

发酵火麻仁乳的工艺优化及抗氧化活性变化

赖惠敏, 王世连, 阮征, 李沛生

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 将熟化火麻仁乳作为原料, 以乳酸菌复配比例、菌种添加量、发酵温度与发酵时间为自变量, 活菌数、酸度、感官评价为评价指标, 采用模糊综合评价法通过单因素试验及响应面试验确定火麻仁发酵乳最佳生产工艺配方。实验表明: 当保加利亚乳杆菌:嗜热链球菌:干酪乳杆菌:嗜酸链球菌复配比例为 2:2:1:1.78、接种量为 6.21%、发酵温度为 39.42 °C、发酵时间为 7.12 h 条件下时, 模糊综合评价值最高, 为 0.927 分, 其活菌数、酸度及感官评分分别为 1.9×10^8 CFU/mL、78 °T 和 8.74 分。发酵后火麻仁乳的总糖、总固形物含量分别为 69.29 mg/mL、 6.08 ± 0.22 g/100 g, 与发酵前相比含量显著降低 ($p < 0.05$), 总酸、总酚和总黄酮含量分别为 7.99 ± 0.34 mg/mL、 28.04 ± 0.82 mg GAE/100 mL、 27.11 ± 1.34 mg GAE/100 mL, 含量均比发酵前显著提高 ($p < 0.05$)。抗氧化实验表明, 当 DPPH 自由基清除率、ABTS⁺ 自由基清除率为 50% 时, 发酵后火麻仁乳浓度分别为 26.09 mg/mL、 7.22 ± 0.13 mg/mL, 与 0.25 mg/mL 和 0.13 mg/mL 生育酚相当, 抗氧化活性得到了显著提高 ($p < 0.05$)。

关键词: 火麻仁发酵乳; 活菌数; 酸度; 模糊综合评价法; 抗氧化性

文章编号: 1673-9078(2021)07-194-202

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.7.0974

Optimization of Fermentation Process of Hemp Seed Milk and Changes in Antioxidant Activity

LAI Hui-min, WANG Shi-lian, RUAN Zheng, LI Bian-sheng

(College of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The optimal production process and formula of hemp seed milk was determined through single factor and response surface experiments using the fuzzy comprehensive evaluation method, with cooked hemp seed milk as the raw material, the lactic acid bacteria mixture ratio, amount of added strain, fermentation temperature and fermentation time as the independent variables, as well as the number of viable bacteria, acidity and sensory score as the evaluation indicators. Experiments show that the fuzzy comprehensive evaluation value was the highest (0.927 points), with the number of viable bacteria, acidity and sensory score being 1.9×10^8 CFU/mL, 78 °T and 8.74 points, respectively, under the following conditions: ratio of *Bulgarian lactobacillus*: *Thermophilic streptococcus*: *Lactobacillus casei*: *Streptococcus acidophilic*, 2:2:1:1.78; inoculation quantity, 6.21%; fermentation temperature, 39.42 °C; fermentation time, 7.12 h. After fermentation, the contents of total sugars and total solids in the hemp kernel milk were 69.29 mg/mL and 6.08 ± 0.22 g/100 g, respectively, which were significantly lower than those before fermentation ($p < 0.05$). The contents of total acids, total phenolics and total flavonoids were 7.99 ± 0.34 mg/mL, 28.04 ± 0.82 mg GAE/100 mL and 27.11 ± 1.34 mg GAE/100 mL, respectively, which were significantly higher than those before fermentation ($p < 0.05$). The antioxidant activity experiments showed that when the DPPH free radical scavenging rate and ABTS⁺ free radical scavenging rate were 50%, the concentrations of hemp seed milk after fermentation were 26.09 mg/mL and 7.22 ± 0.13 mg/mL, respectively, which were equivalent to 0.25 mg/mL and 0.13 mg/mL tocopherol, and the antioxidant activity increased significantly ($p < 0.05$).

Key words: hemp seed fermented milk; viable count; acidity; fuzzy comprehensive evaluation method; antioxidant activity

引文格式:

赖惠敏,王世连,阮征,等.发酵火麻仁乳的工艺优化及抗氧化活性变化[J].现代食品科技,2021,37(7):194-202,+193

LAI Hui-min, WANG Shi-lian, RUAN Zheng, et al. Optimization of fermentation process of hemp seed milk and changes in antioxidant activity [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(7): 194-202, +193

收稿日期: 2020-10-23

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目 (2019B020212002)

作者简介: 赖惠敏 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与保藏

通讯作者: 李沛生 (1962-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品加工和保藏

火麻仁含有丰富的不饱和脂肪酸、蛋白质、矿物质、糖类、矿物质等营养成分,同时含有多酚、黄酮、木质素酰胺类化合物、葫芦巴碱、甾体及萜类等生物活性成分^[1],具有抗氧化、预防心血管疾病、润肠通便、抗炎、护肝等功效。早在20世纪80年代,国外就开发了火麻仁系列的产品,如火麻仁面粉、火麻仁饼干、火麻仁饮料、火麻仁蛋白粉、火麻仁油、火麻仁酱以及火麻仁能量棒等营养保健食品^[2]。而火麻仁早在2002就被国家卫生和计划生育委员会列入“既是食品又是药品”的名录,收录在《中国药典》。但目前国内市场对火麻仁资源的利用多限于简单的物理处理和初级加工,如干燥火麻仁入药、压榨火麻仁油等,火麻仁产品的开发尚处于起步阶段,对其深层次的开发利用远远不够。因此,开发新型火麻仁产品具有很高的市场应用价值。

