

蓝莓酵素发酵过程中的抗氧化活性变化研究

管章瑞¹, 田裕¹, 赵娜², 夏小乐¹

(1. 教育部工业微生物技术重点实验室, 江南大学生物工程学院, 江苏无锡 214122)

(2. 无限极(中国)有限公司, 广东广州 510665)

摘要: 研究实验室自制蓝莓酵素在 30 d 发酵过程中生化指标变化及抗氧化性能力, 以 pH 值、菌落总数、葡萄糖、果糖、乙醇和有机酸为指标, 考察酵素蓝莓酵素在发酵中生化指标的变化, 以 DPPH 自由基清除率、羟自由基清除率及原花青素的变化评判蓝莓酵素抗氧化性能力。结果表明, 发酵过程中, pH 值呈先下降后增加趋势, 最终 pH 值为 3.47; 菌落总数呈现增加降低的循环趋势, 30 d 后菌落总数为 0.4×10^6 cfu/mL; 葡萄糖和果糖总量下降到 73.93 mg/mL; 最终乙醇、乳酸和乙酸含量分别为 23.69 mg/mL、5.84 mg/mL 和 4.30 mg/mL; 有机酸性实验表明, 蓝莓酵素中含有琥珀酸、异戊酸、柠檬酸、丙酮酸和苹果酸等有机酸; 稀释 10 倍蓝莓发酵液的 DPPH 自由基清除率和羟自由基清除率分别提高了 3.2% 和 2.92%。原花青素在发酵中呈下降趋势, 与 DPPH 自由基清除率及羟自由基清除率无相关性。

关键词: 蓝莓酵素; 发酵; 生化指标 抗氧化性

文章编号: 1673-9078(2016)12-74-80

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.12.012

Changes in antioxidant activity of Blueberry Jiaosu during fermentation

GUAN Zhang-ru¹, TIAN Yu¹, ZHAO Na², XIA Xiao-le¹

(1. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

(2. Infinitus (China) Company Ltd, Guangzhou 510665, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the changes in biochemical indicators and antioxidant activity of Blueberry Jiaosu during fermentation. The pH, total number of colonies, and amounts of organic acids, glucose, fructose, and ethanol were monitored to investigate the changes in biochemical indicators. DPPH- and hydroxyl free radical-scavenging rates and changes in procyanidin compounds were assessed to determine the antioxidant ability of Blueberry Jiaosu. The results showed that the pH value initially decreased and then increased, and showed a final value of 3.47. The total number of colonies increased and then decreased cyclically, and the value after 30 d was 0.4×10^6 cfu/mL. The total contents of glucose and fructose decreased to 73.93 mg/mL. The final contents of ethanol, lactic acid, and acetic acid were 23.69 mg/mL, 5.84 mg/mL, and 4.30 mg/mL, respectively. Qualitative analysis of organic acids showed that Blueberry Jiaosu contained succinic acid, isovaleric acid, citric acid, pyruvic acid, malic acid, and other organic acids. DPPH- and hydroxyl free radical-scavenging rates were increased by 3.2% and 2.92%, respectively, in ten-fold diluted blueberry fermentation liquid. The procyanidin content showed a decreasing trend during fermentation, and was not correlated with DPPH- and hydroxyl free radical-scavenging rates.

Key words: blueberry enzyme; fermentation; biochemical indicators; antioxidant ability

酵素是一种在日本和台湾盛行的功能性食品, 利用果蔬及一些可食性药材经过可食用菌在特定条件下发酵而成的对人体健康有利的饮品^[1], 通过益生菌发酵产生了大量的有机酸和氨基酸等次生代谢产物, 具有调理肠胃、促进消化吸收、抗氧化及提高免疫力等作用^[2]。近年来, 酵素食品风靡于日本、韩国、台湾以及欧美发达国家, 其中研究报告指出, 目前酵素产

收稿日期: 2016-10-8

基金项目: 江苏省重点研发计划(现代农业)(BE 2016331)

作者简介: 管章瑞(1993-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 酿造工艺研究

通讯作者: 夏小乐(1980-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 酿造及其微生物研究

品在日本一年可达 1000 亿日圆以上市场量^[3], 我国酵素市场也从无到有快速发展, 据初步统计目前酵素生产企业超过 60 家, 产值在 5 亿元左右, 但整体上还是处于发展初期, 存在产品质量参差不齐、生产企业规模较小及市场推广部规范等问题。随着基于养生理念日益被重视及营养观念不断推广, 酵素相关的产业必将得到迅速的发展。

