | 32.58±0.07 |                          |
| 0      | 26.12±0.53                  | 42.53±0.35 | 37.14±0.48 | 5.60±0.32 <sup>h</sup>   | 27.00±0.52                    | 43.24±0.24 | 38.41±0.60 | 5.08±0.77 <sup>i</sup>   |
| 4      | 19.25±0.24                  | 41.84±0.11 | 29.63±0.31 | 5.64±0.72 <sup>h</sup>   | 19.55±0.49                    | 41.66±0.04 | 30.09±0.70 | 7.33±0.74 <sup>b</sup>   |
| 8      | 15.38±0.55                  | 39.60±0.35 | 24.19±0.78 | 11.86±0.93 <sup>G</sup>  | 15.00±0.70                    | 39.12±0.31 | 23.76±1.15 | 12.47±1.29 <sup>s</sup>  |
| 12     | 12.89±0.36                  | 37.47±0.21 | 20.53±0.53 | 16.45±0.58 <sup>F</sup>  | 12.75±0.14                    | 37.16±0.08 | 20.27±0.21 | 16.78±0.18 <sup>f</sup>  |
| 16     | 11.51±0.35                  | 36.11±0.28 | 18.37±0.53 | 19.19±0.60 <sup>E</sup>  | 11.57±0.12                    | 36.05±0.08 | 18.51±0.19 | 19.06±0.15 <sup>e</sup>  |
| 20     | 10.77±0.31                  | 35.48±0.21 | 17.21±0.52 | 20.66±0.55 <sup>D</sup>  | 10.65±0.12                    | 35.11±0.02 | 17.06±0.21 | 20.94±0.16 <sup>d</sup>  |
| 24     | 10.13±0.23                  | 34.73±0.18 | 16.20±0.33 | 21.99±0.35 <sup>C</sup>  | 10.24±0.24                    | 34.69±0.15 | 16.45±0.42 | 21.74±0.42 <sup>cd</sup> |
| 32     | 9.89±0.22                   | 34.37±0.16 | 15.86±0.41 | 22.48±0.40 <sup>BC</sup> | 9.96±0.11                     | 33.78±0.31 | 15.95±0.22 | 22.53±0.32 <sup>c</sup>  |
| 40     | 9.67±0.37                   | 33.59±0.36 | 15.51±0.58 | 23.09±0.69 <sup>AB</sup> | 9.67±0.37                     | 33.88±0.28 | 15.51±0.62 | 23.00±0.69 <sup>ab</sup> |
| 48     | 9.27±0.18                   | 32.89±0.09 | 14.83±0.32 | 24.04±0.28 <sup>A</sup>  | 9.42±0.44                     | 32.93±0.29 | 15.08±0.68 | 23.75±0.78 <sup>a</sup>  |

注:同列不同字母表示相同发酵菌株不同发酵时间下存在显著性差异( $P<0.05$ )。

由表1可知,随着发酵时间的延长,*L*\*、*a*\*、*b*\* 值整体上均逐渐降低。*L*\* 降低表示花色苷发酵液颜色变暗,*a*\* 值降低表示花色苷发酵液红色减弱,*b*\* 值降低表示花色苷发酵液蓝色减弱。 $\Delta E$  值越大表示颜色差距越大, $\Delta E>3$  时能明显察觉出两者的颜色差别<sup>[25]</sup>。发酵过程中,两株菌  $\Delta E$  分别从5.60、5.08 增大至24.04、23.75,表明外观颜色有显著变化,这可能与花色苷发生降解有关<sup>[26]</sup>。

