

马懿,熊蓉,肖雄峻,等.金银花叶乳酸杆菌发酵凉茶的研制及其抗氧化活性分析[J].食品工业科技,2023,44(9):254-261. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022110170

MA Yi, XIONG Rong, XIAO Xiongjun, et al. Preparation of Herbal Tea Fermented by *Lactobacillus* from *Lonicera japonica* leaves and Analysis of Its Antioxidant Activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(9): 254-261. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022110170

· 工艺技术 ·

金银花叶乳酸杆菌发酵凉茶的研制及其 抗氧化活性分析

马懿^{1,2},熊蓉^{1,2},肖雄峻^{1,2},陈晓姣^{1,2},谢李明^{1,2},魏紫云^{1,2},喻康杰^{1,2},黄慧玲^{1,2},禹潇^{1,2}

(1.四川轻化工大学生物工程学院,四川宜宾 644000;

2.四川省酿酒专用粮工程技术研究中心,四川宜宾 644000)

摘要:为获得一款具强抗氧化活性的高保健性金银花叶发酵凉茶,以金银花叶为原材料,通过单因素实验和正交试验,研究了发酵时间、发酵温度、保加利亚乳酸杆菌(*L. plantarum* 758)接种量及糖的添加量(葡萄糖与蔗糖质量比为3:2)对金银花叶凉茶抗氧化活性的影响并对工艺条件进行了优化,还对比了金银花叶凉茶与市场上常见三种凉茶在抗氧化性及挥发性成分上的差异。结果表明,乳酸杆菌发酵金银花叶凉茶的最佳发酵条件为:发酵时间24 h、发酵温度38℃、接种量4%及糖添加量7%,在此发酵条件下所获得的金银花叶凉茶绿原酸含量达到7.11%,总黄酮含量为22.51%,DPPH自由基清除率为84.23%±3.32%,ABTS自由基清除率为85.30%±2.14%,均显著高于市场上的三种凉茶($P<0.05$);金银花叶凉茶中共有挥发性物质32种,其种类和含量都较其它对比组高。总体表明,保加利亚乳酸杆菌(*L. plantarum* 758)发酵的金银花叶凉茶抗氧化能力突出,具有较高的营养价值和实用功能性。

关键词:金银花叶凉茶,保加利亚乳酸杆菌,发酵,工艺优化,抗氧化活性

中图分类号:TS275.2

文献标识码:B

文章编号:1002-0306(2023)09-0254-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022110170

本文网刊:



Preparation of Herbal Tea Fermented by *Lactobacillus* from *Lonicera japonica* leaves and Analysis of Its Antioxidant Activity

MA Yi^{1,2}, XIONG Rong^{1,2}, XIAO Xiongjun^{1,2}, CHEN Xiaojiao^{1,2}, XIE Liming^{1,2}, WEI Ziyun^{1,2},
YU Kangjie^{1,2}, HUANG Huiling^{1,2}, YU Xiao^{1,2}

(1.College of Bioengineering, Sichuan University of Science and Engineering, Yibin 644000, China;

2.Engineering Technology Research Center of Special Grain for Wine Making, Yibin 644000, China)

Abstract: In order to obtain a kind of *Lonicera japonica* leaves herbal tea with strong antioxidant activity and high health care, an orthogonal array design based on single factor experiments was employed to examine the influence of time, temperature, inoculum amount of *L. plantarum* 758 and the concentration of sugar (The mass ratio of glucose to sucrose was 3:2) on the fermentation process. The antioxidant and volatile components of *Lonicera japonica* leaves herbal tea were compared with those of three common herbal tea in the market. Results showed that the optimal fermentation conditions were determined as fermentation of *Lonicera japonica* leaves extract containing 7% sugar added at 38℃ for 24 h with an inoculum amount of 4%. Under these conditions, the chlorogenic acid content of *Lonicera japonica* leaves herbal tea reached 7.11%, the total flavonoids content was 22.51%, the DPPH free radical clearance rate was 84.23%±3.32%, and the ABTS free radical clearance rate was 85.30%±2.14%, which were significantly higher than those of the three kinds of herbal tea on the market ($P<0.05$). There were 32 kinds of volatile substances in *Lonicera japonica* leaves herbal tea, and their types and contents were higher than those in other comparison groups. Overall, the antioxidant capacity of *Lonicera japonica* leaves herbal tea fermented by *L. plantarum* 758 is outstanding, and it has higher nutritional value and practical function.

