

王思溥, 朱丹, 牛广财, 等. 黑果腺肋花楸酵素自然发酵过程中主要成分与抗氧化活性变化 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(15): 93-100. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022090192

WANG Sipu, ZHU Dan, NIU Guangcai, et al. Changes of Main Components and Antioxidant Activity of Black Chokeberry Jiaosu in Natural Fermentation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(15): 93-100. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022090192

· 研究与探讨 ·

黑果腺肋花楸酵素自然发酵过程中 主要成分与抗氧化活性变化

王思溥^{1,2}, 朱丹^{3,*}, 牛广财^{1,2,*}, 宁志雪^{1,2}, 朱立斌^{1,2}, 魏文毅^{1,2}, 徐瑞航^{1,2}

(1.黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江大庆 163319;

2.黑龙江省农产品加工工程技术研究中心, 黑龙江大庆 163319;

3.黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院, 黑龙江大庆 163319)

摘要:为探究黑果腺肋花楸酵素自然发酵过程中主要成分与抗氧化活性的变化规律, 采取 28 °C 密闭条件下自然发酵 90 d, 检测发酵液中还原糖、可溶性固形物 (TSS)、酒精度、总酸、总多酚、总黄酮、花色苷和 SOD 等理化指标和活性物质, 以 DPPH 自由基、ABTS⁺自由基、羟自由基清除能力以及总抗氧化能力和总还原力等指标来综合评价其体外抗氧化活性, 并进行主要成分与抗氧化活性的皮尔逊相关性分析。结果表明: 黑果腺肋花楸酵素自然发酵过程中, 其还原糖、TSS、总酸、花色苷含量总体呈持续下降趋势, 酒精度持续升高后逐渐趋于稳定, 总多酚、总黄酮含量和 SOD 酶活力呈先升高后降低趋势, 其中总多酚、总黄酮和 SOD 酶活力最高值分别达到 4.99 mg/mL、269.68 mg/L 和 5151.80 U/mL。发酵后酵素的抗氧化活性指标均呈峰型变化, 较未发酵样品显著升高 ($P<0.05$), 其对 DPPH 自由基、ABTS⁺自由基、羟自由基清除能力以及总抗氧化能力和总还原力最大值分别为 65.78%、85.06%、94.22%、750.48 U/mL 和 1.014; 相关性分析表明, 酒精度、总多酚、总黄酮、SOD 与其抗氧化活性总体呈显著正相关 ($P<0.05$), 还原糖、TSS、总酸与抗氧化活性总体呈显著负相关 ($P<0.05$)。本实验结果为改善黑果腺肋花楸酵素产品品质及工业化生产提供理论依据。

关键词:黑果腺肋花楸, 酵素, 自然发酵, 抗氧化活性, 相关性分析

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)15-0093-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022090192



本文网刊:

Changes of Main Components and Antioxidant Activity of Black Chokeberry Jiaosu in Natural Fermentation

WANG Sipu^{1,2}, ZHU Dan^{3,*}, NIU Guangcai^{1,2,*}, NING Zhixue^{1,2}, ZHU Libin^{1,2}, WEI Wenyi^{1,2}, XU Ruihang^{1,2}

(1. Food College, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China;

2. Agri-Food Processing and Engineering Technology Research Center of Heilongjiang Province, Daqing 163319, China;

3. College of Life Science and Biotechnology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract: In order to explore the change rules of main components and antioxidant activity in the natural fermentation process of black chokeberry Jiaosu, the natural fermentation was carried out under 28 °C airtight container for 90 days. During the fermentation process, the physicochemical indexes and bioactive substances including reducing sugar, total soluble solids (TSS), alcohol, total acid, total polyphenols, total flavonoids, anthocyanins and superoxide dismutase (SOD)

收稿日期: 2022-09-19

基金项目: 黑龙江省“双一流”新一轮建设学科协同创新成果建设项目 (LJXCG2022-109); 黑龙江省高校首批“新工科”研究与实践项目 (黑教高函 [2018]681 号); 黑龙江八一农垦大学研究生创新科研项目 (YJSCX2021-Y80); 黑龙江八一农垦大学“三横三纵”平台支持计划项目 (PTJH202103)。

作者简介: 王思溥 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: 2726139391@qq.com。

* **通信作者:** 朱丹 (1972-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 植物资源开发利用, Email: 623016878@qq.com。

牛广财 (1971-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 农产品贮藏与加工, E-mail: gcnui@126.com。

in fermentation broth were estimated. DPPH free radical, ABTS⁺ free radical, hydroxyl free radical scavenging capacity, total antioxidant capacity and total reducing power were used to comprehensively evaluate its antioxidant activity *in vitro*, Pearson's correlation analysis was also performed to further clarify the correlation between main components and antioxidant activity. The results showed that the contents of reducing sugar, TSS, total acids and anthocyanins in black chokeberry Jiaosu showed a continuous decreasing trend during natural fermentation, the alcoholic content continued to increase and gradually stabilized, while the contents of total polyphenols, total flavonoids and SOD enzyme activity increased first and then decreased. The highest values of total polyphenols, total flavonoids and SOD enzyme activity were 4.99 mg/mL, 269.68 mg/L and 5151.80 U/mL, respectively. The antioxidant activity of the Jiaosu after fermentation showed a peak-shaped change, which was significantly higher than that of unfermented sample ($P < 0.05$). The maximum values of its scavenging rate for DPPH radical, ABTS⁺ radical and hydroxyl radical, total antioxidant capacity and total reducing power were 65.78%, 85.06%, 94.22%, 750.48 U/mL and 1.014, respectively. The results of correlation analysis showed that alcohol content, total polyphenols, total flavonoids and SOD were significantly positively correlated with antioxidant activity ($P < 0.05$), while reducing sugars, TSS and total acids were significantly negatively correlated with antioxidant activity ($P < 0.05$). The results of this experiment provide a theoretical basis for improving the product quality and industrial production of black chokeberry Jiaosu.

