乳酸菌发酵接骨木果汁降血糖与抗氧化活性机理

封 弦[1]， 翁佩芳*[1]， 吴祖芳[1]， 李 杲[2]
（1. 宁波大学 食品与药学学院，浙江 宁波 315832；2. 宁波市北仑玉健医药科技有限公司，浙江 宁波 315830）

摘要：为探究乳酸菌发酵对接骨木果汁抗氧化活性的影响，通过测定 DPPH 自由基、羟自由基和超氧阴离子自由基清除率和细胞抗氧化实验比较接骨木果汁发酵前后抗氧化活性的变化。实验结果显示，接骨木果汁发酵后对 DPPH 自由基、羟自由基和超氧阴离子自由基的清除能力提高，对 α-葡萄糖苷酶和 α-淀粉酶的抑制能力也增加，证明发酵果汁具有降血糖活性。HepG2 细胞分别使用发酵前后酚类物质预处理 24 h 后再用 H_2O_2 刺激，发现 HepG2 细胞中总抗氧化能力（T-AOC）、过氧化氢酶（CAT）活力均高于对照组，乳酸脱氢酶（LDH）相对释放率高于空白组，但远远低于对照组，细胞中活性氧的积累降低，并且血红素加氧酶-1（*HO-1*）、醌氧化还原酶-1（*NQO1*）以及谷氨酸半胱氨酸连接酶催化亚基（*GCLC*）相关抗氧化酶的基因表达量在仅用 H_2O_2 处理后的 HepG2 细胞中降低，而在发酵前后分别经质量浓度为 200 μg/mL 和 300 μg/mL 酚类物质预处理的 HepG2 细胞中明显提高，表明接骨木果汁中的酚类化合物降低了 H_2O_2 对 HepG2 细胞的氧化损伤程度。由此可见，接骨木果汁发酵前后抗氧化能力发生变化的原因可能是在酚类化合物的作用下提高了 HepG2 细胞中 *HO-1*、*NQO1* 和 *GCLC* 的基因表达水平，因此说明果汁发酵后提高了对细胞的保护作用。

关键词：接骨木果汁；乳酸菌发酵；酚类物质；抗氧化；抗氧化酶
中图分类号：Q 550.20　**文章编号：**1673-1689(2022)08-0095-09　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.08.010

Preliminary Study on Hypoglycemic Antioxidant Activity and Mechanism of Elderberry Juice Fermented by Lactic Acid Bacteria

FENG Xian[1]， *WENG Peifang*[*1]， *WU Zufang*[1]， *LI Gao*[2]
(1. College of Food and Pharmaceutical Sciences, Ningbo University, Ningbo 315832, China; 2. Ningbo BeilunYujian Pharmaceutical Technology Co., Ltd. Ningbo, 315830, China)

Abstract: To investigate the effect of lactic acid bacteria fermentation on the antioxidant activity of elderberry juice, the changes of antioxidant activity of elderberry juice before and after fermentation were compared by measuring the scavenging rate of DPPH, hydroxyl and superoxide anion radicals and cellular antioxidant assay. The experimental results showed that the fermentation of elderberry juice improved the scavenging ability of DPPH, hydroxyl and superoxide anion radicals, and

收稿日期：2022-03-04
基金项目：浙江省重点研发计划项目（2018C02047）。
* **通信作者：**翁佩芳（1963—），女，教授，硕士研究生导师，主要从事食品生物技术方面的研究。E-mail：wzfwpf@163.com

increased the inhibitory ability of α-glucosidase and α-amylase, which proved the hypoglycemic activity of fermented juice. HepG2 cells were pretreated with phenolic substances before and after fermentation for 24 h, respectively, and then stimulated with H_2O_2. It was found that the total antioxidant capacity (T-AOC) and catalase (CAT) activity in the cells were higher than those of the control group. The relative release rate of lactate dehydrogenase (LDH) was higher than that of the blank group but much lower than that of the control group. The accumulation of reactive oxygen species in the cells was reduced. Moreover, the gene expression levels of heme oxygenase 1 (*HO-1*), quinone oxidoreductase 1 (*NQO1*), and glutamate cysteine ligase catalytic subunit (*GCLC*)-related antioxidant enzymes was decreased in HepG2 cells treated with H_2O_2 only, however, they were significantly increased in HepG2 cells pretreated with phenolics before and after fermentation at mass concentrations of 200 μg/mL and 300 μg/mL, respectively, indicating that the phenolic compounds in elderberry juice reduced the degree of oxidative damage of HepG2 cells induced by H_2O_2. Therefore, the changes in antioxidant capacity of elderberry juice before and after fermentation might be due to the increased gene expression levels of *HO-1*, *NQO1* and *GCLC* in HepG2 cells in the presence of phenolic compounds. Thus, it could be suggested that the juice fermentation could improve the protective effect on cells.

Keywords: elderberry juice, lactic acid bacteria fermentation, phenolics, antioxidant, antioxidant enzymes

接骨木(*Sambucus nigra*)为茜草目忍冬科接骨木属植物,目前多集中于研究其根茎和花,而对接骨木果实的研究较少,仅局限于对接骨木果油的营养和生物活性的研究。接骨木果(Elderberry)富含蛋白质[1]、脂肪酸[2-3]、碳水化合物[4-5]、有机酸和维生素[6]等营养成分以及多酚[7]、黄酮[8-9]、花青素[10-11]和酚酸[12]等生物活性物质,是一种良好的药食资源,可用于开发新的功能食品。

