黄精刺梨复合酵素发酵工艺的优化及其体外抗氧化活性分析

常云鹤[1,2]，李青雅[1]，王雪[1]，何劲[1,2]，宋明发[1,2]，冯红霞[1,2*]

（1.贵阳学院食品科学与工程学院，贵州贵阳 550005）

（2.国家林业草原山桐子加工与综合利用工程技术研究中心，贵州贵阳 550005）

摘要：为了优化黄精-刺梨酵素发酵工艺，并评价其功能成分、抗氧化活性及体外消化特性，为药食同源产品开发提供参考。以黄精、刺梨为原料，酵母菌与乳酸菌为发酵菌株，以总酚含量及感官评分为综合指标，通过单因素及响应面法优化时间、温度、接种量、糖含量。最佳工艺下制备酵素及其冻干粉，测定总酸、总酚、总糖、总黄酮、pH 值及 SOD 酶活力；测定其 DPPH·、ABTS·、·OH、O_2^-·清除率；对冻干粉进行体外模拟消化分析。最佳工艺：时间 66 h、温度 34 ℃、接种量 4.8%、糖含量 4%，此条件下酵素感官评分 93，总酸 8.64 g/100 mL，总酚 1.00 mg·mL^{-1}，总糖 1.12 mg/100 mL，总黄酮 0.072 mg·mL^{-1}，pH 值 3.12。SOD 活力 83.67 U·mL^{-1}。对 DPPH·、ABTS·、·OH、O_2^-·清除率分别为 50.85%、78.96%、81.48%、77.12%，表明抗氧化活性显著增强。冻干粉总酸 9.36 g/100 mL，总酚 1.75 mg·mL^{-1}，总糖 3.15 mg/100 mL，符合行业标准（QB/T 5760-2023）。体外消化表明总黄酮在胃、肠消化阶段分别增长 56.29%、42.85%。该研究成功优化黄精-刺梨酵素发酵工艺，产品富含功能成分，抗氧化活性显著增强，为开发药食同源植物功能性产品提供了依据。

关键词：黄精；刺梨；复合酵素；抗氧化活性；体外消化模拟

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.9.0752

Optimization of the Fermentation Process of *Polygonatum sibiricum* and *Rosa roxburghii Tratt* Compound Enzyme and Analysis of Its In Vitro Antioxidant Activity

CHANG Yunhe[1,2], LI Qingya[1], WANG Xue[1], HE Jin[1,2], SONG Mingfa[1,2], FENG Hongxia[1,2*]

(1.Guiyang University, College of Food Science and Engineering, Guiyang 550005, China)

(2.National Engineering Research Center for Processing and Comprehensive Utilization of Forestry and Grassland idesia polycarpa maxim, Guiyang 550005, China)

Abstract: The fermentation process of *Polygonatum sibiricum–Rosa roxburghii Tratt* enzyme was optimized, and its functional components, antioxidant activity, and in vitro digestive characteristics were evaluated, with the aim of providing a reference for the development of homology of medicine and food products. Using *Polygonatum sibiricum* and *Rosa roxburghii Tratt* as raw materials and yeast and lactic acid bacteria as fermentation strains, optimization of time, temperature, inoculation amount, and sugar content was performed through single-factor and response surface methodology, with total phenolic content and sensory score as comprehensive indicators. Under the optimal conditions, the enzyme and its freeze-dried powder were prepared. Total acid, total phenols, total sugar, total flavonoids, pH value, and SOD enzyme activity were measured. The scavenging rates of DPPH·, ABTS·, ·OH, and O_2^{-}· were determined. In vitro simulated digestion analysis was conducted on the freeze-dried powder. The optimal process parameters were determined as follows: time 66 h, temperature 34 ℃, inoculation amount 4.8%, and sugar content 4%. Under these conditions, the enzyme had a sensory score of 93, total acid of 8.64 g/100 mL, total phenols of 1.00 mg·mL^{-1}, total sugar of 1.12 mg/100 mL, total flavonoids of 0.072 mg·mL^{-1}, and a pH of 3.12. SOD activity was 83.67 U·mL^{-1}. The scavenging rates for DPPH·, ABTS·, ·OH, and O_2^{-}· were 50.85%, 78.96%, 81.48%, and 77.12%, respectively, indicating significantly enhanced antioxidant activity.

收稿日期：2025-05-29；修回日期：2025-09-15；接受日期：2025-09-16

基金项目：贵州省重大专项（黔科合重大专项字[2024]025）；贵州省科技支撑项目（黔科合支撑[2023]一般 464）

作者简介：常云鹤（1986-），男，博士，高级实验师/工程师，研究方向：农产品综合加工利用、特色食用油脂开发等方面，E-mail：changyunhe1102@sina.com

通讯作者：冯红霞（1986-），女，博士，副教授，研究方向：粮油、油脂及植物蛋白工程，E-mail：fenghongxia914@163.com

The freeze-dried powder exhibited total acid of 9.36 g/100 mL, total phenols of 1.75 mg·mL^{-1}, and total sugar of 3.15 mg/100mL, which complied with the industry standard (QB/T 5760-2023). In vitro digestion revealed that the total flavonoid content increased by 56.29% during gastric digestion and by 42.85% during intestinal digestion.This study successfully optimized the fermentation process for *Polygonatum sibiricum–Rosa roxburghii Tratt* enzyme. The product was rich in functional components, exhibited significantly enhanced antioxidant activity, and provides a basis for developing functional products from medicinal and edible homologous plants.

Keywords: *Polygonatum sibiricum*; *Rosa roxburghii tratt*; composite enzyme; antioxidant activity; in vitro digestion simulated

黄精（*Polygonatum sibiricum*）属百合科黄精属（*Polygonatum*）多年生草本植物，是我国传统的药食同源植物[1]，原产于东亚，包括中国、韩国等[2]。已从黄精中提取了许多活性成分，例如多糖[3]、皂苷[4]、生物碱、黄酮和木质素等营养成分。现代药理学试验表明，黄精具有辅助降“三高”、改善记忆力、增强免疫力、抗炎、抗氧化[5]、治疗神经退行性疾病[6]、保护心血管系统、改善神经功能、抗肥胖[7]、抗癌、抗病毒等功效。在食品、医疗等领域具有较好的开发价值和应用前景。

刺梨（*Rosa roxburghii Tratt*）为蔷薇科多年生落叶灌木缫丝花的果实，集中分布于我国西南地区[8]，是贵州的特色资源[9]，它也被称为刺石榴、刺菠萝、送春归。刺梨果汁中含有极高浓度的维生素 C，因而被称为“Vc 之王”[10]。刺梨中富含多种有益物质如多糖[11]、黄酮、槲皮素、多酚、有机酸等，具有抗氧化、调节脂质代谢[12]、降血糖和降血脂[13]、抗炎等功效，已被广泛应用于食品、保健品等领域，主要产品有刺梨果汁、果酒、果干、果脯等。

