

DOI: 10.12161/j.issn.1005-6521.2024.10.018

自然发酵滇黄精酵素的工艺优化及功能活性分析

陆姝余, 马雅鸽, 程清云, 赵声兰, 杨婧娟*, 张希*

(云南中医药大学, 云南昆明 650500)

摘要: 为探究滇黄精自然发酵工艺优化及发酵前后活性成分变化, 以新鲜滇黄精为原料, 经预处理后将其置于自然条件下利用其内生菌进行发酵, 以酶活性和功能成分为评价指标设计单因素和正交试验, 根据隶属度综合评分法得出最佳发酵工艺条件, 并对发酵前后的样品进行有效成分活性评价。结果表明, 与新鲜未发酵滇黄精相比, 经过自然发酵的滇黄精酵素中有效成分多糖、皂苷、多酚含量增多, 发酵液超氧化物歧化酶(SOD)活性及脂肪酶活性分别增加了 181.59 U/g、0.77 U/mL, 且具有一定的抗氧化活性。滇黄精自然发酵最优工艺条件为发酵时间 18 d、初始糖浓度 15%(质量分数), 料水比 1:4.5(g/mL)。综上, 自然发酵法利于滇黄精活性物质的溶出, 同时可提升滇黄精酵素 SOD、脂肪酶活性和抗氧化活性。

关键词: 滇黄精; 酵素; 自然发酵; 工艺优化; 活性成分

Optimization of Natural Fermentation Process and Functional Activity Analysis of *Polygonatum kingianum* Jiaosu

LU Shuyu, MA Yage, CHENG Qingyun, ZHAO Shenglan, YANG Jingjuan*, ZHANG Xi*

(Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, Yunnan, China)

Abstract: In order to explore the optimization of natural fermentation process of *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl and the change of active ingredients before and after fermentation, fresh *P. kingianum* Coll. et Hemsl was pretreated, and then fermented under natural conditions by endophytic bacteria. Single factor and orthogonal tests were designed with enzyme activity and functional components as evaluation indexes. The optimal fermentation process conditions were obtained according to the comprehensive membership scoring method, and the active ingredient activity was evaluated on the samples before and after fermentation. The results showed that compared with fresh unfermented *P. kingianum*, the contents of active ingredients polysaccharide, saponin and polyphenols increased after natural fermentation. The activities of superoxide dismutase (SOD) and lipase in the fermentation broth increased by 181.59 U/g and 0.77 U/mL, respectively, and had certain antioxidant activity. The optimal conditions of natural fermentation of *P. kingianum* were as follows: fermentation time was 18 d, initial sugar concentration was 15% (mass fraction), and the material-to-liquid ratio was 1:4.5 (g/mL). In summary, that natural fermentation is conducive to the dissolution of active substances, and can enhance the SOD and lipase activities and antioxidant activity of *P. kingianum*.

Key words: *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl.; jiaosu; natural fermentation; process optimization; active ingredients

引文格式:

陆姝余, 马雅鸽, 程清云, 等. 自然发酵滇黄精酵素的工艺优化及功能活性分析[J]. 食品研究与开发, 2024, 45(10): 135-141.

LU Shuyu, MA Yage, CHENG Qingyun, et al. Optimization of Natural Fermentation Process and Functional Activity Analysis of *Polygonatum kingianum* Jiaosu[J]. Food Research and Development, 2024, 45(10): 135-141.

基金项目: 云南省高层次人才培养支持计划青年拔尖人才专项(YNWR-QNBJ-2020-213); 云南省科技厅科技计划项目(202102AE090031、202101AZ070001-052); 云南省教育厅科学研究基金项目(2022Y369)

作者简介: 陆姝余(1999—), 女(汉), 硕士研究生在读, 研究方向: 中药资源开发与利用。

*通信作者: 杨婧娟(1986—), 女, 讲师, 博士研究生在读, 研究方向: 天然产物研究与开发; 张希(1982—), 女, 教授, 博士, 研究方向: 功能食品研发。

滇黄精(*Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl.)为百合科黄精属多年生草本植物,以干燥块茎入药,始载于《神农本草经》,是常用的补益类中药,同时也是药食两用天然植物资源。《中国药典》(2020)^[1]记载其具有补气养阴、健脾、润肺、益肾的作用,用于脾胃气虚、体倦乏力、胃阴不足、口干食少、精血不足、腰膝酸软等。现代化学和药理研究证明,黄精的化学成分主要有糖类、皂苷、黄酮类、生物碱、木脂素等,研究人员对黄精的功效研究发现,黄精在延缓衰老、调节免疫力、调节血脂、改善记忆、抗肿瘤、抗菌等方面显示出潜在的药用价值^[2-9]。

目前,黄精越来越多地应用于各类兼具营养和功能性的食品中,如黄精酸奶、黄精酵素饮料等。现有关于黄精产品研发的报道中,多采用发酵法进行处理。其中大部分加入外源菌种进行发酵,微生物通过自身代谢活动不仅可以去除黄精的生麻口感、改善适口性,同时还可提升其功效。杨婧娟等^[10]对黄精发酵工艺进行探究发现,发酵能去除生黄精的生麻口感及刺激性;钟灿等^[11]对添加菌种的蒸制黄精进行发酵,发现产物的酶活随时间的延长而增加;李安等^[12]将保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌接种黄精进行发酵得到一款兼具营养和保健功能的发酵功能饮料。以上研究均以外源添加发酵菌种为主,Niu^[13]等和Hassani等^[14]发现鲜黄精根茎内富含大量内生菌,其内生菌在共进化的过程中,与宿主植物形成了良好的共生关系,可以作为天然酵素开发的优质原料,目前通过黄精内生菌天然自发酵黄精产品的工艺研究鲜见。

