

竹叶酵素发酵过程中代谢产物及抗氧化活性的变化

薛淑龙¹, 范昊安¹, 陈小伟¹, 程勇杰¹, 沙如意¹, 毛建卫^{1,2}

(1. 浙江科技学院生物与化学工程学院, 浙江省农产品化学与生物加工技术重点实验室, 浙江省农业生物资源生化制造协同创新中心, 浙江杭州 310023) (2. 浙江工业职业技术学院鉴湖学院, 浙江绍兴 312000)

摘要: 对竹叶酵素发酵过程中不同发酵时间的乙醇、总酸、乳酸、醋酸、总酚的含量和 pH 值进行了跟踪检测, 考察各代谢产物与各抗氧化指标(DPPH 自由基清除能力、ABTS 自由基清除能力和还原力)相关性, 并利用主成分分析建立竹叶酵素发酵过程中综合指标变化评价方法。结果表明, 竹叶酵素发酵过程中, 乙醇含量从第 10 d 后的 0.55% 增加至 180 d 的 2.73%, 达到最高; 总酸含量经发酵 100 d 上升至 4.78 mg/mL 后逐渐下降, 发酵过程中 pH 值从 4.37 降至 3.54 后趋于稳定; 乳酸和醋酸含量在前 60 d 快速上升, 之后开始趋于平缓; 总酚含量持续上升积累至 0.63 mg/mL, 与对 DPPH、ABTS 自由基的清除率和还原力均分别呈极显著的正相关($p < 0.01$)。结论: 竹叶酵素抗氧化性较好, 尤其对 ABTS 自由基的清除能力较强, 总酚含量可作为评价竹叶酵素抗氧化性的指标。综合评价指标(CEI)在第 230 d 时最高, 可作为判定前发酵参考终点和补料发酵时间点的依据。

关键词: 竹叶; 酵素; 抗氧化性; 主成分分析

文章编号: 1673-9078(2019)05-228-235

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.5.032

Study on the Changes of Material Metabolism and Antioxidant Activity of Bamboo Leaf Jiaosu during the Fermentation Process

XUE Shu-long¹, FAN Hao-an¹, CHEN Xiao-wei¹, CHENG Yong-jie¹, SHA Ru-yi¹, MAO Jian-wei^{1,2}

(1. Zhejiang University of Science & Technology, Hangzhou, Zhejiang Provincial Key Lab for Chem & Bio Processing Technology of Farm Product, Zhejiang Provincial Collaborative Innovation Center of Agricultural Biological Resources Biochemical Manufacturing, Hangzhou 310023, China)

(2. College of Jianhu, Zhejiang Industry Polytechnic College, Shaoxing 312000, China)

Abstract: In this study, the ethanol, total acid, lactic acid, acetic acid, total phenolic pH value and antioxidant index (DPPH free radical scavenging ability, ABTS free radical scavenging ability and reducing power) were investigated. Principal component analysis was used to establish an evaluation method of the changes of comprehensive indexes for Bamboo Leaf Jiaosu during the fermentation process. The results showed that during the fermentation of bamboo leaf Jiaosu, the ethanol content increased from 0.55% at day 10 to 2.73% at day 180, reaching the highest level; after 100 days of fermentation, the total acid content increased to 4.78 mg/mL and gradually decreased. During the fermentation, the pH value decreased from 4.37 to 3.54 and then stabilized. Lactic acid and acetic acid content increased rapidly in the first 60 days, and then began to level off; The total phenolic content continued to rise and accumulated to 0.63 mg/mL, which showed the significant correlation between total phenolic content and DPPH radical scavenging rate, ABTS radical scavenging rate and reducing force, respectively ($p < 0.01$). Conclusion: Bamboo leaf Jiaosu has good antioxidant activity, especially for ABTS radical scavenging ability. The total phenolic content can be used as an index to evaluate the antioxidant activity of bamboo leaf Jiaosu. The comprehensive evaluation index (CEI) reached the highest value on the 230 th day and can be used as the basis for determining the pre-fermentation end point and the reference of the fed-batch fermentation time point.

Key words: bamboo leaf; Jiaosu; antioxidant activity; principal component analysis

收稿日期: 2019-01-03

基金项目: 浙江省重点研发计划项目(2017C02009); 浙江省农业生物资源生化制造协同创新中心开放基金项目(2016KF0040; 2016KF0114)

作者简介: 薛淑龙(1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 生物质资源利用技术与工程

通讯作者: 沙如意(1982-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 农业生物资源生化制造研究; 共同通讯作者: 毛建卫(1964-), 男, 教授, 研究方向: 农业生物资源生化制造研究

酵素源于中国,植物酵素是以一种或多种新鲜蔬菜、水果和谷豆类、海藻类、食药两用本草类等食材为原料,加(或不加)糖类物质,经各种发酵菌通过较长时间发酵后,形成的包含有原料溶出物、微生物本身以及各种生物活性代谢成分的微生物发酵制品^[1,2]。酵素具有一定的抑菌性^[3]、抗氧化性^[4]、降血糖、降血脂^[5]、改善肠道环境^[6]等功能。近十年来随着人们对健康的关注,原料宽泛、口味丰富、形式多样、效果显著的酵素产品迅速风靡于美国、日本、韩国、中国台湾等国家和地区。