Key words: black chokeberry; Jiaosu; natural fermentation; antioxidant activity; correlation analysis

黑果腺肋花楸(*Aronia melanocarpa* Elliott)为蔷薇科腺肋花楸属灌木浆果,富含多酚、黄酮、花青素和多种有机酸、氨基酸及维生素等主要营养成分,具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎抑菌等生理活性功能^[1-4],同时,能够提高人体免疫力,调节血糖血脂,改善肝功能以及防治心血管疾病^[5-8]。作为含有丰富生物活性物质的浆果之一,黑果腺肋花楸以其非凡的抗氧化能力著名,其抗氧化指数(Oxygen radical absorbance capacity, ORAC)高达 160.2 $\mu\text{mol TE/g}$,高于接骨木果、蓝莓、黑加仑、越橘、草莓、蔓越莓、葡萄等多种富含多酚的浆果^[9]。Kardum 等^[10]研究发现,25 位健康女性连续 3 个月每日 3 次摄入 100 mL 黑果腺肋花楸果汁,红细胞中超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GPx)两种抗氧化酶活力均显著增加($P < 0.05$),说明其在保护细胞氧化损伤方面具有一定作用,具有良好的抗氧化活性。国家卫健委于 2018 年将黑果腺肋花楸果正式列为新食品原料,为其进行精深加工提供了基础和保障。

酵素作为一种功能性发酵产品,含有多种酶、维生素、总多酚和花色苷等生物活性成分。食用酵素的发酵方式分为两种:接菌发酵利用不同的微生物作为起始发酵剂,其发酵过程虽易于调控,但容易出现风味单一及同质化现象;自然发酵不添加任何特殊发酵剂,仅依靠原料中的优势菌群发酵,微生物群落组成不断变化,生成不同代谢产物,经自然发酵后的酵素具有良好的抗氧化性能^[11]。自然发酵过程中,酵素中参与发酵的微生物会发生代谢转化,使生化指标及抗氧化活性产生明显变化,其抗氧化活性与营养物质组成及含量的变化密不可分,薛淑龙等^[12]报道的竹叶酵素在自然发酵过程中总酚含量持续上升,与 DPPH 自由基、ABTS⁺自由基清除率和还原力均呈极显著正相关($P < 0.01$)。目前,关于黑果腺肋花楸自然发酵酵素及其在发酵过程中主要成分变化和抗氧

化机制的研究鲜有报道,明确自然发酵中主要营养成分和抗氧化活性的动态变化有利于黑果腺肋花楸酵素发酵过程的调控。因此,本研究以黑果腺肋花楸作为原料,探究黑果腺肋花楸酵素在 28 $^{\circ}\text{C}$ 条件下恒温自然发酵 90 d 过程中还原糖、可溶性固形物、酒精度、总酸、总多酚、总黄酮、花色苷和 SOD 酶活力等主要成分与 DPPH 自由基、ABTS⁺自由基和羟自由基清除能力等抗氧化活性的变化规律以及两者之间的相关性,为黑果腺肋花楸酵素自然发酵工艺优化以及提高其产品品质提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

黑果腺肋花楸果(2021 年 10 月 5 日采收于吉林延边朝鲜族自治州图们市水南黑果农场,成熟度良好,可溶性固形物含量 8%) 延边黑果科技发展有限公司;白砂糖 内蒙古荷丰农业股份有限公司;Pectinex XXL 果胶酶(酶活 10000 U/mL)、Celluclast 1.5 L 纤维素酶(酶活 10000 U/mL) 诺维信生物技术有限公司;福林酚、DPPH、ABTS 上海麦克林生化科技有限公司;总抗氧化能力(O-TAC)试剂盒、SOD 试剂盒 南京建成生物工程研究所;芦丁、没食子酸、葡萄糖 标准品,上海纯优生物科技有限公司;亚硝酸钠、氯化铁、无水碳酸钠、氢氧化钠、硫酸亚铁、氯化钠、冰乙酸、过氧化氢、水杨酸、硝酸铝、磷酸、铁氰化钾、无水醋酸钠、无水乙醇、高硫酸钾、甲醛、盐酸、无水甲醇、三氯乙酸等 分析纯,辽宁泉瑞试剂有限公司。

L530R 离心机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;JA2003 电子分析天平 南北科仪(北京)科技有限公司;SP909S 打浆机 浙江绍兴苏泊尔家居用品有限公司;LB90A 手持糖度计 广州铭睿电子科技有限公司;LRH-70F 恒温培养箱 青岛明博环保科技有限公司;HH-6 恒温水浴锅 常州荣华仪器制造有限公司;UV765PC 紫外分光光度计 渡扬精密

仪器(上海)有限公司;pHS-3E型 pH计 上海习仁科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 黑果腺肋花楸自然发酵酵素的制备

1.2.1.1 工艺流程 黑果果实→挑选→破碎→酶解→调整糖度→自然发酵→恒温培养→黑果酵素

操作要点:

a. 破碎:按照黑果腺肋花楸果与水 1:1 的比例(m:V)添加纯净水,用打浆机打碎并测定其可溶性固形物含量。

b. 酶解:纤维素酶与果胶酶的比例为 1:2^[13],添加量为纤维素酶 3.2 mL/kg,果胶酶 6.4 mL/kg;45 °C 恒温水浴酶解 3.5 h,酶解后 pH 为 3.57±0.02。

c. 调整糖度:按照黑果腺肋花楸果与白砂糖 4:1(m:m)左右的比例添加白砂糖,调整糖度至 190 g/L。

d. 自然发酵:调整糖度后的黑果腺肋花楸果浆分装于已灭菌的锥形瓶中,瓶口使用带有发酵栓的胶塞密封,置于 28 °C 条件下恒温自然发酵 90 d^[14]。

e. 分析测定:每隔 10 d 取样一次,将黑果腺肋花楸发酵液混合均匀,常温下 4000 r/min 离心 15 min 后,对上清液进行主要成分与抗氧化活性检测,重复 3 次。