本试验对新鲜滇黄精块茎进行预处理后进行自然发酵,通过单因素和正交试验进行工艺优化,以酶活和功能成分作为评价指标,获得滇黄精天然发酵酵素的

最优发酵工艺,并对滇黄精酵素进行活性成分测定和对比,以期为其进一步研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

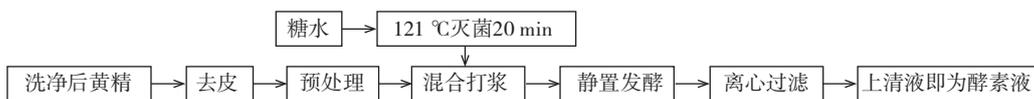
生滇黄精根茎(六年生):云南绿生药业有限公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯胍(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)(≥98%)、人参皂苷 Rb₁ 标准品(≥98%)、芦丁标准品(≥98%)、没食子酸对照品(≥98%)、3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)试剂、福林酚试剂:上海源叶生物科技有限公司;2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐[2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate), ABTS](≥98%):北京索莱宝科技有限公司;过硫酸钾(分析纯):上海易恩化学技术有限公司;水杨酸、三氯乙酸(均为分析纯):上海麦克林生化科技股份有限公司;铁氰化钾、三氯化铁(均为分析纯):天津市风船化学试剂科技有限公司;苯酚、香草醛、硫酸亚铁(均为分析纯):广东光华科技有限公司;浓硫酸(分析纯):汕滇药业有限公司;冰醋酸、甲醇、亚硝酸钠、硝酸铝、碳酸钠(分析纯):天津市致远化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

L5S 紫外可见分光光度计:尤尼克(上海)仪器有限公司;K-98-II A 电热恒温水浴锅:天津泰斯特仪器有限公司;SC-3614 低速离心机:安徽中科中佳科学仪器有限公司;DHG-9420A 电热恒温鼓风干燥箱:重庆实验设备厂;LRH-70 恒温培养箱:上海一恒科学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 工艺流程



预处理:去皮黄精块茎采用无菌水浸泡 10 min,后用 75% 乙醇浸泡 5 min,经无菌水润洗 3~5 次后用 3% 次氯酸钠溶液浸泡 5 min,最后用无菌水润洗 3~5 次。混合打浆后于 37 °C 恒温培养箱静置发酵。

1.3.2 单因素试验

单因素试验以超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性、脂肪酶活性、多糖含量、皂苷含量为指标,采用综合评分法进行数据分析。

1.3.2.1 发酵时间对滇黄精酵素的影响

固定料水比为 1:3.5 (g/mL)、初始糖浓度为 20%,考察不同发酵时间(9、12、15、18、21 d)对滇黄精酵素的影响。

1.3.2.2 初始糖浓度对滇黄精酵素的影响

固定料水比为 1:3.5 (g/mL)、发酵时间为 15 d,考

察不同初始糖浓度[0%、5%、10%、15%、20% (质量分数)]对滇黄精酵素的影响。

1.3.2.3 料水比对滇黄精酵素的影响

固定初始糖浓度为 20%、发酵时间为 15 d,考察不同料水比[1:1.5、1:2.5、1:3.5、1:4.5、1:5.5 (g/mL)]对滇黄精酵素的影响。

1.3.3 隶属度综合分析方法

运用隶属度综合评分法^[15]进行评分,对各指标进行权重系数确定。酵素综合品质应考虑酶活性,且黄精的主要活性物质为多糖,在使酶活力达到最佳水平的基础上,应尽可能保留发酵过程的活性物质,使其含量达到较高水平。采用隶属度综合评分法和赋予的权重进行加权求和得到各样本的综合评分。基于此目标对各指标进行权重系数确定,SOD 活性、脂肪酶活性、

多糖含量、皂苷含量权重系数分别为 25%、25%、30%、20%。其中隶属度按下式计算。

$$L = \frac{C_i - C_{\min}}{C_{\max} - C_{\min}}$$

式中： L 为指标隶属度； C_i 为指标值； C_{\min} 为指标最小值； C_{\max} 为指标最大值。

1.3.4 正交试验

根据单因素试验结果，以黄精醇素的发酵时间、初始糖浓度、料水比设计 $L_9(3^4)$ 正交试验，因素水平设置见表 1。沿用单因素试验指标，应用 SPSS 软件进行分析得出最优发酵工艺。

表 1 正交试验因素及水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	A 发酵时间/d	B 初始糖浓度/%	C 料水比/(g/mL)
1	12	5	1:2.5
2	15	10	1:3.5
3	18	15	1:4.5

