

嗜酸乳杆菌发酵红甜菜汁对血管紧张素转化酶和乙酰胆碱酯酶的抑制作用

闫明哲¹, 王萍^{1,2*}

(1. 东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040)

(2. 黑龙江省森林食品资源利用重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要: 探究了经嗜酸乳杆菌 LA-5 发酵的红甜菜汁对血管紧张素转化酶 (ACE)、乙酰胆碱酯酶 (AChE) 的抑制能力、抗氧化活性影响及其与活性物质的关系。结果表明: 发酵结束时活菌数为 6.29×10^8 CFU/mL, 甜菜红素和总酸含量分别增加了 13.63% 和 302.21%, 还原糖、甜菜黄素和黄酮含量分别降低了 63.87%、43.09% 和 0.05%。经发酵后 $\cdot O_2^-$ 、 $\cdot OH$ 和 $ABTS^+$ 清除率分别提高 29.13%、96.36% 和 77.49%, AChE 和 ACE 抑制率分别提高 59.15% 和 35.37%, 各时间段发酵液经 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 共鉴定出 12 种甜菜色素。相关性分析表明上述功能性指标与甜菜红素呈极显著正相关 ($p < 0.01$); 主成分分析共提取 3 个主成分, 总贡献率为 90.63%, 其中 betanin、betanidin、17-decarboxy-betanidin、2-decarboxy-neobetanin、6'-O-feruloyl-betanin、vulgaxanthin I、betalamic acid 为主要活性成分; Q 型聚类分析将发酵过程聚为 3 类, 即缓慢增长期、显著变化期和平缓期; R 型聚类分析将活性成分和功能指标聚为 3 类, 与相关性分析和主成分分析结果一致。综上所述, 经嗜酸乳杆菌 LA-5 发酵的红甜菜汁是一种以甜菜红素为主的优质抗氧化剂和 AChE、ACE 抑制剂来源, 具有开发防治阿尔兹海默症相关功能性产品的价值。

关键词: 甜菜色素; 阿尔兹海默症; 血管紧张素转化酶; 乙酰胆碱酯酶; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2022)11-98-110

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.11.0046

Inhibition of Angiotensin-converting Enzyme and Acetylcholinesterase of Red Beetroot Juice Fermented with *Lactobacillus acidophilus*

YAN Mingzhe¹, WANG Ping^{1,2*}

(1. College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

(2. Key Laboratory of Forest Food Resources Utilization of Heilongjiang Province, Harbin 150040, China)

Abstract: The effects of red beetroot juice fermentation by *Lactobacillus acidophilus* LA-5 on the activity of angiotensin-converting enzyme (ACE), acetylcholinesterase (AChE), and antioxidants, and its relationship with active substances were studied. The number of viable bacteria at the end of fermentation was 6.29×10^8 CFU/mL. The contents of betacyanins and total acid increased by 13.63% and 302.21%, respectively. The contents of reducing sugar, betaxanthins, and flavones decreased by 63.87%, 43.09%, and 0.05%, respectively. After fermentation, the clearance rates of $\cdot O_2^-$, $\cdot OH$, and $ABTS^+$ increased by 29.13%, 96.36%, and 77.49%, respectively, and the inhibition rates of AChE and ACE increased by 59.15% and 35.37%, respectively. Twelve betalains were identified by UHPLC-Q-TOF-MS/MS. Correlation analysis showed that the aforementioned functional indexes had a very significant positive correlation with the betacyanin content ($p < 0.01$). Three principal components, with a total contribution rate of 90.63%, were extracted using principal component analysis. The main active components were betanin, betanidin, 17-decarboxy-betanidin, 2-decarboxy-neobetanin, 6'-O-feruloyl-betanin, vulgaxanthin I, and betalamic acid. Q-type cluster analysis classified the fermentation process into three categories: slow growth, significant change, and flat periods. R-type cluster

引文格式:

闫明哲, 王萍. 嗜酸乳杆菌发酵红甜菜汁对血管紧张素转化酶和乙酰胆碱酯酶的抑制作用[J]. 现代食品科技, 2022, 38(11): 98-110

YAN Mingzhe, WANG Ping. Inhibition of angiotensin-converting enzyme and acetylcholinesterase of red beetroot juice fermented with *Lactobacillus acidophilus* [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(11): 98-110

收稿日期: 2022-01-05

作者简介: 闫明哲 (1993-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 772897890@qq.com

通讯作者: 王萍 (1964-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 植物活性物质分离及功能性, E-mail: wangping2178@nefu.edu.cn

analysis grouped the active components and functional indexes into three categories. In summary, red beetroot juice fermented by *L. acidophilus* LA-5 is a source of high-quality antioxidants, as well as AChE and ACE inhibitors dominated by betacyanins, which prevent the development of Alzheimer's disease.

Key words: betalains; Alzheimer's disease; angiotensin-converting enzyme; acetylcholinesterase; antioxidation

阿尔兹海默症 (Alzheimer's Disease, AD) 又称原发性老年痴呆症, 是一种具有遗传性和散发性且与衰老相关的神经退行性疾病^[1]。其典型表现为遗忘性认知障碍, 具有不可逆性和致死性^[2,3]。研究显示, 到 2050 年全球 AD 患者将超 1 亿, 亚洲地区 AD 患者将达 6 280 万^[4]。因此, 寻找有效防治 AD 的方法是人们亟待解决的问题。

乙酰胆碱酯酶 (Acetylcholinesterase, AChE) 是生物神经信号传导过程的关键酶, 可将神经递质乙酰胆碱水解为胆碱和乙酸^[5]。AChE 活性过度增加会降低乙酰胆碱水平, 引发或加重 AD 等神经系统疾病^[6]。血管紧张素转化酶 (Angiotensin Converting Enzyme, ACE) 抑制剂可阻断 Ang I 转变为 Ang II, 同时阻断 Ang II 作用于 Ang II-1 型受体^[7,8], 从而减少因神经元凋亡引起的不良反应, 可有效延缓神经退行性病变。此外, 氧化应激产生过多的活性氧会使神经元发生不可逆损伤, 减轻氧化应激对防治神经退行性疾病举足轻重^[9]。因此, 在标准疗法 AChE 抑制剂的基础上结合 ACE 抑制剂和自由基清除剂可有效防治 AD。但 AChE 和 ACE 抑制剂类药物存在副作用且价格高昂, 人们开始关注通过摄入食物防治 AD。此外, 食物所含活性物质易被人体代谢和耐受, 减少副作用发生^[10], 这对开发具有缓解 AD 的功能性食品具有重要意义。

红甜菜 (*Beta vulgaris* L.) 别名火焰菜、紫菜头, 属于石竹目 (Caryophyllales) 藜科 (Chenopodiaceae) 甜菜属 (*Genus beta*)^[11], 富含甜菜色素、酚类、黄酮类、皂苷等活性物质^[12]。红甜菜在维持健康和预防疾病方面具备一定潜能, 具有抗炎、抗氧化、降血压等药理作用^[13]。红甜菜被认为具有神经保护作用, 治疗中枢神经系统相关疾病, 如 AD^[14]。目前关于红甜菜防治 AD 研究较少, 且鲜有学者研究乳酸菌发酵红甜菜汁对 ACE 和 AChE 的抑制作用。

乳酸菌是功能性益生菌的代表, 在发酵代谢过程中会产生乳酸菌素、生物活性肽等活性物质, 上述化合物具有抗氧化、抗炎、抑菌、免疫增强和调节肠道菌群平衡等作用, 可缓解和防治多种疾病^[14]。孙百虎^[15]选用植物乳杆菌发酵桑葚汁, 试验表明经乳酸菌发酵可使总酚、总黄酮含量、DPPH·清除率和 FRAP 显著提高, 且乳酸菌发酵促进了花青素类物质的转化。

Szutowska 等^[16]研究表明乳酸菌发酵果蔬汁能够降低血清胆固醇水平, 改善肠胃功能并增强免疫系统。王惠等^[17]使用乳酸菌发酵树莓汁, 试验发现通过乳酸菌发酵的树莓汁其抑制肿瘤细胞活性能力、促进乳酸酸脱氢酶释放能力、促进细胞凋亡能力均显著提高。Seelam 等^[18]使用球形芽孢杆菌发酵胡萝卜汁, 经乳酸菌发酵后胡萝卜汁的抗氧化活性和感官品质都得到提升。Ming 等^[19]研究表明, 红甜菜中甜菜色素可减少 β -淀粉样蛋白沉积, 延缓 AD 患者病情发展。以上研究均表明以乳酸菌发酵为技术手段可以显著提升植物基质的功能特性, 并对相关产品的感官品质起到一定的改善作用。

