

植物乳杆菌发酵对全谷物黑大麦多酚富集的影响

聂攀, 丁信文, 吴艳, 宋立华*

(上海交通大学农业与生物学院 上海 200240)

摘要 本研究主要探讨不同植物乳杆菌及发酵工艺对全谷物黑大麦多酚富集的影响。试验所用的 4 株菌分别为 1 号菌株希氏乳杆菌(DSMZ 20051)、2 号菌株发酵乳杆菌(DSMZ 20052)、3 号菌株双科特迪瓦乳杆菌(DSMZ 14421)及 4 号菌株北里乳杆菌(JCM15041)。结果表明,发酵菌种对黑大麦多酚富集有显著影响($P<0.05$),其中 4 号菌株发酵黑麦后多酚富集效果最好。通过单因素实验和正交试验得到的最优发酵工艺为料液比 1:5、4 号菌接种量 3%、发酵时间 24 h、发酵温度 30℃,在该优化条件下多酚含量达到 (0.88 ± 0.016) mg/g,较未发酵黑大麦提高 1.05 倍。采用 UPLC-Q-TOF-MS^E 结合靶向代谢组学分析黑大麦发酵液提取物中多酚类物质组成及丰度,结果表明矮茶素、肉桂酸、麦芽酚、儿茶素、芫花素、反式香豆酸、咖啡酸、无色花青素、阿魏酸等显著增加($P<0.05$),分别较未发酵黑大麦提高 3.82, 7.95, 1.38, 0.21, 0.43, 1.40, 0.37, 0.36 倍和 0.33 倍;且丁香酸和藜芦酸仅在黑大麦发酵液中检测到。利用北里乳杆菌发酵有利于全谷物黑大麦多酚的富集,可用于功能性全谷物食品基料的制备。

关键词 黑大麦; 植物乳杆菌; 多酚富集; UPLC-Q-TOF-MS^E

文章编号 1009-7848(2023)08-0186-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.08.020

大麦是世界第四大粮食作物,其富含蛋白、膳食纤维、矿物质和维生素,还含有人体必需的 8 种氨基酸(特别是赖氨酸),铁、铜、钾、钙、硒、锌等 20 多种微量元素(特别是硒元素)和不饱和脂肪酸(油酸和亚油酸),营养价值高于稻谷、玉米和小麦等,是膳食纤维和维生素的良好来源^[1-2]。与普通大麦相比,黑大麦还富含 β -葡聚糖、酚酸、黄酮和花青素等植物化学物质,在降脂、降血压、防治糖尿病和抗癌等方面发挥积极作用^[3-7],可作为食疗基料,开发黑大麦系列特色营养食品。然而,全谷黑大麦皮层坚硬、口感粗糙,如何通过食品加工进一步改善其食用和营养品质,值得深入研究。

发酵加工可通过微生物的生物转化作用增加全谷物营养素及生物活性物质的种类和含量,提高营养物质的生物利用率,从而改善谷物的营养品质。此外,发酵还可改善全谷物的感官特性,延长保质期^[8]。目前关于谷物发酵加工多采用乳酸菌、酵母菌和曲霉菌^[8]。在采用发酵工艺富集谷物

多酚的研究方面,张慧芸等^[9]采用德氏乳杆菌和啤酒酵母菌分别对 4 种谷物(小米、燕麦、黑米、高粱)进行发酵,发现经微生物发酵后,谷物中的多酚含量和抗氧化活性均显著提高,提高的程度与菌种密切相关。姚芳等^[10]发现大麦经植物乳杆菌发酵后,发酵产物的多酚含量和抗氧化活性均显著提高,与 6 株不同乳杆菌发酵黑米中多酚含量和抗氧化活性的变化相一致^[11]。另有研究发现高粱中的总酚含量与发酵时间呈负相关关系,而小麦、大米、燕麦、玉米、小米、糜米 6 种谷物中总酚含量均随发酵时间的延长而增加^[12]。上述研究均表明,微生物发酵对提高谷物中多酚类等生理活性物质和抗氧化活性均有显著影响。然而,针对不同谷物底物,在不同发酵工艺条件下其多酚的富集作用不同。

本研究以黑大麦为原料,以不同植物乳杆菌为发酵菌株,通过分析发酵前、后及不同发酵条件下多酚成分的变化,确定黑大麦的最佳发酵条件,为利用发酵黑大麦基料开发新的全谷物功能性食品提供试验数据。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

1.1.1 试剂 耐高温 α -淀粉酶(A109182)、甲醇、

收稿日期: 2022-08-26

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32172221);上海市农委重点攻关项目(2019-02-08-00-08-F01154)

第一作者: 聂攀,女,硕士生

通信作者: 宋立华 E-mail: lihuas@sjtu.edu.cn

没食子酸标准品(纯度 $\geq 98\%$),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;福林酚、无水乙醇、无水碳酸钠、乙腈(均为分析纯级),国药集团化学试剂有限公司;MRS 培养基,上海盛思生化科技有限公司。

1.1.2 菌种来源 试验所用的 4 株菌【1 号菌株希氏乳杆菌 (*Lactobacillus hilgardii*, DSMZ 20051); 2 号菌株发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*, DSMZ 20052); 3 号菌株双科特迪瓦乳杆菌 (*Lactobacillus diolivorans*, DSMZ 14421); 4 号菌株北里乳杆菌 (*Lactobacillus kisonensis*, JCM15041)】均由华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室馈赠。

1.1.3 仪器与设备 LRH-150 培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;DR-3000 系列酶标分析仪,无锡华卫德朗仪器有限公司;THC 型数控超声波提取机,济宁天华超声电子仪器有限公司;Acquity

I-class 超高效液相色谱和 VION 离子淌度四极杆飞行时间质谱联用仪,沃特世科技(上海)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 培养基制备

1.2.1.1 MRS 液体培养基 称取 MRS 培养基 52.3 g,与 1 L 蒸馏水混合后加热溶解,调节 pH 值为 6.5 ± 0.2 (25 °C),灭菌(121 °C、15 min),冷却后备用。

1.2.1.2 黑大麦液体发酵培养基 将黑大麦粉碎过 80 目筛后与纯水按不同比例(料液比 1:5, 1:7.5 和 1:10)混合,加热、搅拌,升温至 70 °C 时加入耐高温 α -淀粉酶(10 U/g),酶解 40 min(至标准碘液不变色即可),迅速升温至 100 °C,煮沸 15 min,灭菌(115 °C、15 min),冷却后备用。