1.3.5 理化指标测定

1.3.5.1 SOD 活性测定

采用邻苯三酚自氧化法，参照许雅娟等^[16]的方法，于波长 325 nm 处测定吸光度。自反应开始每 30 s 测定一次吸光度并计算平均增量，记作 ΔA_0 ，在上述反应体系中加入样品液，测定和计算方法同上，记作 ΔA_1 。样品抑制率 ($Y, \%$) 及酶活性 ($X, U/g$) 按下式进行计算。

$$Y = \frac{\Delta A_0 - \Delta A_1}{\Delta A_0} \times 100$$

$$X = \frac{(Y \div 50\%) \times V_1 \times n \times V_3}{V_2 \times m}$$

式中： V_1 为反应体系总体积，mL； V_2 为测试时样品的加入体积，mL； V_3 为样品液总体积，mL； n 为样品稀释倍数； m 为样品总质量，g；50% 为酶活力中自氧化速率。

1.3.5.2 脂肪酶活性测定

参照滕宏飞等^[17]的方法，采用滴定法测定，脂肪酶活性按下式进行计算。

$$X = (B - A) \times 50 \times (1/15) \times n$$

式中： X 为样品的酶活性，U/mL； B 为滴定样品时消耗氢氧化钠标准溶液的体积，mL； A 为滴定空白时消耗氢氧化钠标准溶液的体积，mL； n 为稀释倍数；50 为 0.05 mol/L 氢氧化钠溶液 1.00 mL 相当于脂肪酸 50 μmol ；1/15 为反应时间 15 min，以 1 min 计。

1.3.5.3 多糖含量测定

参照王欢等^[18]的方法，采用苯酚-硫酸法于 490 nm 处测定吸光度值。绘制标准曲线方程为 $y = 49.04x - 0.0332$ ， $R^2 = 0.9978$ 。多糖含量 ($D, \text{mg/g}$) 按下式计算。

$$D = n \times C \times V_1 \times V_3 / (m \times V_2)$$

式中： n 为稀释倍数； C 为葡萄糖的质量浓度，mg/mL； V_1 为反应液体积，mL； V_2 为上样量，mL； V_3 为样品液总体积，mL； m 为样品总质量，g。

1.3.5.4 皂苷含量测定

参照杜金凤等^[19]的方法，采用香草醛-高氯酸比色法于波长 545 nm 处测定吸光度。绘制标准曲线方程为 $y = 18.065x - 0.0023$ ， $R^2 = 0.99$ 。皂苷含量 ($Z, \text{mg/g}$) 按下式计算。

$$Z = n \times C \times V_1 \times V_3 / (m \times V_2)$$

式中： n 为稀释倍数； C 为人参皂苷 R_b_1 标准品的质量浓度，mg/mL； V_1 为反应液体积，mL； V_2 为上样量，mL； V_3 为样品液总体积，mL； m 为样品总质量，g。

1.3.5.5 总黄酮含量测定

参照张可青等^[20]的方法，采用分光光度法测定总黄酮含量，绘制标准曲线方程为 $y = 8.76x - 0.0178$ ， $R^2 = 0.9977$ 。总黄酮含量 ($H, \text{mg/g}$) 按下式计算。

$$H = n \times C \times V_1 \times V_3 / (m \times V_2)$$

式中： n 为稀释倍数； C 为芦丁的质量浓度，mg/mL； V_1 为反应液体积，mL； V_2 为上样量，mL； V_3 为样品液总体积，mL； m 为样品总质量，g。

1.3.5.6 总多酚含量测定

参照李娜等^[21]的方法，采用福林酚比色法测定总多酚含量，绘制标准曲线方程为 $y = 0.1281x - 0.0094$ ， $R^2 = 0.998$ 。总多酚含量 ($F, \text{mg/g}$) 按下式计算。

$$F = n \times C \times V_1 \times V_3 / (m \times V_2)$$

式中： n 为稀释倍数； C 为没食子酸的质量浓度，mg/mL； V_1 为反应液体积，mL； V_2 为上样量，mL； V_3 为样品液总体积，mL； m 为样品总质量，g。

1.3.5.7 还原糖含量测定

参照曾志恒等^[22]的方法，采用 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量，绘制标准曲线方程为 $y = 11.486x - 0.0149$ ， $R^2 = 0.999$ 。还原糖含量 ($T, \text{mg/g}$) 按下式计算。

$$T = n \times C \times V_1 \times V_3 / (m \times V_2)$$

式中： n 为稀释倍数； C 为葡萄糖的质量浓度，mg/mL； V_1 为反应液体积，mL； V_2 为上样量，mL； V_3 为样品液总体积，mL； m 为样品总质量，g。

1.3.6 抗氧化能力测定

1.3.6.1 DPPH 自由基清除能力

参照章焯雯等^[23]的方法并稍作修改，取样品上样量 20 μL ，DPPH 工作液 180 μL 。 A_0 为空白对照组吸光度， A_1 为样品体系吸光度， A_2 为以甲醇为工作液的反应体系下测得吸光度，DPPH 自由基清除率 ($P, \%$) 按下式进行计算。