本研究以红甜菜为原料, 旨在利用乳酸菌发酵改善红甜菜汁口感风味、丰富其营养价值并提升对 AD 的防治能力。主要研究了嗜酸乳杆菌发酵的红甜菜汁在发酵过程中 pH 值、活菌数、总酸、还原糖、甜菜色素、总酚和黄酮含量及其自由基 (ABTS⁺·、·O₂·、·OH) 清除能力、酶 (AChE 和 ACE) 抑制能力。旨在探究抗氧化、酶抑制能力变化规律及其与生物活性物质的关系, 为探寻食源性 AChE、ACE 抑制剂来源、推进红甜菜精深加工并针对 AD 功能性食品开发提供数据支撑和理论参考。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

红甜菜 (品种为沃丹), 吉林省长春市; 双碳白砂糖, 南京甘汁园糖业有限公司; 嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*, LA-5), 丹麦科汉森公司。福林酚、ABTS, 北京博奥拓达科技有限公司; 没食子酸、芦丁、无水葡萄糖标准品、氯化硝基四氮唑蓝、还原辅酶 I、N-甲基吩嗪甲基硫酸盐、乙酰胆碱酯酶 (苍蝇头部, 0.2 UN)、5,5-二巯基-2,2-二硝基苯甲酸、碘代硫代乙酰胆碱、4-羟乙基哌嗪乙磺酸、N-[3-(2-呋喃基)丙烯酰]-L-苯丙氨酸-甘氨酸-甘氨酸, 上海源叶生物科技有限公司; 血管紧张素转化酶 (兔肺, 0.1 UN)、亚硝酸钠标准品, 西格玛奥德里奇公司; MRS 肉汤、琼脂粉, 北京奥博星生物科技有限公司; 甲酸、乙腈 (色谱纯), 德国 Merck 公司; 其余试剂、药品均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

Triple TOF 5600 Plus 四级杆飞行时间串联质谱检测器联用仪、ExionLC™ AD UHPLC 超高压液相色谱系统(配备 Analyst 1.6 和 Peakview 2.0 分析软件及数据库),美国 AB SCIEX 公司; SW-CJ-2D 无菌操作台,上海尚道仪器制造有限公司; PHS-3E pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司; SPX-50B 生化培养箱,北京市恒诺利兴科技有限公司; 721 可见分光光度计,上海佑科仪器仪表有限公司; TG16G 离心机,常州金坛仪器制造有限公司; EPOCH2 全波长酶标仪,美国伯腾仪器有限公司; 5030-PVL 高压灭菌锅,长春百奥生物仪器有限公司; L18-YZ05 真空保鲜破壁调理机,九阳电器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 嗜酸乳杆菌菌悬液的制备

取适量培养至 24 h 经活化、驯化的培养液,5 000 r/min 离心 10 min,弃上清液并取底部沉淀转移至无菌水中。根据先前已确定的基于稀释涂布平板计数-分光光度法确定活菌数,在 600 nm 下调整其吸光度值为 1.42~1.45,此时活菌数约为 6.00 lg CFU/mL,菌悬液现用现配。

1.3.2 样品制备

选用新鲜红甜菜,洗净、去皮并切块,将红甜菜与无菌水按照料液比为 1:4 使用破壁调理机在低气压(30 kPa)、40 000 r/min 条件下打浆 4.5 min,4 层纱布过滤,自然 pH 值,滤汁 4 °C 条件下备用;白砂糖添加量 7.5wt%,搅匀后将其置于紫外照射 20 min;按 10% (体积比)接种量向 100 mL 红甜菜汁中接入菌悬液并密封,30 °C 恒温发酵 54 h。

1.3.3 红甜菜接种发酵过程评价指标及测定方法

每间隔 6 h 取样,立即测定 pH 值和乳酸菌活菌数;对样品进行 5 000 r/min 离心 15 min 取上清液,经适当稀释后测定还原糖和总酸、总酚、黄酮、甜菜色素含量及抗氧化能力和酶抑制能力。

1.4 评价指标测定方法

1.4.1 理化指标

(1) pH 值测定: pH 计直接测定。

(2) 乳酸菌活菌数测定: 采用稀释涂布平板计数法在 MRS 培养基中培养 48 h 后计数^[20]。

(3) 总酸含量测定: 参照《GB/T 12456-2008 食品中总酸测定》^[21]并结合文献^[22],采用电位滴定法。

(4) 还原糖含量测定: 参照王俊丽等^[23]的方法,

采用 3,5-二硝基水杨酸法。

1.4.2 活性成分

(1) 总酚含量测定: 参照李祎等^[24]的方法,采用 Folin-Ciocalteu 法。

(2) 黄酮含量测定: 参照 Li 等^[25]的方法,采用 NaNO₂-Al(NO₃)₃ 分光光度法。

(3) 甜菜色素含量测定: 参照李焱等^[26]的方法,采用分光光度法。

1.4.3 自由基清除能力

(1) ABTS⁺清除率测定: 参照 Garzón 等^[27]的方法,采用分光光度法。

(2) ·O₂清除率测定: 参照 Li 等^[28]的方法,采用 NADH-PMS-NBT 经典法。

(3) ·OH 清除率测定: 参照冯隽野等^[29]的方法,采用硫代巴比妥酸法。

1.4.4 酶活抑制

(1) ACE 抑制活性测定: 参照郝心悦等^[30]的方法,采用 FAPGG 底物法。

(2) AChE 抑制活性测定: 参照王微^[31]的方法,采用改良的 Ellman 法。

1.4.5 甜菜色素 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 分析条件

1.4.5.1 色谱条件

ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 柱温 40 °C; 进样量 5 μL; 流量 0.4 mL/min; 检测时间 15 min, 流动相 A 为含 0.1% 甲酸的水溶液, 流动相 B 为纯乙腈; 洗脱程序为 0 min~5 min, 5%~95% B; 5 min~11 min, 95% B; 11 min~12 min, 95%~5% B; 12 min~15 min, 5% B。

1.4.5.2 质谱条件

电喷雾离子源(ESI), 采用正离子和负离子模式采集数据, 一级质谱和二级质谱扫描范围分别为 100~1 200 *m/z*、50~1 200 *m/z*; 扫描类型为 TOF; 一级质谱和二级质谱的离子化电压均为 5 500 V; 各气路均使用氮气(喷雾气、辅助加热气和气帘气分别为 50 psi、50 psi 和 35 psi); 锥孔电压均为 90 V; 碰撞能量分别为 10 V 和 35 V (正负离子不同模式下碰撞能量有 +/- 不同); 二级质谱碰撞能量为 15 V。

1.5 数据处理与统计

各试验独立重复 3 次, 数据表示为均值±标准差。采用 OriginPro 9.8.5 软件进行绘图, Excel 2020 软件进行数据处理, SPSS 26.0 软件进行相关性分析(相关类型为 Pearson)、主成分分析、聚类分析(聚类方法为类间平均连接法、距离类型为 Euclidean 平方)和基于单因素方差分析(ANOVA)的统计学差异检验。显著性

差异分析结果在图和表中以各数据点处小写字母表示,字母相同则表示差异不显著 ($p>0.05$),字母不同则表示差异显著 ($p<0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 红甜菜汁发酵过程中乳酸菌活菌数、pH 值、总酸及还原糖含量变化

红甜菜汁发酵过程中乳酸菌活菌数、pH 值、总酸及还原糖含量变化如图 1 所示。

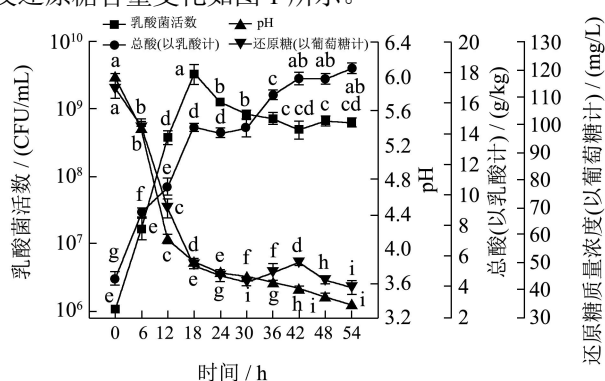


图 1 红甜菜汁发酵过程中活菌数、pH、总酸及还原糖含量变化

Fig.1 Changes of viable bacteria, pH, total acid and reducing sugar content in red beetroot juice during fermentation

