

主成分分析法优选枸杞乳酸菌发酵饮品发酵剂

黄宁馨¹, 丁士勇¹, 刘睿^{1,2*}, 鲁群¹, 朱和平³

(1. 华中农业大学食品科技学院, 环境食品学教育部重点实验室, 武汉 430070; 2. 农业农村部华中都市农业重点实验室, 武汉 430070; 3. 湖北枸杞珍酒业有限公司, 恩施土家族苗族自治州 445300)

摘 要: 乳酸菌发酵作为果蔬汁的一种绿色加工技术, 不仅可以赋予产品独特的风味, 还可以转化其中的活性物质, 提高产品的营养价值和保健功效。该研究以湖北杂交枸杞为原料, 使用 6 种乳酸菌(植物乳杆菌、嗜热链球菌、嗜酸乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、干酪乳杆菌及发酵乳杆菌)进行发酵, 研究发酵前后枸杞果汁理化特性、主要活性成分及体外抗氧化变化, 并利用主成分分析进行综合评价优选出理想的发酵菌株。结果表明, 6 种乳酸菌在枸杞果汁中生长良好, 活菌数均能达到 10.0 lg CFU/mL 以上。发酵后的枸杞果汁中总糖和还原糖含量显著降低($P<0.05$), 且植物乳杆菌和嗜热链球菌产酸能力更强, 发酵后总酸含量达 6.74、6.07 g/kg。与未发酵枸杞果汁相比, 经植物乳杆菌、嗜热链球菌、鼠李糖乳杆菌和发酵乳杆菌发酵的枸杞果汁中总酚含量增加了 13.76%~28.07%, 而嗜酸乳杆菌和干酪乳杆菌发酵后无显著性差异($P>0.05$)。6 种乳酸菌发酵后枸杞果汁中总黄酮含量增加了 55.80%~161.97%。发酵枸杞果汁的抗氧化活性与发酵前相比均有显著提高($P<0.05$)。基于主成分分析的综合评价函数显示经植物乳杆菌、发酵乳杆菌发酵的枸杞果汁品质更优, 适宜作为开发枸杞高值化绿色加工饮品的发酵剂。

关键词: 菌; 发酵; 主成分分析; 乳酸菌; 湖北杂交枸杞

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2021.07.035

中图分类号: TS275.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2021)-07-0286-07

黄宁馨, 丁士勇, 刘睿, 等. 主成分分析法优选枸杞乳酸菌发酵饮品发酵剂[J]. 农业工程学报, 2021, 37(7): 286-292.

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2021.07.035 <http://www.tcsae.org>

Huang Ningxin, Ding Shiyong, Liu Rui, et al. Optimizing lactic acid bacteria starter culture for wolfberry juice fermentation using principal component analysis[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2021, 37(8): 286-292. (in Chinese with English abstract) doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2021.07.035 <http://www.tcsae.org>

0 引 言

枸杞是中国传统的药食同源植物, 其果实为鲜亮的椭球状浆果, 含有多功能成分, 具有抗衰老、免疫调节、抗动脉粥样硬化等多种功能活性^[1]。湖北杂交枸杞是以宁夏栽培枸杞诱导加倍, 再与湖北当地野生枸杞杂交后成功选育出的品种, 改变了宁夏枸杞直接引种江汉平原不耐渍、不耐湿、发生严重根腐、黑果的问题, 后被引种到建始县^[2]。目前湖北杂交枸杞在建始县种植面积已达 467 hm², 可年产鲜果超 1 000 t, 成为当地脱贫攻坚和乡村振兴的重要产业之一。但湖北杂交枸杞由于水分含量高达 90%以上, 前期研究发现其难以加工成传统干制品枸杞子^[3], 因此亟需开发新型枸杞加工产品, 以提高湖北杂交枸杞的附加值, 避免果农丰产不丰收现象的发生。

乳酸菌发酵作为一种绿色果蔬加工方式, 不仅可以赋予果蔬汁产品独特的风味, 还可以转化基质中的营养物质, 提高产品生物活性, 具有广阔的市场前景^[4-6]。有研究发现苦瓜汁经植物乳杆菌发酵后有机酸、总酚含量

增加, 而且抗氧化活性增强^[7]; 柠檬汁经植物乳杆菌发酵后抗氧化活性和抑菌活性也明显增强^[8]。国内外也已有部分学者关注乳酸菌发酵枸杞汁饮料的相关研究, 汪云阳等^[9]以感官评分为指标, 确定了植物乳杆菌发酵枸杞汁的最优发酵工艺参数。乔博鑫等^[10]对保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌复合发酵枸杞汁的工艺条件进行了优化。此外, 还有研究发现使用乳酸菌与芽孢杆菌复合发酵可以增加枸杞汁中酚类物质和挥发性成分含量, 增强其抗氧化活性^[11]。但是不同的乳酸菌在枸杞果汁中的生长与发酵性能不同, 对外界环境的抵抗能力和对果汁营养成分及活性的影响也有较大差异, 而目前国内外有关不同乳酸菌发酵的枸杞果汁品质评价体系尚未见报道。

主成分分析法是一种采用降维的思想, 利用较少的综合指标代替原先的较多的变量, 使复杂的信息简单化的分析方法, 可以对指标进行简化, 降低人为因素干扰, 目前已广泛应用于果蔬产品的品质评价^[12-13]。近年来有研究者将主成分分析应用于果蔬发酵产品的菌株筛选中, Michalak 等^[14]对 10 种乳酸菌发酵羽衣甘蓝汁的理化及功能特性进行主成分分析, 经综合评价筛选出 3 种乳酸菌作为羽衣甘蓝汁发酵菌株; 辛明等^[15]采用主成分分析和聚类分析对 11 种不同酵母菌株酿造的冬瓜酒品质评价, 确定了羟基自由基清除率、氧自由基清除率、浊度等指标为评价冬瓜酒品质的主要指标, 筛选出 BV818 酵母、F45 酵母为冬瓜酒加工的更优菌种。