1.2.2 植物乳杆菌发酵黑大麦工艺

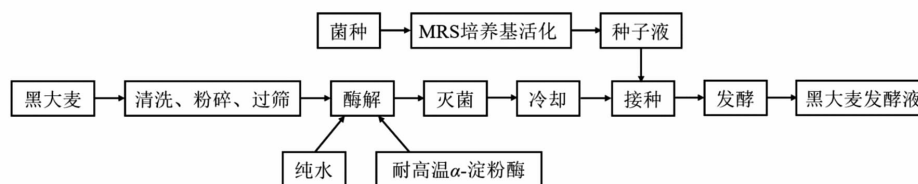


图 1 植物乳杆菌发酵黑大麦工艺流程

Fig.1 Process of fermentation of black barley by *Lactobacillus plantarum*

1.2.3 黑大麦发酵液的制备

1.2.3.1 菌株活化 按接种量 2% 将保存在甘油管中的菌液接种到上述灭菌 MRS 液体培养基中,涡旋混匀,30 °C 避光培养 16 h 后即得活化菌株。

1.2.3.2 接种与发酵 将上述活化菌株 (3×10^8 CFU/mL) 按不同接种量 (3%, 5%, 7% 和 9%) 接种到黑大麦液体发酵培养基中,涡旋混匀,30 °C 摇床培养不同时间 (12, 24 h 和 48 h) 即得到黑大麦发酵液。

1.2.4 单因素实验

1.2.4.1 料液比优化单因素实验 向料液比分别为 1:5, 1:7.5 和 1:10 的黑大麦液体培养基 (初始 pH=6.5) 中接种已活化菌株 (接种量 3%), 30 °C 条件下避光培养 24 h, 取样测定多酚含量 (mg/g)。

1.2.4.2 发酵时间优化单因素实验 在黑大麦液体培养基 (初始 pH=6.5) 中分别接种已活化的 1、2、3、4 号菌 (接种量 3%), 30 °C 条件下避光分别培养 12, 24 和 48 h, 取样测定多酚含量 (mg/g)。

1.2.4.3 发酵温度优化单因素实验 在黑大麦液体培养基 (初始 pH=6.5) 中分别接种已活化的 1、2、3、4 号菌 (接种量 3%), 分别于 25, 30, 37 °C 避光培养 24 h, 取样测定多酚含量 (mg/g)。

1.2.4.4 发酵菌接种量优化单因素实验 在黑大麦液体培养基 (初始 pH=6.5) 中分别接种 3%, 5%, 7% 和 9% 的已活化 1、2、3、4 号菌, 30 °C 条件下避光培养 24 h, 取样测定多酚含量 (mg/g)。

1.2.5 发酵黑大麦富集多酚正交试验

表 1 正交试验的因素与水平设计

Table 1 Factors and horizontal design of orthogonal experiment

水平	因素			
	料液比 (A)	发酵时间 (B)/h	接种量 (C)/%	菌种 (D)
1	1:5	12	3	1 号
2	1:7.5	24	6	3 号
3	1:10	48	9	4 号

1.2.6 黑大麦发酵液多酚成分检测

1.2.6.1 多酚含量测定

1) 前处理 取发酵液 0.3 g, 加入 1.8 mL 分析纯级乙醇, 沉淀蛋白, 在温度 30 °C 下超声提取 30 min 后于 4 000 r/min 离心 10 min 取上清液用于分析。

2) 测定 在 Wu 等^[13]和 Djeridane 等^[14]方法的基础上略作改进。取 0.5 mL 提取液, 加入 1 mL 福林酚试剂和 3 mL Na₂CO₃ 溶液(8%), 加蒸馏水定容, 漩涡混合器混匀, 30 °C 下避光静置 1 h 后于波长 760 nm 处测定吸光度。以没食子酸作为标准品代替样品做标准曲线, 样品中的多酚含量以没食子酸的含量(mg/g)表示。

1.2.6.2 发酵黑大麦中多酚类成分分析

1) 提取 按照体积比 1:2 的比例将 1.2.6.1 节中的提取液与甲醇/乙腈溶液 ($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{乙腈}}=1:1$) 混合, 涡旋、静置, 于 -20 °C 萃取 2 h, 期间每半小时涡旋一次, 离心 (12 000 r/min, 4 °C, 20 min), 取上清用于检测分析。未发酵组处理同上。

2) 色谱分析条件 色谱柱为 ACQUITY U-PLC BEH C18 柱 (100 mm×2.1 mm×1.7 μm); 柱温、流动相流速、进样量分别为 45 °C、0.4 mL/min 和 1 μL; 流动相为 0.1% 甲酸水(A) 0.1% 甲酸-乙腈(B); 梯度洗脱程序设置如下: 0~2 min, 1% B; 2~3 min, 1%~15% B; 3~9 min, 10%~30% B; 9~11 min, 30%~50% B; 11~15 min, 50%~100% B; 15~18 min, 100% B; 18~18.1 min, 100%~1% B; 18.1~20 min, 1% B。

3) 质谱分析条件 毛细管电压为 1 kV; 低能量(CE 6 eV)和高能量(CE 20~45 eV)两种 MSE 模式交替扫描(扫描范围 50~1 000 amu, 扫描速度 0.2 s/次); 采用氩气(99.999%)诱导解离气体; 采用氮气(>99.5%)进行去溶剂化处理(900 L/h), 锥孔处氮气(>99.5%)流量保持 50 L/h。锥形电压、源偏置电压和源温度分别保持 40 V、60 V 和 115 °C。采用亮氨酸-脑啡肽(250 ng/mL)进行正(ESI⁺)、负离子(ESI⁻)模式([M-H]⁻=554.2620)下的锁定质量校正(参比探针连续输注, 流量 5 μL/min, 30 s/次)。

1.3 数据统计与分析

采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 比

较组间差异并进行最小显著差异检验(LSD)(软件 SPSS 21.0), $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极显著; 作图采用 GraphPad Prism 8.2.1 软件; 试验均重复 3 次以上, 分析结果以“平均值±标准差”形式表示。

