DOI:10.12441/spyswjs.20241115005 [文章编号] 1673-1689(2026)02-0141-10

乳酸菌混合发酵蓝莓汁中多酚化合物生物转化的代谢组学分析

甘婉玲[1,2] 龚敏慧[1,2] 苏 巍[1,2] 范琳琳[1] 王 英[1] 周剑忠[1,2*]

(1. 江苏省农业科学院农产品加工研究所,江苏 南京 210014; 2. 江苏大学食品与生物工程学院,江苏 镇江 212013)

摘要:【目的】研究蓝莓汁经肠膜明串珠菌R2、植物乳植杆菌9sh及发酵乳杆菌SR2-6混合发酵后,多酚化合物的生物转化规律,并解析其代谢途径。**【方法】**通过前期选定的肠膜明串珠菌R2、植物乳植杆菌9sh及发酵乳杆菌SR2-6对蓝莓汁进行混合发酵,利用超高效液相色谱-电喷雾四极杆飞行时间质谱(UPLC-ESI-Q-TOF-MS)技术开展非靶向代谢组学研究,绘制酚类化合物及其差异代谢物的图谱,对发酵前后显著变化的多酚化合物进行分析,并运用KEGG解析多酚化合物生物转化的代谢路径。**【结果】**发酵后的蓝莓汁中含有726种多酚化合物,包括44.77%黄酮类、41.32%酚酸类、11.98%木质素和香豆素、0.83%的鞣质类以及1.10%其他类。此外,发酵过程中存在多种代谢多酚化合物的生物转化途径,其中酪氨酸代谢、苯丙氨酸代谢以及其他代谢途径的代谢通路显著富集。**【结论】**肠膜明串珠菌R2、植物乳植杆菌9sh和发酵乳杆菌SR2-6混合发酵蓝莓汁能产生多种多酚化合物,主要为黄酮类与酚酸类,代谢途径主要为酪氨酸代谢、苯丙氨酸代谢以及其他代谢途径。该研究可为乳酸菌发酵蓝莓汁中的多酚类化合物的生物转化研究提供参考。

关键词:乳酸菌发酵;蓝莓汁;多酚化合物;KEGG代谢途径

Metabonomic Analysis of Polyphenol Bioconversion in Blueberry Juice by Mixed Fermentation with Lactic Acid Bacteria

GAN Wanling[1,2] *GONG Minhui*[1,2] *SU Wei*[1,2] *FAN Linlin*[1] *WANG Ying*[1] *ZHOU Jianzhong*[1,2*]

(1. Institute of Agri-products Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to reveal the biotransformation patterns and metabolic pathways of polyphenols in blueberry juice during mixed fermentation with *Leuconostoc mesenteroides* R2, *Lactobacillus plantarum* 9sh, and *Lactobacillus fermentum* SR2-6. [**Method**] Blueberry juice underwent mixed fermentation with *Leuconostoc mesenteroides* R2, *Lactobacillus plantarum* 9sh, and *Lactobacillus fermentum* SR2-6 selected in a previous study. Non-targeted metabonomics was conducted based on ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole-time of flight-mass spectrometry (UPLC-ESI-Q-TOF-MS), and the maps of polyphenols and their differential metabolites were drawn. The polyphenols that changed significantly before and after fermentation were analyzed, and the metabolic pathways of polyphenol bioconversion were analyzed *via* Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). [**Result**] The fermented blueberry juice contained 726 polyphenols, which included 44.77% flavonoids, 41.32% phenolic acids, 11.98% lignins and coumarins, 0.83% tannins, and 1.10% others. In addition, there were many bioconversion pathways of polyphenols during fermentation, among which tyrosine metabolism, phenylalanine metabolism and other metabolic pathways were significantly enriched.

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金项目(CX(22)2026)。

通信作者:周剑忠(1965—),男,博士,研究员,硕士研究生导师,主要从事食品生物技术研究。E-mail: zjzluck@126.com

收稿日期:2024-11-15 **修回日期:**2025-01-15

[**Conclusion**] Mixed fermentation of blueberry juice with *Leuconostoc mesenteroides* R2, *Lactobacillus plantarum* 9sh, and *Lactobacillus fermentum* SR2-6 can produce a variety of polyphenols including flavonoids and phenolic acids. The metabolic pathways mainly involve tyrosine metabolism, phenylalanine metabolism and others. This study can provide a reference for the bioconversion of polyphenols in blueberry juice fermented by lactic acid bacteria.

Keywords: lactic acid bacteria fermentation; blueberry juice; polyphenol compounds; KEGG metabolic pathway

蓝莓是杜鹃花科越橘属植物，富含丰富的活性成分，包括花青素、黄酮醇和酚酸等，其中多酚化合物的种类达 8 000 多种[1]。蓝莓富含多糖、维生素、矿物质及膳食纤维等物质，使其成为乳酸菌发酵的理想基质。研究表明，乳酸菌发酵不仅能提升蓝莓的安全性、风味和营养价值，还是一种性价比较高的生物加工技术[2]。近年来，随着乳酸菌发酵工艺的优化，越来越多的新型果蔬产品应运而生[3]。在发酵过程中，乳酸菌通过水解细胞壁，促使多酚化合物释放，从而显著提升了游离多酚的含量，进一步增强了蓝莓的功能活性[4]。

乳酸菌发酵可以实现果蔬汁中活性成分的生物转化，不仅有助于提升酚类化合物含量，还能增强其抗氧化性能，并可能引起多酚的结构变化[5]。Kwaw 等[6]研究表明，生桑葚汁中多酚化合物质量浓度超过 1 000 μg/mL，而经过乳酸菌发酵，其多酚水平显著提升，尤其是丁香酸、花青素-3-*O*-芦丁苷和槲皮素，分别成了桑葚汁中黄酮类物质、花青素和黄酮醇类物质的主要组分，影响了桑葚汁次生代谢物的组成。Wu 等[7]研究表明，混合菌种发酵显著提升了蓝莓和黑莓汁中丁香酸、阿魏酸和没食子酸等多酚化合物水平，并增强了其抗氧化能力。Li 等[8]分离了蓝莓中的内源性乳酸菌，并利用其发酵蓝莓汁，结果显示，该发酵方法提升了蓝莓汁中多酚化合物水平及抗氧化性能。黄克霞等[9]利用酿酒酵母为主、乳酸菌为辅的微生物群对蓝莓汁进行分阶段发酵，结果显示，发酵蓝莓汁中共检测到 19 种新的挥发性香气成分，并且其多酚化合物的结构也发生了明显变化。由此可知，果汁在乳酸菌发酵过程中所含的活性成分及其营养功能的变化与使用的菌种密切相关。

