

植物乳杆菌 YHG1-155 发酵沙棘汁促糖苷类多酚生物转化

陈彦辉, 李亚凤, 李璞钰, 庄姣, 高岩, 剧柠*

(宁夏大学食品科学与工程学院 银川 750021)

摘要 发酵有助于糖苷类多酚向苷元类多酚转化, 在提高生物利用度的同时, 提升产品的风味。本研究通过植物乳杆菌 YHG1-155 发酵沙棘汁, 分析其体外抗氧化活性的变化, 探究发酵过程中多酚化合物的生物转化。结果显示, 发酵提高了沙棘汁的活菌数、游离酚含量、总酚含量和抗氧化活性。采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)技术从发酵沙棘汁中共鉴定出 116 种差异代谢物。其中, Y2 v.s. Y4 组, Y4 v.s. Y8 组以及 Y2 v.s. Y8 组分别鉴定出 67 种(53 种上调和 14 种下调), 64 种(32 种上调和 32 种下调)和 116 种(74 种上调和 42 种下调)差异代谢物。KEGG 通路富集分析表明, Y2 v.s. Y4 组的 18 种以及 Y4 v.s. Y8 组的 13 种差异代谢物主要参与 3 条生物合成途径, 即次生代谢物的生物合成途径、类黄酮的生物合成途径以及黄酮和黄酮醇的生物合成途径。其中, 次生代谢物的生物合成途径是沙棘多酚转化的重要通路, 多酚糖苷可能主要通过该途径向苷元转化。本研究从代谢组学角度揭示植物乳杆菌 YHG1-155 发酵对沙棘多酚糖苷的生物转化的影响, 为沙棘精深加工提供理论参考。

关键词 发酵沙棘汁; 植物乳杆菌 YHG1-155; 酚类化合物; 代谢组学

文章编号 1009-7848(2024)11-0289-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.11.027

多酚化合物是沙棘果中重要的生物活性物质, 含量高达 110~210 mg/100 g^[1-2]。从沙棘果中鉴定出来的多酚类化合物近 100 种, 主要分为黄酮、酚酸以及水解单宁 3 大类化合物^[3]。沙棘中的多酚主要以糖苷形式存在, 小部分以游离苷元的形式存在^[4]。糖苷类多酚分子质量大, 渗透性差, 难以通过肠壁进入血液被机体有效利用^[5-6]。多酚的低生物利用率严重影响沙棘在医药保健和功能食品领域的开发和利用。此外, 沙棘汁中大量的有机酸和糖苷类多酚造成的沙棘强收敛性的口感, 对其在食品领域的加工利用也带来很大挑战。

研究表明, 乳酸菌发酵可以产生一系列的碳水化合物水解酶, 如 β -葡萄糖苷酶、纤维素酶、木聚糖酶等, 可有效将多酚的糖苷形式转化为苷元形式, 从而提高食品的感官品质和生物利用度^[7-9]。Tkacz 等^[4]研究了不同植物乳杆菌菌株(DSM 10492、20174 和 6872)发酵对沙棘汁和沙棘苹果汁中酚类化合物含量及其抗氧化活性的影响, 发

现其发酵汁中黄酮醇含量和抗氧化活性增加。Shen 等^[10]研究了发酵沙棘汁对饮食诱导代谢综合征的影响及其机制, 采用酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、植物乳杆菌 T17、HN9 和醋酸杆菌(*Acetobacter aceti*)顺序接种发酵沙棘汁, 提高了沙棘汁的抗氧化和抗糖尿病活性。Liu 等^[11]结合电子鼻和电子舌技术分析乳酸菌发酵沙棘汁的感官和风味特性, 发现发酵的沙棘汁苦味和涩味响应值显著降低, 挥发性化合物含量显著增加。乳酸菌发酵沙棘汁, 可将沙棘汁中口感尖锐的苹果酸脱羧为柔和的乳酸, 有效改良沙棘汁的口感、风味^[12-13], 更重要的是可将沙棘中涩味来源的大分子糖苷形式多酚类物质转化为小分子苷元类物质^[14], 从而提高多酚化合物的利用度^[15]。

目前, 发酵过程中沙棘汁中的多酚类化合物, 特别是糖苷形式的多酚类化合物通过何种生物途径向苷元形式转化尚不清晰。本研究采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLCMS/MS)方法, 用植物乳杆菌 YHG1-155 发酵沙棘汁, 分析发酵过程中的多酚代谢物, 明确关键多酚类化合物转变。通过 KEGG 数据库富集分析其参与的相关代谢通路, 探讨沙棘汁发酵过程中多酚类化合物的转化过程。

收稿日期: 2023-11-30

基金项目: 宁夏回族自治区自然科学基金项目(2022AAC03023); 宁夏回族自治区重点研发计划项目(2021BEF02022)

第一作者: 陈彦辉, 男, 硕士, 助理工程师

通信作者: 剧柠 E-mail: juning1122@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

沙棘果(*Hippophae rhamnoides* subsp. *Sinensis Rousi*),购自内蒙古科鸿科技有限公司,4℃冷藏运输至实验室。植物乳杆菌(*L. plantarum*) YHG1-155分离自自然发酵的宁夏浆水中,保藏于宁夏大学食品科学与工程学院微生物实验室。菌株在试验前进行纯化与活化,经MRS液体培养基,37℃、24 h培养,连续传代3次,用于后续试验。

有机酸标准品、Trolox标准品(色谱纯级),上海源叶生物科技有限公司;甲醇、乙腈(色谱纯级),德国Meker公司;1,1-二苯基-2-三硝基苦肼(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)[2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS],上海麦克林生化科技有限公司;所有分离用有机溶剂均为国产分析纯级。

1.2 设备与仪器

巴氏杀菌锅、BSP-150恒温培养箱,上海博迅实业有限公司;RE-2000A旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;PHS-2F pH计、752N紫外-可见分光光度计,上海仪电科学仪器股份有限公司;NexeraX2超高效液相色谱仪,日本岛津公司;4500 QTRAP三重四级杆线性离子阱质谱仪,美国Applied Biosystems公司。

1.3 方法

1.3.1 发酵沙棘汁的制备 沙棘果经筛选、清洗、压榨得到过滤后的汁液。果汁中加入6.0%白砂糖混匀,巴氏杀菌(80℃,10 min)后冷却至室温。将沙棘汁与灭菌蒸馏水按照体积比1:4的比例混合,然后按3.0%接种量接种活化好的YHG1-155菌株,30℃发酵10 d,分别于0,2,4,6,8 d和10 d采集样品进行分析。

1.3.2 植物乳杆菌发酵沙棘汁的活菌数与pH值和总酸的测定

1.3.2.1 乳酸菌菌落计数 参考国家标准《食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验》(GB 4789.35-2016)^[16]中的方法进行测定。

