

DOI:10.14188/j.ajsh.2018.03.003

火龙果酵素在发酵过程中功能成分变化规律及其与抗氧化相关性

沙如意¹,王珍珍¹,陈小伟¹,楼坚¹,毛旻晨²,方晟³,王高坚¹,毛建卫^{1*}

(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. 杭州医学院,浙江 杭州 31005;
3. 绍兴文理学院元培学院,浙江 绍兴 312000)

摘要: 对火龙果酵素发酵487 d过程中总酸、有机酸、总多酚等功能成分的变化及其与抗氧化的相关性进行研究,其中抗氧化能力通过ABTS自由基清除能力和还原力来检测;此外,利用主成分分析法、因子分析法对不同发酵时间的火龙果酵素总酸含量、pH、总多酚含量、ABTS自由基清除能力和还原力5个评价指标进行分析。结果表明:随着发酵时间的延长,火龙果酵素发酵液中总酸、总多酚含量总体上呈逐步增加的趋势,发酵液的pH呈缓慢降低的趋势,从3.75降到3.40;利用高效液相色谱(HPLC)法检测有机酸,从火龙果原料和火龙果酵素发酵液中分别检测到9种和8种有机酸,原料中苹果酸的含量较多,发酵液中乳酸和醋酸的含量较多。与原料相比,酵素发酵液中新检测到了莽草酸;富马酸和抗坏血酸在原料中含量极少,酵素发酵液中则未检测到;火龙果经发酵后,检测到的8种有机酸的含量均有所增加。抗氧化分析结果表明:火龙果酵素发酵过程中ABTS自由基清除能力、还原力总体上呈逐步增加趋势;火龙果酵素发酵过程中总多酚含量、总酸含量、莽草酸和醋酸与ABTS自由基清除能力之间呈中度相关,总多酚含量还原力之间呈中度相关。主成分分析和因子分析结果显示:从检测指标中提取出2个因子,代表了抗氧化因子和环境因子;发酵至359 d时,综合评价指标达到最高值且趋于稳定。

关键词: 火龙果酵素;有机酸;高效液相色谱(HPLC);抗氧化

中图分类号: TS 255.44

文献标识码: A

文章编号: 2096-3491(2018)03-0208-10

Correlation between functional composition and antioxidant capacity during the fermentation of pitaya jiaosu

SHA Ruyi¹, WANG Zhenzhen¹, CHEN Xiaowei¹, LOU Jian¹, MAO Yangchen², FANG Sheng³,
WANG Gaojian¹, MAO Jianwei^{1*}

(1. School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science & Technology; 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, Zhejiang, China;
2. Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053, Zhejiang, China;
3. Shaoxing University Yuanpei College, Shaoxing 312000, Zhejiang, China)

Abstract: The correlations between total acid content (TAC), organic acids content, total polyphenol content (TPC) and antioxidant capacity were studied during the pitaya fermentation for 487 days. Two antioxidant activity assays, 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS⁺·) free radical scavenging activity and reducing power

收稿日期: 2017-11-30 修回日期: 2018-03-06

作者简介: 沙如意(1982-),男,副教授,博士,研究方向为:农业生物资源生化制造。E-mail: kevinsha_0204@163.com

*通讯联系人 E-mail: zjhzmjw@163.com

基金项目: 浙江省重点研发计划项目(2017C02009);浙江省科技计划项目(2016C37078);浙江省大学生科技创新活动计划(新苗人才计划)(2017R415024);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);中国博士后科学基金(2018M632475)

引用格式: Sha R Y, Wang Z Z, Chen X W, et al. Correlation between functional composition and antioxidant capacity during the fermentation of pitaya jiaosu [J]. Biotic Resources, 2018, 40(3): 208-217.

沙如意,王珍珍,陈小伟,等. 火龙果酵素在发酵过程中功能成分变化规律及其与抗氧化相关性[J]. 生物资源, 2018, 40(3): 208-217.

er were employed for reference measurements. Besides, principal component analysis and factor analysis were also carried out to evaluate the effect of 5 indicators for total acid content (TAC), total polyphenol content (TPC), pH, ABTS free radical scavenging activity and reducing power. The results showed that TAC and TPC were gradually increased during the fermentation process. The pH value of pitaya jiaosu decreased slowly from 3.75 to 3.40. There were 9 kinds of organic acids in pitaya and 8 kinds of organic acids in the fermentation of pitaya jiaosu with HPLC analysis. The contents of malic acid in pitaya and lactic acid, acetic acid in pitaya jiaosu were the highest. Compared to pitaya, pitaya jiaosu contained shikimic acid but no fumaric acid and ascorbic acid which were rare in pitaya. In the process of fermentation, the content of 8 kinds of organic acids increased. ABTS free radical scavenging activity and reducing power were gradually increased. TPC, TAC, the content of shikimic acid and acetic acid were moderately correlated with ABTS free radical scavenging ability. TPC also showed moderately correlation with reducing power. Then two principal components of 5 indicators were obtained through principal component analysis and factor analysis, which represented antioxidant capacity and environmental factor. The comprehensive evaluation index for pitaya jiaosu was highest after 359 days and then changed slowly.