随着人们生活水平和健康意识的提高,乳酸菌发酵的乳饮品深受消费者的追捧,在乳酸菌发酵过程中产生的大量乳酸、草酸、丙酮酸等有机酸以及乙醛、乙醇、丙酮、丁二酮等羰基化合物^[3],赋予了发酵乳独特的风味^[4]。Halpern等^[5]发现,食用含保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌的发酵乳可以增加人体内T细胞产生的IFN- γ 以提高人体免疫力。Bartkiene等^[6]研究发现,乳酸菌在发酵过程中释放的蛋白质酶和乳酸菌脂酶可以将蛋白质和脂肪分解为易于人体吸收的状态,从而促进蛋白质和脂肪的消化吸收;在乳酸菌发酵谷物基质的过程中,大分子营养物质降解,增加了矿物质、氨基酸、脂肪酸和碳水化合物的营养价值和可用性^[7]。但目前市场上谷物发酵型蛋白饮料大都局限于大豆、花生、核桃以及杏仁等传统植物原料,开发更多品种的具有高营养价值的植物蛋白以丰富产品的种类也是市场所需。火麻仁乳中含有丰富的氨基酸、糖类、矿物质、多不饱和脂肪酸、木质素酰胺类活性成分,其中80%为多不饱和脂肪酸,亚麻酸和亚油酸比例为1:2至1:3,火麻仁乳中还含有 γ -生育酚,具有很强的抗氧化、抗衰老等功效,具有很强的应用前景^[8]。因此,火麻仁发酵乳具有很高的开发利用价值。

本研究以经过熟化的火麻仁为原料,探究火麻仁乳在乳酸菌复配比例、接种量、发酵温度及时间的最适发酵条件,以获取较高品质的火麻仁发酵乳,并对火麻仁乳发酵前后的营养活性成分及体外抗氧化活性等品质进行研究,旨在为火麻仁的深加工处理提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

火麻仁,采自云南大姚火麻仁种植基地;发酵菌种:保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*, CICC 6045)、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*, IFFI 6038),购于广东微生物菌种保藏中心;干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*, LC A-GJ01)、嗜酸链球菌(*Streptococcus acidophilus*, LYO 10DCU-S),杜邦·丹尼斯克样品;2,4,6-三吡啶基三嗪(TPTZ)、2,2-联苯基-1-苦基肼基(DPPH):上海麦克林生化科技有限公司,均为分析纯;2,2-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐(ABTS):上海麦克林生化科技有限公司,分析纯。

1.2 主要仪器设备

电热恒温培养箱(FX303-2),广东环凯微生物科技有限公司;立式高压灭菌锅(SQ510C),重庆雅马拓科技有限公司;超净工作台(VD-650),苏州净化设备有限公司;高压均质机(GYB40-10S),广州市东征化玻仪器有限公司;紫外可见分光光度计752N,上海精密科学仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 火麻仁原料液的制备

称取100g火麻仁,与水以1:9的料液比在80℃的条件下用打浆机碾磨2min过滤,滤加入5%的白砂糖和0.2%羧甲基纤维素钠,在20MPa下均质10min;取100mL封装于蒸煮袋中,迅速放置80℃水浴锅中,恒温加热20min后冷却至40℃左右,准备接种发酵。

1.3.2 单因素试验

以感官评分为主要参考指标,活菌数及滴定酸度为次要参考指标,参考Singh等^[9]层次分析法(AHP)确定各指标的权重比例系数集为 $W = \{\text{活菌数, 酸度, 感官评分}\} = \{0.25, 0.25, 0.5\}$,以模糊综合评判值作为评价标准,探究菌种复配比例(1:1:1:1; 2:2:1:1; 2:2:1:2; 2:2:2:1; 1:1:1:2; 1:1:2:1)、接种量(3%、4%、5%、6%、7%、8%, W/W)、发酵温度(34℃、36℃、38℃、40℃、42℃、44℃)及发酵时间(5h、6h、7h、8h、9h、10h)对发酵火麻仁乳综合品质的影响,分别进行单因素试验,以选取最适发酵条件。

1.3.3 响应面优化发酵火麻仁乳制备工艺

在单因素实验的基础上选取合适水平范围,根据Box-Behnken中心组合设计原理,以接种量、发酵时间、发酵温度三个因素为自变量,以乳酸菌总数、酸度、感官评分的模糊综合评判值为响应值,各因素的水平采用-1、0、1进行编码,如表1所示。通过

响应面优化实验设计, 研究发酵条件对发酵效果的影响, 并确定最佳发酵工艺条件。

表 1 响应曲面设计实验因素水平和编码

Table 1 Independent variables and their levels used in the response surface design

因素	水平		
	-1	0	1
菌种复配比例	2:2:1:2	1:1:1:1	1:1:2:1
接种量/%	5	6	7
发酵温度/°C	38	40	42
发酵时间/h	7	8	9

注: 菌种为按顺序配比依次: 保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌、干酪乳杆菌、嗜酸链球菌。

1.3.4 各项理化指标测定

1.3.4.1 乳酸菌活菌数

活菌数测定采用稀释平板计数法, 参考国标 GB 4789.35-2010。

1.3.4.2 酸度

酸度值的测定采用电位滴定法, 参考国标 GB 5009.239-2016。

1.3.4.3 酚类物质含量测定

总酚含量测定: 参照 Simwaka 等^[10]实验方法, 采用 Folin-Ciocalteu 法测定火麻仁发酵乳总酚含量。总黄

酮含量测定: 参照 Wang 等^[11]实验方法, 采用 NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 比色法测定火麻仁发酵乳的总黄酮含量。

1.3.4.4 抗氧化活性测定

DPPH 自由基清除能力测定参考 Ma 等^[12]实验方法进行测定。

ABTS⁺自由基清除实验参考 Re 等^[13]实验方法进行测定。

1.3.4.5 持水性测定

称取 20 g 发酵火麻仁乳样品, 置于有滤纸的漏斗中, 放置 120 min 后收集滤液并称重, 用以下公式计算得酸奶持水性。

$$\text{持水性} / \% = \left(1 - \frac{M1}{M2} \right) \times 100\%$$

式中: M1 表示滤液质量 (g); M2 表示称量酸奶样品重量 (g)。

1.3.4.6 可溶性固形物含量测定

取发酵火麻仁乳 1 mL, 加入 4 mL 蒸馏水混匀, 手持式糖度计测定。

1.3.4.7 感官评价

选择 10 名感官经验丰富的品评员, 事先培训。感官评价标准参考中国乳制品行业协会制订的《乳与乳制品感官评价》, 略做修改。具体评价指标以及评分标准如表 2 所示。