2 结果

2.1 不同植物乳杆菌菌株对发酵黑大麦富集多酚效果的影响

首先分析利用希氏乳杆菌(1号)、发酵乳杆菌(2号)、双科特迪瓦乳杆菌(3号)及北里乳杆菌(4号)发酵黑大麦后各菌株对多酚富集作用的影响, 结果如表 2 所示, 与未发酵组相比, 发酵 24 h 时, 4 株菌均可显著增加发酵黑大麦中多酚的含量, 而继续延长发酵时间至 48 h 未见多酚含量的继续增加。其中, 4 号菌在发酵 24 h 时对多酚的富集作用略优于其它 3 个菌株, 因此在后续工艺优化试验前进一步考察 4 种菌在不同发酵工艺条件下对多酚的富集作用。

表 2 不同菌株发酵后黑大麦的多酚含量(mg/g)

菌株	发酵时间/h	
	24	48
空白	0.41 ± 0.02	0.40 ± 0.01
希氏乳杆菌(1号)	0.50 ± 0.01*	0.43 ± 0.01
发酵乳杆菌(2号)	0.50 ± 0.00*	0.50 ± 0.02
双科特迪瓦乳杆菌(3号)	0.49 ± 0.01*	0.47 ± 0.02
北里乳杆菌(4号)	0.52 ± 0.01*	0.50 ± 0.01*

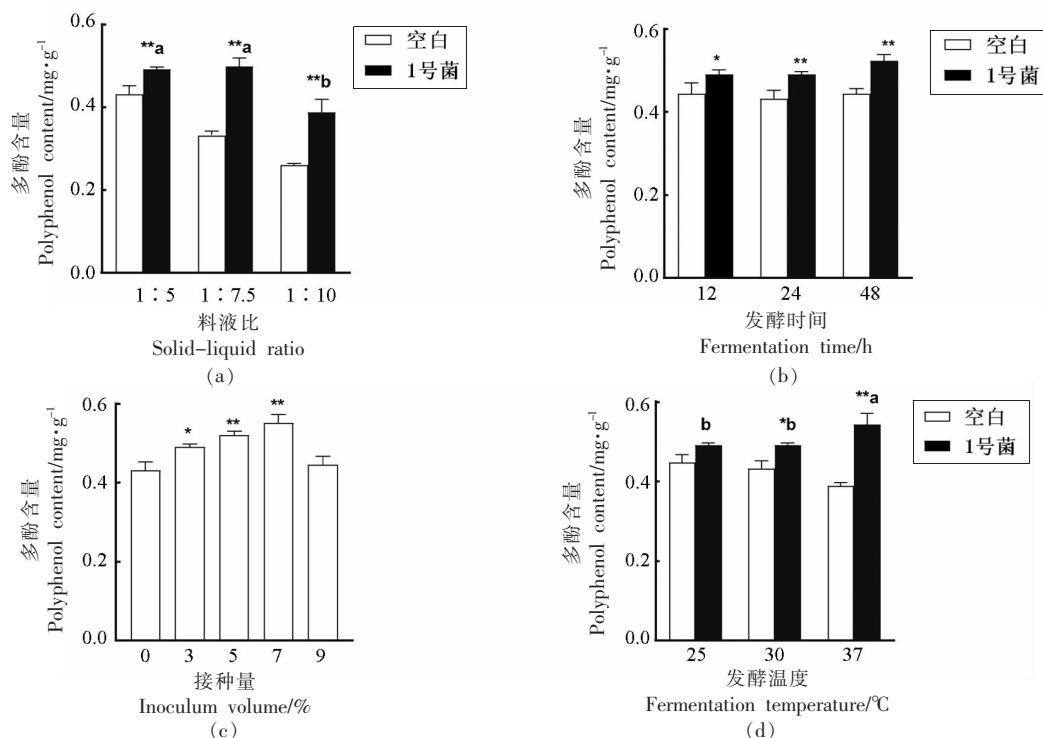
注: * 表示与空白相比, 具有显著差异($P<0.05$)。

2.2 不同发酵工艺对植物乳杆菌富集发酵黑麦中多酚的影响

2.2.1 希氏乳杆菌 图 2 为不同料液比、发酵时间、接种量和发酵温度对 1 号菌希氏乳杆菌发酵黑大麦富集多酚能力的影响。结果表明, 在不同料液比下(图 2a), 其发酵富集多酚的能力均显著高于未接种的空白对照组($P<0.01$), 而当料液比从 1:5 升至 1:7.5 时, 多酚含量无显著差异($P>0.05$), 当料液比提高至 1:10 时多酚含量反而降低($P<0.05$)。图 2b 显示接种希氏乳杆菌发酵 12, 24, 48

h 时均表现出显著富集多酚的能力 ($P < 0.05$), 而各发酵时间下多酚富集效果差异并不显著。当希氏乳杆菌接种量从 3% 升至 7% 时, 多酚含量呈上升趋势 (图 2c), 均显著高于空白对照组 ($P < 0.05$), 而

当接种量达到 9% 时多酚含量显著降低 ($P < 0.01$), 且与空白对照组无差别。从图 2d 可以看出, 发酵温度为 30 °C 和 37 °C 有利于多酚富集 ($P < 0.05$), 且 37 °C 发酵优于 30 °C 发酵。



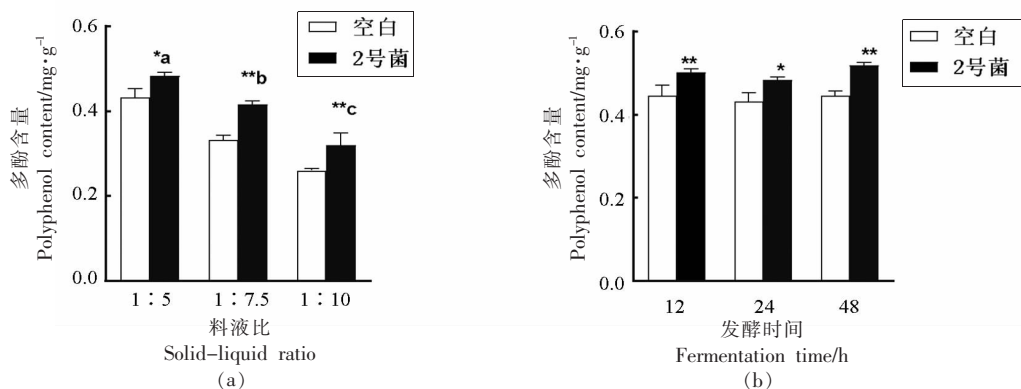
注:与空白组相比,*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$; a, b, c 表示各发酵处理组之间具有显著差异 ($P < 0.05$), 下同。