## 2.5 乳杆菌发酵过程中花色苷含量及单体花色苷的变化

花色苷是蓝莓的呈色物质和功能性成分,由花青素和糖苷构成,大部分以单体的形式存在<sup>[27]</sup>。发酵过程中花色苷含量的变化如图4所示。

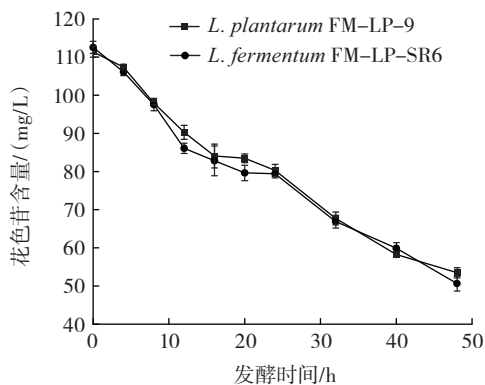


图4 发酵过程中花色苷含量变化情况

Fig.4 Changes of anthocyanin contents during the fermentation

如图4所示,发酵液中花色苷含量随着发酵时间的延长呈下降趋势。两株菌发酵前花色苷含量均在110 mg/L,发酵后花色苷含量明显下降,经 *L. plantarum* FM-LP-9 发酵48 h 时,花色苷含量降至53.49 mg/L; *L. fermentum* FM-LP-SR6 发酵48 h 时,花色苷含量降至50.65 mg/L,表明在发酵过程中花色苷在乳杆菌作用下可能降解转化为其他化合物。

发酵过程中单体花色苷的变化分析结果如图5所示,发酵前后单体花色苷相对含量变化情况见表2。

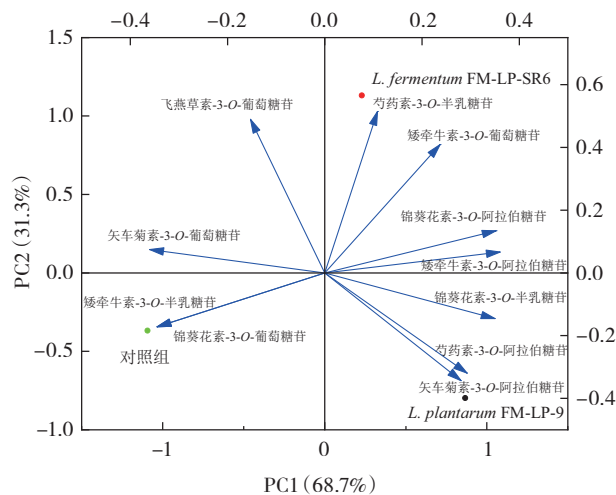


图5 乳杆菌发酵培养液中单体花色苷的载荷图

Fig.5 Principal component analysis of anthocyanin monomers in the fermentation broth of *Lactobacillus* strains

表 2 发酵前后单体花色苷相对含量变化情况

Table 2 Changes in relative contents of anthocyanin monomers before and after fermentation

| 单体花色苷          | 对照组        | <i>L. fermentum</i><br>FM-LP-SR6 | <i>L. plantarum</i><br>FM-LP-9 |
|----------------|------------|----------------------------------|--------------------------------|
| 飞燕草素-3-O-葡萄糖苷  | 1.57±0.25  | —                                | 2.64±0.23                      |
| 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷  | 27.09±3.12 | —                                | 12.14±2.15                     |
| 矮牵牛素-3-O-半乳糖苷  | 1.08±0.03  | —                                | —                              |
| 矮牵牛素-3-O-葡萄糖苷  | 4.42±0.73  | 5.94±1.81                        | 7.53±2.23                      |
| 矢车菊素-3-O-阿拉伯糖苷 | 2.55±0.39  | 6.08±1.90                        | 2.68±0.31                      |
| 矮牵牛素-3-O-阿拉伯糖苷 | —          | 2.56±0.15                        | 2.02±0.08                      |
| 芍药素-3-O-半乳糖苷   | —          | 1.62±0.04                        | 14.30±3.26                     |
| 锦葵黄素-3-O-半乳糖苷  | 24.17±1.75 | 65.35±4.23                       | 42.10±9.35                     |
| 锦葵黄素-3-O-葡萄糖苷  | 23.88±1.83 | —                                | —                              |
| 芍药素-3-O-阿拉伯糖苷  | 1.28±0.12  | 3.23±0.12                        | 1.47±0.11                      |
| 锦葵黄素-3-O-阿拉伯糖苷 | 13.96±1.42 | 15.21±2.40                       | 15.11±2.56                     |

