

黄宁馨,鲁群,丁士勇,等.复合乳酸菌发酵过程中枸杞果汁品质及抗氧化活性变化[J].华中农业大学学报,2021,40(6):186-194.

DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2021.06.023

复合乳酸菌发酵过程中枸杞果汁品质及抗氧化活性变化

黄宁馨¹,鲁群¹,丁士勇¹,刘睿^{1,2},向世利³

1.华中农业大学食品科学技术学院/环境食品学教育部重点实验室,武汉 430070;

2.农业农村部华中都市农业重点实验室,武汉 430070; 3.湖北枸杞珍酒业有限公司,恩施 445300

摘要 以乳酸菌发酵湖北杂交枸杞果汁为研究对象,利用高效液相色谱、顶空固相微萃取-气相色谱质谱等方法,探究植物乳杆菌与发酵乳杆菌复合发酵枸杞果汁过程中营养成分、挥发性物质和抗氧化特性的变化规律。结果显示,2种乳酸菌在枸杞果汁中生长良好;在发酵过程中,乳酸菌利用蔗糖、葡萄糖、果糖作为碳源产酸,pH显著降低,其中乳酸、乙酸和 γ -氨基丁酸的含量均显著提高,而草酸、苹果酸和柠檬酸显著下降;枸杞果汁中酚类物质的组成及含量也发生明显变化,原儿茶酸在未发酵枸杞果汁中未检出,经发酵后含量增至40.55 $\mu\text{g/mL}$,儿茶素、对羟基苯甲酸、3-羟基肉桂酸、杨梅素含量分别增加了13.44%、42.40%、170.73%和12.30%;乳酸菌发酵改变了枸杞果汁挥发性成分的组成和含量,其中,醇类、酸类、烯烃类物质含量增加,而醛类、酮类等含量减少,且新产生了乙醇、1-己醇、芳樟醇等挥发性成分;枸杞果汁经复合乳酸菌发酵后抗氧化性显著提高,DPPH自由基清除率、总还原力和氧化自由基吸收能力分别提高了21.42%、14.18%、51.75%,这些变化与果汁发酵液中原儿茶酸、儿茶素、杨梅素、3-羟基肉桂酸含量的增加密切相关。

关键词 乳酸菌;枸杞果汁;酚类物质;挥发性成分;抗氧化活性;发酵饮料

中图分类号 TS 275.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)06-0186-09

枸杞(*Lycium barbarum* L.)是我国传统的药食同源植物,具有抗衰老、保护神经、抗疲劳、抗糖尿病、保肝、免疫调节、抗肿瘤活性等多种功能作用^[1]。湖北杂交枸杞是以宁夏栽培枸杞诱导加倍,再与华夏枸杞(湖北当地野生枸杞)杂交后成功选育出的品种,改变了宁夏枸杞直接引种江汉平原产生不耐渍、不耐湿、发生严重根腐及黑果的问题,后被引进湖北建始^[2],开创了枸杞南方规模化种植的先河。目前在建始县种植面积已达467 hm^2 ,是当地经济发展的支柱产业,但湖北杂交枸杞水分含量高,不耐贮藏,且不易加工成干制品^[3],亟需进行精深加工,一方面提高枸杞鲜果的加工转化率,另一方面确保果农的收益,而采用乳酸菌发酵开发健康饮品将为其精深加工提供一种有益的尝试。

乳酸菌是一类利用碳水化合物发酵产生大量乳酸的细菌,广泛存在于人和动物肠道,以及泡菜等传统发酵制品中。果蔬汁中富含糖类、有机酸、多酚、维生素等多种营养成分及生物活性物质,是乳酸菌理想的发酵基质。已有研究表明,乳酸菌发酵对果

蔬汁生物活性物质组成和含量、功能活性及感官风味等方面均具有积极作用^[4]。苦瓜汁经过植物乳杆菌发酵能增加产品中有机酸、总酚的含量,降低皂苷含量,使抗氧化活性增强。而植物乳杆菌发酵柿子果汁使其具有更强的激活醇脱氢酶、乙醛脱氢酶及抑制血管紧张素转化酶活性,从而表现出较强的解酒和降血压作用^[5]。且相比单菌发酵而言,复合乳酸菌发酵更能赋予果蔬汁独特的风味和丰富的营养功能^[6-7]。关于乳酸菌发酵枸杞汁的研究目前主要集中在菌株筛选及发酵工艺等方面,如乔博鑫等^[8]以感官评分为指标探讨了枸杞汁最佳发酵工艺条件;李佩佩等^[9]比较了乳酸菌与酵母菌以不同发酵方式结合发酵对枸杞汁主要成分的影响。而发酵过程中枸杞果汁糖、有机酸及酚类物质等营养成分以及产品风味变化的研究少有文献报道。

因此,本研究在前期乳酸菌发酵枸杞果汁菌株筛选及工艺优化的基础上,研究湖北杂交枸杞果汁经植物乳杆菌与发酵乳杆菌复合发酵过程中营养、

收稿日期:2021-03-24

基金项目:中央高校基本科研业务费专项(2662015PY023)

黄宁馨,E-mail:657027488@qq.com

通信作者:刘睿,E-mail:liurui89634@163.com

风味和抗氧化特性的变化,以期为乳酸菌发酵枸杞果汁饮料的开发和利用提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

湖北杂交枸杞鲜果,湖北枸杞珍酒业有限公司;植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)LP90、发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)LF61,江苏微康生物科技有限公司。

果糖、葡萄糖、蔗糖,国药集团化学试剂有限公司;草酸、苹果酸、柠檬酸、乳酸、原儿茶酸、儿茶素、对羟基苯甲酸、杨梅素、芦丁、3-羟基肉桂酸、阿魏酸,均为HPLC级,上海源叶生物科技有限公司;芦丁、Trolox(维生素E衍生物)及1,1-二苯基苦基苯肼(DPPH),上海源叶生物科技有限公司;甲醇、乙腈,Fisher Chemical公司。