蓝莓, 有“浆果之王”之称, 含有多种维生素、果酸和矿物质, 还含有丰富的花青素和原花青素等多酚类化合物和多糖类物质, 具有抗氧化、抗癌和抗炎作用, 对慢性病如糖尿病、肥胖和骨质疏松等有很大益处^[4-5], 被国际粮农组织列为人类五大健康食品之一

[6]。本研究使用蓝莓汁作为发酵原料,加入酵母菌、乳酸菌和醋酸杆菌等益生菌进行发酵,30 d 制得蓝莓酵素初液。经过发酵,可降解蓝莓汁中大分子物质,提高人体的吸收。通过分析蓝莓酵素发酵过程中 pH 值、菌落总数、糖量和乙醇等生化指标变化以及发酵后有机酸变化,结合蓝莓发酵中抗氧化性(DPPH 自由基清除率,氢自由基清除率)变化。以期探讨蓝莓发酵中生化指标之间的变化规律及抗氧化性,为深入研究蓝莓酵素的发展前景及利用价值。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

蓝莓果汁、酵母菌、乳酸菌、干酪乳杆菌和白糖,均为市购;醋酸杆菌,广东省微生物菌种保藏中心;葡萄糖、果糖、乙醇、乙酸和乳酸为色谱纯; α , α -二苯基- β -苦苯肼(DPPH);无水乙醇、邻二氮菲、双氧水、FeSO₄和 EDTA 等均为分析纯试剂。

Thermo U3000 高效液相色谱仪;PHS-3C 型 pH 计上海仪电科学仪器股份有限公司;恒温水浴锅广州市芊荃化玻仪器有限公司;数显鼓风干燥箱上海博迅实业有限公司医疗设备厂;恒温振荡器常州澳华仪器有限公司;生化培养箱上海博迅实业有限公司医疗设备厂;手提式压力蒸汽灭菌锅 YX-280A+合肥华泰医疗设备有限公司;SW-CJ-10 型单人净化工作台苏州净化设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 蓝莓酵素的制备

将市购蓝莓果汁置于无菌操作台上,紫外照射 20 min。在无菌条件下蓝莓汁加入到已灭菌的发酵坛子中,加入 30%蓝莓汁质量的白糖,再加入 0.1%酵母及 1%乳酸菌(干酪乳杆菌和嗜酸乳杆菌 1:1 混合),搅拌均匀,液封。前 5 d 每天在无菌操作台上搅拌 1 次,每次 2 min。于第 6 d 加入 5%醋酸杆菌,前 3 d 每天搅拌 3 次,每次 1 min。3 d 后不再搅拌,30 d 后制得蓝莓酵素初液,过滤,即得蓝莓酵素。发酵过程中,所有操作都在无菌环境下进行。

1.2.2 菌落总数测定参照 GB 4789.2-2010 进行检测[7]。

1.2.3 葡萄糖、果糖、乙醇和有机酸测定[8]

1.2.3.1 色谱分离条件

色谱柱: Aminex HPX-87H 有机酸分析柱(300 mm×7.8 mm:Bio-Rad.Hercules)

流动相: 0.005 mol/L H₂SO₄ 溶液, 流速 0.6

mL/min, 进样量 20/10 μ L, 柱温 50 $^{\circ}$ C。

检测器参数: 紫外检测器波长 210 nm。示差折光检测器温度 50 $^{\circ}$ C。

1.2.3.2 样品预处理

使用 200 目纱布对发酵原液过滤,准确移取一定量酵素液,过滤,溶液经 10000 r/min 离心 5 min 取上清液 1 mL,适当稀释经 0.22 μ m 膜过滤,进样 10 μ L。

1.2.3.3 标准品制备

精确称取标准品,稀释不同浓度,使用 0.22 μ m 膜过滤进样,进样量: 20 μ L。

1.2.4 DPPH 自由基清除能力[9]

样品处理: 样品用纱布过滤,稀释 10 倍,取滤液待用。

0.02 mg/mL 的 DPPH-乙醇溶液 2 mL 中加入样品 2 mL,混合均匀,25 $^{\circ}$ C 恒温水浴室 30 min,测定其在 517 nm 处的吸光度值。空白组以 2 mL 无水乙醇代替试样。同一测定重复 3 次。

DPPH 清除率/%=[1-(A₁-A₂)/A₀] \times 100

式中: A₁ 为样品溶液的吸光度; A₂ 为用无水乙醇代替 DPPH 时测得对应浓度的本底吸光度; A₀ 为空白组的吸光度。

1.2.5 羟自由基清除能力[10]