注:—表示无单体花色苷检出。

由图 5 可知,不同乳杆菌发酵的样品在单体花色苷组分方面存在差异,对花色苷的代谢差异主要来自矮牵牛素-3-O-半乳糖苷、锦葵黄素-3-O-葡萄糖苷。结合表 2 分析,与未发酵的花色苷相比,经 *L. fermentum* FM-LP-SR6 发酵后的花色苷中,未检测出飞燕草素-3-O-葡萄糖苷、矢车菊素-3-O-葡萄糖苷、矮牵牛素-3-O-半乳糖苷和锦葵黄素-3-O-葡萄糖苷;经 *L. plantarum* FM-LP-9 发酵后的花色苷中,未检测到矮牵牛素-3-O-半乳糖苷、锦葵黄素-3-O-葡萄糖苷;对照组的花色苷中未检测到矮牵牛素-3-O-阿拉伯糖苷、芍药素-3-O-半乳糖苷。两株菌发酵过程中可能增强了花色苷生物利用率,在代谢过程中生成矮牵牛素-3-O-阿拉伯糖苷和芍药素-3-O-半乳糖苷。不同菌株水解糖苷的能力有差异,两种乳杆菌对花色苷的代谢能力也有所不同。有研究表明  $\beta$ -半乳糖苷酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶能将异黄酮苷水解为苷元<sup>[28]</sup>,但不同菌株水解糖苷能力有差异<sup>[29]</sup>,这可能是因为两株乳杆菌对花色苷的代谢能力不同。

## 2.6 乳杆菌发酵前后发酵液有机酸含量变化

有机酸对花色苷等物质有保护作用,同时也是决定果酒或果汁品质的重要指标<sup>[18]</sup>。两株乳杆菌发酵前后蓝莓花色苷发酵液有机酸含量变化见表 3,乳杆菌发酵液中有有机酸的载荷图见图 6。

由表 3 可知,经 *L. plantarum* FM-LP-9 发酵后乳酸、乙酸含量增加至 3 142.36、1 132.23 mg/L,分别是对照组的 78.44、17.89 倍,草酸、苹果酸、柠檬酸含量分别降低至 94.95、71.46、1 099.56 mg/L,与对照组相比下降了 70.67%、73.88%、2.17%;经 *L. fermentum* FM-LP-SR6 发酵后乳酸、乙酸含量分别增加至 3 040.85、912.36 mg/L,分别是对照组的 75.91、14.42 倍,草酸、苹果

表 3 不同乳杆菌发酵前后发酵液有机酸含量变化

Table 3 Changes of organic acids contents in the fermentation broth before and after *Lactobacillus* fermentation

| 有机酸种类 | 对照组            | <i>L. plantarum</i><br>FM-LP-9 | <i>L. fermentum</i><br>FM-LP-SR6 |
|-------|----------------|--------------------------------|----------------------------------|
| 草酸    | 323.76±11.23   | 94.95±4.32                     | 70.58±7.45                       |
| 苹果酸   | 273.60±12.58   | 71.46±4.60                     | 76.40±6.57                       |
| 乳酸    | 40.06±4.54     | 3 142.36±28.30                 | 3 040.85±36.40                   |
| 乙酸    | 63.28±5.78     | 1 132.23±13.60                 | 912.36±16.40                     |
| 柠檬酸   | 1 123.90±37.05 | 1 099.56±7.80                  | 913.49±17.30                     |

