

酵解黑莓提取物对 HUVEC 细胞氧化损伤的保护作用

姚凤丽¹, 孟少珂², 延海莹¹, 万国韶³, 杨青⁴, 田迎樱¹, 杜春影¹, 王鹏^{1*}

(¹中国海洋大学食品科学与工程学院 山东青岛 266003

²中华人民共和国黄岛海关 山东青岛 266000

³青岛海济润生物科技有限公司 山东青岛 266000

⁴山东省海洋食品营养研究院 山东威海 264200)

摘要 为实现黑莓中活性成分的高效提取,探究酵解工艺对提取物成分的影响,并研究所得产物对叔丁基过氧化氢诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)氧化应激损伤的保护作用。与未酵解提取物(BH)相比,酵解黑莓提取物(BF)的总糖、可溶性蛋白质、维生素 C 等营养成分含量基本不变,总酚、花色苷和鞣花酸含量分别增加了 43.4%,41.7%,44.4%。在抗氧化能力方面,BF 可以通过降低活性氧、乳酸脱氢酶和丙二醛含量,提高总抗氧化能力和超氧化物歧化酶活力,对 HUVEC 细胞氧化损伤起到保护作用,且 BF 的作用效果优于 BH。本酵解工艺能有效促进黑莓活性成分的溶出,增强提取物的抗氧化能力,为黑莓功能食品的开发提供新思路。

关键词 黑莓; 酵解; 酚类; 抗氧化; HUVEC

文章编号 1009-7848(2022)07-0056-08 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.07.006

氧化-还原反应与多个复杂的生化过程相关,对于细胞稳态和宿主防御机制至关重要^[1]。细胞内活性氧(ROS)水平是反映细胞氧化-还原状态的一项指标,正常情况下,细胞中存在的抗氧化剂和抗氧化酶可以及时清除 ROS^[2]。当细胞产生过多的 ROS,超过其自我清除能力时,会使细胞抗氧化系统失衡,处于氧化应激状态,进而导致组织损伤和细胞死亡^[3]。研究发现,氧化应激是许多生理和病理现象的基础,与炎症、衰老、癌症、心脑血管疾病、神经退行性疾病等密切相关^[4]。

黑莓(*Rubus fruticosus* L.)在欧洲和北美广泛种植^[5],近年来已逐渐引入中国。黑莓富含酚类物质,具有抗氧化、抗衰老、抑菌、抗肿瘤等多种活性。黄酮类是植物多酚最常见的类别之一,有 6 个主要的亚类:花色苷、黄酮、黄酮醇、黄烷酮、黄烷醇和异黄酮^[6]。花色苷可能是黄酮类物质中最受关注的分类,也是黑莓中具有代表性且含量较高的

酚类化合物。花色苷具有良好的抗氧化活性,其中矢车菊素-3-葡萄糖苷可通过提高细胞活力,减少自由基氧化,增强抗氧化酶活力等,实现减轻细胞氧化应激损伤^[7]。

植物多酚的提取及生物活性研究是天然活性物质开发领域的研究热点。甲醇或乙醇萃取法是从植物中分离酚类物质的常用方法,而溶剂萃取过程具有低生物安全性和环境污染等缺点^[8]。酵解和发酵降解可以通过分解细胞壁基质来促进细胞内组分的溶出,在不产生有害杂质的同时,实现细胞内组分的高效提取。

黑莓营养丰富,风味独特,且富含多酚类生物活性物质,具有较高的利用价值。然而,黑莓鲜果极难贮存,目前黑莓的加工利用方式也较为单一,仅有冻果、果汁及发酵果酒等粗加工产品,形式较常见,因此研究黑莓加工工艺及生物活性成分具有重要意义。本研究针对酵解黑莓提取物,分析其成分组成,通过探究其对 HUVEC 氧化损伤模型活性氧(ROS)和丙二醛(MDA)水平、总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)活力及细胞活力等指标的影响,评价其抗氧化能力,进而确定酵解工艺的可行性,为黑莓的高值化利用提供理论依据。

收稿日期: 2021-07-30

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC0311203);
2019 年度新旧动能转换重大工程重大课题攻关项目