注:不同小写字母表示数据间差异显著 ($p<0.05$),相同小写字母表示数据间差异不显著 ($p>0.05$).图 2、3、5、6 同。

由图 1 可知,发酵过程中 pH 值、乳酸菌活菌数、总酸及还原糖含量显著变化 ($p<0.05$)。0 h~18 h 发酵液乳酸菌活菌数及总酸含量均快速上升,分别由 1.03×10^6 CFU/mL (0 h) 升至 3.39×10^9 CFU/mL (18 h)、4.53 g/kg (0 h) 升至 14.37 g/kg (18 h),同时活菌数在 18 h 达到最大值。嗜酸乳杆菌的大量繁殖表明该菌种在发酵时具有较强的生长能力, Yoon 等^[32]对红甜菜作为嗜酸乳杆菌的潜在生长基质进行评估时,发现该菌种可快速利用红甜菜汁进行生长代谢和产生乳酸,在 30 °C 发酵 48 h 后发酵液中活菌数为 6.70×10^8 CFU/mL, pH 值由 6.3 降至 4.5,说明红甜菜可作为该菌种生长的适宜基质。0 h~18 h 发酵液 pH 值及还原糖含量均呈断崖式下降,分别由 5.99(0 h)降至 3.85(18 h)、113.48 mg/L (0 h) 降至 48.98 mg/L (18 h),下降了 55.58% 和 56.84%。这是由于发酵液中嗜酸乳杆菌消耗大量碳源进行生长代谢致使还原糖含量减少^[33],同时伴随着发酵基质中有机酸溶出及菌种产生大量有机酸使 pH 迅速下降^[34]。

18 h~54 h 发酵液中乳酸菌活菌数先缓慢下降后逐渐平稳,由 3.39×10^9 CFU/mL (18 h) 降至 6.29×10^8 CFU/mL

(54 h)。主要原因是发酵过程中菌种产酸量增加使得发酵液 pH 值较低,与嗜酸乳杆菌最适生长 pH 值 5.5~6.5 相差较大,在偏酸性环境下其生长繁殖受到限制导致活菌数有所下降^[35]。随后,该菌种逐渐对环境产生耐受使得发酵后期活菌数略有上升且逐渐平稳。此阶段内总酸含量增加、还原糖含量减少,分别由 14.37 g/kg (18 h) 升至 18.22 g/kg (54 h)、45.34 mg/L (18 h) 降至 41.00 mg/L (54 h),分别增加了 26.79%、减少了 9.57%; pH 值持续降低,由 3.85 (18 h) 降至 3.35 (54 h),降低了 12.99%。与未发酵时相比,活菌数和总酸含量分别增加了 6.27×10^8 CFU/mL 和 302.21%, pH 值和还原糖含量分别降低了 44.07% 和 63.87%。李垚等^[26]在乳酸菌发酵红甜菜的过程中同样观察到相似结果,至发酵结束时 pH 值呈显著下降趋势至 3.94,乳酸菌活菌数呈增加趋势至 1.49×10^7 CFU/mL,总酸含量呈上升趋势至 16.78 g/kg。

2.2 红甜菜汁发酵过程中活性成分含量变化

2.2.1 红甜菜汁发酵过程中总酚和黄酮质量浓度变化

红甜菜汁发酵过程中总酚和黄酮含量变化如图 2 所示。

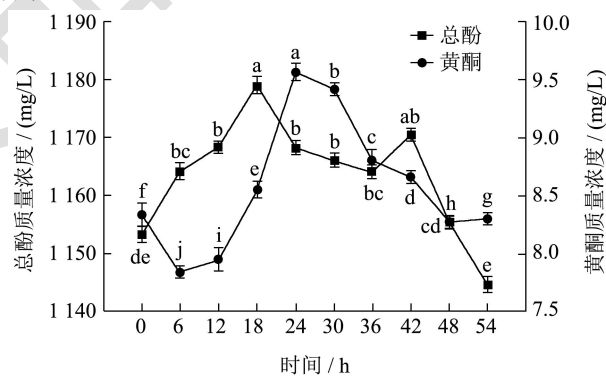


图 2 红甜菜汁发酵过程中总酚和黄酮质量浓度变化

Fig.2 Changes of total phenols and flavonoids in red beetroot juice during fermentation

由图 2 可知,发酵过程中总酚和黄酮质量浓度显著变化 ($p<0.05$),均呈先上升再下降的趋势。0 h~6 h 黄酮质量浓度由 8.34 mg/L (0 h) 降至 7.84 mg/L (6 h),下降了 6.00%。其原因是发酵初期体系中 O_2 含量和多酚氧化酶含量较高使得酚类物质被氧化^[36],致使黄酮类物质部分损失。此外,还与黄酮类物质发生不同程度的水解和聚合作用有关^[37]。6 h~24 h 黄酮质量浓度由 7.84 mg/L (0 h) 升至 9.56 mg/L (24 h),增加了 21.94%。原因是在酸性环境中酸水解反应将黄酮类聚合物转化为单一的黄酮类物质^[38];此外,微生物产生的酶类(如葡萄糖苷酶)可分解植物细胞壁,促进黄酮类物质的释

放或合成^[39],使黄酮质量浓度增加。0 h~18 h 总酚质量浓度由 1 153.29 mg/L (0 h) 升至 1 179.03 mg/L (18 h),增加了 2.23%,这得益于微生物产生的酶类(如酚酸酯酶)利于结合酚水解释放小分子游离酚^[40,41],使总酚质量浓度增加。

18 h~54 h 总酚质量浓度由 1 179.03 mg/L (18 h) 降至 1 144.71 mg/L (54 h),减少了 2.91%。原因是活菌数降低而减少酶类(如酚酸酯酶)的产生而难以将酚类物质转化为代谢产物并释放新的酚类物质^[42],且多酚类物质与蛋白质、多糖等大分子物质结合或吸附,使其质量浓度下降^[43]。24 h~54 h 黄酮质量浓度由 9.56 mg/L (24 h) 降至 8.30 mg/L (54 h),减少了 13.18%,这与引起总酚质量浓度减少的原因相同。

2.2.2 红甜菜汁发酵过程中甜菜色素含量变化

红甜菜汁发酵过程中甜菜红素、甜菜黄素及总甜菜色素含量变化如图 3 所示。

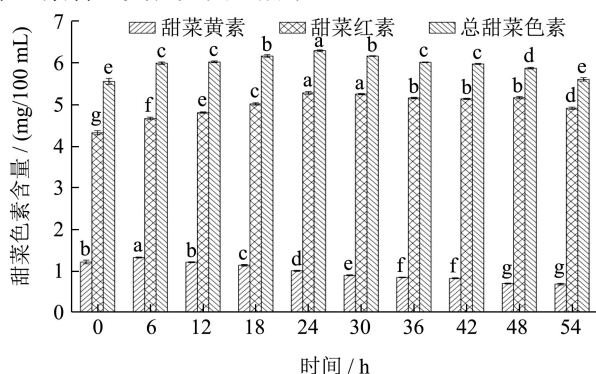


图 3 红甜菜汁发酵过程中甜菜红素、甜菜黄素及总甜菜色素含量变化

Fig.3 Changes of betacyanin, betaxanthin and total betalain content in red beetroot juice during fermentation

注:总甜菜色素含量指甜菜红素含量与甜菜黄素含量之和。

由图 3 可知,发酵过程中色素含量显著变化($p < 0.05$)。0 h~54 h 甜菜黄素含量先下降后趋于稳定,由 1.23 mg/100 mL (0 h) 降至 0.70 mg/100 mL (54 h),下降了 43.09%。0 h~6 h 其含量由 1.23 mg/100 mL (0 h) 升至 1.33 mg/100 mL (6 h),增加了 8.13%。原因是榨汁时红甜菜组织纤维被机械力破坏,与液体接触面积增大利于色素释放;且在低酸环境中甜菜苷发生醛亚胺键断裂生成甜菜醛氨酸,该物质与氨基酸(或胺)进行分子缩合生成甜菜黄素^[44],使甜菜黄素含量增加。6 h~54 h 观察到甜菜黄素含量呈下降趋势,由 1.33 mg/100 mL (6 h) 降至 0.70 mg/100 mL (54 h),减少了 47.37%。其原因是受温度影响,与甜菜红素相比甜菜黄素对温度更敏感,同温度下易降解^[45]。

甜菜红素和总甜菜色素含量在 0 h~54 h 均先上升后下降,分别由 4.33 mg/100 mL (0 h) 升至 4.92 mg/100 mL

(54 h)、5.56 mg/100 mL (0 h) 升至 5.61 mg/100 mL (54 h),增加了 13.63%和 0.90%。0 h~24 h 甜菜红素和总甜菜色素含量整体呈上升趋势,分别由 4.33 mg/100 mL (0 h) 升至 5.29 mg/100 mL (24 h)、5.56 mg/100 mL (0 h) 升至 6.30 mg/100 mL (24 h),增加了 22.17%和 13.30%。因甜菜色素是一种水溶性色素,发酵过程中借助水的浸泡作用使色素溶出;且甜菜苷在酸性环境中会代谢产生不同结构的甜菜红素,使甜菜红素含量上升^[46]。