表 2 感官评价表标准

Table 2 Sensory evaluation criterion

评分标准		8~10 分	6~7 分	4~5 分	1~3 分
色泽(10%)		乳白色, 颜色均匀	淡黄色, 颜色均匀	褐色, 颜色不均匀	褐色较深, 颜色异常
外观	组织状态(25%)	结构紧实, 无乳清析出	结构较紧实, 少量乳清析出	结构稍松散, 少量乳清析出	松散絮状, 大量乳清析出
	风味强度(15%)	谷物香味浓郁	谷物香味明显	谷物味道清淡, 无明显生腥味	有油脂哈喇味, 生腥味严重
口感	细腻程度(20%)	非常细腻, 爽滑	细腻, 较爽滑	细腻不足, 有颗粒感, 但不明显	粗糙, 颗粒感明显
滋味	风味强度(30%)	酸甜比适口	稍过酸或过甜	味道寡淡	滋味异常

1.3.4.8 模糊综合评价法

参照 Singh 等^[9]模糊综合评判法对相应指标进行多目标综合评判, 综合考虑活菌数、酸度、感官评分等指标对发酵力及发酵汁品质的重要程度, 计算各指标总分占所有指标总分的比重^[14]。

1.3.5 数据统计分析

所有样品均设 3 个平行试验, 实验结果表示为平均值±标准误差。采用 Excel 2016 和 Origin 9.1 对数据进行处理与作图, 采用 Design Expert 进行响应面实验设计与分析, 采用 SPSS Statistic 24.0 对数据进行显著性差异及相关性分析。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验

2.1.1 菌种复配比对发酵火麻仁乳的影响

由图 1a 可以看出, 不同的复配比例对感官评分、活菌数以及酸度均有较大的影响。组 2 的感官评分最高, 为 8.46 分, 组 3 因为具有最高的活菌数 (2.1×10^7 CFU/mL) 和酸度 (78.13 mg/mL), 感官评分最低, 为 7.23 分。组 4 的活菌数和酸度值最小, 分别为 1.6×10^7 CFU/mL 和 68.99 mg/mL。由图 1b 可以看出, 组 6 的模糊综合评判值最高, 为 0.972, 其次是组 1, 模糊综合评判值为 0.968, 组 4 的模糊综合评判值最小, 为 0.852。综合考虑, 选择 1:1:2:1、1:1:1:1 和 2:2:1:2 (保加利亚乳杆菌:嗜热链球菌:干酪乳杆菌:嗜酸链球菌)

作为响应面最佳取值范围。

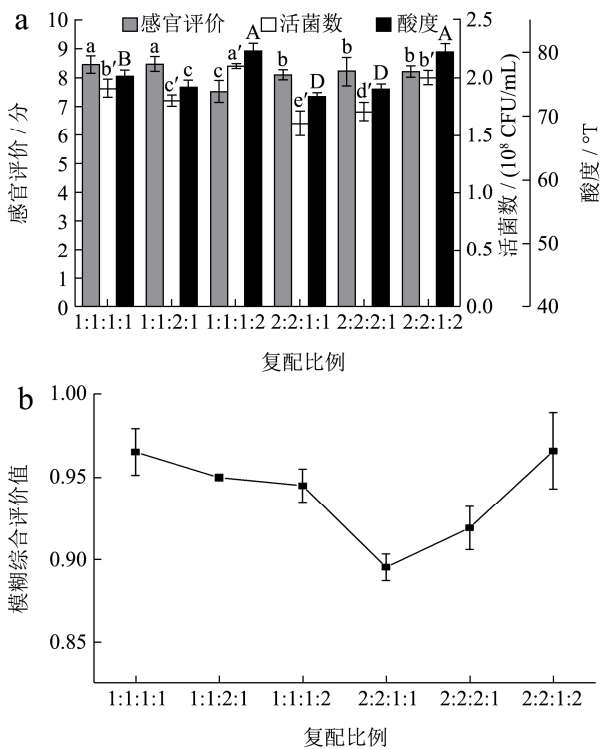


图1 菌种复配比对发酵火麻仁乳品质的影响

Fig.1 Effect of strain proportion on the quality of fermented hempseed milk

2.1.2 菌种接种量对发酵火麻仁乳的影响

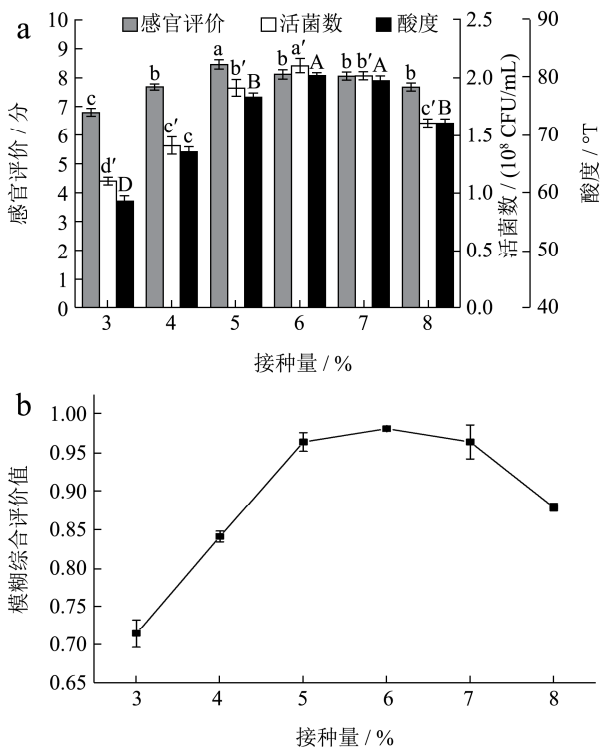


图2 接种量对发酵火麻仁乳品质的影响

Fig.2 Effect of inoculum concentration on the quality of fermented hempseed milk

图2a可以看出,保持菌种复配比例、发酵温度以

及发酵时间不变,随着接种量的增加,活菌数和呈上升趋势,感官评分呈先上升后下降趋势。由图2b可以看出,模糊综合评判值随着发酵时间的延长呈先上升后下降的趋势。接种量越大,发酵火麻仁乳中活菌数越多,发酵产酸能力越强,适量的乳酸能提升发酵火麻仁乳的感官品质。当接种量为6%时,模糊综合评判值最高,为0.94。当接种量超过6%时,由于乳酸菌的产酸过多,使得感官品质下降,从而模糊综合评判值也逐渐降低。综合考虑,选取5%、6%和7%作为响应面接种量的最佳取值范围。