作者简介: 姚凤丽(1998—),女,硕士生

通信作者: 王鹏 E-mail: pengwang@ouc.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黑莓,新鲜冻果,由青岛金凤凰庄园提供;酸性果胶酶,上海蓝季生物有限公司;矢车菊素-3-葡萄糖苷,96%甲酸,3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)、二甲基亚砜、叔丁基过氧化氢(t-BHP),美国 Sigma 公司;HUVEC 细胞系,由山东省医学科学院基础医学研究所提供;DMEM 培养基,美国 Gibco 公司;胎牛血清,杭州四季青公司;ROS 化学荧光试剂盒、LDH、T-AOC、SOD 和 MDA 试剂盒,南京建城生物工程研究所;所有其它化学药品和试剂均为国产分析纯级。

1.2 仪器与设备

UV-6000PC 紫外-可见分光光度计,上海元析仪器有限公司;Agilent 1260 高效液相色谱仪、Agilent 6530 Q-TOF 质谱仪,美国安捷伦公司;Model680 型酶标仪,美国 Bio-Rad 公司;IX51 型倒置荧光显微镜系统,日本 Olympus 公司;DL-CJ-1N 型超净工作台,北京东联哈尔仪器制造有限公司;BJ5060UV 型 CO₂ 培养箱,德国 Heraeus 公司。

1.3 样品制备

黑莓匀浆后按总质量 0.5% 的添加量加入酸性果胶酶,50 °C 下搅拌酶解 1 h,按总质量 0.03% 的添加量加入乳酸菌,28 °C 下密闭发酵 24 h,过滤并冻干后即为酵解黑莓提取物(BF)。黑莓匀浆、过滤、冻干,即为未酵解黑莓提取物(BH)。

1.4 基础成分测定

总糖含量通过苯酚-硫酸法测定,在波长 490 nm 处比色^[9]。可溶性蛋白质含量通过 Folin-酚法测定^[10]。总酸含量的测定参考 GB/T 12456-2008 《食品中总酸的测定》^[11]。维生素 C 含量的测定参考 GB 14754-2010 《食品添加剂维生素 C(抗坏血酸)》^[12]。总酚含量的测定采用 Folin-Ciocalteu 法^[13]。总黄酮的测定采用 NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 比色法^[14]。花色苷的测定采用 pH 示差法^[15]。

鞣花酸含量参照 Paterson 等^[16]的方法,用 HPLC 法测定。色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱(5 μm,4.6 mm×250 mm);流动相:以甲醇(A)和 0.2% 的磷酸(B)为流动相,比例为 45%A 和 55%B;流速为 1.0 mL/min,柱温为 25 °C,检测波长

为 254 nm,进样量为 10 μL。

1.5 HPLC-MS 法测定花色苷组成

花色苷种类及含量使用配有 1290 Infinity II 光电二极管阵列检测器的 Agilent 6530 Q-TOF 质谱仪分析。色谱柱:ZORBAX SB-C18 色谱柱(5 μm,4.6 mm×250 mm)。流动相:以 10% 甲酸(A)和 100% 乙腈(B)作为流动相;洗脱梯度:0~0.5 min 为 96%~91%A,0.5~4 min 为 91%A,4~10 min 内为 91%~87%A,10~20 min 内为 87%~70%A,20~30 min 内为 70%~96%A;流速为 1.0 mL/min,检测波长为 524 nm;扫描方式:全扫描模式,扫描范围(*m/z*)20~2 000,周期为 1.0 s。

1.6 t-BHP 诱导 HUVEC 细胞氧化损伤模型的建立

用 0.25% 胰酶消化对数生长期的 HUVEC 细胞,用 DMEM 完全培养基(含 10% 胎牛血清,1×10⁵ U/L 青霉素,1×10⁵ μg/L 链霉素)配制密度为 5×10⁵ 个/mL 的细胞悬液,按每孔 100 μL 接种到 96 孔板中,置于 37 °C,5%CO₂ 的培养箱中培养。培养 24 h 至细胞培养贴壁后,吸弃培养基。分别按 50,100,200,300,400,500 μmol/L 的浓度加入 t-BHP,每个浓度设置 4 个复孔,每孔加样 200 μL。继续培养 4 h 后吸弃培养基,用 MTT 法测定细胞活力。空白对照组细胞存活率设为 100%,选择存活率接近 50% 时,t-BHP 的浓度为最佳作用浓度。

试验共设置 6 组,分别是正常对照组(N)、模型组(M)、200 μg/mL BH 组(LBH)、200 μg/mL BF 组(LBF)、400 μg/mL BH 组(HBH)和 400 μg/mL BF 组(HBF)。细胞接种到 96 孔板并黏附 24 h 后,吸弃培养基,正常对照组和模型组每孔加入 200 μL 培养基,其余各组加入 200 μL 含对应浓度受试物的培养基,孵育 24 h 后,吸弃液体,正常对照组每孔加入 200 μL 培养基,其余各组每孔加入 200 μL 300 μmol/L 的 t-BHP,继续培养 4 h 后,用 MTT 法测定细胞活力。