随着人们健康生活意识的提高，酵素产品受到大众的青睐，应用市场快速扩展，酵素的研究开发迫在眉睫。食用植物酵素是以水果、蔬菜、菌类以及药食同源中草药等中的一种或多种为原料，经微生物发酵作用制成的产物。由于酵素富含多种酶、维生素、矿物质及抗氧化物质等生物活性成分[14]，所以具有抗氧化[15]、抗肥胖[16]、改善糖尿病[17]、心血管保护、调节肠道菌群和解毒等保健功效[18]。目前大部分食用植物酵素采用一种或多种食物原料发酵制备酵素，而利用果蔬和药食两用食品进行发酵的产品相对较少。我们可选择单一发酵菌种或不同菌种进行复合发酵，以及药食同源的中草药与果蔬进行复合发酵，不仅增强保健功能，还可拓宽酵素市场。该研究以黄精和刺梨两种药食两用植物为原料，以酵母菌和乳酸菌为复合发酵菌种制备黄精刺梨复合酵素，结合了药食两用植物的药效作用和酵素食品的营养保健功能，并模拟黄精刺梨冻干粉在胃和肠中的消化过程，以期为药食两用植物产品开发提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

黄精，市售；刺梨汁，贵州恒力源天然生物科技有限公司；红糖购于沃尔玛百货有限公司；乳酸菌（含保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌、嗜酸乳杆菌、双歧杆菌、干酪乳杆菌、植物乳杆菌、鼠李糖乳杆菌），购于北京川秀国际贸易有限公司；酵母菌，购于安琪酵母股份有限公司；芦丁、没食子酸、无水碳酸钠、无水乙醇、硫酸亚铁、水杨酸、过氧化氢、邻苯三酚、氢氧化钠、盐酸、硫酸、百里酚酞、氯化铝、氯化钠、L-抗坏血酸等，购于麦克林生物科技有限公司；福林酚、果胶酶、纤维素酶、猪胆盐等试剂，购于上海源叶生物有限公司。其他试剂均为国产 AR 级。

1.2 仪器与设备

058 粉碎机，金华市莫非家用电器有限公司；PAL-1 数显折射计，日本爱拓公司；KQ-800DB 型数控超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司；YXQ-LS 高压蒸汽灭菌锅，植物及植物生理学实验室；10N-50B 冷冻干燥机，旌雯科技有限公司；LC-LX-H165A 离心机，力辰科技有限公司；DH6000II 恒温培养箱，天津市泰斯特仪器有限公司；LC-WB-2+恒温水浴锅，力辰科技有限公司；SW-CJ-1D 超净工作台，上海力辰邦西安仪器科技有限公司；SP-722 型紫外可见分光光度计，上海光谱仪器有限公司；HM-96C 酶标仪，山东恒美电子科技有限公司。其他均为实验室常规仪器。

1.3 实验方法

1.3.1 样品制备

将干燥处理过的黄精粉碎成粉末后按质量比添加 15 倍的水浸泡 10 min。浸泡后添加质量分数 4%的红糖，混合打浆 2 min 后再加入刺梨原汁（黄精质量的 1/3）再打浆 1 min。添加黄精刺梨红糖混合物质量分数 2%的纤维素酶，质量分数 1%的果胶酶，pH 值 3.8，在 50 ℃恒温水浴锅中酶解 60 min。

由于商品化菌粉的活菌量稳定，本实验参照植物酵素发酵的常规方法，按质量比酵母菌:无菌水为 1:10 在 28 ℃恒温培养箱中活化 30 min 配制酵母菌悬液，按质量比乳酸菌：无菌水为 1:10 在 37 ℃恒温培养箱中活化 1 d 配制乳酸菌悬液。以配制悬液作为种子液，将活化后的酵母菌悬液和乳酸菌悬液按体积比 2:1 混合，在无菌条件下以 4.8%（*V*/*V*）的接种量放入发酵罐。

1.3.2 单因素实验设计

设定接种量 6%、发酵温度 34 ℃、发酵时间 30 h，探究不同黄精与刺梨质量分数比（2%、4%、6%、8%、10%）对复合酵素品质的影响。

设定糖含量 4%、发酵温度 34 ℃、发酵时间 30 h，探究不同接种量（2%、4%、6%、8%、10%）（*V*/*V*）对复合酵素品质的影响。

设定糖含量 4%、接种量 6%、发酵时间 30 h，探究不同发酵温度（28、31、34、37、41 ℃）对复合酵素品质的影响。

设定糖含量 4%、接种量 6%、发酵温度 34 ℃，探究不同发酵时间（18、30、42、54、66 h）对复合酵素品质的影响。

1.3.3 响应面实验设计

在单因素试验基础上，应用四因素三水平 Box-Behnken 设计，影响因素为糖含量（A）、接种量（B）、发酵温度（C）、发酵时间（D），响应值为总酚含量与感官评分的综合评分（Y），基于响应面法分析结果，确定最优处理参数。

1.3.4 基本理化指标

1.3.4.1 总酚含量测定

总酚含量的测定依据团体标准 T/GZCX 020-2022《刺梨及其制品中总酚含量的测定》，计算总酚含量。

1.3.4.2 总黄酮含量测定

参考韦仕静[19]的实验方法，计算总黄酮含量。

1.3.4.3 总糖含量测定

采用 DNS 比色法[20]，计算总糖含量（以葡萄糖计）。

1.3.4.4 总酸的测定

采用 GB 12456-2021 方法测定总酸（以乳酸计）。

1.3.4.5 pH 值测定

pH 计测定：按照仪器使用说明书操作，电极插入溶液后，待读数稳定时记录 pH 值。

1.3.5 体外抗氧化活性试验设计

1.3.5.1 DPPH 自由基清除能力测定

参考 Rémy 等[21]的实验方法稍作修改，将样品稀释 20 倍，量取 200 μL 稀释后的样品于试管中，加入 200 μL DPPH 溶液振荡均匀，避光反应 20 min，将 200 μL 反应液加入酶标板于 λ=517 nm 处测 OD 值记为 A_1。将乙醇（70%）替代酵素记为 A_2，空白管 OD 值记为 A_0，S_1 为 DPPH 自由基清除率。同时采用 Vc 标准作为对照，测定不同情况下的吸光度，按照式（1）计算：

$$S_1 = \left[1 - \frac{(A_1 - A_2)}{A_0}\right] \times 100\% \quad (1)$$

式中:

S_1——DPPH 自由基清除率，%;

A_0——空白管吸光度值;

A_1——样品吸光度值;

A_2——乙醇替代酵素测得的吸光度值。

1.3.5.2 羟基自由基清除能力测定

参考赵治巧等[22]的实验方法稍作修改，量取 400 μL 实验预用样品，于 1.5 mL 离心管中依次加入 100 μL $FeSO_4$（7.5 mmol Ł$^{-1}$）溶液，100 μL H_2O_2 溶液（7.5 mmol Ł$^{-1}$），振荡均匀后于 25 ℃避光反应 10 min，加入 100 μL 水杨酸溶液（7.5 mmol Ł$^{-1}$），100 μL 70%乙醇，37 ℃振荡水浴 30 min。将 200 μL 反应液加入酶标板中，于 λ=510 nm 测 OD 值记为 A_1。将去离子水作为空白对照记为 A_2，空管的吸光度记为 A_0，代入表达式，S_2 为羟基自由基的清除率。以 Vc 标准品为对照，分别测定吸光度，按照式（2）计算：

$$S_2=\left[1-\frac{(A_1-A_2)}{A_0}\right]\times 100\% \quad (2)$$

式中:

S_2——羟基自由基清除率，%;