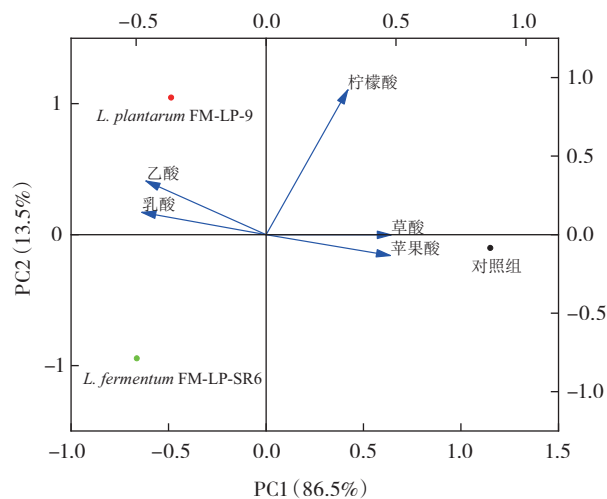


图 6 乳杆菌发酵液中有有机酸的载荷图

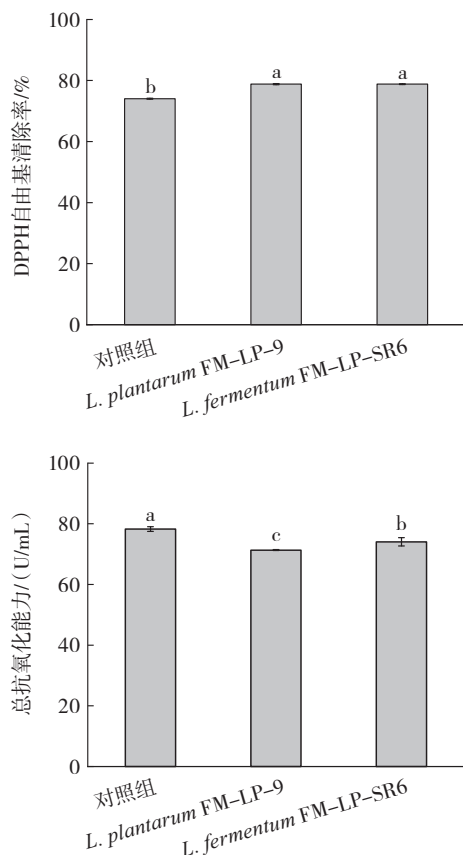
Fig.6 Principal component analysis of organic acids in the fermentation broth of the *Lactobacillus* strains

酸、柠檬酸含量分别降低至 70.58、76.40、913.49 mg/L,与对照组相比下降了 78.20%、72.08%、18.72%。草酸含量的降低可能是由于草酸在发酵过程中以草酸钙的形式沉积在细胞中。苹果酸、柠檬酸含量降低的可能原因是乳杆菌通过均质发酵、异质发酵和其他代谢途径将其转化生成乳酸、乙酸<sup>[28]</sup>,从表 3 中可以看出乳酸和乙酸含量明显提高。结合图 6 进行分析,经发酵后乳酸、乙酸含量明显增加,柠檬酸的变化较其他 4 种酸变化不明显。*L. plantarum* FM-LP-9 的发酵效果优于 *L. fermentum* FM-LP-SR6。

## 2.7 乳杆菌发酵对发酵液体外抗氧化能力的影响

浆果中富含的花色苷和其他酚类物质是主要的抗氧化活性物质<sup>[30]</sup>。通过测定发酵前后发酵液的抗氧化能力变化,可以反映两种乳杆菌发酵过程对花色苷及其他酚类物质生物活性的影响<sup>[31]</sup>。体外抗氧化能力测定结果如图 7 所示。

由图 7 可知,经发酵后的蓝莓花色苷对 DPPH 自由基清除能力相比发酵前有显著提高,这与 Zhang 等<sup>[17]</sup>和 Ryu 等<sup>[32]</sup>的研究结果一致,经 *L. plantarum* FM-LP-9、



不同小写字母表示存在显著性差异( $P < 0.05$ )。

图7 不同乳杆菌发酵前后发酵液DPPH自由基清除能力和总抗氧化能力变化

Fig.7 Changes in DPPH radical scavenging capacity and total antioxidant capacity in the fermentation broth before and after *Lactobacillus* fermentation

*L. fermentum* FM-LP-SR6发酵后,两发酵体系的总抗氧化能力分别下降了6.95 U/mL和4.21 U/mL,这与花色苷含量降低、总酚含量无明显变化结果一致。

### 3 结论

本研究选用自主分离的 *Lactobacillus plantarum* FM-LP-9 和 *Lactobacillus fermentum* FM-LP-SR6 对蓝莓花色苷发酵48 h,研究了发酵过程中菌落总数、营养成分、花色苷含量等指标的变化规律,重点研究了花色苷的色泽、含量、单体成分的变化情况,并评价了发酵后花色苷的抗氧化活性。发酵后两株乳杆菌的菌落总数均可维持在 $9.0 \lg$  (CFU/mL),达到益生菌在人体发挥作用的标准。发酵结束后,花色苷发酵液的pH值降低,色差值升高;总糖含量降低,总黄酮含量增加,总花色苷含量降低。两菌株均能代谢花色苷和转化酚类物质,其对花色苷代谢的差异主要来自飞燕草素-3-O-葡萄糖苷和矢车菊素-3-O-葡萄糖苷。两株乳杆菌发酵后体系中的乳酸、乙酸含量升高,草酸、苹果酸、柠