1.7 ROS 的测定

细胞培养条件及受试物处理条件与 1.6 节一致。细胞与受试物孵育并经 t-BHP 处理后,在含有 10 μmol/L 二氯二氢荧光素-乙酰乙酸酯(DCFH-DA)的无血清 DMEM 培养基中孵育 45

min, 弃去上清液, 用 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 向每个孔中加入 200 μL PBS, 并使用荧光酶标仪检测吸光度, 激发波长为 485 nm, 发射波长为 525 nm。

1.8 细胞形态观察与 LDH、MDA、T-AOC 和 SOD 的测定

试验分组与 1.6 节一致。取对数生长期的 HUVEC 细胞, 用 DMEM 完全培养基配制成密度为 5×10^5 个/mL 的细胞悬液, 加入 6 孔培养板中, 每孔 2 mL。培养 24 h 后, 吸弃培养基, 正常对照组和模型组加入 2 mL 培养基, 其余各组加入 2 mL 含对应浓度受试物的培养基。孵育 24 h 后, 吸弃液体, 正常对照组每孔加入 2 mL 培养基, 其余 5 组每孔加入 2 mL 300 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP, 继续培养 4 h, 观察细胞形态并拍照, 参照试剂盒说明书测定 LDH 的含量。

细胞与受试物孵育并经 t-BHP 处理后, 收集细胞, 冰浴破碎, 按照对应试剂盒说明书测定细胞内 MDA、T-AOC 和 SOD 水平。

1.9 数据处理

使用 Excel 和 SPSS 22.0 进行数据处理, 结果表示为“平均值 \pm 标准差”; 用单因素方差分析 (ANOVA) 进行显著性分析, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 基础成分

比较了 BH 和 BF 中不同成分的水平, 以探究酵解过程对黑莓提取物成分的影响, 结果如表 1 所示。BF 中总糖、可溶性蛋白质和维生素 C 的含量与 BH 中的差异不大, 说明酵解过程未造成明显的营养物质损失。由于酶解和发酵过程破坏了细胞壁, 促进了黄酮、花色苷及鞣花酸等酚类物质的溶出^[17], BF 中总酚、总黄酮、花色苷及鞣花酸含

表 1 BH 和 BF 的成分对比

成分	BH/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	BF/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
总糖	512.69 ± 3.73^a	510.42 ± 2.56^a
可溶性蛋白质	8.63 ± 0.32^a	8.73 ± 0.86^a
总酸	14.01 ± 0.56^a	15.19 ± 0.33^b
维生素 C	0.13 ± 0.03^a	0.12 ± 0.01^a
总酚	4.45 ± 0.22^a	6.38 ± 0.17^b
总黄酮	3.78 ± 0.18^a	4.38 ± 0.21^b
花色苷	0.72 ± 0.10^a	1.02 ± 0.07^b
鞣花酸	0.18 ± 0.01^a	0.26 ± 0.01^b

注: 表中同一行不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

量均显著高于 BH ($P < 0.05$), 分别增加了 43.4%, 15.9%, 41.7%, 44.4%。

2.2 花色苷组成

黑莓花色苷的 HPLC 图有 4 个主要峰 (图 1), 结合表 2 中 HPLC-MS 的鉴定结果, 4 个峰分别是矢车菊素-3-葡萄糖苷 (峰 1, m/z 449/287)、矢车菊素-3-木糖苷 (峰 2, m/z 419/287)、矢车菊素-3-丙二酰葡萄糖苷 (峰 3, m/z 535/287) 和矢车菊素-3-二草酰葡萄糖苷 (峰 4, m/z 593/287), 这与 Cho 等^[18]的结论一致。BF 中花色苷总含量及 4 种花色苷含量均高于 BH, 说明酵解过程促进了花色苷的释放。与 BH 相比, BF 中矢车菊素-3-葡萄糖苷含量增加最多, 为 63.7%, 矢车菊素-3-木糖苷、矢车菊素-3-丙二酰葡萄糖苷和矢车菊素-3-二草酰葡萄糖苷的含量分别增加了 41.2%, 38.8%, 32.9%。