1.2 仪器与设备

低温高速离心机,美国贝克曼库尔特有限公司;pHi510 pH计,美国贝克曼公司;UV-Vis分光光度计,日本SHIMADZU公司;20AD高效液相色谱仪,日本Shimadzu公司;UltiMate 3000超高效液相色谱仪,美国Thermo Fisher公司;HP6890/5975C气质联用仪,美国Agilent Technologies公司;搅拌机,飞利浦家用电器(珠海)有限公司;全波长酶标仪,美国Thermo Fisher公司;HTX多功能酶标仪,美国伯腾仪器有限公司。

1.3 试验方法

1)发酵工艺流程。挑选饱满、无腐烂的枸杞鲜果,清洗,按料液质量比1:3加水榨汁,添加3%蔗糖,经90℃水浴15 min灭菌,冷却至室温。2种乳酸菌菌粉分别接种到灭菌后的MRS液体培养基,37℃培养24 h,活化2代后以5 000 r/min离心15 min,使用无菌生理盐水清洗3次后,各制得植物乳杆菌与发酵乳杆菌的种子液,再以体积比为2:1混合2种菌的种子液,以4%接种量接种到枸杞果汁中,37℃发酵54 h,发酵过程中每隔18 h取样测定。

2)理化指标和微生物学特性的测定。活菌数:采用平板稀释法,参考GB 4789.35-2016《食品微生物学检验 乳酸菌检验》;pH值:采用pH酸度计测定。

3)糖的测定。参考Peng等^[10]方法,利用高效液相色谱仪测定。色谱条件:Agilent ZORBAX

NH2(4.6 mm×150 mm,5 μm)色谱柱,流动相80%乙腈,柱温35℃,流速1 mL/min,进样量20 μL,检测器为示差折光检测器。

4)有机酸的测定。参考文献^[11]方法,利用高效液相色谱仪测定。色谱条件:Hypersil Gold aQ-C18(250 mm×4.6 mm,5 μm)色谱柱,流动相0.02 mol/L磷酸二氢胺(磷酸调节pH值至2.7),柱温30℃,流速0.6 mL/min,进样量10 μL,检测波长210 nm,检测器为二极管阵列检测器。

5)酚类物质的测定。参考文献^[12]的方法,并略作修改。①提取方法:取2 mL枸杞果汁,加入3倍体积的乙酸乙酯分别萃取3次,合并上清液,氮吹至干后加入200 μL色谱甲醇溶解,0.22 μm滤膜过滤后进样。②液相色谱条件:Hypersil Gold C18(250 mm×4.6 mm,5 μm)色谱柱,流动相A为0.13%甲酸水溶液,流动相B为乙腈,体积流量1.0 mL/min,柱温30℃,进样量20 μL,检测波长为280 nm。梯度洗脱程序:0~10 min,5%~12%B;10~15 min,12%~16%;15~30 min,16%~20%B;30~40 min,20%~30%B;40~50 min,30%~35%B;50~60 min,35%~50%;60~70 min,50%~95%。

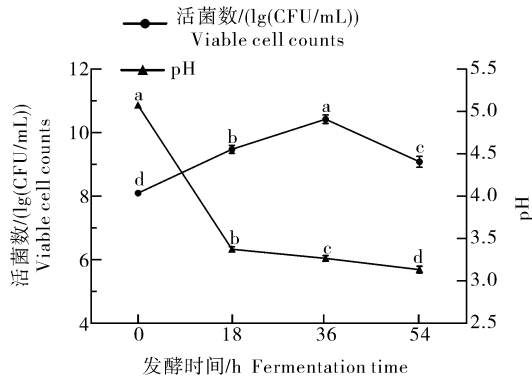
6)挥发性成分的测定。①样品的萃取。称取枸杞果汁6.5 g于25 mL固相微萃取仪采样瓶中,插入装有50/30 μm DVB/CAR/PDMS纤维头的手动进样器,在65℃的平板加热条件下顶空萃取60 min后,移出萃取头并立即插入GC-MS进样口中解析5 min。②GC-MS条件。色谱条件:色谱柱为HP-5MS(60 m×0.25 mm,0.25 μm),程序升温:42℃保持2 min,以3.5℃/min升至189℃,再以8℃/min升至278℃。载气为He,体积流量1 mL/min,进样口温度250℃,不分流进样,设置溶剂延迟时间3 min。质谱条件:离子源为EI,离子源温度230℃,四极杆温度150℃;电子能量70 eV;发射电流34.6 μA;倍增器电压2 129 V;接口温度280℃;扫描范围 m/z 29~500。③数据处理。对总离子流图中的各峰经质谱计算机数据系统检索及核对Nist17和Wiley275标准质谱图,用峰面积归一化法进行各种香气成分相对含量的计算。

7)抗氧化活性的测定。①DPPH自由基清除率的测定参考Mousavi等^[13]方法。②总还原力的测定参考Wang等^[14]的方法。③ORAC的测定,参照Herández-ledesma等^[15]方法。

2 结果与分析

2.1 复合乳酸菌发酵过程中枸杞果汁活菌数和 pH 的变化

活菌数和 pH 值是评价乳酸菌在枸杞果汁中生长情况和发酵力的重要指标,其结果见图 1。由图 1 可知,在发酵 18 h 时,乳酸菌在枸杞果汁中大量生长繁殖,同时 pH 值由 5.07 降至 3.27。随着发酵时间的延长,体系中营养物质不断消耗及代谢产物的积累,36 h 后枸杞果汁中活菌数显著降低 ($P < 0.05$)。



图中不同小写字母表示不同组之间差异显著 ($P < 0.05$)。下同。Data with different superscript letters were significantly different ($P < 0.05$). The same as below.