2.1.3 发酵温度对发酵火麻仁乳的影响

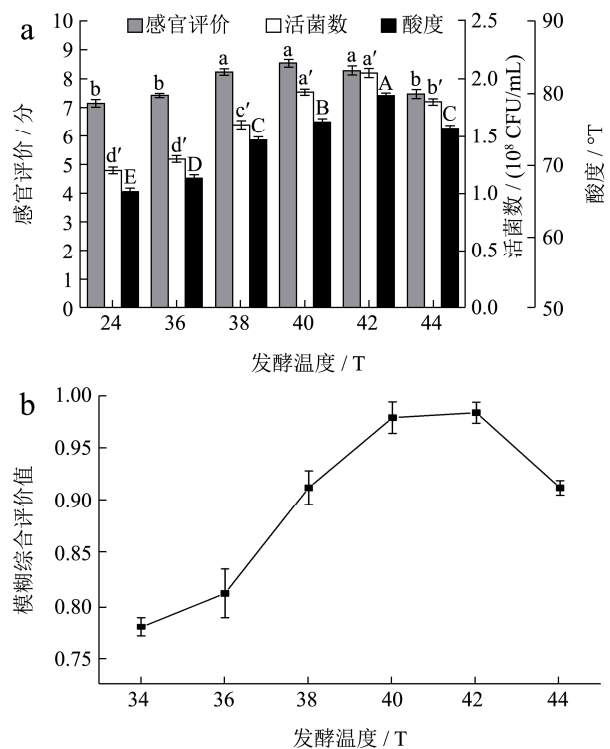


图3 发酵温度对发酵火麻仁乳品质的影响

Fig.3 Effect of fermentation temperature on the quality of fermented hempseed milk

在发酵过程中,发酵温度是发酵工艺中重要的环节,温度的高低将直接影响乳酸菌的生长和代谢,决定着发酵速度的快慢^[15],从而对发酵火麻仁乳的感官品质产生影响。

由图3a可以看出,保持菌种复配比例、接种量以及发酵时间不变,随着发酵温度的增加,感官评分和酸度呈先增大后减小的趋势,活菌数先上升后趋于平缓。由图3b可以看出,模糊综合评判值随着发酵时间的延长呈先上升后下降的趋势,当发酵温度为42℃时,模糊综合评判值最高,为0.967,随后下降。这是因为随着发酵温度适当的提高,有利于乳酸菌的生长和发酵产酸,但是当发酵温度超过乳酸菌的最佳生长温度,就会对其生长和发酵产酸起到抑制作用^[16]。因

此,当发酵温度超过 42 ℃时,乳酸菌生长缓慢,产酸能力下降,从而使模糊综合评判值降低。综合考虑,选择 38 ℃、40 ℃、42 ℃作为响应面发酵温度的最佳取值范围。

2.1.4 发酵时间对发酵火麻仁乳的影响

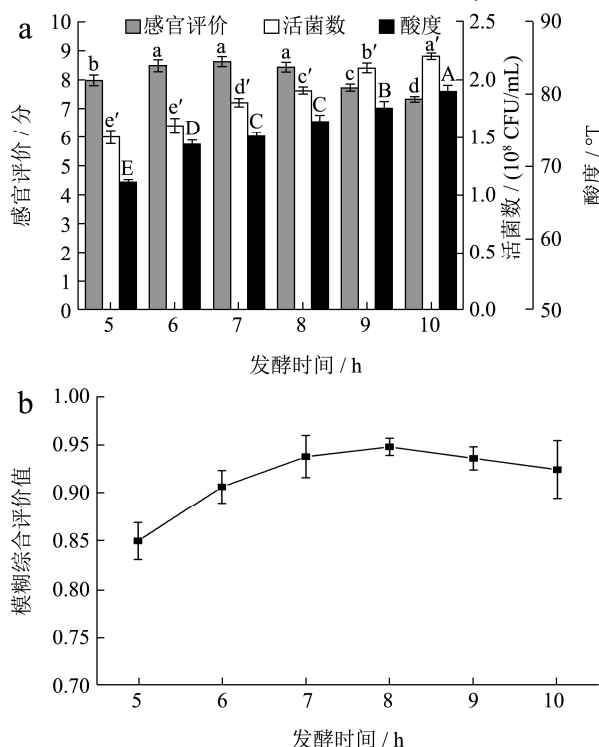


图4 发酵时间对发酵火麻仁乳品质的影响

Fig.4 Effect of fermentation time on the quality of fermented hempseed milk

由图 4a 可以看出,随着发酵时间的延长,活菌数及酸度不断上升,感官评分先上升后下降,当发酵时间在 6~7 h 时,感官评分较高。由图 4b 可以看出,模糊综合评判值随着发酵时间的延长呈先上升后下降的趋势,当发酵时间为 8 h 时,模糊综合评判值最高(0.943),随后下降。主要是因为发酵时间越长,一方面使得乳酸菌浓度越高,发酵产酸越多,导致发酵火麻仁乳的酸度过高;另一方面过长的发酵时间使得乳酸菌发酵过度,使得大量乳清析出,从而影响其感官品质。由图 4a 可以看出,当发酵时间超过 8 h 时,由于酸度过高以及乳清析出的原因,感官评分就开始下降,但是由于活菌数增加的原因,模糊综合评判值没有降低;当发酵时间超过 9 h 时,由于酸度过高导致感官评分严重降低,从而使模糊综合评判值降低。综合考虑,选取 7 h、8 h、9 h 作为响应面发酵时间最适取值范围。

2.2 发酵火麻仁乳工艺条件响应面优化

2.2.1 响应面结果

在单因素实验结果的基础上,以菌种复配比例(A)、接种量(B)、发酵温度(C)、发酵时间(D)为自变量,模糊综合评判值为响应值,对发酵火麻仁乳进行四因素三水平响应面优化,响应面实验结果如表 3 所示。