接骨木果中花青素含量较高,故具有显著的抗氧化能力。Olejnik[13]等使用接骨木果提取物在人结肠膜细胞中进行抗氧化实验,结果显示降低了细胞中活性氧水平和 DNA 的损伤,说明接骨木果对结肠细胞氧化应激具有保护作用。Wu[11]等研究了 15 个水果样品的抗氧化能力,结果显示接骨木果和草莓的抗氧化活性最强。Milbury[14]等研究表明,接骨木果中的花青素的抗氧化能力比维生素 C 和维生素 E 强。有研究表明,接骨木果花青素能避免血管上皮细胞的氧化损伤,进而防止血管病变[15]。Bratu[16]等研究表明接骨木果的提取物能显著清除氧自由基。其他研究也表明,接骨木果汁和果酒均具有抗氧化作用,并且接骨木果酒的抗氧化能力与生产过程中所用的糖和水的比例以及果实的细度有关[17-18]。乳酸菌发酵可以增加果蔬的营养和感官特性,延长货架期,同时乳酸菌发酵也可以促进食品中植物化学成分的转化[19],从而产生大量新的代谢产物,因此相应的营养功能等也会发生变化[20]。

H_2O_2 是一种常用的刺激细胞氧化损伤的工具,它作为氧化应激诱导剂诱导的 HepG2 细胞氧化损伤模型可控性强,具有一定的模拟性[21],因此常应用于天然产物抗氧化研究中。

作者选用保加利亚乳杆菌 BNCC336436 和嗜热链球菌 ABT-T 发酵接骨木果汁,通过 DPPH 自由基、羟自由基和超氧阴离子清除率来判断接骨木果汁发酵过程抗氧化活性变化;以未发酵为对照,进行发酵接骨木果汁酚类化合物细胞抗氧化实验,比较发酵前后抗氧化活性变化并初步探究抗氧化机理,为接骨木果汁的发酵加工和果蔬发酵功能食品开发提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

接骨木果粉:宁波市北仑玉健医药科技有限公司提供;保加利亚乳杆菌 BNCC336436(*Lactobacillus bulgaricus*,B)、嗜热链球菌 ABT-T(*Streptococcus thermophilus*,ST):均保存于宁波大学食品与药学学院食品生物技术实验室;蔗糖:购

于超市;MRS 肉汤培养基、吐温 80、甘油:购于国药集团化学试剂有限公司;HepG2 细胞、PBS 缓冲溶液、细胞冻存液和质量分数 0.25%胰酶缓冲液(EDTA 缓冲液)、乳酸脱氢酶(LDH)测定试剂盒:购于北京索莱宝科技有限公司;DMEM 高糖培养基、胎牛血清、链霉素、青霉素:购于美国 Gibco 公司;细胞培养瓶、6 孔板、12 孔板、96 孔板:购于宁波航景生物有限公司;CCK-8 试剂盒:购于美国 Proteintech 公司;细胞活性氧(ROS)检测试剂盒、总抗氧化能力(T-AOC)测定试剂盒、过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒:购于南京建成生物有限公司;qPCR 实验相关引物:购于生工生物工程(上海)股份有限公司;RNA 提取试剂盒(HiPure Bacterial RNA Kit,R4182):购于广州美基生物有限公司;反转录试剂盒(UEIris Ⅱ IRT-PCR System for First-StrandcDNA Svnthesis,R2028):购于苏州宇恒生物科技有限公司;实时荧光定量检测试剂盒(PerfectStarrTM Green qPCR SuperMix):购于北京全式金生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

FA2004 分析天平:上海舜宇恒平科学仪器有限公司;ZJ-HCB-1200 洁净工作台:广州梓净净化设备有限公司;SPX 智能生化培养箱:江南仪器厂;5418R 低温超速离心机:德国 Eppendorf 公司;311 型细胞 CO_2 培养箱、1300 系列 A2 型生物安全柜、MK3 酶标仪:美国赛默飞世尔科技有限公司;XSP-63XDV 荧光倒置显微镜:上海光学仪器厂;HWS-11 恒温水浴锅:上海慧泰仪器制造有限公司;LDZX-40B Ⅰ型立式蒸汽灭菌器:上海申安医疗器械厂;DM-40L262-40 ℃冰箱:青岛海尔特种电器有限公司;-80 ℃超低温冰箱:赛默飞科技(苏州)有限公司;qPCR 仪:武汉俊杰电子有限公司;BD-252WY-20 ℃冰箱:容声冰箱有限公司;SCIENTZ-18N 冷冻干燥机:宁波新芝仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 菌种活化 取新鲜保藏的 B 和 ST 试管斜面分别接种至 MRS 肉汤培养基中,于 37 ℃恒温静置培养 18 h 得到菌种活化液,备用。

1.3.2 发酵接骨木果汁的制备 按料液质量体积比 1 g:50 mL 配制接骨木果汁,加入质量分数 4%的蔗糖,经 85 ℃水浴灭菌 15 min 后降至室温得到发酵基质。将 B 和 ST 按体积分数 3%接入发酵基质中,于 37 ℃恒温静置发酵 36 h。

1.3.3 发酵接骨木果汁酚类化合物的提取与纯化 分别取一定量的未发酵和发酵接骨木果汁与无水乙醇按体积比 1:1 混合均匀,然后超声提取 30 min(功率 40 W,温度 40 ℃)后过滤,得到的滤渣再按体积比 1:1 的比例加入无水乙醇进行提取,重复提取 3 次,将收集到的提取液旋转蒸发至无醇味,即得到酚类化合物的粗提取物,于 4 ℃保存待纯化。采用 AB-8 大孔吸附树脂对接骨木果汁酚类化合物的粗提取物进行纯化。具体操作步骤为:1)AB-8 大孔吸附树脂经无水乙醇浸泡 24 h 使其活化,用蒸馏水冲洗至无醇味;2)取适量烘干活化好的 AB-8 树脂倒入烧杯中备用;3)在烧杯中加入酚类物质粗提取物浓缩液、无水乙醇和 AB-8 大孔树脂,搅拌均匀放置磁力搅拌器搅拌过夜;4)收集乙醇洗脱液,将洗脱液旋转蒸发至无醇味,备用;5)经冷冻干燥后得到接骨木果汁的酚类化合物纯化物。