Key words: pitaya jiaosu; organic acid; high-performance liquid chromatography method (HPLC); antioxidation

0 引言

食用植物酵素(edible plant source jiaosu)是以一种或多种新鲜蔬菜、水果和谷豆类、海洋本草类、食药两用本草类、菌菇类等食材为原料,加(或不加)糖类物质,在较低温度下,经多种有益菌通过较长时间发酵而生产的功能性微生物发酵产品,拥有丰富的代谢产物功能成分、植物本身营养成分和益生菌本身功能成分等,特别是富有小分子功能成分,研究表明该类产品具有抗衰老、抗菌消炎、净化血液、增强机体免疫能力及解毒抗癌等多种保健功能^[1~5]。

以果蔬等为原料制备的食用植物酵素中含有苹果酸、柠檬酸、酒石酸等有机酸,这些有机酸是食用植物酵素产品的主要风味物质,影响食用植物酵素产品的口感、风味和质量。有机酸以游离态或者酸式盐的形式存在于果蔬中,具有软化血管、促进消化吸收、改善食欲等功能^[6]。研究表明:在发酵过程中,适当的酸度不仅能起到抑菌的作用,还能加强维生素C、花青素、花色苷等活性成分的稳定性^[6]。有研究用高效液相色谱法从葡萄酵素中分离到酒石酸、乙酸、柠檬酸等有机酸^[7],从树莓酵素中分离到酒石酸、乙酸和柠檬酸,同时检测到了丙酮酸、莽草酸和富马酸^[2]。而目前对火龙果酵素的研究报道甚少,仅有的几篇论文主要研究火龙果酵素产品的抗氧化能力及酶活^[13]、花青素含量测定^[14]方面,有机酸的种类及含量的研究未见报道,因此,有必要对火龙果酵素发酵过程中有机酸的变化进行跟踪研究。随着医学和自由基生物化学研究的日趋深入,发现自由基可诱发生物大分子损伤,导致人体组织器官衰老^[8],多酚类物质可利用酚羟基提供

氢,直接与活性氧自由基结合,通过阻断自由基氧化的链式反应或通过产生自由基相关酶的相互作用,络合诱导氧化的过渡金属离子,有效清除体内过剩自由基,具有较强的抗氧化功能^[9~11]。火龙果中富含原花青素、原儿茶酸、香草酸等多酚类物质^[12],分析火龙果酵素发酵过程中总多酚含量变化及其与抗氧化活性相关性有利于进一步了解火龙果酵素的抗氧化机制。

本文通过跟踪检测火龙果酵素发酵过程中总酸、有机酸、总多酚等含量与pH值的变化及抗氧化活性的变化,对其相关性进行分析,并利用主成分分析法建立火龙果酵素的综合评价指标,以期为火龙果酵素的发酵机制和抗氧化功能的研究提供基础研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

火龙果采自浙江省嘉兴市桐乡殷家漾红心火龙果园,糖液、酵素菌液由浙江省农产品化学与生物加工技术重点实验室提供。

草酸、富马酸、马来酸、苹果酸、柠檬酸(均为标准品)购买于国家食品药品检测中心;酒石酸(色谱纯)购买于Sigma-Aldrich公司;抗坏血酸、莽草酸、没食子酸、醋酸、乳酸、磷酸二氢钾、没食子酸标品(均为色谱纯),ABTS、三氯乙酸、铁氰化钾、三氯化铁(均为分析纯),均购买于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;甲醇(色谱纯)购买于美国天地有限公司;磷酸(色谱纯)、福林酚(分析纯)购买于上海长哲生物科技有限公司;过硫酸钾(分析纯)购买于西陇化工股份有限公司。

1.2 仪器设备

PHS-3C型精密酸度计购自杭州齐威仪器有限公司;XW-80A型微型漩涡混合仪购自上海沪西分析仪器厂;PTX-FA210型电子天平购自福州华志科学仪器有限公司;UV-5500PC型紫外分光光度计购自上海市元析仪器有限公司;Allegra X-12R型冷冻离心机购自美国贝克曼库尔特有限公司;Waters e2695高效液相色谱购自美国waters公司。

1.3 方法

1.3.1 火龙果酵素的制备

摘取无腐烂的新鲜火龙果,清洗,干燥脱去表面水分,火龙果与糖液质量比3:4,加入适量酵素菌液,混匀,密封,25℃恒温发酵,适当时间进行搅拌、观测。每隔一段时间取样,样品经10 000 r/min离心10 min后取上清液用于测定。

1.3.2 发酵过程中总酸与pH变化

发酵过程中总酸含量变化根据GB/T 12456-2008食品中总酸^[15]的测定方法进行检测,利用电位滴定法测定发酵过程中的pH变化规律。

1.3.3 有机酸种类及含量分析

样品预处理:取适量1.3.1中发酵液,用0.01 mol/L磷酸二氢钾溶液(用磷酸调至pH=2.7)稀释5倍备用;火龙果原料与水按质量比1:1混合,打浆后,在10 000 r/min环境下高速离心取上清液备用。将上述处理好的样品过0.22 μm的微孔滤膜后用于有机酸分析。

混合标准品配制:配制含苹果酸、草酸、莽草酸、抗坏血酸、乳酸、醋酸、酒石酸、马来酸、柠檬酸、琥珀酸、富马酸、没食子酸等12种标准品的混合溶液,使其质量浓度分别为0.1、0.1、0.01、0.1、1、1、0.1、0.01、1、1、0.01、0.01 mg/mL。

色谱条件^[4]:Agilent TC C₁₈柱(250 mm×4.6 mm i.d., 5 μm);流动相(A:甲醇,B:磷酸二氢钾)用磷酸调pH至2.7;流动相比比例为A:B=2:98(V:V),流速:1 mL/min,柱温:20℃,进样量10 μL。

1.3.4 发酵过程中总多酚含量变化

参照GB/T 31740.2-2015^[16]茶多酚的检测方法,以没食子酸为标品,绘制标准曲线。

1.3.5 发酵过程中抗氧化能力变化

① ABTS自由基清除能力

参照文献^[17]的方法,称取38.41 mg ABTS和6.62 mg过硫酸钾,用pH 7.4浓度为5 mmol/L的PBS定容至10 mL,室温下黑暗放置反应12~16 h,使用前用上述PBS缓冲液稀释,使其在波长734 nm