2.3 t-BHP 最佳作用浓度

不同浓度的 t-BHP 对 HUVEC 细胞活力的影响如图 2 所示。不同浓度的 t-BHP 作用于 HUVEC 细胞 4 h 后, 细胞活力均有所下降, 且呈现剂量依赖性。t-BHP 浓度为 300 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞活力最接近 50%。因此, 选择 300 $\mu\text{mol/L}$ 作为 t-

表 2 BH 及 BF 的花色苷组成

Table 2 Anthocyanin composition of BF and BH

编号	[M+]	化合物	含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	
			BH	BF
1	449/287	矢车菊素-3-葡萄糖苷	1.23	2.01
2	419/287	矢车菊素-3-木糖苷	0.16	0.22
3	535/287	矢车菊素-3-丙二酰葡萄糖苷	0.05	0.07
4	593/287	矢车菊素-3-草酰基葡萄糖苷	0.20	0.26

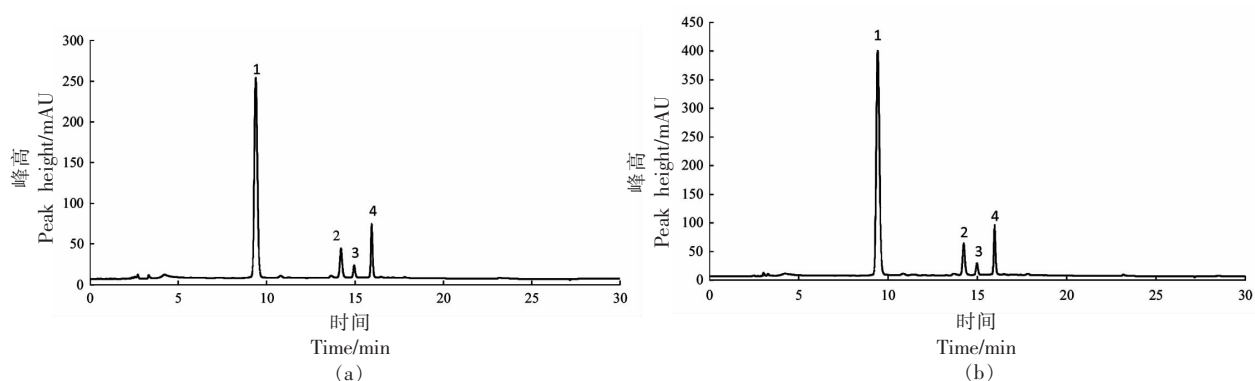


图 1 BH(a)和 BF(b)中花色苷组分的 HPLC 分析

Fig.1 HPLC analysis of anthocyanins in BH (a) and BF (b)

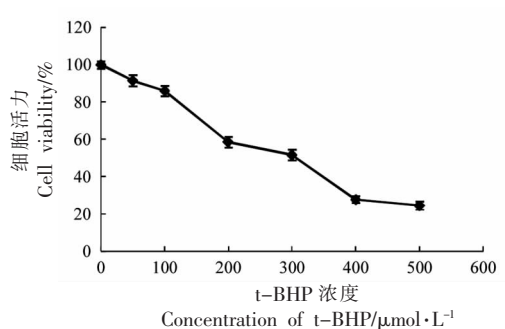


图 2 t-BHP 浓度对 HUVEC 细胞活力的影响

Fig.2 Effects of t-BHP concentration on the cell viability of HUVEC

BHP 诱导 HUVEC 细胞氧化损伤的最佳作用浓度。

2.4 BH 和 BF 对细胞形态的影响

图 3 显示了不同样品对 HUVEC 细胞形态的影响。正常对照组的 HUVEC 细胞表面光滑,具有长突触。用 t-BHP 处理的 HUVEC 细胞呈圆形,呈现突触萎缩和氧化损伤,表明成功建立了氧化应激模型。BH 和 BF 处理均能预防氧化损伤并维持细胞形态。BF 组圆形细胞占比少于 BH 组,表明酵解黑莓提取物能更有效地减少 t-BHP 对细胞结构的破坏损害,维持细胞正常形态。

