

发酵沙棘原果汁的乳酸菌筛选及工艺优化

毛新亮^{1,2}, 王憬³, 周明³, 陆路³, 张新雪³, 付少委^{3*}

(1. 完美(广东)日用品有限公司, 广东中山 528400) (2. 广东完美生命健康科技研究院有限公司, 广东中山 528400) (3. 中国食品发酵工业研究院有限公司北京市蛋白功能肽技术研究中心, 北京 100015)

摘要: 该研究以沙棘原果汁为原料, 利用乳酸菌进行发酵, 筛选出转化黄酮苷元含量高的菌株以及发酵工艺。以发酵后的黄酮苷元含量(以异鼠李素计)的变化为筛选标准, 先利用 26 株单菌进行筛选, 再进行复配, 得到植物乳杆菌 L23、戊糖片球菌 P27 和植物乳杆菌 L21 复配效果最好。并利用正交试验对 pH 值、温度、碳源添加量以及接种比例进行发酵工艺条件的优化。优化后得到的 3 株乳酸菌在 pH 值为 4, 温度 30 °C, 添加碳源 6% (m/V), 接种比例为 1:2:1 时发酵得到的黄酮苷元含量较高, 同时检测沙棘原果汁发酵前后总黄酮、总酚酸、有机酸以及粗多糖含量。发酵后的黄酮苷元含量提升约 90%, 总黄酮提升约 108%, 粗多糖、有机酸和总酚酸含量与沙棘原果汁相比, 具有显著性差异。该研究得出 3 株乳酸菌发酵沙棘黄酮, 黄酮苷元含量明显提升, 其他基本指标的含量显著增加, 为研究黄酮苷转化为黄酮苷元的机制提供数据参考, 为中国沙棘工业产业化深加工提供指导。

关键词: 乳酸菌; 沙棘黄酮; 发酵工艺; 正交试验设计

文章编号: 1673-9078(2023)09-106-112

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.9.1318

Screening and Optimization of Lactic Acid Bacteria for Fermentation of Seabuckthorn Juice

MAO Xinliang^{1,2}, WANG Jing³, ZHOU Ming³, LU Lu³, ZHANG Xinxue³, FU Shaowei^{3*}

(1. Perfect (Guangdong) Commodity Co. Ltd., Zhongshan 528400, China) (2. Guangdong Perfect Life Health Technology Research Institute Co. Ltd., Zhongshan, 528400, China) (3. China National Research Institute of Food and Fermentation Industries Co. Ltd., Beijing Engineering Research Center of Protein and Functional Peptides, Beijing 100015, China)

Abstract: A total of 26 strains of lactic acid bacteria were screened with the aim of achieving a high flavonoid aglycone conversion rate in fermented seabuckthorn juice. The fermentation was optimized through single strain selection, followed by mixed inoculation. *Lactobacillus plantarum* L23, *Pediococcus pentosaceus* P27, and *Lactobacillus plantarum* L21 emerged as the most efficient conversion strains used for mixed inoculation. Subsequently, the orthogonal test was conducted to optimize pH value, temperature, and carbon source addition. The flavonoid aglycone content (calculated by isorhamnetin) was measured as a primer value for optimization. After screening, the highest flavonoid aglycone content was obtained under the following conditions: pH value of 4, temperature of 30 °C, carbon source of 6% (m/V), and inoculation ratio of 1:2:1. The contents of total flavonoids, total phenolic acid, organic acid, and crude polysaccharides were measured before and after fermentation of seabuckthorn raw juice. The flavonoid aglycone content increased by approximately 90%, whereas the total flavonoid content increased by approximately 108%. In this formula, the contents of crude polysaccharide, organic acid, and total phenolic acid were also significantly different from those of the original seabuckthorn juice before fermentation. This study serves as a valuable reference for investigating the conversion mechanism of flavonoid aglycones using lactic acid bacteria, providing guidance for further industrial processing of seabuckthorn in China.

引文格式:

毛新亮, 王憬, 周明, 等. 发酵沙棘原果汁的乳酸菌筛选及工艺优化[J]. 现代食品科技, 2023, 39(9): 106-112

MAO Xinliang, WANG Jing, ZHOU Ming, et al. Screening and optimization of lactic acid bacteria for fermentation of seabuckthorn juice [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(9): 106-112

收稿日期: 2022-10-15

基金项目: 中国轻工集团有限公司科技创新重点专项项目 (ZQ2021YY07); 宁夏回族自治区重点研发计划项目 (2021BEG02027); 北京市科技创新基地培育与发展工程专项 (Z191100002819001)

作者简介: 毛新亮 (1982-), 男, 博士, 研究方向: 功能食品, E-mail: yfzx02@perfect99.com

通讯作者: 付少委 (1995-), 女, 硕士, 研究方向: 食品微生物, E-mail: fsw1058292250@163.com

Key words: lactic acid bacteria; seabuckthorn flavonoid; fermentation technology; orthogonal experimental design