1.3.2.2 pH值和总酸的测定

1) pH值的测定 参考国家标准《食品安全

国家标准 食品中pH值的测定》(GB 5009.237-2016)^[17]中的方法进行测定。

2) 总酸的测定 参考国家标准《食品安全国家标准 食品中总酸的测定》(GB 12456-2021)^[18]中的方法进行测定,用0.05 mol/L NaOH标准溶液直接滴定沙棘汁样品(2 mL),总酸质量浓度以苹果酸计。

1.3.3 植物乳杆菌发酵沙棘汁的游离酚、结合酚、总酚含量的测定

1.3.3.1 多酚提取 根据You等^[19]的方法进行游离酚和结合酚的提取,并做适当修改。

1) 游离酚的提取 将0.5 mL发酵沙棘汁与15 mL酸化甲醇($V_{80\% \text{ 甲醇}}:V_{1\% \text{ 盐酸}}=1:1$)涡旋混匀,并在超声水浴中以固定频率24 kHz处理30 min。随后,将该混合物在4 000 r/min的条件下离心10 min(3次)。上清液在45℃下真空浓缩以蒸发溶剂,并溶解在10 mL的色谱级甲醇中,即为游离酚提取液。

2) 结合酚的提取 提取游离酚后产生的残留物依次用2 mol/L NaOH、2 mol/L HCl进行碱水解和酸水解。首先,用15 mL 2 mol/L NaOH在30℃条件下水解残留物4 h,并在氮气下振荡。水解完成后,将该混合物用2 mol/L HCl酸化至pH=2,然后立即以4 000 r/min离心10 min,上清液用等体积的乙酸乙酯提取3次。碱水解后,用15 mL 2 mol/L HCl在85℃下将剩余的残留物水解1 h,并将pH值调至2。将混合物立即以4 000 r/min离心10 min,然后上清液用等体积的乙酸乙酯提取3次。然后,将来自连续碱水解和酸水解的乙酸乙酯提取物合并、蒸发并用10 mL色谱级甲醇再溶解。所有酚类提取物均储存在-20℃下,以进行进一步测定。

1.3.3.2 多酚含量的测定 多酚含量的测定采用Folin-Ciocalteu方法测定,并稍作修改^[20]。

1) 游离酚、结合酚含量测定 将游离酚、结合酚提取液稀释一定倍数。取2 mL稀释液加入25 mL容量瓶中,加入1 mL福林酚试剂、13 mL 10% Na₂CO₃溶液,用蒸馏水定容25 mL,混匀。室温避光静置60 min,测定反应液在波长760 nm处的吸光值,代入标准曲线计算含量。

2) 总酚测定 取1 mL稀释50倍的沙棘汁样

品加入 10 mL 比色管中,加入 0.5 mL 福林酚试剂、6.5 mL 10% Na_2CO_3 溶液,混匀。室温避光静置 60 min,测定反应液在波长 760 nm 处的吸光值,代入标准曲线计算含量。

1.3.4 抗氧化活性的测定 DPPH 和 ABTS 自由基清除能力采用 Re 等^[21]的方法进行测定,并稍作修改。将 0.1 mL 沙棘汁加入到 3.9 mL ABTS 溶液中,室温避光静置 8 min,测定反应液在波长 734 nm 处的吸光值。类似地,将 0.1 mL 沙棘汁与 3.9 mL DPPH 甲醇溶液混合,室温避光静置 20 min,测定反应液在波长 517 nm 处的吸光值。Trolox 溶液作为参考标准绘制标准曲线,维生素 E 等量抗氧化能力(TEAC)值换算成 $\mu\text{mol/L}$ Trolox。

1.3.5 发酵沙棘汁中多酚的代谢组学检测

1.3.5.1 样品处理 根据沙棘汁发酵过程中的抗氧化活性和乳酸菌数的变化趋势,选择 3 个变化显著的样本点(第 2 天、第 4 天和第 8 天)研究发酵过程中沙棘汁中多酚的变化,分别装于 15 mL 的无酶管中,转至 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 超低温冰箱中备用。这 3 个样本点分别命名为 Y2、Y4 和 Y8,每个取样点取样设置 3 个重复。对比组指定为 Y2 v.s. Y4、Y4 v.s. Y8 和 Y2 v.s. Y8。

取出储存在 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中的样品,解冻,涡旋 10 s。取 3 mL 样品进行真空冷冻干燥。冻干后,加入 300 μL 的 70% 甲醇内标提取液,涡旋 3 min、超声 10 min,然后在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下以 12 000 r/min 离心 10 min。移取上清液,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤后,保存于进样瓶中,用于 LC-MS 检测。

1.3.5.2 UPLC-MS/MS 分析 仪器参数的设定参考张琴等^[22]的方法。

1.4 数据处理

所有试验均有 3 次重复,结果以“平均数 \pm 标准误差”表示。采用 SPSS v.17.0 进行单因素方差分析(ANOVA)。采用 Duncan's 检验对数据进行多重比较, $P<0.05$ 视为具有显著性差异。采用 Analyst 1.6.3 软件处理质谱数据,采用主成分分析(PCA)、聚类分析对发酵沙棘汁样本中的代谢物进行多元统计分析。根据正交偏最小二乘法判别分析法(Orthogonal partial least-squares discrimination analysis, OPLS-DA)判断模型稳定性和准确性。根据变量重要性投影(VIP)值、差异倍数

(Fold change, FC) 筛选出不同组间的差异代谢物。显著差异代谢物满足 $\text{FC} \geq 2$ 或 ≤ 0.5 ,且 $\text{VIP} \geq 1$ 2 个条件,并进行归一化处理。通过 R 3.5.1 软件对沙棘汁发酵过程中的显著差异代谢物进行聚类分析并绘制热图。利用 KEGG 数据库(<https://www.genome.jp/kegg/path-way.html>)对沙棘汁发酵过程中的代谢物进行通路分析。

2 结果与分析

2.1 沙棘汁发酵过程中活菌数和总酸、pH 值的变化

如图 1a 所示,采用平板计数法对植物乳杆菌 YHG1-155 的乳酸菌数进行测定,确定其生长能力。乳酸菌数在 10 d 的发酵过程中出现了 3 个明显的变化阶段。在沙棘汁发酵的初始阶段,乳酸菌数从刚开始的 8.11 lg(CFU/mL)略微下降到第 4 天的 8.09 lg(CFU/mL),该阶段为菌株进入新环境的适应阶段。随着发酵的进行,菌株逐步适应发酵环境,在 4~8 d 迅速上升,并在第 8 天生长到 8.36 lg(CFU/mL),该阶段发酵菌株表现的极为活跃。然后在 9~10 d 再次呈现下降的趋势。如图 1b 所示,发酵过程中,沙棘汁 pH 值波动范围在 3.13(2 d)~2.98(10 d)之间;与 Wu 等^[23]的报道一致,总酸质量浓度与 pH 值呈负相关关系,呈先下降后上升趋势。