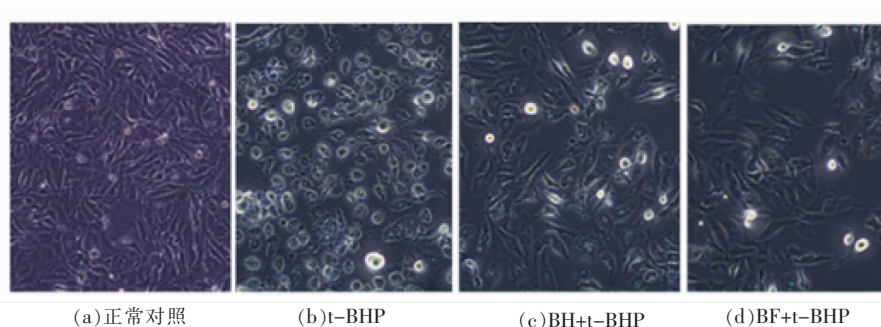


图 3 BH 和 BF 对 HUVEC 细胞形态的影响

Fig.3 Effects of BH and BF on the morphology of HUVEC

2.5 BH 和 BF 对细胞活力的影响

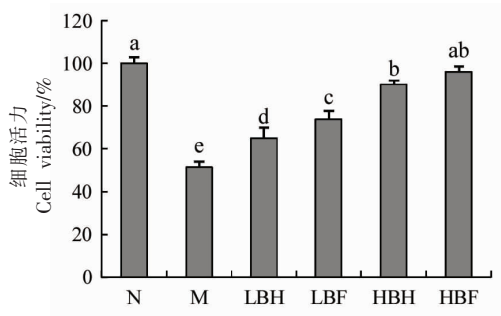
不同处理方式对 HUVEC 细胞活力的影响如图 4 所示,模型组经 t-BHP 处理后,细胞活力降低至正常对照组的 51.3%。BH 和 BF 均能显著提高细胞活力($P < 0.05$),且作用具有剂量依赖性。付鑫景^[19]研究发现,黑米中的多酚类物质可减轻 H_2O_2 引起的氧化应激,提高细胞活力,并表现出剂

量依赖性。HBF 组细胞活力显著高于 HBH 组($P < 0.05$),相较模型组分别提高了 38.7%和 44.7%,表明 BF 能更有效地减轻细胞的氧化应激损伤,防止细胞死亡,这与酵解过程中酚类物质释放量增加有关。

2.6 BH 和 BF 对 ROS 的影响

如图 5 所示,模型组 t-BHP 处理显著增加了

细胞内 ROS 水平。Fallah 等^[20]的研究表明,花色苷可通过降低 ROS 含量来阻断 NF- κ B 途径,从而减少炎症和氧化应激。BH 和 BF 处理均能降低 ROS 相对含量,表明 BH 和 BF 中的花色苷可以抑制 ROS 积累,且在一定浓度范围内其作用效果与



注:不同字母表示组间差异具有显著性($P<0.05$),下同。

图4 BH和BF对细胞活力的影响

Fig.4 Effects of BH and BF on cell viability

2.7 BH和BF对LDH的影响

LDH位于细胞质内,是糖酵解过程中的重要酶之一,当细胞受到氧化损伤时,细胞膜结构被破坏,LDH被释放到细胞外,因此上清液中LDH水平可以反映细胞的损伤程度^[21]。用t-BHP处理后,上清液中LDH含量显著增加,表明t-BHP引起HUVEC细胞膜损伤并导致LDH释放。BH和BF均显著抑制LDH释放($P<0.05$),说明BH和BF都能减少t-BHP对HUVEC细胞的损伤,保护细胞膜完整性。HBH组和HBF组LDH释放量比模型组分别降低了38.3%和44.2%,表明BF对细胞膜结构的保护效果更好。

2.8 BH和BF对MDA的影响

MDA是由氧化应激引起的脂质过氧化的产

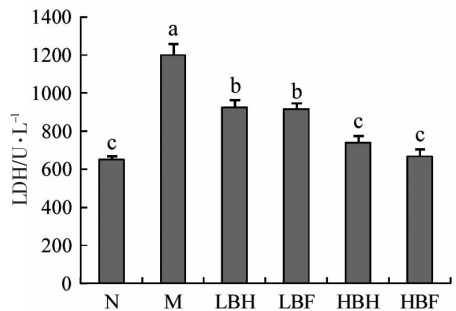


图6 BH和BF对LDH的影响

Fig.6 Effects of BH and BF on LDH

样品浓度呈正相关。HBF组ROS释放量显著低于HBH组($P<0.05$),分别较模型组降低了41.3%和56.5%。上述结果表明,酵解过程中黑莓花色苷的释放增强了提取物对ROS积累的抑制效果。