收稿日期: 2022-11-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(31801458);四川省科技厅项目(2020YJ0402);四川轻化工大学人才引进项目(2017RCL24)。

作者简介: 马懿(1983-),男,博士,副教授,研究方向:食品科学与工程,E-mail: 191066789@qq.com。

Key words: *Lonicera japonica* leaves herbal tea; *L. plantarum* 758; fermentation; process optimization; antioxidant activity

金银花,又名忍冬花、银花、金银藤,是忍冬科忍冬属多年生藤本植物^[1-2]。金银花作为常见的药食同源类植物之一,具有抑菌抗病毒^[3-4]、调节免疫系统^[5]、降低血脂^[6]、解热消炎^[7]、抗氧化及止血等功效^[8],但其花产量低且金银花性寒^[9]。金银花的副产物——金银花叶,具有易采集、产量大、活性成分丰富等优点^[10],但金银花叶作为金银花的非药用部位,其在生活中未得到充分利用^[11]。据报道,金银花叶富含绿原酸、黄酮、萜类等活性成分^[12],且黄酮含量尤为丰富,金银花叶中黄酮含量是花中黄酮含量的 2.78 倍^[13]。因此,对金银花叶的开发应用具有重要的社会效益和经济价值^[14]。乳酸菌作为人体肠道的正常菌群^[15],具有维持肠道菌群生态平衡^[16]、提高免疫力^[17]、抗病毒及消炎^[18]等功效。

目前,党参^[19]、黑枸杞^[20]等营养丰富、好喝、易吸收的新型乳酸菌饮料快速发展并被大众喜爱。随着乳酸菌应用于饮料加工的不断深入,寻求将乳酸菌应用于金银花凉茶发酵,不仅能丰富凉茶口感及色泽,还能赋予凉茶特殊的营养成分^[21],从而增强其保健功效。已有大量研究将金银花作为原材料制作凉茶。如陈康等^[21]研制了植物乳杆菌 PMO 发酵金银花凉茶,卢超等^[22]采用金银花、枸杞和菊花为原料制得一款金银花茶饮,但将金银花叶制作凉茶还鲜有研究,对金银花叶凉茶品质也有待考究。

因此,本研究以金银花叶为原材料,采用本实验室筛选、驯化的优质保加利亚乳酸杆菌进行金银花叶凉茶的发酵,对乳酸菌发酵金银花叶凉茶发酵条件进行优化,旨在开发一款兼具高抗氧化活性和高保健性能的金银花叶凉茶饮料,为提高金银花叶的附加产值提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

金银花 宜宾市售;茶样 1~3 购置于四川省宜宾市绿源超市;脱脂乳粉 内蒙古蒙牛乳业股份有限公司;保加利亚乳酸杆菌(*L. plantarum* 758) 四川轻化工大学实验室提供;MRS 培养基 北京索莱宝科技有限公司;绿原酸标准品(纯度≥98%) 四川九州通医药有限公司;DPPH 标准品 合肥博美生物科技有限公司。

PMHG 恒温电热鼓风干燥机 普若迈德有限公司;M383907 数显恒温水浴锅 金坛市晶玻实验仪器厂;UV-1800 紫外可见分光光度计 翱艺仪器有限公司;TGL-21 台式高速多功能冷冻离心机 上海百典仪器设备有限公司;SS-322 高压蒸汽灭菌锅 奥豪斯仪器有限公司;PHS-3C 酸度计 金坛市晶玻实验仪器厂;7890A 气相色谱仪 四川蜀科仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 工艺流程 金银花叶洗净、烘干→除去枝干