表 3 响应面实验设计及结果

Table 3 Design and results of response surface experiment

试验号	因素				模糊综合评判值
	A 复配比例	B 接种量	C 发酵温度	D 发酵时间	
1	-1	-1	0	0	0.891
2	0	-1	0	1	0.842
3	0	0	0	0	0.918
4	0	0	0	0	0.917
5	0	0	-1	0	0.912
6	0	-1	-1	0	0.852
7	0	0	1	1	0.823
8	0	0	-1	1	0.88
9	0	0	-1	-1	0.894
10	1	-1	0	0	0.903
11	1	1	0	0	0.881
12	0	1	0	-1	0.901
13	0	-1	0	-1	0.903
14	0	0	0	0	0.914
15	-1	0	0	1	0.891
16	1	0	0	-1	0.946
17	-1	0	0	-1	0.933
18	-1	1	0	0	0.897
19	0	0	0	0	0.914
20	1	0	1	0	0.886
21	-1	0	-1	0	0.905
22	0	1	0	1	0.837
23	0	1	-1	0	0.901
24	0	-1	1	0	0.892
25	-1	0	1	0	0.899
26	0	1	1	0	0.826
27	1	0	0	1	0.862
28	0	0	1	-1	0.926
29	0	0	0	0	0.917

2.2.2 回归模型建立及方差分析

通过 Design Expert 10 统计分析软件对模糊综合评判值进行回归分析,分析结果如表 4 所示。对各因素回归模拟后,得到回归方程为:

$$Y=0.91-2.333E-003A-5.121E-004B-8.647E-003C-0.033D-7.293E-003AB-4.784E-003AC-0.01AD-0.029B$$

$$C-7.5E-004BD-0.022CD+7.438E-003A^2-0.029B^2-0.02C^2-0.015D^2$$

F 值检验是反应回归模型的有效性,由表 4 可知,该模型 F 值为 260.22, $p<0.0001$, 表明实验所用二次模型是极显著的,在统计学上是有意义的;该模型的失拟项不显著 ($p>0.05$),表明模型合理,可以使用该数学模型推卸实验结果。方程决定系数 $R^2=0.9962$,校正系数 (Adj $R^2=0.9923$) 与预测决定系数 (Pred $R^2=0.9821$) 相差较小,变异系数 $C.V.\%=0.31<15\%$,信噪比 $Adeq\ Precision=63.95>4$,表明实际值与预测值之间的拟合程度较好,利用响应面优化发酵火麻仁乳发酵条件的方案可行。

由表 4 可知,模型中一次项接种量 (B)、发酵温度 (C)、发酵时间 (D) 对模糊综合评判值的影响极显著 ($p<0.01$),菌种复配比例 (A) 的影响显著 ($p<0.05$)。交互项菌种复配比例与接种量 (AB)、菌种复配比例与发酵温度 (AC)、菌种复配比例与发酵时间 (AD)、接种量与发酵温度 (BC)、发酵温度与发酵时间 (CD) 的影响极显著 ($p<0.01$),而接种量与发酵时间 (BD) 的影响不显著 ($p>0.05$)。二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 的影响均为极显著 ($p<0.01$)。此外,根据 F 值得大小可以判断,各因素对模糊综合评判值的影响顺序为:发酵时间>菌种复配比例>发酵温度>接种量。

表 4 回归模型及方差分析

Table 4 Analysis of variance of regression equation

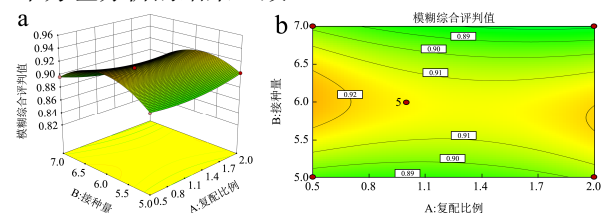
方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.027	14	1.936E-003	260.22	<0.0001	**
A	6.533E-005	1	6.533E-005	8.78	0.0103	*
B	2.765E-004	1	2.765E-004	37.16	<0.0001	**
C	7.884E-004	1	7.884E-004	105.95	<0.0001	**
D	0.011	1	0.011	1540.82	<0.0001	**
AB	2.285E-004	1	2.285E-004	30.71	<0.0001	**
AC	9.835E-005	1	9.835E-005	13.22	0.0027	**
AD	4.304E-004	1	4.304E-004	57.83	<0.0001	**
BC	3.306E-003	1	3.306E-003	444.30	<0.0001	**
BD	2.250E-006	1	2.250E-006	0.30	0.5911	
CD	1.936E-003	1	1.936E-003	260.16	<0.0001	**
A^2	2.674E-004	1	2.674E-004	35.94	<0.0001	**
B^2	5.518E-003	1	5.518E-003	741.52	<0.0001	**
C^2	2.671E-003	1	2.671E-003	358.91	<0.0001	**
D^2	1.468E-003	1	1.468E-003	197.22	<0.0001	**
残差	1.042E-004	14	7.442E-006			
失拟	9.018E-005	10	9.018E-006	2.58	0.1875	不显著
误差	1.400E-005	4	3.500E-006			
总和	0.027	28				

注: *, 在 0.05 水平上相关性显著; **, 在 0.01 水平上相关性显著; 6.533E-005 表示 6.533×10^{-5} , 以此类推。

2.2.3 响应面及等高线分析

为了更加直观的反映出菌种复配比例 (A)、接种量 (B)、发酵温度 (C) 以及发酵时间 (D) 四个因素之间交互作用对模糊综合评判值的影响,做出响应值 3D 曲面。交互作用的强弱可由等高线的形状反映出来,椭圆形表示交互作用显著,越接近圆形表示交互作用越不显著。图 5 所示为当固定任意三个因素,其余两个因素之间的交互作用对火麻仁发酵乳模糊综合评判值的影响。由图 5 可知,在两两因素的交互作用对模糊综合评判值的影响中,复配比例与接种量、