图 1 枸杞果汁发酵过程中活菌数和 pH 值的变化

Fig.1 The change in viable cell counts and pH value during fermentation of Goji juice

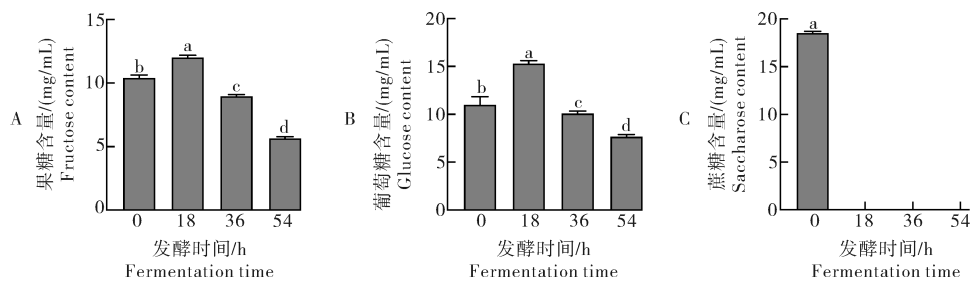


图 2 枸杞果汁发酵过程中果糖(A)、葡萄糖(B)、蔗糖(C)含量的变化

Fig.2 Changes of fructose(A), glucose(B) and saccharose(C) content during fermentation of Goji juice

2.2 复合乳酸菌发酵对枸杞果汁糖含量的影响

2.2 复合乳酸菌发酵对枸杞果汁糖含量的影响

复合乳酸菌发酵枸杞果汁过程中果糖、葡萄糖、蔗糖的变化如图 2 所示,在发酵进行到 18 h 时,原料中添加的蔗糖被乳酸菌完全分解、利用,同时由于蔗糖的分解速度高于乳酸菌的消耗,生成部分葡萄糖和果糖。18 h 后,乳酸菌利用葡萄糖和果糖作为碳源生长繁殖,发酵结束后果糖、葡萄糖含量分别降低了 45.58%、29.86%。

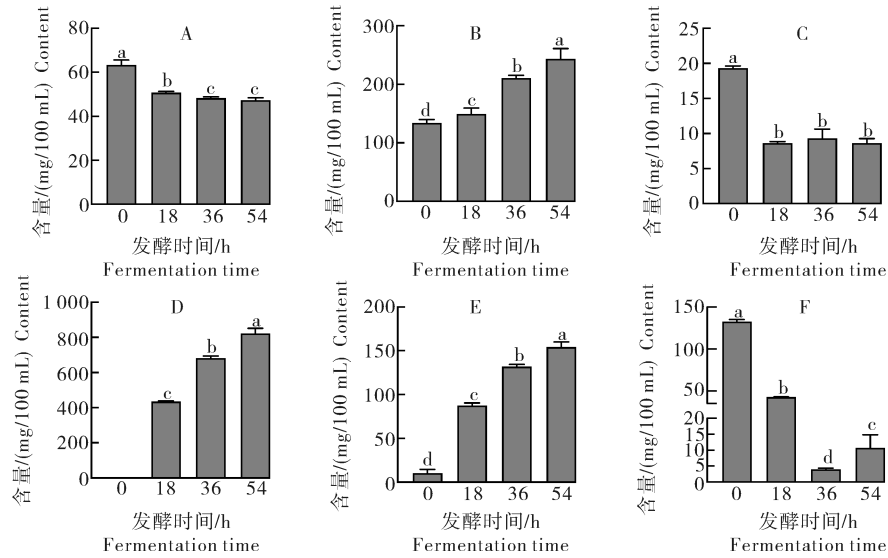
2.3 复合乳酸菌发酵对枸杞果汁有机酸的影响

复合乳酸菌发酵枸杞果汁过程中有机酸的变化见图 3。随着发酵的进行,枸杞汁中草酸、苹果酸、柠檬酸含量显著降低 ($P < 0.05$),尤其是发酵前期。苹果酸在枸杞果汁中含量较低,仅为 19.07 mg/100 mL,在发酵过程中乳酸菌进行苹果酸-乳酸发酵使苹果酸向乳酸转变,发酵 54 h 后含量降至 8.63 mg/100 mL。柠檬酸是枸杞果汁中含量最为丰富的有机酸,在复合乳酸菌发酵过程中呈动态变化,发酵到 36 h 时,柠檬酸含量降至最低 (9.72 mg/100 mL)。草酸在枸杞果汁中含量为 63.88 mg/100 mL,在复合乳酸菌生长代谢过程中被转化利用,发酵结束后降至 47.38 mg/100 mL。乳酸、乙酸、 γ -氨基丁酸在复合乳酸菌发酵过程中不断增加。其中,乳酸是复合乳酸菌发酵的主要代谢产物,发酵结束后占有有机酸总量的 59.97%。乙酸在枸杞果汁中含量较低,初始含量为 10.59 mg/100 mL,随发酵时间的增加不断增加,54 h 后含量增至 154.26 mg/100 mL。 γ -氨基丁酸经复合乳酸菌发酵后含量增加了 1.82 倍。

2.4 复合乳酸菌发酵对枸杞果汁酚类物质的影响

采用高效液相色谱法对复合乳酸菌发酵过程中枸杞果汁中酚类物质组成和含量进行检测,酚类物质标准图谱及发酵前后枸杞果汁酚类物质液相色谱图见图 4,结果如表 1 所示。结果表明,乳酸菌发酵可以改变枸杞果汁中酚类物质组成和含量。原儿茶