2.2 发酵沙棘汁中游离酚、结合酚和总酚含量的变化

为了研究植物乳杆菌 YHG1-155 发酵对沙棘多酚类物质的影响,测定不同发酵阶段沙棘汁中的游离酚、结合酚和总酚含量,结果见图 2a。在沙棘汁发酵的前 4 d,游离酚含量较为稳定(69.61~66.33 mg/100 g),6~10 天内迅速增长,从 66.33 mg/100 g 上升至 102.98 mg/100 g。与游离酚的变化趋势相反,结合酚类含量在发酵的前 4 d 急剧增加(23.80~49.24 mg/100 g),然后在 6~10 d 缓慢下降(39.71~14.91 mg/100 g)。值得注意的是,在游离酚、结合酚含量变化显著的第 4 天,植物乳杆菌 YHG1-155 度过适应期开始增长(图 1a),这与 Li 等^[24]和 Li 等^[25]的报道相一致。因此,可能是植物乳杆菌 YHG1-155 的生长导致了沙棘汁中结合酚转化为游离酚,继而增加了发酵沙棘汁中总酚的含

量。此外,总酚含量在发酵4 d时急剧增加(从发酵前 90.77 mg/100 g 增加至 111.35 mg/100 g)直至发酵末期的 118.12 mg/100 g。这与植物乳杆菌 Lp39、C8-1 发酵枸杞汁^[26]和嗜热链球菌 CI-CC6220 发酵枣泥^[25]的报道一致。乳酸菌通过酶促

代谢将复杂的酚类化合物水解成更简单的游离形式来提高酚类化合物的生物利用度,或通过去糖基化释放细胞壁结合的酚类物质,从而增加总酚含量^[27]。

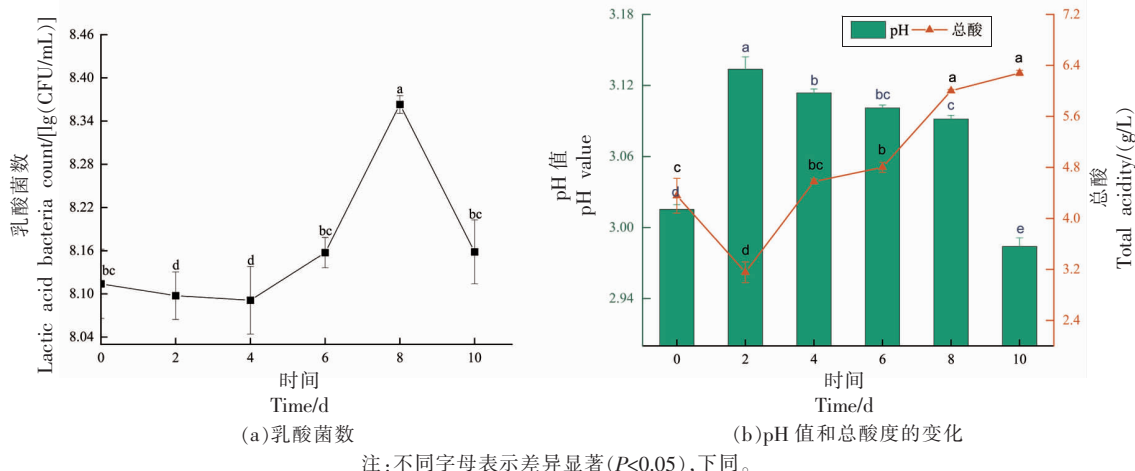


图1 沙棘汁乳酸菌发酵过程中乳酸菌数(a)以及 pH 值和总酸度的变化(b)

Fig.1 Change in lactic acid bacteria count (a) and pH value and total acidity (b) in sea buckthorn juice during process of LAB fermentation

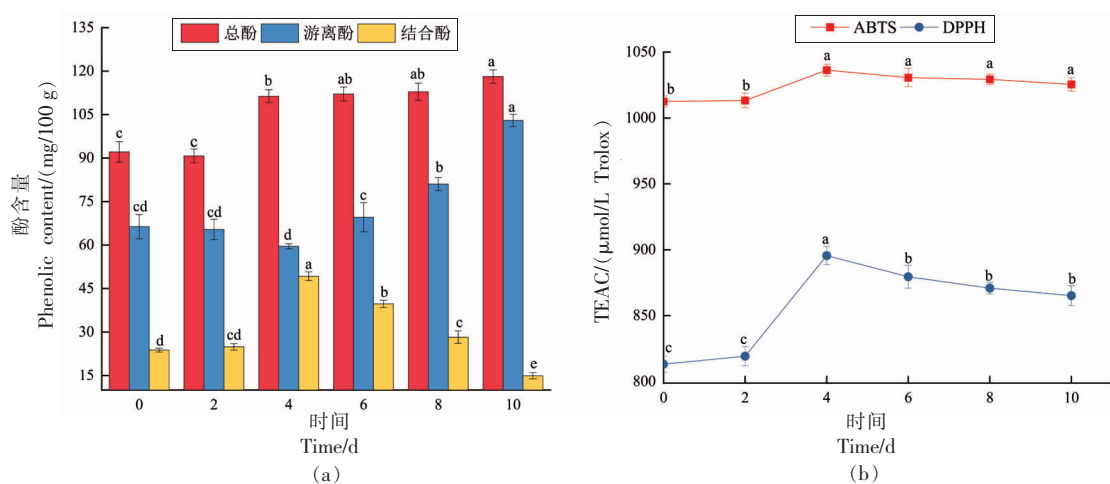


图2 沙棘汁乳酸菌发酵过程中游离、结合和总酚含量(a)及其 ABTS 和 DPPH 自由基清除能力(b)的变化

Fig.2 Changes in free, bound, and the total phenolic content (a) and ABTS and DPPH free radical scavenging capacity (b) of sea buckthorn juice during process of LAB fermentation

2.3 发酵沙棘汁抗氧化活性的变化

通过测定 DPPH 和 ABTS 2 种自由基清除能力,反映发酵沙棘汁抗氧化活性的动态变化。如图 2b 所示,2 种抗氧化指标均呈现相似趋势。TEAC 值测定显示,与未发酵沙棘汁相比,发酵沙棘汁的抗氧化能力总体增加。发酵后沙棘汁对 ABTS 和

DPPH 自由基清除能力均有所提高。发酵第 2 天,发酵沙棘汁的自由基清除能力开始增加,在第 4 天时最强($P < 0.05$),随后基本保持稳定($P > 0.05$)。乳酸菌发酵提高了沙棘汁抗氧化特性,这可能由于乳酸菌在发酵过程中产生的 β -葡萄糖苷酶,将糖苷水解为具有更高自由基清除特性的相应糖苷