我国是世界上沙棘资源最为丰富的国家^[1],在全国各地都有分布^[2]。沙棘是药食同源植物^[3],具有极高的营养价值和药用价值^[4],其果实含有丰富的营养成分和生物活性物质^[5],已报道的活性成分约 190 多种,包括维生素和黄酮等^[6]。沙棘黄酮有很高的保健和药用价值,具有降低心血管疾病^[7]、抗氧化^[8]、抗衰老^[9]、抗疲劳、抗肿瘤、抗菌、降血脂、降血糖^[10]等作用^[11]。大部分黄酮在植物体内以糖苷形式存在,仅有小部分以游离苷元形式存在^[12]。研究表明,黄酮糖苷在人体内生物利用度低于黄酮苷元^[13],黄酮糖苷所具有的功能活性作用,多依赖于其去除糖基后的黄酮苷元^[14]。糖苷形式的黄酮类物质难以被人体胃肠道直接吸收^[15],只有在肠道菌群的作用下,黄酮苷可以通过微生物转化生成黄酮苷元,易于被人体吸收、利用^[16]。微生物细胞中存在的酶种类较多,且具有较好的糖苷类化合物转化为苷元的潜力^[17,18],可以将黄酮类化合物以去糖基化反应、脱羟基化反应等方式转化为黄酮苷元,提高其生物利用度^[14]。乳酸菌发酵被认为是一种保持并提高果蔬营养价值及感官特性的加工方法^[19,20],而目前关于乳酸菌显著提高沙棘原果汁黄酮的研究鲜有报道,且关于多个菌株复合进行黄酮苷转化黄酮苷元的研究也比较少见。

本研究以沙棘原果汁为原料,3种实验室自行保藏鉴定的乳酸菌作为发酵剂,采用微生物发酵技术提高沙棘原果汁中黄酮类物质的含量,利用高效液相色谱法检测其中黄酮类物质的含量,并通过单因素和正交试验,对其发酵工艺条件进行优化,得到最佳发酵工艺手段。目的是高效利用沙棘中的主要活性物质,提供优质发酵菌种资源以及多种黄酮类物质高效液相检测的方法,以期沙棘黄酮类物质的研究提供参考、为中国沙棘工业产业化加工提供指导。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与设备

沙棘原果汁,张北宝得康食品有限公司;菌种,所有菌种均来自实验室内自行鉴定保藏;MRS培养基,北京奥博星生物技术有限责任公司;山奈素、异鼠李素、槲皮素、金丝桃苷,纯度均 $\geq 98\%$,成都植标化纯生物技术有限公司;异鼠李素-3-O-槐二糖-7-O-鼠李糖苷、槲皮素-3-O-槐二糖-7-O-鼠李糖苷,纯度均 $\geq 98\%$,武汉格林特生物技术有限公司;异鼠李素-3-O-葡萄糖苷、异鼠李素-3-O-葡萄糖-7-O-鼠李糖苷,纯度均

$\geq 98\%$,宝鸡市辰光生物科技有限公司;异鼠李素-3-O-芸香糖苷、异槲皮苷,纯度均 $\geq 98\%$,成都曼斯特生物科技有限公司;芦丁,纯度均 $\geq 98\%$,中国药品生物制品检定所。甲醇、乙腈(色谱纯),德国 Merck;甲酸(色谱纯),迪马科技;试验用超纯水($18.2\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$)由 Milli-Q 纯水系统制备。S20P 型 pH 计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;1389A2 型生物安全柜,美国 Thermo;HZQ-211C 型恒温震荡培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;水浴锅,苏州珀瓦尔实验设备有限公司;NexeraX2 超高效液相色谱仪,岛津(上海)实验器材有限公司;XS205DU 型分析天平,美国 Mettler Toledo;QL-901 型涡旋混合仪,中国其林贝尔仪器制造有限公司;BXM-50VE 立式压力蒸汽灭菌器,上海博迅。

1.2 试验方法

1.2.1 黄酮类化合物的检测

11种黄酮类化合物的高效液相色谱条件依照 Chen 等^[21]的方法,在此基础上略有改动:色谱柱为 Ascentis RP-Amide $15\text{ cm}\times 4.6\text{ mm}$, $3\text{ }\mu\text{m}$;流动相为 A 相-乙腈+0.3%磷酸(V/V);B 相-乙腈+水(2.5+97.5)(V/V),用磷酸调节流动相至 pH 值 3;流速:1.0 mL/min;检测波长:270 nm;进样量:50 μL 。