1.3.4 DPPH 自由基、超氧阴离子、羟自由基清除能力的测定 DPPH 自由基清除能力的测定参照冯文娟[22]等的方法;超氧阴离子清除能力的测定参照文献[23]的方法;羟自由基清除能力的测定参考郑时莲[24]等的方法。

1.3.5 α-淀粉酶抑制实验 α-淀粉酶抑制率用 3,5-二硝基水杨酸试剂法测定[25]。称取 α-淀粉酶粉末用 pH 6.8 的 PBS 溶液配制成质量浓度为 0.04 mg/mL 的 α-淀粉酶溶液。取 1 mL 样品与 1 mL α-淀粉酶溶液,摇匀,25 ℃静置反应 10 min。随后加入 1 mL 体积分数 1%可溶性淀粉(pH 6.8 的 PBS 溶液溶解),再加入 1 mL DNS 溶液沸水浴 5 min 进行显色反应,冷却至室温。加入蒸馏水稀释至 10 mL,540 nm 处检测吸光值,空白组以蒸馏水做对照。

$$\alpha\text{-淀粉酶抑制率}(\%)=\frac{A_c-A_s}{A_c}\times 100\% \quad (1)$$

式中:A_c 为空白组吸光值,A_s 为样品组吸光值。

1.3.6 α-葡萄糖苷酶抑制实验 α-葡萄糖苷酶抑制率参考 Marilisa[26]的方法,稍做修改。具体操作为:分别取 1 mL 磷酸盐缓冲液、0.2 mL α-葡萄糖苷酶溶液、0.4 mL 果汁发酵液加入试管中摇匀,37 ℃水浴 10 min,加入 0.5 mL pNPG 溶液摇匀,再于 37 ℃水浴 10 min,最后加入 8 mL Na_2CO_3 溶液,于 405 nm 处测定其吸光值,结果记为 A_1。取 2 支试管做对照实验,其中不加底物 pNPG 的试管吸光值记为

A_2,另一支不加果汁的试管吸光值记为 A_3。

$$\alpha\text{-葡萄糖苷酶抑制率}(\%)=\frac{A_3-(A_1-A_2)}{A_3}\times 100\% \quad (2)$$

式中:A_1 为添加 α-葡萄糖苷酶溶液、果汁和底物 pNPG 的吸光值,A_2 为添加 α-葡萄糖苷酶溶液和果汁的吸光值,A_3 为添加 α-葡萄糖苷酶溶液和底物 pNPG 的吸光值。

1.3.7 细胞复苏、培养和传代 将 HepG2 细胞在培养瓶中培养至状态良好后灌满培养基并转移到生物安全柜中操作。如细胞生长至 70%~80%,将瓶中的培养基移入无菌瓶中留作培养使用,保留 5~8 mL 培养基在培养箱(37 ℃、5% CO_2)中继续培养。细胞培养至 90%~100%后,按要求消化传代。弃去培养基,细胞用无菌 PBS 缓冲液清洗 2 次,加入适量胰蛋白酶消化,待细胞完全脱壁后加入培养基吹打均匀,分瓶培养,按需传代或铺板。

1.3.8 细胞冻存 将培养至 90%~100%的 HepG2 细胞于生物安全柜中弃掉旧培养基,用 PBS 缓冲液清洗 2 遍,然后加入适量 0.25% EDTA 溶液消化 2~3 min 后,加入新鲜培养基终止消化。最后将细胞收集至 15 mL 离心管中,于 1 000 r/min 离心 5 min,弃掉培养基,将细胞冻存液(提前预冷)加入细胞中,吹打之后分装到 2 mL 细胞冻存管中,写好标签后,用封口膜封好,最后放至-80 ℃超低温冰箱中保存。

1.3.9 建立 HepG2 细胞氧化损伤模型 以未经过样品和 H_2O_2 处理的细胞作为空白对照组,经过不同浓度的 H_2O_2 处理的细胞为模型组,经过样品处理再经过 H_2O_2 处理的细胞作为实验组。选择质量浓度 0、125、250、500、1 000 μg/mL 的 H_2O_2 溶液(DMEM 培养基配制)作为本实验浓度,将生长至对数期的 HepG2 细胞接种于 96 孔板中,每个孔中加入 200 μL 细胞悬液后置于培养箱(37℃、5% CO_2)中培养 24 h,弃去旧培养基,用 PBS 缓冲液清洗 1 次,每个孔中加入不同质量浓度的 200 μL H_2O_2 溶液继续培养 4 h 后测定细胞存活率,获得 HepG2 细胞氧化损伤模型。

1.3.10 HepG2 细胞毒性实验 按照 CCK-8 试剂盒步骤进行测定。

1.3.11 ROS、LDH、T-AOC 和 CAT 活力的测定 取适量经过处理的细胞培养液,严格按照相应的测定试剂盒测定步骤进行。其中 ROS 以荧光强度计,LDH 用相对释放率表示,T-AOC 单位为 U/mL,CAT 其活力单位为 U/mL。

1.3.12 RNA 提取及反转录 HepG2 细胞培养结束后,分别收集各组细胞。总 RNA 的提取根据 RNA 提取试剂盒提供的方法执行,接着使用反转录试剂盒对提取的 RNA 进行反转录,具体操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。GAPDH 购自生工生物工程(上海)股份有限公司,货号 B661104。