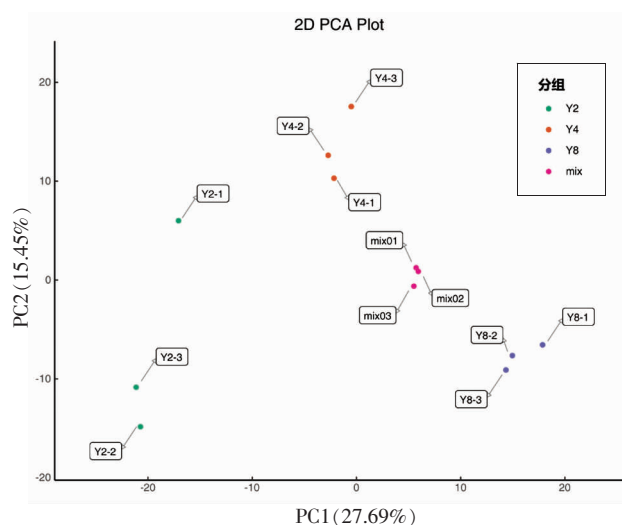
配基的原因^[28]。

2.4 发酵过程中沙棘汁中多酚代谢物的变化

采用武汉迈特维尔生物科技有限公司自建数据库 MWDB (metware database) 对沙棘汁发酵过程中的代谢物进行定性和定量分析。3 个样本点共鉴定出 665 种代谢物, 包括 436 种黄酮类化合物、179 种酚酸、29 种单宁、18 种木脂素和香豆素以及 3 种二苯乙烯。

2.4.1 PCA 结果 3 组发酵沙棘汁样品的总体 PCA 二维图见图 3, 其中 PC1 根据不同处理对样本进行分离, 最大方差为 27.69%, PC2 根据重复性对样本进行分离, 最大方差为 15.45%^[29]。由图可知, Y2、Y4 和 Y8 组的代谢物以及质控组的代谢物聚类良好; 质控样本的紧密聚集, 表明建模数据的稳定性和可靠性。3 个组间的样品分离趋势明显, 表明不同发酵阶段多酚代谢物存在差异。

2.4.2 正交偏最小二乘判别分析结果 根据 O-PLS-DA 模型分析得到的发酵沙棘汁样品的代谢组数据, 分别绘制 Y2 v.s. Y4 组 (图 4a)、Y4 v.s. Y8 组 (图 4b)、Y2 v.s. Y8 组 (图 4c) 两两比较的得分图, 进一步展示各分组之间的差异。从图 4 中可以看出, 3 个组间样本区分效果明显。各组



注: Y2、Y4、Y8 分别为发酵第 2、4、8 天的样品; mix 为样品和质量控制样品 (混合)。

图 3 3 组发酵样本与质控样品质谱数据的 PCA 得分图
Fig.3 Principal component analysis (PCA) of metabolic profiles in QC samples versus three experimental samples

OPLS-DA 模型验证结果的 Q^2 和 R^2Y 值均大于 0.7, $P < 0.005$, 说明模型稳定、可靠, 可进行差异代谢物的筛选分析。

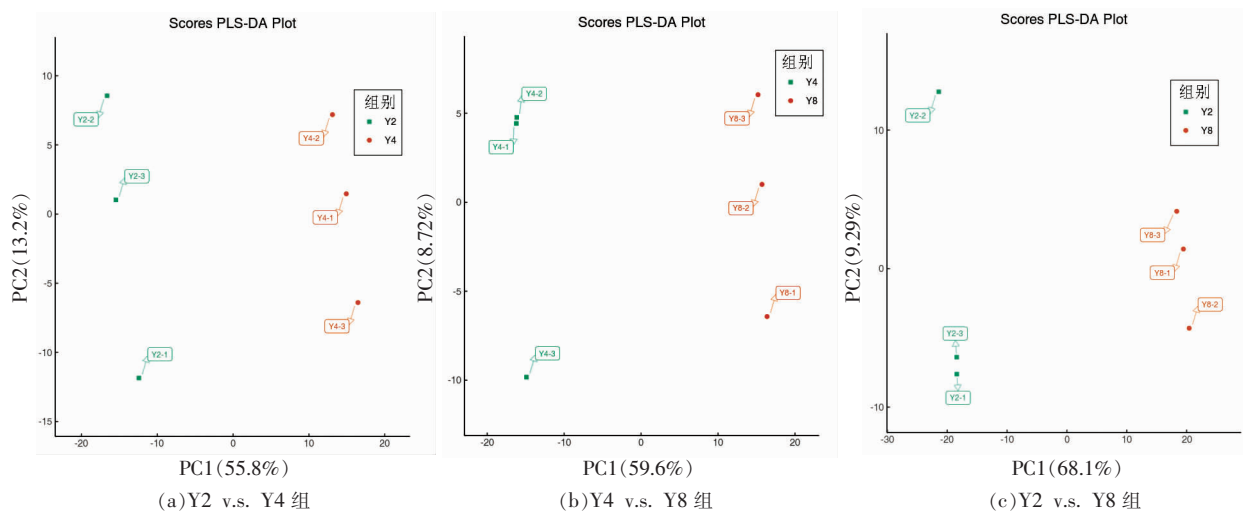


图 4 3 个比较组 OPLS-DA 得分图和验证图

Fig.4 OPLS-DA score plot and permutation test plot for three comparison groups

2.4.3 差异代谢物的鉴定与分析 如表 1 所示, Y2 v.s. Y4 组中共筛选到 67 种差异代谢物, 其中 79.10% 的代谢物显著上调、20.90% 的代谢物显著

下调。在这些差异代谢物中, 黄酮类化合物的比例最高 (71.64%), 其次是酚酸类化合物 (20.9%), 仅检测到 4 种鞣质和 1 种芪类。在 Y4 v.s. Y8 组中

共筛选到 64 种差异代谢物,显著上调和显著下调的代谢物数量相同。与 Y2 v.s. Y4 组相比,Y4 v.s. Y8 组的黄酮类差异代谢物占比减少(48.44%),而酚酸类差异代谢物的占比增加(31.25%)。在 Y2 v.s. Y8 组中共筛选到 116 种差异代谢物,其中显

著上调和显著下调代谢物占比分别为 63.79%和 36.21%;黄酮类化合物占比最大为 58.62%,其次为酚酸类化合物和鞣质,占比分别为 30.17%和 8.62%。

表 1 不同样品组发酵沙棘汁中多酚的显著差异代谢物数量和比例

Table 1 The number and proportion of differential polyphenol metabolites in fermented sea buckthorn juice of different sample groups

	Y2 v.s. Y4		Y4 v.s. Y8		Y2 v.s. Y8	
	数量/种	比例/%	数量/种	比例/%	数量/种	比例/%
总的差异代谢物	67	100.00	64	100.00	116	100.00
上调差异代谢物	53	79.10	32	50.00	74	63.79
下调差异代谢物	14	20.90	32	50.00	42	36.21
类别						
酚酸	14	20.90	20	31.25	35	30.17
黄酮类化合物	48	71.64	31	48.44	68	58.62
木脂素和香豆素	—	—	1	1.56	2	1.72
鞣质	4	5.97	10	15.63	10	8.62
芪类	1	1.49	2	3.13	1	0.86