取 5 mmol/L 邻二氮菲溶液 0.6 mL,加入 0.4 mL 0.2 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液,混合均匀后加入 5 mmol/L 硫酸亚铁溶液 0.6 mL,15 mmol/L EDTA 溶液 0.6 mL,稀释 10 倍的发酵液 0.6 mL,0.1%的双氧水 0.8 mL,混合均匀,37 $^{\circ}$ C 保温 1 h,于 536 nm 处测定吸光值 A 样品。同一测定重复 3 次。

羟自由基清除率(%)=[(A_{样品}-A_{损伤})/(A_{空白}-A_{损伤})] \times 100%

其中, A_{损伤}: 将蒸馏水替换样品进行测定; A_{空白}: 取 5 mmol/L 邻二氮菲溶液 0.6 mL,加入 0.4 mL、0.2 mol/L、pH 7.4 磷酸盐缓冲液,混合均匀后加入 5 mmol/L 硫酸亚铁溶液 0.6 mL,15 mmol/L EDTA 溶液 0.6 mL,蒸馏水 1.4 mL,混合均匀,37 $^{\circ}$ C 保温 1 h,536 nm 处测定吸光值。

1.2.6 原花青素测定[11]

1.2.6.1 标准曲线的制作

分别取不同浓度的标准品(正丁醇稀释)1.00 mL 置于 10 mL 刻度试管中,加入 9 mL 反应混合液(正丁醇、浓盐酸和 20%硫酸高铁铵体积比 85:5:0.4),置于沸水浴中加热,塞紧塞子(勿摇匀),准确加热 40 min 后,立即取出,用冷水快速冷却至室温,用正丁醇定容至刻度线摇匀,在 550 nm 处测吸光值。以吸光值为纵坐标(y),以原花青素浓度为横坐标(x, μ g/mL),绘制标准曲线。

1.2.6.2 样品的处理及测定

吸取 1 mL 样品移入 10 mL 容量瓶中, 用无水乙醇定容, 摇匀后用纱布过滤, 滤液依照上述标准曲线绘制同样操作, 测定 OD 值, 查标准曲线, 并计算原花青素的含量:

依照下列公式计算原花青素含量:

$$\text{原花青素 (mg/100 mL)} = \frac{c \times V_2}{V_1 \times 1000} \times 100$$

c 表示查标准曲线样品液 OD 值对应的原花青素的含量 ($\mu\text{g/mL}$); V_1 表示吸取样品体积, mL; V_2 表示样品稀释后体积, mL。

2 结果与分析

2.1 蓝莓酵素发酵过程中 pH 值变化

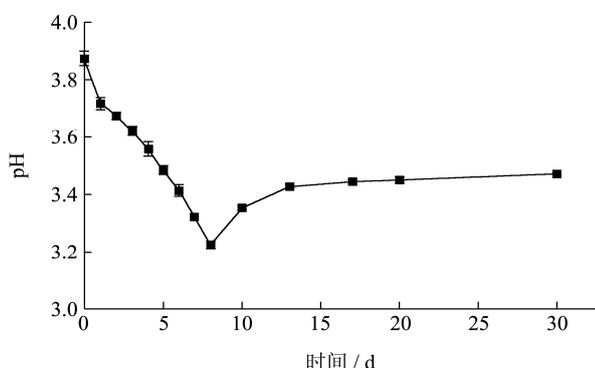


图1 发酵过程中 pH 变化

Fig.1 Changes in pH value during fermentation

蓝莓果汁 pH 值为 3.87, 由图 1 可知, 蓝莓酵素在前 8 d 处于下降趋势, 8 d 后缓慢上升。发酵前 6 d, 主要是酵母菌和乳酸菌进行发酵, 酵母菌在无氧条件下利用糖产生乙醇和二氧化碳, 发酵液中由于二氧化碳浓度上升, 碳酸浓度随之上升, 乳酸菌利用糖产乳酸^[12], 因此 pH 值下降。发酵第 6 d 加入醋酸杆菌, 醋酸杆菌利用发酵液中乙醇, 在供氧条件下分解乙醇产乙酸和水, 从而降低 pH 值。第 8 d 后, pH 值缓慢上升, 主要由于微生物对发酵液中蛋白质水解和氨基酸的利用, 产乙酸及其他有机酸的共同作用结果^[13]。pH 值 30 d 后为 3.47, 可抑制大部分有害菌的生长。