表 1 qPCR 引物序列

Table 1 Sequence of qPCR primer

基因名称	引物序列	
	正向引物	反向引物
HO-1	GGCTCCTTTTCCTGAGTATGCTGAG	GACCCTGCTGCCTAAACCATTCC
NQO-1	AAGCCGCAGACCTTGTGATATTCC	CATGGCAGCGTAAGTGTAAGCAAAC
GCLC	TTGATTGTCGCTGGGGAGTGATTTC	TTGTTCTTCAATGGCTCCAGTCCTC

1.3.13 数据分析 每组实验进行 3 次重复,结果以均值±标准偏差表示。利用 SPSS 软件对数据进行分析,使用 Origin 软件作图。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌发酵接骨木果汁体外抗氧化活性变化

乳酸菌发酵接骨木果汁过程中抗氧化能力的变化见图 1。可以看出,发酵接骨木果汁对 DPPH 自由基、羟自由基和超氧阴离子的清除能力呈现一致的趋势,随着发酵时间的增加对自由基的清除率提高,且发酵结束时接骨木果汁的抗氧化能力最大。经菌种 B 和 ST 发酵后,接骨木果汁对 DPPH 自由基的清除能力从 44.67%提高到了60.76%,对羟自由基清除率达到了 75.37%,较未发酵果汁提高了 20.39%,对超氧阴离子的清除能力从43.27%增加到了 57.45%,表明接骨木果汁经过乳酸菌发酵后提高了抗氧化能力。这可能是由于乳酸菌发酵过程中发酵基质中酚类和黄酮类化合物的释放以及乳酸菌分泌的抗氧化酶的抗氧化能力不同引起的。延莎[27]等使用乳酸菌发酵茶花粉后发现其总多酚和总黄

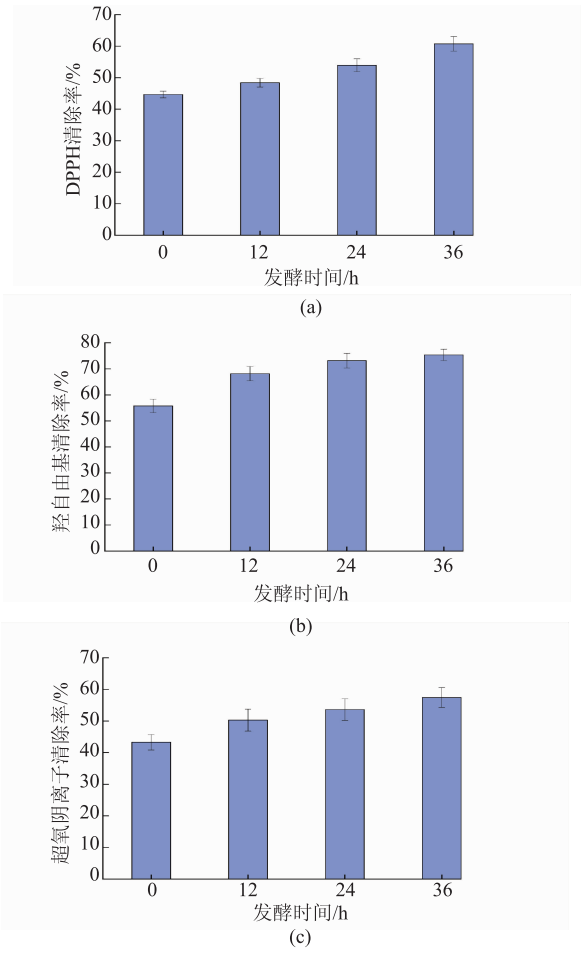


图 1　接骨木果汁发酵过程中 DPPH 自由基、羟自由基和超氧阴离子清除率的变化

Fig. 1　Changes in the scavenging rates of DPPH radicals, hydroxyl radicals and superoxide anions during the fermentation of elderberry juice

酮含量都有明显的增加，发酵茶花粉提取物对 DPPH 自由基、ABTS 自由基等自由基的清除能力均高于对照组。沙棘-苹果汁的复合果汁经不同种类乳酸菌发酵后，植物乳杆菌对其黄酮醇含量和抗氧化能力的提高更为明显[28]。乳清蛋白蓝莓汁混合物经保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌单独发酵和混菌发酵后对 DPPH 自由基、超氧阴离子、羟自由基清除率和脂质过氧化能力与发酵前相比均有提高[29]。

2.2　酶抑制实验

α-葡萄糖苷酶和 α-淀粉酶可以分解碳水化合物，从而增加人体血糖水平，通过抑制这两种酶的活性可以有效地延缓糖类的水解从而起到降低血糖的作用。保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌发酵接骨木果汁过程中对这 2 种酶抑制能力变化见图 2。从图 2 可以看出，发酵接骨木果汁对 α-葡萄糖苷酶的抑制率随发酵时间的延长而增加；经 36 h 的发酵，接骨木果汁对 α-葡萄糖苷酶的抑制率从 52.97%提高至 72.39%，对 α-淀粉酶的抑制率从 48.75%增加到 68.62%，表明乳酸菌发酵有效提高了接骨木果汁的酶抑制能力。有文献报道，Aronia 果汁经发酵后具有较强的 α-葡萄糖苷酶抑制活性[30]。李云姣[31]等发现，水果酵素在发酵 120 d 后对 α-葡萄糖苷酶和 α-淀粉酶的抑制率分别达到了 99.57%和 81.67%，证明水果酵素具有良好的降血糖作用。有研究表明，采用植物乳杆菌发酵黑葡萄汁后对 α-葡萄糖苷酶和 α-淀粉酶的抑制活性显著提高[32]。南瓜乳酸菌发酵饮料对 α-葡萄糖苷酶的抑制率达到（95.89±0.03）%[33]，证明南瓜经乳酸菌发酵可用于开发降糖饮料。