1.2.2 沙棘原果汁发酵工艺流程

沙棘原果汁发酵的工艺流程如图 1 所示。

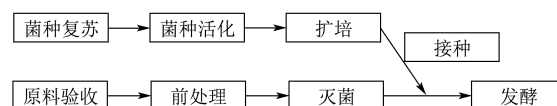


图 1 沙棘原果汁发酵工艺流程

Fig.1 Fermentation process of seabuckthorn juice

1.2.3 菌种复苏及培养

菌种保藏于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$,室温解冻,以 1% (V/V) 的接种比例接种于液体培养基中, $(36\pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 24 h,活化 2 代备用。

1.2.4 沙棘前处理

称取一定体积的沙棘原果汁,利用小麦肽和碳酸钠调节沙棘原果汁的 pH 值,分装并在 $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下灭菌 20 min。

1.2.5 菌株筛选

单一菌株筛选:选择唾液乳杆菌、戊糖片球菌、副干酪乳杆菌、发酵乳杆菌、德氏乳杆菌以及植物乳杆菌等共 26 个菌株进行单一菌株筛选实验。碳源添加量为 4% (m/V),调节 pH 值为 5,接种量为 1%

(V/V)，于30℃下发酵5d。

复配菌株筛选：根据单一菌株发酵后异鼠李素的含量，选择发酵效果显著的菌株，进行复配实验研究。共设计15组方案进行实验，碳源添加量为4% (m/V)，调节pH值为5，接种量为1% (V/V)，于30℃下发酵14d，选择发酵后异鼠李素的含量最高的菌株复配组合，确定发酵终点。

1.2.6 工艺优化

针对发酵前后异鼠李素含量变化较高的菌种组合进行单因素实验设计，分别对温度、pH值、碳源添加量以及菌种组合的接种比例进行考察，探究相关因素对发酵过程中沙棘原果汁中异鼠李素含量 (mg/L) 的影响，确定各因素合适的发条件，为沙棘中异鼠李素含量的提高提供参考，每个因素设置3个平行(见表1)。

表1 单因素实验因素及水平表

Table 1 Factors and levels of single factor formula experimental

水平	因素			
	A 温度/℃	B pH值	C 碳源添加量/%	D 接种比例
1	25	3	2	1:1:1
2	30	4	4	1:2:1
3	35	5	6	2:1:2
4	40	6	8	2:1:1
5	45	7	10	1:1:2

1.2.7 正交试验设计

通过单因素实验结果确定正交试验设计的因素和水平，选取温度、pH值、碳源添加量以及接种比例四个因素及其对应的三个较优水平，以异鼠李素含量为考察指标设计L₉(3⁴)正交试验表，每组试验做3次计算沙棘异鼠李素的平均含量。

1.2.8 沙棘原果汁和沙棘发酵液中基本指标的测定

粗多糖的测定：根据行业标准 SNT 4260-2015《出口植物源食品中粗多糖的测定》；总黄酮的测定：根据行业标准 NY/T 2010-2011《柑橘类水果及制品中总黄酮含量的测定》；总酚酸的测定：参照 Ledoux 等人^[22]的方法；有机酸的测定：根据国家标准 GB 5009.157-2016《食品中有机酸的测定》。

1.2.9 数据分析

实验数据采用 SPSS 22.0，进行分析，结果均以平均值±标准差表示，组间比较采用 ANOVA 单因素分析，P>0.05 为无显著性差异，P≤0.05 为差异性显著，P≤0.01 为差异性极显著。

2 结果与讨论

2.1 黄酮类化合物高效液相色谱图

图2为黄酮混合标准品色谱图，每种物质都有单一的峰出现，共11个峰，时间与表3出峰顺序和时间相一致，由于异鼠李素在黄酮苷元占比较高，且具有较好的抗氧化和抗肿瘤作用，故后续以异鼠李素的增量作为筛选标准，得出最优的发酵工艺条件。