菌种复配比例与发酵温度、菌种复配比例与发酵时间、接种量与发酵温度、发酵温度与发酵时间的交互作用显著,而接种量与发酵时间的交互作用不显著,与表 4 中方差分析的结果一致。



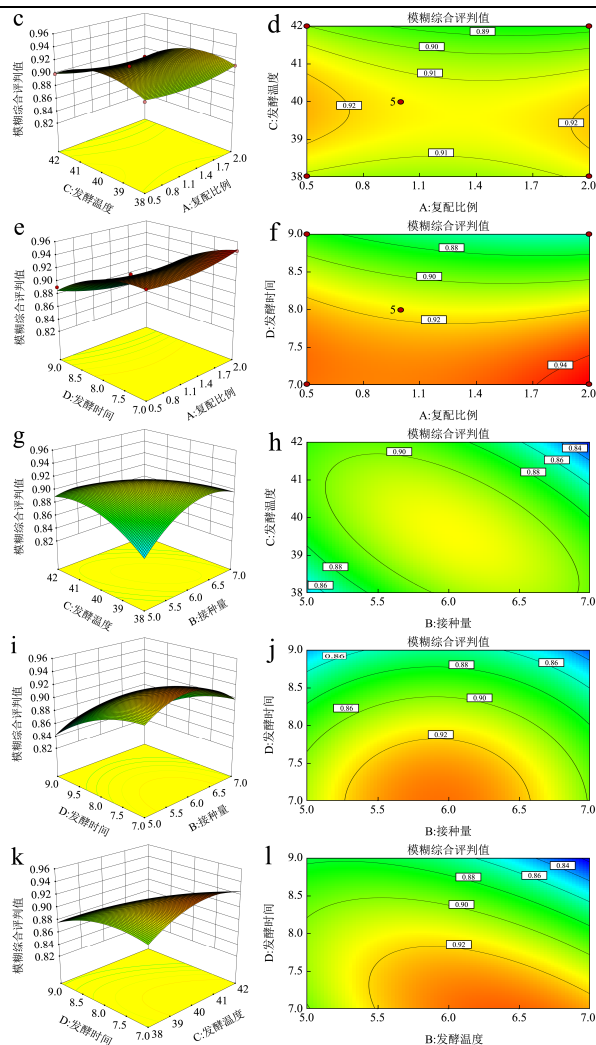


图5 两两因素对模糊综合评判值的交互作用及等高线图

Fig.5 Interaction diagram and contour map of two Factors on fuzzy comprehensive evaluation value

注：a、b：菌种复配比例与接种量；c、d：菌种复配比例与发酵温度；e、f：菌种复配比例与发酵时间；g、h：接种量与发酵温度；i、j：接种量与发酵时间；k、l：发酵温度与发酵时间。

2.2.4 响应面结果优化及验证性实验

根据 BBD-RSM 试验结果显示，发酵火麻仁乳的最佳发酵工艺条件参数为：菌种复配比例为保加利亚乳杆菌：嗜热链球菌：干酪乳杆菌：嗜酸链球菌

=2:2:1:1.78、接种量为 6.21%、发酵温度为 39.42 ℃、发酵时间为 7.12 h，在此模型下，模糊综合评判值为 0.935。为了检验响应面法优化发酵火麻仁乳发酵条件的可靠性，采用优化后的工艺参数进行 3 次重复性验证试验。在此条件下，测得模糊综合评判值为 0.927，与模型预测值相差不大，模糊综合评价法的相对误差为 0.86%，由此说明该模型是可行的。

2.3 火麻仁发酵乳营养成分分析

表 5 反应了火麻仁乳发酵前后的营养成分含量的变化，其中总酸、总糖、持水性、可溶性固形物、总酚以及总黄酮含量均呈现显著性变化 ($p < 0.05$)。由表 5 可知，持水性由发酵前的 19.54% 上升到了发酵后的 31.08%，陈玮等^[17]测定酸奶 TPA 质构时发现持水性的提高可能与乳酸菌发酵过程产生的胞外多糖和火麻仁乳液中乳清蛋白的变性有关；火麻仁乳发酵前后的总糖含量显著降低 ($p < 0.01$)，由初始发酵前 142.03 mg/mL 变为发酵后 69.29 mg/mL。发酵前火麻仁乳的总酸含量为 1.08 mg/mL，发酵后其总酸含量为 7.99 mg/mL，增加了 6.4 倍，这是因为在发酵的过程中乳酸菌利用糖经过 EMP 途径产生丙酮酸然后还原成乳酸^[18]，此外中间还产生大量的有机酸，包括柠檬酸、琥珀酸、酒石酸等^[19]。因此，发酵后火麻仁乳中的总酸含量显著提高，总糖含量显著降低。这也说明了在该发酵条件下，乳酸菌能够充分利用糖类产酸，具有良好发酵力。发酵后的火麻仁乳的总酚和总黄酮均呈显著性增加，分别增加了 31.77% 和 14.10%，与方芳等^[20]研究结果一致。火麻仁乳经乳酸菌发酵后，乳糖、蛋白质等大分子物质约有 20% 被分解为半乳糖、氨基酸等小分子物质，乳酸菌可进一步将火麻仁乳中分解的氨基酸转氨生成 α -酮酸，降解产生醛类、多酚类和羧酸等抗氧化活性物质，且乳酸菌自身的代谢产物如有机酸、胞外多糖等可能阻断了多酚类抗氧化活性物质与基质的结合，乳酸菌中的 α -半乳糖苷酶水解半乳糖使得游离酚的含量增加，导致总酚和黄酮含量提高，抗氧化活性提高。

表 5 发酵火麻仁乳营养成分

Table 5 Nutrition components of fermented hempseed milk

项目	总酸/(mg/mL)	总糖/(mg/mL)	持水性/%	可溶性固物/(g/100 g)	总酚/(mg GAE/100 mL)	总黄酮/(mg QE/100 mL)
发酵前	1.08±0.01	142.03±2.81	19.54±1.33	7.89±0.45	21.28±0.59	23.76±0.42
发酵后	7.99±0.34*	69.29±3.55**	31.08±3.14**	6.08±0.22*	28.04±0.82*	27.11±1.34*