竹子为多年生禾本科竹亚科植物,高拔挺直,四季常青,广泛分布于东南亚,中国南部、南美、印度、日本等国家和地区,我国更有着“竹子王国”的美誉。竹叶,中药名,指禾本科植物淡竹等的叶子,在中国古代时便已非常成熟的应用于中医治疗。据《药品化义》、《本草求真》和《本草逢源》等古代医学著作记载,竹叶清香透心,微苦凉热,既可凉心缓脾、清爽止渴、疗疮杀虫,也可为治咳逆喘促、呕秽吐血和中风惊痫等症^[7]。竹叶来源广泛、使用价值较高,随着人们对竹叶的研究逐渐深入,近年来有学者在竹叶提取物中发现了竹叶黄酮^[8]、多酚^[9]、多糖^[10]、特种氨基酸^[11]等对人体有益的活性物质。多酚为植物体内的复杂酚类次生代谢物,在植物中的含量仅次于纤维素、半纤维素和木质素^[12],竹叶多酚具有良好的抗氧化性^[13]和抑菌性^[14]广泛的应用于食品生产及保存。但目前国内尚未有以竹叶为原料制备竹叶酵素的研究报道。

本文以竹叶为原料制备竹叶酵素,并跟踪检测竹叶酵素发酵过程中乙醇、总酸、有机酸、总酚含量的变化,pH值的变化,通过DPPH自由基清除能力、ABTS自由基清除能力和还原力的跟踪检测竹叶酵素发酵过程中抗氧化性的变化,以科学合理的分析竹叶酵素的抗氧化活性,为竹叶酵素产品的开发提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材料、试剂与仪器

淡竹竹叶,采自浙江省杭州市西湖区,采样时间为2017年7月。

发酵用糖液,由浙江省农产品化学与生物加工技术重点实验室提供。

α,α -二苯基- β -苦苯肼(DPPH)日本东京化成工业;三羟甲基氨基甲烷[(HOCH₂)₃CNH₂O],上海凌峰化学试剂有限公司;2,2-联氨基-双-二胺盐(ABTS),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;福林酚(10%),上海长哲

生物科技有限公司。

PHS-3C型精密酸度计,杭州齐威仪器有限公司;PTX-FA210型电子天平,福州华志科学仪器有限公司;KQ-300E型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;UV-5500PC型紫外分光光度计,上海元析仪器有限公司;XMTD-204数显式电热恒温水浴锅,常州诺基仪器有限公司;Waters e2695高效液相色谱(配备Waters 2998二极管阵列紫外检测器),Waters公司;GC-2010岛津新色谱气相系统,岛津公司;HSS86.50型顶空进样器,DANI公司;50L 316 L型不锈钢发酵罐,浙江省农产品化学与生物加工技术重点实验室研制。

1.2 试验方法

1.2.1 竹叶酵素的制备

本实验选取无黑斑、枯斑、缺口、虫卵的竹叶,用无菌水轻轻冲洗除去竹叶表面的尘土,常温悬挂晾干表面水分。切碎后按样品:无菌水:发酵用糖浆(W/W/W)=2:3:15加入到已灭菌的发酵罐中,封口,置于干燥阴凉处发酵。定期取样,保存在超低温冰箱中备用。

1.2.2 乙醇含量的测定^[15]

标准溶液的配制:分别配制0.1%、0.2%、0.5%、1%、2%、4%、5%(V/V)乙醇溶液,1%(V/V)叔丁醇作为内标,待测。

样品配制:样品10000 r/min离心10 min,取上清,以叔丁醇为内标,参照GB/T 842-2009《血液酒精含量的检验方法》进行测定。

自动顶空条件:炉温85℃,平衡时间40 min;进样阀温度105℃;传输线温度110℃。

气相色谱条件:RTX-5毛细管柱(30 m×0.25 mm,0.25 μ m);升温程序:40℃保持3.0 min,以10℃/min升温至180℃,保持5 min;进样口/气化室温度:200℃;检测器温度250℃。

1.2.3 总酸含量和pH值的测定

总酸含量测定参照GB/T 12456-2008《食品中总酸的测定方法》,略作调整,分别取离心后竹叶酵素1 mL,用去离子水稀释至50 mL,摇匀。取10 mL的上述稀释液于150 mL锥形瓶中,加1%酚酞2滴~3滴。用0.001 mol/L的NaOH水溶液滴定至微红色30 s不褪色为滴定终点。每组3次平行,根据柠檬酸溶液与样品消耗的NaOH体积计算样品中与柠檬酸当量的总酸含量。

发酵液pH值的测定依据GB 10468-1989《水果和蔬菜产品pH值的测定方法》,取离心后的发酵液直接

检测。

1.2.4 有机酸含量的测定

标品配制:使用 0.01 mol/L 磷酸二氢钾缓冲液(pH 2.7)配制乳酸和醋酸的混合标准溶液,其质量浓度均为 1 mg/mL,经过 0.22 μm 微孔滤膜过滤后备用。

样品配制:将竹叶酵素用 0.01 mol/L 磷酸二氢钾缓冲液(pH 2.7)稀释 10 倍,经过 0.22 μm 微孔滤膜过滤,待测。

HPLC 色谱条件:色谱柱:Agilent TC C18 柱(250 mm×4.6 mm i.d, 5 μm);流动相:甲醇:磷酸二氢钾缓冲液(pH 2.7)=2:98(V/V);柱温:25 ℃;流速:1.0 mL/min;检测波长:210 nm。

1.2.5 总酚含量的测定

采用福林酚法测定竹叶酵素发酵过程中总酚含量的变化^[16]。分别取竹叶酵素 40 μL,加水稀释至 500 μL,加入 10%福林酚溶液(V/V) 2.5 mL,充分震荡混匀,常温避光静置 3 min。反应结束后加入 7.5% Na₂CO₃ 溶液(W/V) 2 mL,震荡混匀。避光反应 1 h,以 0.5 mL 去离子水按上述方法进行空白调零,765 nm 下测定吸光度。