1.2.2 黑果腺肋花楸酵素自然发酵过程中主要成分的测定

1.2.2.1 还原糖含量测定 采用 3,5-二硝基水杨酸比色法(DNS 显色法)^[15],葡萄糖标准曲线方程为: $y=0.6577x-0.0145$, $R^2=0.9975$ 。

1.2.2.2 可溶性固形物(TSS)含量的测定 采用手持糖度计法。

1.2.2.3 酒精度测定 参考 GB 5009.225-2016 食品安全国家标准 酒中乙醇浓度的测定的方法,采用密度瓶法测定并计算发酵液酒精度。

1.2.2.4 总酸含量测定 参考 GB 12456-2021 食品安全国家标准 食品中总酸的测定的方法,结果以苹果酸计。

1.2.2.5 总多酚含量测定 采用福林酚法进行测定^[16],没食子酸标准曲线方程为: $y=0.0237x-0.0068$, $R^2=0.9999$ 。

1.2.2.6 总黄酮含量测定 采用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠比色法进行测定^[17],芦丁标准曲线方程为: $y=10.427x+0.0186$, $R^2=0.9978$ 。

1.2.2.7 花色苷含量测定 参考张荣菲等^[18]的方法,采用 pH 示差法测定花色苷含量。

1.2.2.8 SOD 酶活力测定 参考樊秋元等^[19]的试剂盒方法进行测定。

1.2.3 黑果腺肋花楸酵素自然发酵过程中抗氧化活性的测定

1.2.3.1 DPPH 自由基清除能力的测定 参考张琪

等^[20]的方法配制浓度为 0.5 mmol/mL 的 DPPH 溶液,将 0.5 mL DPPH 溶液与 2 mL 稀释后的发酵液混合均匀,37 °C 避光放置 20 min,用无水甲醇作空白,在 517 nm 测定吸光度 A_1 。将 2 mL 无水甲醇与 0.5 mL DPPH 溶液混合均匀后,于 37 °C 避光放置 20 min,测定其吸光度 A_0 。将 0.5 mL 无水甲醇与 2 mL 稀释后的发酵液混合均匀后,于 37 °C 避光放置 20 min,测定其吸光度 A_2 ,按公式(1)计算。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100$$

式(1)

式中: A_1 为加发酵液后 DPPH 溶液的吸光度; A_2 为加发酵液,不加 DPPH 溶液的吸光度; A_0 为加无水甲醇后 DPPH 溶液的吸光度。

1.2.3.2 ABTS⁺自由基清除能力的测定 参照宋艺君等^[21]的方法配制 ABTS 溶液,取 20 μ L 发酵液,加入 2 mL ABTS 反应液,混匀静置 10 min,测定其在 734 nm 处的吸光度,以不加入样品的 ABTS 反应液为空白对照,按公式(2)计算。

$$\text{ABTS}^+ \text{ 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1}{A_0}\right) \times 100$$

式(2)

式中: A_1 为发酵液的吸光度, A_0 为空白对照的吸光度。

1.2.3.3 羟自由基清除能力的测定 参考李昱鼎^[22]的方法稍有改动。在 2 mL 稀释后的发酵液中分别加入 6 mmol/L FeSO_4 溶液和 6 mmol/L H_2O_2 溶液各 2 mL,摇匀后静置 10 min,再加入 2 mL 6 mmol/L 水杨酸溶液,摇匀后 37 °C 保温 1 h,于 510 nm 处测定吸光值 A_1 。以蒸馏水代替发酵液,测定吸光值 A_0 。以蒸馏水代替水杨酸溶液,测定吸光值 A_2 ,按公式(3)计算。

$$\text{羟自由基清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100$$

式(3)

式中: A_0 为空白的吸光度, A_1 为发酵液的吸光度, A_2 为发酵液在体系中的吸光度。

1.2.3.4 总还原力的测定 参照姚沛琳等^[23]的方法稍有改动。在 1 mL 发酵液中分别加入 0.2 mol/L pH6.6 磷酸盐缓冲液和 1% 铁氰化钾溶液各 2.5 mL,50 °C 水浴 20 min,加入 2.5 mL 10% 三氯乙酸溶液,于 4000 r/min 离心 10 min,取 2.5 mL 上清液,加入 2.5 mL 蒸馏水和 0.2 mL 0.1% 的三氯化铁溶液,静置 10 min,在 700 nm 处测定吸光度。

1.2.3.5 总抗氧化能力的测定 参考樊秋元等^[19]的试剂盒方法进行测定。

1.3 数据处理

每组实验平行测定 3 次,结果均采用平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 Origin 2021 软件进行绘图,SPSS 26.0 软件进行皮尔逊相关性及显著性分析,显著性检验在 0.05 水平上进行。

2 结果与分析

2.1 黑果腺肋花楸酵素自然发酵过程中主要成分的变化

2.1.1 还原糖含量、TSS 和酒精度的变化 图 1 为黑果腺肋花楸自然发酵过程中还原糖含量、TSS 和酒精度的变化。发酵液中的可溶性固形物主要是糖类物质,糖类是微生物利用最广泛的碳源和能源物质,在发酵中被酵母等微生物消耗分解产生酒精和二氧化碳等物质。因此,发酵过程中还原糖和 TSS 的变化规律基本一致,两个指标随着发酵的进行总体呈下降趋势,尤其在前 20 d 下降非常明显,20 d 后趋于平稳,发酵 90 d 时还原糖和 TSS 从初始的 186.59 g/L 和 19.0% 分别降至 4.18 g/L 和 7.5%,而酒精度的变化规律正好与前两者相反。酒精度在前 20 d 上升较快,在发酵 30 d 时酒精度已经达到最高值 10.1%vol,之后缓慢下降逐渐趋于稳定,这可能是由于发酵前期酵母菌等产酒精微生物的菌数较高,消耗还原糖速度较快并产生大量酒精,随着发酵的进行,还原糖含量的大幅度减少,中后期可利用的能源物质较少,使酒精度维持稳定,也可能由于产生的乙醇浓度较高,抑制了酵母等微生物的活动^[24],后期酒精度略有下降可能与酒精和发酵液中的酸类物质作用产生酯类物质有关^[25]。