下吸光度为0.70±0.02。取10 μL样品,加PBS缓冲溶液至300 μL,加入5 mL上述稀释液,混匀,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。

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

式中: A_0 ——空白对照液的吸光度;

A_1 ——样品测定管的吸光度;

A_2 ——样品本底管的吸光度。

按照公式(1)计算ABTS自由基清除能力。

② 还原力

取70 μL样品,加0.2 mol/L(pH 6.6)的磷酸缓冲液至2.5 mL,与2.5 mL的1%铁氰化钾(m/V)混合均匀后,50℃下反应30 min,加入10%三氯乙酸(m/V)2.5 mL,混合均匀,静置10 min,取2.5 mL上清液,与2.5 mL去离子水和0.5 mL 0.1%三氯化铁(m/V)充分混合,以去离子水为参比溶液,在波长700 nm下测定吸光值。吸光度的数值越高,说明其还原力越强^[18]。

1.3.6 数据处理和分析

每组实验均重复三次,结果形式为(平均值±标准差),并利用SPSS 16.0进行相关性分析和主成分分析。

2 结果与分析

2.1 发酵过程中总酸与pH变化

火龙果酵素发酵过程中总酸及pH的变化分别见图1和图2。由图可知,火龙果酵素发酵过程中总酸含量呈先显著增加再缓慢增加的趋势,pH呈缓慢降低的趋势。经487 d的发酵,发酵液中总酸含量从0.067 mol/L增加至0.133 mol/L,增加了0.99倍;pH从发酵初期的3.75降低到3.40。发酵前40 d,总酸含量增幅明显,可能与原料中有机酸的大量溶出有关;发酵40 d到100 d,总酸含量显著减少,可能与能利用有机酸的微生物大量繁殖有关,发酵100 d后总酸含量呈缓慢增加的趋势,可能与发酵过程中酵母菌、乳酸菌等菌种代谢生成苹果酸、柠檬酸等酸性物质有关。pH的缓慢降低可能与发酵过程中溶出或代谢产生的酸性物质,如苹果酸、柠檬酸等含量的增加有关。

2.2 发酵过程中有机酸种类及含量变化

利用液相色谱检测火龙果原料和火龙果酵素中的有机酸,分别如图3(a)和3(b)所示。从图3(a)中可以看出,从火龙果原料中检测到9种有机酸:草

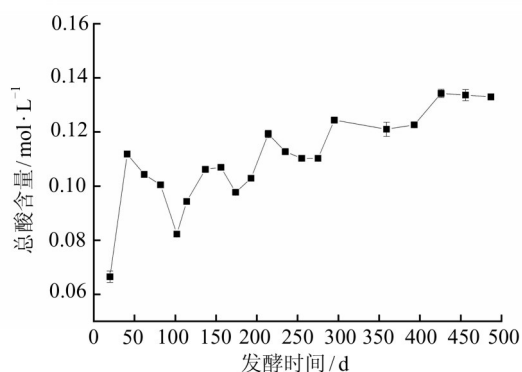


图1 火龙果酵素发酵过程中总酸含量变化

Fig. 1 Changes of total acid content in the fermentation of pitaya jiaosu

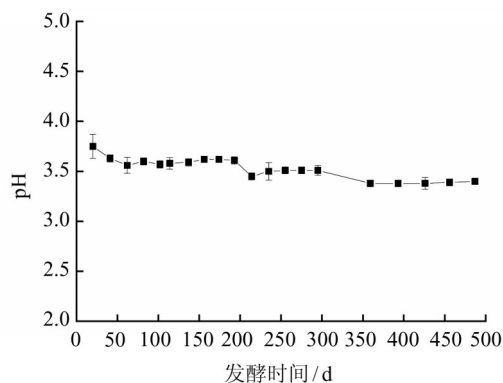


图2 火龙果酵素发酵过程中pH变化

Fig. 2 Changes of pH in the fermentation of pitaya jiaosu

酸、酒石酸、苹果酸、抗坏血酸(V_C)、乳酸、醋酸、柠檬酸、富马酸和琥珀酸,与文献报道中有机酸的种类基本一致^[19]。火龙果原料中各种有机酸含量由高到低依次为:苹果酸>醋酸>柠檬酸>琥珀酸>草酸>乳酸>酒石酸> V_C >富马酸,其中苹果酸的