24 h~54 h 观察到甜菜红素及总甜菜色素含量均为下降趋势,分别由 5.29 mg/100 mL (24 h) 降至 4.92 mg/100 mL (54 h) 和 6.30 mg/100 mL (24 h) 降至 5.61 mg/100 mL (54 h),减少了 7.00%和 10.95%。原因是在 30 °C 的发酵温度下受发酵容器中 O_2 含量和降解酶^[47](如 β -葡萄糖苷酶)的影响,甜菜苷在易发生化学变化位置发生脱糖基化、脱羧、脱氢作用等化学变化^[46]加速代谢使其含量减少。此外,乳酸菌可将红甜菜汁中的 β -葡萄糖苷作为碳源进行生长代谢从而减少甜菜苷含量^[48]。值得注意的是,甜菜红素与总甜菜色素含量变化趋势相似,原因是红甜菜中甜菜红素含量要远多于甜菜黄素含量,使得以甜菜红素发生的化学变化占主导地位。Swaicki 等^[49]在红甜菜发酵过程中也观察到甜菜红素含量与未发酵时相比下降了 30%~50%,其下降原因与上述原因相同。

2.3 基于 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 对发酵液中

甜菜色素组成及相对含量分析

2.3.1 红甜菜汁发酵液中甜菜色素组成定性分析及代谢途径分析

根据质谱数据库和文献^[50-52]对发酵 0 h~54 h 共 10 个样品中的甜菜色素组成进行定性分析,在 $[M+H]^+$ 条件下所有样品共鉴定出 12 种甜菜色素,详见表 1。

如表 1 所示,12 种甜菜色素分别为 2 种甜菜色素前体 (Betamic Acid、Cyclo-DOPA)、6 种甜菜红素 (Betanin、Betanidin、17-Decarboxy-Betanidin、2-Decarboxy-Neobetainin、2-Decarboxy-2,3-Dehydro-Neobetainin、6'-O-Feruloyl-Betanin)、4 种甜菜黄素 (Indicaxanthin、Vulgaxanthin I、Miraxanthin V、Vulgaxanthin IV)。

红甜菜汁所含甜菜色素在发酵过程中受发酵温度、光照、氧气、pH 值、酶等综合因素影响产生以甜菜苷为主的代谢作用^[53,54],具体的代谢途径和颜色变化见图 4。

表 1 甜菜色素组成分析

Table 1 Analysis of constituents of betalain

序号	名称	保留时间/min	分子式	MS	MS/MS
A	betanin	0.70	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₁₃	551.150 9	389.097 3
B	indicaxanthin	0.79	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₆	309.107 9	263.103 9
C	betanidin	0.86	C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₈	389.098 2	343.093 6
D	17-decarboxy-betanidin	0.88	C ₁₇ H ₁₆ N ₂ O ₆	344.097 1	300.100 8
E	2-decarboxy-neobetainin	0.99	C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₁₁	504.145 6	297.103 3
F	betalamic acid	1.06	C ₉ H ₉ NO ₅	212.055 4	166.047 1
G	2-decarboxy-2,3-dehydro-neobetainin	1.43	C ₂₃ H ₂₂ N ₂ O ₁₁	503.130 0	341.078 2
H	vulgaxanthin I	1.53	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₇	339.107 0	321.096 2
I	miraxanthin V	1.58	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₆	347.136 7	303.037 9
J	vulgaxanthin IV	1.58	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₆	325.169 6	209.084 4
K	6'-O-feruloyl-betanin	1.63	C ₃₄ H ₃₄ N ₂ O ₁₆	727.197 5	389.097 1
L	cyclo-DOPA	1.90	C ₉ H ₉ NO ₄	195.064 8	149.061 7

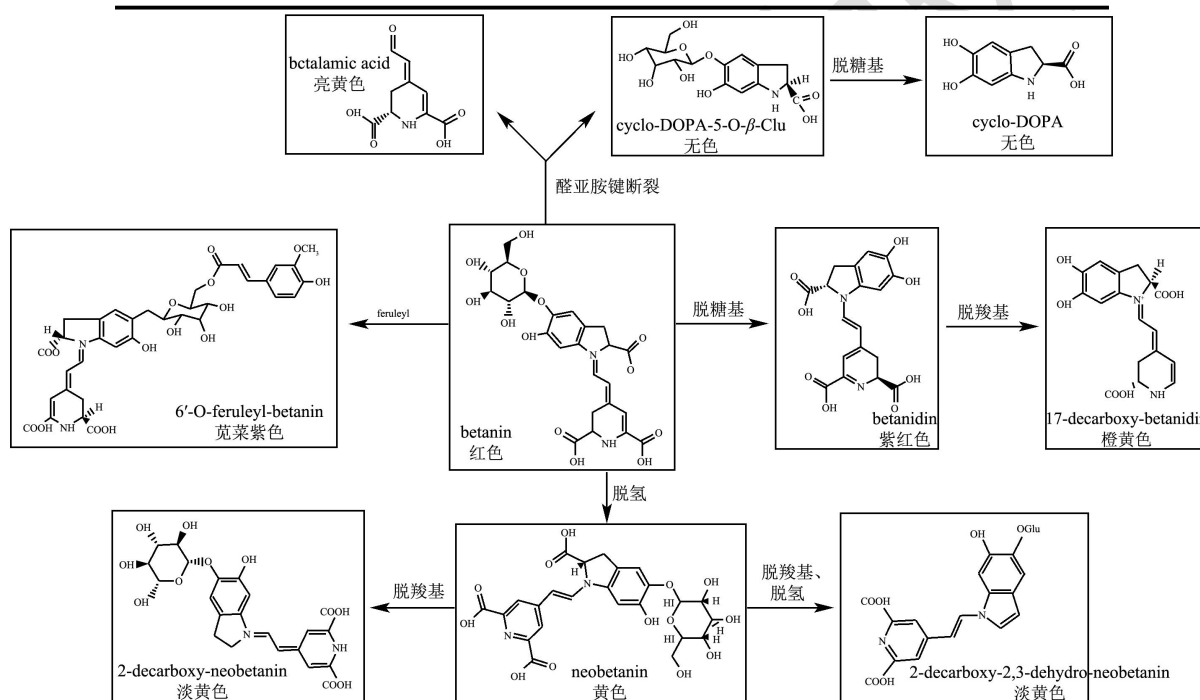


图 4 甜菜苷的代谢途径及其代谢产物颜色变化

Fig.4 Metabolic pathway of beet glycoside and color change of its metabolites

由图 4 可知甜菜苷 (Betanin) 的代谢途径及其产物, 鉴定出的 12 种甜菜色素有 7 种是由甜菜苷 (Betanin) 在代谢过程中产生, 分别为 Betanidin、17-Decarboxy-Betanidin、2-Decarboxy-Neobetainin、2-Decarboxy-2,3-Dehydro-Neobetainin、6'-O-Feruloyl-Betanin 和 Betalamic Acid、Cyclo-DOPA。

2.3.2 红甜菜汁发酵液中甜菜色素组成相对定量分析

根据甜菜色素各成分质谱峰进行峰面积积分并进行积分校正, 计算甜菜色素各成分其相对含量, 详见表 2。

由表 2 可知, 与未发酵时相比, 在发酵第 6 小时

和 24 小时共生成 3 种新的甜菜红素, 分别为 17-Decarboxy-Betanidin (6 h)、2-Decarboxy-Neobetainin (6 h) 和 6'-O-Feruloyl-Betanin (24 h)。发酵过程中 12 种甜菜色素成分按照上调和下调被分为 2 类。第 1 类中共有 7 种甜菜色素成分上调, 即相对含量增加, 分别为 5 种甜菜红素 (Betanin、Betanidin、17-Decarboxy-Betanidin、2-Decarboxy-Neobetainin、6'-O-Feruloyl-Betanin)、甜菜黄素 (Vulgaxanthin I) 和甜菜色素前体物质 (Betalamic Acid), 增加的甜菜色素成分占 12 种甜菜色素成分的 58.33%; 第 2 类中共有 5 种成分下调, 即相对含量降低, 分别为甜菜红素

(2-Decarboxy-2,3-Dehydro-Neobetanin)、3种甜菜黄素 (Indicaxanthin、Miraxanthin V、Vulgaxanthin IV) 和甜菜色素前体物质 (Cyclo-DOPA), 降低的甜菜色

素成分占 12 种甜菜色素成分的 41.67%。由此可见, 在发酵过程中甜菜色素各成分相对含量变化以甜菜红素上调为主。

表 2 发酵过程中甜菜色素各成分相对含量

Table 2 Relative content of betalain components in fermentation process

时间/h	甜菜色素各组分相对含量/%											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
0	8.30	11.73	7.72	0.00	0.00	5.92	30.32	4.63	10.82	20.21	0.00	17.96
6	8.60	13.12	10.08	7.51	0.00	13.88	14.59	9.33	10.25	16.16	7.17	8.98
12	9.26	11.82	9.83	11.01	0.00	12.15	7.15	9.70	9.45	13.84	9.26	8.64
18	9.51	10.22	10.70	12.41	0.00	8.96	6.59	10.22	10.07	11.12	11.93	8.30
24	9.68	10.33	10.38	11.39	18.89	7.81	9.56	11.15	10.29	9.25	12.17	8.29
30	11.34	10.15	9.64	11.93	20.76	8.29	6.57	10.77	8.98	6.68	11.93	7.53
36	11.28	9.22	10.45	11.30	16.80	9.29	5.95	11.61	10.40	6.86	12.36	8.39
42	11.24	8.45	10.28	10.54	17.69	9.89	7.93	11.96	10.25	6.39	12.14	6.97
48	10.93	7.70	10.36	11.94	13.89	9.80	4.96	11.35	10.09	5.05	11.29	11.85
54	9.87	7.26	10.55	11.96	11.98	14.01	6.40	9.27	9.41	4.43	11.74	13.09