某些酚酸的衍生物及花色苷的代谢与乳酸菌的特性密切相关。对多酚转化过程具有显著影响的菌种包括植物乳植杆菌[10]、鼠李糖乳酪杆菌、干酪乳酪杆菌、嗜酸乳杆菌和双歧杆菌[11]等，其中植物乳植杆菌能将多酚转变为酚酸以及其他芳香化合物[12]。现有研究表明，用副干酪乳酪杆菌、植物乳植杆菌及嗜酸乳杆菌对果汁进行发酵，可显著提升其多酚化合物水平。Pérez-Gregorio 等[13]的研究也观察到类似现象，这可能是因为乳酸菌能够合成水解酶，水解酶能降解复杂的植物成分；此外，也可能是因为果汁中的高分子聚合物发生降解，使结合态化合物转化为游离态形式。因此，研究乳酸菌发酵过程中多酚化合物的转化规律及其相关代谢过程，对于解析菌种的发酵特性、果汁中营养物质的转化规律及指导相关产品的开发具有重要意义。

作者所在研究组前期通过对耐酸性、耐胆盐和多酚化合物转化能力等的评估，筛选出了 3 种具备良好耐受性的细菌，包括植物乳杆菌 9sh、发酵乳杆菌 SR2-6 和肠膜明串珠菌 R2[14]。混合发酵试验结果表明，这些菌种的混合发酵能够显著提升代谢产物的生成，同时改善蓝莓汁的风味[15]，其效果优于单一菌株发酵。然而，混合发酵过程中多酚化合物的转变及其代谢途径尚未明晰。为深入了解此过程，本研究通过前期选定的肠膜明串珠菌 R2、植物乳植杆菌 9sh 及发酵乳杆菌 SR2-6 对蓝莓汁进行混合发酵，利用 UPLC-ESI-Q-TOF-MS 技术开展非靶向代谢组学研究，绘制多酚化合物及其差异代谢物的图谱，并对发酵前后显著变化的多酚化合物进行分析。同时，运用 KEGG 解析多酚生物转化的代谢路径，揭示蓝莓汁发酵过程中的营养成分变化，以期为相关代谢产物的分析提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

冷冻‘南高丛’蓝莓：南京双吉农业发展有限公司；肠膜明串珠菌 R2、植物乳植杆菌 9sh、发酵乳杆菌 SR2-6：作者所在单位筛选获得。

MRS 肉汤培养基：北京奥博星生物技术有限公司；琼脂：德国 Biofroxx 公司；甲酸：分析纯，阿拉丁试剂（上海）有限公司；乙腈、甲醇：色谱级，德

国Merck公司；碳酸氢钠、乳糖、大豆肽：浙江诺一生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

高压灭菌锅：SX-500型，日本TOMY公司；冷冻离心机：3K-15型，美国Sigma公司；生物化学培养箱：LRH-150F型，上海一恒科学仪器有限公司；涡旋仪：MX-S型，美国SCILOGEX公司；恒温水浴锅：HH-4型，常州国华电器有限公司；高效液相色谱仪：ExionLC™ AD型，美国Agilent科技有限公司；三重四极质谱仪：6500 QTRAP型，美国Agilent科技有限公司；色谱柱：Agilent SB-C18型，美国Agilent科技有限公司；烘箱：DHG-9023A型，上海一恒科学仪器有限公司；超净工作台：SW-CJ-1C型，苏州净化设备有限公司；榨汁机：XY-8608型，广东德玛仕智能厨房设备有限公司；pH计：FE-20型，梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株活化与培养

将甘油管中保藏的乳酸菌以体积分数3%接种至4 mL MRS液体培养基中，37 ℃培养24 h。用接种环取菌液在MRS固体培养基上划线，37 ℃培养48 h后挑取单菌落接种到8 mL MRS液体培养基中，37 ℃培养24 h，在4 000 r/min条件下离心10 min，弃去上清液，用无菌水洗涤沉淀，再离心，重复2~3次，用无菌水重悬，使菌浓度达到1.0×10^7 CFU/mL，得到乳酸菌种子液。

1.3.2 发酵蓝莓汁的制备

将冷冻蓝莓于室温解冻，打浆，4 500 r/min离心15 min，上清液经40目滤布过滤，得到蓝莓汁，用0.1 mol/L碳酸氢钠调节pH至4.5，加入质量分数6%的乳糖和质量分数0.6%的大豆肽进行调配，搅拌均匀，于85 ℃杀菌25 min，待其冷却后接入体积分数8%的种子液，3株乳酸菌肠膜明串珠菌R2、植物乳植杆菌9sh、发酵乳杆菌SR2-6的体积比为2∶1∶1，30 ℃静置培养60 h，于4 ℃放置2 h以停止发酵。

1.3.3 样品的预处理

将发酵蓝莓汁于4 000 r/min离心10 min，然后将上清液转移至离心管中，涡旋混合10 s。将100 μL样品加入已标记的1.5 mL离心管中，随后添加100 μL的内标提取液（体积分数为70%甲醇），涡旋混合15 min，在4 ℃、12 000 r/min条件下离心3 min，用0.22 μm微孔滤膜过滤上清液，将滤液转移至进样瓶中，进行UPLC-ESI-Q-TOF-MS分析。

1.3.4 UPLC-ESI-Q-TOF-MS检测方法

采用Agilent Technologies ExionLC™ AD系统进行样品分离，使用的色谱柱为Agilent SB-C18（2.1 mm×100 mm×1.8 μm）。流动相A为体积分数0.1%的甲酸水溶液，流动相B为乙腈，具体操作参数为：温度40 ℃，流量0.35 mL/min，上样量2 μL。洗脱程序设置为：0~9.0 min，流动相B体积分数从5%升高至95%；9.0~10.0 min，流动相B体积分数为95%；10.0~11.1 min，流动相B体积分数从95%降至5%；11.1~14.0 min，流动相B体积分数为5%。

采用质谱仪进行分析，设备配备了电喷雾电离（ESI）技术。在进行分析时，负离子模式下ESI工作电压为−4 500 V，正离子模式下ESI工作电压为5 500 V，离子源的温度设置为500 ℃。此外，离子源气体I（GSI）、气体II（GSII）以及气帘气（CUR）的气压分别调节至344.73、413.68、172.36 kPa。

1.4 数据处理与统计分析

所有试验重复3次，结果以平均值±标准差表示。采用Analyst 1.6.3软件对质谱数据进行处理；采用UV软件对代谢物水平进行分析；通过R软件绘制热图；采用SIMCA 14.1软件对代谢物进行主成分分析（PCA）和层次聚类分析；通过KEGG数据库构建代谢通路并分析。

2 结果与讨论

2.1 代谢物定性、定量分析

使用UPLC-ESI-Q-TOF-MS技术分析蓝莓汁发酵前和发酵后的多酚化合物成分，用Analyst 1.6.3软件处理质谱数据。混样质控（QC）样本的总离子流图及多反应监测（MRM）模式下检测的代谢物的多峰图见图1~2，横坐标为代谢物检测的保留时间，纵坐标为离子检测的离子流强度（单位为cps）。