含量最高。

发酵487 d的火龙果酵素有机酸色谱图见图3(b),由图可知,从火龙果酵素中检测到8种有机酸:草酸、酒石酸、苹果酸、莽草酸、乳酸、醋酸、柠檬酸和琥珀酸。

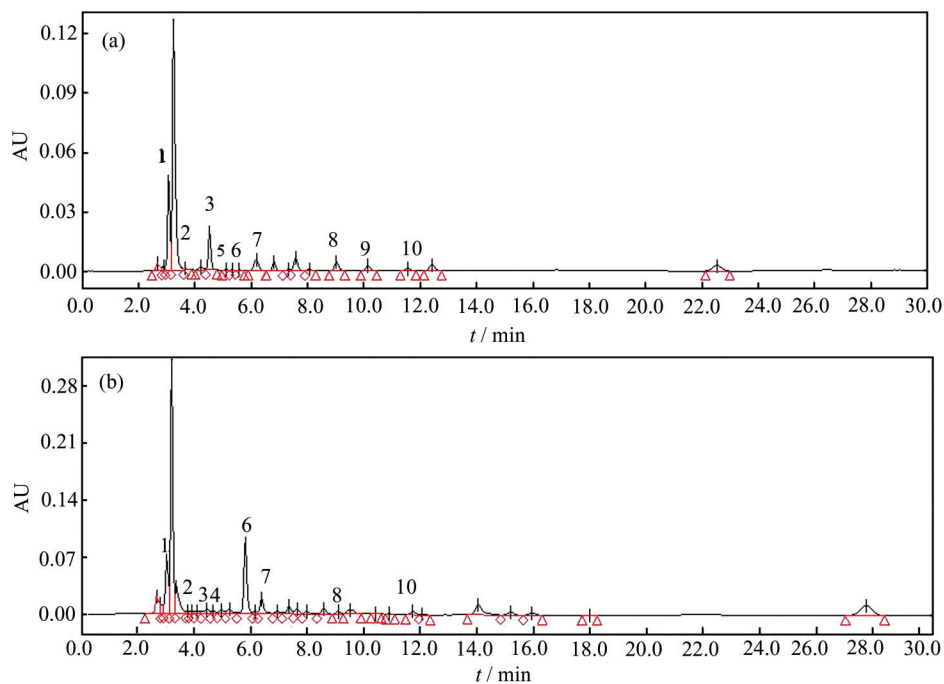


图3 火龙果样品有机酸色谱图

Fig. 3 Organic acid chromatogram of pitaya samples

注:(a)火龙果原料有机酸色谱图;(b)火龙果酵素发酵487 d有机酸色谱图

1.草酸 2.L-酒石酸 3.L-苹果酸 4.莽草酸 5.抗坏血酸 6.乳酸 7.醋酸 8.柠檬酸 9.富马酸 10.琥珀酸

Note: (a)organic acid chromatogram of raw material of pitaya;(b)organic acid chromatogram of the fermentation for 487 days of pitaya

1.oxalic acid 2.L-tartaric acid 3.L-malic acid 4.shikimic acid 5.ascorbic acid 6.lactic acid 7.acetic acid 8.citric acid 9.fumaric acid 10. succinic acid

火龙果酵素发酵过程中有机酸含量的变化见图4,由图4可知,随着发酵时间的增加,火龙果酵素发酵过程中,8种有机酸的含量均有所增加,各种有机酸的含量由高到低依次为:乳酸>醋酸>琥珀酸>柠檬酸>酒石酸>草酸>苹果酸>莽草酸。乳酸、醋酸的含量增加明显。发酵前40 d乳酸的含量变化明显,从发酵初期的5.21 mg/mL增加到7.89 mg/mL,增加了51.44%;从第40 d开始,乳酸的含量变化缓慢。醋酸含量在发酵初期变化不明显,发酵193~235 d阶段时,醋酸含量显著增加,从1.41 mg/mL增加到2.87 mg/mL,增加了103.55%,变化显著;发酵中期,随着发酵时间的延长,酵素微环境中氧含量逐步下降,醋酸菌代谢作用增强,这可能是导致醋酸含量增加的原因;发酵235 d后,醋酸的含量变化缓慢。经过487 d的发酵,火龙果酵素中乳酸和醋酸的含量分别增加了49.17%和81.70%。此外,与原料相比,火龙果酵素在发酵过程中,发酵液中新检测到莽草酸,而富马酸和抗坏血酸未检测到,莽草酸和富马酸的变化可能与发酵过程中微生物的莽草酸途径、三羧酸循环等代谢路径有关。

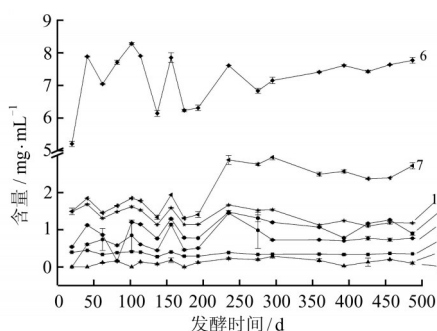


图4 火龙果酵素发酵过程中有机酸变化

Fig. 4 Changes of organic acid in the fermentation of pitaya jiaosu

注:1.草酸 2.L-酒石酸 3.L-苹果酸 4.莽草酸 6.乳酸 7.醋酸 8.柠檬酸 10.琥珀酸

Note: 1.oxalic acid 2.L-tartaric acid 3.L-malic acid 4.shikimic acid 6.lactic acid 7.acetic acid 8.citric acid 10.succinic acid

2.3 发酵过程中总多酚含量变化

以没食子酸为标准物质得到总酚的标准曲线, $y=0.0097x+0.019$, 相关系数 $R^2=0.9996$, 其中: y 为吸光度, x 为没食子酸等价物($\mu\text{g/mL}$), 计算总多酚含量。火龙果酵素发酵过程中总多酚含量变化见图5, 从中可以看出随着发酵时间的延长, 火龙果酵素液总多酚含量呈缓慢增加的趋势, 发酵至487 d时, 从最初321.65 $\mu\text{g/mL}$ 增加至433.33 $\mu\text{g/mL}$, 增加了34.72%。

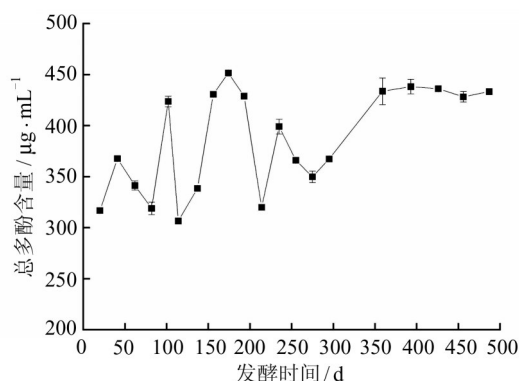


图5 火龙果酵素发酵过程中总多酚含量变化

Fig. 5 Changes of total polyphenol content in the fermentation of pitaya jiaosu

2.4 发酵过程中抗氧化能力变化

2.4.1 发酵过程中ABTS自由基清除能力变化

ABTS自由基用于亲水性和亲脂性物质抗氧化能力测定, ABTS经氧化后生成稳定的蓝绿色阳离子自由基 $\text{ABTS}^{+\cdot}$, 能溶于水相或酸性乙醇介质中, 其抗氧化机制是氢原子转移^[20]。有研究发现, 生物体内的氧化还原反应主要是氢转移机制^[21]。