2.2 蓝莓酵素发酵过程中菌落总数变化

菌落总数是在一定条件下单位体积或者质量样品生长出的细菌菌落总数。由于不同菌对生长环境要求不同, 国家标准中测定菌落总数的方法不代表实际的菌落总数, 只代表大部分菌的生长情况。实验室自备蓝莓酵素使用了酵母、乳酸杆菌和醋酸杆菌, 分别为兼性厌氧型、厌氧型及好氧型。菌落总数测定结果如下:

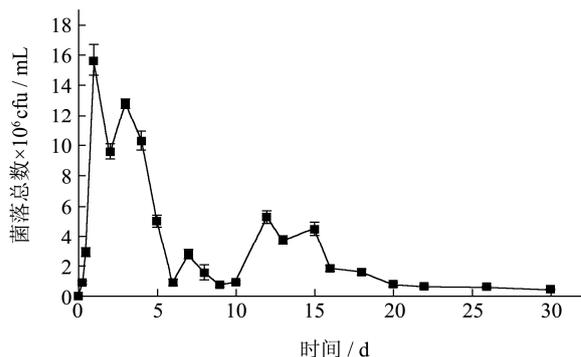


图2 发酵过程中菌落总数变化

Fig.2 Changes in total number of colonies during fermentation

如图 2 所示, 在发酵过程中, 菌落总数 1 d 内迅速上升到 1.57×10^7 cfu/mL, 达到最大值, 之后呈现下降趋势, 间歇性小幅度上升。随着发酵时间的延长, 糖原不断被消耗, 且生长空间的限制, 菌量开始下降, 第 6 d 加入醋酸杆菌后, 菌量开始呈现上升趋势, 到第 12 d, 菌落总数呈现又一个高峰值, 于 20 d 后趋于平稳值。菌落总数 30 d 为 0.4×10^6 cfu/mL。

2.3 蓝莓发酵过程中葡萄糖、果糖和乙醇变化

发酵液中葡萄糖、果糖和乙醇采用液相色谱进行测定, 色谱峰如图 3 所示, 出峰顺序为葡萄糖、果糖和乙醇。其保留时间和线性关系如表 1 所示。

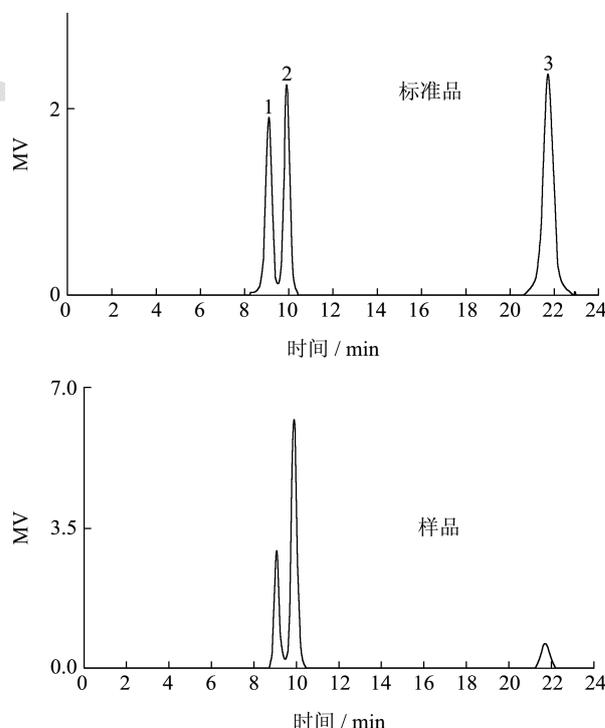


图3 对照品和样品色谱图

Fig.3 Chromatogram of control and sample

注: 1, 葡萄糖; 2, 果糖; 3, 乙醇。

表 1 葡萄糖、果糖、乙醇的保留时间及线性关系

Table 1 Retention time and linear relationship of glucose, fructose and ethanol

组分	保留时间/min	线性关系	R ²
葡萄糖	9.079	y=12242x-1907.5	0.9991
果糖	9.855	y=12414x-3068.7	0.9999
乙醇	21.750	y=3521.9x+828.75	0.9995