收稿日期: 2020-12-19 修订日期: 2021-03-09

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助(项目批号: 2662015PY023)

作者简介: 黄宁馨, 研究方向为功能食品与分子营养。

Email: 657027488@qq.com

*通信作者: 刘睿, 博士, 教授, 研究方向为功能食品与分子营养。

Email: liurui89634@163.com

本研究以湖北杂交枸杞为原料, 利用 6 种不同乳酸菌进行发酵, 分析发酵前后理化品质、活性成分及抗氧化活性等 12 项指标, 并基于主成分分析对其品质进行综合评价, 筛选出适合开发湖北杂交枸杞乳酸菌发酵饮品的乳酸菌发酵剂, 以进一步提高湖北杂交枸杞深加工产品的营养保健作用, 为建始县枸杞的高值化绿色加工提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与主要试剂

湖北杂交枸杞, 湖北枸杞珍酒业有限公司; 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*, Lp90)、嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*, LA85)、干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*, LC89)、鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*, LRa05)、发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*, LF61) 来自江苏微康生物科技有限公司; 嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*, ATCC 19987) 为实验室保藏; MRS 培养基 (Man Rogosa Sharpe Medium, MRS) 和 LB 肉汤培养基 (Luria-Bertani Broth, LB) 购自青岛海博生物公司; 福林酚、芦丁、Trolox (维生素 E 衍生物) 及 1,1-二苯基苦基苯肼 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 购自上海源叶生物科技有限公司; 白砂糖为食品级; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

立式压力蒸汽灭菌锅, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; pH510 pH 计, 美国贝克曼公司; UV-Vis 分光光度计, 日本 SHIMADZU 公司; 电子天平, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司; 数显恒温水浴锅, 国华电器有限公司; 搅拌机, 飞利浦飞利浦家用电器 (珠海) 有限公司; 低温高速离心机, 美国贝克曼公司; 全波长酶标仪, 美国 Thermo Fisher 公司; HTX 多功能酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司; HPY300 恒温培养箱, 武汉海声达仪器设备有限公司; 5W-EF-2FD 无菌操作台, 国华电器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 枸杞乳酸菌发酵果汁制备工艺流程

将冷冻的枸杞鲜果自然解冻后, 挑选饱满、无腐烂的鲜果, 清洗, 与水 1:3 (质量/体积) 混合打汁、破碎, 添加 3% 糖, 经 90 °C, 15 min 灭菌, 冷却至室温, 得到未发酵枸杞汁。将 6 种乳酸菌菌粉分别接种到灭菌后的 MRS 液体培养基, 37 °C 培养 24 h, 活化 2 代后以 5 000 r/min 条件下离心 15 min, 使用无菌生理盐水清洗 3 次后, 与无菌生理盐水混合得到菌悬液, 分别以 3% 接种量接种到未发酵枸杞汁中, 接种后菌浓度为 (8.0±0.4) lg CFU/mL, 37 °C 发酵 48 h。

1.3.2 枸杞乳酸菌发酵果汁的理化指标测定

活菌数: 采用平板稀释法, 参考《食品微生物学检验 乳酸菌检验 GB 4789.35-2016》^[16]; pH 值: 采用 pH 酸度计测定; 总酸: 参照《食品中总酸的测定 GB/T

12456-2008》, 以乳酸计量^[17]; 总糖和还原糖: 采用 3,5-二硝基水杨酸比色法 (3,5-Dinitrosalicylic acid, DNS) 测定^[18]; 可溶性蛋白质: 采用考马斯亮蓝 G-250 法测定。

1.3.3 枸杞乳酸菌发酵果汁的主要活性成分测定

总酚含量采用福林酚法进行测定, 结果以没食子酸当量表示^[19]; 总黄酮采用硝酸铝比色法测定, 结果以芦丁当量表示^[19]; 多糖经水提醇沉后使用苯酚硫酸法测定^[20]。

1.3.4 枸杞乳酸菌发酵果汁的体外抗氧化活性测定

1) DPPH 自由基清除活性的测定

参考文献方法^[21], 吸取 50 μL 样品溶液, 加入 0.2 mmol/L DPPH 乙醇溶液 150 μL, 室温避光反应 30 min, 于 517 nm 处测定吸光值。用超纯水代替样品作为空白对照, 用水代替 DPPH 作为样品对照, 清除率按照式 (1) 计算。

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{样品测定 OD 值} - \text{样品空白 OD 值}}{\text{空白对照 OD 值}} \right) \times 100\% \quad (1)$$

2) 总还原力的测定

参考文献方法^[22], 在离心管中加入 500 μL 0.2 mmol/L pH 值 6.6 的磷酸盐缓冲液和一定浓度的样品溶液 200 μL, 再加入 1% 铁氰化钾 500 μL, 于 50 °C 水浴中加热反应 20 min, 冷至室温后加入 10% 三氯乙酸 500 μL, 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 500 μL 加入蒸馏水 500 μL 和 0.1% 三氯化铁溶液 100 μL, 混匀静置 10 min, 于 700 nm 处测定吸光度值 A_1 , 空白对照用蒸馏水代替样品测定吸光度值 A_0 。 $A_1 - A_0$ 越大说明 Fe^{3+} 总还原能力越强, 样品的总还原能力越强。