檬酸含量均降低。该研究结果可为益生菌发酵花色苷类果蔬汁的相关研究提供参考。

### 参考文献:

- [1] REID G. Probiotics in the treatment of diarrheal diseases[J]. Current Infectious Disease Reports, 2000, 2(1): 78-83.
- [2] SZUTOWSKA J. Functional properties of lactic acid bacteria in fermented fruit and vegetable juices: A systematic literature review[J]. European Food Research and Technology, 2020, 246(3): 357-372.
- [3] VALERO-CASES E, CERDÁ-BERNAD D, PASTOR J J, et al. Non-dairy fermented beverages as potential carriers to ensure probiotics, prebiotics, and bioactive compounds arrival to the gut and their health benefits[J]. Nutrients, 2020, 12(6): 1666.
- [4] 崔树茂,徐长悦,毛丙永,等.植物乳杆菌发酵苹果汁及菌体活性保持[J].食品与发酵工业,2019,45(12): 120-126.  
CUI Shumao, XU Changyue, MAO Bingyong, et al. Proliferation and vitality retention of *Lactobacillus plantarum* in apple juices[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(12): 120-126.
- [5] HASHEMI S M B, MOUSAVI KHANEGHAH A, BARBA F J, et al. Fermented sweet lemon juice (*Citrus limetta*) using *Lactobacillus plantarum* LS5: Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities[J]. Journal of Functional Foods, 2017, 38: 409-414.
- [6] 杨立启,季坚,黄海婵,等.植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* 15 对不同品种柑橘全果汁的发酵及其挥发性物质分析[J].食品与发酵工业,2019,45(8): 203-209.  
YANG Liqi, JI Jian, HUANG Haichan, et al. Volatile compounds in citrus juices fermented with *Lactobacillus plantarum* strain 15[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(8): 203-209.
- [7] ZHANG Y, LIU W P, WEI Z H, et al. Enhancement of functional characteristics of blueberry juice fermented by *Lactobacillus plantarum* [J]. LWT- Food Science and Technology, 2021, 139: 110590.
- [8] 吴彩云,张晓荣,徐怀德,等.益生菌发酵果蔬汁生物活性成分及功能特性研究进展[J].中国食品学报,2021,21(12): 323-334.  
WU Caiyun, ZHANG Xiaorong, XU Huaide, et al. Research progress on bioactive components and functional properties of fruit and vegetable juice fermented by probiotics[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(12): 323-334.
- [9] 王忠东,于建焕.食品卫生微生物学检验菌落总数测定方法的效果分析[J].临床医药文献电子杂志,2015,2(20): 4285-4286.  
WANG Zhongdong, YU Jianhuan. Analysis of the effect of the determination method of total bacterial count in food hygiene microbiological examination[J]. Journal of Clinical Medical Literature, 2015, 2(20): 4285-4286.
- [10] WANG T, YUN J M, ZHANG Y, et al. Effects of ozone fumigation combined with nano-film packaging on the postharvest storage quality and antioxidant capacity of button mushrooms (*Agaricus bisporus*) [J]. Postharvest Biology and Technology, 2021, 176: 111501.
- [11] 杨赞.分光光度法测定复方刺五加片中总黄酮含量研究[J].中国现代医生,2012,50(7): 90-91.  
YANG Yu. Study to assaying of total flavonoids in compositus acanthopanax tablet with spectrophotometry[J]. China Modern Doctor, 2012, 50(7): 90-91.
- [12] 刘志明,唐彦君,吴海舟,等.苯酚-硫酸法测定葡萄酒中总糖含量的样品处理[J].中国酿造,2011,30(2): 158-161.  
LIU Zhiming, TANG Yanjun, WU Haizhou, et al. Sample treatment for determination of total sugar content in wine by phenol-sulfuric acid method[J]. China Brewing, 2011, 30(2): 158-161.