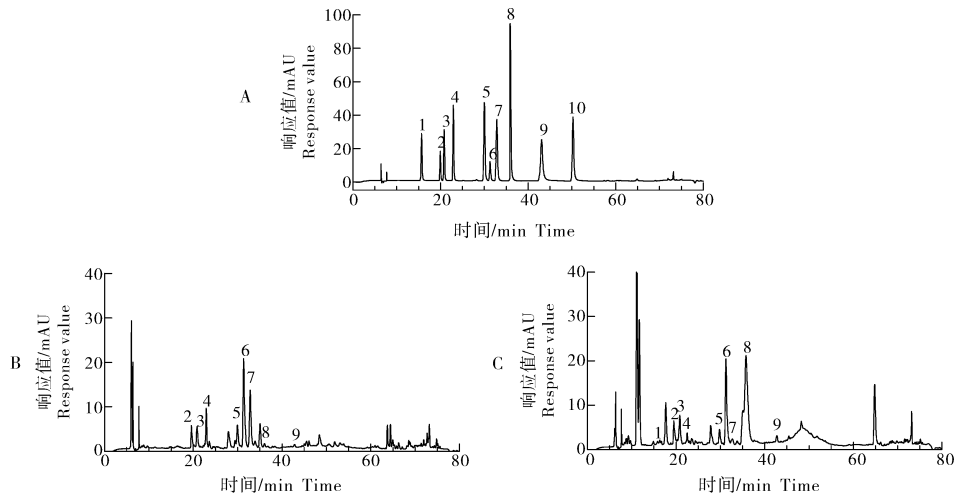
酸在未发酵枸杞果汁中未检出,经发酵后含量增至 40.55 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ 。经复合乳酸菌发酵后,枸杞果汁中的对羟基苯甲酸、儿茶素、3-羟基肉桂酸和杨梅素含量显著增加,芦丁在发酵过程无显著性变化。阿魏酸和香草酸含量较初始分别降低了 66.62%、62.72%。



A:草酸 Oxalic acid; B:γ-氨基丁酸 GABA; C:苹果酸 Malic acid; D:乳酸 Lactic acid; E:乙酸 Acetic acid; F:柠檬酸 Citric acid.

图 3 枸杞果汁发酵过程中有机酸含量的变化

Fig.3 Changes of the content of organic acid during fermentation of Goji juice



A:混合标准品 Mixed standard products; B:发酵前 Before fermentation; C:发酵后 After fermentation.1~10 分别代表原儿茶酸、儿茶素、对羟基苯甲酸、香草酸、对香豆酸、芦丁、阿魏酸、3-羟基肉桂酸、杨梅素、槲皮素。1-10 represent protocatechuic acid, catechin, *p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, *p*-coumaric acid, rutin, ferulic acid, 3-hydroxycinnamic acid, myricetin and quercetin, respectively.

图 4 枸杞果汁复合乳酸菌发酵前后酚类物质的液相色谱图

Fig.4 Liquid chromatograms of phenolic substances before and after Goji juice fermentation

表 1 枸杞果汁发酵过程中酚类物质含量的变化

Table 1 Changes of volatile constituents during fermentation of Goji juice

μg/100 mL

酚类物质 Phenolics	发酵时间/h Fermentation time			
	0	18	36	54
原儿茶酸 Protocatechuic acid	—	38.97±0.37a	38.72±0.15a	40.55±1.87a
儿茶素 Catechin	82.57±0.79b	93.02±7.66a	98.05±8.55a	93.66±6.30a
对羟基苯甲酸 <i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	56.03±7.22c	67.08±4.35b	71.55±4.77ab	79.79±1.15a
香草酸 Vanillic acid	57.80±0.25a	20.76±0.12c	20.80±0.12c	21.55±0.24b
对香豆酸 <i>p</i> -Coumaric acid	16.80±0.38a	13.54±0.93b	13.51±0.50b	13.77±1.77b
芦丁 Rutin	485.06±16.04a	471.94±38.03a	470.42±43.84a	466.75±49.23a
阿魏酸 Ferulic acid	96.40±1.42a	31.44±1.65bc	28.79±1.78c	32.18±0.41b
3-羟基肉桂酸 3-Hydroxycinnamic acid	27.30±0.06c	57.15±3.62b	71.57±5.82a	73.91±3.99a
杨梅素 Myricetin	69.97±1.27c	75.39±0.20c	77.73±1.28b	78.58±0.68a

注：“—”表示未检出。下同。Note：“—” means no detected.The same as below.

2.5 复合乳酸菌发酵对枸杞果汁挥发性成分的影响

挥发性成分是果蔬汁重要的感官特性指标,可以影响消费者的选择。本研究利用 SPME-GC/MS 对枸杞果汁发酵不同时间的样品进行挥发性成分测定,得到的挥发性风味物质相对含量及种类见表 2。在枸杞果汁发酵过程中共鉴定出 18 种物质,包括 3 种醛、4 种醇、4 种酯、3 种酮、1 种酸、1 种烯炔和 2 种其他类物质。醛类物质具有较低的香气阈值,对枸杞果汁风味具有重要影响。己醛、苯甲醛和 β -环柠檬醛是枸杞果汁中鉴定出的 3 种醛类物质。其中,在发酵过程中己醛相对含量不断降低,在 36 h 后未检出,而 β -环柠檬醛和苯甲醛经发酵后相对含

量增加。1-辛烯-3-醇是枸杞果汁中鉴定出的主要醇类物质,随发酵时间的增加其相对含量不断降低,经乳酸菌发酵后新生成了乙醇、1-己醇、芳樟醇 3 种醇类物质。酯类物质是一类对风味有重要影响的化合物,在本研究中,乳酸菌发酵未使枸杞果汁酯类物质的种类发生改变。水杨酸甲酯是发酵与未发酵枸杞果汁中的主要酯类物质,伴有冬青叶香与果香味。乙酸乙酯的增加主要来自于乙酸和乙醇的酯化反应,发酵 54 h 后其相对含量增加了 3.28 倍,提升了枸杞果汁的果香味。枸杞果汁中的酮主要为香叶基丙酮和 β -紫罗兰酮,占酮类物质总量的 93.93%,经复合乳酸菌发酵后均出现降低。柠檬烯发酵结束后其相对含量是枸杞果汁的 4.57 倍。