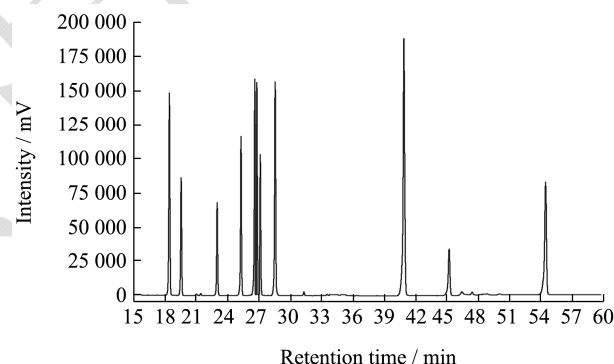


图2 黄酮类化合物高效液相色谱图

Fig.2 High performance liquid chromatography of flavonoids

表2 11种黄酮类化合物出峰顺序和时间

Table 2 Peak sequence and time of 11 flavonoids

出峰顺序	化合物名称	出峰时间/min	强度/mV
1	槲皮素-3-O-槐二糖-7-O-鼠李糖苷	18.56	144 236.00
2	异鼠李素-3-O-槐二糖-7-O-鼠李糖苷	19.68	85 649.00
3	异鼠李素-3-O-葡萄糖-7-O-鼠李糖苷	23.12	67 937.00
4	芦丁	25.41	114 694.00
5	金丝桃苷	26.73	152 839.00
6	异槲皮苷	26.92	151 820.00
7	水仙苷	27.25	102 582.00
8	异鼠李素-3-O-葡萄糖苷	28.67	154 982.00
9	槲皮素	40.99	187 964.00
10	异鼠李素	45.32	33 800.00
11	山奈素	54.54	82 735.00

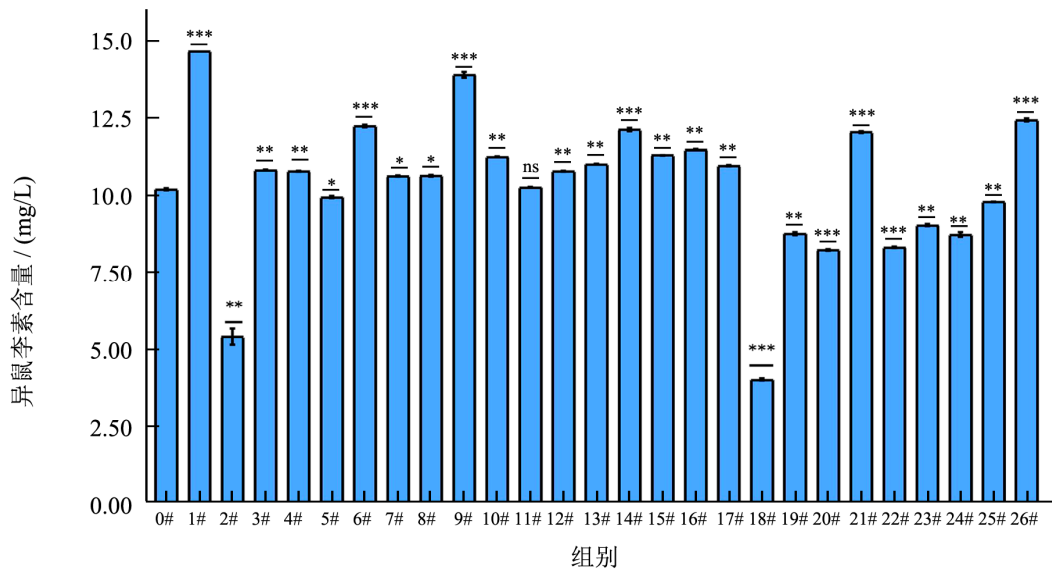


图3 沙棘发酵前后异鼠李素的含量

Fig.3 Content of isorhamnetin before and after fermentation of sea-buckthorn

注: ***表示 $P \leq 0.001$; **表示 $0.001 < P \leq 0.01$; *表示 $0.01 < P \leq 0.05$; ns 表示 $P > 0.05$ 。

2.2 菌株筛选结果

2.2.1 单个菌株的筛选结果

以异鼠李素含量为筛选依据,与空白沙棘原果汁相比,除11#菌株发酵后无明显差异之外,沙棘发酵液具有不同层次的差异,但2#、18#、19#、20#、22#、23#、24#、25#菌株发酵后异鼠李素含量显著降低,这可能是因为菌株在此时间段内没有开始发挥作用,一些黄酮类物质作为营养物质被利用掉,沙棘中其它物质的发酵趋势在其它研究中也表明^[23]。故综合筛选得到6株发酵后异鼠李素含量显著性提高的菌株,说明这6株菌具有较好的转化黄酮苷元的能力。它们分别是1#植物乳植物杆菌(L21)、6#德氏乳杆菌(L25)、9#植物乳植物杆菌(L23)、14#戊糖片球菌(P27)、21#德氏乳杆菌(L22)和26#类干酪乳杆菌(L09),如图3所示。

2.2.2 复配菌株的第一次筛选结果

由于1#植物乳植物杆菌(L21)发酵后的异鼠李素含量大于9#植物乳植物杆菌(L23)的含量,6#德氏乳杆菌保加利亚亚种(L25)发酵后的异鼠李素含量大于21#德氏乳杆菌保加利亚亚种(L22)。故选择9#植物乳植物杆菌(L23)、14#戊糖片球菌(P27)、21#德氏乳杆菌保加利亚亚种(L22)和26#类干酪乳杆菌(L09)进行复配,实验设计如表3所示。将不同实验组发酵14d每隔1d取一次样品进行检测,选择以异鼠李素增量为筛选依据,与空白相比,如图4所示,12#(L23+P27+L09)菌种组合在第10天的异鼠李素增量相对较高,故选取12#进行后续菌种复配方案优化,这