粉碎→以 1:60 的料水比于 80 ℃ 水浴 40 min→抽滤→调节 pH→灭菌→冷却至室温后接种驯化后的保加利亚乳酸杆菌→发酵。

1.2.2 操作要点

1.2.2.1 金银花叶浸提液的制备 挑选完整饱满无坏死的金银花叶,除去枝干放入高速粉碎机粉碎 10 min,用粉碎机粉碎后的金银花叶以 1:60 的料水比于 80 ℃ 水浴 40 min(此条件由前期实验获得),于抽滤机下抽滤,放于 4 ℃ 冰箱备用。

1.2.2.2 乳酸菌的活化与驯化 配制 MRS 液体培养基,在高压蒸汽灭菌锅中灭菌冷却后,接种筛选后的乳酸菌后置于 37 ℃ 恒温培养箱培养 36 h,发现锥形瓶底部有沉淀产生,活化成功,将活化好的菌种放入冰箱备用。在 35 ℃ 条件下将活化好的菌种按照表 1 配制的培养基进行逐步驯化。

表 1 驯化培养基的制备

Table 1 Preparation of domestication medium

培养编号	1	2	3	4	5	6
金银花叶浸提液添加量	0	10%	20%	30%	40%	50%
10%脱脂乳粉添加量	50%	40%	30%	20%	10%	0

注:培养基中按葡萄糖:蔗糖=3:2的比例添加6%的糖。

1.2.2.3 接种、发酵及冷藏 调节金银花叶浸提液 pH 至 6.4,用高压蒸汽灭菌锅灭菌 20 min,冷却至室温后接种保加利亚乳酸杆菌发酵剂,放入 37 ℃ 恒温培养箱中培养发酵 24 h 后置于 4 ℃ 冰箱中冷藏。

1.2.3 乳酸菌发酵金银花叶凉茶单因素实验

1.2.3.1 发酵时间对金银花叶凉茶发酵的影响 取 4 只 100 mL 三角瓶,依加入金银花浸提液 50 mL,添加 6% 的糖,高压蒸汽灭菌 20 min,冷却后接种 3% 的乳酸菌发酵剂,放入 37 ℃ 恒温培养箱分别培养 12、24、36、48 h。培养完成后放入冰箱冷藏保存。

1.2.3.2 发酵温度对金银花叶凉茶发酵的影响 取 4 只三角瓶,依次加入金银花浸提液 50 mL,添加 6% 的糖,高压蒸汽灭菌 20 min,冷却后接种 3% 的乳酸菌发酵剂,分别放入 35、37、39、41 ℃ 的培养箱中培养 24 h。培养完成后放入冰箱冷藏保存。

1.2.3.3 乳酸菌接种量对金银花叶凉茶发酵的影响 取 6 只三角瓶,依次加入金银花浸提液 50 mL,添加 6% 的糖,高压蒸汽灭菌 20 min,冷却后分别接种 1%、2%、3%、4%、5%、6% 的乳酸菌发酵剂,放入 37 ℃ 的培养箱中培养 24 h。培养完成后放入冰箱冷藏保存。

1.2.3.4 糖添加量对金银花叶凉茶发酵的影响 取 5 只三角瓶,依次加入金银花浸提液 50 mL,分别添加 2%、4%、6%、8%、10% 的糖(葡萄糖:蔗糖=3:2),高压蒸汽灭菌 20 min,冷却后接种 3% 的乳酸菌发酵剂,放入 37 ℃ 的培养箱中培养 24 h。培养完成后

放入冰箱冷藏保存。

1.2.3.5 金银花叶凉茶发酵工艺条件的优化 以金银花叶凉茶乳酸含量和 DPPH 自由基清除率为考察指标,选取发酵时间、发酵温度、接种量、糖添加量为主要影响因素,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验。正交试验因素与水平见表 2。