图 2 不同发酵条件对希氏乳杆菌富集多酚的影响

Fig.2 Effects of *Lactobacillus hilgardii* on polyphenols enrichment under different fermentation conditions

2.2.2 发酵乳杆菌 图 3 为不同料液比、发酵时间、接种量和发酵温度对 2 号菌株发酵乳杆菌富集多酚能力的影响。与未接种的空白组相比,不同料液比下发酵乳杆菌均表现出显著富集多酚的能力 ($P < 0.05$) (图 3a), 而随着料液比的增加多酚富集能力呈下降趋势 ($P < 0.05$)。与发酵前相比,不同发酵时间 (12, 24, 48 h) 下发酵乳杆菌发酵液多酚

含量均显著增加 ($P < 0.05$), 但不同发酵组间无差异 (图 3b)。从图 3c 可以看出, 接种发酵乳杆菌发酵后多酚含量均显著高于未接种组 ($P < 0.05$), 且多酚含量随着接种量的增加而升高。在 25, 30 °C 和 37 °C 发酵温度条件下均有利于发酵乳杆菌发酵黑大麦后对多酚的富集 ($P < 0.01$), 各发酵温度间无显著差异 (图 3d)。



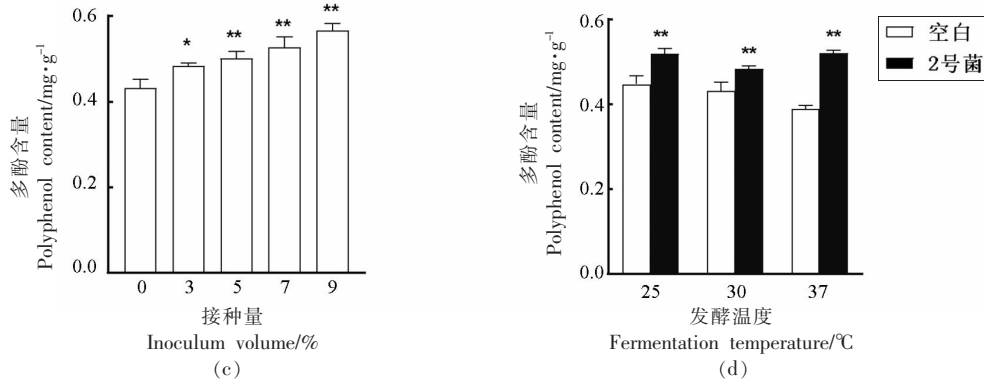


图 3 不同发酵条件对发酵乳杆菌富集多酚的影响

Fig.3 Effects of *Lactobacillus fermentum* on polyphenols enrichment under different fermentation conditions

2.2.3 双科特迪瓦乳杆菌 图 4 为不同料液比、发酵时间、接种量和发酵温度对 3 号菌双科特迪瓦乳杆菌富集多酚能力的影响。与未接种的空白组相比,不同料液比下双科特迪瓦乳杆菌发酵均可显著富集多酚($P<0.01$),而随着料液比的增加多酚富集能力逐渐降低($P<0.05$)(图 4a)。从图 4b 可以看出,发酵 24 h 和 48 h 后黑大麦发酵液中多

酚含量均显著高于空白组($P<0.01$),但发酵 24 h 与 48 h 之间无显著差异。图 4c 表明,接种量对双科特迪瓦乳杆菌发酵黑大麦多酚的富集有显著影响($P<0.01$),且随着接种量的增加总体呈上升趋势。图 4d 数据表明,发酵温度对双科特迪瓦乳杆菌富集多酚的影响差异不显著。

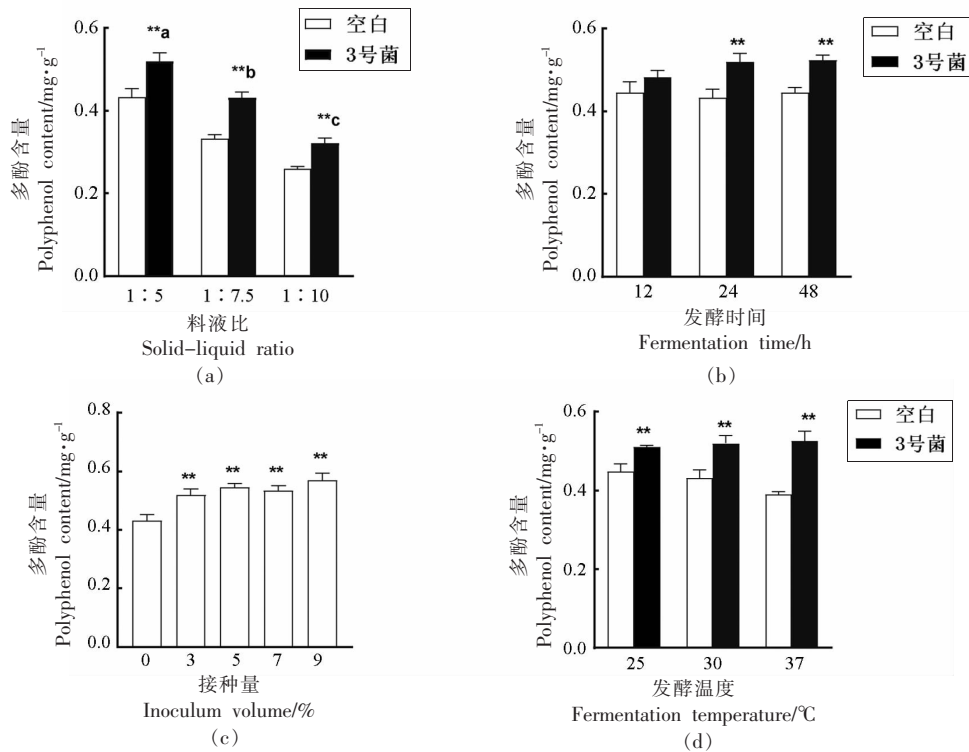


图 4 不同发酵条件对双科特迪瓦乳杆菌富集多酚的影响

Fig.4 Effects of *Lactobacillus diolivorans* on polyphenols enrichment under different fermentation conditions