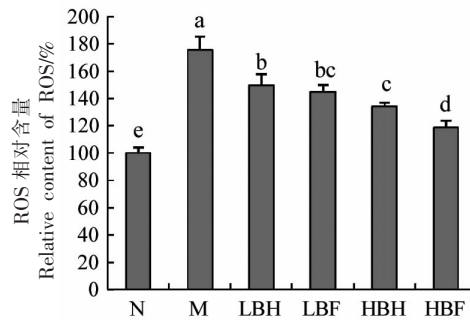


图5 BH和BF对ROS的影响

Fig.5 Effects of BH and BF on ROS

物,细胞内MDA水平能够反应细胞膜的脂质过氧化程度^[22]。如图7所示,模型组MDA水平显著高于正常对照组,说明t-BHP处理可以诱发HUVEC细胞脂质过氧化。游庭活^[23]研究发现,桑葚多酚类化合物具有很好的抗氧化活性,可以有效抑制脂质过氧化,降低D-半乳糖诱导的衰老小鼠血清及脑、肝脏和心脏组织中MDA含量。与模型组相比,BH和BF处理均以剂量依赖性方式显著降低MDA水平,且400 μ g/mL BF作用下,细胞内MDA水平与正常对照组差异不显著($P>0.05$),说明黑莓提取物中的多酚类物质对细胞膜脂质过氧化有显著的抑制作用,且酵解过程有效提高了其抑制脂质过氧化的能力。

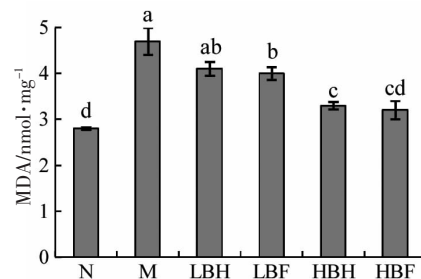


图7 BH和BF对MDA的影响

Fig.7 Effects of BH and BF on MDA

2.9 BH 和 BF 对 T-AOC 和 SOD 的影响

T-AOC 代表总抗氧化剂水平, SOD 是清除细胞内自由基的关键酶。BH 和 BF 对 HUVEC 细胞中抗氧化系统的作用可以通过 T-AOC 和 SOD 活力来表征。如图 8 所示, 模型组的 T-AOC 和 SOD 水平显著低于正常对照组, 说明在氧化应激状态下, 细胞抗氧化系统功能受损。与模型组相比, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 BH 和 BF 均可显著增加 T-AOC 水

平, 且 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BF 组 T-AOC 水平显著高于同浓度 BH 组。同时, BH 和 BF 处理能够以剂量依赖的方式提高 SOD 活力, 且相同浓度下 BF 组 SOD 活力稍高于 BH 组。Wu 等^[24]研究发现, 甜樱桃花色苷可通过增加 SOD 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH) 的活力来抑制氧化应激。本文所采取的酵解工艺促进了花色苷的溶出, 使酵解黑莓提取物对细胞抗氧化系统的保护作用增强。

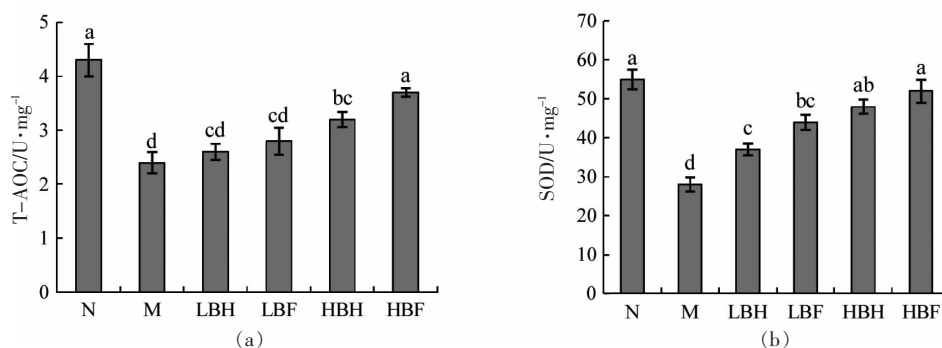


图 8 BH 和 BF 对 T-AOC(a)和 SOD(b)的影响

Fig.8 Effects of BH and BF on T-AOC (a) and SOD (b)