表 2 枸杞果汁发酵过程中挥发性成分变化

Table 2 Changes of volatile constituents during fermentation of Goji juice

序号 No.	挥发性成分 Volatile substances	相对含量/% Relative content			
		0 h	18 h	36 h	54 h
醛类 Aldehydes					
1	己醛 Hexanal	2.570	0.228	—	—
2	苯甲醛 Benzaldehyde	1.654	0.375	1.989	2.577
3	β -环柠檬醛 β -Cyclocitral	3.992	6.611	5.106	4.831
醇类 Alcohols					
4	乙醇 Ethanol	—	2.121	1.750	1.681
5	1-己醇 1-Hexanol	—	3.513	3.417	1.945
6	1-辛烯-3-醇 1-Octen-3-ol	7.685	6.353	5.888	4.061
7	芳樟醇 Linalool	—	1.060	1.393	1.277
酯类 Esters					
8	乙酸乙酯 Ethyl acetate	1.339	5.446	3.850	4.389
9	水杨酸甲酯 Methyl salicylate	20.402	14.203	15.073	12.108
10	十六酸甲酯 Methyl hexadecanoate	2.759	1.346	0.968	0.917
11	十六酸乙酯 Ethyl hexadecanoate	1.066	0.650	0.698	1.375
酮类 Ketones					
12	6-甲基-5-庚烯-2-酮 6-Methyl-5-hepten-2-one	1.356	0.869	0.999	0.744
13	香叶基丙酮 Geranyl acetone	13.523	8.727	8.016	8.158
14	β -紫罗兰酮 β -Ionone	7.457	6.885	6.911	5.821
酸类 Acids					
15	乙酸 Acetic acid	—	5.243	7.941	9.987
烯炔类 Olefins					
16	柠檬烯 Limonene	0.374	0.907	1.334	1.709
其他类 Others					
17	2,4-二叔丁基苯酚 2,4-Di-tert-butylphenol	2.697	1.441	2.095	1.634
18	2-戊基呋喃 2-Pentyl furan	3.658	2.963	2.772	1.719

2.6 复合乳酸菌发酵枸杞果汁过程中抗氧化的变化

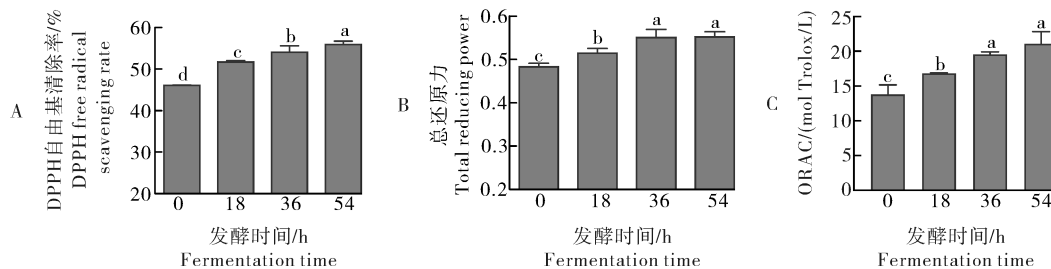
利用 DPPH 自由基清除率、总还原力和 ORAC 法对发酵过程中的枸杞果汁抗氧化活性进行评价,结果如图 5 所示。乳酸菌发酵可以显著提高枸杞果汁的抗氧化活性。其中,DPPH 自由基清除力随发

酵时间延长而不断提高,发酵 54 h 时较初始提高了 21.42%。而总还原力和 ORAC 值在 36 h 达到最大,发酵结束后分别提高了 14.18%、51.75%。

为了进一步确定枸杞果汁抗氧化活性变化与酚类物质的关系,对发酵过程中 9 种酚类物质与 3 种体外抗氧化活性进行相关性分析,其结果见表 3。

由表 3 可知, DPPH 自由基清除率与原儿茶酸含量呈极显著正相关($P < 0.01$), 与儿茶素、3-羟基肉桂酸、杨梅素含量呈显著正相关($P < 0.05$), ORAC 值与

杨梅素含量呈显著正相关($P < 0.05$)。由此可见, 乳酸菌发酵枸杞果汁引起的抗氧化活性的增强, 可能与酚类物质的释放和相互转化相关。



A: DPPH 自由基清除率; B: 总还原力; C: 氧化自由基吸收能力。A: DPPH free radical scavenging rate; B: Total reducing power; C: ORAC.

图 5 枸杞果汁发酵过程中抗氧化活性的变化

Fig.5 Changes of the antioxidant activity during fermentation of Goji juice

表 3 枸杞果汁发酵过程中酚类物质与抗氧化活性的相关性分析

Table 3 Correlation analysis of phenolics and antioxidant activity during fermentation of Goji juice

酚类物质 Phenolics	抗氧化活性 Antioxidant activity		
	DPPH 自由基清除率 DPPH free radical scavenging rate	总还原力 Total reducing power	ORAC
原儿茶酸 Protocatechuic acid	0.795 **	0.352	0.318
儿茶素 Catechin	0.612 *	0.064	0.528
对羟基苯甲酸 <i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	0.333	-0.335	0.450
香草酸 Vanillic acid	-0.811 **	-0.386	-0.308
对香豆酸 <i>p</i> -Coumaric acid	-0.821 **	-0.371	-0.556
芦丁 Rutin	0.054	-0.110	0.535
阿魏酸 Ferulic acid	-0.836 **	-0.385	-0.303
3-羟基肉桂酸 3-Hydroxycinnamic acid	0.629 *	0.569	0.325
杨梅素 Myricetin	0.707 *	0.388	0.643 *

注: ** 表示在 $\alpha = 0.01$ 水平上极显著相关; * 表示在 $\alpha = 0.05$ 水平上显著相关。Note: ** indicates extremely significant correction at 0.01 level; * indicates significant correction at 0.05 level.