注:比例表示该类物质的差异代谢物数量在总的差异代谢物数量中的占比;“—”表示未检出。

如图 5 所示,与发酵第 2 天相比,发酵第 4 天沙棘汁中的 53 种差异代谢物显著上调。其中,糖苷类化合物有 17 种,苷元类化合物有 15 种。上调倍数较高的前 5 种糖苷类代谢物为芥子醛-4-O-葡萄糖苷、牡荆素-2''-O-葡萄糖苷、槲皮素-3-O-(6''-丙二酰)葡萄糖苷-5-O-葡萄糖苷、乔松素-7-O-(2'',6''-二-O-鼠李糖基)葡萄糖苷、槲皮素-3-O-(2''-丙二酰)槐糖苷-7-O-阿拉伯糖苷。大量糖苷类物质上调,可能与新的糖苷键形成有关^[30]。随着发酵进行,乳酸菌开始大量产酸使得原花青素、鞣质等物质质子化,导致糖苷键断裂释放出苷元,如芥子醛、牡荆素、槲皮素^[31],这些苷元与其它基团重新结合形成新的糖苷类化合物。上调倍数较高的前 5 个苷元类代谢物有山奈酚、2-羟基柚皮素、6-羟基木犀草素、樱花素、桉叶黄素。与发酵第 2 天相比,发酵第 4 天沙棘汁中的 14 种差异代谢物显著下调,其中糖苷类代谢物有 4 种,为山奈酚-3-O-鼠李糖苷、柚皮苷、柚皮黄素-3-O-(3-羟基-3-甲基戊二酰)葡萄糖苷、圣草次苷。与上调的苷元如山奈酚、2-羟基柚皮素、圣草酚一一对应。下调的苷元类代谢物有 2 种,为桔皮素、淫羊藿黄

素。

如图 6 所示,与发酵第 4 天相比,发酵第 8 天沙棘汁中的 32 种差异代谢物显著上调。其中,糖苷类化合物有 9 种,上调倍数较高的前 5 个糖苷类代谢物有鞣花酸-4-O-木糖苷、单没食子酰-二葡萄糖苷、它乔糖苷、香草酸-4-O-葡萄糖醛酸苷、白藜芦醇苷。苷元类化合物有 5 种,5 个苷元类代谢物分别为 2-苯乙醇、2-羟基-2,3-二氢染料木素、8-去甲杜鹃素、6-羟基木犀草素、槲皮素。其中,2-苯乙醇具有玫瑰香味、香气轻甜柔和的特征^[32],其含量显著上调对沙棘汁感官质量提升有益。32 种差异代谢物显著下调,下调的糖苷类代谢物有 13 种,几乎占到下调差异物数量的一半,下调倍数较高的前 5 个糖苷类代谢物分别为维采宁-3-、异鼠李素-3-O-鼠李糖苷、矢车菊素-3,5-二-O-葡萄糖苷、6-C-甲基槲皮素-3-O-鼠李糖苷、槲皮素-3-O-鼠李糖苷。值得注意的是,异鼠李糖苷和沙棘强收敛性的口感密切相关^[33],异鼠李糖苷的显著下调对于改善沙棘汁风味有积极作用。下调的苷元类代谢物仅有 1 种,即樱花素。