3) 氧自由基吸收能力 (Oxygen Free Radical Absorption Capacity, ORAC) 的测定

参照文献方法^[23], 并作适当修改。用 75 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液依次配制 200、100、50、12.5、6.25 μM 的 Trolox 标准溶液, 向全黑 96 孔板中加入 25 μL 上述各浓度溶液, 同时设置对照组和空白, 再加入 150 μL 的荧光素钠溶液, 于 37 °C 下温育 10 min, 最后向板中加入 153 mmol/L AAPH 溶液 50 μL, 在激发波长 485 nm, 发射波长 528 nm 测定荧光强度, 每分钟测定 1 次, 测定 120 min。以 Trolox 浓度为横坐标, 荧光衰退净面积 net AUC 为纵坐标, 绘制 ORAC (Oxygen Radical Absorption Capacity) 标准曲线。取稀释一定倍数的样品溶液进行上述试验方法计算 AUC, 计算方法如式 (2), 代入标准曲线, ORAC 值以 Trolox 当量表示。

$$\text{AUC} = 0.5 + \frac{0.5f_n}{f_0} + \frac{(f_1 + \dots + f_{n-1})}{f_n} \quad (2)$$

式中 AUC 为荧光衰退面积; f_1 为第 1 次荧光读数; f_n 为第 n 次荧光读数

1.3.5 数据统计分析

试验设置 3 次平行。使用 Excel 2016 和 GraphPad Prism 8.0 软件对试验数据进行统计与制图, 使用 SPSS 26.0 进行数据相关性分析。由于不同指标的量纲不统一, 在进行数据分析之前, 进行了数据标准化处理, 标准化

方法为每一变量值与其平均值之差除以该变量的标准差。使用 SPSS 26.0 对标准化后的品质指标进行因子分析,以各主成分对应的方差相对贡献率为权重,对主成分得分和相应的权重进行线性加权求和构建发酵枸杞汁品质的评价函数。

2 结果与讨论

2.1 不同菌株对枸杞果汁发酵后理化特性的影响

不同乳酸菌对枸杞果汁理化特性的影响如表 1 所示。发酵 48 h 后,6 种乳酸菌在枸杞汁中均能达到 10.0 lg CFU/mL

以上,表明枸杞果汁中营养充足,适合乳酸菌生长。在发酵过程中,乳酸菌利用果汁中的糖类作为碳源产酸,经发酵后,总糖含量降低了 27.1%~59.7%,还原糖含量降低了 14.2%~56.6%。植物乳杆菌和嗜热链球菌在枸杞果汁中具有更高的产酸能力,发酵后总酸质量分数达 6.74、6.07 g/kg。不同乳酸菌发酵的枸杞果汁可溶性蛋白含量具有差异,除干酪乳杆菌外,其他乳酸菌发酵枸杞果汁可溶性蛋白增加,这可能是由于枸杞果汁中的蛋白质被分解成多肽和一些有一定空间结构但分子质量较小的蛋白质,增加了其溶解性,从而提高了可溶性蛋白含量^[11]。

表 1 不同菌株对枸杞果汁理化特性的影响
Table 1 Effect of different strains on the physicochemical properties of wolfberry juices

种类 Type	活菌数 Viable cell counts/ (lg CFU·mL ⁻¹)	pH 值 pH value	总酸 Total acidity/(g·kg ⁻¹)	总糖 Total sugar/(mg·mL ⁻¹)	还原糖 Reducing sugar/(mg·mL ⁻¹)	可溶性蛋白 Soluble protein/(μg·mL ⁻¹)
未发酵 Non-fermentation	-	5.20±0.01 ^d	0.47±0.03 ^d	40.18±0.51 ^d	19.47±0.23 ^d	60.86±5.06 ^{de}
植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i>	11.03±0.20 ^a	3.37±0.03 ^a	6.74±0.80 ^a	20.79±0.72 ^b	12.23±0.57 ^b	109.87±4.81 ^a
嗜热链球菌 <i>Streptococcus thermophilus</i>	10.74±0.28 ^a	3.33±0.02 ^a	6.07±0.17 ^a	23.53±0.69 ^b	11.87±0.37 ^b	98.09±4.00 ^{ab}
嗜酸乳杆菌 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	10.37±0.10 ^b	3.64±0.03 ^c	3.16±0.31 ^c	29.28±2.69 ^c	16.36±1.33 ^c	83.13±9.12 ^c
鼠李糖乳杆菌 <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	10.96±0.18 ^a	3.55±0.03 ^b	4.98±0.33 ^b	16.68±2.97 ^a	8.45±0.85 ^a	73.23±5.58 ^{cd}
干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus casei</i>	10.82±0.13 ^a	3.55±0.02 ^b	3.58±0.53 ^c	16.20±0.33 ^a	13.84±0.27 ^b	58.69±8.32 ^c
发酵乳杆菌 <i>Lactobacillus fermentum</i>	10.22±0.22 ^b	3.53±0.02 ^b	5.03±0.38 ^b	21.97±2.05 ^b	16.70±2.00 ^c	85.98±10.94 ^{bc}

注: a、b、c 表示同列不同种类间的显著性差异 (P<0.05)。下同。
Note: Data with different superscript letters in the same column different types were significantly different (P<0.05). The same below.