3 讨论

糖类是乳酸菌在生长过程中的主要碳源和能量来源,不同乳酸菌对糖的代谢因菌株、发酵时间和底物类型的不同而有所差异^[16]。在本研究中,乳酸菌发酵 18 h 时已将枸杞果汁中添加的蔗糖利用完全,发酵后期仅利用葡萄糖、果糖进行生长繁殖。有机酸是乳酸菌发酵过程中的主要代谢产物,在体内不仅可以抑制有害菌的生长,提高人体对钙、磷等无机物的吸收,对于维持发酵产品风味也发挥重要作用。复合乳酸菌发酵后乳酸的大量生成主要是碳水化合物经糖酵解和 6-磷酸葡萄糖酸内酯途径转化产生,本研究使用的异型发酵乳酸菌,其代谢产物除乳酸外还会有乙酸等物质的生成,从而赋予枸杞果汁更为丰富的口感。在乳酸菌发酵过程中存在苹果酸-乳酸途径,使枸杞果汁中的苹果酸含量显著降低。柠檬酸是三羧酸循环的中间产物,在发酵过程

中含量降低可能是由于复合乳酸菌将其转化生成双乙酰、乳酸、乙酸等物质^[17]。 γ -氨基丁酸是人体内重要的抑制性神经递质,具有多种生理功能,本研究中经复合乳酸菌发酵后其含量增加了 1.82 倍。在乳酸菌发酵马齿苋、黑莓汁等研究中 γ -氨基丁酸均有所增加,其原因一方面是果蔬组织受外界刺激生成,另一方面来自于乳酸菌代谢产生^[18-19]。此外,研究表明在高酸性环境下更能促使乳酸菌产生 γ -氨基丁酸。这可能是发酵后期具有更高水平 γ -氨基丁酸的原因^[20]。

酚类物质是枸杞果汁中重要的活性成分,与枸杞果汁的多种功能活性密切相关。笔者所在课题组前期研究发现乳酸菌发酵可以显著提高枸杞果汁中总酚、总黄酮含量。本研究进一步利用 HPLC 分析发现湖北杂交枸杞汁在复合乳酸菌发酵过程中酚类物质组成和含量发生明显变化。研究表明,乳酸菌发酵过程中产生的蛋白酶、葡萄糖苷酶等酶,可以释

放出与细胞壁上的多糖和蛋白质结合的酚类物质。Liu 等^[21]研究发现多菌发酵可以促进枸杞汁中结合态对羟基苯甲酸的释放,此外,植物乳杆菌产生的脱羧酶也可以将对香豆酸代谢为对羟基苯丙酸或对羟基苯甲酸,这可能是对羟基苯甲酸含量大量增加而对香豆酸含量降低的原因。杨梅素含量的增加可能与乳酸菌将一些黄酮糖苷转化为游离性的黄酮苷元有关。研究表明植物乳杆菌产生的脱羧酶和还原酶可以将阿魏酸代谢为 4-乙炔基愈创木酚等风味前体物质,使得阿魏酸含量降低^[22]。

发酵果汁中挥发性物质的组成和含量对于产品的感官品质至关重要,许多研究表明乳酸菌发酵可以增加果汁挥发性物质的种类和含量。Ricci 等^[23]用乳酸菌发酵樱桃汁后发现挥发性化合物的总量较发酵前有所增加,主要表现为萜烯类、酮类、醇类、酸类等物质含量的增加。在本研究中,复合乳酸菌发酵增加了枸杞果汁中挥发性物质种类及醇类、酸类和烯炔类物质的含量。其中,乙醇、1-己醇、芳樟醇和乙酸是复合乳酸菌发酵后新增加的挥发性物质,乙醇具有令人愉快的醇香味,主要是由糖酵解生成的丙酮酸在丙酮酸甲裂解酶、乙醛脱氢酶、醇脱氢酶的作用下生成,它在发酵 18 h 时相对含量最高,发酵后期略有降低,可能是与酸结合生成了酯类物质有关^[24]。1-己醇的产生可能与脂氧合酶途径有关,该物质具有水果的芳芬。芳樟醇属于链状萜烯醇类,香气阈值低,赋予枸杞果汁甜的铃兰香味。乙酸是经乳酸菌发酵产生的挥发性酸,主要通过磷酸葡萄糖酸途径和柠檬酸的代谢产生,研究发现与其他乳酸菌相比,乳杆菌发酵果蔬汁挥发性成分中具有更高的乙酸含量,赋予果汁理想的酸味^[25]。 β -环柠檬醛具有清爽的薄荷香和果香,经发酵后该物质相对含量增加,对枸杞果汁风味有一定的辅助作用。苯甲醛主要由色氨酸或苯丙胺酸经转氨酶的作用产生,随着浓度的增加,苯甲醛会产生樱桃的香甜味^[26]。柠檬烯是柠檬、胡柚、柑橘等水果中含量最高的挥发性成分,在发酵过程中由于乳酸菌产生糖苷酶,将键合态烯类释放成游离态使得该物质含量不断增加,赋予枸杞果汁清新的橘子香气^[27]。己醛、1-辛烯-3-醇、2-戊基呋喃等物质随发酵时间延长不断降低,其中,己醛具有脂肪和青草的风味,浓度过高会产生酸败的气味,而 1-辛烯-3-醇具有土腥味和蘑菇味,研究结果表明复合乳酸菌发酵可以降低枸杞果汁的青草味和腥味,增加令人愉悦的花果等

香味。

果蔬汁经过乳酸菌发酵不仅促使膳食多酚的转化,改变有机酸的组成和含量,还可以显著提高枸杞果汁的 DPPH 自由基清除力、总还原力和 ORAC 抗氧化活性。刘秋豆等^[28]研究也发现,使用植物乳杆菌、保加利亚乳杆菌与嗜热链球菌复合发酵芒果汁可显著提高其 ABTS 自由基清除力和总还原力。果蔬汁的抗氧化活性与其含有的酚类化合物有关,研究表明,一些乳酸菌能够通过产生酚酸脱羧酶、糖基水解酶或酯酶将酚类化合物转化为生物活性更好的衍生物^[29]。而本研究相关性分析表明,发酵枸杞果汁抗氧化活性的增强与原儿茶酸、儿茶素、杨梅素、3-羟基肉桂酸含量的增加呈显著相关。