火龙果酵素发酵过程中对ABTS自由基清除能力的变化见图6, 从图中可以看出随着发酵时间的延长, 火龙果酵素发酵液对ABTS自由基清除能力呈缓慢增加的趋势, 经487 d的发酵, 清除能力从发酵初期的37.85%增加至53.90%, 增加了42.4%。

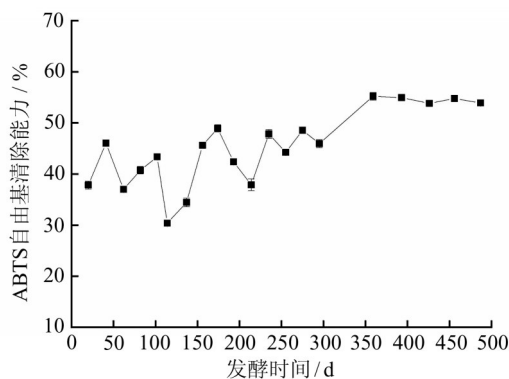


图6 火龙果酵素发酵过程中ABTS自由基清除能力变化

Fig. 6 Changes of ABTS radical scavenging ability in the fermentation of pitaya jiaosu

2.4.2 发酵过程中还原力变化

在还原力测定中, 依据样品中抗氧化物还原力的大小, 反应后溶液颜色呈现不同程度的绿色或蓝色。火龙果酵素发酵过程中还原力的变化见图7, 从中可以看出, 火龙果酵素发酵过程中还原力变化

较慢,发酵初期吸光度为0.291,经487 d发酵后吸光度为0.356,说明还原力增加了22.34%。

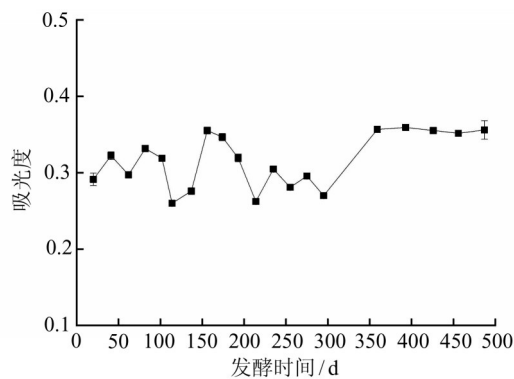


图7 火龙果酵素发酵过程中还原力变化
Fig. 7 Changes of reducing power in the fermentation of pitaya jiaosu

2.5 主成分分析法评价火龙果酵素

2.5.1 抗氧化能力与总多酚含量、总酸含量、pH值、有机酸含量之间的相关性

火龙果酵素发酵液具有显著的ABTS自由基清除能力和较高的还原力,说明火龙果酵素具有较强的抗氧化活性。火龙果酵素发酵液中富含有机酸、多酚、总酸等功能成分,在对火龙果酵素营养价值和品质评价时,需要综合考虑多种因素及与抗氧化功能特性的影响,单独采用某一指标评价时可能会得到片面的结果。因此,本文综合研究了火龙果酵素中总多酚含量、总酸含量、pH、各有机酸含量等评价指标与抗氧化性能(ABTS自由基清除能力和还原力)之间的相互关系,采用SPSS软件将抗氧化的指标和总多酚含量、总酸含量、pH值、各有机酸含量等评价指标关联起来进行系统地评价,以期对火龙果酵素的品质控制和营养评价提供基础数据。为了克服各个不同量纲变量的影响,首先对各变量进行标准化处理,经标准化处理后,对各指标之间的相关性进行分析,结果如表1所示。

在火龙果酵素发酵过程中,抗氧化性能与有机酸含量的相关性结果表明:莽草酸和醋酸与ABTS自由基清除能力呈中度正相关,苹果酸与ABTS自由基清除能力呈低度正相关;莽草酸、乳酸与还原力呈低度正相关。草酸、苹果酸与还原力呈负相关,琥珀酸与ABTS自由基清除能力和还原力呈负相关。火龙果酵素中有机酸具有一定的抗氧化活性(表1)。

2.5.2 主成分分析的特征值

从表1可以看出,两种抗氧化指标与总多酚含

表1 经标准化处理后的抗氧化能力与总多酚含量、总酸含量、pH值、各有机酸含量之间的相关性

Tab. 1 Correlation of antioxidant ability and total polyphenol content, total acid content and pH value after normalization

	ZpH	ZTPC	ZAC	ZABTS	ZRP
ZpH	1.000	-0.436*	-0.856***	-0.670**	-0.358*
ZTPC		1.000	0.408*	0.798***	0.810***
ZAC			1.000	0.646**	0.351*
ZABTS				1.000	0.783***
ZRP				/	1.000
ZOXA				0.36	-0.1
ZTAA				0.265	0.066
ZMAA				0.407*	-0.078
ZSHA				0.712**	0.437**
ZLAA				0.289	0.332*
ZACA				0.659**	0.189
ZCIA				0.184	-0.08
ZSUA				-0.330*	-0.422*