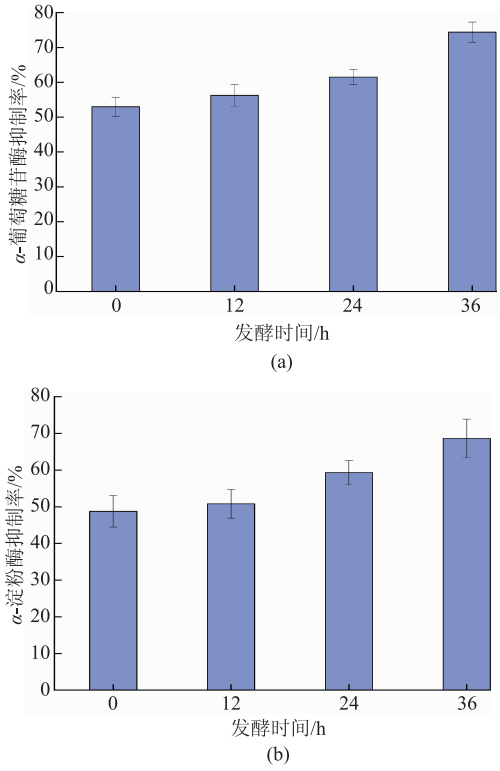


图 2　接骨木果汁发酵过程中 α-葡萄糖苷酶和 α-淀粉酶抑制能力的变化

Fig. 2　Changes in the inhibitory capacity of α-glucosidase and α-amylase during the fermentation of elderberry juice

2.3　乳酸菌发酵接骨木果汁酚类化合物对 HepG2 细胞的毒性作用

不同质量浓度酚类物质作用下 HepG2 细胞存

活率见图 3。可以看出,发酵前后的接骨木果汁酚类化合物质量浓度在 0~500 μg/mL 范围内作用于 HepG2 细胞,细胞存活率均在 85%以上,说明在该质量浓度范围内,酚类化合物对 HepG2 细胞无明显毒性作用。

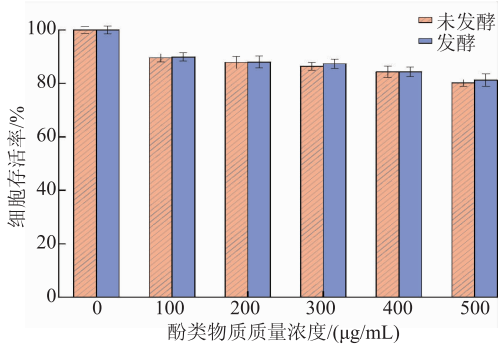


图 3 不同质量浓度接骨木果汁酚类物质作用下的 HepG2 细胞存活率

Fig. 3 Survival of HepG2 cells under the different mass concentrations of phenolic substances of elderberry juice

2.4 H_2O_2 诱导 HepG2 细胞氧化损伤质量浓度的确定

为了确定 H_2O_2 的刺激浓度,选取质量浓度 0、125、250、500、1 000 μg/mL 的 H_2O_2 对 HepG2 细胞进行氧化刺激,不同质量浓度作用下 HepG2 细胞存活率见图 4。从图 4 可以看出,H_2O_2 质量浓度在 0、125、250 μg/mL 下 HepG2 细胞存活率都在 80%以上,说明该质量浓度范围内 H_2O_2 对 HepG2 细胞没有造成氧化损伤;而在 500、1 000 μg/mL 质量浓度刺激下,HepG2 细胞存活率分别为 47.31%和 31.27%,如果细胞存活率太高或太低,那么样品对 HepG2 细胞的作用效果就会不明显,参考意义不大[34]。因此选择刺激条件下细胞存活率接近50%的 H_2O_2 质量浓度进行下一步分析。

2.5 接骨木果汁酚类物质对 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用

通过实验筛选了诱导 HepG2 细胞氧化损伤的 H_2O_2 质量浓度。从图 5 可以看出,在质量浓度为 100、200、300、400、500 μg/mL 未发酵和发酵接骨木果汁酚类物质质量浓度作用下,HepG2 细胞的存活率都高于刺激组,说明酚类物质可有效降低 H_2O_2 对 HepG2 细胞的氧化损伤程度。而在 200 μg/mL 和 300 μg/mL 时,细胞存活率接近 85%,有利于下一步

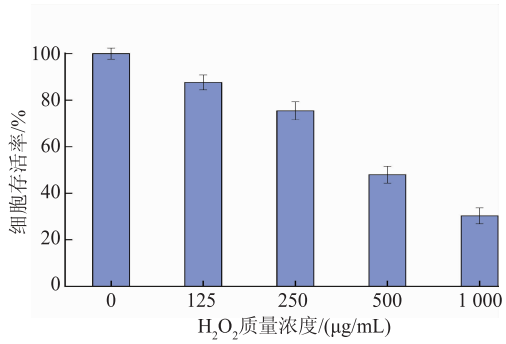


图 4 不同质量浓度 H_2O_2 刺激下 HepG2 细胞存活率

Fig. 4 Survival rate of HepG2 cells under different mass concentrations of H_2O_2 stimulation

实验的开展。为了确保下一步实验顺利进行,作者研究了 200 μg/mL 和 300 μg/mL 接骨木果汁酚类物质对 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用。

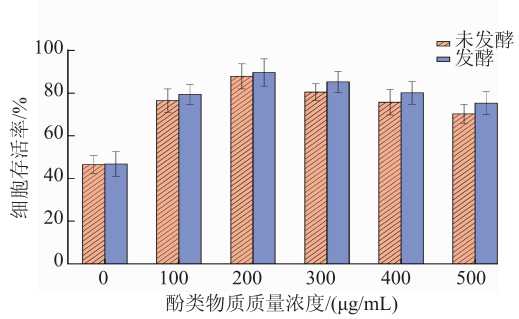


图 5 不同质量浓度酚类物质作用下 HepG2 细胞的存活率

Fig. 5 Survival rate of HepG2 cells under the effect of different mass concentrations of phenolic substances