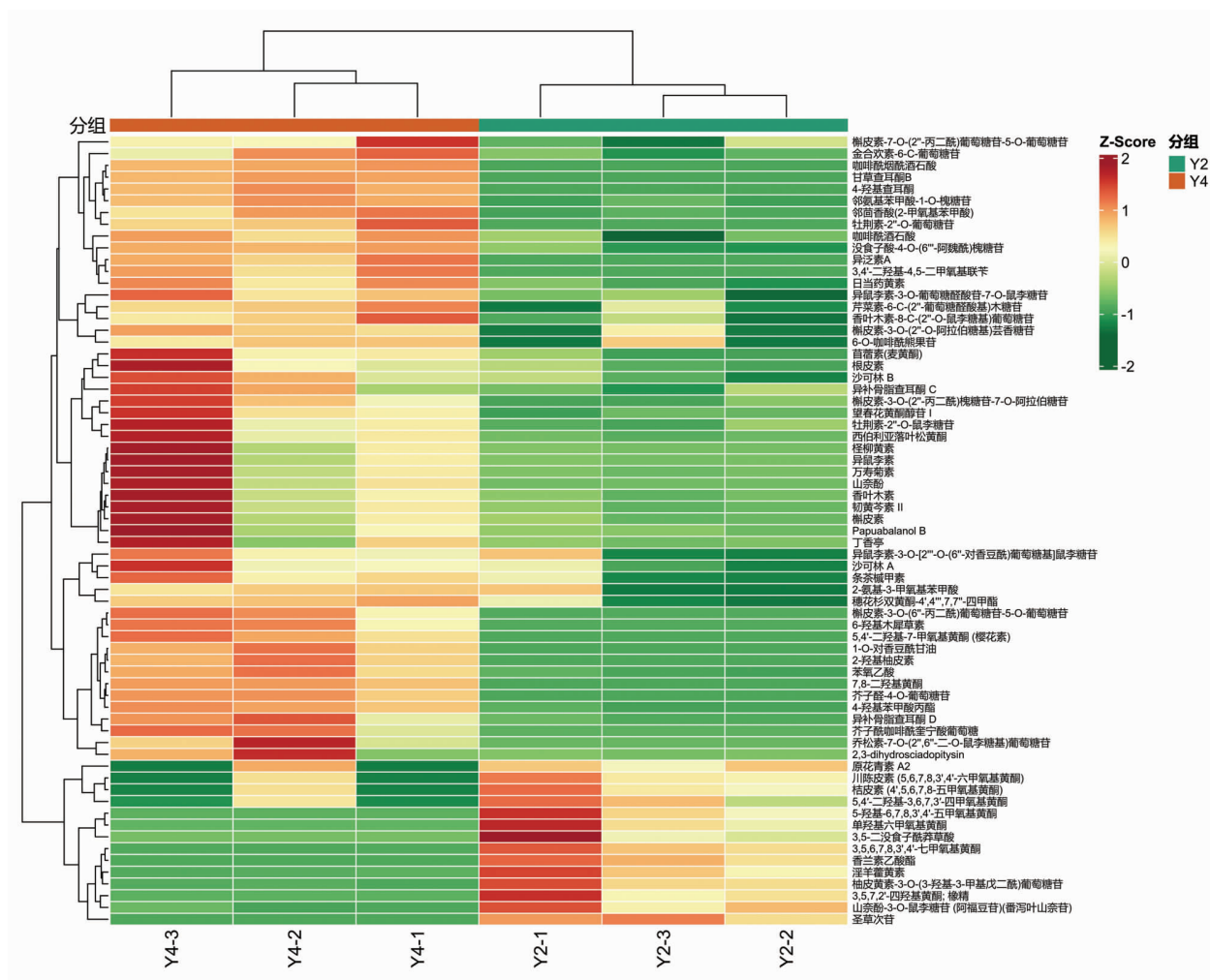


图 5 Y2 v.s. Y4 组中显著差异代谢物的聚类热图

Fig.5 Clustering heat map of differential metabolites in Y2 v.s. Y4

为了进一步了解差异代谢物参与的代谢通路,使用 KEGG 数据库对差异代谢物进行通路富集分析。结果显示,差异代谢物显著富集于 3 条代谢通路中,即次生代谢物的生物合成、类黄酮的生物合成以及黄酮和黄酮醇的生物合成途径。如图 7a 所示,Y2 v.s. Y4 组的 18 种差异代谢物 7 种参与黄酮和黄酮醇的生物合成途径,4 种参与类黄酮的生物合成途径,4 种参与次生代谢物的生物合成途径($P<0.05$)。如图 7b 所示,Y4 v.s. Y8 组的 13 种差异代谢物分别参与次生代谢物的生物合成途径(3 种),黄酮和黄酮醇的生物合成途径(3 种),类黄酮的生物合成途径(2 种)($P<0.05$)。其中,次生代谢物的生物合成途径是糖苷多酚生

物转化的重要代谢途径,包括根皮素、山奈酚、樱花素、槲皮素、西伯利亚落叶松黄酮、丁香亭、2-羟基-2,3-二氢染料木素、圣草酚在内的 8 种苷元通过该途径生成。这些苷元类物质主要由相应的黄酮糖苷类化合物通过酶的作用进行酯水解和苷元 c 环断裂释放^[34-35]。类黄酮的生物合成途径提供了黄酮和黄酮醇合成的上游物质(如芹菜素和山奈酚)。在黄酮和黄酮醇的生物合成途径中,包括芹菜素、牡荆素、山奈酚、杨梅素、槲皮素、西伯利亚落叶松黄酮、丁香亭在内的 7 种苷元在糖基转移酶或甲基转移酶的作用下与各种单糖苷、双糖苷和甲基代谢产物进行着相互转化。