A_0——空白管吸光度值;

A_1——样品吸光度值;

A_2——空白对照的吸光度值。

1.3.5.3 超氧阴离子自由基清除能力测定

参考王海英[23]的实验方法稍作修改，量取 1 mL 实验预用样品与 3 mL Tris-HCl 缓冲液（0.05 mol Ł$^{-1}$、pH=8.2）加入试管混匀，25 ℃恒温水浴 20 min，再加入 0.4 mL 邻苯三酚（2.5 mmol Ł$^{-1}$），反应 5 min 后加 0.5 mL 浓盐酸终止反应。向酶标板中加入反应液，于 325 nm 波长处测定吸光度值（A_0）。同时设置空白对照，以等体积去离子水替代酵素，测定其吸光度（A_1）。将所得 A_0和 A_1代入表达式（3）进行计算。

$$S_3=\left(1-\frac{A_1}{A_0}\right)\times 100\% \quad (3)$$

式中:

S_3——超氧阴离子自由基清除率，%;

A_0——样品吸光度值;

A_1——空白对照的吸光度值。

1.3.5.4 ABTS 自由基清除能力测定

参考 Jiang 等[24]的实验方法稍作修改，称取 78 mg ABTS 与 13.2 mg 过硫酸钾，于 20 mL 去离子水中溶解，4 ℃暗室放置作为储备液，取少量储备液用纯水稀释到吸光度值小于 1。在 EP 管中加入 100 μL 稀释 30 倍实验预用样品，再加入 0.9 mL ABTS 稀释溶液混匀，静置 6 min，吸取上清液 200 μL 在酶标板上，在 734 nm 波长下，使用无水乙醇作为空白对照，测量吸光度，代入表达式。

$$S_4=\left(1-\frac{A_1}{A_0}\right)\times 100\% \quad (4)$$

式中:

S_4——ABTS 自由基清除率，%;

A_0——空白对照的吸光度值;

A_1——样品吸光度值。

1.3.5.5 超氧化物歧化酶活力测定

依据南京建成生物工程研究所试剂盒说明书进行操作：将超氧化物歧化酶试剂盒中试剂一、三、五取出 25 ℃预热 5 min，量取酵素实验预用样品 90 μL 于 EP 管中，按顺序依次加入 500 μL 试剂一、10 μL 试剂二、200 μL 试剂三、200 μL 试剂五，充分混匀 37 ℃反应 30 min，加入显色剂，空白对照组同上，吸取上清液 200 μL 于酶标板中，在 λ=560 nm 处测量吸光度值得空白组 A_0、样品组 A_1。

$$X=\left[\frac{A_0-A_1}{A_0}\right]\times 100\% \quad (5)$$

$$S_5=\frac{X(1-X)V_1}{V_2}\times F$$

式中:

X——抑制百分率，%;

A_0——空白组的吸光度值;

A_1——样品组的吸光度值;

S_5——超氧化物歧化酶活性，U mL^{-1};

V_1——反应体系总体积，L;

V_2——加入反应体系中样本的体积，L;

F——样品稀释倍数。

1.3.6 体外消化模拟

1.3.6.1 体外模拟液的制备

模拟胃液：取 10 mL 准确配制的 0.01 mol Ł$^{-1}$ HCl 溶液，加入 0.2 g 胃蛋白酶和 1 g 的氯化钠，用微孔滤膜过滤，振荡均匀备用。

模拟肠液：准确称取 1.9 g 牛胆盐，0.3 g 的胰蛋白酶，将其加入 120 mL 0.1 mol Ł$^{-1}$ 的碳酸氢钠溶液，用微孔滤膜过滤，振荡均匀备用。

生理盐水的制备：准确配制氯化钠溶液 0.85%（*m/V*），在灭菌锅内（121 ℃）灭菌 20 min。

1.3.6.2 胃消化模拟

参照曾光[25]的方法有所改动，取 50 mL 试管，加试样溶液 1 mL，稀释 20 倍（加生理盐水 19 mL），摇匀，将稀释至 20 倍的样液置于恒温水浴锅中，升温至 37 ℃，样品溶液 pH 值用 1 mol Ł$^{-1}$ 盐酸溶液调节至 2.0 后，加入 4 mL 模拟胃液。模拟胃消化过程中，胃的生化环境和胃蛋白酶所处的条件可能存在差异，试验分为三组，分别为模拟胃消化样品组、胃酸对照组与空白对照组。空白对照组不加胃液和调节试样溶液的 pH 值，但用生理盐水代替加入 4 mL 的胃液量和加入调节试样溶液 pH 值的盐酸量。酸对照组换成 4 mL 0.01 mol Ł$^{-1}$ 的盐酸代替胃液。溶液配制好后，全部存放在用锡箔层包裹的试管中，置于黑暗处，以达到隔光的目的，并在反应过程中尽量避免与空气接触。所有组均设置三组平行。在 37 ℃数字恒温水浴锅中消化 1.5 h，消化过程中 0、30、60、90 min 取出 5 mL 消化样品，4 ℃下以 8 500 r min^{-1} 离心 3 min 后取上清液测定三组对照组 DPPH 自由基清除率和总黄酮含量，所有实验操作重复三次。

1.3.6.3 肠消化模拟

胃消化后，食物会进入肠道进行再消化，取 90 min 模拟胃消化后的消化液，以 1 mol Ł$^{-1}$ $NaHCO_3$溶液调节 pH 值至 7.2，随后加入 4 mL 模拟肠液开始肠消化。在模拟肠消化过程中，为了有别于模拟肠液，设置空白对照组与样品组。空白对照组无肠液模拟，是加碳酸氢钠溶液 4 mL。所有组均设置三组平行。在 37 ℃数字恒温水浴锅中消化 1.5 h 后，在消解过程中，取出 5 mL 消化了 0、30、60、90 min 的消化样品，在 4 ℃下以 8 500 r min^{-1} 离心 3 min 后取上清液测定空白对照组、酸对照组和模拟肠消化样品组的 DPPH 自由基清除率和总黄酮含量。所有实验操作重复三次。

1.3.7 感官评价

参照 QB/T 5323-2018《植物酵素》中食用植物酵素的感官要求，选取 10 位感官评定员（5 男 5 女），分别对复合酵素从色泽、香气、滋味和组织形态 4 个方面进行评价，取其平均值，具体见表 1。

表 1 感官评分表

Table 1 Sensory Score Sheet

指标	评价标准（满分 100 分）
色泽	光亮清透呈褐色（17~25 分）
	颜色暗沉（9~16 分）

	色泽过深或过浅（1~8 分）
滋味	酸甜适中，黄精和刺梨味协调，无涩感（17 ~25 分）
	较酸或较甜，口感较苦涩（9~16 分）
	过酸或过甜，有苦涩感（1~8 分）
气味	发酵香味和黄精、刺梨香味协调，无异味（17~25 分）
	黄精或刺梨气味浓重、发酵香味偏淡（9~16 分）
	无黄精和刺梨气味或有异常气味（1~8 分）
杂质	澄清明亮，无悬浮物及沉淀（17~25 分）
	较为澄清明亮，无明显悬浮物或沉淀（9~16 分）
	浑浊，有悬浮物和沉淀（1~8 分）