2.6 ROS、T-AOC、CAT、LDH 的测定

不同处理条件下 HepG2 细胞中 ROS 水平的变化见图 6。可以看出,与空白组相比,仅添加 H_2O_2 处理后提高了 HepG2 细胞中 ROS 的水平,说明促进了氧化应激的发生;而 HepG2 细胞经质量浓度 200 μg/mL 和 300 μg/mL 酚类物质预处理后明显减弱了氧化应激作用,抑制了 ROS 的积累,说明酚类物质在一定程度上起到了保护作用。为了探究接骨木果汁酚类物质对 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞氧化应激的保护作用,HepG2 细胞先用酚类物质预处理 24 h,然后测定 HepG2 细胞 T-AOC、CAT 和 LDH 相对释放率的变化,结果见图 6。经质量浓度 200 μg/mL 和 300 μg/mL 酚类物质预处理的 HepG2 细胞总抗氧化能力显著提高,并且呈现一定的剂量依赖性,说明酚类物质的作用降低了 HepG2 细胞的氧化损伤

程度。发酵接骨木果汁酚类物质的总抗氧化能力比未发酵酚类物质强。同时，用质量浓度 200 μg/mL 和 300 μg/mL 酚类物质预处理的 HepG2 细胞的过氧化氢酶活力显著高于对照组，说明酚类物质可以有效降低 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞氧化应激。乳酸脱氢酶的释放可能是因为在 H_2O_2 的刺激下细胞膜受到损伤，通透性增加，从而导致了细胞中乳酸脱氢酶浓度的增加。如图 6 所示，用质量浓度 200 μg/mL 和 300 μg/mL 酚类物质预处理的 HepG2 细胞的乳酸脱氢酶相对释放率明显高于空白组，但远远低于对照组。这些都说明酚类物质在一定程度上降低了 H_2O_2 对 HepG2 细胞膜的破坏。

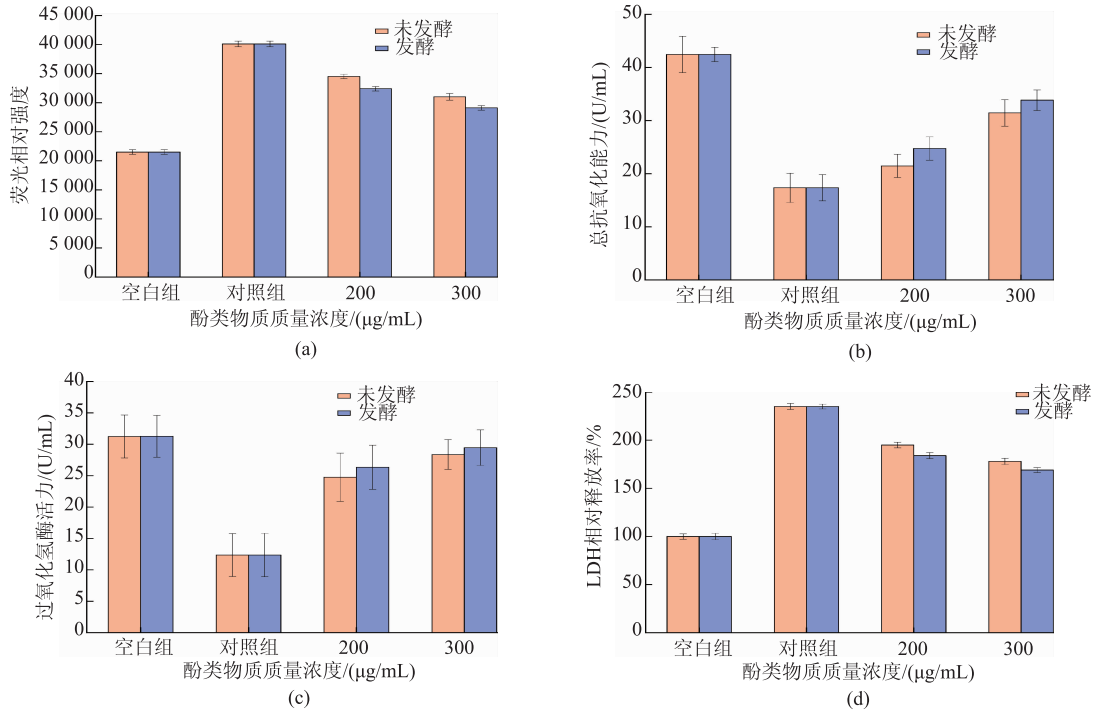
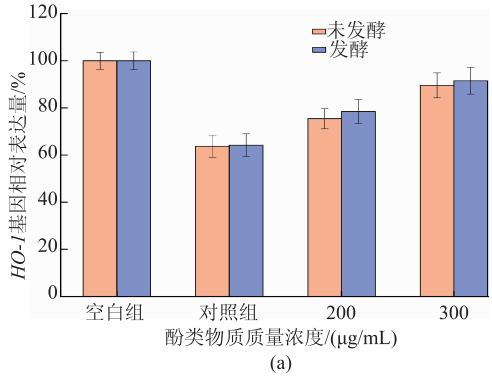