2.2.4 北里乳杆菌 图 5 为不同料液比、发酵时间、接种量和发酵温度对 4 号菌北里乳杆菌富集多酚能力的影响。与空白对照组相比,在不同料液比下利用北里乳杆菌发酵均可显著富集多酚 ($P < 0.01$) (图 5a),但随着料液比的增加多酚富集效果下降 ($P < 0.05$)。如图 5b 所示,发酵时间对北里乳杆菌富集多酚的效果有显著影响,在发酵时间 12~24 h 范围内,随着发酵时间的延长,多酚含量

显著增加 ($P < 0.01$),当发酵时间延长至 48 h 时,多酚含量反而显著降低 ($P < 0.05$)。不同北里乳杆菌接种量的发酵液中多酚含量均显著高于空白组,其中接种量为 3% 时多酚富集能力最强 ($P < 0.01$),但与其它组无显著差异 (如图 5c 所示)。发酵温度也会显著影响北里乳杆菌富集多酚的能力 ($P < 0.05$),其中 30 °C 发酵富集多酚效果优于 25 °C 和 37 °C ($P < 0.05$) (图 5d)。

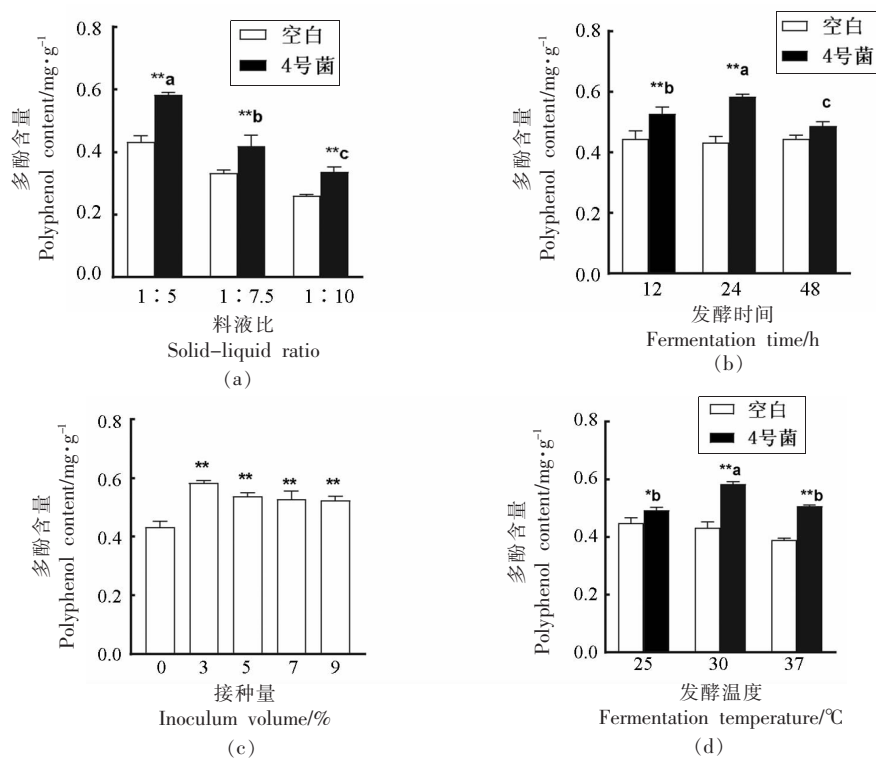


图 5 不同发酵条件对北里乳杆菌富集多酚的影响

Fig.5 Effects of *Lactobacillus kisonensis* on polyphenols enrichment under different fermentation conditions

2.3 发酵全谷物黑大麦富集多酚工艺条件的优化

2.2 节中单因素实验结果表明料液比、发酵时间、接种量及菌种均会影响发酵对黑大麦多酚的富集效果,因此,本研究以单因素实验结果为基础,以多酚含量(mg/g)为考察指标,通过正交试验进一步优化发酵工艺条件(见表 1),结果如表 3 所示。根据正交实验结果可知,影响发酵富集黑大麦多酚的各因素主次顺序为:料液比>接种量>发酵时间>菌种,优化发酵条件参数为料液比 1:5、发酵时间 24 h、接种量 9%和 4 号菌(北里乳杆菌)。

2.4 发酵黑大麦富集多酚优化工艺条件的验证

根据图 2~5 结果,不难发现接种 7% 的 1 号菌、9% 的 2 号菌、9% 的 3 号菌、3% 的 4 号菌后发酵黑大麦多酚富集效果最好,表明不同菌种及接种量对多酚富集作用的影响和差异。因此,验证试验根据 2.3 节正交试验结果,选用 4 号菌(北里乳杆菌)为发酵菌种,料液比为 1:5 及发酵时间为 24 h,发酵温度为 30 °C,进一步明确其接种量分别为 3%,6%和 9%时对多酚富集作用的影响,结果如表 4 所示。从表中结果可看出按 3%,6%,9%接种量接种北里乳杆菌发酵后,多酚富集较未发酵组

分别增加了 1.05, 0.95, 0.91 倍。由于 3% 接种量多酚富集效果好且成本低, 故利用北里乳杆菌发酵黑大麦富集多酚的优化发酵条件为料液比 1:5、发

酵时间 24 h、接种量 3%, 且该条件下多酚含量达到 $(0.88 \pm 0.02) \text{ mg/g}$ 。

表 3 黑大麦发酵富集多酚工艺条件优化结果

Table 3 The optimization results of fermentation condition for the enrichment of polyphenol in black barley

试验号	因素				多酚含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
	料液比(A)	时间(B)/h	接种量(C)/%	菌种(D)	
1	1:5	12	3	1号	0.6127
2	1:5	24	6	3号	0.6872
3	1:5	48	9	4号	0.6969
4	1:7.5	12	6	4号	0.5563
5	1:7.5	24	9	1号	0.5973
6	1:7.5	48	3	3号	0.5318
7	1:10	12	9	3号	0.4835
8	1:10	24	3	4号	0.4647
9	1:10	48	6	1号	0.4937
k_1	0.6789	0.5508	0.5563	0.5679	
k_2	0.5618	0.5831	0.5791	0.5510	
k_3	0.4806	0.5741	0.5926	0.5725	
极差 r	0.1983	0.0323	0.0363	0.0215	
主次顺序			$A > C > B > D$		
优组合			$A_1 B_2 C_3 D_3$		