1.4 数据统计分析

试验设计采用 Design-Expert 8.06，使用 Microsoft Excel 2016 进行数据统计与计算，结果表示为“平均值±标准偏差”。数据结果使用 Origin 2022 进行分析和制图。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

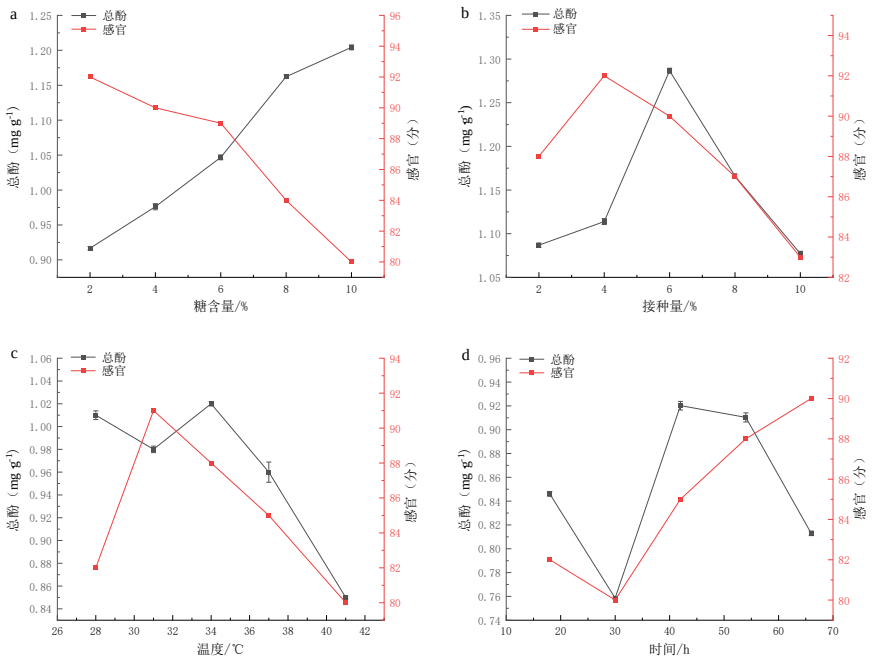


图 1 单因素实验结果

Fig.1 Results of single-factor experiments

注：（a）糖含量对黄精刺梨复合酵素质量的影响；（b）接种量对黄精刺梨复合酵素质量的影响；（c）发酵温度对黄精刺梨复合酵素质量的影响；（d）发酵时间对黄精刺梨复合酵素质量的影响。

由图 1a 可知，酵素总酚含量随着糖含量的增加呈上升趋势，而感官呈下降趋势，主要是由于糖含量过高会掩盖黄精和刺梨发酵口感，导致酵素偏甜[26]。因此根据试验结果分析选择糖含量 2%、4%、6%进行后续优化。

由图 1b 可知，酵素感官评分与总酚含量随接种量变化的图像呈先升后降趋势，主要是因为在发酵过程中接种量低会导致发酵菌繁殖不足或感染杂菌影响风味[27]，接种量过高时，发酵菌繁殖量大，繁殖速度快，使发酵底物消耗的营养成分过多，接种量过多或过少都会导致风味受到影响。因此根据试验结果分析选择接种量 4%、6%、

8%进行后续优化。

由图 1c 所示，酵素的感官评分随温度的变化图像呈先升后降趋势，而总酚含量则呈波动下降趋势（先降后升再降）。在 34 ℃时，总酚含量达到峰值。发酵温度较高或较低时，酵素感官评分及总酚含量较低，主要是由于温度过高或过低对菌体生长繁殖具有一定抑制作用，研究发现，微生物在适宜温度下繁殖代谢活动加快，生化反应活跃，有利于总酚、黄酮等活性物质释放[28]。因此，选择发酵温度 31、34、37 ℃进行后续优化。

由图 1d 可知，随着发酵时间的增加，总酚含量和感官评分呈下降再上升。在发酵前期主要由于酚类物质易被氧化，导致前期总酚含量降低。发酵中期，酵素体系内酚类物质相互转化，且菌种可以在发酵过程中降解和修饰酚类次生代谢物，产生酚类化合物[29]，从而总酚含量升高，总酚含量在 42 h 时达到最大含量 0.92 mg g^{-1}。总酚含量在 42 h 后又呈下降趋势，是因为微生物繁殖到一定浓度会主动分解各类酚类物质。而感官评分先下降再上升，是由于发酵前期微生物繁殖过少，发酵液风味不协调导致评分过低[30]。当发酵时间过长后，酵素发酵风味过浓，所以导致感官评分降低。因此根据试验结果分析选择发酵时间 42、54、66 h 进行后续优化。

2.2 响应面结果与分析

2.2.1 试验设计及数据处理分析

在单因素实验的基础上，以酵素总酚含量和感官评分的综合评分（Y）为响应值，综合评分（Y）=（总酚含量/最高总酚含量）×40%+（感官评分/最高感官评分）×60%。利用 Design Expert 8.0.6 软件设置 3 个零点试验 24 个析因试验，各因素与水平见表 2，试验数据和方差分析结果见表 3 和表 4。

表 2 Box-Behnken 设计试验因素与水平表

Table 2 Factors and levels of Box-Behnken design

水平	A 发酵时间/h	B 发酵温度/℃	C 接种量/%	D 糖含量/%
-1	42	31	2	2
0	54	34	4	4
1	66	37	6	6

表 3 Box-Benhnken 试验设计及响应结果

Table 3 Box-Benhnken design and response results values

试验号	A 时间/min	B 温度/℃	C 接种量/%	D 糖含量/%	Y 综合评分
1	54	34	2	2	0.8
2	66	34	2	4	0.81
3	54	31	6	4	0.86
4	54	37	2	4	0.77
5	54	37	6	4	0.83
6	54	37	4	6	0.74
7	54	34	4	4	0.94
8	54	31	2	4	0.81
9	66	37	4	4	0.85
10	42	34	4	2	0.87
11	54	34	2	6	0.76
12	66	34	6	4	0.91
13	66	34	4	2	0.82
14	54	31	4	2	0.85
15	42	31	4	4	0.87
16	54	34	4	4	0.93
17	54	34	4	4	0.94
18	54	37	4	2	0.85
19	66	34	4	6	0.86

20	42	34	2	4	0.87
21	54	34	6	2	0.86
22	42	34	6	4	0.87
23	66	31	4	4	0.87
24	54	34	6	6	0.81
25	54	31	4	6	0.87
26	42	37	4	4	0.86
27	42	34	4	6	0.88