1.2.6 DPPH 自由基清除能力的测定^[17]

分别取竹叶酵素 80 μL,用去离子水补足至 2 mL,再分别加入 4 mL 0.1 mmol/L DPPH-甲醇溶液,最后加入 450 μL 50 mmol/L Tris-HCl buffer,25 ℃恒温水浴 30 min。以去离子水调零,在 517 nm 下测定吸光度,DPPH 自由基清除能力的计算见公式(1)。

$$\text{DPPH自由基清除能力}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中, A₀: 空白对照液的吸光度; A₁: 样品测定管的吸光度; A₂: 样品本底管的吸光度。

1.2.7 ABTS 自由基清除能力的测定^[18]

将过硫酸钾溶液加入到 7 mmol/L ABTS(用 5 mmol/L 的 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液配制),使得 ABTS 最终浓度为 2.45 mmol/L,在室温下置于黑暗处 12~16 h。使用前用 PBS 缓冲液将 ABTS 溶液稀释至吸光度为 0.7±0.02(734 nm)。

分别取竹叶酵素 15 μL,添加磷酸盐缓冲液至 300 μL,再加入 5 mL 上述 ABTS 稀释液,在 30 ℃下,反应 1 h。以去离子水为参比溶液,在 734 nm 下测定吸光度。ABTS 自由基清除能力的计算见公式(2)

$$\text{ABTS自由基清除能力}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中, A₀: 空白对照液的吸光度; A₁: 样品测定管的吸光度; A₂: 样品本底管的吸光度。

1.2.8 还原力的测定^[19]

取竹叶酵素 200 μL,加入磷酸缓冲液(0.2 mol/L, pH 6.6)至 2.5 mL,然后加入 2.5 mL 1%铁氰化钾,混合均匀,50 ℃下恒温水浴 30 min,再加入 2.5 mL 10%三氯乙酸,混合均匀。静置 10 min,立即取 2.5 mL 上清液,加入 2.5 mL 去离子水和 0.5 mL 0.1%三氯化铁,混匀。以去离子水为参比溶液,在 700 nm 下测定。吸光度值越高表示还原力越强。

1.3 数据分析和处理

每组实验重复三次(n=3),采用 SPSS 22.0 进行数据分析。

2 结果与讨论

2.1 发酵过程中乙醇含量的变化

自然发酵过程中,微生物消耗糖类物质供给自身的生长和代谢,其含量变化在一定程度上反映了微生物生长的情况,是发酵过程中一个重要的检测指标。竹叶酵素发酵过程中乙醇含量的变化如图 1 所示,由于发酵液中含有丰富的糖类物质,酵母菌在无氧条件下消耗糖将其代谢为乙醇,发酵前期乙醇含量迅速上升,发酵至第 40 d 乙醇含量同第 10 d 相比增长了 170.1%。发酵中期随着营养物质的消耗,代谢速度减慢,同时产生的乙醇对微生物的生长具有产物抑制效应,乙醇含量随着发酵时间的延长逐渐积累,增加速率降低,呈现稳定上升的趋势,在第 180 d 乙醇浓度积累到最高为 2.73%。发酵后期乙醇含量减少,可能是被部分消耗参与其他代谢活动,如酯化反应^[20]。韦仕静^[21]等研究发现西兰花于发酵 5 d 时加入醋酸杆菌后,乙醇积累速率逐渐小于消耗速率,导致其含量下降。由此可见,乙醇含量的下降跟酵素中的优势菌种的转变有关。可能是随着糖原的消耗和乙醇含量的积累,醋酸菌逐渐转变为优势菌种并将乙醇氧化成乙酸。

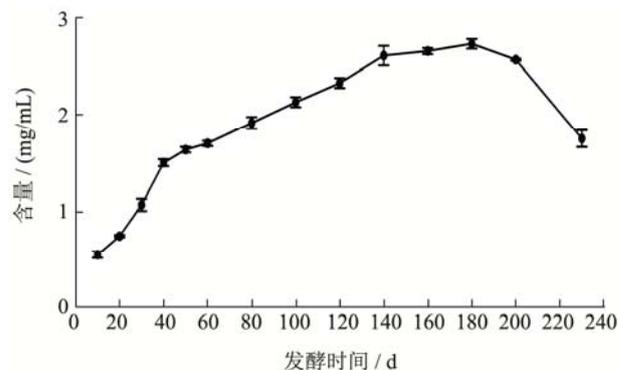


图 1 竹叶酵素发酵过程中乙醇含量的变化

Fig.1 Changes of ethanol content in the fermentation of bamboo leaf Jiaosu

2.2 发酵过程中总酸含量与 pH 值的变化

微生物发酵过程中的 pH 值在一定程度上可以反映出微生物对底物的利用程度,同时也是判别发酵异常的重要指标之一。在竹叶酵素发酵过程中,总酸含量与 pH 值的变化情况如图 2 所示。在发酵前期(前 40 d),总酸含量明显上升,这可能是因为在在此期间环境中营养物质丰富,有利于一些产酸微生物大量繁殖,从而产生大量的乳酸、醋酸等次生代谢产物^[22]。相应地, pH 值迅速下降,在发酵第 40 d,总酸含量达到 3.92 mg/mL, pH 值下降到 3.54,随后总酸含量与 pH 值趋于稳定,一方面可能是因为较低的 pH 值导致部分微生物生长繁殖代谢产有机酸受到影响;另一方面,发酵后期乳酸菌进行乳酸发酵,将多元酸转变成一元酸,使得总酸上升的趋势受到抑制。发酵中后期(140 d~230 d),总酸含量开始下降,可能是因为随着发酵液中可发酵液中糖类物质的消耗,部分微生物开始利用有机酸作为碳源,从而导致总酸含量下降。杨小幸^[23]等探究发现苹果酵素在发酵前两周的 pH 值由 5.02 迅速下降至 3.69,总酸含量由 0.06 g/100 mL 上升至 0.51 g/100 mL,之后均逐渐趋于平缓。由此可见,酵素产品的发酵速度可能与原料中的含水量、含糖量以及其携带的微生物种类及数量相关。