注: 字母 A~L 代表甜菜色素各组分, 详见表 1。

2.4 红甜菜汁发酵过程中抗氧化能力变化

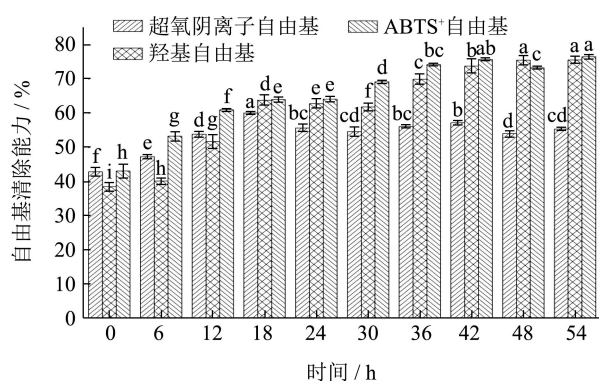


图 5 红甜菜汁发酵液自由基清除能力

Fig.5 Free radical scavenging ability of red beetroot juice fermentation broth

红甜菜汁发酵液抗氧化能力如图 5 所示。由图 5 可知, 发酵的红甜菜汁与未发酵样品相比, 抗氧化能力显著提升 ($p < 0.05$), 随着发酵进行抗氧化能力整体呈上升趋势。 $\cdot O_2^-$ 清除率在发酵过程中显著上升 ($p < 0.05$), 由 42.90% (0 h) 增至 55.40% (54 h), 增加了 29.13%; 在 18 h 达到了最高点 60.10%, 与 0 h 相比增加了 40.09%。 $\cdot OH$ 清除率在发酵过程中显著提升 ($p < 0.05$), 由 38.50% (0 h) 增至 75.60% (54 h), 增加了 96.36%, 且在 54 h 达到了清除率最高点。ABTS⁺清除率在发酵过程中显著提升 ($p < 0.05$), 由 43.10% (0 h) 增至 76.50% (54 h), 增加了 77.49%, 且在 54 h 达到了清除率最高点。相似的是, Sawicki 等^[44]在发酵红甜菜 48 h 时发现 ABTS⁺清除率和 DPPH·清除率与发酵初期相比分别提

升 0.16 和 0.15 $\mu\text{mol Trolox/mL}$; Değirmencioğlu 等^[55]对比了红甜菜鲜汁与红甜菜汁乳酸菌发酵液的抗氧化能力后得出同样结论, 经发酵的红甜菜汁 ABTS⁺清除率相比红甜菜鲜汁显著 ($p < 0.05$) 提升 9.00%, 具有更强的自由基清除能力。以上分析均表明经发酵的红甜菜汁具有较高的抗氧化能力并明显高于未发酵样品, 且以发酵为技术手段可显著提升并维持红甜菜的抗氧化能力。

2.5 红甜菜汁发酵过程中酶抑制能力变化

红甜菜汁发酵液对 ACE 和 AChE 抑制能力如图 6 所示。如图 6 可知, 与未发酵样品相比, 发酵液酶抑制能力显著提升 ($p < 0.05$)。随着发酵的进行酶抑制能力呈先上升后逐渐下降、最后趋于稳定的趋势。AChE 抑制率在发酵过程中显著增加 ($p < 0.05$), 由 38.60% (0 h) 增至 61.43% (54 h), 增加了 59.15%; 在 24 h 达到了抑制率最高点 77.18%, 与 0 h 相比增加了 99.95%。ACE 抑制率在发酵过程中显著提升 ($p < 0.05$), 由 46.03% (0 h) 增加至 62.31% (54 h) 增加了 35.37%; 在 24 h 达到了清除率最高点 70.38%, 与 0 h 相比增加了 52.90%。虽然 24~54 h 酶抑制能力有所下降, 但仍高于未发酵样品。Sawicki 等^[56]经试验发现以发酵红甜菜汁为主的处理方式其 ACE 抑制率显著优于未发酵、真空切片和煮沸等加工方式, 经发酵后其 ACE 抑制率显著 ($p < 0.05$) 增加了 31.00%。以上分析表明, 红甜菜汁发酵液不仅具有较强的 AChE 抑制能力, 还是一种具有中枢作用的 ACE 抑制剂, 即可通过增强 AChE 和 ACE 抑制能力延缓 AD 所引起的神经退行性变^[57,58]。

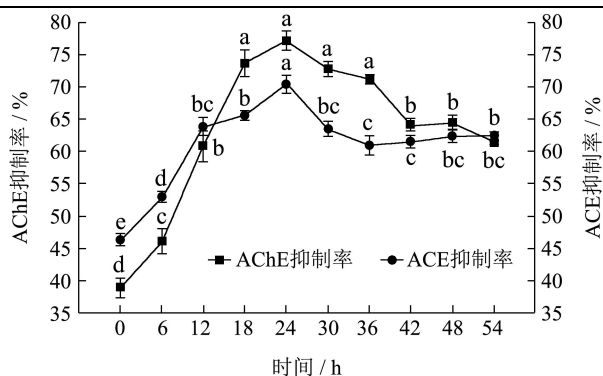


图6 红甜菜汁发酵液血管紧张素转化酶和乙酰胆碱酯酶抑制能力

Fig.6 Inhibition of angiotensin converting enzyme and acetylcholinesterase in red beetroot juice fermentation broth

2.6 活性物质与抗氧化能力、酶抑制能力相关性分析

2.6.1 甜菜色素、总酚、黄酮与抗氧化能力、酶抑制能力相关性分析

为探究发酵液抗氧化能力、酶抑制能力与活性物质含量的关系，将上述功能指标与甜菜红素、甜菜黄

表3 甜菜黄素、甜菜红素和总酚、黄酮含量与抗氧化能力、酶抑制能力相关性

Table 3 Correlation between the contents of betaxanthins, betacyanins, total phenols, flavonoids and antioxidant capacity and enzyme inhibition capacity

项目	·O ₂ 清除率	·OH清除率	ABTS ⁺ 清除率	AChE抑制率	ACE抑制率
甜菜黄素	-0.507	-0.914**	-0.871**	-0.546	-0.415
甜菜红素	0.815**	0.779**	0.807**	0.851**	0.850**
总酚	0.478	-0.057	-0.014	0.244	0.417
黄酮	0.385	0.334	0.295	0.450	0.517

注：*表示在 0.05 的水平下显著相关，**表示在 0.01 的水平下极显著相关。

表4 甜菜色素各成分相对含量与抗氧化能力、酶抑制能力相关性分析

Table 4 Correlation analysis of betalain with antioxidant capacity and enzyme inhibition capacity

甜菜色素	·O ₂ 清除率	·OH清除率	ABTS ⁺ 清除率	AChE抑制率	ACE抑制率
betanin	0.628	0.799**	0.854**	0.662*	0.492
indicaxanthin	-0.576	-0.941**	-0.850**	-0.470	-0.427
betanidin	0.827**	0.696*	0.758*	0.701*	0.756*
17-decarboxy-betanidin	0.902**	0.756*	0.831**	0.855**	0.893**
2-decarboxy-neobetanin	0.451	0.693*	0.717*	0.631	0.506
betalamic acid	0.101	0.095	0.267	-0.149	0.068
2-decarboxy-2,3-dehydro-neobetanin	-0.874**	-0.770**	-0.863**	-0.801**	-0.831**
vulgaxanthin I	0.806**	0.724*	0.814**	0.797**	0.773**
miraxanthin V	-0.385	-0.278	-0.425	-0.384	-0.466
vulgaxanthin IV	-0.751*	-0.957**	-0.976**	-0.722*	-0.676*
6'-O-feruloyl-betanin	0.922**	0.820**	0.887**	0.890**	0.878**
cyclo-DOPA	-0.690*	-0.326	-0.488	-0.685*	-0.668*