表 4 方差分析

Table 4 Variance Analysis

来源	方差	自由度	均方差	F 值	*P* 值	显著性
模型	0.059 4	14	0.004 2	0.000 3	0.000 3	**
A	0.000 8	1	0.000 8	0.209 7	0.209 7	
B	0.004 4	1	0.004 4	0.010 1	0.010 1	*
C	0.008 5	1	0.008 5	0.001 1	0.001 1	**
D	0.001 4	1	0.001 4	0.110 5	0.110 5	
AB	0.000 0	1	0.000 0	0.822 3	0.822 3	
AC	0.002 5	1	0.002 5	0.040 5	0.040 5	*
AD	0.000 2	1	0.000 2	0.504 1	0.504 1	
BC	0.000 0	1	0.000 0	0.822 3	0.822 3	
BD	0.004 2	1	0.004 2	0.011 4	0.011 4	*
CD	0.000 0	1	0.000 0	0.822 3	0.822 3	
A2	0.001 3	1	0.001 3	0.128 0	0.128 0	
B2	0.015 6	1	0.015 6	<0.000 1	<0.000 1	**
C2	0.021 1	1	0.021 1	<0.000 1	<0.000 1	**
D2	0.020 3	1	0.020 3	<0.000 1	<0.000 1	**
残差	0.005 7	12	0.000 5			
失拟项	0.005 6	10	0.000 6	0.057 2	0.057 2	
纯误差	0.000 1	2	0.000 0			
合计	0.065 1	26				

注：“*”表示对结果影响显著（*P*<0.05）；“**”表示对结果影响极显著（*P*<0.01）。

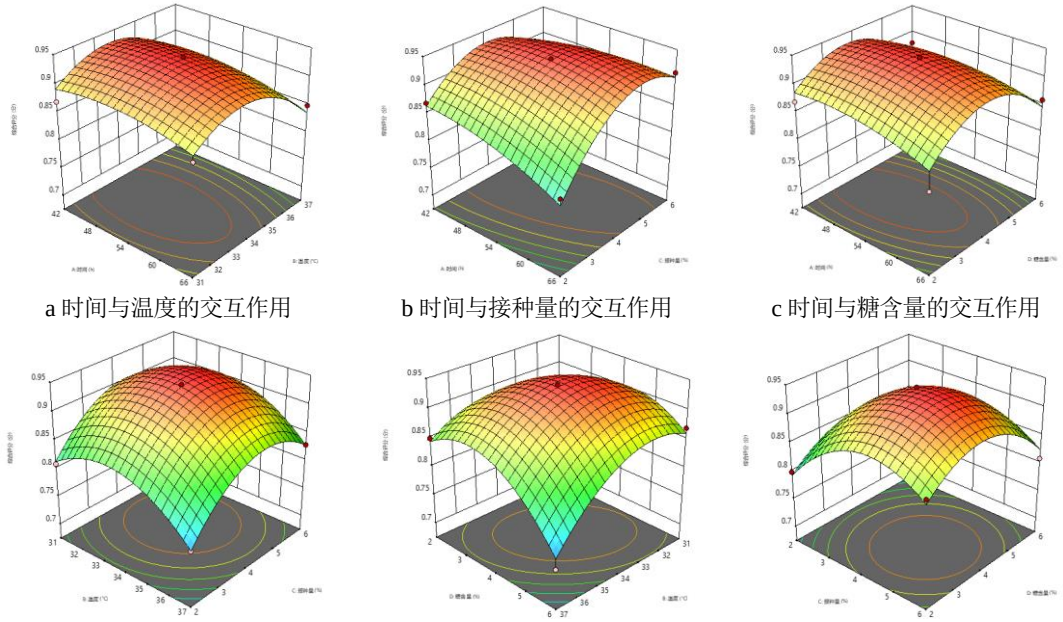
从方差分析结果（表 4）可见，模型组高度显著（*P*<0.000 1），同时失拟项无显著性差异（*P*=0.057 2>0.05），模型决定系数 R^2=0.912 6，说明回归模型拟合度良好，检验误差小。根据回归系数，拟合所得黄精刺梨复合酵素综合评分的二次多元回归方程：

Y=0.936 7-0.008 3A-0.019 2B+0.026 7C-0.010 8D-0.002 5AB+0.025AC+0.007 5AD+0.002 5BC-0.032 5BD-0.002 5CD-0.015 4A^2-0.054 2B^2-0.062 9C^2-0.016 7D^2.

根据表 4 中方差分析结果可以看出，在黄精刺梨复合酵素加工工艺参数中，C 接种量对黄精刺梨复合酵素综合评价影响最大，B 发酵温度、D 糖含量和 A 时间次之，其中 AC 和 BD 达到显著水平。

2.2.2 两因素交互作用响应面分析

基于实验结果，构建三维响应面图（图 2），以评估各因素间的交互作用对复合酵素的影响。由图 2 可知，图 e 的等高线图为椭圆形且密集，响应面斜率最大，说明这两个因素之间的交互作用对黄精刺梨复合酵素综合评价影响作用明显，当发酵时间为 54 h，接种量为 4%时，复合酵素的综合评分随着发酵温度和含糖量的增加而增加，到温度为 34 ℃，糖含量为 4%时，评分达到最高为 0.94，随着温度和糖含量的增加，综合评分逐渐降低，从图中可以看出发酵温度对黄精刺梨酵素的综合评分影响效果最明显，与表 4 分析结果一致。



a 时间与温度的交互作用　b 时间与接种量的交互作用　c 时间与糖含量的交互作用

d 温度与接种量的交互作用　e 温度与糖含量的交互作用　f 接种量与糖含量的交互作用

图 2 两因素交互作用对黄精刺梨复合酵素品质的响应面图

Fig.2 Response surface diagram of the interaction of two factors on the quality of composite enzyme of *Polygonatum sibiricum-Rosa roxburghii Tratt*

2.2.3 最佳条件的确定和模型的验证

通过响应面设计模型分析结果，得出最终优化工艺参数：发酵温度 33.43 ℃，发酵时间 66.00 h，接种量 4.82%，糖含量 4.02%，并预测复合酵素综合评分为 92。最终调整最佳工艺参数为：发酵温度 34 ℃，发酵时间 66 h，接种量 4.8%，糖含量 4%。在此条件下重复实验 3 次，综合评分为 93，与模型预测值相近，证明响应面优化得到的工艺条件是可信的。

2.3 黄精-刺梨复合酵素发酵过程中功能成分的动态变化

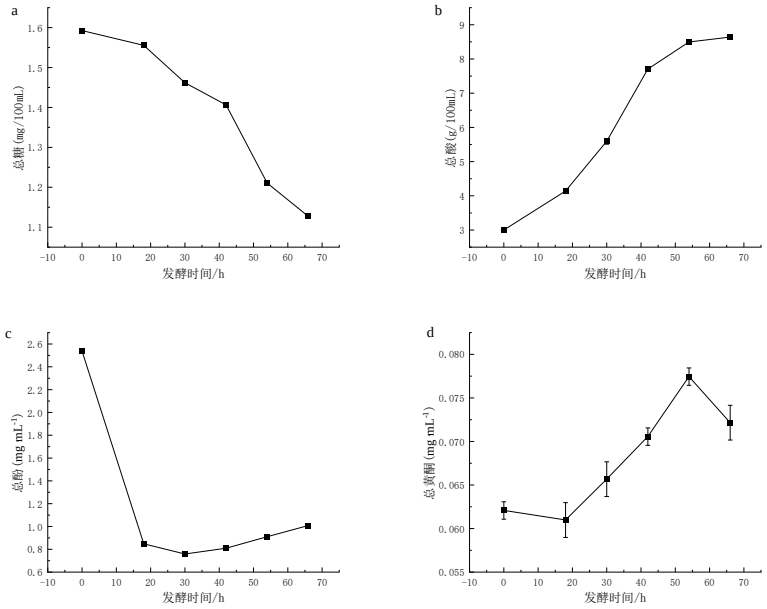


图 3 黄精-刺梨复合酵素发酵过程中功能成分的动态变化

Fig.3 Dynamic Changes of Functional Components in *Polygonatum sibiricum-Rosa roxburghii Tratt* composite enzyme During