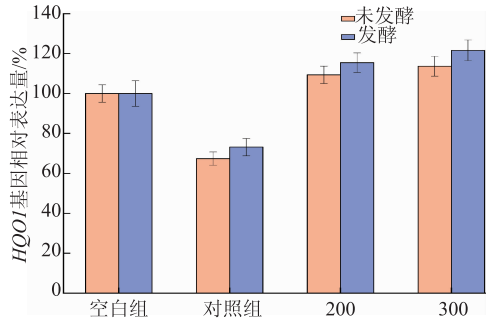
图 6　不同质量浓度酚类物质作用下 HepG2 细胞 ROS、T-AOC、CAT 和 LDH 的变化

Fig. 6　Changes of ROS, T-AOC, CAT and LDH in HepG2 cells under the different mass concentrations of phenolic substances

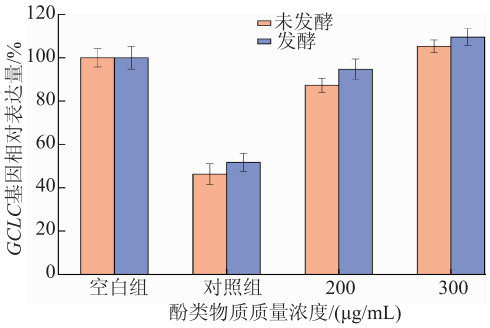
2.7　抗氧化酶相关基因表达的变化

抗氧化酶可以保护细胞免受氧化应激的损害，抑制细胞中 ROS 的过量生成，以维持细胞氧化还原平衡。同时，抗氧化酶可以将过氧化物转化为毒性较小或无害的物质。通过测定 *HO-1*、*NQO1* 和 *GCLC* 基因相对表达量，证明酚类物质处理后是否提高了相关酶的抗氧化活性。*HO-1* 可以催化血红素分解，生成的小分子产物具有抗氧化损伤的功能[35]，是一种重要的抗氧化酶。如图 7 所示，*HO-1* 的基因表达在经 H_2O_2 处理的 HepG2 细胞中明显降低，而在经 200、300 μg/mL 酚类物质预处理的HepG2 细胞中明显提高。*NQO1* 可以通过还原反应降低 ROS 的产生，因此 *NQO1* 能阻止外源性刺激条件对 DNA 造成氧化损伤，是重要的抗氧化酶之一。在 H_2O_2 刺激下 HepG2 细胞中的 *NQO1* 基因表达量减少，而采用质量浓度为 200、300 μg/mL 酚类物质预处理的 HepG2 细胞中 *NQO1* 基因表达量明显增加。同时，经 H_2O_2 刺激后 HepG2 细胞中 *GCLC* 表达量减少，使用质量浓度 200 μg/mL 和 300 μg/mL 酚类物质预处理的HepG2 细胞中 *NQO1* 基因表达量上升。因此可以说明酚类物质可以加强 HepG2 细胞中抗氧





(b)



(c)

图 7　不同质量浓度酚类物质作用下 HepG2 细胞氧化损伤模型中的抗氧化酶相关基因相对表达

Fig. 7　Relative expression of antioxidant enzyme-related genes in a model of oxidative damage in HepG2 cells under the different phenolic substance mass concentrations

化酶相关基因的表达量。

3 结　语

选用 B 和 ST 发酵接骨木果汁后，果汁的抗氧化活性提高，对 α-葡萄糖苷酶和 α-淀粉酶的抑制能力也提高。研究还表明，用酚类物质预处理 HepG2 细胞后，细胞 T-AOC、CAT 明显提高；LDH 相对释放率明显增加并且降低了细胞中活性氧的积累；这说明酚类物质能使 HepG2 细胞免受 H_2O_2 氧化损伤，并且发酵后的酚类物质作用比发酵前强。细胞抗氧化实验证明，*HO-1*、*NQO1* 和 *GCLC* 相关抗氧化酶的基因表达在经 H_2O_2 处理的 HepG2 细胞中明显降低，而经酚类物质预处理的 HepG2 细胞中明显提高。由此可见，发酵后果汁抗氧化能力提高的原因可能是在酚类物质的作用下提高了 HepG2 细胞中相关抗氧化酶的基因表达水平。

参考文献：

[1] ERCISLI S,TOSUN M,AKBULUT M. Physicochemical characteristics of some wild grown European elderberry (*Sambucus nigra* L.) genotypes[J]. **Pharmacognosy Magazine**,2009,5(20):320-323.

[2] 胡荣,戚继忠,薛振平,等. 药食两用木本新油源—接骨木油[J]. 林业科学,2005,41(1):65-70.

[3] DULF F V,OROIAN I,DAN C V,et al. Lipid classes and fatty acid regiodistribution in triacylglycerols of seed oils of two *sambucus* species(*S. nigra* L. and *S. ebulus* L.)[J]. **Molecules**,2013,18(10):11768-11782.

[4] VEBERIC R,JAKOPIC J,STAMPAR F,et al. European elderberry (*Sambucus nigra* L.) rich in sugars,organic acids, anthocyanins and selected polyphenols - science direct[J]. **Food Chemistry**,2009,114(2):511-515.

[5] MRATINIC E,FOTIRIC M. Selection of black elderberry(*Sambucus nigra* L.) and evaluation of its fruits usability as biologically valuable food[J]. **Genetika**,2007,39(3):305-314.

[6] KAACK K,AUSTED T. Interaction of vitamin C and flavonoids in elderberry (*Sambucus nigra* L.) during juice processing[J]. **Plant Foods for Human Nutrition**,1998,52(3):187-198.

[7] LEE J,FINN C E. Anthocyanins and other polyphenolics in American elderberry(*Sambucus canadensis*) and European elderberry (*S. nigra*) cultivars[J]. **Journal of the Science of Food & Agriculture**,2010,87(14):2665-2675.

[8] KAACK K,FRETTÉ X,CHRISTENSEN L P,et al. Selection of elderberry (*Sambucus nigra* L.) genotypes best suited for the preparation of juice[J]. **European Food Research & Technology**,2008,226(4):843-855.