运用区域代谢数据库对样本中的多酚化合物进行定性和定量研究。MRM模式下的检测结果（见图2）展现了样本中可鉴定的多酚成分，其中不同颜色的色谱峰代表不同多酚化合物的检测结果。如表1和图3所示，蓝莓汁中共识别到726种不同的多酚化合物，主要包括黄酮类、酚酸类、木质素和香豆素、鞣质类等多个类别。其中，黄酮类

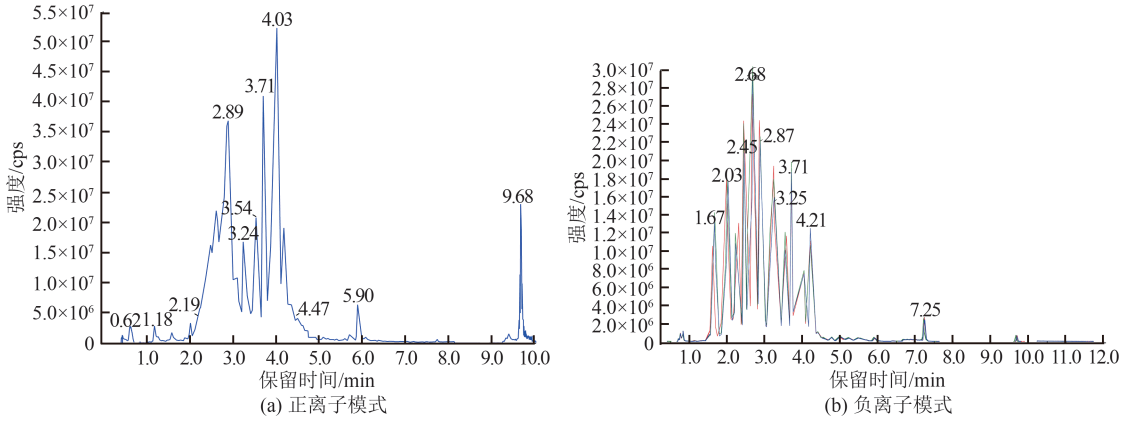


图 1　混样 QC 样本质谱分析总离子流图

Fig. 1　Total ion chromatograms of mixed QC sample in mass spectrometry analysis

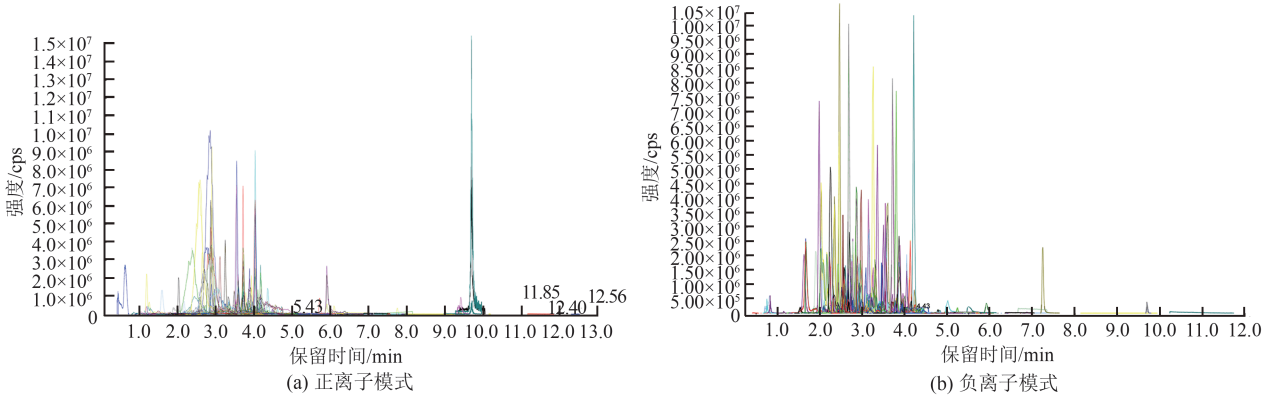


图 2　MRM 模式下检测的代谢物多峰图

Fig. 2　Multimodal chromatograms of metabolite detection under the MRM mode

占比最大，为 44.77%，其次是酚酸类，这些成分赋予了蓝莓汁较为全面的保健功能[16]。

2.2　多变量统计分析

2.2.1　PCA

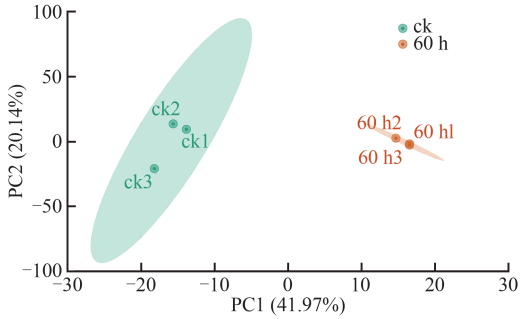
PCA 是一种无监督模式识别的多维数据统计分析方法，通过正交变换将一组可能存在相关性的变量转换为一组线性不相关的变量，转换后的这组变量称为主成分。PCA 是从大量的原始变量中提取出少数主成分，在尽可能保留原始信息的同时，确保各成分相互独立，并通过少数主成分来揭示多个变量之间的内在关系，这一过程通常是通过线性组合多个指标并构建新的综合指标来实现降维分析[17]。

表 1　酚类化合物的分类及数量

Table 1　Classification and number of phenols

分类	占比/%	数量/种
黄酮类	44.77	325
酚酸类	41.32	300
木脂素和香豆素	11.98	87
鞣质类	0.83	6
其他类	1.10	8

利用 PCA 对发酵前后的蓝莓汁样品进行分析。如图 3 所示，PC1 表示第一主成分，PC2 表示第二主成分，百分数表示该主成分对数据集的解释率，椭圆形区域表示 95% 的置信区间。PC1 和 PC2 在 2 个样品中的差异占比分别为 41.97% 和 20.14%，累计占比 62.11%。根据 PC1 可以看出，样本间存在明显的离散现象，即发酵蓝莓汁与未发酵蓝莓汁存在显著差异，说明肠膜明串珠菌 R2、植物乳植杆菌 9sh、发酵乳杆菌 SR2-6 混合发酵显著改变了蓝莓汁的营养组成；PC2 上的分布差异从侧面证明了发酵蓝莓汁与未发酵蓝莓汁在营养组成上存在较小的相似度。由于微生物代谢途径非常复杂，即使在严格控制培养条件的情况下，也