$$P = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100$$

1.3.6.2 ABTS⁺自由基清除能力

参照章焯雯等^[23]的方法并稍作修改,取样品上样量 20 μL, ABTS 工作液 180 μL, ABTS⁺ 自由基清除率计算公式同 1.3.6.1。

1.3.6.3 羟自由基(·OH)清除能力

参照闫旭宇等^[24]法并稍作修改,取样品上样量为 1 mL, ·OH 清除率计算公式同 1.3.6.1。

1.3.6.4 总还原力测定

取 1 mL 样品液至离心管中,加入磷酸盐缓冲液 2.50 mL、铁氰化钾溶液 2.50 mL,混匀后置 50 °C 恒温水浴反应 20 min,反应完成后快速冷却,再加入三氯乙酸溶液 2.50 mL。混匀后离心(3 000 r/min, 10 min),取上清液 2.50 mL 于另一试管,加入蒸馏水 2.50 mL 和氯化铁溶液 0.50 mL,充分混匀后在室温下静置 10 min,波长 700 nm 下测定吸光度,记为 A₁。蒸馏水作空白对照,记为 A₀。总还原力(O)计算公式如下。

$$O = A_1 - A_0$$

1.4 数据处理

运用 SPSS 26.0 软件进行显著性分析, $p < 0.05$ 表示差异显著;采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行绘图分析;所有试验均进行 3 次重复。

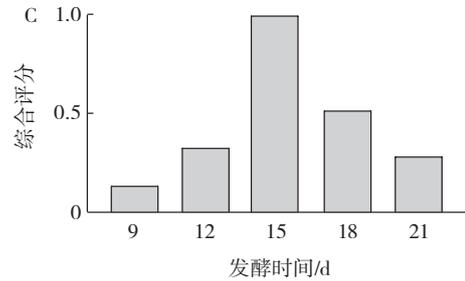
2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 发酵时间对滇黄精酵素的影响

发酵时间对滇黄精酵素的影响如图 1 所示。

由图 1 可知,在发酵时间为 9~15 d 时,随着发酵时间的增加, SOD 活性和脂肪酶活力在不断增加,当时



A. 多糖含量、SOD 活性; B. 皂苷含量、脂肪酶活性; C. 综合评分; 同一指标不同字母表示具有显著性差异, $p < 0.05$ 。

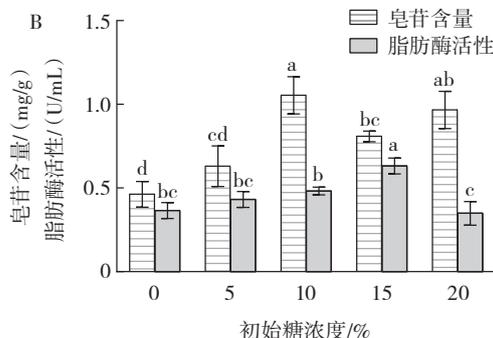
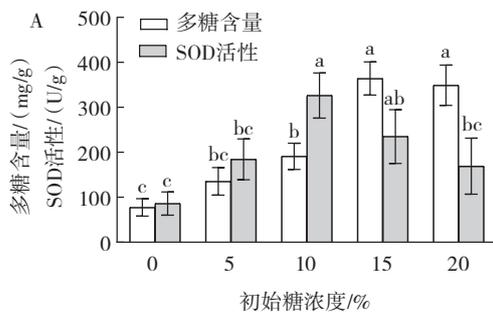
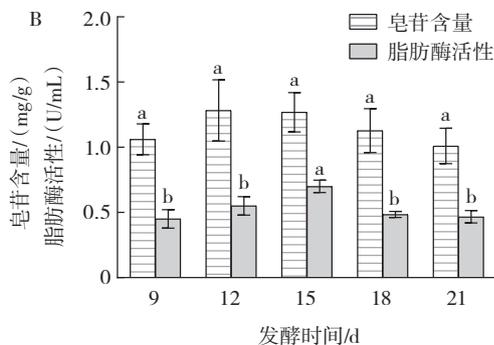
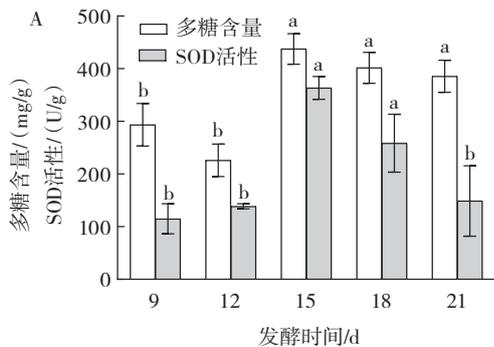
图 1 发酵时间对滇黄精酵素的影响

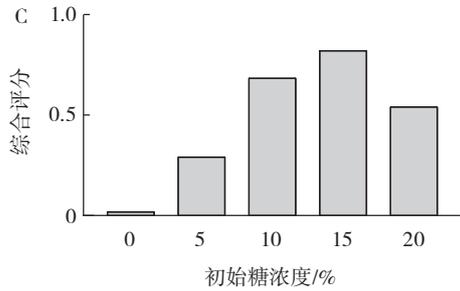
Fig.1 Effect of fermentation time on the *Polygonatum kingianum* jiaosu

间超过 15 d 时,各含量及酶活性均呈下降趋势。即随着发酵时间的延长,黄精酵素的酶活力及有效成分的含量均呈现较高水平,表明发酵时间长,自然发酵菌种可将黄精内的活性物质溶出^[25],且酶活较高。12 d 时,多糖含量有所下降,此时已进入发酵中后期,体系中的微生物不断生长^[26],糖源被消耗;而至 15 d 时微生物快速繁殖,对植物细胞的破壁作用加强,有效成分溶出增多,随着发酵进行,基质中的营养物质被消耗殆尽以至不足以满足菌体生长所需,微生物代谢渐缓,产酶量减少,导致酶活性降低。SOD 活性及脂肪酶活性在发酵至 15 d 时取得最大值,原因可能是黄精酵素的发酵体系适宜其生存,进而生长代谢旺盛,使得两种酶活力明显提高,因此选取发酵时间 12、15、18 d 进行后续试验。