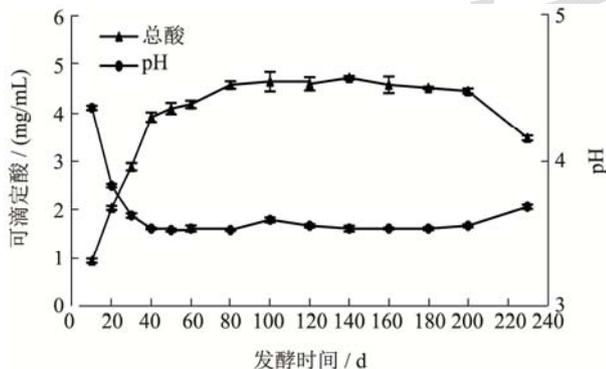


图 2 竹叶酵素发酵过程中总酸、pH 的变化

Fig.2 Changes of total acid, pH value in the fermentation of bamboo leaf Jiaosu

2.3 发酵过程中乳酸、醋酸含量的变化

目前已从酵素产品中筛选出多株菌种,其中绝大部分为酵母菌^[24]和乳酸菌^[25]、醋酸菌^[26]等产酸细菌。发酵过程中微生物产有机酸的含量和种类会影响到发酵产品的风味和品质,能起到呈香、助香和缓冲平衡的作用,因此对发酵过程中的有机酸进行监测有利于判断微生物发酵进行的程度。表 1 为乳酸、醋酸的标准曲线,在乳酸和醋酸浓度分别在 0~1.2 mg/mL 范围内,相关性系数均大于 0.9998,说明建立的标准曲线

具有良好的线性相关性,能够用于乳酸和醋酸浓度的分析。

表 1 乳酸和醋酸标准曲线

Table 1 The standard curve of lactic acid and acetic acid

顺序	有机酸	标准曲线	相关性系数(R ²)
1	乳酸	y=464871x-3429.8	0.9999
2	醋酸	y=311575x-2836.8	0.9998

竹叶酵素发酵过程中乳酸和醋酸的变化如图 3 所示。从图 3 可以看出,发酵前期环境中营养物质丰富,有利于一些产酸微生物大量繁殖,消耗糖分产生了醋酸、乳酸等代谢产物,使总酸含量上升。随着发酵液中有机酸含量的增加,较低的 pH 值导致微生物生长繁殖受抑制,从而降低产生有机酸的速率。发酵 100 d 后醋酸与乳酸含量不再上升,发酵 200 d 后,两种有机酸含量均下降,可能是此时发酵液中碳源含量下降,导致部分有机酸被微生物作为碳源消耗利用^[27],且消耗速率逐渐大于醋酸杆菌将乙醇转化为乙酸的速率。

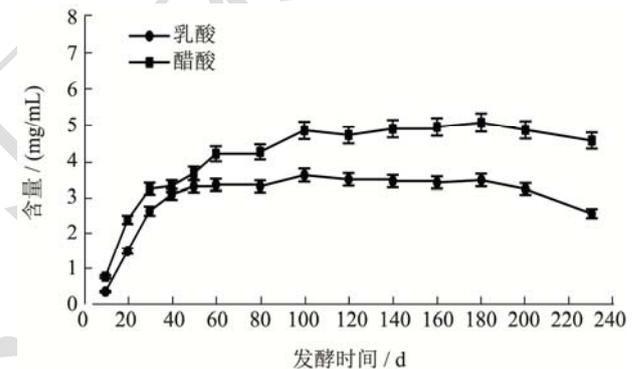


图 3 竹叶酵素发酵过程中两种有机酸含量的变化

Fig.3 Changes of two organic acids content in the fermentation of bamboo leaf Jiaosu

2.4 发酵过程中总酚含量的变化

竹叶酵素发酵过程中总酚含量的变化情况如图 4 所示。发酵前 60 d,总酚含量快速上升,此阶段微生物生长代谢活动非常旺盛,大量消耗原料中的其它组分代谢生成酚类物质;在发酵 60 d 后呈现较缓慢的上升趋势。一方面发酵液中酒精含量不断增加和大量二氧化碳的积累利于酚类物质浸入发酵液中,另一方面在微生物的作用下竹叶表皮细胞结构发生变化,这个时间段因高渗透压作用使竹叶原料中的总酚逐渐被浸提出来。樊丹敏^[28]在研究中发现玫瑰花酵素的总酚含量在前 27 d 迅速上升,之后趋于稳定; Ghosh^[29]等研究表明乳酸菌有利于酚类物质溶出并呈游离状态, Di Cagno^[30]等指出酚类物质达到一定浓度会产生抑菌效果,周围环境中的微生物为了维持生长则产生消耗酚类的物质。由此可见,酵素产品在发酵过程中总酚含