表 2 正交试验因素与水平
Table 2 Factors and levels of orthogonal design

水平	A 发酵时间(h)	B 发酵温度(℃)	C 接种量(%)	D 糖添加量(%)
1	22	36	2	5
2	24	37	3	6
3	26	38	4	7

1.2.4 乳酸含量 乳酸含量参照 GB/T 15038-2006《葡萄酒、果酒通用分析方法》进行测定。

1.2.5 金银花叶发酵凉茶体外抗氧化能力的测定 本实验通过测定 DPPH 自由基清除率及 ABTS 自由基清除率反映发酵液的抗氧化能力。

DPPH 自由基清除率测定: 配制浓度为 0.0178 mmol/L 的 DPPH 储备液, 吸取 2 mL DPPH 溶液和 2 mL 无水乙醇在室温下避光静置 30 min, 在 517 nm 处测得其吸光值为 A, 以 2 mL 样品溶液和 2 mL DPPH 溶液在室温下避光静置 30 min, 在 517 nm 处测得吸光值为 A_i , 以 2 mL 样品溶液和 2 mL 无水乙醇溶液在室温下避光静置 30 min, 在 517 nm 处测得吸光值为 A_j 。DPPH 自由基清除率按照公式(1)进行计算:

$$K(\%) = \frac{[A - (A_i - A_j)]}{A} \times 100 \quad \text{式 (1)}$$

ABTS 自由基清除率测定: 将配制好的 7 mmol/L 的 ABTS 溶液和 2.45 mmol/L 的过硫酸钾等体积混合, 避光静置过夜, 形成 ABTS 自由基储备液并用 0.01 mol/L 的磷酸缓冲液 (pH7.4) 稀释, 使其在 734 nm 下吸光度为 0.70 ± 0.02 。吸取 1 mL 待测样品与 3 mL ABTS 自由基工作液, 混合 10 s 后立即置于暗处准确反应 6 min, 在 734 nm 波长下测定吸光度($A_{\text{样品}}$)。同时, 以等量蒸馏水代替样品作空白对照实验($A_{\text{空白}}$)。

$$\text{ABTS 自由基清除率}(\%) = \frac{(A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}})}{A_{\text{空白}}} \times 100 \quad \text{式 (2)}$$

1.2.6 金银花叶发酵凉茶绿原酸及总黄酮含量测定 参照马懿等^[23]所述研究方法分别对金银花叶凉茶及购买的三种市场凉茶进行绿原酸含量测定, 在 322 nm 处测定最大吸光度值并绘制标准曲线, 线性回归方程为: $Y = 0.6068X + 0.232 (R^2 = 0.9997)$ 。

参照许陈思茵等^[24]所述硝酸铝法进行总黄酮含量测定, 在 324 nm 处测定吸光度值, 绘制标准曲线, 线性回归方程为: $y = 82.00x - 0.0078 (R^2 = 0.9993)$ 。

1.2.7 挥发性物质的测定 (SPME-GC-MS) 采用刁

体伟等^[25]描述的顶空固相微萃取-气质联用法 (solid phase micro-extraction gas chromatography mass spectrometry, SPME-GC-MS) 并加以改进用于测定样品挥发性物质。在 15 mL 顶空瓶中准确加入 8.0 mL 样茶, 并加入 1 g NaCl。茶样在 45 ℃ 条件下预热 10 min 后, 将老化后的微萃取头插入顶空瓶中, 同时推出纤维头 (距离茶液面 1.5 cm), 于顶空位置吸附 35 min, 吸附后, 收回纤维头并迅速送至 GC 送样口, 在 250 ℃ 热解析 3 min。GC 条件: DB-WAX 毛细管色谱柱 (60 m×0.25 mm×0.25 μm); 进样口温度为 250 ℃; 采用不分流进样模式; 程序升温: 初始温度 40 ℃, 保留 5 min, 以 2 ℃/min 升温至 60 ℃, 以 5 ℃/min 升温至 180 ℃, 保留 5 min, 以 10 ℃/min 升温至 230 ℃, 保留 10 min; 载气为高纯氮气, 恒定流速 1.2 mL/min。