注：*表示在 0.05 的水平下显著相关，**表示在 0.01 的水平下极显著相关。

素和总酚、黄酮含量进行 Pearson 相关性分析，分析结果见表 3。

由表 3 可知，甜菜红素和甜菜黄素含量分别与上述功能指标呈极显著正相关 ($p < 0.01$) 和不同程度的负相关。虽然总酚、黄酮含量与上述功能指标均呈极低负相关或呈正相关 ($p > 0.05$)，但酚类物质同样具有抗氧化能力^[59]，这表明上述功能应是由所有物质共同发挥作用。上述抗氧化能力与甜菜红素呈极显著正相关 ($p < 0.01$)，与另外 3 种活性物质呈负相关或正相关不显著，说明甜菜红素是主要的抗氧化活性成分。同样的，肖默艳等^[60]研究了红心火龙果果肉中甜红色素、总酚、黄酮类物质与其抗氧化能力的相关性，经试验发现甜菜红素在总抗氧化、清除 DPPH·、NO₂·、ABTS⁺和·OH 自由基能力时发挥了主要作用，与上述自由基清除能力呈极显著正相关 ($r = 0.936 \sim 0.955$)。其原因是甜菜红素主要以糖苷形式存在，经诱导之后能产生泛醌还原酶，其酚基和环胺基均为电子供体，可参与生物体的氧化还原反应和自由基的清除过程^[61]。

2.6.2 甜菜色素各成分与抗氧化能力、酶抑制能力相关性分析

为深入探究甜菜色素与抗氧化能力、酶抑制能力的关系,对发酵液中甜菜色素各成分相对含量与功能指标进行相关性分析,分析结果见表4。

由表4可知,抗氧化能力和酶抑制能力与甜菜红素(Betanin、Betanidin、17-Decarboxy-Betanidin、2-Decarboxy-Neobetanin、6'-O-Feruloyl-Betanin)、甜菜黄素(Vulgaxanthin I)和甜菜色素前体物质(Betalamic Acid)均呈现不同程度的正向相关性。其中,甜菜红素是以Betanin和Betanidin为清除自由基的主要基团,其功能性基团同时作为电子供体和电子受体,是氧化还原的中间体^[62]。相似的是,肖默艳等^[60]在研究红心火龙果果肉中甜红色素与其抗氧化能力关系的试验中,经液质鉴定出果肉中甜菜红素组分有Betanin、Isobetanin、Phyllocactin和Isophyllocactin,其中Betanin是清除自由基的主要成分。此外,Sawicki等^[56]研究了

红甜菜汁发酵液中甜菜色素与ACE抑制能力的关系,经液质分析鉴定后发现Betanin、Betanidin、6'-O-Feruloyl-Betanin、2-Decarboxy-Neobetanin是提升ACE抑制能力的主要物质,与本试验分析结果相同。

2.7 甜菜色素各成分与抗氧化能力、酶抑制能力的主成分分析

为消除指标间的信息重叠和多重共线性,并对相关性分析结果进行补充和解释,将甜菜色素12个成分、3种抗氧化能力和2种酶抑制能力共17个指标经数值标准化后进行主成分分析,选取特征值>1且各主成分总方差总贡献率≥85%^[63]的原则选择主成分,分析结果如表5和图7所示。

表5 主成分的特征值、贡献率和累计贡献率

Table 5 The eigenvalue, contribution rate and the cumulative contribution rate of principal components

序号	指标	主要主成分的特征向量		
		PC1	PC2	PC3
A	betanin	0.781	0.508	0.041
B	indicaxanthin	-0.698	-0.414	0.560
C	betanidin	0.871	-0.338	0.037
D	17-decarboxy-betanidin	0.960	-0.228	0.082
E	2-decarboxy-neobetanin	0.664	0.620	0.068
F	betalamic acid	0.249	-0.747	-0.409
G	2-decarboxy-2,3-dehydro-neobetanin	-0.959	0.218	-0.034
H	vulgaxanthin I	0.914	0.003	0.287
I	miraxanthin V	-0.477	0.693	0.443
J	vulgaxanthin IV	-0.924	-0.260	0.247
K	6'-O-feruloyl-betanin	0.985	-0.061	0.126
L	cyclo-DOPA	-0.676	0.242	-0.626
M	·O ₂ 清除率	0.910	-0.075	0.139
N	·OH清除率	0.890	0.285	-0.310
O	ABTS ⁺ 清除率	0.940	0.165	-0.246
P	ACE抑制率	0.891	-0.107	0.080
Q	AChE抑制率	0.860	-0.143	0.246
	特征值	11.579	2.341	1.487
	方差贡献率/%	68.11	13.77	8.75
	累计方差贡献率/%	68.11	81.88	90.63

由图7a可知,前3个主成分的特征值大于1,由表5可知前3个主成分(分别用PC1、PC2、PC3表示)的方差贡献率累积达到90.63%,可保留90.63%的原始信息。由表5和图7b可知,第一主成分方差贡献率为68.11%,主要包含3种抗氧化能力、2种酶抑制能力和甜菜色素(Betanin、Betanidin、17-Decarboxy-Betanidin、

2-Decarboxy-Neobetanin、Betalamic Acid、Vulgaxanthin I、6'-O-Feruloyl-Betanin)且12个指标且呈正相关;第二主成分的方差贡献率为13.77%,主要包含·OH清除率、ABTS⁺清除率和甜菜色素(Betanin、2-Decarboxy-Neobetanin)且4个指标且呈正相关,还包含·O₂清除率、2种酶抑制能力和甜菜色素

(Miraxanthin V、cyclo-DOPA)且呈负相关;第三主成分的方差贡献率为8.75%,主要包含·O₂清除率、2种酶抑制能力和甜菜色素Vulgaxanthin I且呈正相关,还包含·OH清除率、ABTS⁺清除率和甜菜色素(Indicaxanthin、Miraxanthin V、Vulgaxanthin IV)且5个指标且呈负相关。由主成分分析可知,主要的活性物质为Betanin、Betanidin、17-Decarboxy-Betanidin、2-Decarboxy-Neobetainin、Betalamic Acid、Vulgaxanthin I、6'-O-Feruloyl-Betanin,且主成分分析结果与相关性分析结果基本一致。

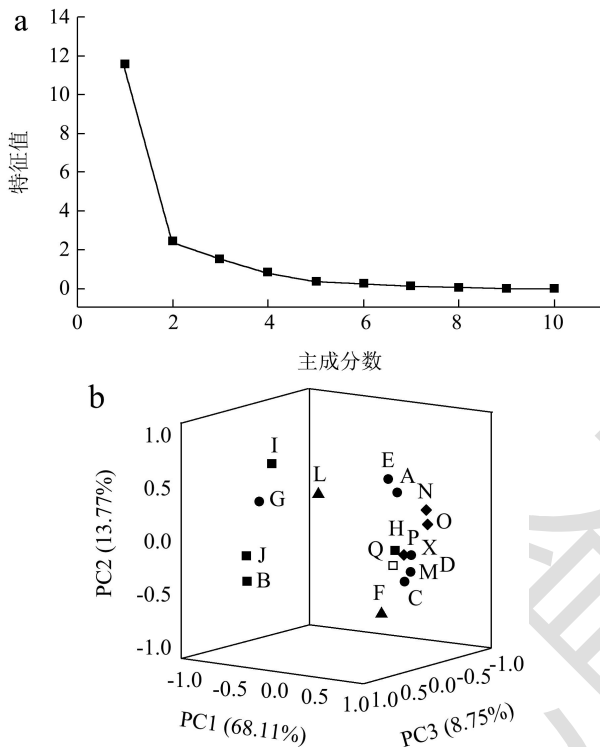


图7 碎石图(a)和主成分分析图(b)

Fig.7 Scree plot (a) and Principal component analysis diagram (b)

注:主成分分析图中字母A~L与表1中字母所代表指标相一致,字母M~Q依次代表·O₂清除率、·OH清除率、ABTS⁺清除率、ACE抑制率、AChE抑制率。

2.8 甜菜色素各成分与抗氧化能力、酶抑制能力的聚类分析

红甜菜汁发酵过程中其抗氧化和酶抑制能力呈动态变化,为掌握发酵过程中功能性指标变化、补充相关性分析和主成分分析结果,遂进行聚类分析。数据经标准化后采用聚类方法为类间平均连接法、距离类型为Euclidean平方,对10个发酵时间节点样品的聚类采用Q型聚类、对17个指标的聚类采用R型聚类,结果如图8所示。