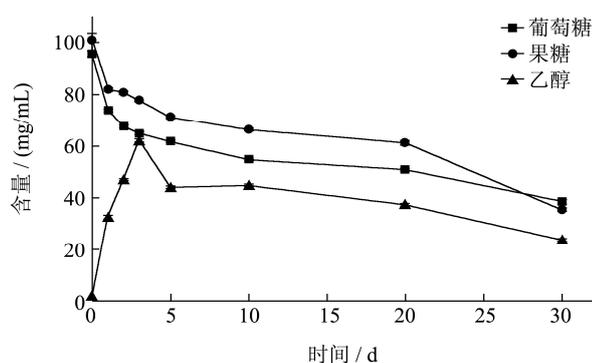


图 4 发酵过程中葡萄糖、果糖和乙醇变化

Fig.4 Changes of glucose, fructose and ethanol during fermentation

如图 4 为葡萄糖、果糖、乙醇在发酵过程中变化情况。发酵前添加浓缩苹果汁补充糖原，主要糖原为果糖和葡萄糖。由图可知，葡萄糖、果糖在发酵中都处于下降趋势。二者总含量由最初的 198.4 mg/mL 降低到 73.93 mg/mL，发酵利用 124.47 mg/mL。发酵中，糖主要由酵母菌和乳酸菌代谢利用，在前 6 d 快速下降，后期缓慢降低。结合图 2 菌落总数变化，前期菌落总数增加，生长快速，糖利用量高，因此，糖量下降快速，后期菌落总数趋于平缓，对糖的需要量相对较低，且后期优势菌种为醋酸杆菌，主要分解利用乙醇转化为乙酸和水，因此，糖耗量低。

发酵前期，由于酵母在无氧条件下将糖转化为乙醇，因此在前 6 d 乙醇含量不断上升，最大值为 64.32 mg/mL。第 6 d 加入醋酸杆菌，将乙醇转化为乙酸，乙醇含量降低，30 d 后乙醇含量为 23.69 mg/mL。

2.4 蓝莓酵素发酵过程中乳酸、乙酸及其他有机酸变化

使用高效液相色谱法测定乳酸和乙酸等有机酸含量，乳酸、乙酸定量线性关系及保留时间如表 2 所示。其余有机酸定性保留时间如表 3 所示。

由图 5 可知，乳酸和乙酸含量在发酵过程中不断增加。30 d 后乳酸为 4.30 mg/mL，乙酸为 5.84 mg/mL。

在发酵过程中，乳酸主要由乳酸菌通过糖代谢生成。乙酸主要为醋酸杆菌的代谢产物。实验室制备蓝莓酵素加入的乳酸菌为干酪乳杆菌和嗜酸乳杆菌，前者为兼性异型发酵，除了生成乳酸外，还能生成乙醇和乙酸。后者为同型乳酸发酵，只生成乳酸。由图中可知乙酸在前两天几乎为 0，在加入醋酸杆菌后增加速度快。乳酸在加入乳酸菌后一直在不断增加。

表 2 乳酸和乙酸的保留时间及线性关系

Table 2 Retention time and linear relationship of lactic acid and acetic acid

成分	保留时间/min	线性关系	R ²
乳酸	12.507	y=1112.3x-54.278	0.9999
乙酸	15.054	y=58599x-3585.7	0.9998

表 3 有机酸（定性）保留时间

Table 3 Retention time of organic acid (qualitative analysis)

标准品	保留时间/min
草酸	6.603
柠檬酸	7.987
丙酮酸	9.358
苹果酸	9.512
琥珀酸	11.796
甲酸	13.811
丙酸	17.814
正丁酸	21.977
异戊酸	25.312

由表 4 可知，经过发酵后的蓝莓酵素含有柠檬酸、苹果酸、丙酮酸、乳酸、琥珀酸、乙酸、丙酸、正丁酸和异戊酸，其中，乙酸、丙酸、正丁酸和异戊酸属于短链脂肪酸，可调节结肠细胞代谢维持肠道功能、抗炎和抗病原微生物。有机酸种类增多，使蓝莓酵素具有独特的风味。