[9] BARANIAK W B. The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L.(antioxidant properties of extracts)[J]. **LWT – Food Science and Technology**,2006,39(3):308-315.

[10] LABUN,FEJER,SALAMON,et al. Study of content and composition of anthocyanins in selected plants species[J]. **Planta**

Medica,2011,77(12):68.
[11] WU X,GU L,PRIOR R L,et al. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of *Ribes*,*Aronia*,and *Sambucus* and their antioxidant capacity[J]. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**,2004,52(26):7846-7856.
[12] FAZIO A,PLASTINA P,MEIJERINK J,et al. Comparative analyses of seeds of wild fruits of *Rubus* and *Sambucus* species from Southern Italy:Fatty acid composition of the oil,total phenolic content,antioxidant and anti-inflammatory properties of the methanolic extracts[J]. **Food Chemistry**,2013,140(4):817-824.
[13] OLEJNIK A,OLKOWICZ M,KOWALSKA K,et al. Gastrointestinal digested *Sambucus nigra* L. fruit extract protects *in vitro* cultured human colon cells against oxidative stress[J]. **Food Chemistry**,2016,197(15):648-657.
[14] MILBURY,PAUL E,PRIOR R L, et al. Bioavailablility of elderberry anthocyanins[J]. **Mechanisms of Ageing and Development**,2002,123(8):997-1006.
[15] 希雨. 接骨木缘何走俏欧洲[J]. 国外医药:植物药分册,2001,16(5):202-204.
[16] BRATU M M,DOROFTEI E,NEGREANU-PIRJOL T,et al. Determination of antioxidant activity and toxicity of *Sambucus nigra* fruit extract using alternative methods[J]. **Food Technology and Biotechnology**,2012,50(2):177-182.
[17] JAKOBEK,LIDIJA,ŠERUGA,et al. Antioxidant activity and polyphenols of Aronia in comparison to other berry species[J]. **Agriculturae Conspectus Scientificus**,2007,72(4):301-306.
[18] GAROFULI I E,GANI K K,GALI I,et al. The influence of processing on phyico-chemical parameters,phenolics,antioxidant capacity and sensory attributes of elderberry(*Sambucus nigra* L.) fruit wine[J]. **International Congress of Food Technologists Biotechnologists & Nutritionists**,2012,7(7):9-13.
[19] SUN J H,LEE S Y,KIM Y C,et al. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods[J]. **Food Chemistry**,2014,160:346-356.
[20] CIRLINI M,CALANI L,BERNINI V,et al. In vitro metabolism of elderberry juice polyphenols by lactic acid bacteria[J]. **Food Chemistry**,2019,276:692-699.
[21] 罗春丽,王林,李杏,等. 紫薯花青素体外抗氧化及对 H_2O_2 诱导 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用[J]. 食品科学,2015,36(17):225-230.
[22] 冯文娟,崔玮琪,徐泽平,等. 接骨木花青素的纯化工艺及清除 DPPH 自由基活性的研究[J]. 中国酿造,2017,36(11):134-137.
[23] 吴祖芳,洪松虎,沈锡权,等. 乳酸菌高抗氧化活性菌株的筛选及鉴定[J]. 中国食品学报,2010,(1):73-78.
[24] 郑时莲,邓泽元,蒋海伟,等. 茄子皮中花色苷提取方法的比较及其抗氧化活性研究[J]. 中国食品学报,2017,17(1):92-99.
[25] 赵蓉,李多伟,沈晓东,等. 白芸豆中 α- 淀粉酶抑制剂的研究[J]. 中成药,2008,30(9):1355-1357.
[26] MARILISA A,MONICA A. Effect of coffee roasting on in vitro α -glucosidase activity:Inhibition and mechanism of action[J]. **Food Research International**,2018,111:480-487.
[27] 延莎,范亚芳,郑龙华,等. 乳酸菌发酵茶花粉所得提取物对 4 种自由基的清除能力[J]. 食品科技,2017,(3):238-243.
[28] KT A,JC B,IPT A,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.
[29] 王文琼,孙志勇,黄冬成,等. 乳酸菌发酵蓝莓乳清混合体系体外抗氧化特性分析[J]. 现代食品科技,2021,37(1):142-149.
[30] DU X,MYRACLE A D. Fermentation alters the bioaccessible phenolic compounds and increases the alpha-glucosidase inhibitory effects of aronia juice in a dairy matrix following in vitro digestion[J]. **Food & Function**,2018,9(5):2998-3007.
[31] 李云姣,李琪,杜佳峰,等. 水果酵素体外抗氧化及抑制 α- 淀粉酶和 α- 葡萄糖苷酶活性的研究[J]. 中国食品学报,2019,19(4):79-84.
[32] FREDIANSYAH A,NURHAYATI R,ROMADHONI F. Enhancement of antioxidant activity,α-glucosidase and α-amylase inhibitory activities by spontaneous and bacterial monoculture fermentation of Indonesian black grape juices[A]. Proceedings of the International Symposium on Applied Chemistry[C]. New York: AIP Publishing, 2017.
[33] KOH W Y,UTHUMPORN U,ROSMA A,et al. Optimization of a fermented pumpkin-based beverage to improve *Lactobacillus mali* survival and α-glucosidase inhibitory activity:a response surface methodology approach[J]. **Food Science & Human Wellness**,2018,7(1):57-70.
[34] 李汀,邹波,吴继军,等. 蜜柚果肉膳食多酚的结构鉴定及抗氧化机理[J]. 食品科学,2021,42(19):202-210.
[35] 朱子夫. HO-1 抗氧化损伤的研究进展[J]. 医学综述,2010,16(15):2266-2270.