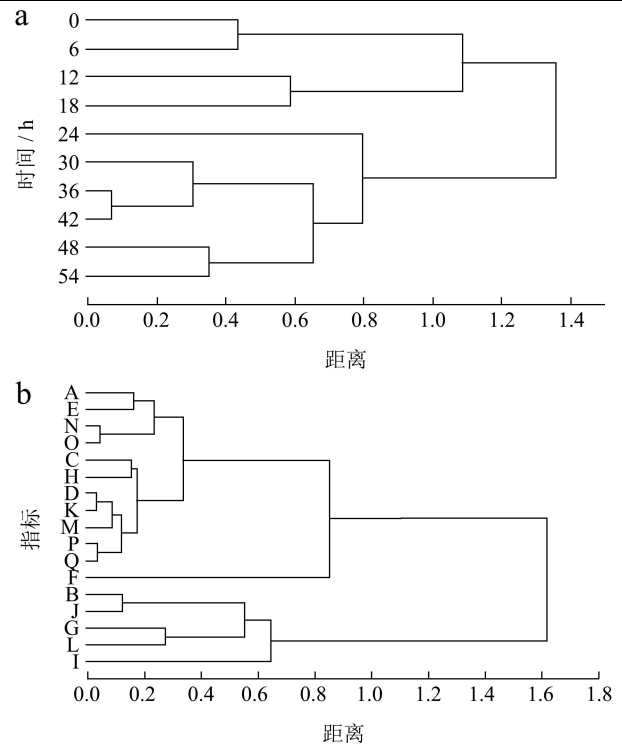


图8 不同发酵时间节点的Q型聚类分析(a)和各指标间的R型聚类分析(b)谱系图

Fig.8 Q-type cluster analysis (a) of different fermentation time and R-type cluster analysis among indicators (b) pedigree

注:各指标间的聚类分析谱系图b中各字母与表5字母所代表指标相一致。

由图8a所示Q型聚类分析可知,10个发酵时间节点可聚为3类,代表发酵过程中抗氧化能力和酶抑制能力的变化趋势。第1类聚集了0h~18h4个时间点,聚集了发酵过程初期(缓慢增长期)。与未发酵时相比,此时发酵液抗氧化能力和酶抑制能力得到提升。从发酵全过程来看,此阶段内发酵液抗氧化能力和酶抑制能力相对较低,处于缓慢上升阶段。第2类聚集了24h~42h4个时间点,聚集了发酵过程中期(显著变化期),与未发酵时相比和发酵全过程来看,此阶段内发酵液抗氧化能力处于上升期,而酶抑制能力处于先上升后下降的动态变化趋势。第3类聚集了48h~54h2个时间点,聚集了发酵过程末期(平缓期)。与未发酵时相比和发酵全过程来看,此阶段内发酵液抗氧化能力处于整体处于上升期,而酶抑制能力处于先下降后稳定的平缓趋势。经Q型聚类分析可知,各阶段内发酵液抗氧化能力和酶抑制能力均有不同程度的提升。

由图8b所示R型聚类分析可知,17个指标可聚为3类,代表发酵过程中甜菜色素各成分与抗氧化能力、酶抑制能力的相关程度。第1类聚集了甜菜色素(Betain、2-Decarboxy-Neobetainin)和·OH清除率、ABTS⁺清除率,且呈正相关。第2类聚集了甜菜色素

(Betanidin、17-Decarboxy-Betanidin、Vulgaxanthin I、6'-O-Feruloyl-Betanin、Betalamic Acid) 和 $\cdot\text{O}_2^-$ 清除率、2种酶抑制能力,且呈正相关。第3类聚集了剩余部分的甜菜色素成分,且与抗氧化能力和酶抑制能力呈负相关。经R型聚类分析可知,在聚为3类的情况下,分析结果与相关性分析和主成分分析结果一致。

3 结论

本研究选用的嗜酸乳杆菌 LA-5 在发酵末期活菌数在 10^8 CFU/mL 并保持稳定,这有利于发挥其健康益处。发酵过程中 pH 值和还原糖含量均显著降低 ($p < 0.05$),活菌数、甜菜红素含量均显著增加 ($p < 0.05$),甜菜黄素和黄酮含量显著下降 ($p < 0.05$),总甜菜色素和总酚含量无显著差异 ($p > 0.05$)。各时间段发酵液中共鉴定出 12 种甜菜色素,包括 6 种甜菜红素、4 种甜菜黄素和 2 种甜菜色素前体;其中有 3 种甜菜红素是在发酵过程中新产生的,这表明益生菌发酵使甜菜色素成分更多样。发酵后自由基 ($\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 ABTS^+) 清除能力和酶 (AChE、ACE) 抑制能力显著提升 ($p < 0.05$),说明以发酵为技术手段发酵红甜菜可减少氧化应激和增强上述酶抑制能力从而对 AD 病情起到缓解作用。

相关性分析表明,自由基 ($\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 ABTS^+) 清除能力和酶 (AChE、ACE) 抑制能力的增强是由甜菜色素、总酚和黄酮共同作用的结果,且上述指标与 5 种甜菜红素 (Betanin、Betanidin、17-Decarboxy-Betanidin、2-Decarboxy-Neobetanin、6'-O-Feruloyl-Betanin)、甜菜黄素 (Vulgaxanthin I) 和甜菜色素前体物质 (Betalamic Acid) 含量呈正相关,说明甜菜红素是主要的功能性成分。主成分分析表明,活性成分和功能指标可转化为 3 个主成分,可保留全部信息的 90.63%。Q 型聚类分析表明可将发酵过程聚为 3 类,分别为缓慢增长期、显著变化期和平缓期;R 型聚类分析表明活性成分和功能指标可聚为 3 类,各个分类所涵盖信息与相关性分析结果一致。

实验表明经嗜酸乳杆菌 LA-5 发酵的红甜菜汁是一种优质的自由基 ($\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 ABTS^+) 清除剂和酶 (AChE、ACE) 抑制剂,对 AD 具有一定的防治作用,具有一定的开发空间和研究价值。未来的研究内容包括乳酸菌发酵红甜菜汁饮品制备和小胶质细胞试验,此系列研究旨在为乳酸菌发酵红甜菜及防治 AD 提供数据支撑和理论依据。

参考文献

[1] 马少博,李铃,刘志刚,等.膳食补充芝麻素对 APP/PS1 转基因小鼠认知障碍的改善作用及机制[J].中国食品学报,2020,20

(6):1-10

- [2] Salloway S, Farlow M, Mcdade E, et al. A trial of gantenerumab or solanezumab in dominantly inherited Alzheimer's disease [J]. Nature Medicine, 2021, 27(7): 1187-1196
- [3] 王威丽,宋沧桑.阿尔兹海默病发病机制的研究进展及临床应用[J].中国药物评价,2019,36(3):204-209
- [4] 张涛,陈艳红,常高萍,等.基于乙酰胆碱酯酶和氧化应激研究海胆酮对阿尔兹海默症的作用机制[J].食品科学: 2022, 43(11):105-112
- [5] Wu M, Li M, Yuan J, et al. Postmenopausal hormone therapy and Alzheimer's disease, dementia, and Parkinson's disease: A systematic review and time-response meta-analysis [J]. Pharmacological Research, 2020, 155: 1-25
- [6] Volpato D, Holzgrave U. Designing hybrids targeting the cholinergic system by modulating the muscarinic and nicotinic receptors: a concept to treat Alzheimer's disease [J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2018, 23(12): 3230
- [7] Quitterer U, Abdalla S. Improvements of symptoms of Alzheimer's disease by inhibition of the angiotensin system [J]. Pharmacological Research, 2020, 154: 1-24
- [8] Rouch L, Cestac P, Hanon O, et al. Antihypertensive drugs, prevention of cognitive decline and dementia: a systematic review of observational studies, randomized controlled trials and meta-analyses, with discussion of potential mechanisms [J]. Cns Drugs, 2015, 29(2): 113-130
- [9] Uddin M S, Mamun A A, Kabir M T, et al. Multi-target drug candidates for multifactorial Alzheimer's disease: AChE and NMDAR as molecular targets [J]. Molecular Neurobiology, 2020, 58: 1-23
- [10] Aluko R. Food-derived acetylcholinesterase inhibitors as potential agents against Alzheimer's disease [J]. eFood, 2021, 2(2): 49-58
- [11] Babarykin D, Smirnova G, Pundinsh I, et al. Red beet (*Beta vulgaris*) impact on human health [J]. Journal of Biosciences and Medicines, 2019, 7(3): 61-79
- [12] Rocchetti G, Tomas M, Zhang L, et al. Red beet (*Beta vulgaris*) and amaranth (*Amaranthus* sp.) microgreens: Effect of storage and in vitro gastrointestinal digestion on the untargeted metabolomic profile [J]. Food Chemistry, 2020, 332: 1-31
- [13] Chirila A C, Barbu V, Mocanu G, et al. Tailoring the functional potential of red beet purees by inoculation with lactic acid bacteria and drying [J]. Foods, 2020, 9(11): 1-16
- [14] Ren C, Faas M M, de Vos P. Disease managing capacities and mechanisms of host effects of lactic acid bacteria [J]. Critical