Fermentation

注:（a）总糖含量的变化;（b）总酸含量的变化;（c）总酚含量的变化;（d）总黄酮含量的变化。

由图 3a 可知酵素在发酵过程中总糖含量变化的图像呈下降趋势，主要是因为微生物繁殖发育所需的碳源主要来源于原料中以及添加的糖分，在发酵过程中酵母菌和乳酸菌大量繁殖，原料及添加的糖分被消耗，导致总糖含量逐渐减少。高灿灿等[31]在龙葵果酵素的研究中发现总糖质量浓度也呈下降趋势，与本研究结果一致。

由图 3b 可知，在酵素发酵过程中总酸含量变化图像呈现上升趋势，在 42 h 前增长较快这可能源于发酵过程中微生物的大量繁殖，生成多种次生代谢物，如乳酸和醋酸[32]。在发酵 42 h 后，总酸上涨缓慢，可能是由于发酵液中糖类物质减少，导致部分微生物利用有机酸作为碳源，且发酵后期微生物繁殖缓慢或部分消亡，并通过将多元酸转化成一元酸，有效抑制了总酸的上升速度，最终发酵液总酸含量为 8.64 g/100 mL，符合食用酵素行业标准（>8 g/100 mL）。

总酚含量的高低影响着酵素抗氧化能力的强弱，由图 3c 可得，酵素的总酚含量随时间变化的图像呈先下降后缓慢上升。在发酵前期迅速下降，在发酵 18 h 后总酚含量在 1 mg mL^{-1} 达到动态平衡的状态，这是由于在发酵前期，发酵底物中的酚类物质容易被氧化，使得总酚含量呈降低趋势，而在发酵中后期，随着酵素体系中酚类物质的合成与氧化，导致总酚含量呈缓慢上升状态[33]。

由图 3d 可看出，在发酵过程中，酵素总黄酮含量呈先缓慢下降，后逐渐上升再下降的趋势。可能是由于发酵过程中，总黄酮被部分氧化而引起黄酮含量的下降，在发酵中期由于微生物的大量繁殖，使得底物被分解，黄酮从原料中渗出导致黄酮含量升高[34]，到发酵后期，黄酮类化合物可能转化为其他物质或水解导致其含量降低。黄酮含量在 54 h 达到最大值 0.077 mg mL^{-1}。

2.4 抗氧化能力分析

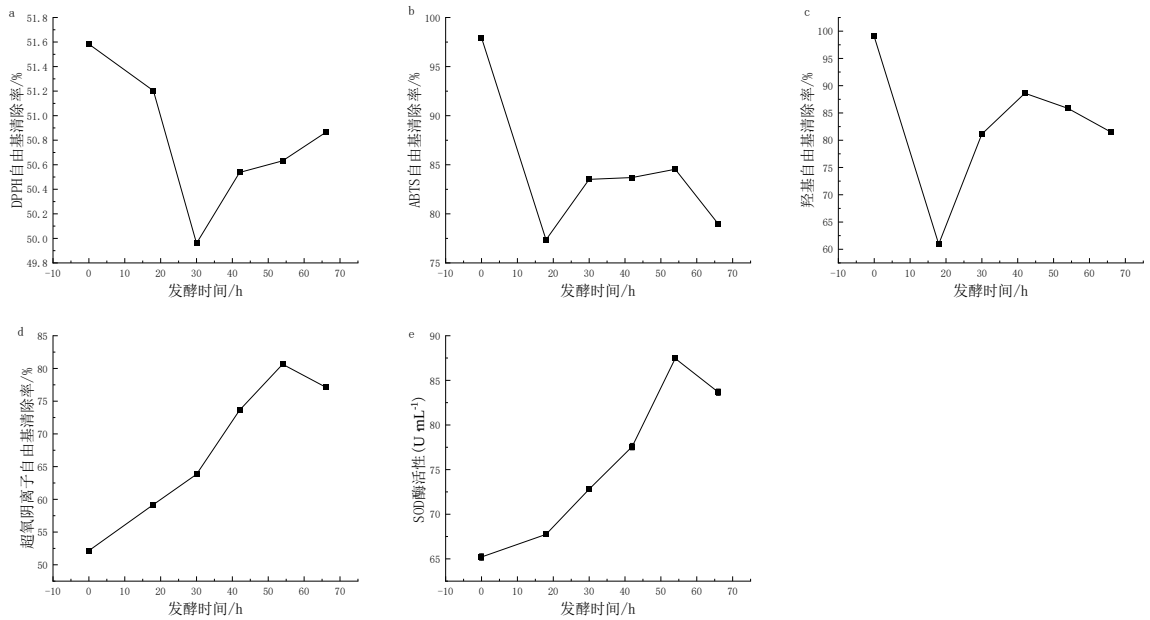


图 4 （a）DPPH 自由基清除率的变化（b）ABTS 自由基清除率的变化（c）羟基自由基清除率的变化（d）超氧阴离子自由基清除率的变化（e）SOD 酶活性的变化

Fig.4 (a)Changes in DPPH free radical scavenging rate(b) Changes in ABTS free radical scavenging rate (c) Changes in hydroxyl free radical scavenging rate(d) Changes in superoxide anion free radical scavenging rate (e) Changes in SOD activity

由图 4a 可知，发酵过程中黄精刺梨复合酵素对 DPPH 自由基清除率呈先下降后上升的趋势。主要是由于发酵原料中维生素 C、总酚含量高，在发酵过程中维生素 C 和总酚含量逐渐减少，导致 DPPH 自由基清除率出现下降趋势，在发酵中后期，经过发酵总酚含量逐渐增加，使得 DPPH 缓慢增长，也证明总酚含量的变化影响着 DPPH 自由基清除率的变化。赵春丽等[35]在铁皮石斛-生姜混合酵素的抗氧化活性测定中发现，DPPH 自由基清除率为

73%，发酵后抗氧化能力显著增强。

由图 4b 可知，发酵过程中酵素对 ABTS 自由基清除率呈先快速下降，再逐渐上升，最后缓慢下降的趋势。清除率与发酵过程中黄精多糖的含量变化有关，发酵初期消耗黄精多糖，导致 ABTS 自由基清除率下降。发酵中期黄精多糖慢慢渗出，导致自由基清除有所上升，在 54 h 时清除率达到 84.53%。发酵末期，黄精多糖总量下降，从而 ABTS 自由基清除率下降。曹云等[36]在药桑酵素的抗氧化活性测定中发现，ABTS 自由基清除率为 88.93%，发酵后抗氧化能力更强。

羟基自由基是一种能在人体内对人体细胞造成损伤的自由基，所以羟基自由基的清除尤为重要。从图 4c 可以看出，羟基自由基清除率在发酵前期呈先快速下降，发酵中后期缓慢上升再下降的趋势。发酵初期消耗底物导致对羟基自由基的清除率降低，发酵中期清除率缓慢上升可能是由于酵素中多种有机酸综合作用的结果[37]，在 42 h 时羟基自由基清除率达到 88.62%。发酵后期羟基自由基清除率下降是由于发酵底物不断减少。庹有朋[38]在利用西瓜皮葡萄皮发酵复合酵素研究中也呈先下降后上升再下降的变化趋势，与本文的研究结果一致。