2.2 不同菌株发酵对枸杞果汁活性成分的影响

枸杞果汁主要活性成分经不同乳酸菌发酵前后的变化如图 1 所示,植物乳杆菌、嗜热链球菌、鼠李糖乳杆菌和发酵乳杆菌发酵后总酚含量增加了 13.76%~28.07%,而嗜酸乳杆菌和干酪乳杆菌发酵后无显著性差异 (P>0.05)。经乳酸菌发酵后,枸杞果汁的总黄酮含量增加了 55.80%~161.97%。许多研究表明发酵可以增加果汁中总酚和总黄酮的含量^[24-25],但不同菌株发酵导致果汁中总酚和总黄酮含量的变化具有一定的差异,Kwaw 等^[26]使用植物乳杆菌、嗜酸乳杆菌和副干酪乳杆菌发酵桑葚汁后总酚和总黄酮含量都显著增加,且植物乳杆菌发酵桑葚果汁中总酚含量显著高于其他两种乳酸菌;赖婷等^[27]比较嗜酸乳杆菌、植物乳杆菌等 7 种不同乳酸菌对桂圆浆

品质的影响,植物乳杆菌提高桂圆肉游离态酚类物质含量和释放结合态酚类物质的能力要明显优于其他乳酸菌种。在本研究中,和其他乳酸菌相比,植物乳杆菌也使得产品中具有更高的总酚和总黄酮含量,这可能是因为它能够在发酵过程中会产生多种酶,使糖苷键和酯键等分解,释放出可溶或不溶的结合酚类化合物^[28]。

经发酵后,植物乳杆菌、嗜热链球菌、嗜酸乳杆菌和鼠李糖乳杆菌作为菌种的果汁中多糖含量显著降低 (P<0.05),在发酵过程中,他们利用枸杞多糖作为碳源或产生的酶将其降解,生成了小分子物质,致使多糖含量降低;而干酪乳杆菌和发酵乳杆菌为菌种的枸杞果汁经发酵后多糖含量显著增加 (P<0.05),这可能与乳酸菌在生长代谢过程中产胞外多糖有关^[29]。

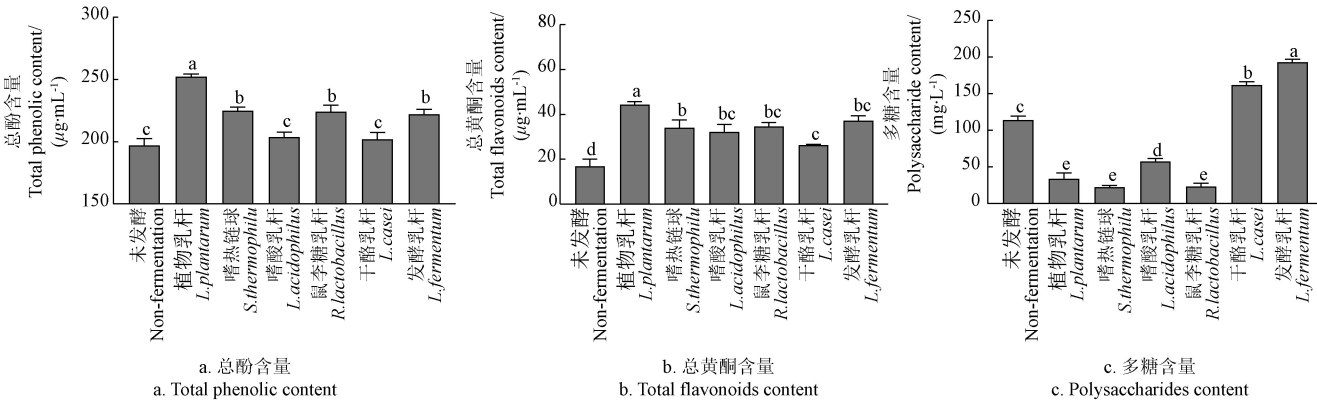


图 1 不同菌株发酵枸杞果汁前后总酚、总黄酮及多糖含量的变化
Fig.1 Changes of total phenolic, total flavonoids and polysaccharides contents fermented by different strains

2.3 不同菌株发酵对枸杞果汁抗氧化活性的影响

枸杞果汁经不同乳酸菌发酵前后的抗氧化活性的变化如图 2 所示，DPPH 自由基清除率和总还原力是一种基于电子转移实现清除自由基的方法，而 ORAC 方法的原理是通过抑制氢转移反应过程终止自由基链式反应，因此这两类方法可以从不同机制评价枸杞果汁发酵后的抗氧化能力^[30]。由图可知，除干酪乳杆菌外，枸杞果汁经发酵后的 DPPH 自由基清除能力和总还原能力显著增加（ $P<0.05$ ），ORAC 法显示植物乳杆菌、干酪乳杆菌及发酵乳杆菌发酵的枸杞果汁具有更高的抗氧化活性。果蔬汁抗氧化活性的主要贡献之一是其酚类化合物的含量，乳酸菌能够通过酚酸脱羧酶、糖基水解酶或酯酶等将酚类化合物转化为生物活性衍生物，从

而具有更高的抗氧化活性^[31]，如植物乳杆菌发酵樱桃汁后出现原儿茶酸向儿茶酚以及咖啡酸向二氢咖啡酸的生物转化^[32]。此外，乳酸菌自身具有的一定的抗氧化活性，可产生超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、硫醇类等活性抗氧化性物质^[33]，对发酵产品的抗氧化活性有一定的贡献。

抗氧化能力评价指标与发酵枸杞果汁主要活性成分（总黄酮、总酚、多糖）的相关系数如表 2 所示。在本研究中，DPPH 自由基清除活性与总酚和总黄酮含量极显著相关（ $P<0.01$ ）；总还原能力与总酚含量显著相关（ $P<0.05$ ），与总黄酮含量极显著正相关（ $P<0.01$ ），而多糖与总还原力及 ORAC 活性均无显著相关性，这可能与部分菌株发酵枸杞果汁后多糖含量显著降低有关。