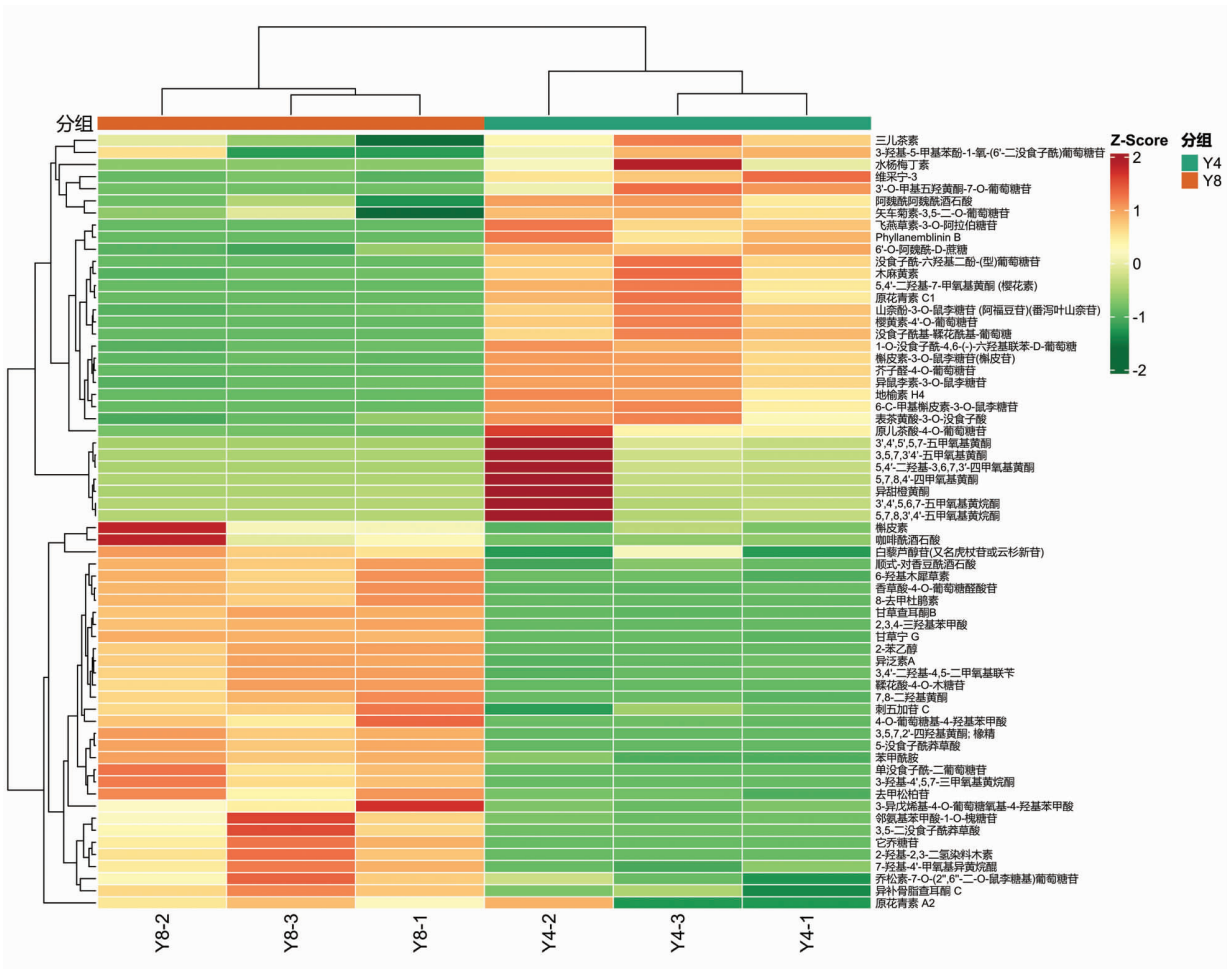


图6 Y4 v.s. Y8组中显著差异代谢物的聚类热图

Fig.6 Clustering heat map of differential metabolites in Y4 v.s. Y8

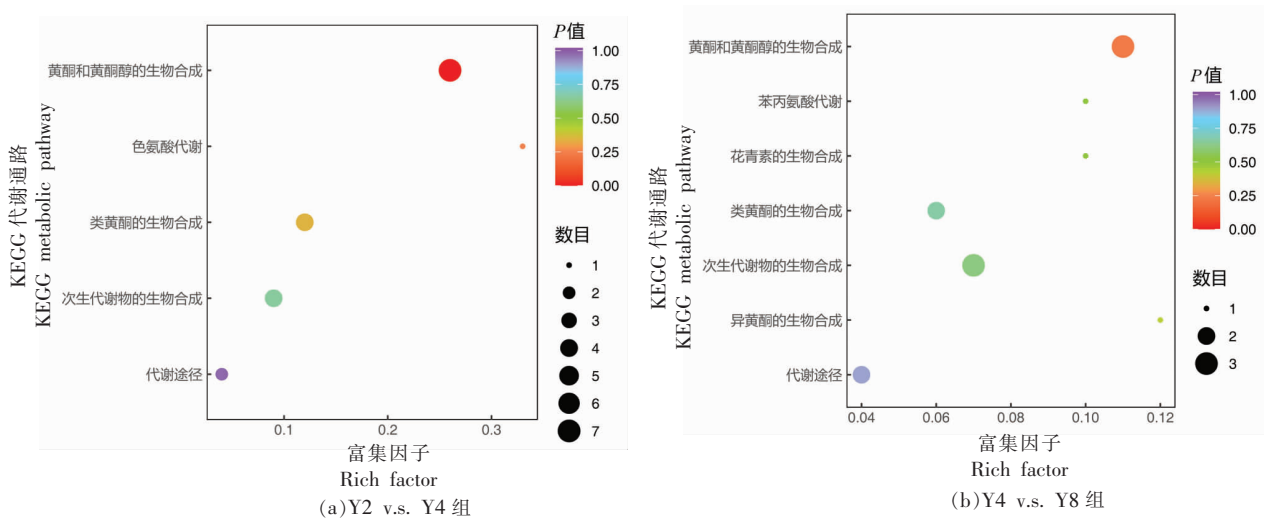


图7 发酵沙棘汁的差异代谢物 KEGG 富集图

Fig.7 KEGG enrichment map for differential metabolites of fermented sea buckthorn juice sample

3 结论

本研究利用超高效液相色谱-串联质谱技术测定沙棘汁发酵过程中代谢物的变化,通过对总体样本定性分析,发酵沙棘汁中共鉴定出 665 个代谢物,其中黄酮类、酚酸类化合物占的比例较大。在 Y2 v.s. Y4 组、Y4 v.s. Y8 组以及 Y2 v.s. Y8 组分别鉴定出 67,64 种和 116 种差异代谢物,这些差异代谢物主要属于黄酮类和酚酸类化合物。KEGG 通路富集分析发现,这些差异代谢物主要来自次生代谢物的生物合成、类黄酮的生物合成以及黄酮和黄酮醇的生物合成 3 条途径。结果表明,随着发酵的进行,苷元类差异代谢物含量主要在次生代谢物的生物合成途径中明显增加,沙棘中的多酚糖苷可能主要通过该途径转化为各自相对应的苷元。这些差异代谢物可作为发酵沙棘汁中糖苷类多酚转化的参考物质,进而后期优化发酵条件对其参与的代谢通路进行调控,提高发酵沙棘汁的营养品质。本研究为探究沙棘多酚生物转化机制提供理论基础。

参 考 文 献

- [1] ZHAO S J, SUN H Y, LIU Q B, et al. Protective effect of seabuckthorn berry juice against acrylamide-induced oxidative damage in rats[J]. *Journal of Food Science*, 2020, 85(7): 2245-2254.
- [2] GATLAN A M, GUTT G. Sea buckthorn in plant based diets. An analytical approach of sea buckthorn fruits composition: Nutritional value, applications, and health benefits[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2021, 18(17): 8986.
- [3] JI M X, GONG X, LI X, et al. Advanced research on the antioxidant activity and mechanism of polyphenols from hippophae species -A review [J]. *Molecules*, 2020, 25(4): 917.
- [4] TKACZ K, CHMIELEWSKA J, TURKIEWICZ I P, et al. Dynamics of changes in organic acids, sugars and phenolic compounds and antioxidant activity of sea buckthorn and sea buckthorn-apple juices during malolactic fermentation [J]. *Food Chemistry*, 2020, 332: 127382.
- [5] HOU L F, ZHOU B, YANG L, et al. Inhibition of human low density lipoprotein oxidation by flavonols and their glycosides [J]. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2004, 129(2): 209-219.
- [6] POLIA F, PASTOR -BELDA M, MARTINEZ -BLAZQUEZ A, et al. Technological and biotechnological processes to enhance the bioavailability of dietary (poly)phenols in humans[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2022, 70(7): 2092-2107.
- [7] ZHENG H Z, HWANG I W, CHUNG S K. Enhancing polyphenol extraction from unripe apples by carbohydrate-hydrolyzing enzymes[J]. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 2009, 10(12): 912-919.
- [8] GAO Y X, HOU L Z, GAO J, et al. Metabolomics approaches for the comprehensive evaluation of fermented foods: A review[J]. *Foods*, 2021, 10(10): 2294.
- [9] TANG R X, YU H F, QI M G, et al. Biotransformation of citrus fruits phenolic profiles by mixed probiotics *in vitro* anaerobic fermentation[J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2022, 160: 113087.
- [10] SHEN F, ZHUANG J C, WANG Q Q, et al. Enhancement in the metabolic profile of sea buckthorn juice via fermentation for its better efficacy on attenuating diet-induced metabolic syndrome by targeting gut microbiota[J]. *Food Research International* 2022, 162(Part A): 111948.
- [11] LIU Y Y, SHENG J, LI J J, et al. Influence of lactic acid bacteria on physicochemical indexes, sensory and flavor characteristics of fermented sea buckthorn juice[J]. *Food Bioscience*, 2022, 46: 101519.
- [12] TIITINEN K, VAHVASELKA M, HAKALA M, et al. Malolactic fermentation in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) juice processing[J]. *European Food Research and Technology*, 2006, 222(5/6): 686-691.
- [13] MARKKINEN N, LAAKSONEN O, YANG B R. Impact of malolactic fermentation with *Lactobacillus plantarum* on volatile compounds of sea buckthorn juice [J]. *European Food Research and Technology*, 2021, 247(3): 719-736.
- [14] 李瑞雪, 于江傲, 冉军舰, 等. 发酵果蔬汁功能特性及生物转化研究进展[J]. *中国酿造*, 2023, 42(2): 22-26.