- [13] HERKEN E N, GUZEL S. Total antioxidant capacity and total phenol contents of selected commercial fruit juices in Turkey[J]. International Journal of Food Properties, 2010, 13(6): 1373-1379.
- [14] LEE B J, KIM J S, KANG Y M, et al. Antioxidant activity and  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) content in sea tangle fermented by *Lactobacillus brevis* BJ20 isolated from traditional fermented foods[J]. Food Chemistry, 2010, 122(1): 271-276.
- [15] LIU Y, LIU Y X, TAO C, et al. Effect of temperature and pH on stability of anthocyanin obtained from blueberry[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2018, 12(3): 1744-1753.
- [16] YOU Q, WANG B W, CHEN F, et al. Comparison of anthocyanins and phenolics in organically and conventionally grown blueberries in selected cultivars[J]. Food Chemistry, 2011, 125(1): 201-208.
- [17] 胡小露, 刘卉, 鲁宁, 等. HPLC 法同时测定蓝莓汁及其发酵酒中 9 种有机酸[J]. 食品科学, 2012, 33(16): 229-232.
- HU Xiaolu, LIU Hui, LU Ning, et al. Determination of 9 organic acids in blueberry juice and wine by HPLC[J]. Food Science, 2012, 33(16): 229-232.
- [18] 陶阳, 廖小军, 韩永斌. 益生菌发酵蓝莓花色苷的代谢规律[J]. 食品工业科技, 2020, 41(20): 12-19.
- TAO Yang, LIAO Xiaojun, HAN Yongbin. Metabolism of blueberry anthocyanins during probiotic fermentation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(20): 12-19.
- [19] ASPRI M, PAPADEMÁS P, TSALTAS D. Review on non-dairy probiotics and their use in non-dairy based products[J]. Fermentation, 2020, 6(1): 30.
- [20] ZHOU L, XIE M H, YANG F, et al. Antioxidant activity of high purity blueberry anthocyanins and the effects on human intestinal microbiota[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 117: 108621.
- [21] LEONARD W, ZHANG P Z, YING D Y, et al. Fermentation transforms the phenolic profiles and bioactivities of plant-based foods[J]. Biotechnology Advances, 2021, 49: 107763.
- [22] 宫祥博, 延海莹, 田迎樱, 等. 红树莓发酵果酒及其抗氧化活性[J]. 食品工业, 2020, 41(12): 236-240.
- GONG Xiangbo, YAN Haiying, TIAN Yingying, et al. The preparation of red raspberry wine and its antioxidant activity[J]. The Food Industry, 2020, 41(12): 236-240.
- [23] 王行, 张海宁, 马永昆, 等. 蓝莓酒发酵过程中酚类物质动态变化及其抗氧化活性研究[J]. 现代食品科技, 2015, 31(1): 90-95.
- WANG Xing, ZHANG Haining, MA Yongkun, et al. Dynamic changes in phenolics and their antioxidant activities during the fermentation of blueberry wine[J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(1): 90-95.
- [24] 黄晓杰, 柴哲, 杨钟燕, 等. 蓝莓酒发酵过程中抗氧化物质变化规律研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(17): 103-105, 109.
- HUANG Xiaojie, CHAI Zhe, YANG Zhongyan, et al. Research of the change rules of antioxidant substances of blueberry wines during fermentation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(17): 103-105, 109.
- [25] 赵沁雨, 兰天, 袁取予, 等. 植物乳杆菌发酵对果汁品质的影响研究概述[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(16): 300-307.
- ZHAO Qinyu, LAN Tian, YUAN Quyu, et al. Research progress on the effect of *Lactobacillus plantarum* fermentation on juice quality [J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(16): 300-307.
- [26] KWAW E, MA Y K, 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, 250: 148-154.
- [27] MARTÍN-GÓMEZ J, GARCÍA-MARTÍNEZ T, VARO M Á, et al. Phenolic compounds, antioxidant activity and color in the fermentation of mixed blueberry and grape juice with different yeasts [J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 146: 111661.
- [28] WU Y, LI S J, TAO Y, et al. Fermentation of blueberry and blackberry juices using *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus* and *Bifidobacterium bifidum*: Growth of probiotics, metabolism of phenolics, antioxidant capacity in vitro and sensory evaluation[J]. Food Chemistry, 2021, 348: 129083.
- [29] LILA M A, BURTON-FREEMAN B, GRACE M, et al. Unraveling anthocyanin bioavailability for human health[J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2016, 7: 375-393.
- [30] PHAM T T, SHAH N P. Hydrolysis of isoflavone glycosides in soy milk by  $\beta$ -galactosidase and  $\beta$ -glucosidase[J]. Journal of Food Biochemistry, 2009, 33(1): 38-60.
- [31] OTIENO D O, ASHTON J F, SHAH N E. Stability of  $\beta$ -glucosidase activity produced by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* spp. in fermented soymilk during processing and storage[J]. Journal of Food Science, 2005, 70(4): M236-M241.
- [32] RYU J Y, KANG H R, CHO S K. Changes over the fermentation period in phenolic compounds and antioxidant and anticancer activities of blueberries fermented by *Lactobacillus plantarum*[J]. Journal of Food Science, 2019, 84(8): 2347-2356.

加工编辑:王艳

收稿日期:2022-07-28