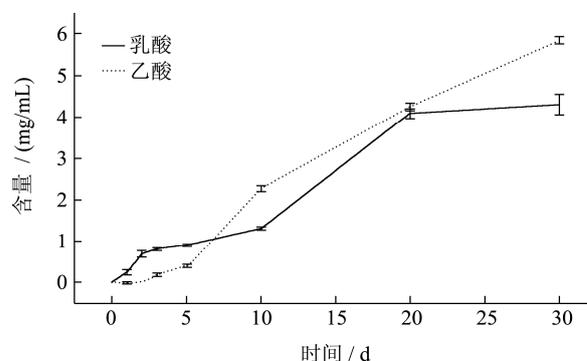


图 5 发酵中乳酸、乙酸变化

Fig.5 Changes of lactic acid and acetic acid during fermentation

表4 蓝莓汁及蓝莓酵素有机酸定性

Table 4 Organic acids in blueberry juice and blueberryenzyme

样品	草酸	柠檬酸	丙酮酸	苹果酸	乳酸	琥珀酸	乙酸	丙酸	正丁酸	异戊酸
蓝莓汁		√	√	√						
蓝莓酵素		√	√	√	√	√	√	√	√	√

2.5 蓝莓酵素发酵过程中 DPPH 变化

DPPH 名为 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼, DPPH 自由基存在单电子, 在 517 nm 处有强吸收。当存在自由基清除剂时, DPPH 自由基单电子与其配对使吸收逐渐减弱, 褪色程度与电子数呈定量关系。DPPH 自由基相较于超氧自由基和羟自由基更加稳定, 能更好的评价抗氧化性。蓝莓酵素发酵过程中的 DPPH 自由基清除率如下图所示:

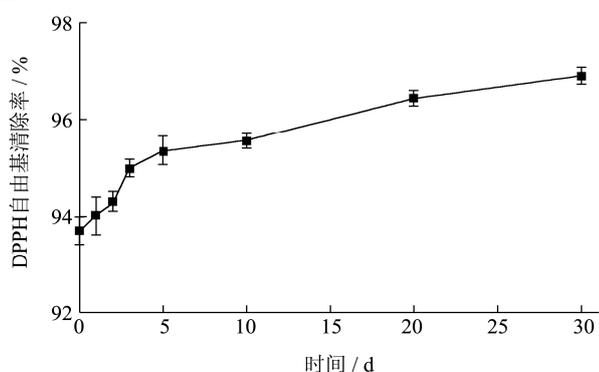


图6 发酵过程中 DPPH 自由基清除能力的变化

Fig.6 Changes in DPPH scavenging ability during fermentation

由图 6 可知, 稀释了 10 倍发酵液的 DPPH 自由基清除率在 30 d 上升到 96.90%, 发酵中上升了 3.2%。而 0.012 mg/mL 维生素 C 的 DPPH 自由基清除率为 66.98%。稀释后的发酵液高出 29.92%。因此, 原液的 DPPH 自由基清除率高出 0.012 mg/mL 维生素的 10 倍以上。变化趋势处于上升趋势, 表明在此种发酵有利于提高 DPPH 自由基清除率。

2.6 蓝莓酵素发酵过程中羟自由基清除率变化

羟自由基属活性氧中的一种, 可降解多糖、DNA 和细胞膜等, 在体内可与金属离子发生氧化, 使金属离子形成高氧化态。可损害机体细胞, 进而引发慢性病以及衰老等疾病。氢自由基清除率利用显色反应, 在 536 nm 处测定其最大吸收。蓝莓酵素羟自由基清除率如图 7 所示。

由图 7 可知, 稀释 10 倍的发酵液羟自由基清除率在发酵过程中上升了 2.92%。第 30 d 最高, 为 23.64%。而 0.012 mg/mL 维生素 C 羟基自由基清除率为