量的变化可能与发酵条件及微生物的作用有关。

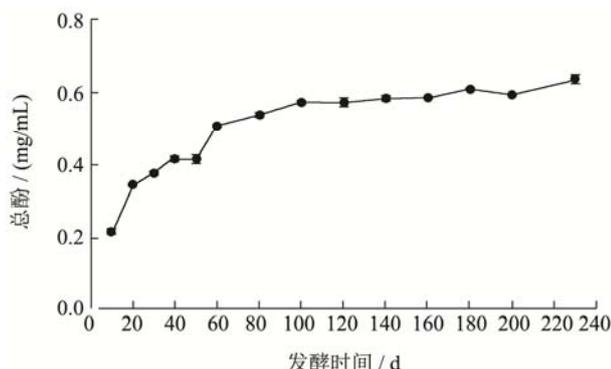


图4 竹叶酵素发酵过程中总酚含量的变化

Fig.4 Changes of total phenolic content in the fermentation of bamboo leaf Jiaosu

2.5 发酵过程中 DPPH 自由基清除能力的变化

DPPH 自由基存在单电子,在 517 nm 处有强吸收。当存在自由基清除剂时, DPPH 自由基单电子与其配对使吸收逐渐减弱,褪色程度与电子数呈定量关系。发酵过程中竹叶酵素对 DPPH 自由基清除能力的变化情况如图 5 所示。随着发酵时间的延长,竹叶酵素对 DPPH 自由基清除能力呈现上升趋势,说明发酵过程能够提高竹叶酵素对 DPPH 自由基的清除能力。

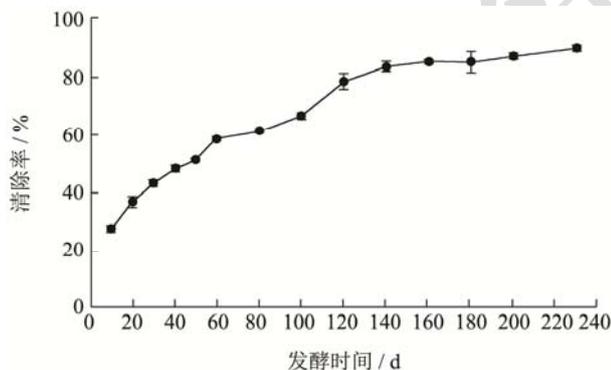


图5 发酵过程中 DPPH 自由基清除能力变化

Fig.5 Changes of DPPH free radical scavenging ability during the fermentation

2.6 发酵过程中 ABTS 自由基清除能力的变化

ABTS 自由基通常也作为抗氧化能力的评估标准之一,被广泛用于抗氧化能力的测定。Floegel^[31]等通过对美国 50 种常见果蔬抗氧化性能的研究发现,与 DPPH 测定相比, ABTS 自由基清除能力更具有代表性。发酵过程中竹叶酵素对 ABTS 自由基清除能力的

变化情况如图 6 所示,随着发酵时间的延长,样品对 ABTS 自由基的清除能力逐渐上升,在发酵 10 d~60 d 之间清除率上升的速率较快,上升了 35.27%。而在 60~180 d 之间清除率处于缓慢上升的趋势,上升了 16.38%。蒋增良^[32]等对葡萄酵素天然发酵过程中体外抗氧化活性研究发现,总酚含量与 ABTS 自由基清除能力具有显著的相关性。发酵过程中 ABTS 自由基清除能力的变化可能与总酚含量的变化有关。

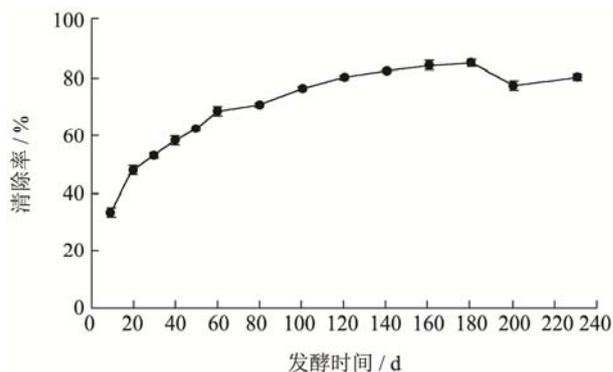


图6 发酵过程中 ABTS 自由基清除能力变化

Fig.6 Changes of ABTS free radical scavenging ability during the fermentation

2.7 发酵过程中还原力的变化

还原力作为一种综合抗氧化评价指标,与多种抗氧化机制有关,包括结合自由基的清除、过多金属离子催化剂、还原能、过氧化物的降解等^[33]。发酵过程中竹叶酵素还原力的变化情况如图 7 所示。与 ABTS 自由基清除能力的变化趋势类似,竹叶酵素还原力在发酵前 140 d 稳定提高,第 140 d 相比第 10 d 提高了 113.88%;发酵到 180 d 后还原力达到最高为 0.94,之后开始下降。