- Reviews in Food Science and Nutrition, 2020, 61(8): 1365-1393
- [15] 孙百虎.不同乳酸菌对发酵桑葚汁酚类物质含量及抗氧化能力的影响[J].中国酿造,2022,41(1):92-97
- [16] Szutowaska J. Functional properties of lactic acid bacteria in fermented fruit and vegetable juices: a systematic literature review [J]. European Food Research & Technology, 2020, 246(3): 357-372
- [17] 王惠.乳酸菌发酵树莓汁工艺及其抗氧化、抗肿瘤活性研究[D].石家庄:河北科技大学,2020
- [18] Seelam D N S, Akula H, Katike U, et al. Production, characterization and optimization of fermented tomato and carrot juices by using *Lysinibacillus sphaericus* isolate [J]. Journal of Applied Biology & Biotechnology, 2017, 5(4): 66-75
- [19] Ming L. Beetroot compound could help slow progression of Alzheimer's disease [C]// 255th National Meeting & Exposition of the American Chemical Society. New Orleans, Los Angeles: ACS, 2018: 13-15
- [20] Pardali E, Paramithiotis S, Papadelli M, et al. Lactic acid bacteria population dynamics during spontaneous fermentation of radish (*Raphanus sativus* L.) roots in brine [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2017, 33(6): 1-9
- [21] GBT12456-2021, 食品安全国家标准 食品中总酸的测定[S]
- [22] Chandra D, Choi A J, Kim Y P, et al. Physicochemical, microbial and sensory quality of fresh-cut red beetroots in relation to sanitation method and storage duration [J]. Italian Journal of Food Science, 2015, 27(2): 208-220
- [23] 王俊丽,聂国兴,李素贞,等.DNS法测定还原糖含量时最适波长的确定[J].河南农业科学,2010,4:115-118
- [24] 李祎,王萍.龙葵果自然发酵过程中活性物质含量及体外抗氧化能力研究[J].食品工业科技,2017,38(6):207-212
- [25] Li X, Chen D, Mai Y, et al. Concordance between antioxidant activities in vitro and chemical components of *Radix Astragali* (Huangqi) [J]. Natural Product Research, 2012, 26(11): 1050-1053
- [26] 李垚,郭瑞,闫明哲,等.自然发酵分离乳酸菌发酵红甜菜过程中品质及抗氧化能力变化[J].现代食品科技,2021,37(1):207-215
- [27] Garzón G A, Wrolstad R E. Major anthocyanins and antioxidant activity of Nasturtium flowers (*Tropaeolum majus*) [J]. Food Chemistry, 2009, 114(1): 44-49
- [28] Li X, Zhou A, Han Y. Anti-oxidation and anti-microorganism activities of purification polysaccharide from *Lygodium japonicum in vitro* [J]. Carbohydrate Polymers, 2006, 66(1): 34-42
- [29] 冯隽野,李佳启,王萍.野生蓝靛果发酵过程中品质变化及挥发性物质分析[J].现代食品科技,2018,34(11):111-118
- [30] 郝欣悦,李晓东,刘璐,等.瑞士乳杆菌对契达干酪成熟期间所产 ACE 抑制肽的影响及其消化稳定性[J/O].食品科学: 2021,42(18):143-149
- [31] 王微.香水莲花提取物改善阿尔兹海默症学习记忆能力的作用研究[D].杭州:浙江大学,2019
- [32] Yoon K Y, Woodams E E, Hang Y D. Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria [J]. Food Science & Technology, 2005, 38(1): 73-75
- [33] 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, 250: 148-154
- [34] Jayabalan R, Subathradevi P, Marimuthu S, et al. Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation [J]. Food Chemistry, 2008, 109(1): 227-234
- [35] Kaprasob R, Kerdehoechuen O, laohakunjit N, et al. Fermentation-based biotransformation of bioactive phenolics and volatile compounds from cashew apple juice by select lactic acid bacteria [J]. Process Biochemistry, 2017, 59: 141-149
- [36] Escudero-lópez B, Cerrillo I, Herrero-martín G, et al. Fermented orange juice: source of higher carotenoid and flavanone contents [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(37): 8773-8782
- [37] 冉玉兵,刘磊,张名位,等.乳酸菌发酵对龙眼果浆中糖和酚类物质的影响[J].现代食品科技,2017,33(8):116-122
- [38] Chu S, Chen C. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha [J]. Food Chemistry, 2006, 98(3): 502-507
- [39] 李俶,戴涛涛,程超,等.发酵对南酸枣饮料抗氧化性的影响[J].食品工业科技,2016,37(5):54-59
- [40] Ghosh K, Ray M, Adak A, et al. Role of probiotic *Lactobacillus fermentum* KKL1 in the preparation of a rice based fermented beverage [J]. Bioresource Technology, 2015, 188: 161-168
- [41] 赖婷,刘汉伟,张名位,等.乳酸菌发酵对果蔬中主要活性物质及其生理功能的影响研究进展[J].中国酿造,2015,34(3):1-4
- [42] Filannino P, Bai Y, Di C 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
- [43] Maryam M, Seyed M B H. Fermentation of barberry juice to

- produce probiotic beverage [J]. *Current Nutrition & Food Science*, 2017, 13(3): 1-8
- [44] Carrillo López A, Yahia E M. *Betalains: Chemistry and Biological Functions* [M]. Yahia E M. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2017
- [45] Herbach K M, Stintzing F C, Carle R. Impact of thermal treatment on color and pigment pattern of red beet (*Beta vulgaris* L.) preparations [J]. *Journal of Food Science*, 2006, 69(6): 491-498
- [46] Khan M I. Stabilization of betalains: A review [J]. *Food Chemistry*, 2016, 197: 1280-1285
- [47] 王萍, 闫明哲. 红甜菜色素稳定性影响因素研究进展[J]. *食品与生物技术学报*, 2021, 40(7): 19-29
- [48] Ліманська Н В, Коротаєва Н В, Ямборко Г В, et al. Effect of *Lactobacillus plantarum* on tumor formation caused by *Rhizobium radiobacter* [J]. *Mikrobiologîa i Biotehnologîa*, 2014, 1(25): 8-18
- [49] Sawicki T, Wiczkowski W. The effects of boiling and fermentation on betalain profiles and antioxidant capacities of red beetroot products [J]. *Food Chemistry*, 2018, 259: 292-303
- [50] Sawicki T, Bczek N, Wiczkowski W. Betalain profile, content and antioxidant capacity of red beetroot dependent on the genotype and root part [J]. *Journal of Functional Foods*, 2016, 27: 249-261
- [51] Mikoajczyk-Bator K, Pawlak S. The effect of thermal treatment on antioxidant capacity and pigment contents in separated betalain fractions [J]. *Journal of Geophysical Research Atmospheres*, 2002, 107(3): 5-9
- [52] Wybraniec S, Starzak K, Szneler E, et al. Separation of chlorinated diastereomers of decarboxy-betacyanins in myeloperoxidase catalyzed chlorinated *Beta vulgaris* L. extract [J]. *Journal of Chromatography B*, 2016, 1036-1037: 20-32
- [53] Azeredo H M C. Betalains: properties, sources, applications, and stability - a review [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2009, 44(12): 2365-2376
- [54] Ravichandran K, Saw N M M T, Mohdaly A A A, et al. Impact of processing of red beet on betalain content and antioxidant activity [J]. *Food Research International*, 2013, 50(2): 670-675
- [55] Değirmencioglu N, Gurbuz O, Şahan Y. The monitoring, via an *in vitro* digestion system, of the bioactive content of vegetable juice fermented with *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii* [J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2016, 40(4): 798-811
- [56] Sawicki T, Martinez-villaluenga C, Frias J, et al. The effect of processing and *in vitro* digestion on the betalain profile and ACE inhibition activity of red beetroot products [J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 55: 229-237
- [57] Quitterer U, Abdalla S. Improvements of symptoms of Alzheimer's disease by inhibition of the angiotensin system [J]. *Pharmacological Research*, 2020, 154: 1-24
- [58] Kunkle B W, Grenier-bolely B, Sims R, et al. Author correction: Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates A[beta], tau, immunity and lipid processing [J]. *Nature Genetics*, 2019, 51(9): 1-2
- [59] 黄豪, 周义, 陈佳慧, 等. 乳酸菌发酵对山楂汁理化性质、酚类化合物、抗氧化性及风味的影响[J/OL]. *食品科学*: 2022, 43(10): 97-106
- [60] 肖默艳, 黄燕芬, 王东伟, 等. 红心火龙果果肉中活性成分与其抗氧化能力的相关性研究[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(11): 98-103
- [61] Da Silva D V T, Pereira A D, Boaventura G T, et al. Short-term betanin intake reduces oxidative stress in wistar rats [J]. *Nutrients*, 2019, 11(9): 1-16
- [62] Davi V T D S, Dos Santos Baião, Diego, et al. Betanin, a natural food additive: stability, bioavailability, antioxidant and preservative ability assessments [J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2019, 24(3): 1-15
- [63] 禹晓, 黄沙沙, 程晨, 等. 不同品种亚麻籽组成及抗氧化特性分析[J]. *中国油料作物学报*, 2018, 40(6): 879-888