表 4 北里乳杆菌不同接种量对发酵黑大麦多酚含量的影响

Table 4 Effect of different inoculation amount of *Lactobacillus kisonensis* on polyphenol enrichment in fermented black barley

	接种量/%			
	0	3	6	9
多酚含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	0.43 ± 0.02	$0.88 \pm 0.02^{\Delta}$	$0.84 \pm 0.03^{\Delta}$	$0.82 \pm 0.01^{\Delta}$
增加倍数(较空白组)	-	1.05	0.95	0.91

注: Δ 表示与空白组相比, 有极显著差异 ($P < 0.01$)。

2.5 利用 UPLC-Q-TOF-MS^E 分析发酵黑大麦多酚类化合物组成

本研究进一步利用 UPLC-Q-TOF-MSE 技术结合靶向代谢组学技术分析黑大麦发酵物中多酚类物质组成, 利用北里乳杆菌发酵黑大麦差异代谢物总离子流图及多酚类物质组成和分布情况分别如图 6 和图 7 所示。在黑大麦发酵液提取物中共检测到 16 种差异代谢物, 其中矮茶素、肉桂酸、麦芽酚、儿茶素、茺花素、反式香豆酸、咖啡酸、无色花青素、阿魏酸等酚类物质含量在发酵后显著提高 ($P < 0.05$), 分别较未发酵黑大麦提高 3.82, 7.95, 1.38, 0.21, 0.43, 1.40, 0.37, 0.36 倍和 0.33 倍; 此外丁香酸和藜芦酸, 这两种物质只在 4 号菌接

种发酵液中被检出。提示利用北里乳杆菌发酵(料液比 1:5、4 号菌接种量 3%、发酵时间 24 h、发酵温度 30 °C)较有利于黑大麦中酚类物质的富集。

3 讨论

本研究以全谷物黑大麦为发酵底物, 以多酚富集为目的, 利用不同的植物乳杆菌进行发酵, 在建立优化发酵工艺的基础上, 利用 UPLC-Q-TOF-MS^E 进一步分析植物乳杆菌发酵黑麦上清液中部分多酚物质的组成及相对丰度。

黑大麦富含淀粉, 多酚类物质容易进入淀粉螺旋内腔形成复合物, 这种复合物有利于保护多酚的活性和调节多酚的释放; 此外, α -淀粉酶对淀

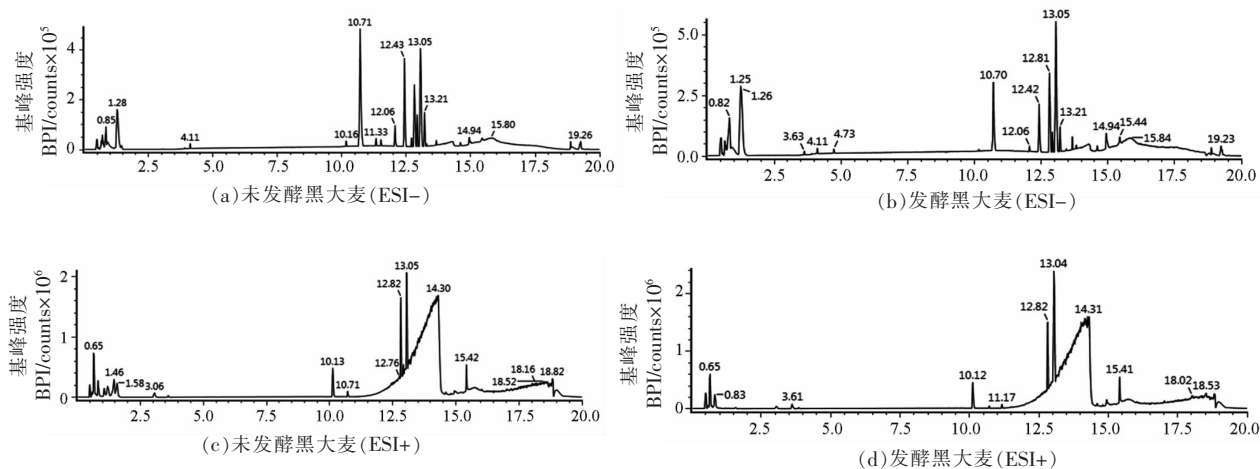


图 6 北里乳杆菌发酵黑大麦差异代谢物总离子流图

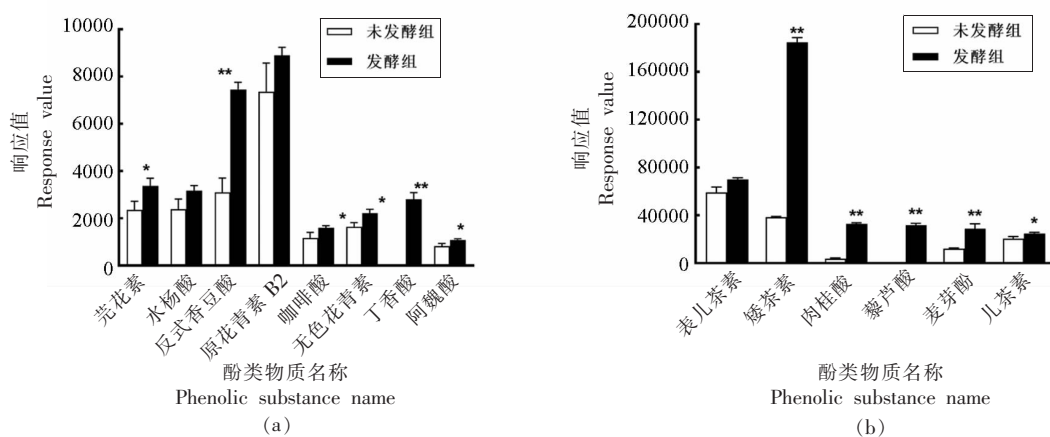
Fig.6 Total ion chromatogram of differential metabolites in black barley fermented by *Lactobacillus kisonensis* (JCM15041)

图 7 北里乳杆菌发酵黑大麦中多酚类物质组成和分布情况

Fig.7 Composition and distribution of polyphenols in black barley fermented by *Lactobacillus kisonensis* (JCM15041)

粉-多酚复合物的酶解作用会影响结合型多酚的释放^[15-16]。在糖化温度 70 °C 条件下,黑大麦颗粒淀粉发生糊化,淀粉颗粒结构被破坏而形成单分子,淀粉-多酚复合物结构也被破坏,有利于多酚类物质的释放。