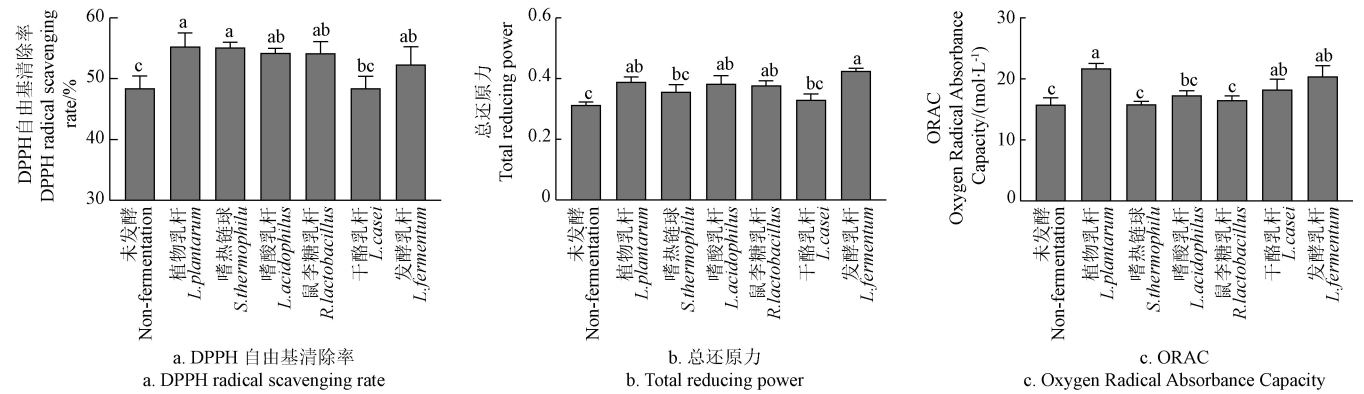


图 2 不同菌株发酵枸杞果汁 DPPH 自由基清除能力、总还原能力和氧自由基吸收能力 (ORAC) 的变化
Fig.2 Changes of DPPH radical scavenging rate, total reducing power and Oxygen free Radical Absorption Capacity of wolfberry juice fermented by different strains

表 2 发酵枸杞果汁的抗氧化能力和主要活性成分的相关系数
Table 2 Correlation coefficient between antioxidant capacity and main active ingredients of fermented wolfberry juice

活性成分 Active ingredient	抗氧化活性 Antioxidant activity		
	DPPH 自由基清除力 DPPH radical scavenging activity	总还原力 Total reducing power	ORAC
总酚 Total phenolic	0.594**	0.508*	0.416
总黄酮 Total flavonoids	0.615**	0.590**	0.373
多糖 Polysaccharides	-0.455*	0.02	0.2

注：**表示在 $P<0.01$ 水平上，极显著相关；*表示在 $P<0.05$ 水平上，显著相关。
Note: ** and * are extremely significant or significant at 0.01 and 0.05 level, respectively.

2.4 基于主成分分析筛选最适枸杞果汁发酵的菌株

本研究利用 SPSS 26.0 对未经发酵枸杞果汁和分别经 6 种不同乳酸菌发酵的枸杞果汁的活菌数、pH 值、总酸、可溶性蛋白、还原糖、总糖、总酚、总黄酮、多糖、DPPH、总还原力、ORAC 共 12 项指标进行了主成分分析，结果见表 3。由表 3 可知，前 3 个主成分的累积贡献率已达到 82.344%，符合主成分分析法贡献率累加和 $>80\%$ 的要求，因此对于其主成分而言，发酵枸杞果汁品质只需 3 个主成分便可以表现出 12 种指标。

因每个主成分都是原始变量的线性组合，组合中各

变量对主成分的影响可用载荷表示，载荷绝对值越大，其影响越大。由表 4 可知，活菌数、pH 值、总酸、总糖和还原糖是影响主成分 1 的主要特征向量，可溶性蛋白、总酚和总黄酮是影响主成分 2 的主要特征向量，当可溶性蛋白、总酚和总黄酮含量高时，第 2 主成分较大，多糖和 ORAC 是影响主成分 3 的主要特征向量，当多糖含量和 ORAC 活性较高时，第 3 主成分较大。第 1 主成分反映发酵枸杞果汁的理化特性，也在一定程度上反映了果汁的滋味特性，第 2 和第 3 主成分主要反映了发酵枸杞果汁的营养特性和抗氧化能力。

根据表 3 中的特征值和表 4 中各指标的主成分载荷，可以分别得到 3 个主成分的函数表达式 Y_1 、 Y_2 和 Y_3 ：

$$Y_1=0.272Z_1+0.12Z_2-0.212Z_3-0.165Z_4-0.288Z_5-0.34Z_6-0.051Z_7+0.001Z_8+0.002Z_9-0.109Z_{10}-0.101Z_{11}+0.008Z_{12} \tag{3}$$

$$Y_2=-0.092Z_1+0.082Z_2+0.022Z_3+0.33Z_4+0.153Z_5+0.184Z_6+0.231Z_7+0.191Z_8-0.067Z_9+0.233Z_{10}+0.245Z_{11}+0.106Z_{12} \tag{4}$$

$$Y_3=-0.012Z_1+0.037Z_2-0.056Z_3-0.034Z_4+0.23Z_5-0.117Z_6-0.01Z_7+0.045Z_8+0.475Z_9-0.244Z_{10}+0.229Z_{11}+0.448Z_{12} \tag{5}$$

式中 $Z_1\sim Z_{12}$ 分别表示活菌数、pH 值、总酸、可溶性蛋白、还原糖、总糖、总酚、总黄酮、多糖、DPPH 清除活性、总还原力、ORAC 值。将 3 个主成分以及各主成分

对应的方差贡献率作为权重，得到综合评价函数： $Y=0.35Y_1+0.34Y_2+0.14Y_3$ ，结果见表 5。从表 5 可知，综合得分值前二的是植物乳杆菌、发酵乳杆菌，这些菌种发酵的枸杞果汁综合品质性状更优良。

表 3 主成分的特征值及贡献率
Table 3 Characteristic value and contribution rate of each principal component