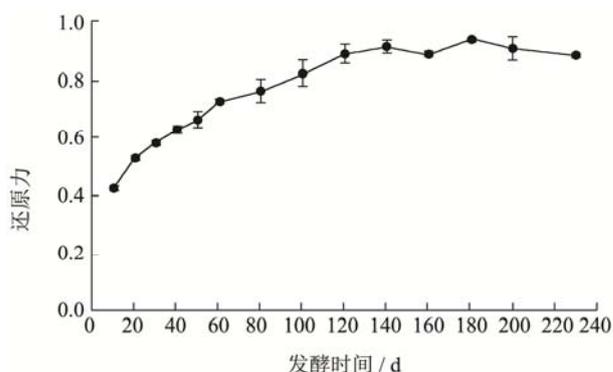


图7 发酵过程中还原力的变化

Fig.7 Changes of reducing power during fermentation

2.8 竹叶酵素发酵过程中各参数相关性与主成分分析

表 2 发酵过程中各参数相关性

Table 2 Correlation of parameters during fermentation

项目	乙醇	总酸	pH	乳酸	醋酸	总酚	DPPH	ABTS	还原力
乙醇	1	/	/	/	/	/	/	/	/
总酸	0.878**	1	/	/	/	/	/	/	/
pH	-0.692**	-0.893**	1	/	/	/	/	/	/
乳酸	0.819**	0.977**	-0.945**	1	/	/	/	/	/
醋酸	0.923**	0.928**	-0.840**	0.908**	1	/	/	/	/
总酚	0.898**	0.847**	-0.717**	0.793**	0.967**	1	/	/	/
DPPH	0.909**	0.740**	-0.589*	0.676**	0.904**	0.958**	1	/	/
ABTS	0.945**	0.876**	-0.742**	0.831**	0.977**	0.984**	0.957**	1	/
还原力	0.952**	0.828**	-0.665**	0.768**	0.951**	0.977**	0.981**	0.986**	1

注: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

2.8.1 竹叶酵素过程中各参数相关性分析

对竹叶酵素发酵过程中各个指标利用 Pearson 法进行了相关性分析,结果如表 2 所示。由表 2 可知,在发酵过程中,总酚和总酸含量与 DPPH 自由基清除能力、ABTS 自由基清除能力和还原力之间均相互呈极显著的正相关性($p < 0.01$),说明酚类化合物是竹叶酵素中抗氧化能力的主要来源。Shahidi F^[34]等研究表明酚类物质可以很容易地脱离一个氢离子并通过共振杂化而稳定,这是酚类物质抗氧化的主要因素之一。

2.8.2 竹叶酵素发酵过程中各指标的主成分分析

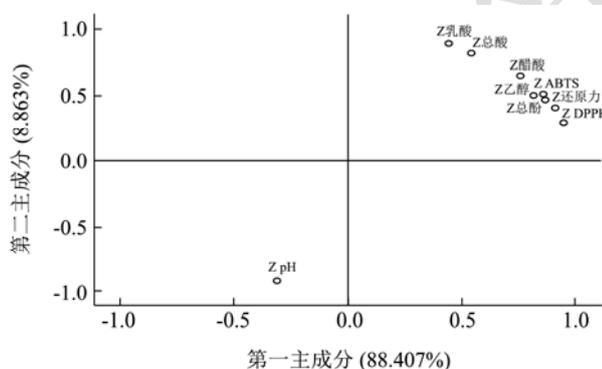


图 8 主成分分析的载荷图

Fig.8 Principal component analysis of the load diagram

为了更进一步的明确发酵过程中众多变量之间的相互关系,采用主成分分析(PCA)对各个变量进行降维处理,提取特征值大于 1 的成分。各指标之间的相关性越大,则其位置越接近。主成分分析的载荷图如图 8 所示:各项指标通过 PCA 后,得到两个主成分,累计总贡献率达到了 97.27%,说明可以利用两个主成分变量解释众多变量指标。其中,总酸与乙醇、ABTS 清除能力、还原力、总酚以及 DPPH 清除能力彼此之间距离较近,均呈现很高的正相关;总酚与还原力、ABTS 清除率和 DPPH 清除率距离最近,距离较近的

指标说明指标之间均呈现极显著的正相关性。这与前文所述相关性分析的结果相一致。

2.8.3 竹叶酵素发酵时间聚类分析

为了对不同发酵时间点的竹叶酵素样品进行归类,对 14 个不同发酵时间点竹叶酵素的主成分样品得分进行聚类分析,结果如图 9 所示,可以按照不同发酵时间的主成分得分将不同发酵时间的竹叶酵素样品分为 4 个区域 N1(0~10 d)、N2(10~20 d)、N3(20~100 d)和 N4(100~230 d)。发酵第 30 d 至 100 d 位置比较接近,说明在此发酵时间范围内的酵素样品性质差别比较小;发酵第 120 d 至 230 d 位置比较接近,说明它们之间的性质差别很小。

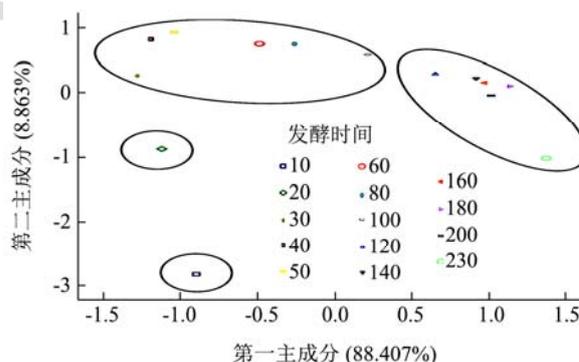


图 9 主成分样品得分图

Fig.9 Main component sample score chart

2.8.4 竹叶酵素综合评价指标分析

通过主成分分析法构建不同发酵时间竹叶酵素样品的综合评价指标(Comprehensive evaluation index, CEI)。以每个主成分所对应的特征值占所提取主成分的特征值之和的比例,进行线性加权求和得到 CEI 见公式(3)。

$$\text{综合评价指标}(CEI) = \frac{7.957PC_1 + 0.798PC_2}{7.957 + 0.798} \quad (3)$$

不同发酵时间竹叶酵素的综合评价指标如图 10

所示, CEI 值在前 30 d 逐渐下降, 可能是自然发酵前期发酵液中的微生物处于适应环境并不断消耗周围环境中营养成分的阶段, 之后一直增长直至 180 d 后 CEI 值达到顶峰, 之后在 180 d~230 d 内始终在峰值周围波动。在本次发酵中 CEI 值最高的发酵时间点是 230 d, 与总酚含量的变化趋势相符, 因此可以利用竹叶酵素中总酚含量作为综合评价的指标。