2.1.2 初始糖浓度对滇黄精酵素的影响

初始糖浓度对滇黄精酵素的影响如图 2 所示。





A. 多糖含量、SOD 活性;B. 皂苷含量、脂肪酶活性;C. 综合评分;同一指标不同字母表示具有显著性差异, $p < 0.05$ 。

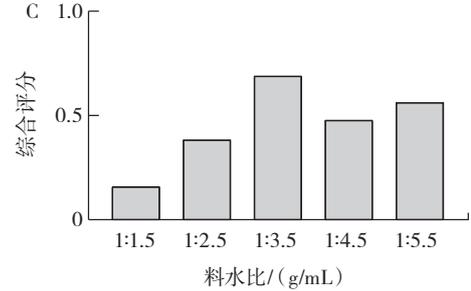
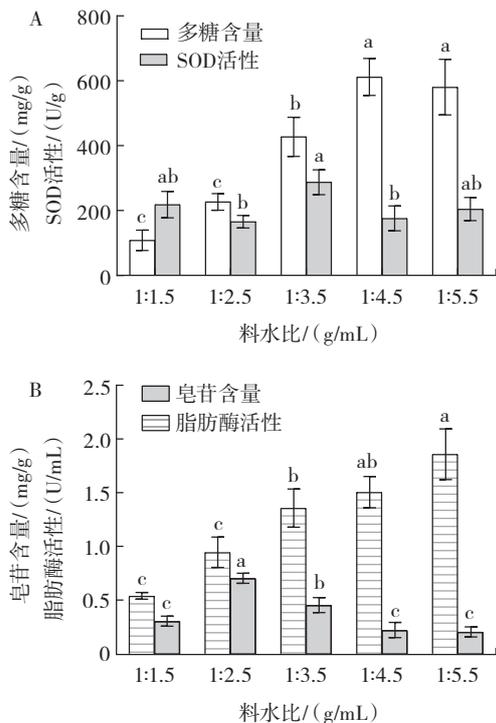
图2 初始糖浓度对滇黄精醇素的影响

Fig.2 Effect of initial sugar concentration on the *Polygonatum kingianum jiaosu*

由图2可知,多糖和皂苷含量在初始糖浓度0%~10%时显著提高,当浓度超过15%时,脂肪酶活性降低,可能是由于较高的渗透压影响酶活性。此外,在前期研究时发现发酵后期乳酸菌含量增多,使得pH值下降,刘虹蕾等^[27]发现低pH值不利于脂肪酶的催化反应,所以在发酵后期脂肪酶活性显著降低。黄精中内生菌在利用黄精作为底物的条件下发酵,以达到产生特异性酶进行生物转化,但前期试验表明,未加糖发酵试验进行困难,所以在保证乳酸菌正常繁殖的情况下,尽可能减少糖用量,以期使菌群密度上升从而能更多地利用黄精为底物代谢。为维持合适稳定的渗透压,防止菌体提早衰亡,在对活性无显著差异影响下,选取初始糖浓度5%、10%、15%进行后续试验。

2.1.3 料水比对滇黄精醇素的影响

料水比对滇黄精醇素的影响如图3所示。



A. 多糖含量、SOD 活性;B. 皂苷含量、脂肪酶活性;C. 综合评分;同一指标不同字母表示具有显著性差异, $p < 0.05$ 。

图3 料水比对滇黄精醇素的影响

Fig.3 Effect of material-water ratio on the *Polygonatum kingianum jiaosu*

由图3可知,料水比1:1.5~1:4.5(g/mL)时,多糖及皂苷含量明显上升,可能是由于基质中的糖含量充足,菌体数量增多,进而使得微生物快速繁殖,对植物细胞的破壁作用加强,从而使多糖及皂苷的含量增多。菌种密度高,乳酸菌的破壁作用促使多糖和皂苷等物质溶出,但对部分革兰氏阴性菌存在抑制作用,造成其分泌自身代谢产物的活性下降,导致酶活性降低。活性物质增加,酶活性降低,进一步说明醇素中物质含量的变化与微生物发酵过程中产生的水解酶系有关^[28]。除料水比1:3.5(g/mL)外,SOD活性各组间无显著差异,在一定范围内有正常波动。随溶剂添加量增加,脂肪酶活性先增高后下降,可能是溶剂添加量过高,稀释滇黄精醇素有效成分,影响酶活性。综上,选择料水比1:2.5、1:3.5、1:4.5进行后续试验。

2.2 正交试验

2.2.1 正交试验结果

在单因素试验的基础上,对发酵时间(A)、初始糖浓度(B)、料水比(C)3个因素进行 $L_9(3^4)$ 正交试验。以SOD活性、脂肪酶活性、多糖含量及皂苷含量作为评价指标,利用隶属度综合评分法进行评分,通过分析得最优发酵工艺条件,结果见表2~表3。