说明菌株复合相比较单个菌株发酵具有更好的效果。

表3 菌种复配方案

Table 3 The recombination scheme of strains

编号	对应菌种组合方案	编号	对应菌种组合方案
1#	L23	9#	P27+L09
2#	P27	10#	L22+L09
3#	L22	11#	L23+P27+L22
4#	L09	12#	L23+P27+L09
5#	L23+P27	13#	L23+L22+L09
6#	L23+L22	14#	P27+L22+L09
7#	L23+L09	15#	L23+P27+L22+L09
8#	P27+L22		

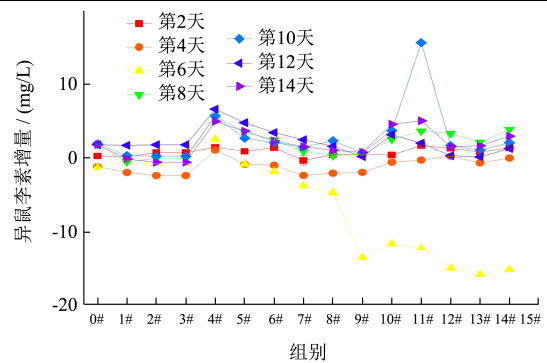


图4 不同实验组的异鼠李素增量

Fig.4 Isorhamnetin increment in different experimental groups

2.2.3 复配菌株的第二次筛选结果

结合单菌和第一次复配方案,再将发酵菌种的复配方案进行优化。发酵10d,取样进行检测。如表4设计菌种复配方案,结果显示1#菌种复配组合异鼠李素增量明显,故选择1#菌种组合进行后续工艺优化实

验,由此可见更多菌株的复合反而减少菌株之间的协同作用,阻碍次级代谢物质发挥作用,从而减少黄酮苷转化为黄酮苷元。

表4 菌种复配方案优化

Table 4 Optimization of the recombination scheme of strains

编号	对应菌种组合方案	特殊说明
1#	L23+P27+L21	
2#	L22+P27+L25	
3#	L23+P27+L22	
4#	L23+P27+L09	用于验证上一次结果
5#	L23+P27+L09	用于验证上一次结果
6#	L23+P27+L21+L25	
7#	L23+P27+L22+L25	
8#	L23+P27+L21+L22+L25	

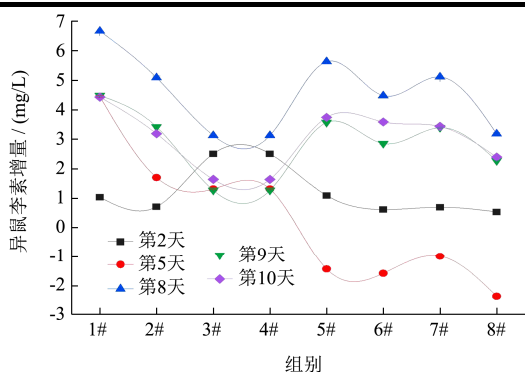


图5 不同实验组的异鼠李素增量

Fig.5 Isorhamnetin increment in different experimental groups

2.3 单因素试验结果

2.3.1 pH 值

在温度为 30 °C、碳源添加量为 4% (m/V), 接种比例为 1:1:1 和接种量为 1% 的条件下, 不同 pH 值条件 3、4、5、6 和 7 对发酵液中异鼠李素含量的影响见图 6。pH 值对异鼠李素增量的影响表现先升高后下降的趋势, 并且在 pH 值为 5 时, 异鼠李素增量表现明显。

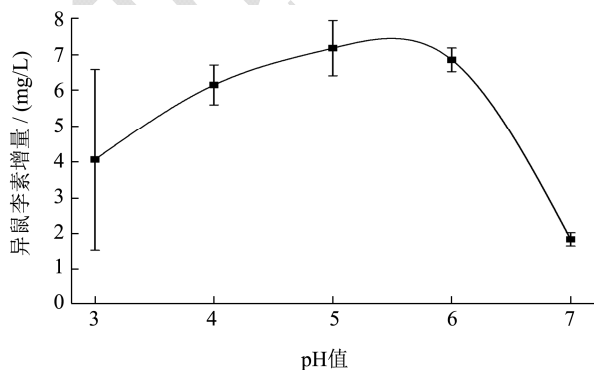


图6 pH 值对发酵液中异鼠李素含量的影响

Fig.6 Effect of pH value on the isorhamnetin content in fermentation broth

2.3.2 温度

在 pH 值为 5、碳源添加量为 4% (m/V)、接种比例为 1:1:1 和接种量为 1% 的条件下, 不同温度条件 25、30、35、40 和 45 °C 对发酵液中异鼠李素含量的影响见图 7。结果表明在 30 °C 时异鼠李素表现出最高的增量, 提升至 7.17 mg/L, 说明乳酸菌在该温度下表现出较高的活力, 利用其次级代谢产物提高黄酮类物质的含量。