成分 Component	初始特征值 Eigen value			提取载荷平方和 Extraction sums of squared loadings			旋转载荷平方和 Rotation sums of squared loadings		
	总计 Total	方差贡献率 Variance contribution/%	累积方差贡献 Cumulative variance contribution/%	总计 Total	方差贡献率 Variance contribution/%	累积方差贡献 Cumulative variance contribution/%	总计 Total	方差贡献率 Variance contribution/%	累积方差贡献 Cumulative variance contribution/%
1	6.673	55.604	55.604	6.673	55.604	55.604	4.214	35.115	35.115
2	1.659	13.826	69.431	1.659	13.826	69.431	4.028	33.564	68.679
3	1.550	12.913	82.344	1.550	12.913	82.344	1.640	13.664	82.344
4	0.784	6.533	88.877						
5	0.423	3.523	92.399						
6	0.323	2.692	95.091						
7	0.233	1.939	97.030						
8	0.186	1.550	98.580						
9	0.072	0.602	99.182						
10	0.057	0.478	99.660						
11	0.039	0.323	99.983						
12	0.002	0.017	100.000						

表 4 不同菌株发酵枸杞果汁品质载荷矩阵
Table 4 Quality load matrix of wolfberry juice fermented by different strains

指标 Index	PC1(35%)	PC2(34%)	PC3(14%)
活菌数 Viable cell counts	0.913	0.324	-0.035
pH 值 pH value	-0.834	-0.439	-0.070
总酸 Total acidity	0.711	0.628	0.032
可溶性蛋白 Soluble protein	0.148	0.917	-0.096
还原糖 Reducing sugar	-0.847	-0.154	0.382
总糖 Total sugar	-0.949	-0.101	-0.185
总酚 Total phenolics	0.373	0.801	-0.051
总黄酮 Total flavonoids	0.486	0.766	0.040
多糖 Polysaccharides	-0.215	-0.349	0.791
DPPH 自由基清除力 DPPH radical scavenging activity	0.163	0.706	-0.429
总还原力 Total reducing power	0.170	0.689	0.343
ORAC	0.250	0.369	0.715

表 5 综合得分和排名
Table 5 Composites scores and rankings

菌株 Strains	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y	排名 Sorts
植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i>	0.30	1.50	0.16	0.64	1
嗜热链球菌 <i>Streptococcus thermophilus</i>	0.35	0.38	-1.10	0.10	4
嗜酸乳杆菌 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	-0.47	0.20	-0.28	-0.14	6
鼠李糖乳杆菌 <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1.03	-0.31	-0.95	0.12	3
干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus casei</i>	0.95	-1.49	0.75	-0.07	5
发酵乳杆菌 <i>Lactobacillus fermentum</i>	-0.19	0.61	1.70	0.38	2

3 结 论

枸杞果汁乳酸菌发酵饮品开发的关键点之一是菌株的筛选，不同乳酸菌菌株在果汁中的生长与发酵性能不同，对果汁的营养成分及活性的影响也不相同。研究结

果表明枸杞果汁经 6 种不同乳酸菌发酵后理化指标、营养成分及抗氧化活性均发生了显著的变化。其中，植物乳杆菌和嗜热链球菌产酸最多，达 6.74、6.07 g/kg，总糖和还原糖含量显著降低 ($P<0.05$)；使用植物乳杆菌、嗜热链球菌、鼠李糖乳杆菌和发酵乳杆菌发酵的枸杞果汁中总酚含量增加了 13.76%~28.07%，而嗜酸乳杆菌和干酪乳杆菌发酵后无显著性差异 ($P>0.05$)。6 种乳酸菌发酵后枸杞果汁中总黄酮含量增加了 55.80%~161.97%。此外，干酪乳杆菌和发酵乳杆菌发酵使枸杞果汁中多糖含量显著增加 ($P<0.05$)。乳酸菌发酵可显著提高枸杞果汁的 DPPH 自由基清除率、总还原力和 ORAC 活性，相关性分析结果表明抗氧化活性与总酚和总黄酮显著相关 ($P<0.05$)。

本研究采用主成分分析法对不同菌种发酵的枸杞发酵汁品质进行了综合评价，以活菌数、pH 值、总糖、还原糖、可溶性蛋白、总酚、多糖、ORAC 活性为评价主要指标，这些指标涵盖了发酵力、营养品质、功能性 3 个层面，综合反映了发酵枸杞果汁的品质，6 种乳酸菌菌种发酵对枸杞发酵汁的综合品质影响从高到低的排序为：植物乳杆菌、发酵乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、嗜热链球菌、干酪乳杆菌、嗜酸乳杆菌，其中植物乳杆菌和发酵乳杆菌可以作为枸杞发酵乳酸菌饮品开发的优选菌株。本研究为乳酸菌发酵枸杞果汁产品开发及建始县枸杞的加工利用提供了参考。

[参 考 文 献]

[1] Donno D, Beccaro G L, Mellano M G, et al. Goji berry fruit (*Lycium* spp.): Antioxidant compound fingerprint and bioactivity evaluation [J]. Journal of Functional Foods, 2015, 18: 1070-1085.

[2] 戴凯书. 湖北杂交枸杞及系列产品开发研究进展[J]. 湖北农学院学报, 1994, 14(3): 77-80.