ck—未发酵的蓝莓汁样品；60 h—发酵 60 h 的蓝莓汁样品。

图 3　发酵前和发酵后蓝莓汁中多酚化合物的 PCA 得分图

Fig. 3　PCA plot of polyphenols in blueberry juice before and after fermentation

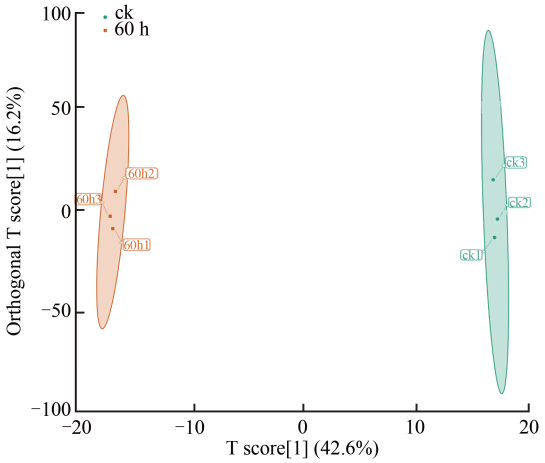
会出现一定差异，这也是导致同一组平行样本之间存在细微差异的原因[18]。

2.2.2　正交偏最小二乘法判别分析（OPLS-DA）

偏最小二乘法判别分析（partial least squares-discriminant analysis，PLS-DA）是一种有监督模式识别的多变量统计分析方法，即分别提取自变量 X 与因变量 Y 中的成分，然后计算成分间的相关性。OPLS-DA 集成了正交信号校正（OSC）与 PLS-DA，其过程包括在对原始数据进行 ln 转换之后，进行数据中心化，接着基于 R 软件平台，使用 Metabo Analyst R 包中的 OPLSR.Anal 函数进行数据分析。在此过程中，X 代表样本的定量信息矩阵，Y 则指样本的分组信息矩阵。

如图 4 所示，横轴代表预测的主要成分，纵轴则代表正交成分，百分比反映了各成分对数据集的解释率，椭圆形区域则表示 95% 的置信区间。从横坐标方向可以看出，发酵前与发酵后的蓝莓汁明显分离；从纵坐标方向可以看出，组间差异较小。与 PCA 不同的是，OPLS-DA 能够显著增强组间的区分度，有助于识别不同代谢物。这是因为 OPLS-DA 能将输入数据矩阵分为 2 部分：一部分与预设的组别相关；另一部分则无关。通过去除无关的差异，以此来筛选出具有显著差异的变量。

OPLS-DA 评价模型的预测参数有 R^2_X、R^2_Y 和 Q^2，其中 R^2_X 和 R^2_Y 分别表示所建模型对 X 和 Y 矩阵的解释率，Q^2 表示模型的预测能力，这 3 个指标越接近 1 表示模型越稳定可靠，Q^2>0.5 表明模型有效，Q^2>0.9 表明模型的预测性能优异。OPLS-DA 验证图见图 5，横坐标表示模型 R^2_Y、Q^2 的置换保留度，纵坐标表示模型保留度的频率，该频率基于模



ck—未发酵的蓝莓汁样品；60 h—发酵 60 h 的蓝莓汁样品。

图 4　显著差异代谢物的 OPLS-DA 得分图

Fig. 4　OPLS-DA plot of significantly differential metabolites

型对数据进行的 200 次随机排列组合得出。由图 5 可知，模型的 R^2_X=0.588、Q^2=0.896、R^2_Y=1.000，表明模型可行且预测性能较好，OPLS-DA 模型稳定且有意义，可进一步用于分析乳酸菌混合发酵蓝莓汁的代谢物差异[19]。

2.3　单变量统计分析

单变量的统计分析方法主要包含假设检验以及差异倍数分析。根据 OPLS-DA 模型（生物学重复≥3）得到的变量重要性投影（variable importance in projection，VIP）值，可以初步筛选出不同品种或组织间的差异代谢物，同时可以结合单变量分析的 P/FDR（生物学重复≥2）或者 FC 值来进一步筛选出差异代谢物。

对发酵前和发酵后蓝莓汁的多酚化合物进行

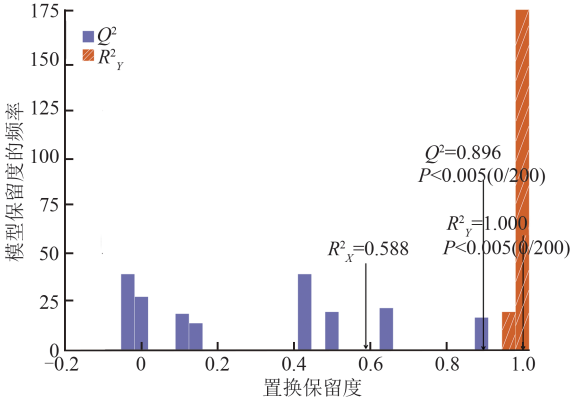


图 5　显著差异代谢物的 OPLS-DA 验证图

Fig. 5　OPLS-DA validation diagram of significantly differential metabolites

生物样本分析，VIP值>1、FC≥2（或FC≤0.5）、P≤0.05时，说明该代谢物差异显著，以此标准筛选出各个比较组差异代谢物的火山图。如图6所示，横坐标lb FC的绝对值越大，代表这些物质在2组样本之间的相对含量差异越明显；纵坐标表示显著性差异的水平（−lg P），−lg P越大表明差异越明显，所筛选出的差异代谢物更具可靠性；图中数据点的大小则代表该代谢物的VIP值。以未发酵蓝莓汁为对照，共检测到了726种代谢物，其中42种差异代谢物显著上调，33种差异代谢物显著下调，651种差异代谢物的变化不具有统计学意义。

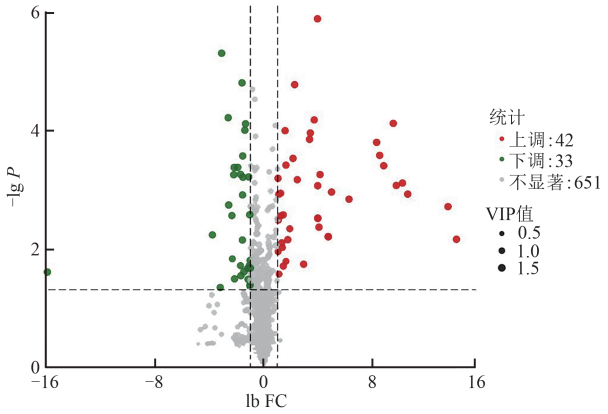


图6 乳酸菌发酵蓝莓汁的差异代谢物火山图

Fig. 6 Volcano plot of different metabolites in blueberry juice fermented by lactic acid bacteria

2.4 差异代谢物筛选

根据VIP值>1、FC≥2、P≤0.05，筛选得到42种显著上调的差异代谢物，包括25种酚酸类、3种黄酮类、3种木质素和香豆素以及1种鞣质类，见表2。根据VIP值>1、FC≤0.05、P≤0.05，筛选得到33种显著下调的差异代谢物，包括16种酚酸类、14种黄酮类、2种木质素和香豆素以及1种芪类，见表3。