注：*表示与发酵前比差异显著 ($p < 0.05$)，**表示与发酵前比差异极显著 ($p < 0.01$)。下表同。

2.4 火麻仁乳发酵前后抗氧化活性变化

2.4.1 DPPH 自由基清除能力

发酵前后火麻仁乳对 DPPH 自由基清除率如图 6 所示。由图 6 可以看出，DPPH 自由基清除率与样品浓度存在良好的剂量-效应关系。在一定的浓度范围

内,随着样品浓度的增加,对 DPPH 自由基的清除率呈上升趋势,然后趋于平缓,郭俊花等^[21]发酵槐米酸奶时,其 DPPH 自由基清除率最高可达达到 60.3%,与本实验浓度 40 mg/mL 发酵火麻仁乳 DPPH 自由基清除率相当。当样品浓度为 100 mg/mL 时,火麻仁乳和发酵火麻仁乳的 DPPH 自由基的清除率达到较高水平,分别为 89.34% 和 96.84%,当浓度继续提高时,对 DPPH 自由基清除率变化不明显。当浓度小于 25 mg/mL 时,发酵前后对 DPPH 自由基清除能力变化不大;当浓度为 30 mg/mL 时,发酵火麻仁乳的清除能力明显提高。

IC₅₀ 表示当自由基清除率为 50%,所需样品的浓度,IC₅₀ 值越小,则清除自由基能力越强。根据火麻仁乳、发酵火麻仁乳以及生育酚清除 DPPH 自由基曲线的线性回归方程分别计算出 IC₅₀,如表 6 所示,火麻仁乳、发酵火麻仁乳以及阳性对照生育酚对 DPPH 自由基清除活性的 IC₅₀ 值分别为:29.14 mg/mL、26.09 mg/mL 和 0.25 mg/mL。26.09 mg/mL 的发酵火麻仁乳对 DPPH 自由基清除能力与 0.25 mg/mL 的生育酚相同,因此原发酵火麻仁乳(0.992 g/mL)对 DPPH 自由基清除能力与 9.51mg/mL 的生育酚相同。

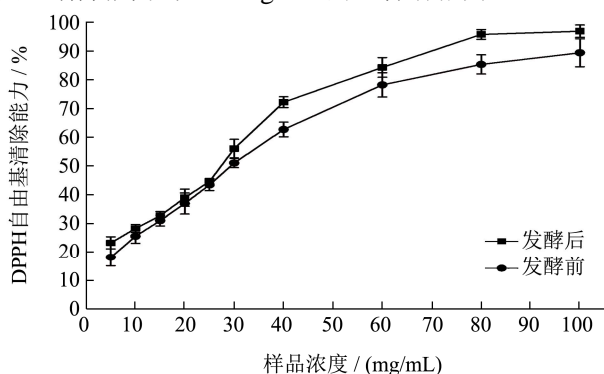


图 6 发酵火麻仁乳的 DPPH 自由基清除能力

Fig.6 DPPH radical scavenging ability of of fermented hempseed milk

2.4.2 ABTS 自由基清除能力

火麻仁乳和发酵火麻仁乳对 ABTS⁺自由基清除率如图 7 所示。由图 7 可以看出,随着样品浓度的增加,ABTS⁺自由基的清除能力先急剧上升;当浓度为 15 mg/mL 时,火麻仁乳和发酵火麻仁乳的 ABTS⁺自由基清除率分别为 83.06% 和 90.63%;当浓度继续增大,对 ABTS⁺自由基清除率变化不明显。当浓度小于 12.5 mg/mL 时,发酵前后对 ABTS⁺自由基清除能力变化不大;当浓度为 15 mg/mL 时,发酵火麻仁乳的清除能力明显提高 ($p < 0.05$)。李子叶等^[22]用嗜酸乳杆菌 *KLDS 1.0901* 对酸奶进行发酵显示其 ABTS⁺自由基清除能力只有 53.16%,可能与发酵原料及浓度不同有

关。Di 等^[23]研究显示 ABTS⁺自由基清除能力的提高可能是由于 ABTS⁺自由基与加入的乳酸菌作为抗氧化剂,避免了蛋白质与 ABTS⁺自由基之间相互结合,因此导致蛋白质被降解,抗氧化肽生成,增加了火麻仁乳的抗氧化能力。由表 6 可知,火麻仁乳、发酵火麻仁乳以及阳性对照生育酚对 ABTS⁺自由基清除活性的 IC₅₀ 值分别为:7.91 mg/mL、7.22 mg/mL 和 0.13 mg/mL,说明 7.22 mg/mL 的发酵火麻仁乳对 ABTS⁺自由基清除能力与 0.13 mg/mL 的生育酚相同,即原发酵火麻仁乳(0.992 g/mL)对 ABTS⁺自由基清除能力与 17.86 mg/mL 的生育酚相同。

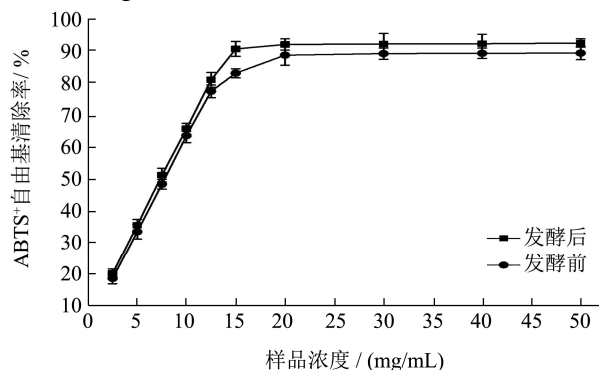


图 7 发酵火麻仁乳的 ABTS 自由基清除能力

Fig.7 ABTS⁺ scavenging ability of fermented hempseed milk

表 6 发酵火麻仁乳抗氧化活性

Table 6 Antioxidant activity of fermented hempseed milk

项目	DPPH 自由基清除率 / (IC ₅₀ , mg/mL)	ABTS ⁺ 自由基清除率 / (IC ₅₀ , mg/mL)
发酵前	29.14±0.22	7.91±0.20
发酵后	26.09±0.28*	7.22±0.13*
生育酚当量	0.25±0.03	0.13±0.01