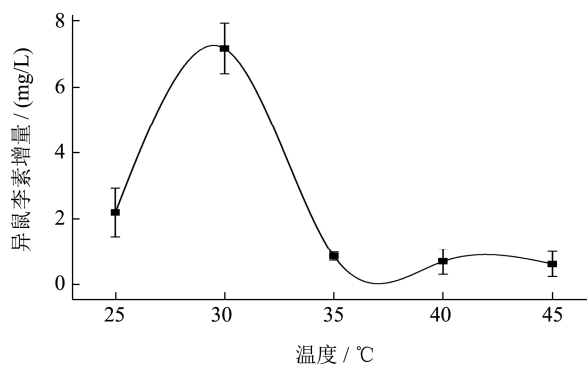


图7 温度对发酵液中异鼠李素含量的影响

Fig.7 Effect of temperature on isorhamnetin content in fermentation broth

2.3.3 碳源添加量

在温度为 30 °C、pH 值为 5, 接种比例为 1:1:1 和接种量为 1% 的条件下, 不同碳源添加量 2% (m/V)、4% (m/V)、6% (m/V)、8% (m/V) 和 10% (m/V) 对发酵液中异鼠李素含量的影响见图 8。由图可知在添加 4% (m/V) 的碳源时, 异鼠李素的增量较高。碳源作为乳酸菌的底物, 供给乳酸菌生长。

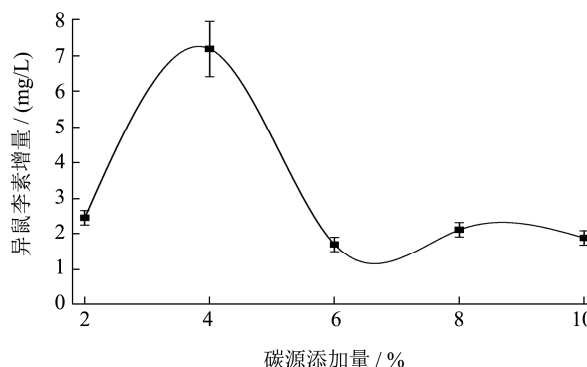


图8 碳源添加量对发酵液中异鼠李素含量的影响

Fig.8 Effect of carbon sources addition on the isorhamnetin content in fermentation broth

2.3.4 接种比例

在温度为 30 °C、pH 值为 5, 碳源添加量 4% (m/V) 和接种量为 1% 的条件下, 不同接种比例 1:1:1、1:1:2、1:1:2:2:1:2 和 2:1:1 对发酵液中异鼠李素含量的影响见图 9。接种比例 1:1:1 时, 异鼠李素的增量趋势明显。不同菌株具有不同的转化能力, 不同接种比例会影响菌株的生长状态, 故影响异鼠李素的含量。

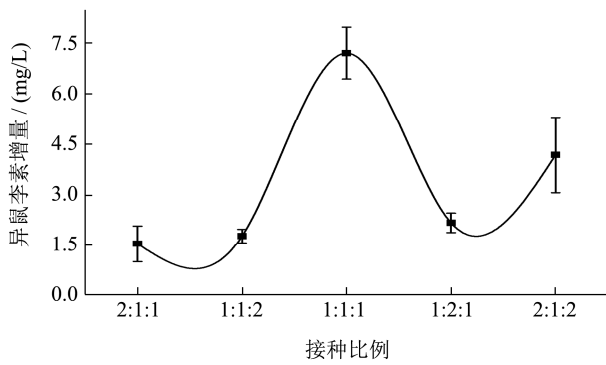


图9 接种比例对发酵液中异鼠李素含量的影响

Fig.9 Effect of inoculation proportion on the isorhamnetin content in fermentation broth

2.3.5 正交试验优化发酵工艺

根据单因素实验结果确定正交试验设计的因素和水平, 选取温度 (A)、pH 值 (B)、碳源添加量 (C) 和接种比例 (D) 为试验因素。正交试验因素水平表如表 5 所示。结果见表 6。

表 5 L₉(3⁴) 正交试验因素水平表

Table 5 Design of L₉(3⁴) orthogonal test

水平 编号	因素			
	A 温度/°C	B pH 值	C 碳源添加量/%	D 接种比例
1	25	4	2	1:1:1
2	30	5	4	1:2:1
3	35	6	6	2:1:2