超氧阴离子自由基对人体中的细胞会造成不可逆的损伤，所以对超氧阴离子自由基的清除是必要的。由图 4d 可以看出在发酵过程中，超氧阴离子自由基清除率先快速上升后下降的趋势。研究发现，黄酮类化合物与 SOD 酶对超氧阴离子自由基清除率有重要影响[39]。发酵初期，通过发酵合成黄酮类化合物导致超氧阴离子自由基清除率不断升高。发酵后期，黄酮类化合物被消耗导致清除率下降。复合酵素在发酵 54 h 时清除率达到最大，清除率为 80.63%。

由图 4e 可知，酵素的酶活性呈先上升后下降的变化趋势。发酵初期，酵素中黄精粘多糖不断渗出导致 SOD 酶活性升高，在第 54 h 达到最大值为 87.44 U mL^{-1}。发酵后期，黄精粘多糖开始被消耗导致 SOD 酶活性降低。黄精中粘多糖对 SOD 酶的活性有重要影响[40]，使得 SOD 酶活性呈先上升后下降趋势。

2.5 体外模拟消化过程中复合酵素粉总黄酮含量的变化

2.5.1 体外模拟胃消化对黄精刺梨复合酵素粉总黄酮含量的影响

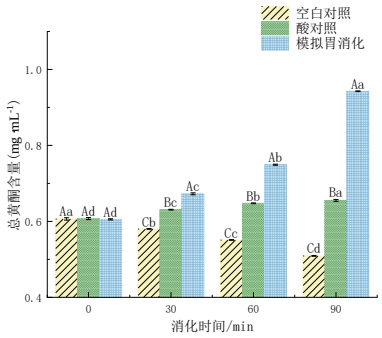


图 5 体外模拟胃消化对黄精刺梨复合酵素粉总黄酮含量的影响

Fig.5 Effect of in vitro simulated gastric digestion on the total flavonoid content of *Polygonatum sibiricum-Rosa roxburghii Tratt* composite enzyme powder

注：不同大写字母表示相同时间下不同组之间的显著性差异（$P < 0.05$），不同小写字母表示同组在不同时间之间的显著性差异（$P < 0.05$）。

如图 5 所示，结果表明，黄精刺梨复合酵素粉空白对照组的总黄酮含量变化差异不明显，酸对照组的总黄酮含量逐渐增加，模拟胃消化组的总黄酮增长较快。在酵素粉模拟胃消化 0~30 min 内，总黄酮含量从 0.604 mg mL^{-1} 上升至 0.670 mg mL^{-1}，与初始相比增加了 10.92%，在 30~60 min，总黄酮含量从 0.670 mg mL^{-1} 增长至 0.749 mg mL^{-1}，增长量占原始总黄酮的 24%；在 60~90 min，总黄酮含量从 0.749 mg mL^{-1} 增长至 0.944 mg mL^{-1}，较初始相比增加 56.29%。这可能是由于胃蛋白酶加速消化样品中黄酮的释放，胃蛋白酶作用于部分蛋白质，继而水解成小分子肽，最终将黄酮从大分子中释放出来。

2.5.2 体外模拟肠消化对黄精刺梨复合酵素粉总黄酮含量的影响

如图 6 所示，整个肠消化期间，空白对照组总黄酮含量持续下降，而模拟肠消化组则呈上升趋势。在 0~90 min，酵素粉空白对照组总黄酮含量从 0.638 mg mL^{-1} 下降至 0.576 mg mL^{-1}，较原始总黄酮含量下降了 9.71%，模拟肠

消化组总黄酮含量从 0.658 mg mL^{-1} 上升至 0.940 mg mL^{-1} 较原始总黄酮含量增长了 42.85%。是由于肠消化后，使与蛋白质结合的黄酮被释放出来[41]，使得黄酮含量增加。

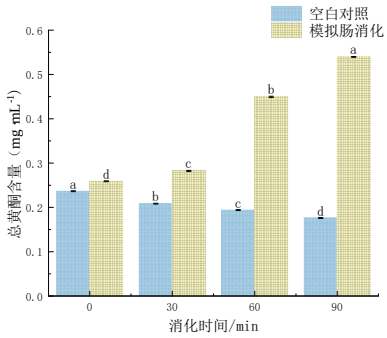


图 6 体外模拟肠消化对黄精刺梨复合酵素粉总黄酮含量的影响

Fig.6 Effect of in vitro simulated intestinal digestion on the total flavonoid content of *Polygonatum sibiricum-Rosa roxburghii Tratt* composite enzyme powder

注：不同小写字母表示差异显著（$P < 0.05$）。

3 结论

该研究以黄精和刺梨原汁为原料，采用酵母菌与乳酸菌复合发酵，并结合单因素试验与响应面分析优化工艺条件。结果确定最佳发酵参数为：时间 66 h、温度 34 ℃、接种量 4.8%、糖含量 4%。在此条件下，所得复合酵素感官评分为 93 分，总酸含量 8.64 g/100 mL，总酚含量 1.00 mg mL^{-1}，总糖含量 1.12 mg/100 mL，总黄酮含量 0.072 mg mL^{-1}，pH 值 3.12，SOD 酶活力 83.67 U mL^{-1}。黄精刺梨复合酵素对 DPPH、ABTS、OH、O_2^- 清除率分别为 50.85%、78.96%、81.48%、77.12%，在发酵过程中抗氧化能力有增强。冻干粉检测结果显示，总酸含量为 9.36 g/100 mL，总酚 1.75 mg mL^{-1}，总糖 3.15 mg/100 mL，符合《QB/T 5760-2023》标准。体外模拟消化实验结果表明，酵素粉总黄酮含量在胃消化阶段增加 56.29%，在肠消化阶段增加 42.85%，证明其功能成分在消化过程中具有良好的释放性与稳定性。综上，优化后的黄精-刺梨复合酵素品质优良，且活性成分丰富、抗氧化活性显著增强，为其作为药食同源功能性产品的开发提供了科学依据。

参考文献

[1] YANG M, CHEN R, ZHOU X, et al. Research progress on pharmacological effects and mechanism of *Polygonatum sibiricum* polysaccharides [J]. Starch/Staerke, 2024, 76 (9/10): 2300168.

[2] LIU R, ZHANG X, CAI Y,et al.Research progress on medicinal components and pharmacological activities of *Polygonatum sibiricum* [J].Journal of Ethnopharmacology, 2024, 328: 12.

[3] LAI W, NING Q, WANG G, et al. Antitumor activity of *Polygonatum sibiricum* polysaccharides [J]. Archives of Pharmacal Research, 2024, 47(8-9): 696-708.

[4] CAO R, FANG X, LI Z, et al. Effect of *Polygonatum sibiricum* saponins on gut microbiota of mice with ulcerative colitis [J]. Fitoterapia, 2024, 174: 105855.

[5] WANG S Q, LI G, ZHANG X F, et al. Structural characterization and antioxidant activity of *Polygonatum sibiricum* polysaccharides [J]. Carbohydrate Polymers, 2022, 291: 119524.