表2 正交试验结果

Table 2 Orthogonal test results

序号	A 发酵时间	B 初始糖浓度	C 料水比	空列 D	SOD 活性/(U/g)	脂肪酶活性/(U/mL)	多糖含量/(mg/g)	皂苷含量/(mg/g)	综合评分
1	1	1	1	1	86.20	0.42	141.00	0.61	0.058 4
2	1	2	2	2	81.20	0.38	208.25	0.78	0.123 0
3	1	3	3	3	131.90	0.35	227.70	1.09	0.243 2
4	2	1	2	3	101.50	0.38	341.60	0.66	0.238 3
5	2	2	3	1	316.20	0.47	389.70	1.24	0.712 0
6	2	3	1	2	209.70	0.37	218.25	0.98	0.307 2
7	3	1	3	2	202.90	0.42	470.70	1.48	0.682 5
8	3	2	1	3	177.50	0.50	332.00	0.83	0.440 4
9	3	3	2	1	262.10	0.68	449.05	1.07	0.828 5

续表2 正交试验结果

Continue table 2 Orthogonal test results

序号	A 发酵时间	B 初始糖浓度	C 料水比	空列 D	SOD 活性/(U/g)	脂肪酶活性/(U/mL)	多糖含量/(mg/g)	皂苷含量/(mg/g)	综合评分
k ₁	0.142	0.326	0.269	0.533					
k ₂	0.419	0.425	0.397	0.371					
k ₃	0.650	0.460	0.546	0.307					
R	0.508	0.134	0.277	0.226					

由表2可知,根据综合评分,各因素对滇黄精酵素影响程度的大小为发酵时间>料水比>初始糖浓度。正交试验结果表明,最佳发酵工艺条件为A₃B₃C₃,即发酵时间18 d、初始糖浓度15%、料水比1:4.5(g/mL)。

表3 正交试验方差分析

Table 3 Orthogonal test analysis of variance

项目	平方和	自由度	均方	F	显著性
A	0.390	2	0.195	0.188 9	不显著
B	0.029	2	0.014	0.013 6	不显著
C	0.116	2	0.058	0.056 2	不显著
误差	0.0812	2			
总和	0.615	8			

由表3方差分析结果得到, $F_A > F_C > F_B$,发酵时间对滇黄精酵素生产工艺影响效果最大,其次是料水比,初始糖浓度对其影响最小,与正交试验结果分析一致。

2.2.2 验证试验

对最优条件进行3次平行试验,对其各项指标进行综合评价,验证配方的合理性,结果见表4。

表4 验证试验结果

Table 4 Results of validation test

工艺	SOD 活性/(U/g)	脂肪酶活性/(U/mL)	多糖含量/(mg/g)	皂苷含量/(mg/g)	综合评分
A ₃ B ₃ C ₃	181.59±7.92	0.77±0.41	543.60±43.73	3.26±1.81	0.856 8

在A₃B₃C₃工艺下进行验证试验,脂肪酶活性、多糖及皂苷含量均高于正交试验中各组,综合评分高于正交试验中最高组,说明此工艺合理可行。

2.3 理化指标结果

最优发酵工艺条件和未发酵生滇黄精理化指标结果见表5。

由表5可知,经过发酵后的酵素液总多酚、还原糖、皂苷、多糖含量增加,SOD活性及脂肪酶活性增强。可能是因为在高渗透压的溶液环境下,酚类物质可能析出,同时,滇黄精酵素中众多微生物的复杂代谢较迅速,消耗了原料中的其他成分从而生成酚类物质。高维锡等^[29]发现,微生物代谢产生的蛋白酶、纤维素酶和果胶酶可从不可溶性基质中释放结合酚类化合物,并将其水解为游离形式,增加发酵产物中多酚含量。而总黄酮含量的下降可能是由于黄酮物质中的某些成分发

表5 理化指标测定结果

Table 5 Determination results of physicochemical indicators

测定指标	未发酵生滇黄精	最优工艺发酵生滇黄精
SOD 活性/(U/g)	-	181.59±7.92
脂肪酶活性/(U/mL)	-	0.77±0.41
总黄酮含量/(mg/g)	2.180±0.026	0.650±0.004
总多酚含量/(mg/g)	143.21±9.63	228.98±7.04
还原糖含量/(mg/g)	7.88±3.12	423.47±50.76
多糖含量/(mg/g)	466.56±10.22	543.60±43.73
皂苷含量/(mg/g)	1.89±0.85	3.26±1.81
DPPH·清除率/%	12.98±2.00	33.79±2.17
ABTS ⁺ ·清除率/%	33.52±0.95	41.27±0.03
·OH清除率/%	84.49±0.91	91.06±0.79

注:-表明该样品未测出指标值。

生了生物转化或降解引起。多糖、皂苷等已被药理研究广泛证实为具备抗氧化能力的活性物质,在发酵后的滇黄精酵素中含量明显上升。DPPH·、ABTS⁺·、·OH的清除率均有所上升,表明滇黄精在自然发酵过程中自身进行了生物转化,具有较好的抗氧化作用。