Dai Kaishu. Research progress of Hubei hybrid structure and

- series products development[J]. Journal of Hubei Agricultural College, 1994, 14(3): 77-80. (in Chinese with English abstract)
- [3] 向宇, 鲁群, 谭军, 等. 响应面分析优化枸杞浑浊汁饮料稳定工艺研究[J]. 核农学报, 2017, 31(11): 2154-2163. Xiang Yu, Lu Qun, Tan Jun, et al. Optimization of the stabilization technology of Chinese wolfberry cloudy juice by response surface methodology[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2017, 31(11): 2154-2163. (in Chinese with English abstract)
- [4] Li Z, Teng J, Lyu Y, et al. Enhanced antioxidant activity for apple juice fermented with *Lactobacillus plantarum* ATCC14917[J]. Molecules, 2018, 24: 51-67.
- [5] Ricci A, Cirlini M, Maoloni A, et al. Use of dairy and plant-derived *Lactobacilli* as starters for cherry juice fermentation[J]. Nutrients, 2019, 11: 213.
- [6] Morais S G G, da Silva C B G, Dos Santos L M, et al. Effects of probiotics on the content and bioaccessibility of phenolic compounds in red pitaya pulp[J]. Food Res Int, 2019, 126: 108681.
- [7] Gao H, Wen J J, Hu J L, et al. Momordica charantia juice with *Lactobacillus plantarum* fermentation: Chemical composition, antioxidant properties and aroma profile[J]. Food Bioscience, 2019, 29: 62-72.
- [8] Hashemi S M B, Mousavi Khaneghah A, Barba F J, et al. Fermented sweet lemon juice (*Citrus limetta*) using *Lactobacillus plantarum* LS5: Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities[J]. Journal of Functional Foods, 2017, 38: 409-414.
- [9] 汪云阳, 单静博, 陈亚楠, 等. 枸杞发酵饮料的工艺优化及其风味物质分析[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(18): 40-47. Wang Yunyang, Shan Jingbo, Chen Yanan, et al. Optimization of fermentation technology and analysis of flavor substances of wolfberry[J]. Food Research and Development, 2020, 41(18): 40-47. (in Chinese with English abstract)
- [10] 乔博鑫, 邢紫娟, 郭红莲. 乳酸菌发酵枸杞过程中理化指标及风味物质的变化[J]. 食品工业科技, 2019, 40(9): 6-12. Qiao Boxin, Xing Zijuan, Guo Honglian. Changes of physicochemical indexes and flavor components in the fermentation process of *Lycium barbarum* by lactic acid bacteria [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(9): 6-12. (in Chinese with English abstract)
- [11] Liu Y X, Cheng H, Liu H Y, et al. Fermentation by multiple bacterial strains improves the production of bioactive compounds and antioxidant activity of goji juice[J]. Molecules, 2019, 24(19): 3519.
- [12] 公丽艳, 孟宪军, 刘乃侨, 等. 基于主成分与聚类分析的苹果加工品质评价[J]. 农业工程学报, 2014, 30(13): 276-285. Gong Liyan, Meng Xianjun, Liu Naiqiao, et al. Evaluation of apple quality based on principal component and hierarchical cluster analysis[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2014, 30(13): 276-285. (in Chinese with English abstract)
- [13] 吴澎, 贾朝爽, 范苏仪, 等. 樱桃品种果实品质因子主成分分析及模糊综合评价[J]. 农业工程学报, 2018, 34(17): 291-300. Wu Peng, Jia Chaoshuang, Fan Suyi, et al. Principal component analysis and fuzzy comprehensive evaluation of fruit quality in cultivars of cherry[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2018, 34(17): 291-300. (in Chinese with English abstract)
- [14] Michalak M, Kubik-Komar A, Waśko A, et al. Starter culture for curly kale juice fermentation selected using principal component analysis[J]. Food Bioscience, 2020, 35: 2212-4292.
- [15] 辛明, 李昌宝, 孙健, 等. 基于主成分和聚类分析的冬瓜酒品质评价[J]. 热带作物学报, 2019, 40(8): 1638-1644. Xin Ming, Li Changbao, Sun Jian, et al. Evaluation of wax gourd wine based on principal components and cluster analysis[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2019, 40(8): 1638-1644. (in Chinese with English abstract)
- [16] 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.
- [17] 国家质量监督检验检疫总局. 食品中总酸的测定: GB/T 12456-2008 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [18] 郑欣. 荔枝汁乳酸菌发酵饮料的工艺研究[D]. 南昌: 江西农业大学, 2014. Zheng Xin. Study on Fermentation Technology of Lactic Acid Bacteria in Litchi Juice[D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2014. (in Chinese with English abstract)
- [19] Khan S A, Liu L, Lai T, et al. Phenolic profile, free amino acids composition and antioxidant potential of dried longan fermented by lactic acid bacteria[J]. J Food Sci Technol, 2018, 55(12): 4782-4791.
- [20] 马晓娟, 谢有发, 余银芳, 等. 发酵枸杞原浆中多糖、活菌数的变化规律[J]. 食品安全导刊, 2019(28): 62-65. Ma Xiaojuan, Xie Youfa, Yu Yinfang, et al. Changes of polysaccharide and viable bacteria in fermented *Lycium barbarum* pulp[J]. China Food Safety Magazine, 2019(28): 62-65. (in Chinese with English abstract)
- [21] Mousavi Z E, Mousavi M. The effect of fermentation by *Lactobacillus plantarum* on the physicochemical and functional properties of liquorice root extract[J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 105: 164-168.
- [22] Wang Lu, Luo You, Wu Yana, et al. Fermentation and complex enzyme hydrolysis for improving the total soluble phenolic contents, flavonoid aglycones contents and bio-activities of guava leaves tea[J]. Food Chemistry, 2018, 264: 189-198.
- [23] Hernández-Ledesma B, Amigo A, Isidra R, et al. ACE-Inhibitory and radical-scavenging activity of peptides derived from β -lactoglobulin f(19-25)[J]. Interactions with Ascorbic Acid. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(9): 3392-3397.
- [24] Mantzourani I, Kazakos S, Terpou A, et al. Potential of the probiotic *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 strain to produce functional fermented pomegranate juice[J]. Foods, 2018, 8(1): 4.
- [25] Zhou Yan, Wang Ruimin, Zhang Yefang, et al. Biotransformation of phenolics and metabolites and the change in antioxidant activity in kiwifruit induced by *Lactobacillus plantarum* fermentation[J]. J Sci Food Agric, 2020, 100(8): 3283-3290.
- [26] Kwaw E, Ma Y, Tchabo W, et al. Effect of lactobacillus strains on phenolic profile, color attributes and antioxidant activities of lactic-acid-fermented mulberry juice[J]. Food Chem, 2018, 250: 148-154.
- [27] 赖婷, 刘磊, 张名位, 等. 不同乳酸菌发酵对桂圆肉中酚类物质及抗氧化活性的影响[J]. 中国农业科学, 2016, 49(10): 1979-1989. Lai Ting, Liu Lei, Zhang Mingwei, et al. Effect of lactic acid bacteria fermentation on phenolic profiles and antioxidant activity of dried longan flesh[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2016, 49(10): 1979-1989. (in Chinese with English abstract)
- [28] Landete J M, Curiel J A, Rodríguez H, et al. Aryl glycosidases from *Lactobacillus plantarum* increase antioxidant activity of phenolic compounds[J]. Journal of Functional Foods, 2014, 7(1): 322-329.
- [29] 龚小洁, 余元善, 徐玉娟, 等. 鲜龙眼果肉的干酪乳杆菌发酵特性的研究[J]. 食品科技, 2015, 40(6): 6-10. Gong Xiaojie, Yu Yuanshan, Xu Yujuan, et al. Fermentation