根据正交试验设计进一步研究, 得到正交试验结果。由上表分析结果表明各因素对异鼠李素含量影响大小的顺序依次是 pH 值 > 碳源添加量 > 接种比例 > 温度, 最优条件为 A₂B₁C₃D₂, 即温度 30 °C, pH 值为 4, 碳源添加量为 6% (m/v), 接种比例为 1:2:1。并以最优的条件进行了验证, 异鼠李素含量达到 15.78 mg/L, 与正交试验结果无太大差异, 为后续研究提供参考。此结果在付依依等^[23]的研究结果中也有同样展示结果, 该研究利用酒酒球菌 CICC 6066 发酵沙棘, 得到异鼠李素含量约为 1.93 mg/L, 与空白对照 1.48 mg/L 相比, 提升约 30%, 而本研究通过乳酸菌的复配, 与空白对照相比, 提升约 90%。表明多个乳酸菌复合具有较高黄酮苷元转化的能力, 而此发酵工艺可以发挥

表 7 基本指标的检测结果

Table 7 Test results of basic indicators

检测指标名称	沙棘原果汁	沙棘发酵液	P-value*
粗多糖/(g/100 g)	0.21±0.00	0.58±0.00	0.01<P<0.05
总黄酮含量/(mg/L)	1 200.00±42.00	2 500.00±100.00	P>0.05
总酚酸含量/(mg/g)	155.70±3.02	899.80±33.96	0.01<P<0.05
有机酸总含量/(g/100 g)	4.57±0.00	7.69±0.00	P<0.01

注: P>0.5 为无显著性差异, P≤0.05 为差异性显著, P≤0.01 为差异性极显著。

最大的效益。

表 6 正交试验结果

Table 6 Results of L₉(3⁴) orthogonal test

试验编号	A	B	C	D	异鼠李素增量/(mg/L)
1	1	1	1	1	13.03
2	1	2	2	2	4.46
3	1	3	3	3	2.15
4	2	1	2	3	14.73
5	2	2	3	1	6.84
6	2	3	1	2	0.09
7	3	1	3	2	13.35
8	3	2	1	3	4.66
9	3	3	2	1	0.05
k1	6.55	13.70	5.93	6.64	
k2	7.22	5.32	6.41	10.97	
k3	6.02	1.15	7.45	10.51	
R	1.20	12.55	1.52	4.33	

2.4 基本指标检测结果

黄酮含量的提高对于人体的免疫健康等具有明显的益处; 而粗多糖能够降血脂, 提高肝脏抗氧化能力, 还可以防止一些糖尿病的出现; 酚酸可以杀菌, 也可作为抗氧化剂, 防止自由基氧化反应引起的细胞损伤; 有机酸有利于人体及消化, 帮助提高食欲, 增强免疫力软化血管等功效。如表 7 所示, 沙棘发酵液与沙棘原果汁相比, 基本指标所测含量都有所提升, 总黄酮含量无明显差异, 但含量提升约 108%, 有效的提高了发酵液中总黄酮含量。崔欣悦等^[24]利用单个乳酸菌发酵橘皮黄酮, 其得率提高至 0.21 mg/g, 提升了 20%, 由此可见本研究多个乳酸菌复合发酵具有更好转化黄酮苷元的作用。发酵前后两者的粗多糖、总酚酸以及有机酸含量都具有显著性差异。付依依等^[25]检测总酚酸的结果发酵后的含量约为 586.00 mg/L, 提升约 4%, 本研究提高了约 5 倍。由此可见乳酸菌复合发酵沙棘原果汁可以明显提升基本指标含量, 帮助其提高作用功效, 在促进人体健康方面具有很大的潜力。

3 结论

本研究通过对 26 个菌株进行单菌株发酵沙棘原果汁筛选, 选出 6 个具有较好转化的菌株进行复配发酵, 最终得到植物乳植物杆菌 L23、戊糖片球菌 P27 和植物乳植物杆菌 L21 这三个菌株复配效果最好; 再通过单因素试验和正交试验进行优化, 得到沙棘的发酵工艺条件为: 植物乳植物杆菌 L23、戊糖片球菌 P27 和植物乳植物杆菌 L21 在 pH 值为 4, 温度 30 °C, 添加碳源 6%, 接菌比例为 1:2:1 时发酵得到的黄酮苷元含量较高, 在此条件下, 异鼠李素的含量提升至 15.78 mg/L, 与空白对照 8.26 mg/L 相比提升了约 90%。可见植物乳植物杆菌 L23、戊糖片球菌 P27 和植物乳植物杆菌 L21 在优化发酵工艺后具有更好转化沙棘黄酮苷元的能力, 这些数据为后续的相关研究提供参考, 同时本研究还提供一种检测 11 种黄酮类物质高效液相色谱的检测方法。