注: ZpH、ZTPC、ZAC、ZABTS、ZRP、ZOXA、ZTAA、ZMAA、ZSHA、ZLAA、ZACA、ZCIA、ZSUA 分别代表标准化后的 pH 值、总多酚含量、总酸含量、ABTS 自由基清除能力、还原力、草酸、酒石酸、苹果酸、莽草酸、乳酸、醋酸、柠檬酸、琥珀酸; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$
Note: ZpH、ZTPC、ZAC、ZABTS、ZRP、ZOXA、ZTAA、ZMAA、ZSHA、ZLAA、ZACA、ZCIA、ZSUA represent pH value, total polyphenols content, total acid content, ABTS radical scavenging ability, reducing power, oxalic acid, L-tartaric acid, L-malic acid, shikimic acid, lactic acid, acetic acid, citric acid and succinic acid; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

量、总酸含量、pH值之间呈显著相关,故用SPSS软件对两种抗氧化指标与总多酚含量、总酸含量、pH值进行主成分分析,相关系数的特征值见表2。

从表2可知,以特征值大于1为纳入标准,前2个主成分特征值均大于1,两者累积的方差贡献率达到原始信息的90.799%,说明采用前2个主成分可以代替大部分的信息,从第3个开始,特征值明显

表2 主成分的特征值、贡献率和累计贡献率
Tab. 2 The eigenvalue, contribution rate and the cumulative contribution rate of principal components

主成分	特征值	贡献率/%	累积贡献率/%
1	3.464	69.279	69.279
2	1.076	21.520	90.799
3	0.189	3.788	94.587
4	0.145	2.901	97.488
5	0.126	2.512	100.000

小于1,可以确定主成分的个数为2,达到统计分析的要求,因此利用2个新变量来代替原来的5个变量,由载荷矩阵系数除以主成分特征值的开方,得到主成分的得分系数,前2个主成分与原来的5个变量之间的线性关系分别为:

$$PC_1 = -0.425 \cdot Z_{pH} + 0.450 \cdot Z_{TPC} + 0.417 \cdot Z_{AC} + 0.508 \cdot Z_{ABTS} + 0.431 \cdot Z_{RP}$$
$$PC_2 = 0.294 \cdot Z_{pH} + 0.230 \cdot Z_{TPC} - 0.305 \cdot Z_{AC} + 0.060 \cdot Z_{ABTS} + 0.274 \cdot Z_{RP}$$

2.5.3 评价指标的主成分载荷图

测量指标的载荷图见图8,从中可以看出第一主成分主要与总酚含量、ABTS清除率和还原力相关,且具有明显的正相关性,总多酚、还原力、与ABTS自由基清除能力之间的位置较近,说明这三个指标之间有很好的相关性,这与Pearson相关性分析的结果一致。第二主成分主要与pH和总酸相关,且具有相似的载荷。

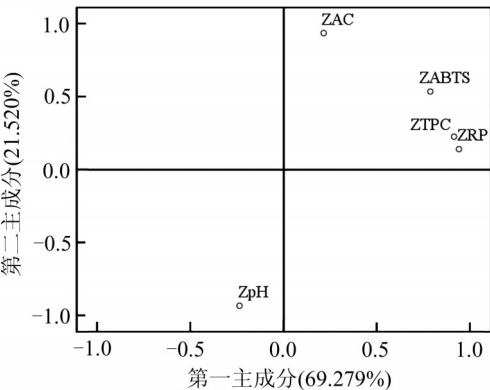


图8 主成分分析的载荷图
Fig. 8 Loading plots

2.5.4 因子分析

用标准化处理后的ZTPC、ZAC、ZpH、ZABTS和ZRP进行因子分析,旋转后因子载荷矩阵见表3,对有关因子提取与旋转的方法为:使用主成分法提取因子,使用Varimax最大方差法旋转,经3次迭代收敛。旋转后的因子与原始变量的相关矩阵可以看出,第一个因子与三个变量之间的相关性较高,这三个变量是ABTS自由基清除能力、还原力和总多酚的含量,而第二个因子与pH、总酸的相关性更高,因子分析结果与主成分分析结果一致,其中第一个因子主要概括了火龙果酵素发酵液中抗氧化成分及抗氧化能力情况,可以命名为抗氧化因子,第二个因子是火龙果酵素发酵的环境,可以命名为环境因子。

表3 旋转后因子载荷矩阵
Tab. 3 rotated component matrix

影响因子	成分	
	1	2
RP	0.939	0.141
TPC	0.913	0.227
ABTS	0.786	0.536
AC	0.214	0.936
pH	-0.238	-0.932

2.5.5 主成分分析法构建抗氧化能力综合评价指标

每个主成分所对应的特征值占所提取主成分总的特征值之和的比例作为权重,线性加权求和得到综合评价指标(comprehensive evaluation index, GEI),公式见(2)

$$\text{综合评价指标(GEI)} = \frac{3.464PC_1 + 1.076PC_2}{3.464 + 1.076} \quad (2)$$

以主成分分析法构建的抗氧化能力综合评价指标对火龙果酵素发酵过程中不同时间点的样品进行评价、排序,结果见表4和图9,发酵至359 d以后,综合评价指标达到最高值且趋于稳定,说明在

表4 火龙果酵素发酵过程中综合评价指标变化

发酵时间/d	综合评价指标(GEI)
20	-2.386
41	-0.234
62	-1.161
82	-0.899
102	-0.256
114	-2.413
137	-1.609
156	0.567
174	0.685
193	-0.064
214	-1.191
235	0.244
255	-0.543
275	-0.268
295	-0.357
359	1.923
393	1.997
426	2.042
456	1.957
487	1.965