3 结论

以新鲜滇黄精为原料,通过自然发酵,运用单因素和正交试验优化其工艺,对最佳工艺发酵的酵素多糖、皂苷含量以及SOD、脂肪酶活性进行测定。根据综合评分得出滇黄精自然发酵最优工艺条件为发酵时间18 d、初始糖浓度15%、料水比1:4.5(g/mL)。该工艺得到的滇黄精酵素SOD、脂肪酶活性分别为181.59 U/g、0.77 U/mL,多糖、皂苷含量为543.60、3.26 mg/g,具有一定DPPH·、ABTS⁺·、·OH清除能力;自然发酵滇黄精酵素的还原糖及总多酚含量高于未发酵的滇黄精。综上,发酵不仅能提高体系中的酶活力,还对其中的生物转化及活性物质的生成具有一定的促进作用。在今后的研究中可着重关注发酵体系中微生物群落的变化,以期实现对微生物菌群的调控,为黄精酵素的开发提供一定的理论依据。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典-二部: 2020年版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 319-320.
Chinese Pharmacopoeia Commission. People's republic of China (PRC) pharmacopoeia - part II: 2020 edition[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 319-320.
- [2] 柳威, 林懋怡, 刘晋杰, 等. 滇黄精研究进展及黄精研究现状[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(14): 226-234.
LIU Wei, LIN Maoyi, LIU Jinjie, et al. Progress in study of *Polygonatum kingianum* and research status of polygonati rhizoma[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2017, 23(14): 226-234.
- [3] YELITHAO K, SURAYOT U, PARK W, et al. Effect of sulfation and partial hydrolysis of polysaccharides from *Polygonatum sibiricum* on immune-enhancement[J]. International Journal Of Biological Macromolecules, 2019, 122: 10-18.