利用发酵手段及对发酵条件的有效控制实现对黄酮类物质的转化及相关机理的探究, 提高了生物转换效率, 为实现黄酮类化合物等功能资源的高值化利用提供数据支撑, 同时为今后利用沙棘发酵工艺实现产业化生产奠定了基础, 为黄酮苷和黄酮苷元具体转化机制提供数据参考。

参考文献

- [1] 张琼妹. 山西引种沙棘的生物学特征和适应性研究[D]. 太原: 山西大学, 2017.
- [2] 张郁松, 罗仓学. 沙棘资源开发与沙棘黄酮提取[J]. 食品研究与开发, 2005, 3: 46-47.
- [3] 王迪, 李文霞, 姚瑜, 等. 沙棘蛋白和多肽的提取及功能活性研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(3): 447-455.
- [4] 宋超男. 蓝靛果-沙棘发酵果汁研制及功能性评价[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2021.
- [5] 张鹏, 朱素英, 杨风琴, 等. 沙棘总黄酮体外抑菌实验研究[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2008, 11(12): 1909-1910.
- [6] 丁小林, 秦利平. 沙棘中的营养成分与生物活性物质研究进展[J]. 中国食物与营养, 2008, 9: 57-59.
- [7] Xu Y J, Kaur M, Dhillon R S, et al. Health benefits of sea buckthorn for the prevention of cardiovascular diseases [J]. *Journal of Functional Foods*, 2011, 3(1): 2-12.
- [8] Pap N, Reshamwala D, Korpinen R, et al. Toxicological and bioactivity evaluation of blackcurrant press cake, sea buckthorn leaves and bark from Scots pine and Norway spruce extracts under a green integrated approach [J]. *Food Chem Toxicol*, 2021, 153: 112284.
- [9] 由士权, 王昌涛, 张佳婵, 等. 发酵法制备沙棘籽粕总黄酮的初步纯化及抗衰老活性评价[J]. 日用化学工业, 2019, 49(10): 661-667.
- [10] Mulati A, Ma S, Zhang H, et al. Sea-buckthorn flavonoids alleviate high-fat and high-fructose diet-induced cognitive impairment by inhibiting insulin resistance and neuroinflammation [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(21): 5835-5846.
- [11] 张存存, 张娟, 谭志超, 等. 沙棘叶总黄酮闪式提取工艺优化及组分鉴定[J]. 食品工业, 2022, 43(1): 1-5.
- [12] 于航, 郑瑞芳, 苏文灵, 等. 基于肠道菌的黄酮类成分代谢特征及药理学思考[J]. 药科学报, 2021, 56(7): 1757-1768.
- [13] 余兰平. 蜂胶黄酮苷酶解与抗氧化活性的探讨[J]. 蜜蜂杂志, 2007, 1: 3-4.
- [14] 孙欣光, 张洁, 庞旭, 等. 天然黄酮苷的代谢途径研究进展[J]. 中草药, 2020, 51(11): 3078-3089.
- [15] 张平静. 低共熔溶剂在黄酮类化合物苷元制备与分析中的应用[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2019.
- [16] 赵锐. 超声提取黄姜总黄酮的工艺优化及动力学研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2013.
- [17] 陈思键, 吴冬雪, 刘淑莹, 等. 人参皂苷化学转化与生物转化研究进展[J]. 中成药, 2022, 44(5): 1539-1545.
- [18] 张宇航, 陈旺, 冯自立, 等. 淫羊藿黄酮苷类化合物生物转化的研究进展[J]. 中国药房, 2022, 33(12): 1525-1529.
- [19] 刘原野, 蔡文超, 张琴, 等. 乳酸菌对沙棘汁中酚酸及挥发性化合物的影响研究[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(11): 156-161.
- [20] Ruiz R L, Zamora G V, Pescuma M, et al. Fruits and fruit by-products as sources of bioactive compounds. Benefits and trends of lactic acid fermentation in the development of novel fruit-based functional beverages [J]. *Food Res Int*, 2021, 140: 109854.
- [21] Chen C, Zhang H, Xiao W, et al. High-performance liquid chromatographic fingerprint analysis for different origins of sea buckthorn berries [J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1154(1-2): 250-259.
- [22] Ledoux M, Lamy F. Determination of proteins and sulfobetaine with the folin-phenol reagent [J]. *Analytical Biochemistry*, 1986, 157(1): 28-31.
- [23] 付依依, 王永霞, 宋惠月, 等. 沙棘原浆苹果酸-乳酸发酵过程中理化指标及抗氧化能力的变化[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(5): 89-97.
- [24] 崔欣悦, 凌空, 周明, 等. 乳酸菌发酵柑橘皮的工艺研究及优化[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(8): 126-133.
- [25] 付依依, 王永霞, 李月, 等. 沙棘原浆发酵功能饮料的研制及其品质特征和抗氧化活性评价[J]. 食品科技, 2022, 47(1): 123-131.