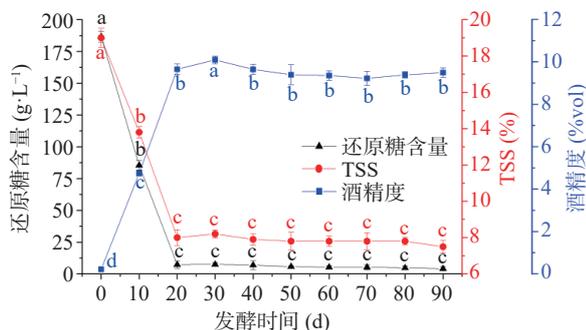


图 1 黑果腺肋花楸自然发酵过程中还原糖含量、TSS 和酒精度变化

Fig.1 Changes of reducing sugar content, TSS and alcohol content during natural fermentation of black chokeberry
注:同一条曲线上不同字母表示差异显著($P<0.05$);图 2~图 8 同。

2.1.2 总酸含量的变化 图 2 为黑果腺肋花楸自然发酵过程中总酸含量的变化规律。总酸含量总体呈波动下降的趋势,从初始的 5.87 g/L 降低至 3.94 g/L,可能是由于发酵液中的有机酸被氧化分解形成脂类,被微生物作为碳源消耗,导致其含量下降,但总酸含量在发酵第 30 d 和第 70 d 时略有上升,出现波动的原因可能是由于有机酸的种类和含量在发酵不同阶段发生了变化,也可能是微生物的生长代谢产生了大量的二氧化碳,由于二氧化碳气泡在发酵瓶内不稳定,使得发酵后期酵素液的总酸含量产生轻微上下浮动^[26]。

2.1.3 总多酚、总黄酮和花色苷含量的变化 黑果腺肋花楸自然发酵过程中总多酚、总黄酮及花色苷含量变化如图 3 所示。总多酚和总黄酮含量均呈先升高后降低趋势,在发酵 10 d 时总多酚含量达到最

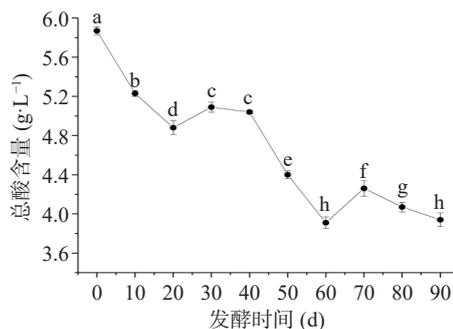


图 2 黑果腺肋花楸自然发酵过程中总酸含量变化

Fig.2 Changes of total acid content during natural fermentation of black chokeberry

高值 4.99 mg/mL, 20 d 时总黄酮含量达到最高值 269.68 mg/L, 相对于未发酵前分别提高了 26.01% 和 27.12%, 可能由于发酵前期在高渗透压的环境使多酚和黄酮类物质逐步被溶解释放至发酵液中,同时大分子酚类物质被微生物利用生成小分子酚类物质,使体系的总酚和总黄酮含量呈上升趋势。发酵 20 d 后总多酚和总黄酮含量持续降低,到 90 d 时分别降低至 2.84 mg/mL 和 166.43 mg/L,可能是由于酚类化合物与有机酸发生反应而生成酚酸类化合物;总黄酮含量的降低可能是由于酵母产生的次级代谢产物如丙酮酸、乙醛等与黄酮类物质反应,生成一些大分子衍生物;也可能是微生物产生的一些酶使其发生降解,导致其水溶性降低,从而使发酵液中总黄酮含量下降^[27]。

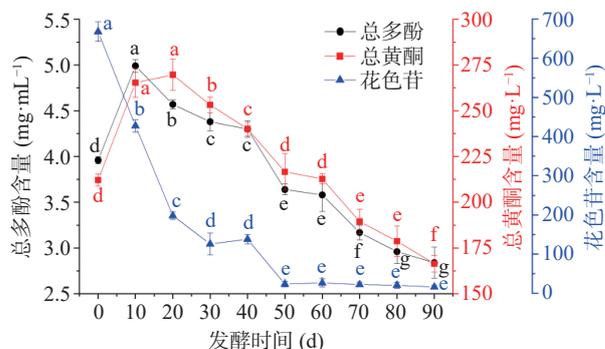


图 3 黑果腺肋花楸自然发酵过程中总多酚、总黄酮及花色苷含量变化

Fig.3 Changes of total polyphenols, total flavonoids and anthocyanins during natural fermentation of black chokeberry

花色苷的变化趋势与总多酚和总黄酮变化不同,随着发酵的进行,花色苷含量不断下降,由初始的 668.49 mg/L 降至 90 d 时最低值 17.26 mg/L,仅为初始值的 2.58%,特别是发酵的前 20 d 下降尤为明显,此后下降相对缓慢。这与韦仕静^[28]报道的桑葚酵素发酵的变化一致,即桑葚酵素发酵过程中花青素持续下降,可能与植物乳杆菌等微生物作用发生生物转化有关。