此时间范围内火龙果酵素品质达优。

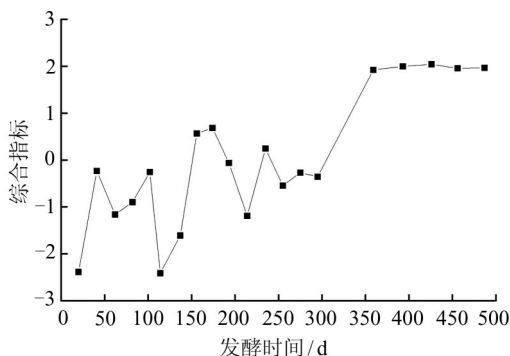


图9 综合评价指标

Fig. 9 Comprehensive evaluation index

3 结论与讨论

火龙果酵素能够清除体内多余自由基,具有抗氧化、抗衰老、增强免疫力、预防各种疾病的功能,可能与其内含有的抗氧化物质有关^[13]。本文首次对火龙果酵素在发酵过程中总酸、有机酸、总多酚等功能成分与抗氧化能力的变化进行了跟踪检测,在此基础上进行相关性和主成分分析等,有望进一步完善火龙果酵素的抗氧化功能研究。结果表明:

①发酵过程中,火龙果酵素发酵液中总酸含量整体上呈增加的趋势,pH呈缓慢降低的趋势,从3.75降到3.40。从火龙果原料中检测到9种有机酸:草酸、酒石酸、苹果酸、抗坏血酸、乳酸、醋酸、柠檬酸、富马酸和琥珀酸,各种有机酸含量由高到低依次为:苹果酸>醋酸>柠檬酸>琥珀酸>草酸>乳酸>酒石酸>V_C>富马酸;从火龙果酵素中检测到8种有机酸,与原料相比,发酵液中新检测到了莽草酸,原料中富马酸和抗坏血酸的含量较低,发酵液中没有检测到;各种有机酸的含量由高到低依次为:乳酸>醋酸>琥珀酸>柠檬酸>酒石酸>草酸>苹果酸>莽草酸。发酵过程中,各种有机酸的含量都有所增加,其中乳酸和醋酸的含量显著增加。柠檬酸、琥珀酸、苹果酸和富马酸是三羧酸循环的中间物质,莽草酸是生物合成芳香氨基酸的重要中间产物^[24],发酵过程中乳酸、醋酸含量的显著增加可能主要与乳酸菌、醋酸菌等微生物的代谢有关。

②随着发酵时间的延长,发酵液中总多酚含量总体上呈逐步增加的趋势,有研究表明:红肉火龙果中含有槲皮素-3-O-芸香糖苷、山奈酚-3-O-芸香糖苷、原儿茶酸、香草酸、咖啡酸、丁香酸、香豆酸等酚类物质^[12]。发酵过程中总多酚含量的增加,或有

以下几个方面的原因:(1)原料中可溶性多酚逐渐溶解;(2)发酵液中酵母菌等微生物代谢作用^[22,23];(3)单体酚,如没食子酸、原儿茶素、绿原酸等的生成。

③火龙果酵素发酵过程中ABTS自由基清除能力、还原力总体上呈逐步增加趋势,相关性分析结果显示:火龙果酵素发酵过程中总多酚含量与ABTS自由基清除能力和还原力之间呈中度相关,总酸含量与ABTS自由基清除能力之间呈中度相关,与还原力之间呈低度相关。有机酸含量的相关性结果表明:火龙果酵素发酵过程中的莽草酸和醋酸与ABTS自由基清除能力呈中度正相关。有研究通过RP-HPLC-ABTS⁺·联用技术,结果表明酚类物质具有ABTS自由基清除能力^[25]。还有研究者以50种水果、蔬菜、饮料为研究对象,对其抗氧化性进行研究,结果表明,ABTS自由基清除能力与总多酚含量呈高度正相关性^[26]。还有研究表明,多酚分子中活性酚羟基具有较强的还原力,即多酚类物质具有抗氧化活性^[27],与本文的研究结果一致。且有研究表明:莽草酸具有一定的抗氧化性^[28]。

④利用主成分分析法、因子分析对不同发酵时间的火龙果酵素抗氧化力和各功能性成分进行评价,主成分分析与聚类分析结果均显示:可以从总多酚含量、总酸含量、pH值、ABTS自由基清除能力、还原力5个因素中提取出2个主成分/因子,第一主成分/因子主要与总多酚含量、ABTS清除率和还原力相关,且具有明显的正相关性,可以命名为抗氧化因子;第二主成分/因子主要与pH和总酸相关,可以命名为环境因子。

⑤利用主成分分析法对不同发酵时间的火龙果酵素抗氧化力和各功能性成分进行综合评价,发酵至359 d以后,综合评价指标达到最高值且趋于稳定,说明在此时间范围内火龙果酵素的品质达优。

参考文献

- [1] Mao J W, Wu Y F, Fang S, *et al.* Research progress on microbial jiaosu [J]. Bulletin of Fermentation Science and Technology, 2010, 39(3): 42-44.
毛建卫, 吴元锋, 方晟等. 微生物酵素研究进展[J]. 发酵科技通讯, 2010, 39(3): 42-44.
- [2] Jiang Z L. Study on mechanism, metabolic process and bioactivities of microbial natural-ferments during fermentation [D]. Ningbo: Zhejiang Sci-Tech University, 2012: 1-6.