本研究还发现料液比对多酚富集效果有显著影响,其中在料液比 1:5 条件下,可能由于黑大麦淀粉糊化已经接近饱和状态,富营养环境中有利于微生物的生物转化作用,从而促进多酚物质的形成,而料液比过高反而减少了微生物次级代谢产物形成所需要的营养物质;此外,料液比过高会降低 α -淀粉酶与淀粉-多酚复合物的接触量,不利于充分酶解,多酚释放量随之减少。1 号菌、2 号

菌和 3 号菌富集多酚能力随着发酵时间的延长而增强,这与发酵过程中黑大麦细胞壁通透性改变、微生物代谢作用和胞外酶的酶促作用有关;而北里乳杆菌(4 号菌)多酚富集能力在发酵时间 48 h 下反而减弱,可能是由于较长的发酵时间使多酚被氧化和发酵菌种的活性下降所致,在本研究中,发酵菌种和发酵时间均会影响植物乳杆菌多酚富集效果,这与王猛等^[17]和翟飞红等^[12]的研究结果相一致。

植物乳杆菌接种量对多酚富集效果也具有显著影响,这是因为植物乳杆菌在发酵过程中通过次级代谢途径产生酚类物质,促进酚类物质富集,而过高的接种量会导致发酵底物不能满足乳杆菌

生长繁殖的需求,加快酒精、酸等产物的积累,从而对多酚的积累产生抑制作用^[18]。这种变化趋势与张桂芳等^[19]的研究结果基本一致。此外,发酵过程中产生的氧化酶等物质对发酵液中多酚物质具有破坏作用,也会造成多酚含量下降^[20]。本研究中,发酵温度对多酚富集效果也有影响,温度从25℃上升至30℃,有利于多酚积累,而随着温度继续升高(37℃),可能是由于酒精和酸类等物质累积加快,反而抑制多酚产生,表明适宜的发酵温度(30~32℃)更有利于植物乳杆菌生长和活性物质的富集^[21]。

经北里乳杆菌发酵,黑大麦中矮茶素、儿茶素、麦芽酚、藜芦酸、荜花素、反式香豆酸、咖啡酸、无色花青素、丁香酸、阿魏酸等物质显著增加,表明北里乳杆菌发酵对黑大麦中酚类物质具有较好的富集作用。类似地,已有利用发酵富集谷物酚类物质的报道。Călinoiu等^[22]发现酵母菌固态发酵后小麦麸皮和燕麦麸皮中香草酸、阿魏酸、二羟基苯甲酸等酚酸物质含量显著提高;徐磊等^[23]以米根霉发酵脱脂薏米麸皮,可使丁香酸、绿原酸、阿魏酸等酚类物质含量显著提高。可见,发酵是富集谷物中多酚物质和提高谷物营养价值的重要技术手段,可用于功能性全谷物食品基料的开发。

4 结论

本文探讨不同发酵工艺参数对黑大麦富集多酚的影响。结果表明发酵菌种、料液比、发酵时间和接种量均会影响发酵对黑大麦中多酚的富集效果。利用正交试验进一步明确黑大麦最优发酵条件参数为:料液比1:5、发酵时间24h、接种量3%、北里乳杆菌和发酵温度30℃。经北里乳杆菌发酵后,黑大麦中丁香酸和藜芦酸、矮茶素、麦芽酚、儿茶素、肉桂酸、咖啡酸、阿魏酸等酚类物质丰度显著提高。利用发酵加工全谷物富集多酚等活性成分是提高谷物营养价值的重要手段,并可用于功能性全谷物食品基料的开发。

参 考 文 献

[1] 臧慧,陈和,陈健,等.黑大麦的营养价值及其开发利用前景[J].江苏农业科学,2012,40(3):13-

14.

ZANG H, CHEN H, CHEN J, et al. Nutritional value of black barley and its development and utilization prospect [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2012, 40(3): 13-14.

[2] GOUDAR G, SHARMA P, JANGHU S, et al. Effect of processing on barley β -glucan content, its molecular weight and extractability [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 162: 1204-1216.

[3] XIONG Y, ZHANG P, WARNER R D, et al. Cereal grain-based functional beverages: From cereal grain bioactive phytochemicals to beverage processing technologies, health benefits and product features [J]. Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 2020, 62(9): 2404-2431.

[4] ZHAO Y S, WU C, BAI J, et al. Fermented barley extracts with *Lactobacillus plantarum* dy-1 decreased fat accumulation of *Caenorhabditis elegans* in a daf-2-dependent mechanism [J]. Journal of Food Biochemistry, 2020, 44(11): e13459.

[5] IDEHEN E, TANG Y, SANG S. Bioactive phytochemicals in barley [J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2017, 25(1): 148-161.

[6] RAO S, SANTHAKUMAR A B, CHINKWO K A, et al. Chemopreventive potential of cereal polyphenols [J]. Nutrition and Cancer, 2018, 70(6): 913-927.

[7] JIANG Z H, CHEN C, XIE W Y, et al. Anthocyanins attenuate alcohol-induced hepatic injury by inhibiting pro-inflammation signalling [J]. Natural Product Research, 2016, 30(4): 469-473.

[8] 陈楠,戴传云.利用多菌种生产传统发酵食品研究进展[J].食品科学,2013,34(3):308-311.

CHEN N, DAI C Y. Multi-starter cultivation for preparation of traditionally fermented foods [J]. Food Science, 2013, 34(3): 308-311.

[9] 张慧芸,陈俊亮,康怀彬.发酵对几种谷物提取物总酚及抗氧化活性的影响[J].食品科学,2014,35(11):195-199.

ZHANG H Y, CHEN J L, KANG H B. Effect of fermentation on total polyphenol content and antioxidant activity of cereal extract [J]. Food Science, 2014, 35(11): 195-199.