酚酸类是蓝莓汁发酵过程中的主要差异代谢物，酚酸类代谢物的结构变化主要在甲酸、乙酸、丙酸、水杨酸、肉桂酸等结构的不同位置上连接羟基、苯基、甲氧基等基团[20]，如5-甲氧基水杨酸、4-羟苯基乳酸、2-羟基-3-苯基丙酸、3,4-二甲氧基苯乙酸、2,3-二羟基苯甲酸等。5-甲氧基水杨酸作为儿茶酚和龙胆酸代谢途径的初始代谢物，可通过脱甲基化反应直接转化为龙胆酸，或脱甲基化后进一步还原成儿茶酚[21]，龙胆酸具有减轻关节肿胀和炎症反应、促进细胞凋亡等作用[22]，儿茶酚具有抗菌作用[23]。4-羟苯基乳酸是苯丙氨酸的代谢产物，苯丙氨酸可以转氨基为苯丙酮酸，苯丙酮酸进一步通过羟酸脱氢酶代谢为4-羟苯基乳酸[24]。苯丙酸是微生物代谢途径中的重要中间产物，微生物通过不同的代谢途径可以将苯丙酸分解为儿茶酚、原儿茶酸和龙胆酸[25]，原儿茶酸作为一种天然的酚酸类化合物，广泛分布于多种水果和蔬菜中，具有抗氧化[26]、抗炎[27]、抗菌[28]和抗凋亡[29]等多种生物活性。二氢阿魏酸水平的增加主要是由于乳酸菌可利用羟基肉桂酸作为电子受体，通过其酚酸还原酶将阿魏酸还原为二氢阿魏酸[11]。有研究表明，相较于阿魏酸，二氢阿魏酸具有更强的抗氧化活性，并且能在细胞内发挥抗氧化作用的同时，在内皮细胞中实现生物累积[30]。另外，从表2中可以看出，乳酸菌发酵可以促进蓝莓汁中对香豆酸、丁子香酚、藜芦酸等的产生。对香豆酸具有抑制细胞增殖与迁移、保护神经、预防糖尿病、抗氧化等功能[31-32]，该物质在蓝莓、苹果、葡萄等水果中分布广泛[33]，且其抗氧化能力高于阿魏酸、咖啡酸、绿原酸等其他酚酸类物质[34]。

黄酮类代谢物的变化主要集中在具有糖苷键结构的黄酮类代谢物，例如槲皮素、山柰酚和芹菜素等[19]。研究表明，有14种代谢物水平呈显著下降趋势，包括三色堇黄酮苷、大齿杨苷、槲皮素-7-*O*-（6”-丙二酰）葡萄糖苷、槲皮素-3,4’-*O*-二葡萄糖苷、芹菜素-7-*O*-（6”-乙酰）葡萄糖苷、*E*-3,4,5’-三羟基-3’-二苯乙烯葡萄糖苷、山柰酚-3-*O*-（6”-丙二酰）葡萄糖苷、芹菜素-8-*C*-（2’’-木糖基）葡萄糖苷、山柰酚-3-*O*-（6”-丙二酰）半乳糖苷、6”-*O*-丙二酰染料木苷、蝙蝠葛碱A葡萄糖苷、芹菜素-7-*O*-（6”-丙二酰）葡萄糖苷、锦葵色素-3,5-*O*-二-*O*-葡萄糖苷、茂霍苷A、山柰酚-3-O-（2”-对香豆酰）葡萄糖苷和球松素查耳酮。这些糖苷类物质减少的原因可能与发酵过程中蓝莓汁中的糖苷酶水解糖苷键，使其转化为苷元密切相关[19]。锦葵色素-3,5-*O*-二-*O*-葡萄糖苷作为一种花青素，乳酸菌可将其转化为阿魏酸和丁香酸等酚酸。此外，显著上调的差异代谢物有8-去甲杜鹃素、山野豌豆苷、荭草素-7-*O*-阿拉伯糖苷等，这可能与乳酸菌的发酵作用相关，乳酸菌能够激发黄酮及其醇类的合成，进而促进苷元的转化。

发酵蓝莓汁中，木质素和香豆素、鞣质类、芪

表2　显著上调的差异代谢物

Table 2　Up-regulated metabolites with significant differences

序号	名称	化学式	ln FC
1	5-甲氧基水杨酸	$C_8H_8O_4$	14.12
2	8-去甲杜鹃素	$C_{16}H_{14}O_5$	13.50
3	2,4-二羟基苯乙酸甲酯	$C_9H_{10}O_4$	10.54
4	2-羟基-(4-羟基苯基)丙酸	$C_9H_{10}O_4$	10.16
5	4-羟苯基乳酸	$C_9H_{10}O_4$	9.71
6	邻苯二酚(儿茶酚)	$C_6H_6O_2$	9.48
7	2-羟基-3-苯基丙酸	$C_9H_{10}O_3$	8.78
8	3-(4-羟基苯基)丙酸	$C_9H_{10}O_3$	8.49
9	2,6-二甲氧基苯甲醛	$C_9H_{10}O_3$	8.26
10	鞣花酸-4-*O*-木糖苷	$C_{19}H_{14}O_{12}$	6.24
11	3,4-二甲氧基苯乙酸	$C_{10}H_{12}O_4$	4.96
12	3-羟基肉桂酸	$C_9H_8O_3$	4.71
13	*α*-羟基肉桂酸	$C_9H_8O_3$	4.71
14	2-羟基肉桂酸	$C_9H_8O_3$	4.11
15	3,4-二羟基苯甲酸(原儿茶酸)	$C_7H_6O_4$	4.03
16	2,3-二羟基苯甲酸	$C_7H_6O_4$	3.95
17	2,5-二羟基苯甲酸(龙胆酸)	$C_7H_6O_4$	3.95
18	香豆酸甲酯	$C_7H_6O_4$	3.94
19	对苯二酚	$C_6H_6O_2$	3.92
20	3,4-二甲氧基苯甲酸(藜芦酸)	$C_9H_{10}O_4$	3.68
21	2-甲基苯甲酸	$C_8H_8O_2$	3.40
22	2-(甲酰氨基)苯甲酸	$C_8H_7NO_3$	3.34
23	对香豆酸	$C_9H_8O_3$	2.91
24	4-羟基-3-甲氧基扁桃酸	$C_9H_{10}O_5$	2.44
25	7-羟基香豆素(伞形酮)	$C_9H_6O_3$	2.25
26	3-羟基苯甲醛	$C_7H_6O_2$	2.13
27	邻羟基苄醇(水杨醇)	$C_7H_8O_2$	1.89
28	2-(羟基甲基)苯甲酸	$C_8H_8O_3$	1.74
29	4-羟基苯甲酰苹果酸	$C_{11}H_{10}O_7$	1.61
30	2',4',6'-三羟基苯乙酮	$C_8H_8O_4$	1.61
31	山柰酚-3-*O*-甘露糖苷(山野豌豆苷)	$C_{21}H_{20}O_{11}$	1.55
32	咖啡醛	$C_9H_8O_3$	1.42
33	盐酸二甲酯	$C_8H_{14}O_8$	1.41
34	荭草素-7-*O*-阿拉伯糖苷	$C_{26}H_{28}O_{15}$	1.35
35	丁子香酚	$C_{10}H_{12}O_2$	1.31
36	氢化肉桂酸	$C_9H_{10}O_2$	1.23
37	对甲氧基苯甲酸(茴香酸)	$C_8H_8O_3$	1.22
38	2-甲氧基-4-乙烯基苯酚	$C_9H_{10}O_2$	1.11
39	3-羟基苯乙酸	$C_8H_8O_3$	1.08
40	二氢阿魏酸	$C_{10}H_{12}O_4$	1.04
41	vitelignin A	$C_{20}H_{16}O_8$	1.03
42	松脂醇	$C_{20}H_{22}O_6$	1.03