2.1.4 SOD 酶活力变化 SOD 酶具有清除自由基和过氧化氢等能力,是细胞防御系统中的主要抗氧化

酶,图 4 为黑果腺肋花楸自然发酵过程中 SOD 酶活力变化。SOD 酶活力总体呈先升高后降低趋势,但在整个发酵过程中 SOD 酶活力较发酵前均有显著提高($P<0.05$),说明发酵体系中具有能够产生 SOD 酶的微生物,与宋爱伟等^[29]的研究中乳酸菌和酵母菌两种菌类都可以使酵素 SOD 酶提高的结果一致。因此,发酵过程中 SOD 酶活力的升高可能与微生物的增长有关。本实验中前 10 d 时 SOD 酶活力急剧升高,达到最高值 5151.80 U/mL,其活力值为发酵前的 3.22 倍,发酵 10 d 后开始缓慢降低。贾丽丽等^[30]研究发现,SOD 酶活力与生物量变化之间呈现显著正相关($P<0.05$)。由此可知,随着发酵体系中微生物的增加,有利于 SOD 酶的产生,但是在发酵中后期,不同微生物之间存在竞争或者拮抗关系,抑制了 SOD 酶的积累^[31]。黑果腺肋花楸酵素自然发酵结束后,SOD 酶活力为 2215.54 U/mL,虽然远低于发酵 10 d 的结果,但要高于核桃青皮果蔬酵素(1980.25 U/mL)、黑果枸杞酵素(644.45 U/mL)和诺丽酵素(376.426 U/mL)等其他酵素中的 SOD 酶活力^[32-34]。

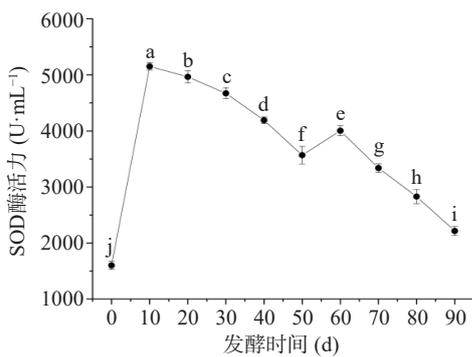


图 4 黑果腺肋花楸自然发酵过程中 SOD 酶活力变化
Fig.4 Changes of SOD enzyme activity during natural fermentation of black chokeberry

2.2 黑果腺肋花楸自然发酵过程中抗氧化活性变化

2.2.1 DPPH、ABTS⁺、羟自由基清除能力变化 图 5~图 7 分别为黑果腺肋花楸自然发酵过程中 DPPH、ABTS⁺及羟自由基清除能力变化。黑果腺肋花楸发酵液在整个发酵过程中的 DPPH 自由基、ABTS⁺自由基及羟自由基的清除能力均高于初始样品的清除能力($P<0.05$),说明采用适度发酵的方法能够有效提高其对自由基的清除能力。

随着发酵的进行,DPPH 自由基清除能力和 ABTS⁺自由基清除能力总体上均呈先上升后下降的趋势,DPPH 自由基清除率于 40 d 达到最大值 65.78%,ABTS⁺自由基清除率于 50 d 达到最高值 85.06%,两种自由基清除能力变化规律大致相同,这可能与发酵前期发酵液中较高的多酚、黄酮等抗氧化活成分和 SOD 酶活性有关,后期 DPPH 自由基清除能力逐渐减弱很可能与发酵液中微生物代谢过程中分解或消耗具有清除能力的物质有关^[35]。与前两种自由基清

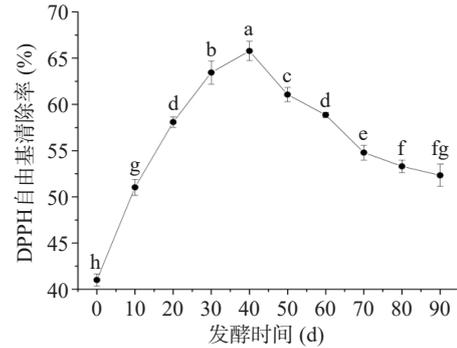


图 5 黑果腺肋花楸自然发酵过程中 DPPH 自由基清除能力变化

Fig.5 Changes of DPPH radical scavenging capacity during natural fermentation of black chokeberry

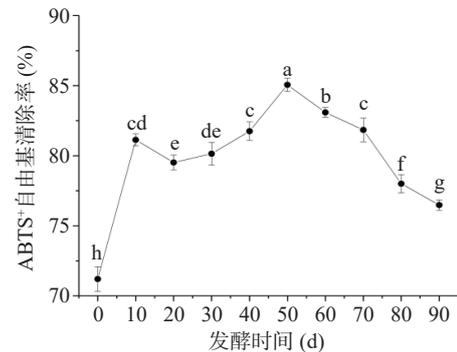


图 6 黑果腺肋花楸自然发酵过程中 ABTS⁺ 自由基清除能力变化

Fig.6 Changes of ABTS⁺ radical scavenging capacity during natural fermentation of black chokeberry

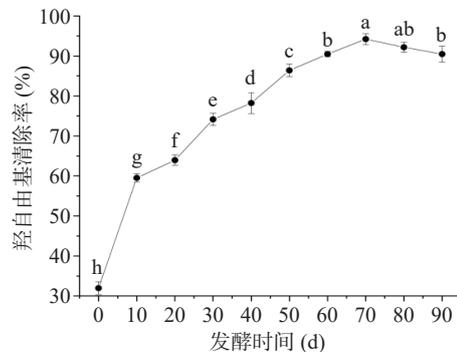


图 7 黑果腺肋花楸自然发酵过程中羟自由基清除能力变化
Fig.7 Changes of hydroxyl radical scavenging capacity during natural fermentation of black chokeberry

除能力变化有所不同,随着发酵的进行,羟基自由基清除能力均持续升高,于 70 d 达到最高值 94.22%,可能是由于微生物代谢的结果;70 d 后基本稳定,该结果与苏龙等^[36]的研究结果一致。黑果腺肋花楸自然发酵过程中,DPPH 自由基清除率、ABTS⁺自由基清除率和羟自由基清除率的变化趋势不一致,这与唐敏等^[37]对桑葚酵素的研究结果一致,可能由于发酵过程中的微生物利用的原料成分和代谢产物不同。