- 蒋增良.天然微生物酵素发酵机理、代谢过程及生物活性研究[D].宁波:浙江理工大学,2012:1-6.
- [3] Wang Z Z, Sha R Y, Cai C G, *et al.* Screening, identification and properties of osmophilic yeast from raspberry jiaosu during natural fermentation process [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(8): 178-182, 188.
- 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.
- [4] Wang Z Z. Studies on preparation, active component analysis and antioxidant activity of functional edible plant jiaosu [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Science and Technology, 2017.
- 王珍珍.功能性食用植物酵素制备、活性物分析及抗氧化性研究[D].杭州:浙江科技学院,2017.
- [5] China Biotech Fermentation Industry Association. T/CBFIA 08003-2017. Edible plant jiaosu [S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.
- 中国生物发酵产业协会. T/CBFIA 08003-2017.食用植物酵素[S].北京:中国标准出版社,2017.
- [6] Bian Y F. Processing technology of preserved fruit [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2001, 78-83.
- 边用服.新编果脯凉果加工技术大全[M].北京:中国农业大学出版社,2001,78-83.
- [7] Jiang Z L, Liu Y Q, Wang Z Z, *et al.* Analysis of organic acids and *in vitro* antioxidant activity of grape-ferment [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(5): 255-262.
- 蒋增良,刘晓庆,王珍珍,等.葡萄酵素有机酸分析及其体外抗氧化性能[J].中国食品学报,2017,17(5):255-262.
- [8] Han X, Tao S, Lou H. Dietary polyphenols and their biological significance [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2007, 8(9): 950-988.
- [9] Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses [J]. Food Chemistry, 2006, 9(1): 191-203.
- [10] Goli A H, Barzegar M, Sahari M A. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts [J]. Food Chemistry, 2005, 92: 521-525.
- [11] Han X Z, Shen T, Lou H X. Dietary polyphenols and their biological significance [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2007, 8: 950-988.
- [12] Tenore G C, Novellino E, Basile A. Nutraceutical potential and antioxidant benefits of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) extracts [J]. Journal of Functional Foods, 2012, 4(1): 129-136.
- [13] Dong Y M, He C F, Wang L, *et al.* Study on the bioactivity of pitaya enzyme [J]. Food Science and technology, 2009, 34(3): 192-196.
- 董银卯,何聪芬,王领,等.火龙果酵素生物活性的初步研究[J].食品科技,2009,34(3):192-196.
- [14] Zhu M L, Guo H M, Sun H T, *et al.* Establishment of determination method of proanthocyanidins content in pitaya enzyme [J]. China Brewing, 2017, 36(4): 184-187.
- 朱曼利,郭会明,孙宏韬,等.火龙果酵素中原花青素含量测定方法的建立[J].中国酿造,2017,36(4):184-187.
- [15] General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. GB/T 12456-2008, Determination of total acid in foods [S]. Beijing: Standards Press of China, 2015.
- 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. GB/T 12456-2008,食品中总酸的测定[S].北京:中国标准出版社,2015.
- [16] General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. GB/T 12456-2008, Tea products-Part 2: Tea polyphenols [S]. Beijing: Standards Press of China, 2015.
- 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. GB/T 31740.2-2015,茶制品第2部分:茶多酚[S].北京:中国标准出版社,2015.
- [17] Nenadis N, Wang L F, Tsimidou M, *et al.* Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS(*+) assay [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2004, 52(15): 4669-4674.
- [18] 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): 4083-4089.
- [19] Jiang N H, Fan C, Liu W, *et al.* A study on simultaneous determination of 7 kinds of organic acids and Vc in dragon fruit by RP-HPLC [J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2015, 37(5): 798-803.
- 蒋依辉,凡超,刘伟,等.运用RP-HPLC同时测定火龙果中7种有机酸和VC含量的方法研究[J].江西农业大学学报,2015,37(5):798-803.
- [20] Nenadis N, Wang L F, Tsimidou M, *et al.* Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the

- ABTS(*+) assay [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2004, 52(15): 4669-4674.
- [21] Ou B, Huang D, Hampsch-Woodill M, *et al.* Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2002, 50(11): 3122-3128.
- [22] Min F Q. Extraction and screening of tannic acid degradation strains and corresponding metabolites [D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2014.
闵凡芹. 五倍子单宁酸的提取、降解菌株筛选及代谢产物研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2014.
- [23] Kanpiengjai A, Chui-Chai N, Chaikaew S, *et al.* Distribution of tannin tolerant yeasts isolated from miang, a traditional fermented tea leaf (*Camellia sinensis*, var. *assamica*) in northern Thailand [J]. International Journal of Food Microbiology, 2016.
- [24] Dong J E, Zhang K J, Liang Z S. Plant secondary metabolism and regulation [M]. Xianyang: Press of Northwest A&F University, 2009, 8-13.
董娟娥, 张康健, 梁宗锁. 植物次生代谢与调控[M]. 咸阳: 西北农林科技大学出版社, 2009, 8-13.
- [25] Werf R V D, Marcic C, Khalil A, *et al.* ABTS radical scavenging capacity in green and roasted coffee extracts [J]. LWT - Food Science and Technology, 2014, 58(1): 77-85.
- [26] Floegel A, Kim D O, Chung S J, *et al.* Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods [J]. Journal of Food Composition & Analysis, 2011, 24(7): 1043-1048.
- [27] Fouda F, El-Baz F K, Ali F F, *et al.* HPLC evaluation of phenolic profile, and antioxidant activity of different extracts of *Jatropha curcas* leaves [J]. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review & Research, 2014, 29(1): 203-210.
- [28] Wang Q, Shen H M, Luo J H, *et al.* The study of extraction process and antioxidant activity of shikimic acid in star anise [J]. Guangzhou Chemical Industry, 2014, 42(20): 70-75.
王强, 沈华明, 罗杰辉, 等. 八角茴香中莽草酸提取工艺及抗氧化性研究[J]. 广州化工, 2014, 42(20): 70-75.
-