表3　显著下调的差异代谢物

Table 3　Down-regulated metabolites with significant differences

序号	名称	化学式	ln FC
1	三色堇黄酮苷	$C_{27}H_{30}O_{14}$	−15.90
2	大齿杨苷	$C_{21}H_{28}O_9$	−3.79
3	槲皮素-7-*O*-(6''-丙二酰)葡萄糖苷	$C_{24}H_{22}O_{15}$	−3.21
4	水杨酸	$C_7H_6O_3$	−3.11
5	芥子醛	$C_{11}H_{12}O_4$	−2.63
6	阿魏酸钠	$C_{10}H_9NaO_4$	−2.59
7	槲皮素-3,4'-*O*-二葡萄糖苷	$C_{27}H_{30}O_{17}$	−2.36
8	对羟基苯乙醇(酪醇)	$C_8H_{10}O_2$	−2.32
9	芹菜素-7-*O*-(6''-乙酰)葡萄糖苷	$C_{23}H_{22}O_{11}$	−2.22
10	4-羟基苯甲醛	$C_7H_6O_2$	−2.19
11	阿魏酰芥子酰酒石酸	$C_{25}H_{24}O_{13}$	−2.16
12	*E*-3,4,5'-三羟基-3'-二苯乙烯葡萄糖苷	$C_{20}H_{22}O_9$	−1.92
13	山柰酚-3-*O*-(6''-丙二酰)葡萄糖苷	$C_{24}H_{22}O_{14}$	−1.72
14	芹菜素-8-*C*-(2''-木糖基)葡萄糖苷	$C_{26}H_{28}O_{14}$	−1.72
15	山柰酚-3-*O*-(6''-丙二酰)半乳糖苷	$C_{24}H_{22}O_{14}$	−1.70
16	异香草醛	$C_8H_8O_3$	−1.61
17	5,7,8-三羟基-6-甲氧基香豆素	$C_{10}H_8O_6$	−1.58
18	芥子酸	$C_{11}H_{12}O_5$	−1.57
19	4-羟基-3-甲氧基苯甲醛(香草醛)	$C_8H_8O_3$	−1.56
20	绿原酸甲酯	$C_{17}H_{20}O_9$	−1.54
21	6''-*O*-丙二酰染料木苷	$C_{24}H_{22}O_{13}$	−1.48
22	5-*O*-咖啡酰莽草酸	$C_{16}H_{16}O_8$	−1.41
23	4-咖啡酰莽草酸	$C_{16}H_{16}O_8$	−1.36
24	1-*O*-肉桂酰-*β*-*D*-葡萄糖	$C_{15}H_{18}O_7$	−1.22
25	蝙蝠葛碱A葡萄糖苷	$C_{17}H_{20}O9$	−1.17
26	芹菜素-7-*O*-(6''-丙二酰)葡萄糖苷	$C_{24}H_{22}O_{13}$	−1.12
27	锦葵色素-3,5-*O*-二-*O*-葡萄糖苷	$C_{29}H_{35}O_{17}$	−1.08
28	阿魏酸	$C_{10}H_{10}O_4$	−1.08
29	异阿魏酸	$C_{10}H_{10}O_4$	−1.05
30	茂霍苷A	$C_{27}H_{32}O_{12}$	−1.04
31	山柰酚-3-*O*-(2''-对香豆酰)葡萄糖苷	$C_{30}H_{26}O_{13}$	−1.03
32	球松素查耳酮	$C_{16}H_{14}O_4$	−1.03
33	槲皮素-3-*O*-鼠李糖苷(槲皮苷)	$C_{21}H_{20}O_{11}$	−1.00

类的显著变化的差异代谢物较少，且各物质之间并无明显相关性。木质素和香豆素中有3种差异代谢物显著上调，分别是伞形酮、vitelignin A和松脂醇。伞形酮具有抑制细胞凋亡和氧化应激等药理活性[35]；vitelignin A具有抗真菌活性[36]；松脂醇是一种天然的抗炎补充剂，可以治疗皮肤溃疡、改善骨骼肌增殖等[37]。此外，木质素和香豆素中有2种显著下调的差异代谢物(5,7,8-三羟基-6-甲氧基香豆素、蝙蝠葛碱A葡萄糖苷)。鞣质类中，有1种显著上调的差异代谢物(鞣花酸-4-*O*-木糖苷)，其余鞣质类代谢物均无显著差异。*E*-3,4,5'-三羟基-3'-二苯乙烯葡萄糖苷是芪类中唯一显著下调的差异代谢物，这可能是因为乳酸菌发酵产生的酶使其结构中的糖苷键断裂。

2.5　多酚代谢通路分析

基于差异代谢物的分析结果，通过KEGG数据库构建代谢通路并进行分析，结果见图7。

横坐标轴展示的是每条通路的富集因子，即该通路下的差异代谢物数量与该通路下所有注释代谢物数量的比例，富集因子越高说明富集程度越高。纵坐标轴为各通路名称（按 *P* 值排序），图中气泡的颜色体现了 *P* 值的大小，颜色越红表明富集的显著性越强，气泡的尺寸大小则表示在特定通路中有多少差异代谢物显著富集。

由图 7 可知，具有显著差异的代谢物所参与的 KEGG 代谢路径涵盖了多种生物合成途径，包括次生代谢产物的生物合成、酪氨酸代谢、苯丙烷生物合成、苯丙氨酸代谢和萜类、哌啶及吡啶生物碱的生物合成，以及植物激素信号转导。此外，还有类黄酮生物合成、色氨酸代谢、泛醌和其他萜类醌生物合成、异喹啉生物碱的生物合成以及黄酮和黄酮醇生物合成等多个路径。在这些通路中，苯丙氨酸代谢、酪氨酸代谢及其他相关代谢途径是富集最显著的 3 条代谢通路。