2.2.2 总抗氧化能力和总还原力的变化 黑果腺肋花楸自然发酵过程中总抗氧化能力和总还原力的变化如图 8 所示。在整个发酵过程中,总抗氧化能力

和总还原力均显著高于初始样品($P<0.05$)。总抗氧化能力随着发酵的进行,呈现先升高后降低趋势,发酵前初始样品的总抗氧化能力为 540.82 U/mL,发酵前 30 d 持续上升达到最高值 750.48 U/mL,之后随着发酵的进行而持续下降,于 90 d 时降至 561.17 U/mL,这与樊秋元等^[19]研究中黑加仑酵素的总抗氧化能力在发酵 96 h 时达到最大值 844.83 U/mL 之后下降的结果一致;说明黑果腺肋花楸酵素在适度的发酵时间内有利于总抗氧化能力的增长,发酵时间的过度延长会导致总抗氧化能力逐渐降低。总还原力在发酵第 10 d 时达到最高值 1.014,从第 10 d 开始持续波动下降,其变化与总多酚和总黄酮含量变化趋势相似,可以初步判断发酵液总还原力的变化与总多酚和总黄酮的变化有关。

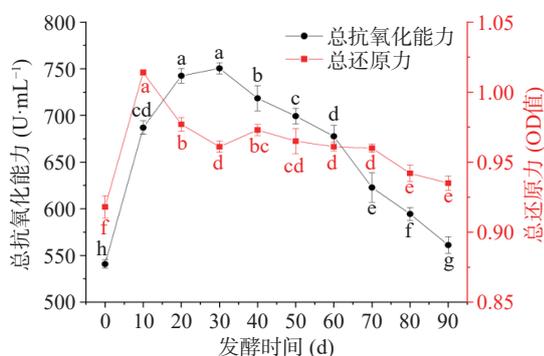


图 8 黑果腺肋花楸自然发酵过程中总抗氧化能力和总还原力的变化

Fig.8 Changes of total antioxidant capacity and total reducing power during natural fermentation of black chokeberry

2.3 黑果腺肋花楸自然发酵过程中主要成分与抗氧化相关性分析

黑果腺肋花楸自然发酵过程中主要成分与抗氧化活性相关性分析结果如表 1 所示。还原糖和 TSS 与 DPPH 自由基、ABTS⁺ 自由基和羟自由基清除能力呈显著的负相关($P<0.05$)。酒精度与 DPPH 自由基、ABTS⁺ 自由基、羟自由基清除能力 3 种自由基清

表 1 黑果腺肋花楸自然发酵过程中主要成分与抗氧化活性相关性分析

Table 1 Correlation analysis of main components and antioxidant activity during natural fermentation of black chokeberry

相关系数 r	DPPH 自由基清除能力	ABTS ⁺ 自由基清除能力	羟自由基清除能力	总还原力	总抗氧化能力
还原糖	-0.769**	-0.690*	-0.886**	-0.239	-0.462
TSS	-0.743*	-0.654*	-0.892**	-0.161	-0.418
酒精度	0.791**	0.656*	0.849**	0.199	0.495
总酸	-0.257	-0.439	-0.919**	0.102	0.117
总多酚	0.250	0.118	-0.623	0.682*	0.659*
总黄酮	0.395	0.248	-0.495	0.708*	0.795**
花色苷	-0.620	-0.626	-0.969**	-0.026	-0.229
SOD 酶	0.706*	0.653*	0.064	0.899**	0.915**

注: *在 0.05 水平(双侧)上相关性显著, **在 0.01 水平(双侧)上相关性极显著。

除能力呈显著正相关($P<0.05$), 相关系数为 0.656~0.849。总酸和花色苷与羟自由基清除能力呈极显著负相关($P<0.01$), 相关系数分别为-0.919 和-0.969。总多酚和总黄酮与总抗氧化能力和总还原力呈显著正相关($P<0.05$), 这与魏雪琴等^[38]研究的红枣酵素总抗氧化能力与总黄酮和总多酚含量呈显著正相关的结果相一致。SOD 与 DPPH 自由基和 ABTS⁺ 自由基清除能力呈显著正相关($P<0.05$), 并与总还原力和总抗氧化能力呈极显著正相关($P<0.01$), 表明 SOD 对黑果腺肋花楸酵素的抗氧化活性影响很大, 这与张海燕等^[39]的研究结果一致。

3 结论

黑果腺肋花楸自然发酵过程中, 其还原糖、TSS、总酸、花色苷含量总体呈下降趋势, 酒精度持续上升后逐渐趋于稳定, 总多酚、总黄酮和 SOD 酶活力均呈先升高后降低的趋势。与初始样品相比, 发酵液的抗氧化能力均显著升高($P<0.05$)。相关性分析表明, 酒精度、总多酚、总黄酮、SOD 与其抗氧化活性总体呈显著正相关($P<0.05$), 还原糖、TSS 和总酸与抗氧化活性总体呈显著负相关($P<0.05$)。黑果腺肋花楸自然发酵过程中代谢产物含量的变化规律, 可以在一定程度上反映其发酵液中主要成分和生物活性物质的积累情况。后续将在此基础上, 深入研究黑果腺肋花楸自然发酵中微生物菌群与上述代谢产物的关系, 为进一步了解黑果腺肋花楸酵素抗氧化机制以及发酵过程的调控提供更多指导和参考。

参考文献

[1] SIDOR A, GRAMZA-MICHALOWSKA A. Black chokeberry *Aronia melanocarpa* L. —A qualitative composition, phenolic profile and antioxidant potential [J]. *Molecules*, 2019, 24(20): 3710–3710.

[2] THI N, HWANG E S. Effects of black chokeberry extracts on metastasis and cell-cycle arrest in SK-Hep1 human liver cancer cell line [J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2018, 8(6): 285–291.

[3] DENEV P, ČIZ M, KRATCHANOVA M, et al. Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenols reveal different antioxidant, antimicrobial and neutrophil-modulating activities [J]. *Food Chemistry*, 2019, 284(30): 108–117.