因此,本研究表明以植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)和发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)为菌种的复合乳酸菌发酵可以提高枸杞果汁中膳食多酚等活性成分含量和抗氧化活性,改变其有机酸的组成和含量,赋予其令人愉悦的花果香等风味,为开发风味良好与营养俱佳的乳酸菌发酵枸杞饮料提供实验依据和理论支撑。但本研究也存在一定局限性,有关枸杞乳酸菌饮料产品稳定性及口感调配在今后的工作中仍需进一步深入研究。

参考文献 References

- [1] DONNO D, BECCARO G L, MELLANO M G, et al. Goji berry fruit (*Lycium* spp.): antioxidant compound fingerprint and bioactivity evaluation[J]. *Journal of functional foods*, 2015, 18: 1070-1085.
- [2] 戴凯书. 湖北杂交枸杞及系列产品开发研究进展[J]. *湖北农学院学报*, 1994, 14(3): 77-80. DAI K S. Research progress of Hubei hybrid structure and series products development [J]. *Journal of Hubei agricultural college*, 1994, 14(3): 77-80 (in Chinese).
- [3] 向宇, 鲁群, 谭军, 等. 响应面分析优化枸杞浑浊汁饮料稳定工艺研究[J]. *核农学报*, 2017, 31(11): 2154-2163. XIANG Y, LU Q, TAN J, et al. Optimization of the stabilization technology of Chinese wolfberry cloudy juice by response surface methodology[J]. *Journal of nuclear agricultural sciences*, 2017, 31(11): 2154-2163 (in Chinese with English abstract).
- [4] GAO H, WEN J J, HU J L, et al. *Momordica charantia* juice with *Lactobacillus plantarum* fermentation: chemical composition, antioxidant properties and aroma profile[J]. *Food bioscience*, 2019, 29: 62-72.
- [5] ZHOU C, LI J, MAO K M, et al. Anti-hangover and anti-hypertensive effects *in vitro* of fermented persimmon juice[J]. *Cy-*

- TA-journal of food, 2019, 17(1): 960-966.
- [6] MICHALAK M, KUBIK-KOMAR A, WAŚKO A, et al. Starter culture for curly kale juice fermentation selected using principal component analysis[J/OL]. Food bioscience, 2020, 35: 100602 [2021-03-24]. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100602>.
- [7] 李维妮, 郭春锋, 张宇翔, 等. 气相色谱-质谱法分析乳酸菌发酵苹果汁香气成分[J]. 食品科学, 2017, 38(4): 146-154. LI W N, GUO C F, ZHANG Y X, et al. GC-MS analysis of aroma components of apple juice fermented with lactic acid bacteria[J]. Food science, 2017, 38(4): 146-154 (in Chinese with English abstract).
- [8] 乔博鑫, 邢紫娟, 郭红莲. 乳酸菌发酵枸杞过程中理化指标及风味物质的变化[J]. 食品工业科技, 2019, 40(9): 6-12. QIAO B X, XING Z J, GUO H L. Changes of physicochemical indexes and flavor components in the fermentation process of *Lycium barbarum* by lactic acid bacteria[J]. Science and technology of food industry, 2019, 40(9): 6-12 (in Chinese with English abstract).
- [9] 李佩佩, 颀向红, 王聪, 等. 不同发酵方式下枸杞饮料主要成分及其抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(24): 90-97. LI P P, XIE X H, WANG C, et al. Main components and antioxidant activities of *Lycium barbarum* L. beverages using two different fermentation processes[J]. Food and fermentation industries, 2019, 45(24): 90-97 (in Chinese with English abstract).
- [10] PENG W Y, MENG D Q, YUE T L, et al. Effect of the apple cultivar on cloudy apple juice fermented by a mixture of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, and *Lactobacillus fermentum* [J/OL]. Food chemistry, 2021, 340: 127922 [2021-03-24]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127922>.
- [11] CHEN Y Q, OUYANG X, LAAKSONEN O, et al. Effect of *Lactobacillus acidophilus*, *Oenococcus oeni*, and *Lactobacillus brevis* on composition of bog bilberry juice[J]. Foods, 2019, 8(10): 430. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31546648/>. DOI: 10.3390/foods8100430.
- [12] 仵白敏. 复合益生菌发酵葡萄酒工艺优化与营养特性研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2020. WU B M. Study on optimization of grape juice fermentation process with combined probiotics and its nutritional properties[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2020 (in Chinese with English abstract).
- [13] MOUSAVI Z E, MOUSAVI M. The effect of fermentation by *Lactobacillus plantarum* on the physicochemical and functional properties of liquorice root extract[J]. LWT, 2019, 105: 164-168.
- [14] WANG L, LUO Y, WU Y N, et al. Fermentation and complex enzyme hydrolysis for improving the total soluble phenolic contents, flavonoid aglycones contents and bio-activities of guava leaves tea[J]. Food chemistry, 2018, 264: 189-198.
- [15] HERNÁNDEZ-LEDESMA B, AMIGO L, RECIO I, et al. ACE-inhibitory and radical-scavenging activity of peptides derived from β -lactoglobulin f(19-25). interactions with ascorbic acid[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2007, 55(9): 3392-3397.
- [16] TKACZ K, CHMIELEWSKA J, TURKIEWICZ I P, et al. Dynamics of changes in organic acids, sugars and phenolic compounds and antioxidant activity of sea buckthorn and sea buckthorn-apple juices during malolactic fermentation[J/OL]. Food chemistry, 2020, 332: 127382 [2021-03-24]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127382>.
- [17] 张梦梅, 刘芳, 胡凯弟, 等. 酵素食品微生物指标与主要功效酶及有机酸分析[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(9): 195-200. ZHANG M M, LIU F, HU K D, et al. Analysis on microorganism index, main enzymes and organic acids of leaven food[J]. Food and fermentation industries, 2017, 43(9): 195-200 (in Chinese with English abstract).
- [18] DI CAGNO R, FILANNINO P, CAVOSKI I, et al. Bioprocessing technology to exploit organic palm date (*Phoenix dactylifera* L. cultivar Siwi) fruit as a functional dietary supplement[J]. Journal of functional foods, 2017, 31: 9-19.
- [19] KIM J Y, LEE M Y, JI G E, et al. Production of γ -aminobutyric acid in black raspberry juice during fermentation by *Lactobacillus brevis* GABA100[J]. International journal of food microbiology, 2009, 130(1): 12-16.
- [20] 卢嘉懿, 张弛, 李沛生, 等. 乳酸菌发酵对荔枝汁中 γ -氨基丁酸含量的影响[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(12): 97-102. LU J Y, ZHANG C, LI B S, et al. γ -Aminobutyric acid production in lychee juice fermented by lactic acid bacterium[J]. Food and fermentation industries, 2018, 44(12): 97-102 (in Chinese with English abstract).
- [21] LIU Y X, CHENG H, LIU H Y, et al. Fermentation by multiple bacterial strains improves the production of bioactive compounds and antioxidant activity of Goji juice[J/OL]. Molecules, 2019, 24(19): 3519 [2021-03-24]. <https://doi.org/10.3390/molecules24193519>.
- [22] KACHOURI F, KSONTINI H, KRAIEM M, et al. Involvement of antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* on functional properties of olive phenolic compounds[J]. Journal of food science and technology, 2015, 52(12): 7924-7933.
- [23] RICCI A, CIRLINI M, MAOLONI A, et al. Use of dairy and plant-derived *Lactobacilli* as starters for cherry juice fermentation[J/OL]. Nutrients, 2019, 11(2): 213 [2021-03-24]. <https://doi.org/10.3390/nu11020213>.
- [24] 马媛, 耿伟涛, 王金菊, 等. 乳酸菌代谢与食品风味物质的形成[J]. 中国调味品, 2019, 44(1): 159-163, 172. MA Y, GENG W T, WANG J J, et al. Lactic acid bacteria metabolism and formation of food flavor substances[J]. China condiment, 2019, 44(1): 159-163, 172 (in Chinese with English abstract).
- [25] CUI S M, ZHAO N, LU W W, et al. Effect of different *Lactobacillus* species on volatile and nonvolatile flavor compounds in juices fermentation[J]. Food science & nutrition, 2019, 7(7): 2214-2223.