[10] 姚芳,肖香,董英.大麦乳酸菌发酵液粉中多酚的提取及其抗氧化性研究[J].食品工业科技,2017,

- 38(10): 211–216, 235.
- YAO F, XIAO X, DONG Y. Extraction and antioxidant activity of polyphenols from barley *Lactobacillus* fermented solution [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(10): 211–216, 235.
- [11] 刘秉杰, 崔春丹, 陈中. 乳杆菌发酵对黑米多酚提取量和抗氧化性的影响[J]. 食品科技, 2022, 47(7): 182–187.
- LIU B J, CUI C D, CHEN Z. Effects of *Lactobacillus* fermentation on polyphenol extraction content and antioxidant activity of black rice[J]. Food Science and Technology, 2022, 47(7): 182–187.
- [12] 翟飞红, 王琪, 刘艺, 等. 姬松茸固态发酵对谷物主要营养成分的影响[J]. 食品工业科技, 2015, 36(6): 212–215.
- ZHAI F H, WANG Q, LIU Y, et al. Effect of solid-state fermentation with *Agaricus blazei* Murrill on main nutritional components of grains[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(6): 212–215.
- [13] WU C Q, CHEN F, WANG X, et al. Antioxidant constituents in feverfew (*Tanacetum parthenium*) extract and their chromatographic quantification [J]. Food Chemistry, 2006, 96(2): 220–227.
- [14] DJERIDANE A, YOUSFI M, NADJEMI B, et al. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds [J]. Food Chemistry, 2006, 97(4): 654–660.
- [15] 赵蓓蓓, 贾祥泽, 孙思薇, 等. 淀粉-多酚复合物理化及功能特性的研究进展[J]. 食品科学, 2018, 39(13): 297–303.
- ZHAO B B, JIA X Z, SUN S W, et al. Advances in physicochemical and functional properties of starch-polyphenol complex[J]. Food Science, 2018, 39(13): 297–303.
- [16] DENG N, DENG Z, TANG C, et al. Formation, structure and properties of the starch-polyphenol inclusion complex: A review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 112: 667–675.
- [17] 王猛, 郭静, 陆俊. 乳酸菌发酵对有色米多酚含量及其抗氧化活性影响研究[J]. 粮食与油脂, 2021, 34(8): 43–47.
- WANG M, GUO J, LU J. The effect on polyphenols content and antioxidant activity of pigmented rice by lactic acid bacteria fermentation[J]. Cereals and Oils, 2021, 34(8): 43–47.
- [18] 李相禹, 韦青海, 彭佳丽, 等. 植物乳杆菌发酵富集猕猴桃多酚工艺优化及其对多酚生物可及性的影响[J]. 食品科技, 2020, 45(11): 15–20.
- LI X Y, WEI Q H, PENG J L, et al. Process optimization of polyphenol accumulation in kiwifruit fermented with *Lactobacillus plantarum* and the effect on bioaccessibility of polyphenol[J]. Food Science and Technology, 2020, 45(11): 15–20.
- [19] 张桂芳, 郭希娟, 张东杰, 等. 益生菌发酵小米浆的工艺研究[J]. 粮油食品科技, 2016, 24(4): 90–93.
- ZHANG G F, GUO X J, ZHANG D J, et al. Probiotics fermentation process of millet pulp[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2016, 24(4): 90–93.
- [20] 张晶, 左勇, 谢光杰, 等. 发酵条件对猕猴桃果酒中多酚含量的影响[J]. 食品工业科技, 2017, 38(9): 160–163, 167.
- ZHANG J, ZUO Y, XIE G J, et al. Influence of fermentation conditions on the yield of polyphenols in kiwi fruit wine [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(9): 160–163, 167.
- [21] 王超凯, 刘绪, 张磊, 等. 产 γ -氨基丁酸乳酸菌的筛选及发酵条件初步优化[J]. 食品与发酵科技, 2012, 48(1): 36–39.
- WANG C K, LIU X, ZHANG L, et al. Selection of lactic acid bacteria for γ -aminobutyric acid production and optimization of fermentation conditions[J]. Food and Fermentation Technology, 2012, 48(1): 36–39.
- [22] CĂLINOIU L F, CTOI A F, VODNAR D C. Solid-state yeast fermented wheat and oat bran as a route for delivery of antioxidants[J]. Antioxidants, 2019, 8(9): 372.
- [23] 徐磊, 高珊, 王心, 等. 米根霉发酵对脱脂薏米麸皮营养成分及抗氧化活性的影响[J]. 中国粮油学报, 2021, 36(2): 16–22.
- XU L, GAO S, WANG X, et al. Effects of *Rhizopus oryzae* fermentation on nutrient composition and antioxidant activity of defatted coix barley bran[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2021, 36(2): 16–22.

Effects of *Lactobacillus plantarum* Fermentation on Enrichment of Polyphenols in Whole Grain Black Barley

Nie Pan, Ding Xinwen, Wu Yan, Song Lihua*

(College of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240)

Abstract This study was aimed to investigate the effects of different *Lactobacillus* and fermentation conditions on the enrichment of polyphenols in whole grain black barley, in which No.1 *Lactobacillus hilgardii* (DSMZ 20051), No.2 *Lactobacillus fermentum* (DSMZ 20052), No.3 *Lactobacillus diolivorans* (DSMZ 14421) and No.4 strains *Lactobacillus kisonensis* (JCM15041) were used in the fermentation. The results showed that different fermentation strains had significant effects on polyphenols enrichment of black barley ($P<0.05$). The polyphenols enrichment effect of No.4 strains *Lactobacillus kisonensis* (JCM15041) was better than other three strains. The optimal fermentation conditions were established as follows via single factor and orthogonal experiments: solid-liquid ratio 1:5, inoculum volume of No.4 strains 3%, fermentation time 24 h, fermentation temperature 30 °C. Under these optimized conditions, the polyphenols content reached (0.88 ± 0.016) mg/g, which was 1.05 times higher than that of unfermented black barley. Some of polyphenols compounds such as bergenin, cinnamic acid, maltol, catechin, genkwanin, trans-coumaric acid, caffeic acid, anthocyanidin, and ferulic acid were identified in the extract of black barley fermentation broth by using the targeted metabolomics analysis of UPLC-Q-TOF-MS^E, which were 3.82, 7.95, 1.38, 0.21, 0.43, 1.40, 0.37, 0.36 times and 0.33 times higher than that of unfermented black barley ($P<0.05$). Additionally, syringic acid and veratric acid were only detected in fermented black barley. In conclusion, fermentation of black barley with *Lactobacillus kisonensis* (JCM15041) could effectively enrich polyphenols, which can be used for the preparation of functional whole grain food material.

Keywords black barley; *Lactobacillus plantarum*; polyphenol enrichment; UPLC-Q-TOF-MS^E