- LI R X, YU J A, RAN J J, et al. Research progress on functional characteristics and biotransformation of fermented fruit and vegetable juice [J]. *China Brewing*, 2023, 42(2): 22–26.
- [15] LEE N K, PAIK H D. Bioconversion using lactic acid bacteria: Ginsenosides, GABA, and phenolic compounds[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2017, 27(5): 869–877.
- [16] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验: GB 4789.35–2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 1–8.
National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, State Food and Drug Administration. National food safety standard, food microbiological analysis lactic acid bacteria test: GB 4789.35–2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016: 1–8.
- [17] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品 pH 值的测定: GB 5009.237–2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 1–8.
National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National food safety standard, determination of pH value of food: GB 5009.237–2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016: 1–8.
- [18] 中华人民共和国国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中总酸的测定: GB 12456–2021[S]. 北京: 中国标准出版社, 2021: 1–8.
State Administration for Market Regulation, National Health Commission of the People's Republic of China. National food safety standard, determination of total acids in food: GB 12456–2021[S]. Beijing: Standards Press of China, 2021: 1–8.
- [19] YOU B Y, YANG S Y, YU J W, et al. Effect of thermal and dry salt-curing processing on free and bound phenolics and antioxidant activity in *Prunus mume* fruits together with the phenolic bioaccessibility[J]. *LWT–Food Science and Technology*, 2021, 145(2021): 111355.
- [20] 古小露, 马嫒, 耿福能, 等. 发酵剂复配对全石榴发酵汁品质的影响[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(17): 105–110.
GU X L, MA Y, GENG F N, et al. Effects of vat starters on the quality of pomegranate fermented juice[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(17): 105–110.
- [21] RE R, PELLEGRINI N, PROTEGGENTE A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, 26(9/10): 1231–1237.
- [22] 张琴, 黄世安, 林欣, 等. 基于 UPLC–MS/MS 的 3 个李品种果实初生代谢物分析[J]. *食品科学*, 2022, 43(16): 226–234.
ZHANG Q, HUANG S A, LIN X, et al. Analysis of primary metabolites in three plum varieties using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Food Science*, 2022, 43(16): 226–234.
- [23] WU C Y, LI T L, QI J, et al. Effects of lactic acid fermentation-based biotransformation on phenolic profiles, antioxidant capacity and flavor volatiles of apple juice[J]. *LWT–Food Science and Technology*, 2020, 122(2020): 109064.
- [24] LI T L, JIANG T, LIU N, et al. Biotransformation of phenolic profiles and improvement of antioxidant capacities in jujube juice by select lactic acid bacteria[J]. *Food Chemistry*, 2021, 339(2021): 127859.
- [25] LI J, ZHAO W T, PAN X, et al. Improvement of antioxidant properties of jujube puree by biotransformation of polyphenols via *Streptococcus thermophilus* fermentation[J]. *Food Chemistry*, 2022, 13(2022): 100214.
- [26] WANG M Z, OUYANG X Y, LIU Y R, et al. Comparison of nutrients and microbial density in goji berry juice during lactic acid fermentation using four lactic acid bacteria strains[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2021, 45(1): e15059.
- [27] BENINCASA C, MUCCILLI S, AMENTA M, et al. Phenolic trend and hygienic quality of green table olives fermented with *Lactobacillus plantarum* starter culture[J]. *Food Chemistry*, 2015, 186(2015): 271–276.
- [28] HASHEMI S M B, JAFARPOUR D. Fermentation of bergamot juice with *Lactobacillus plantarum* strains in pure and mixed fermentations: Chemical composition, antioxidant activity and sensorial properties[J]. *LWT–Food Science and Technology*, 2020, 131(2020): 109803.
- [29] 朱昆宇, 潘成才, 吉怡颖, 等. 盐胁迫下冰菜盐囊泡细胞的比较代谢组学分析[J]. *热带生物学报*,

- 2023, 14(3): 1-8.
- ZHU K Y, PAN C C, JI Y Y, et al. Comparative metabolomic analysis of epidermal bladder cells in *Mesembryanthemum crystallinum* under salt stress[J]. Journal of Tropical Biology, 2023, 14(3): 1-8.
- [30] TU F, XIE C Y, LI H N, et al. Effect of *in vitro* digestion on chestnut outer-skin and inner-skin bioaccessibility: The relationship between biotransformation and antioxidant activity of polyphenols by metabolomics[J]. Food Chemistry, 2021, 363(2021): 130277.
- [31] LIANG L H, WU X Y, ZHAO T, et al. *In vitro* bioaccessibility and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) following simulated gastro-intestinal digestion[J]. Food Research International, 2012, 46(1): 76-82.
- [32] 王航, 孟春, 石贤爱, 等. 2-苯乙醇对酿酒酵母生理生化特性影响[J]. 微生物学通报, 2012, 39(6): 749-755.
- WANG H, MENG C, SHI X A, et al. Effects of 2-phenylethanol on physiological and biochemical characteristics of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbiology China, 2012, 39(6): 749-755.
- [33] MA X, YANG W, LAAKSONEN O, et al. Role of Flavonols and proanthocyanidins in the sensory quality of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(45): 9871-9879.
- [34] CARDENAS-CASTRO A P, ROCHIN-MEDINA J J, RAMIREZ K, et al. *In vitro* intestinal bioaccessibility and colonic biotransformation of polyphenols from mini bell peppers (*Capsicum annuum* L.)[J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2022, 77(1): 77-82.
- [35] LIU L H, ZHANG C Y, ZHANG H M, et al. Biotransformation of polyphenols in apple pomace fermented by beta-glucosidase-producing *Lactobacillus rhamnosus* L08[J]. Foods, 2021, 10(6): 1343.

The Biotransformation of Glycoside Polyphenols in Sea Buckthorn Juice by *Lactobacillus plantarum* YHG1-155 Fermented

Chen Yanhui, Li Yafeng, Li Puyu, Zhuang Jiao, Gao Yan, Ju Ning*
(College of Food Science and Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750021)

Abstract Fermentation, contributing to convert polyphenol glycosides to their respective aglycones, could improve their bioavailability as well as flavor of the product. This study performed *Lactobacillus plantarum* YHG1-155 fermentation of sea buckthorn juice (SBJ) to analysis the changes of its antioxidant activity *in vitro* and explore the biotransformation process of polyphenols in the fermentation. The results showed that *L. plantarum* fermentation increased the viable cell count, free phenolic content, total phenolic content, and antioxidant activity of SBJ. In total, 116 significantly different metabolites were identified in *L. plantarum* fermented SBJ using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). Among them, 67 (53 upregulated and 14 downregulated), 64 (32 upregulated and 32 downregulated), and 116 (74 upregulated and 42 downregulated) kinds of differential metabolites were identified between the groups Y2 and Y4, Y4 and Y8, and Y2 and Y8. Furthermore, KEGG pathway enrichment analysis showed that 18 kinds of differential metabolites between Y4 and Y2 and 13 kinds of differential metabolites between Y8 and Y4 were mainly involved in three pathways, namely the biosynthesis of secondary metabolites, flavonoid, flavone and flavonol biosynthesis pathways. Among them, the biosynthesis pathway of secondary metabolites was an important pathway for polyphenol biotransformation, and polyphenol glycosides might mainly be converted to their respective aglycones through this pathway. Our findings revealed the biotransformation of polyphenol glycosides of SBJ by *L. plantarum* YHG1-155 fermentation, providing a theoretical reference for the deep processing of *hippophae rhamnoides*.

Keywords fermented sea buckthorn juice; *Lactobacillus plantarum* YHG1-155; phenolic compound; metabolomics