3 结论

3.1 本实验在单因素的基础上,采用 Box-Behnken 响应面法优化火麻仁乳发酵工艺,得到发酵条件的回归模型为: $Y=0.91-2.333E-003A-5.121E-004B-8.647E-003C-0.033D-7.293E-003AB-4.784E-003AC-0.01AD-0.029BC-7.5E-004BD-0.022CD+7.438E-003A^2-0.029B^2-0.02C^2-0.015D^2$ 。最佳发酵条件为:菌种复配比例为保加利亚乳杆菌:嗜热链球菌:干酪乳杆菌:嗜酸链球菌=2:2:1:1.78、接种量为 6.21%、发酵温度为 39.42 °C、发酵时间为 7.12 h。在此条件下,发酵火麻仁乳的活菌数、滴定酸度以及感官评分分别为 1.9×10^8 CFU/mL、78 °T 和 8.74 分,模糊综合评判值为 0.927,与预测值 0.935 的相对误差仅为 0.86%,此时产品活菌数含量充足、酸度适宜、色香味俱佳。

3.2 发酵后火麻仁乳的总糖、总固形物含量与发酵前

相比含量显著降低 ($p<0.05$), 总酸、总酚和总黄酮含量分含量均显著提高 ($p<0.05$)。抗氧化实验表明, 当 DPPH 自由基清除率、ABTS⁺自由基清除率为 50% 时, 发酵火麻仁乳的浓度分别为 26.09 mg/mL、7.22±0.13 mg/mL, 与 0.25 mg/mL 和 0.13 mg/mL 生育酚相当, 抗氧化活性得到了显著提高 ($p<0.05$)。本文对发酵火麻仁乳的工艺进行探究, 可以制作出营养丰富、口感浓郁、抗氧化能力强的火麻仁发酵产品, 为火麻仁乳的加工利用和新型产品研发提供了理论依据。

参考文献

- [1] Zhou Y, Wang S, Lou H, et al. Chemical constituents of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed with potential anti-neuroinflammatory activity [J]. *Phytochemistry Letters*, 2018, 23(2): 57-61
- [2] 魏月媛,李理.火麻仁的功效及食用安全性研究进展[J].食品工业,2015,36(7):256-260
WEI Yue-yuan, LI Li. Research progress on efficacy and food safety of hemp kernels [J]. *Food Industry*, 2015, 36(7): 256-260
- [3] Hadi M K, Abolfazl B, Shahram H, et al. Isolation and molecular identification of *Lactobacillus* with probiotic potential from abomasums driven rennet [J]. *Food Chemistry*, 2019, 272: 709-714
- [4] Zheng Y, Fei Y, Yang Y, et al. A potential flavor culture: *Lactobacillus harbinensis* M1 improves the organoleptic quality of fermented soymilk by high production of 2,3-butanedione and acetoin [J]. *Food Microbiology*, 2020, 91: 103540
- [5] Halpern G M, Vruwink K G, Water J V D, et al. Influence of long-term yoghurt consumption in young adults [J]. *Int J Immunother*, 1991, 7(4): 205-210
- [6] Bartkiene E, Zokaityte E, Lele V, et al. Technology and characterisation of whole hemp seed beverages prepared from ultrasonicated and fermented whole seed paste [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2020, 55: 406-419
- [7] Yunyang Z, Kiran T, Jingyu F, et al. B-vitamin enriched fermented soymilk: a novel strategy for soy-based functional foods development [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2020, 105: 43-55
- [8] 魏月媛,李理.火麻仁油凝固型酸奶的品质研究[J].现代食品科技,2015,31(6):198-204
WEI Yue-yuan, LI Li. Research on the quality of the solidified hemp seed oil yoghurt [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2015, 31(6): 198-204
- [9] Singh K P, Mishra A, Mishra H N. Fuzzy analysis of sensory attributes of bread prepared from millet-based composite flours [J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2012, 48(2): 276-282
- [10] Joyce S, Madalitso C, Zhuo H, et al. Effect of fermentation on physicochemical and antinutritional factors of complementary foods from millet, sorghum, pumpkin and amaranth seed flours [J]. *International Food Research Journal*, 2017, 25(5): 1869-1879
- [11] 王中奎,王超,关法春.不同产地核桃坚果的综合性状评价[J].食品科学,2013,34(15):100-103
WANG Zhong-kui, WANG Chao, GUAN Fa-chun. Comprehensive character evaluation of walnut nuts from different habitats [J]. *Food Science*, 2013, 34(15): 100-103
- [12] Ma Y, Huang H. Characterisation and comparison of phenols, flavonoids and isoflavones of soymilk and their correlations with antioxidant activity [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2015, 49(10): 2290-2298
- [13] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay [J]. *Free Radic Biol Med*, 1999, 26(9-10): 1231-1237
- [14] 刘俊艳,王成花,梁真,等.模糊数学感官评价法优化塔格糖酸奶发酵工艺[J].中国酿造,2017,36(3):99-102
LIU Jun-yan, WANG Cheng-hua, LIANG Zhen, et al. Optimization of fermentation process of tugg sugar yogurt by fuzzy mathematical sensory evaluation [J]. *China Brewing*, 2017, 36(3): 99-102
- [15] 刘丽丽.发酵谷物胚乳饮料的开发及工艺过程[J].食品安全导刊,2019,6:135
LIU Li-li. Development and process of fermented grain endosperm beverage [J]. *Journal of Food Safety*, 2019, 6: 135
- [16] Benzie I F, Strain J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay [J]. *Analytical Biochemistry*, 1996, 239(1): 70-76
- [17] 陈玮,常忠义,高红亮,等.不同发酵剂生产的酸奶感官评定和 TPA 质构分析[J].中国酿造,2012,31(1):193-195
CHEN Wei, CHANG Zhong-yi, GAO Hong-liang, et al. Sensory evaluation and TPA texture analysis of yoghurt produced by different leaveners [J]. *China Brewing*, 2012, 31(1): 193-195

(下转第 193 页)