MS 条件: 电子轰击电离源 (EI), 离子源温度 230 ℃, 电子能量 70 eV, 采集模式为全扫描, MS 四极杆温度 150 ℃, 溶剂延迟 3 min。

挥发性物质定性定量: 色谱峰对应的质谱通过与 NIST/Wiley Database 进行检索比对, 保留匹配度大于 80% 的鉴定结果。通过内标物 (2-辛醇) 的峰面积和茶样中各组分的峰面积比值, 计算各个组分的质量浓度。

1.2.8 感官品评 参照陈康等^[21]所述方法进行感官品评。感官评价由 10 名经过培训的评估小组完成 (5 名女性和 5 名男性, 平均年龄 25 岁, 所有小组成员在饮料相关领域都有超过 2 年的经验)。在整个感官分析过程中, 样品在标准感官室 (EN ISO, 8586) 中进行评估。

1.3 数据处理

所有实验均重复测定 3 次, 数据采用平均值 (Mean)±标准差 (SD) 表示。SPSS 软件用于统计分析与方差分析 (Duncan 检验, $P < 0.05$ 表示显著差异), 采用 Origin 2018 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 金银花叶凉茶发酵的单因素实验结果

2.1.1 发酵时间对金银花叶凉茶发酵的影响 由图 1

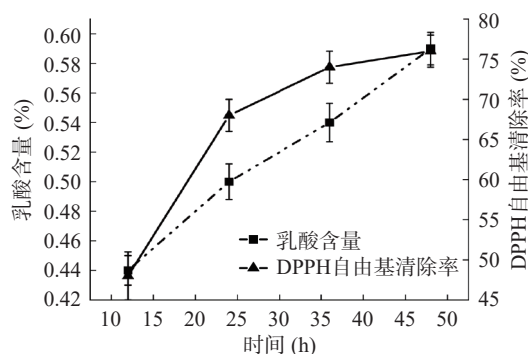


图 1 发酵时间对金银花叶发酵凉茶乳酸含量及 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.1 Effect of fermentation time on lactic acid content and DPPH free radical clearance rate of *Lonicera japonica* leaf fermented herbal tea

可知,发酵时间的长短决定了发酵液中乳酸的含量,发酵时间过短,发酵过程中产生的乳酸累积量较少,整体口感和风味较差,而发酵时间过长,会造成乳酸大量积累,不利于乳酸菌的生长繁殖;且发酵时间的延长不仅增加了生产成本也会导致大量代谢副产物的积累,从而影响凉茶整体质量^[26];发酵时间越长,发酵凉茶的 DPPH 自由基清除率越高,凉茶抗氧化能力越强,作为保健品的效果越好。但考虑实际生产成本及综合凉茶品质,从本实验可知发酵时间最好设置为 24 h,以确保兼具口感和保健效果。

2.1.2 发酵温度对金银花叶凉茶发酵的影响 由图 2 可知,发酵温度过高或者过低都会抑制乳酸菌的活性^[27],导致发酵凉茶的乳酸含量降低,且温度过高或过低都会降低凉茶抗氧化活性,作为保健品的保健效果也会降低。因此,在生产过程中要严格控制发酵温度,研究表明,35 ℃ 较接近乳酸菌生长的最适温度,此时在发酵凉茶中生长旺盛。但较高的发酵温度可增强乳酸菌的产酸能力,在短时间积累足够的酸度,从而缩短发酵时间^[28]。综合考虑,发酵温度最好控制在 37 ℃,此时乳酸菌活性相对较高,发酵液抗氧化活性最强。