3 结论

本研究通过对 2 种黑莓提取物 BH 和 BF 的主要成分进行对比分析, 发现 BF 的总糖、可溶性蛋白质、维生素 C 等营养成分含量与 BH 相当, 总酚、总黄酮、花色苷和鞣花酸含量显著高于 BH, 其中矢车菊素-3-葡萄糖苷含量比 BH 高 63.7%, 表明酵解过程有助于黑莓活性物质的溶出。BF 对 t-BHP 诱导的 HUVEC 细胞氧化应激损伤具有很好的保护作用, 可以维持氧化应激状态下 HUVEC 细胞的正常形态, 抑制 ROS 积累, 保护细胞膜完整性, 抑制脂质过氧化并提高细胞内抗氧化酶活力。该酵解工艺促进了花色苷等酚类活性物质的释放, 提高了黑莓提取物的抗氧化能力, 因此相同浓度下 BF 对 HUVEC 细胞氧化损伤的保护作用优于 BH。本研究证明了酵解工艺的可行性, 在分析提取物成分的基础上, 深入分析了其抗氧化能力, 为黑莓的高值化利用提供理论依据。

参 考 文 献

[1] HELMUT S. Oxidative stress: A concept in redox

biology and medicine[J]. Redox Biology, 2015, 4: 180-183.

[2] ESTHER S K, FUMIKO I, IRWIN K, et al. Glucose - induced metabolic memory in Schwann cells: Prevention by PPAR agonists[J]. Narnia, 2013, 154(9): 3054-3066.

[3] 陈彬和. 大豆发酵液抗氧化性能研究[D]. 无锡: 江南大学, 2020.

CHEN B H. Study on the antioxidant activity of soybeanfermentation broth [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020.

[4] 李兴太, 张春英, 仲伟利, 等. 活性氧的生成与健康 and 疾病关系研究进展[J]. 食品科学, 2016, 37(13): 257-270.

LI X T, ZHANG C Y, ZHONG W L, et al. Advances in generation of reactive oxygen species associated with health and diseases[J]. Food Science, 2016, 37(13): 257-270.

[5] KITRYTĚ V, NARKEVIČIŪTĚ A, TAMKUTĚ L, et al. Consecutive high -pressure and enzyme assisted fractionation of blackberry (*Rubus fruticosus* L.) pomace into functional ingredients: Process optimization and product characterization[J]. Food

- Chemistry, 2020, 312: 126072.
- [6] FENG R T, NI H M, WANG S Y, et al. Cyanidin-3-rutinoside, a natural polyphenol antioxidant, selectively kills leukemic cells by induction of oxidative stress[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(18): 13468-13476.
- [7] 刘迪, 张浩, 孙宏宇, 等. 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷的细胞抗氧化活性研究[J]. 营养学报, 2019, 41(3): 293-297.
- LIU D, ZHANG H, SUN H Y, et al. Study on cellular antioxidant activity of cyanidin-3-O-glucoside[J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2019, 41(3): 293-297.
- [8] 梁进欣, 白卫东, 杨娟, 等. 植物多酚的研究进展[J]. 农产品加工, 2020(21): 85-91.
- LIANG J X, BAI W D, YANG J, et al. Research progress on plant polyphenols [J]. Farm Products Processing, 2020(21): 85-91.
- [9] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. Analytical Chemistry, 1956, 28(3): 350-356.
- [10] LORRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1951, 193(1): 265-275.
- [11] 中国国家标准化管理委员会. 食品中总酸的测定: GB/T 12456-2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008: 1-5.
- China Standardization Administration Committee. Determination of total acid in food: GB/T 12456-2008[S]. Beijing: Standards Press of China, 2008: 1-5.
- [12] 中华人民共和国卫生部. 食品添加剂维生素 C: GB 14754-2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010: 1-4.
- Ministry of Health of the P. R. China. Food additive vitamin C: GB 14754-2010[S]. Beijing: Standards Press of China, 2010: 1-4.
- [13] DAI J, GUPTE A, GATES L, et al. A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms[J]. Food and Chemical Toxicology, 2009, 47(4): 837-847.
- [14] SHELLY H, ZHANG L, LI J R, et al. Antioxidant rich grape pomace extract suppresses postprandial hyperglycemia in diabetic mice by specifically inhibiting alpha-glucosidase[J]. Nutrition & Metabolism, 2010, 7: 71.
- [15] 陈钢, 黄立山, 徐静, 等. 黑莓花色苷的超声波提取与抗氧化性活性研究[J]. 食品科学, 2012, 33(24): 117-121.
- CHEN G, HUANG L S, XU J, et al. Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of anthocyanins from blackberry fruits[J]. Food Science, 2012, 33(24): 117-121.
- [16] PATERSON A, KASSIM A, MCCALLUM S, et al. Environmental and seasonal influences on red raspberry flavour volatiles and identification of quantitative trait loci (QTL) and candidate genes[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2013, 126(1): 33-48.
- [17] 王高坚, 王珍珍, 李嘉嘉, 等. 蓝莓酵素的体外抗氧化及对秀丽隐杆线虫的氧化应激保护作用[J]. 食品工业科技, 2021, 42(15): 343-350.
- WANG G J, WANG Z Z, LI J J, et al. Antioxidant activity *in vitro* and promoting resistance to oxidative stress in *Caenorhabditis elegans* of blueberry Jiaosu[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(15): 343-350.
- [18] CHO B O, RYU H W, JIN C H, et al. Blackberry extract attenuates oxidative stress through up-regulation of Nrf2-dependent antioxidant enzymes in carbon tetrachloride-treated rats [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(21): 11442-11448.
- [19] 付鑫景. 黑米多酚对细胞氧化应激的保护作用研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2019.
- FU X J. Study on the protective effects of black rice polyphenols for cellular oxidative stress [D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2019.
- [20] FALLAH A A, SARMAST E, JAFARI T. Effect of dietary anthocyanins on biomarkers of oxidative stress and antioxidative capacity: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Journal of Functional Foods, 2020, 68: 103912.
- [21] 孔令联, 崔艳军, 杨金勇, 等. 奶牛小肠上皮细胞氧化损伤模型的构建[J]. 中国畜牧杂志, 2018, 54(11): 79-83.