26.87%, 从而得出发酵原液氢自由基清除率远高于 0.012 mg/mL 维生素 C 的羟自由基清除率。但变化趋势来看, 此种发酵方法提高了羟自由基清除率。

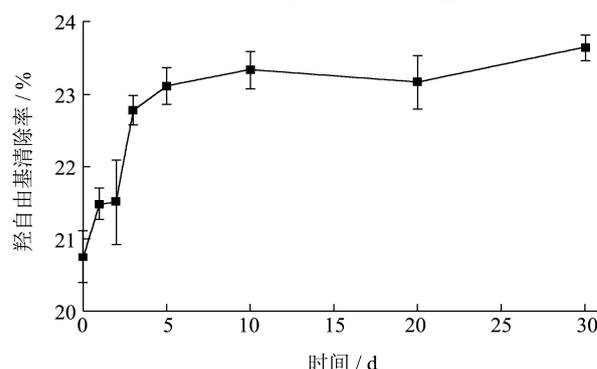


图7 发酵中羟自由基清除率变化

Fig.7 Changes in hydroxyl radical scavenging ability during fermentation

2.7 蓝莓酵素发酵过程中原花青素变化

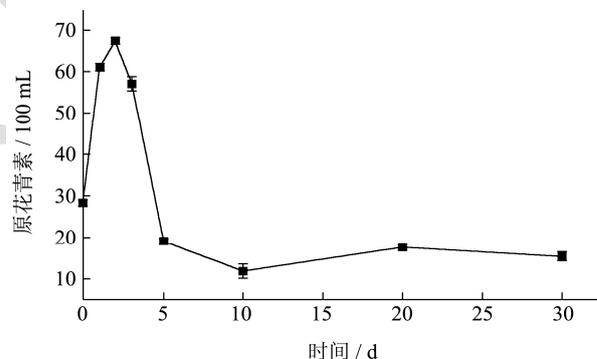


图8 发酵中原花青素变化

Fig.8 Variation of Proanthocyanidins during fermentation

由图 8 可知, 原花青素含量先增加后降低, 与 DPPH 自由基清除率及羟自由基清除率无任何相关性。可能在发酵过程中原花青素结构发生转变。叶春苗等^[14]研究发现原花青素易受 pH 值、光照、温度和金属离子等影响。低 pH 值有利于原花青素的稳定性。随着 pH 值上升, 原花青素会发生分解。汪志慧等^[15]研究光照对莲房原花青素稳定性影响, 发现随着光照时间延长, 原花青素呈现不同程度的降低, 并于第三天降低明显。其中室外阳光直射降低最快, 避光降低最小。原花青素在结构上是由不同量的表儿茶素和儿茶素聚合而成, 最简单的原花青素是儿茶素和表儿茶素^[16]。Aida Serra^[17]等人研究发现, 通过小鼠肠道菌群

代谢原花青素中的儿茶酚、表儿茶酚、二聚体 B2、EGC 和 EGCG, 48 h 后, 5 类原花青素不同程度降低, 其中, 原花青素 B2 代谢物中发现有表儿茶酚单体生成。Berké B^[18]等人研究发现原花青素不同的立体构象可不同程度与葡萄糖甙结合, 稳定溶液的呈色效果。Dangles^[19]等人研究发现红酒中乙醇会降低溶液的呈色效果。结合图中在发酵过程中原花青素变化, 可能在前 2 d 原花青素上升是由于高聚体原花青素分解为低聚体原花青素, 导致原花青素上升。随着发酵时间延长, 光照时间增加, 原花青素单体被微生物分解代谢为其他产物, 从而降低其含量。

蒋增良等^[13]研究蓝莓酵素抗氧化性在天然发酵过程中变化, 结果显示在发酵过程中 DPPH 和羟自由基清除率呈增加趋势, 与多酚含量呈正相关性。^[20]等研究了蓝莓多糖抗氧化性, 发现蓝莓多糖对羟自由基和 DPPH 自由基具有较强的清除能力。因此, 发酵中 DPPH 自由基清除率以及羟自由基清除率的上升可能是由于多酚含量的增加和多糖的共同作用。具体原因需要进一步研究。

3 结论

3.1 通过对蓝莓酵素发酵过程中 pH 值、菌落总数、葡萄糖、果糖和乳酸等有机酸进行测定, 更好的掌控蓝莓在发酵中的各个指标变化, 为后续大实验发酵过程控制提供参考。蓝莓酵素产生了多种有机酸, 有益于人体机体调节, 其中产生的短链脂肪酸可调节人体肠道菌群平衡, 有利于人体健康。

3.2 蓝莓中含有大量的花青素和原花青素等多酚类物质, 抗氧化性强。在发酵过程中, 通过测定 DPPH 自由基和羟自由基清除率及原花青素含量, 结果显示发酵有利于提高抗氧化能力, 但原花青素含量与抗氧化性不呈正相关性。可能由于原花青素转化为其他多酚类物质, 具体原因需进一步研究。

参考文献

- [1] Randazzo W, Corona O, Guarcello R, et al. Development of new non-dairy beverages from Mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms [J]. Food Microbiology, 2016, 54: 40-51
- [2] 毛建卫, 吴元锋, 方晟. 微生物酵素研究进展[J]. 发酵科技通讯, 2010, 39(3): 42-44
MAO Jian-wei, WU Yuan-feng, FANG Sheng. The research progress of microbial jiaosu [J]. Fermentation Technology Newsletter, 2010, 39(3): 42-44
- [3] 徐萌. 现代生活中关于酵素市场经济发展的探究[J]. 经营管

理者, 2016, 22: 183

XU Meng. The research of jiaosu market economy development in modern life [J]. Journal of Management, 2016, 22: 183

- [4] 陈介甫, 李亚东, 徐哲. 蓝莓的主要化学成分及生物活性[J]. 药理学学报, 2010, 45(4): 422-429

CHEN Jie-fu, LI Ya-dong, XU Zhe. Chemical principles and bioactivities of blueberry [J]. Acta Pharm Sin., 2010, 45(4): 422-429

- [5] Neto C C. Cranberry and blueberry: evidence for protective effects against cancer and vascular diseases [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2007, 51(6): 652-664