- characteristic of *Lactobacillus casei* in fresh longan pulp[J]. Food Science and Technology, 2015, 40(6): 6-10. (in Chinese with English abstract)
- [30] 王晓宇, 杜国荣, 李华. 抗氧化能力的体外测定方法研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(3): 247-252. Wang Xiaoyu, Du Guorong, Li Hua. Progress of analytical methods for antioxidant capacity in vitro [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2012, 31(3): 247-252. (in Chinese with English abstract)
- [31] 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.
- [32] Ricci A, Cirlini M, Maoloni A, et al. Use of dairy and plant-derived lactobacilli as starters for cherry juice fermentation[J]. Nutrients, 2019; 11(2): 213.
- [33] 赵彤, 钟宜科, 荀一萍, 等. 乳酸菌抗氧化性及其作用机制研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2018, 175(9): 202-209. Zhao Tong, Zhong Yike, Xun Yiping et al. Research progress on antioxidation and regulation mechanism of lactic acid bacteria[J]. China food additives, 2018, 175(9): 202-209. (in Chinese with English abstract)

Optimizing lactic acid bacteria starter culture for wolfberry juice fermentation using principal component analysis

Huang Ningxin¹, Ding Shiyong¹, Liu Rui^{1,2*}, Lu Qun¹, Zhu Heping³

(1. Key Laboratory of Environment Correlative Dietology, Ministry of Education, College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. Key Laboratory of Urban Agriculture in Central China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Wu Han 430070, China; 3. Hubei Gouqi Zhen Co., Ltd, Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture 445300, China)

Abstract: Wolfberry (*Lyciumbarbarum*) is a typical traditional Chinese medicinal and edible fruit, sharing a variety of ingredients and functional activities, such as anti-aging, immune regulation, and anti-atherosclerosis. One of the wolfberry cultivars, Hubei hybrid wolfberry was introduced from the doubled Ningxia wolfberry that crossed with the local wild one in Enshi Prefecture, Jianshi County of Hubei Province in China. A previous study found that this new type of wolfberry was not suitable to process into the conventional dried products, due mainly to higher moisture content, compared with the original Ningxia wolfberry. Therefore, it is highly urgent to develop a new processing approach for the wolfberry products, further improving the conversion rate of Hubei hybrid wolfberry. Alternatively, a characteristic fruit fermentation using lactic acid bacteria can provide a unique flavor product, while transform the types and increase the content of active substances for high nutritional value and health benefits. However, only a few reports were focused on the effects of lactic acid bacteria fermentation on the nutritional quality of wolfberry juice. Taking Hubei hybrid wolfberry as raw material, this study aims to investigate the physicochemical properties, main active components, and antioxidant activity *in vitro* of wolfberry juice before and after lactic acid bacteria fermentation. 6 kinds of lactic acid bacteria were selected (*Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, and *Lactobacillus fermentum*) for fermentation. A principal component analysis was utilized to evaluate the quality of fermented wolfberry juice, where the most suitable lactic acid bacteria strain was obtained for wolfberry juice fermentation. The results showed that 6 kinds of lactic acid bacteria grew well in wolfberry juice, where the viable count reached above 10.0 lg CFU/mL. The total contents of sugar and reducing sugar in the juice were significantly reduced ($P < 0.05$) after fermentation. A high capacity of acid production was achieved in the *Lactobacillus plantarum* and *Streptococcus thermophilus*, where the total acid contents were 6.74 and 6.07 g/kg, respectively. The total phenol content in wolfberry juice fermented by *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Lactobacillus fermentum* increased by 13.76% to 28.07%, compared with unfermented wolfberry juice. Nevertheless, there was no significant difference in the content of total phenols in the wolfberry juice fermented by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* ($P > 0.05$). The total flavonoid content increased by 55.80% to 161.97% after fermentation. The antioxidant activities of fermented wolfberry juice were also significantly improved ($P < 0.05$). Correlation analysis showed that the increase in antioxidant activity was closely related to the content of total phenols and total flavonoids. Three principal components were extracted in a principal component analysis, covering three levels of fermentability, nutritional quality, and functionality, indicating a higher quality of fermented wolfberry juice. The cumulative variance contribution rate was 82.344%. The comprehensive score ranking demonstrated that the quality of wolfberry juice fermented by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* was better, suitable for a starter for green processed beverages of Hubei hybrid wolfberry.

Keywords: bacteria; fermentation; principal component analysis; lactic acid bacteria; Hubei hybrid wolfberry