[4] BIJAK M, SALUK J, ANTOSIK A, et al. *Aronia melanocarpa* as a protector against nitration of fibrinogen [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 55: 264–268.

[5] GAJIC D, SAKSIDA T, KOPTIVICA I, et al. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) fruit extract modulates immune response *in vivo* and *in vitro* [J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 66(1): 1–12.

[6] VALCHEVA-KUZMANOVA S, KUZMANOV K, TANCH-EVA S, et al. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Aronia melanocarpa* fruit juice in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 2007, 29(2): 1295–1300.

[7] YANG J, GAO J, YU W C, et al. The effects and mechanism of *Aronia melanocarpa* Elliot anthocyanins on hepatic fibrosis [J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 68(1): 1–3.

[8] DASKALOVA E, DELCHEV S, PEEVA Y, et al. Antiathero-

- genic and cardioprotective effects of black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) juice in aging rats[J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine (eCAM), 2015, 58(1): 1-10.
- [9] KULLING S E, RAWEL H M. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*)-A review on the characteristic components and potential health effects[J]. *Planta Medica*, 2008, 74(10): 1625-1634.
- [10] KARDUM N, TAKIC M, ŠAVIKIN K, et al. Effects of polyphenol-rich chokeberry juice on cellular antioxidant enzymes and membrane lipid status in healthy women[J]. *Journal of Functional Foods*, 2014, 9: 89-97.
- [11] FANG S, JIN Z, XU Y, et al. Chinese bayberry Jiaosu fermentation-changes of mycobiota composition and antioxidant properties[J]. *International Journal of Food Engineering*, 2021, 17(6): 455-463.
- [12] 薛淑龙, 范昊安, 陈小伟, 等. 竹叶酵素发酵过程中代谢产物及抗氧化活性的变化[J]. *现代食品科技*, 2019, 35(5): 228-235, 174. [XUE S L, FAN H A, CHEN X W, et al. Study on the changes of material metabolism and antioxidant activity of bamboo leaf Jiaosu during the fermentation process[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2019, 35(5): 228-235, 174.]
- [13] 刘玉梅, 张家俊, 吴浪. 复合酶协同超声波法提取香椿老叶总黄酮工艺研究[J]. *现代食品科技*, 2019, 35(11): 223-230. [LIU Y M, ZHANG J J, WU L. Extraction of total flavonoids from *Toona sinensis* old leaves by complex enzymolysis assisted with ultrasounds[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2019, 35(11): 223-230.]
- [14] 高庆超, 常应九, 马蓉, 等. 黑果枸杞酵素发酵前后主要成分分析及其体外抗氧化活性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(5): 275-283. [GAO Q C, CHANG Y J, MA R, et al. Analysis of main components and antioxidant activity *in vitro* for *Lycium ruthenicum* Murr. Jiaosu before and after fermentation[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(5): 275-283.]
- [15] 王明瑞, 侯彦喜, 张亚丹. 3, 5-二硝基水杨酸法测定发酵液中多糖含量[J]. *现代食品*, 2020, 6(4): 216-222. [WANG M R, HOU Y X, ZHANG Y D. Determination of polysaccharide content in fermentation broth by 3, 5-Dinitrosalicylic acid method[J]. *Modern Food*, 2020, 6(4): 216-222.]
- [16] 严红光, 李丽, 杨芬, 等. 蓝莓叶多酚及抗氧化研究[J]. *食品科技*, 2018, 43(10): 285-288. [YAN H G, LI L, YANG Q, et al. Phenolic compounds and antioxidant activity of blueberry leaf[J]. *Food Science and Technology*, 2018, 43(10): 285-288.]
- [17] 陈宇, 黄晓丹, 林素英, 等. 枇杷酒中总黄酮的测定[J]. *莆田学院学报*, 2010, 17(5): 28-31. [CHEN Y, HUANG X D, LIN S Y, et al. Determination of total flavonoids content in loquat wine[J]. *Journal of Putian University*, 2010, 17(5): 28-31.]
- [18] 张荣菲, 王绍云. 贵州黔东南蓝莓中花青素的提取与含量测定[J]. *中国食品添加剂*, 2016, 27(11): 190-194. [ZHANG R F, WANG S Y. Study on extraction and determination of anthocyanins from blueberry of Qiandongnan, Guizhou Province[J]. *China Food Additives*, 2016, 27(11): 190-194.]
- [19] 樊秋元, 朱丹, 牛广财, 等. 黑加仑酵素发酵工艺优化及其体外抗氧化性能[J]. *食品工业*, 2020, 41(1): 132-137. [FAN Q Y, ZHU D, NIU G C, et al. Optimization of fermentation process of blackcurrant Jiaosu and antioxidant activity *in vitro*[J]. *The Food Industry*, 2020, 41(1): 132-137.]
- [20] 张琪, 朱丹, 牛广财, 等. 沙棘果酒发酵动力学及其抗氧化活性[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(15): 53-58. [ZHANG Q, ZHU D, NIU G C, et al. Fermentation kinetics and antioxidant activity of sea buckthorn wine[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(15): 53-58.]
- [21] 宋艺君, 郭涛, 刘世军, 等. 响应面法优化黄精-大枣果酒发酵工艺及其抗氧化活性[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(1): 156-161. [SONG Y J, GUO T, LIU S J, et al. Optimization of fermentation process and antioxidant activity of *Polygonati rhizoma-Jujubae fructus* fruit wine by response surface methodology[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(1): 156-161.]
- [22] 李昱鼎. 竹茶酒发酵工艺优化及抗氧化特性研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2013. [LI Y D. Study on fermentation technique of bamboo-tea wine and its antioxidant activities[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2013.]
- [23] 姚沛琳, 蒋家璇, 武进雨, 等. 无花果酵素自然发酵过程中代谢产物与抗氧化活性的相关性研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2022, 34(3): 427-435. [YAO P L, JIANG J X, WU J Y, et al. Study on the relationship of metabolites and antioxidant activity during natural fermentation of fig enzyme[J]. *Natural Product Research and Development*, 2022, 34(3): 427-435.]
- [24] 孟金明, 樊爱萍, 和川琦, 等. 芒果、胡萝卜复合果酒发酵过程中理化成分和香气物质的变化[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(12): 7-13. [MENG J M, FAN A P, HE C Q, et al. Dynamic changes of physicochemical and aroma components in the fermentation process of mango-carrot compound fruit wine[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(12): 7-13.]
- [25] 徐文, 袁辛锐, 唐智, 等. 桂圆果酒的陈酿研究[J]. *中国酿造*, 2021, 40(11): 76-81. [XU W, YUAN X R, TANG Z, et al. Ageing of longan fruit wine[J]. *China Brewing*, 2021, 40(11): 76-81.]
- [26] 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 Q, CHEN C X, CHEN Z L, 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.]
- [27] 曾爱蓝, 马胤鹏, 秦丹, 等. 柑橘酒发酵过程中总黄酮、柠檬苦素和诺米林含量变化[J]. *中国酿造*, 2019, 38(4): 80-83. [ZENG J L, MA Y P, QIN D, et al. Changes of total flavonoids, limonin and nomilin contents in the fermentation of citrus wine[J]. *China Brewing*, 2019, 38(4): 80-83.]
- [28] 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: 华南理工大学, 2018. [WEI S J. The Research on fermentation process of mulberry Jiaosu and biotransformation of anthocyanins[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018.]
- [29] 宋爱伟, 毕红, 陈亚军, 等. 苹果青枣酵素发酵过程中生物学特性和抗氧化活性研究[J]. *合肥师范学院学报*, 2021, 39(6): 25-29. [SONG A W, BI H, CHEN Y J, et al. Study on the biological characteristics and antioxidant activity of apple and green jujube Jiaosu during fermentation process[J]. *Journal of Hefei Normal University*, 2021, 39(6): 25-29.]
- [30] 贾丽丽, 冀利, 孙曙光, 等. 冬枣酵素发酵过程中生物学特性和抗氧化活性研究[J]. *食品与发酵科技*, 2014, 50(4): 30-33. [JIA L L, JI L, SUN S G, et al. Study on biological property and antioxidant activity of winter-jujube ferment during fermentation process[J]. *Food and Fermentation Technology*, 2014, 50(4): 30-33.]
- [31] 秦宇蒙, 王艳丽, 周笑犁, 等. 番茄酵素自然发酵过程中主要功效酶的变化[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(20): 60-66. [QIN Y M, WANG Y L, ZHOU X L, et al. Changes of main functional enzymes during natural fermentation of tomato enzymes[J]. *Science*