- KONG L L, CUI Y J, YANG J Y, et al. Establishment of oxidative damage model in cow intestinal epithelial cells [J]. Chinese Journal of Animal Science, 2018, 54(11): 79-83.
- [22] 孙亚男, 黄小波, 梁伟, 等. 陈皮、半夏对动脉粥样硬化小鼠 PI3K-Akt 通路、SOD、MDA、SA- β -gal 水平的影响[J]. 首都医科大学学报, 2018(6): 805-809.
- SUN Y N, HUANG X B, LIANG W, et al. Effects of *Citrus* and *Pinellia* on the levels of PI3K-Akt pathway, SOD, MDA, SASap-gal in atherosclerosis mice[J]. Journal of Capital Medical University, 2018 (6): 805-809.
- [23] 游庭活. 桑椹多酚类化合物抗氧化及延缓衰老作用研究[D]. 广州: 广东药学院, 2015.
- YOU T H. Study of antioxidant and anti-aging activity of polyphenol compounds in mulberry [D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2015.
- [24] WU T, TANG Q, YU Z P, et al. Inhibitory effects of sweet cherry anthocyanins on the obesity development in C57BL/6 mice[J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2014, 65(3): 351-359.

Protective Effect of Fermented Blackberry Extracts on Oxidative Damage in HUVEC Cells

Yao Fengli¹, Meng Shaoke², Yan Haiying¹, Wan Guoshao³, Yang Qing⁴, Tian Yingying¹,
Du Chunying¹, Wang Peng^{1*}

¹*Ocean University of China, College of Food Science and Engineering, Qingdao 266003, Shandong*

²*Huangdao Customs District P.R. China, Qingdao 266000, Shandong*

³*Qingdao Haijirunsheng Biotechnology Co., Ltd., Qingdao 266000, Shandong*

⁴*Shandong Marine Food and Nutrition Research Institute, Weihai 264200, Shandong*

Abstract In order to achieve efficient extraction of active ingredients in blackberries, this study was conducted to investigate the effect of fermentation treatment on the components of blackberry extracts and its protective effect on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress damage in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Compared with unfermented blackberry extracts (BH), the content of total sugar, soluble protein, vitamin C in fermented blackberry extracts (BF) remained basically unchanged, and the content of total phenols, anthocyanins and ellagic acid increased by 43.4%, 41.7% and 44.4%, respectively. In terms of antioxidant capacity, BF protected HUVEC cells from oxidative damage by reducing the content of reactive oxygen species, lactate dehydrogenase and malondialdehyde, and increasing the total antioxidant capacity and superoxide dismutase activity, and the effect of BF was superior to that of BH. The results showed that the fermentation process adopted in this study can effectively promote the dissolution of active ingredients in blackberry and improve its antioxidant capacity, provide new ideas for the development of blackberry functional food.

Keywords blackberry; fermentation; phenols; antioxidant; HUVEC