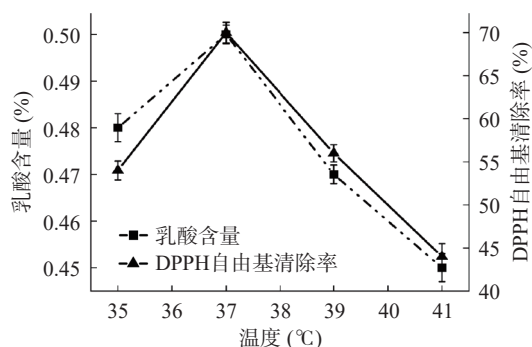


图 2 发酵温度对金银花叶发酵凉茶乳酸含量及 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.2 Effect of fermentation temperature on lactic acid content and DPPH free radical clearance rate of *Lonicera japonica* leaf fermented herbal tea

2.1.3 乳酸菌接种量对金银花叶凉茶发酵的影响 乳酸菌接种量的多少在一定范围决定了其产酸速率^[29]。有研究表明,乳酸菌接种量过低形成的环境不利于发挥纯菌种生长优势,从而影响产酸^[30];而接种量过高,酸度急剧上升,不利于风味物质的生成,只有适中的接种量才能加快产酸速率的同时形成最佳风味。由图 3 也可看出,接种量对金银花发酵凉茶的品质有一定影响,特别是接种量过低时,乳酸产量和 DPPH 自由基清除率都明显降低,但是接种量过高又会导致乳酸含量过多,故在生产过程中乳酸菌的接种量应该合理控制。由本实验可知,最佳乳酸菌接种量为 3%。

2.1.4 糖添加量对金银花叶凉茶发酵的影响 糖不仅提供乳酸菌生长的碳源^[31],还可防止茶饮料中蛋白质聚沉现象。由图 4 可知,乳酸含量随着糖添加量

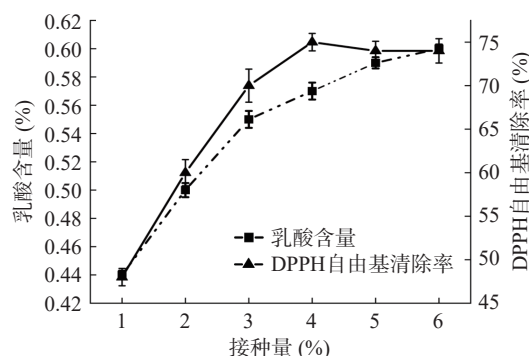


图 3 乳酸菌接种量对金银花叶发酵凉茶乳酸含量及 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.3 Effect of inoculation amount of lactic acid bacteria on lactic acid content and DPPH free radical clearance rate of *Lonicera japonica* leaf fermented herbal tea

增加呈现先增加后降低的趋势,糖添加量为 6% 时,乳酸含量达到最大值。较低的糖添加量无法为乳酸菌提供充足的营养,而当糖添加量到 6% 后,过高的糖添加量反而会抑制乳酸菌的生长繁殖。发酵液 DPPH 自由基清除率与乳酸含量变化趋势基本一致,较低糖添加量时,凉茶 DPPH 自由基清除率处于一个较低的水平,故在生产中需要控制适当的糖添加量,使乳酸菌的发酵处于较活跃的水平。综上,6% 的糖添加量为最适糖添加量。

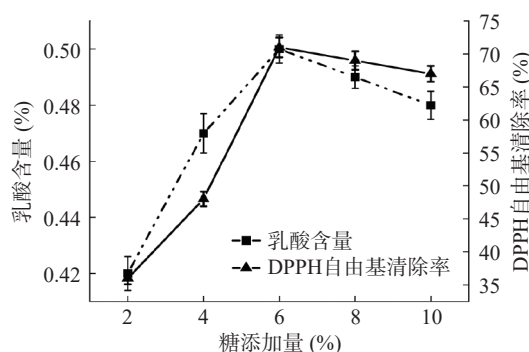


图 4 糖添加量对金银花叶发酵凉茶乳酸含量及 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.4 Effect of sugar content on lactic acid content and DPPH free radical clearance rate of *Lonicera japonica* leaf fermented herbal tea