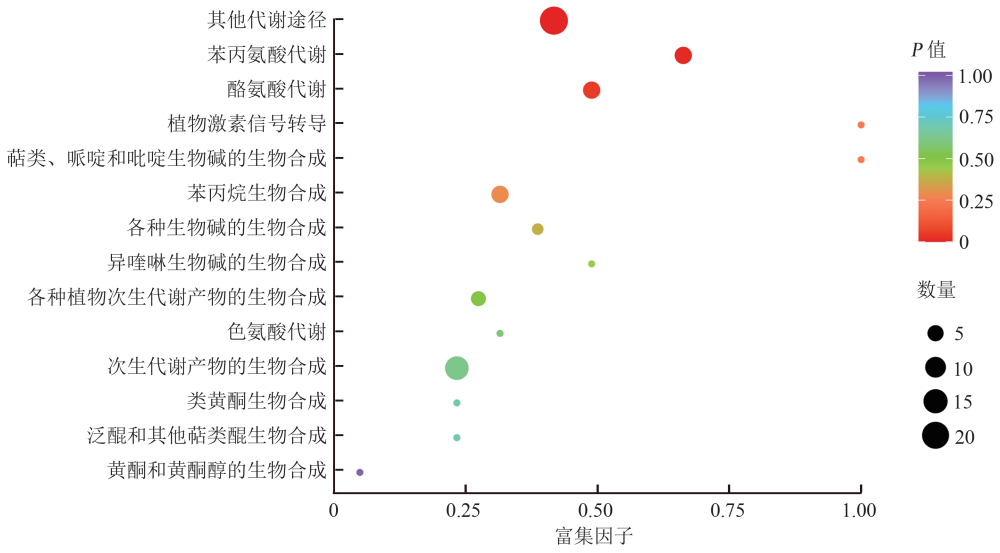


图 7　差异代谢物的 KEGG 富集图

Fig. 7　KEGG enrichment map of differential metabolites

表 4 为差异代谢物在 KEGG 通路中的注释分布，由表 4 可知，有 12 种多酚化合物参与了酪氨酸代谢，其中包括 6 种差异显著的代谢物，分别为龙胆酸、对苯二酚、4-羟基-3-甲氧基扁桃酸、对羟基苯乙醇、3-羟基苯乙酸和对香豆酸；有 9 种多酚代谢物参与了苯丙氨酸代谢，包括 6 种差异显著的代谢物，分别为 2-羟基-3-苯基丙酸、2-羟基肉桂酸、3-羟基苯乙酸、氢化肉桂酸、3-羟基肉桂酸、*α*-羟基肉桂酸，其中肉桂酸类物质在苯丙氨酸代谢通路中上调的原因可能是苯丙氨酸解氨酶将苯丙氨酸催化成了各种肉桂酸类物质；有 12 种多酚化合物参与了酪氨酸代谢，其中包括 22 种显著差异的代谢物，分别为 2-甲基苯甲酸、阿魏酸、2-羟基-3-苯基丙酸、水杨酸、松脂醇、香草醛等，其中阿魏酸水平下调的原因是其在发酵过程中转化成了其他增值产品（如香草醛、香草酸、4-乙烯基愈创木酚、苯乙烯等）[11]。

表 4　差异代谢物在 KEGG 通路中的注释分布

Table 4　Annotation distribution of differential metabolites in KEGG pathways

代谢途径	差异显著的代谢物数量/种	代谢物数量/种
次生代谢产物的生物合成	14	56
酪氨酸代谢	6	12
苯丙烷生物合成	6	18
苯丙氨酸代谢	6	9
萜类、哌啶和吡啶生物碱的生物合成	1	1
各种生物碱的生物合成	2	5
植物激素信号转导	1	1
各种植物次生代谢产物的生物合成	4	14
类黄酮生物合成	1	4
色氨酸代谢	1	3
泛醌和其他萜类醌生物合成	1	4
异喹啉生物碱的生物合成	1	2
黄酮和黄酮醇的生物合成	1	15
其他代谢途径	22	51

3 结论

3种乳酸菌（肠膜明串珠菌R2、植物乳植杆菌9sh和发酵乳杆菌SR2-6）混合发酵，可以改变蓝莓汁中多酚化合物的组成。经乳酸菌发酵的蓝莓汁中含有726种酚类物质，包括44.77%黄酮类、41.32%酚酸类、11.98%木质素和香豆素、0.83%的鞣质类以及1.10%的其他类。采用UPLC-ESI-Q-TOF-MS技术构建多酚化合物和差异代谢物的图谱，分析发酵前后显著变化的多酚化合物，结果表明，有42种代谢物显著上调，33种代谢物显著下调，651种代谢物差异不显著。差异代谢物与多种多酚代谢的生物转化途径相关，其中酪氨酸代谢、苯丙氨酸代谢以及其他代谢途径的代谢通路显著富集。本文研究了3种乳酸菌混合发酵对蓝莓汁多酚化合物转化的影响，后续可对发酵蓝莓汁的品质进行分析，解析蓝莓汁多酚化合物转变与其感官品质和功能活性之间的相关性，为提高蓝莓汁产品的营养附加值提供技术参考。

参考文献

[1] 李亚东，裴嘉博，孙海悦. 全球蓝莓产业发展现状及展望[J]. 吉林农业大学学报，2018，40(4)：421-432.
LI Y D，PEI J B，SUN H Y. Status and prospect of global blueberry industry [J]. Journal of Jilin Agricultural University，2018，40(4)：421-432.(in Chinese)

[2] 李雨浩. 蓝莓复合果汁的研制及贮藏期内品质变化研究[D]. 北京：北京林业大学，2020.

[3] SZUTOWSKA J. Functional properties of lactic acid bacteria in fermented fruit and vegetable juices：a systematic literature review[J]. European Food Research and Technology，2020，246(3)：357-372.

[4] 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.(in Chinese)

[5] 覃超，唐富豪，滕建文，等. 产β-葡萄糖苷酶乳酸菌发酵对百香果皮多酚含量和功能活性的影响[J]. 食品与发酵工业，2023，49(8)：230-236.
QIN C，TANG F H，TENG J W，et al. Effect of β-glucosidase producing lactic acid bacteria fermentation on polyphenol content and functional activity of passion fruit peel[J]. Food and Fermentation Industries，2023，49(8)：230-236.(in Chinese)

[6] KWAW E，MA Y K，TCHABO W，et al. Effect of *Lactobacillus strains* on phenolic profile，color attributes and antioxidant activities of lactic-acid-fermented mulberry juice[J]. Food Chemistry，2018，250：148-154.

[7] WU Y，LI S J，TAO Y，et al. Fermentation of blueberry and blackberry juices using *Lactobacillus plantarum*，*Streptococcus thermophilus* and *Bifidobacterium bifidum*：growth of probiotics，metabolism of phenolics，antioxidant capacity *in vitro* and sensory evaluation [J]. Food Chemistry，2021，348：129083.

[8] LI S J，TAO Y，LI D D，et al. Fermentation of blueberry juices using autochthonous lactic acid bacteria isolated from fruit environment：fermentation characteristics and evolution of phenolic profiles[J]. Chemosphere，2021，276：130090.