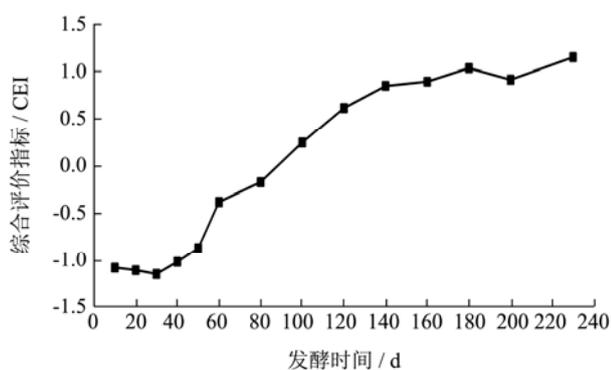


图 10 竹叶酵素综合评价指标

Fig.10 Comprehensive evaluation index of bamboo leaf Jiaosu

3 结论

3.1 对竹叶酵素在发酵过程中乙醇、pH 值、总酸、乳酸、醋酸和总酚含量, 与抗氧化活性(DPPH 自由基清除能力、ABTS 自由基清除能力和还原力)的变化进行跟踪测定。结果表明, 竹叶酵素在发酵过程中的乙醇、总酸、乳酸、醋酸含量均呈先上升后下降的趋势; pH 的变化趋势与总酸相反, 在 50 d 时降到了最低(3.53); 总酚含量总体呈上升趋势, 在 230 d 达到最高, 为 0.63 mg/mL。DPPH、ABTS 自由基清除率和还原力与总酚呈极显著正相关($p < 0.01$), 分别在 230 d、180 d、180 d 达到最高(89.64%、84.74%、0.94%)。

3.2 通过主成分得分大致将竹叶酵素发酵时间段分为四个阶段: N1(0~10 d)、N2(10~20 d)、N3(20~100 d)、N4(100~230 d); 从综合评价指标及发酵时间成本分析, 判断发酵终点 230 d, 这个时间点也可作为判定竹叶酵素发酵终点时间或添补糖液、酵液的依据。

参考文献

[1] 程勇杰, 陈小伟, 张沙沙, 等. 柘树植物酵素中氨基酸分析及抗氧化性能研究[J]. 食品工业科技, 2018, 39(6): 1-7
CHENG Yong-jie, CHEN Xiao-wei, ZHANG Sha-sha, et al. Analysis of amino acids and *in vitro* antioxidant activity of *Cudrania tricuspidata* Jiaosu [J]. Science and Technology of Food, 2018, 39(6): 1-7

[2] 毛建卫, 吴元锋, 方晟. 微生物酵素研究进展[J]. 发酵科技通讯, 2010, 39(3): 42-44

MAO Jian-wei, WU Yuan-feng, FANG Sheng. Advances in microbial Jiaosu research [J]. Bulletin of Fermentation Science and Technology, 2010, 39(3): 42-44

[3] 杨婧娟, 李娜, 赵声兰. 一种酵素的配方优化研究[J]. 中国酿造, 2016, 35(1): 95-99
YANG Jing-juan, LI Na, ZHAO Sheng-lan. Research on the formula optimization of a ferment [J]. China Brewing, 2016, 35(1): 95-99

[4] 张巧, 陈春喜, 陈振林, 等. 大果山楂酵素发酵过程中组分及抗氧化性研究[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(22): 15-19
ZHANG Qiao, CHEN Chun-xi, CHEN Zhen-lin, et al. Research of compositions and antioxidant activity during natural fermentation of *Malus domeri* (Bois) Chev. Enzyme drink [J]. Food Research and Development, 2018, 39(22): 15-19

[5] 马巧灵, 申元英, 杨芳, 等. 苹果酵素对代谢性疾病模型小鼠的实验研究[J]. 食品研究与开发, 2015, 16: 14-16
MA Qiao-ling, SHEN Yuan-ying, YANG Fang, et al. Experimental study of model mice on the apple enzyme of metabolic disease [J]. Food Research and Development, 2015, 16: 14-16

[6] 郭乐. 苹果酵素对小鼠肠道微生态的恢复重建作用[D]. 大理: 大理学院, 2015
GUO Le. Study on intestinal microecology recovery and re-establishment by using apple enzyme in mice model [D]. Dali: Dali University, 2015

[7] 张洪坤. 竹叶的保健功能及应用[J]. 山东商业职业技术学院学报, 2005, 5(2): 91-94
ZHANG Hong-kun. The health functions and apply of bamboo leaves [J]. Journal of Shandong Institute of Commerce and Technology, 2005, 5(2): 91-94

[8] 栗明月, 焦梦荷, 蒋林树, 等. 竹叶黄酮的生理功能及其应用前景[J]. 中国农学通报, 2018, 34(32): 144-149
LI Ming-yue, JIAO Meng-he, JIANG Lin-shu, et al. Physiological functions and application prospect of bamboo leaf flavonoids [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2018, 34(32): 144-149

[9] 王文渊, 周振华, 黄宁江, 等. 高压脉冲电场协同酶法提取竹叶中活性成分的研究[J]. 中国食品添加剂, 2014, 6: 95-101
WANG Wen-yuan, ZHOU Zhen-hua, HUANG Ning-jiang, et al. Extraction of active ingredients in bamboo leaves by enzyme combined with high pulse electric field [J]. China Food Additives, 2014, 6: 95-101