- and Technology of Food Industry, 2022, 43(20): 60–66.]
- [32] 李杰, 赵声兰, 陈朝银. 核桃青皮果蔬酵素的成分组成及体外抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(10): 117–122. [LI J, ZHAO S L, CHEN C Y. Chemical composition and *in vitro* antioxidant properties of walnut green husk fruit and vegetable compound ferment[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(10): 117–122.]
- [33] 高庆超, 常应九, 马蓉, 等. 黑果枸杞酵素自然发酵过程中微生物群落的动态变化[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(13): 126–133. [GAO Q C, CHANG Y J, MA R, et al. Dynamic changes in microbial community during natural fermentation of *Lycium ruthenicum* Murr. enzymes[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(13): 126–133.]
- [34] 周偏, 蔡坤, 梁丛颖, 等. 诺丽酵素在自然发酵过程中体外抗氧化活性变化及品质研究[J]. 中国酿造, 2018, 37(1): 92–96. [ZHOU P, CAI K, LIANG C Y, et al. Changes of *in vitro* antioxidant activity of *Morinda citrifolia* ferment during natural fermentation process and quality analysis[J]. China Brewing, 2018, 37(1): 92–96.]
- [35] 朱倩, 杨松, 伍玉蕊, 等. 乳杆菌发酵对生姜副产物蒸馏液活性成分及抗氧化活性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(24): 131–138. [ZHU Q, YANG S, WU Y H, et al. Effects of *Lactobacillus* fermentation on active components and antioxidant activities of distillate of ginger by-product[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(24): 131–138.]
- [36] 苏龙, 庄明川, 陆孔泳, 等. 芒果木瓜天然酵素抗氧化性能分析[J]. 湖北农业科学, 2017, 56(7): 1312–1314. [SU L, ZHUANG M C, LU K Y, et al. Analysis on antioxidant properties of mango and pawpaw ferment[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2017, 56(7): 1312–1314.]
- [37] 唐敏, 刘刚, 王雪力, 等. 桑葚酵素复合与自然发酵的增效成分、感官评价与抗氧化活性比较[J]. 四川师范大学学报(自然科学版), 2022, 45(1): 73–78. [TANG M, LIU G, WANG X L, et al. Comparison of functional components, sensory evaluation and antioxidant activity by multi microorganism fermentation in mulberry enzymes with those by natural fermentation[J]. Journal of Sichuan Normal University(Natural Science), 2022, 45(1): 73–78.]
- [38] 魏雪琴, 武燕蓉, 庞杰. 四种红枣酵素品质对比研究[J]. 中国调味品, 2021, 46(11): 52–56. [WEI X Q, WU Y R, PANG J. Comparative study on the quality of four jujube enzymes[J]. China Condiment, 2021, 46(11): 52–56.]
- [39] 张海燕, 康三江, 袁晶, 等. 苹果酵素自然发酵过程中生物活性物质的变化[J]. 中国酿造, 2021, 40(3): 111–114. [ZHANG H Y, KANG S J, YUAN J, et al. Changes of bioactive compounds of apple Jiaosu during natural fermentation[J]. China Brewing, 2021, 40(3): 111–114.]