- [4] LI C Y, LI J X, SHANG Y X, et al. Hypoglycemic and hypolipidemic activity of *Polygonatum sibiricum* fermented with *Lactobacillus brevis* YM 1301 in diabetic C57BL/6 mice[J]. Journal of Medicinal Food, 2021, 24(7): 720-731.
- [5] LIU B, TANG Y, SONG Z Y, et al. *Polygonatum sibiricum* F. Delarochae polysaccharide ameliorates HFD-induced mouse obesity via regulation of lipid metabolism and inflammatory response[J]. Molecular Medicine Reports, 2021, 24(1): 501.
- [6] ZHENG S Y. Protective effect of *Polygonatum sibiricum* Polysaccharide on D-galactose-induced aging rats model[J]. Scientific Reports, 2020, 10: 2246.
- [7] LONG T T, LIU Z J, SHANG J C, et al. *Polygonatum sibiricum* polysaccharides play anti-cancer effect through TLR4-MAPK/NF- κ B signaling pathways[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 111: 813-821.
- [8] 刘爽, 胡舒婷, 贾巧君, 等. 黄精的化学组成及药理作用的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(10): 1783-1796.
LIU Shuang, HU Shuting, JIA Qiaojun, et al. Advances in chemical constituents and pharmacological effects of *Polygonati rhizoma*[J]. Natural Product Research and Development, 2021, 33(10): 1783-1796.
- [9] LUO J Y, CHAI Y Y, ZHAO M, et al. Hypoglycemic effects and modulation of gut microbiota of diabetic mice by saponin from *Polygonatum sibiricum*[J]. Food & Function, 2020, 11(5): 4327-4338.
- [10] 杨婧娟, 张希, 谭书宇, 等. 黄精发酵工艺的初步研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(17): 81-88.
YANG Jingjuan, ZHANG Xi, TAN Shuyu, et al. A preliminary research of fermentation conditions of rhizoma polygonati[J]. Food Research and Development, 2016, 37(17): 81-88.
- [11] 钟灿, 劳嘉, 金剑, 等. 微生物对黄精醇素中酶活性动态变化影响的研究[J]. 食品与发酵科技, 2020, 56(4): 6-10.
ZHONG Can, LAO Jia, JIN Jian, et al. Effects of microorganisms on dynamic changes of enzyme activity in ferments of *Polygonatum* [J]. Food and Fermentation Sciences & Technology, 2020, 56(4): 6-10.
- [12] 李安, 袁小卓, 孙亚茹, 等. 响应面法优选黄精发酵功能饮料的工艺和配方[J]. 中国酿造, 2017, 36(6): 187-192.
LI An, YUAN Xiaozhuo, SUN Yaru, et al. Optimization of technology and formula of fermented *Polygonatum kingianum* functional beverage by response surface method[J]. China Brewing, 2017, 36(6): 187-192.
- [13] NIU B, PAULSON J N, ZHENG X Q, et al. Simplified and representative bacterial community of maize roots[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(12): E2450-E2459.
- [14] HASSANI M A, DURÁN P, HACQUARD S. Microbial interactions within the plant holobiont[J]. Microbiome, 2018, 6(1): 58.
- [15] 张黎骅, 张文, 吕珍珍, 等. 响应面法优化酒糟微波间歇干燥工艺[J]. 农业工程学报, 2011, 27(3): 369-374.
ZHANG Lihua, ZHANG Wen, LÜ Zhenzhen, et al. Optimization of intermittent microwave drying technology for lees by response surface methodology[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2011, 27(3): 369-374.
- [16] 许雅娟, 胡虹. 果蔬组织中超氧化物歧化酶活性的测定[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2006, 32(4): 742-744.
XU Yajuan, HU Hong. The activity measurement of superoxide dismutase in the tissue of vegetables and fruits[J]. Journal of Southwest Minzu University(Natural Science Edition), 2006, 32(4): 742-744.
- [17] 滕宏飞, 王丹静, 徐青, 等. 橄榄油乳化法测定脂肪酶活性的优化研究[J]. 食品工业, 2011, 32(6): 80-83.
TENG Hongfei, WANG Danjing, XU Qing, et al. Optimization study of olive oil emulsification method determining lipase activity[J]. The Food Industry, 2011, 32(6): 80-83.
- [18] 王欢, 刘明珠, 芦永昌. 青海高山辣根菜中水溶性总多糖的提取工艺研究[J]. 青海农林科技, 2021(4): 13-17.
WANG Huan, LIU Mingzhu, LU Yongchang. Study on extraction technology of water soluble total polysaccharide from *Pegaeophyton scapiflorum* in Qinghai[J]. Science and Technology of Qinghai Agriculture and Forestry, 2021(4): 13-17.
- [19] 杜金凤, 宋鉴达, 朱传翔, 等. 比色法测定人参保健饮料中人参总皂苷含量[J]. 现代食品, 2017(11): 79-80.
DU Jinfeng, SONG Jianda, ZHU Chuanxiang, et al. Determination of ginsenosides in ginseng health drink by colorimetry[J]. Modern Food, 2017(11): 79-80.
- [20] 张可青, 成瑞, 王建华, 等. 蒙药麻花头中总黄酮的超声提取及含量测定[J]. 实用药物与临床, 2021, 24(12): 1103-1106.
ZHANG Keqing, CHENG Rui, WANG Jianhua, et al. Ultrasound extraction and content determination of total flavonoids in Mongolian *Serratula*[J]. Practical Pharmacy and Clinical Remedies, 2021, 24(12): 1103-1106.
- [21] 李娜, 胡月月, 葛亮. 不同产地沙棘中总黄酮、总多酚含量测定及其抗氧化活性研究[J]. 化学与生物工程, 2021, 38(8): 64-68.
LI Na, HU Yueyue, GE Liang, et al. Determination of contents of total flavonoids and total polyphenols in *Hippophae rhamnoides* L. from different origins and their antioxidant activity[J]. Chemistry & Bioengineering, 2021, 38(8): 64-68.
- [22] 曾志恒, 曾辉, 程翊, 等. 双孢蘑菇发酵液还原糖和总糖的含量测定[J]. 中国食用菌, 2018, 37(6): 40-43, 49.
ZENG Zhiheng, ZENG Hui, CHENG Yi, et al. Determination of reducing sugar and total sugar content in fermentation liquid of *Agaricus bisporus*[J]. Edible Fungi of China, 2018, 37(6): 40-43, 49.
- [23] 章焯雯, 臧青民, 陈荣, 等. 金橘叶中总黄酮的提取工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(1): 46-54.
ZHANG Yewen, ZANG Qingmin, CHEN Rong, et al. Optimization of processing technology of total flavonoids from *Fortunella margarita*(Lour.) swingle leaves and its antioxidant activity[J]. China Food Additives, 2022, 33(1): 46-54.
- [24] 闫旭宇, 李娟, 任潘, 等. 银杏叶多酚超声辅助提取工艺及其对羟自由基的清除作用[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(19): 99-104.
YAN Xuyu, LI Juan, REN Pan, et al. Optimization of polyphenols from *Ginkgo biloba* Leaves by ultrasound-assisted extraction and its scavenging capacity on hydroxyl free radicals[J]. Food Research and Development, 2020, 41(19): 99-104.
- [25] ZHAO Y S, EWEYS A S, ZHANG J Y, et al. Fermentation affects the antioxidant activity of plant-based food material through the release and production of bioactive components[J]. Antioxidants, 2021, 10(12): 2004.
- [26] 章昱, 谭强, 曾春晖, 等. 铁皮石斛叶酵素发酵过程中活性物质及抗氧化性变化研究[J]. 中国酿造, 2022, 41(5): 188-193.
ZHANG Yu, TAN Qiang, ZENG Chunhui, et al. Changes of active substances and antioxidant activity of *Dendrobium officinale* Jiaosu during fermentation process[J]. China Brewing, 2022, 41(5): 188-193.
- [27] 刘虹蕾, 缪铭, 江波, 等. 微生物脂肪酶的研究与应用[J]. 食品工业科技, 2012, 33(12): 376-381.
LIU Honglei, MIAO Ming, JIANG Bo, et al. Research and applications of microbial lipases[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(12): 376-381.
- [28] 丁玉峰, 马艳莉, 李素萍, 等. 接种发酵对葡萄醇素多酚生物利用度及抗氧化活性的影响[J]. 食品科学, 2022, 43(2): 108-116.
DING Yufeng, MA Yanli, LI Suping, et al. Effect of inoculated fermentation on the bioaccessibility and antioxidant activity of polyphenols from grape jiaosu[J]. Food Science, 2022, 43(2): 108-116.
- [29] 高维锡, 李钢, 李娜. 植物乳杆菌与酿酒酵母共发酵对薏仁米发酵液品质及抗氧化活性的增效性[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(4): 193-199.
GAO Weixi, LI Gang, LI Na. Enhancement on the quality and antioxidant activity of coix seed by *Lactobacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae* co-fermentation[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(4): 193-199.