- [6] 方仲相, 胡君艳, 江波, 等. 蓝莓研究进展[J]. 浙江农林大学学报, 2013, 30(4): 599-606

FANG Zhong-xiang, HU Jun-yan, JIANG Bo, et al. Research progress on blueberry (*Vaccinium spp.*) [J]. Journal of Zhejiang A&F University, 2013, 30(4): 599-606

- [7] GB 4789.2-2010, 食品安全国家标准食品微生物学检验. 菌落总数测定[S]

GB 4789.2-2010, National food safety standards food microbiological examination. aerobic plate count [S]

- [8] 马瑞, 欧阳嘉, 李鑫, 等. 高效液相色谱法同时测定生物物质乳酸发酵液中有有机酸及糖类化合物[J]. 色谱, 2012, 30(1): 62-66

MA Rui, OU Yang-jia, LI Xin, et al. Simultaneous determination of organic acids and saccharides in lactic acid fermentation broth from biomass using high performance liquid chromatography [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2012, 30(1): 62-66

- [9] 韦献雅, 殷丽琴, 钟成, 等. DPPH法评价抗氧化活性研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35(9): 317-322

WEI Xian-ya, YIN Li-qin, ZHONG Cheng, et al. Advances in the DPPH radical scavenging assay for antioxidant activity evaluation [J]. Food Science, 2014, 35(9): 317-322

- [10] 金鸣, 蔡亚欣, 李金荣, 等. 邻二氮菲-Fe²⁺氧化法检测H₂O₂/Fe²⁺产生的羟自由基[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 6: 553-555

JIN Ming, CAI Ya-xin, LI Jin-rong, et al. 1,10-Phenanthroline-Fe²⁺ oxidative assay of hydroxyl radical produced by H₂O₂/Fe²⁺ [J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 1996, 6: 553-555

- [11] 白鸿. 保健食品功效成分检测方法[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2011

BAI Hong. The method of health food ingredient detection [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2011

- [12] Li X, Xu W, Yang J, et al. Effects of applying lactic acid bacteria to the fermentation on a mixture of corn steep liquor and air-dried rice straw [J]. *Animal Nutrition*, 2016, 2(3): 229-233
- [13] 蒋增良,毛建卫,黄俊,等. 蓝莓酵素在天然发酵过程中抗氧化性能的变化[J]. *食品工业科技*, 2013, 2: 194-197, 201
JIANG Zeng-liang, MAO Jian-wei, HUANG Jun, et al. Changes in antioxidant activity of blueberry-ferment during natural fermentation process [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 2: 194-197, 201
- [14] 叶春苗. 原花青素的提取方法及稳定性研究进展[J]. *农业科技与装备*, 2014, 7: 64-65
YE Chun-miao. The extraction methods and stability of procyanidins [J]. *Agricultural Science & Technology and Equipment*, 2014, 7: 64-65
- [15] 汪志慧,孙智达,谢笔钧. 莲房原花青素的稳定性及热降解动力学研究[J]. *食品科学*, 2011, 7: 77-82
WANG Zhi-hui, SUN Zhi-da, XIE Bi-yun. Stability and thermal degradation kinetics of procyanidins from lotus seed pods [J]. *Food Science*, 2011, 7: 77-82
- [16] Appeldoorn M M, Vincken J, Aura A, et al. Procyanidin dimers are metabolised by human microbiota with 2-(3,4-dihydroxyphenyl)acetic acid and 5-(3,4-dihydroxyphenyl)-c-valerolactone as the major metabolites [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(3): 1084-1092
- [17] Aida Serra, Alba Macià, Maria-Paz Romero, et al. Metabolic pathways of the colonic metabolism of procyanidins (monomers and dimers) and alkaloids [J]. *Food Chemistry*, 2011, 126: 1127-1137
- [18] 孟宪军,孙希云,朱金艳,等. 蓝莓多糖的优化提取及抗氧化性研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2010, 29(1): 56-60
MENG Xian-jun, SUN Xi-yun, ZHU Jin-yan, et al. Extraction and antioxidant capability of blueberry polysaccharides [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2010, 29(1): 56-60
- [19] Berké B, de Freitas V A P. Influence of procyanidin structures on their ability to complex with oenin [J]. *Food Chemistry*, 2005, 90(3): 453-460
- [20] Dangles O, Brouillard, R. Polyphenol interactions. The copigmentation case: thermodynamic data from temperature variation and relaxation kinetics. Medium effect [J]. *Canadian Journal Chemistry*, 1992, 70: 2174-2189