- [26] 刘磊,汪浩,张名位,等.龙眼乳酸菌发酵工艺条件优化及其挥发性风味物质变化[J].中国农业科学,2015,48(20):4147-4158.LIU L,WANG H,ZHANG M W,et al.Optimization of the process conditions and change of volatile flavor components of longan pulp fermented by lactic acid bacteria[J].Scientia agricultura sinica,2015,48(20):4147-4158(in Chinese with English abstract).
- [27] REN J N,TAI Y N,DONG M,et al.Characterisation of free and bound volatile compounds from six different varieties of citrus fruits[J].Food chemistry,2015,185:25-32.
- [28] 刘秋豆,胡凯,陈亚淑,等.益生菌芒果饮料加工和发酵过程中理化性质变化规律[J].华中农业大学学报,2019,38(3):89-96.LIU Q D,HU K,CHEN Y S,et al.Changes in physicochemical properties of probiotic mango beverage during processing and fermentation[J].Journal of Huazhong Agricultural University,2019,38(3):89-96(in Chinese with English abstract).
- [29] FILANNINO P,DI CAGNO R,GOBBETTI M.Metabolic and functional paths of lactic acid bacteria in plant foods: get out of the labyrinth[J].Current opinion in biotechnology,2018,49:64-72.

Changes in quality and antioxidant activity of Goji juice during fermentation of compound lactic acid bacteria

HUANG Ningxin¹, LU Qun¹, DING Shiyong¹, LIU Rui^{1,2}, XIANG Shili³

1.College of Food Science and Technology/Ministry of Education Key Laboratory of Environment Correlative Dietology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2.Ministry of Agriculture and Rural Affairs Key Laboratory of Urban Agriculture in Central China, Wuhan 430070, China;

3.Hubei Gouqi Zhen Co., Ltd., Enshi 445300, China

Abstract The changes of nutrients, volatile substances and antioxidant properties during the compound fermentation of Goji juice by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* were investigated with HPLC and HS-SPME-GC-MS. The results showed that lactic acid bacteria grew well in Goji juice, and the pH value was significantly reduced. During the fermentation process, lactic acid bacteria used saccharose, glucose, and fructose as carbon sources to produce acid, and the content of lactic acid, acetic acid and aminobutyric acid were significantly increased, while the content of oxalic acid, malic acid and citric acid were decreased significantly. The composition and content of phenolic substances in Goji juice were significantly changed after fermentation. The content of protocatechuic acid was not detected in unfermented Goji juice, and increased to 40.55 $\mu\text{g/mL}$ after fermentation. The content of catechins, *p*-hydroxybenzoic acid, 3-hydroxycinnamic acid, and myricetin increased by 13.44%, 42.40%, 170.73% and 12.30%, respectively. Fermentation of lactic acid bacteria changed the composition and content of volatile components in Goji juice. The content of alcohols, acids, and olefins increased, while some substances including aldehydes and ketones decreased, and volatile components such as ethanol, 1-hexanol, and linalool were newly produced after fermentation. The antioxidant capacity of Goji juice was significantly improved as well. The DPPH free radical scavenging rate, total reducing power and oxygen radical absorbance capacity increased by 21.42%, 14.18%, and 51.75%, respectively.

Keywords lactic acid bacteria; Goji juice; phenolics; volatile components; antioxidant activity; fermented beverage

(责任编辑:赵琳琳)