[6] JIANG X, WANG Y, LIN Z, et al. *Polygonatum sibiricum* polysaccharides: a promising strategy in the treatment of neurodegenerative disease [J]. Neurochemistry International, 2024, 181: 105902.

[7] OU X, WANG X, ZHAO B, et al. Metabolome and transcriptome signatures shed light on the anti-obesity effect of *Polygonatum sibiricum* [J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 12.

[8] ZUO Y, XU H, FENG D, et al. Effect of fermented *Rosa roxburghii Tratt* fruit juice on gut microbiota in a dextran sulfate sodium-induced colitis mouse model [J]. Food Science and Human Wellness, 2024, 13(4): 2234-2243.

[9] LU M, ZHANG H, AN H. Chloroplast DNA-based genetic variation of *Rosa roxburghii* in Southwest China: phylogeography and

conservation implications [J].Horticultural Plant Journal, 2021, 7(4): 9.

[10] A Q Q Y, A D Z, A A K F, et al. Phytochemicals, essential oils, and bioactivities of an underutilized wild fruit Cili (*Rosa roxburghii*) [J]. Industrial Crops and Products, 2020, 143: 111928.

[11] YANG Z, CHEN G. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis in prostatic carcinoma DU145 cells by polysaccharides from Yunnan *Rosa roxburghii Tratt* [J]. Molecules, 2024, 29(7): 1575.

[12] TAN Y, TAN S, REN T, et al. Transcriptomics reveals the mechanism of *Rosa roxburghii Tratt* ellagitannin in improving hepatic lipid metabolism disorder in db/db mice [J]. Nutrients, 2023, 15(19): 4187.

[13] JI J, ZHANG S, TANG L, et al. Integrative analysis of fecal metabolome and gut microbiota in high-fat diet-induced hyperlipidemic rats treated with *Rosa Roxburghii Tratt* juice [J]. Journal of Functional Foods, 2022, 90: 104978.

[14] HIDALGO-FUENTES BELÉN, DE JESÚS-JOSÉ EDGAR, CABRERA-HIDALGO A D J, et al. Plant-based fermented beverages: nutritional composition, sensory properties, and health benefits [J].Foods, 2024, 13(6): 844.

[15] AGARBATI A, CANONICO L, CIANI M, et al. Functional potential of a new plant-based fermented beverage: benefits through non-conventional probiotic yeasts and antioxidant properties [J]. International Journal of Food Microbiology, 2024, 424: 10.

[16] XIAO X, LI S, ZHOU X, et al. The anti-obesogenic effects and underpinning mechanisms of fermented plant-based foods: a review [J]. Trends in Food Science & Technology, 2023, 136: 1-10.

[17] DWIVEDI S, SINGH V, SHARMA K, et al. Significance of soy-based fermented food and their bioactive compounds against obesity, diabetes, and cardiovascular diseases [J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2024, 79(1): 1-11.

[18] DAI J, SHA R Y, WANG Z Z, et al. Edible plant jiaosu: manufacturing, bioactive compounds, potential health benefits, and safety aspects [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100(15): 5313-5323.

[19] 韦仕静.桑葚酵素发酵工艺及花青素生物转化的研究[D].广州市:华南理工大学,2018.

[20] 高庆超,常应九,马蓉,等.微生物酵素的研究进展[J].食品研究与开发,2020,41(2):190-195.

[21] RÉMY ROMANET, SARHANE Z, BAHUT F, et al. Exploring the chemical space of white wine antioxidant capacity: a combined DPPH, EPR and FT-ICR-MS study [J].Food Chemistry, 2021, 355(5): 129566.

[22] 赵治巧,曾莉,万玉军,等.酵母菌-植物乳杆菌复合发酵菠萝酵素生物活性的初步研究[J].食品与发酵工业,2020,46(7):110-115.

[23] 王海英.番木瓜酵素的研究与制备[D].天津:天津科技大学,2018.

[24] JIANG J K, LI W X, YU S P. The effect of inoculation Leu-conostoc mesenteroides and Lactiplantibacillus planetarium on the quality of Pleurotus eryngii Jiaosu [J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 163: 113445.

[25] 曾光.两种酵素发酵工艺、消化模拟及货架预测模型的研究[D].沈阳:辽宁大学,2021.

[26] RAN J, TANG Y, MAO W, et al. Optimization of the fermentation process and antioxidant activity of mixed lactic acid bacteria for honeysuckle beverage [J]. Frontiers in Microbiology, 2024, 15: 11.

[27] TAO A, FENG X, SHENG Y, et al. Optimization of the Artemisia polysaccharide fermentation process by Aspergillus niger [J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9(9): 842766.

[28] 商卓,刘杰文,刘红,等.青芒果-木瓜混合果皮酵素发酵工艺优化及其抗氧化活性[J].中国酿造,2024,43(5):144-149.

[29] 张蕊,袁晶.益生菌的生理功能及其在果蔬汁发酵中的应用研究进展[J].寒旱农业科学,2024,5:393-399.

[30] CONG S, ZHANG X, ZHAO H, et al. Process optimization and analysis of product quality of blueberry and corn peptide fermented by mixed lactic acid bacteria [J]. Fermentation, 2024, 10(9): 454.

[31] 高灿灿,连洁,钱荪宁,等.龙葵果酵素理化指标活性成分及其抑菌性研究[J].农产品加工,2024,1:66-69.

[32] WAN P, LIU H, ZHU Y,et al.Effects of *Polygonatum sibiricum* on physicochemical properties, biological compounds, and functionality of fermented soymilk[J].Foods, 2023, 12(14).

[33] 郭乃菲,董墨思,刘军彤,等.葛根葡萄酵素发酵过程中的抗氧化能力研究[C]//中共沈阳市委,沈阳市人民政府.第二十一届沈阳科学学术年会论文集——自然科学类二等奖.沈阳：辽宁中医药大学,2024:7.

[34] CHENG J R, LIU X M, CHEN Z Y, et al. Mulberry anthocyanin biotransformation by intestinal probiotics [J]. Food Chemistry, 2016, 213: 721-727.

[35] 赵春丽,詹凤,周永强,等.铁皮石斛-生姜混合酵素发酵工艺的筛选及抗氧化活性测定[J].微量元素与健康研究,2025,1:7-12.

[36] 曹云,袁保泰,艾力塔比尔·艾尼完,等.药桑酵素的制备及品质分析[J].现代食品科技,2025,2:253-261.

[37] 贾仕杰,张海华,张焕,等.东北 6 种红树莓叶酚类化合物的鉴定及抗氧化活性分析[J].食品科学,2019,40(20):227-233.

[38] 庹有朋.葡萄皮西瓜皮复合酵素加工工艺参数优化及特性研究[D].雅安:四川农业大学,2022.

[39] 姜峰,晏子玉,乐治平.发酵过程中青梅酵素的活性成分及其抗氧化性能[J].南昌大学学报(工科版),2021,3:227-233.

[40] MO X, GUO D, JIANG Y, et al. Isolation, structures and bioactivities of the polysaccharides from Radix Hedysari: a review [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 199: 212-222.

[41] ZHANG X, LI Y, LI Y, et al. Changes of bioactive components and antioxidant capacity of pear ferment in simulated gastrointestinal digestion in vitro [J]. Foods, 2023, 12(6): 1211.