[10] 潘月, 雷美, 吕兆林, 等. 竹叶多糖分离纯化及抗氧化能力的研究[J]. 北京林业大学学报, 2015, 37(3): 148-152

- PAN Yue, LEI Mei, LYU Zhao-lin, et al. Isolation, purification technique and antioxidant capacities of polysaccharides from bamboo leaves [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2015, 37(3): 148-152
- [11] 张东京, 高贵珍, 张兴桃, 等. 响应面法优化竹叶中氨基酸的提取工艺[J]. 萍乡高等专科学校学报, 2017, 34(3): 50-55
ZHANG Dong-jing, GAO Gui-zhen, ZHANG Xing-tao, et al. Optimization of the extraction process of amino acids from bamboo leaves by response surface methodology [J]. Journal of Pingxiang University, 2017, 34(3): 50-55
- [12] 任旺, 叶秀娟, 李婷婷, 等. 麻竹笋中多酚类化合物的提取及挥发性成分分析[J]. 食品科学, 2014, 35(16): 120-123
REN Wang, YE Xiu-juan, LI Ting-ting, et al. Analysis of the volatile components in polyphenol compounds extracted from *Dendrocalamus latiflorus* shoots [J]. Food Science, 2014, 35(16): 120-123
- [13] 王文渊, 黄光文, 龙红萍, 等. 竹叶中茶多酚的提取及其抗氧化性研究[J]. 香料香精化妆品, 2011, 2: 24-28
WANG Wen-yuan, HUANG Guang-wen, LONG Hong-ping, et al. Study on extraction of tea-polyphenols in bamboo leaf and its antioxidational effect [J]. Flavour Fragrance Cosmetics, 2011, 2: 24-28
- [14] 梁倩, 刘蔚漪, 王芳, 等. 野龙竹竹叶中多酚含量及其抑菌活性[J]. 林业科技与开发, 2013, 27(3): 112-114
LIANG Qian, LIU Wei-yi, WANG Fang, et al. A study on polyphenol content and antibacterial activities in leaves of *Dendrocalamus semiscandens* [J]. China Forestry Science and Technology, 2013, 27(3): 112-114
- [15] 周枝凤, 陈凌云, 沈梅, 等. 自动顶空-气相色谱-质谱法测定血液中乙醇含量[J]. 理化检验(化学分册), 2010, 46(1): 22-24
ZHOU Zhi-feng, CHEN Ling-yun, SHEN Mei, et al. GC-MS determination of ethanol in blood with auto-headspace sample introduction [J]. Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chemical Analysis), 2010, 46(1): 22-24
- [16] Ledoux M, Lamy F. Determination of proteins and sulfobetaine with the folin-phenol reagent [J]. Analytical Biochemistry, 1986, 157(1): 28-31
- [17] Omp S, Tejk B. DPPH antioxidant assay revisited [J]. Food Chemistry, 2009, 113(4): 1202-1205
- [18] 杜国荣. 猕猴桃、柿和苹果果实的抗氧化能力及其抗氧化活性成分的分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2009
DU Guo-rong. Study on the total antioxidant capacity and bioactive compounds of kiwi, persimmon and apple fruits [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2009
- [19] Yildirim A, Mavi A, Kara A A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2001, 49(8): 4083
- [20] 庄名扬. 中国白酒香味物质形成机理及酿酒工艺的调控[J]. 食品与发酵科技, 2007, 43(2): 1-6
ZHUANG Ming-yang. The production mechanism of the fragrance in the Chinese spirit & the operation of the spirit brewing [J]. Sichuan Food and Fermentation, 2007, 43(2): 1-6
- [21] 韦仕静, 刘涛, 葛亚中, 等. 西兰花酵素在发酵过程中生化指标变化及其抗氧化活性研究[J]. 现代食品科技, 2017, 33(8): 123-129
WEI Shi-jing, LIU Tao, GE Ya-zhong, et al. Study on changes in the biochemical indicators and antioxidant activity of broccoli enzyme during fermentation [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(8): 123-129
- [22] Jayabalan R, Subathradevi P, Marimuthu S, et al. Changes in free-radical scavenging ability of Kombucha tea during fermentation [J]. Food Chemistry, 2008, 109(1): 227-234
- [23] 杨小幸, 周家春, 陈启明, 等. 苹果酵素天然发酵过程中代谢产物的变化规律[J]. 食品科学, 2017, 38(24): 15-19
YANG Xiao-xing, ZHOU Jia-chun, CHEN Qi-ming, et al. Changes in metabolites during natural fermentation of apple into enzyme drink [J]. Food Science, 2017, 38(24): 15-19
- [24] 卢梦瑶, 刘书亮, 胡凯弟, 等. 酵素中一株高产醋酸菌的鉴定及其产酸特性[J]. 食品与机械, 2016, 32(12): 64-69
LU Meng-yao, LIU Shu-liang, HU Kai-di, et al. Identification of a strain of high yield acetic acid bacteria from ferment and its acid-producing characteristics [J]. Food & Machinery, 2016, 32(12): 64-69
- [25] 王珍珍, 沙如意, 蔡成岗, 等. 树莓酵素中耐高渗酵母菌的分离鉴定及生长特性研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(8): 178-182, 188
WANG Zhen-zhen, SHA Ru-yi, CAI Cheng-Gang, et al. Science and technology of food industry [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(8): 178-182, 188
- [26] 谭明, 马麦生, 张国平, 等. 酵素菌中乳酸菌的分离鉴定[J]. 潍坊医学院学报, 2002, 24(2): 88-90
TAN Ming, MA Mai-sheng, ZHANG Guo-ping, et al. Division and identification on *Lactobacillus* of enzymatic microorganism [J]. Journal of Weifang Medical College, 2002, 24(2): 88-90

(下转第 174 页)