[9] 黄克霞，祝义伟，陈秋生，等. 蓝莓果汁发酵工艺优化及挥发性风味物质分析[J]. 中国酿造，2021，40(12)：109-114.
HUANG K X，ZHU Y W，CHEN Q S，et al. Optimization of fermentation process and analysis of volatile flavor compounds of blueberry juice[J]. China Brewing，2021，40(12)：109-114.(in Chinese)

[10] CHEN J，LIN H M，HU M. Absorption and metabolism of genistein and its five isoflavone analogs in the human intestinal Caco-2 model[J]. Cancer Chemotherapy and Pharmacology，2005，55(2)：159-169.

[11] RICCI A，CIRLINI M，CALANI L，et al. *In vitro* metabolism of elderberry juice polyphenols by lactic acid bacteria[J]. Food Chemistry，2019，276：692-699.

[12] FILANNINO P，DI CAGNO R，GOBBETTI M. Metabolic and functional paths of lactic acid bacteria in plant foods：get out of the labyrinth[J]. Current Opinion in Biotechnology，2018，49：64-72.

[13] PÉREZ-GREGORIO M R，REGUEIRO J，ALONSO-GONZÁLEZ E，et al. Influence of alcoholic fermentation process on antioxidant activity and phenolic levels from mulberries (*Morus nigra* L.)[J]. LWT-Food Science and Technology，2011，44(8)：1793-1801.

[14] 龚敏慧，单成俊，李双健，等. 基于响应面法和人工神经网络优化复合乳酸菌发酵蓝莓汁产胞外多糖工艺[J]. 食品工业科技，2023，44(17)：242-250.
GONG M H，SHAN C J，LI S J，et al. Optimization of exocytopolysaccharide production from fermented blueberry juice by complex lactic acid bacteria based on response surface method and artificial neural network[J]. Science and Technology of Food Industry，2023，44(17)：242-250.(in Chinese)

[15] 龚敏慧. 高产胞外多糖的乳酸菌对蓝莓汁发酵的影响

研究[D]. 镇江:江苏大学,2023.
[16] 董盼豪. 桑葚酚类物质研究及全组分果汁研发[D]. 南昌:南昌大学,2021.
[17] NEMETH M A. Multi- and megavariate data analysis [J]. Technometrics,2003,45(4):362.
[18] 李东娜. 基于代谢组学的非酿酒酵母与酿酒酵母协同发酵白果米酒的研究[D]. 上海:上海应用技术大学,2021.
[19] ARU V, PISANO M B, SAVORANI F, et al. Metabolomics analysis of shucked mussels' freshness[J]. Food Chemistry,2016,205:58-65.
[20] 李璞钰. 宁夏浆水微生物中高产β-葡萄糖苷酶乳酸菌筛选及其对沙棘果多酚生物转化的研究[D]. 银川:宁夏大学,2022.
[21] LEE D, CHA S. 5-Methoxysalicylic acid matrix for ganglioside analysis with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry[J]. Journal of the American Society for Mass Spectrometry,2015,26(3):522-525.
[22] DING D,ZHANG Q,ZENG F J,et al. Mechanism of gentisic acid on rheumatoid arthritis based on miR-19b-3p/RAF1 axis[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine,2023,29(6):508-516.
[23] WANG G Q,MENG X Y,WANG P Y,et al. A catechol bioadhesive for rapid hemostasis and healing of traumatic internal organs and major arteries [J]. Biomaterials,2022,291:121908.
[24] LAVERMICOCCA P, VALERIO F, VISCONTI A. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products [J]. Applied and Environmental Microbiology,2003,69(1):634-640.
[25] YUASA K, ISHIZUKA K, KABURAKI S, et al. Metabolism of phenylalanine in *Saccharomyces rouxii*[J]. Agricultural and Biological Chemistry,1976,40(9):1679-1685.
[26] 程菲儿,刘惠卿,张文静. 原花青素和原儿茶酸的协同抗氧化作用[J]. 现代食品,2022(15):168-172.
CHENG F E, LIU H Q, ZHANG W J. Synergistic antioxidant effect of proanthocyanidins and protocatechuic acid[J]. Modern Food,2022(15):168-172.(in Chinese)
[27] 李佳. 原儿茶酸改善高脂诱导肝脏炎症及作用机制研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2021.
[28] 吴咪. 原儿茶酸对小肠结肠炎耶尔森氏菌和藤黄微球菌的抑菌机理研究[D]. 西安:陕西科技大学,2022.
[29] 刘叶明. 原儿茶酸对鱼藤酮诱导的PC12细胞凋亡的保护作用[D]. 大连:大连理工大学,2007.
[30] AMIĆ A, MARKOVIĆ Z, KLEIN E, et al. Theoretical study of the thermodynamics of the mechanisms underlying antiradical activity of cinnamic acid derivatives [J]. Food Chemistry,2018,246:481-489.
[31] 刘沛然,堵国成,周景文,等. 粘红酵母酪氨酸解氨酶在大肠杆菌中的异源表达[J]. 食品与生物技术学报,2016,35(12):1241-1246.
LIU P R, DU G C, ZHOU J W, et al. Heterologous expression of tyrosine ammonia lyase from *Rhodotorula glutinis* in *Escherichia coli*[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2016, 35 (12): 1241-1246.(in Chinese)
[32] 管西芹,毛近隆,唐迎雪,等. 对香豆酸的药理作用研究进展[J]. 中草药,2018,49(17):4162-4170.
GUAN X Q, MAO J L, TANG Y X, et al. Research progress on pharmacological effects of *p*-coumaric acid [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2018, 49 (17):4162-4170.(in Chinese)
[33] PEI K H, OU J Y, HUANG J Q, et al. *p*-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture,2016,96(9):2952-2962.
[34] 赵春贵,张立伟,王晖,等. 肉桂酸及其衍生物抗氧化活性研究[J]. 食品科学,2005,26(1):218-222.
ZHAO C G, ZHANG L W, WANG H, et al. Study on anti-oxidation effects of cinnamic acid and its derivants [J]. Food Science,2005,26(1):218-222.(in Chinese)
[35] 商萍,孙帅波,刘宝华. 伞形酮通过抑制RhoA/ROCK信号通路和自噬改善慢性低氧性肺动脉高压[J]. 生理学报,2022,74(4):555-562.
SHANG P, SUN S B, LIU B H. Umbelliferone improves chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension by inhibiting the RhoA/ROCK signaling pathway and autophagy[J]. Acta Physiologica Sinica, 2022, 74(4): 555-562.(in Chinese)
[36] ZHENG C J, LAN X P, CHENG R B, et al. Furanofuran lignans from *Vitex negundo* seeds [J]. Phytochemistry Letters,2011,4(3):298-300.
[37] KIM S Y, KWON S P, PARK S, et al. Effect of pinoresinol and vanillic acid isolated from *Catalpa bignonioides* on mouse myoblast proliferation *via* the Akt/mTOR signaling pathway[J]. Molecules, 2022, 27 (17):5397.