2.2 金银花叶凉茶发酵工艺条件的优化

以乳酸含量和 DPPH 自由基清除率为正交试验考核指标,通过直观分析法,由表 3 中乳酸含量极值 R 可知,影响金银花叶发酵凉茶的因素主次顺序为:接种量(C)>发酵温度(B)>发酵时间(A)>糖添加量(D);理论最优组合为: A₃B₃C₃D₂。

由表 3 中 DPPH 自由基清除率极值 R 可知,影响金银花叶凉茶发酵因素的主次顺序为:接种量(C)>发酵时间(A)>发酵温度(B)>糖添加量(D);理论最优组合为: A₂B₃C₃D₃。

由于两组理论最优组合均不在表 3 的 9 组试验中,因此,对 A₃B₃C₃D₂、A₂B₃C₃D₃ 及表中直观最优组合 A₂B₂C₃D₁ 分别进行验证实验,采用 A₃B₃C₃D₂

表3 金银花叶凉茶发酵工艺条件正交试验设计及结果

Table 3 Orthogonal experimental design and results of *Lonicera japonica* leaves herbal tea fermentation

试验号	A发酵 时间	B发酵 温度	C接种量	D糖添 加量	乳酸含 量(%)	DPPH自由基 清除率(%)
1	1	1	1	1	0.53	78.10
2	1	2	2	2	0.49	79.30
3	1	3	3	3	0.58	80.40
4	2	1	2	3	0.44	80.10
5	2	2	3	1	0.50	80.49
6	2	3	1	2	0.54	79.76
7	3	1	3	2	0.55	79.61
8	3	2	1	3	0.52	78.34
9	3	3	2	1	0.51	79.02
乳酸含量	k1	0.517	0.490	0.513	0.497	
	k2	0.493	0.503	0.480	0.527	
	k3	0.527	0.543	0.543	0.513	
	R	0.034	0.053	0.063	0.030	
DPPH自由 基清除率	k1	79.267	79.267	78.733	79.200	
	k2	80.133	79.367	79.467	79.567	
	k3	78.967	79.733	80.167	79.600	
	R	1.166	0.466	1.434	0.400	

进行验证实验,测得金银花叶发酵凉茶乳酸含量为 0.56%, DPPH 自由基清除率为 80.41%±2.14%; 采用 A₂B₃C₃D₃ 进行验证实验,测得金银花叶发酵凉茶乳酸含量为 0.58%, DPPH 自由基清除率为 82.15%±2.45%; 采用 A₂B₂C₃D₁ 进行验证实验,测得金银花叶发酵凉茶乳酸含量为 0.55%, DPPH 自由基清除率为 80.94%。因此,金银花叶发酵凉茶最优工艺组合为 A₂B₃C₃D₃,即发酵时间为 24 h,发酵温度为 38 ℃,接种量为 4%,糖添加量为 7%。

2.3 活性成分与抗氧化性结果

绿原酸是金银花的代表性酚酸类药效成分^[32],作为含量最高的有机酸,其奠定了金银花抑菌消炎等保健基础^[33]。金银花中总黄酮是其发挥清除自由基、抗氧化作用的主要功能物质,具有天然、无毒、抗衰老等优点。DPPH 是一种具有 3 个苯环结构的人工合成的稳定自由基,易溶于乙醇溶液并在其中呈紫红色,于 517 nm 左右处有最大吸收。当与自由基清除剂共存时,DPPH 的颜色会减退,其褪色程度与自由基清除剂的清除能力及数量存在定量关系。由于 DPPH 法稳定性好、操作方便,目前已广泛应用于

表4 金银花叶凉茶与市场上三种凉茶活性成分与抗氧化活性对比

Table 4 Comparison of active ingredients and antioxidant activities between *Lonicera japonica* leaves herbal tea and three kinds of herbal tea on the market

种类	绿原酸 (%)	总黄酮 (%)	DPPH自由基 清除率(%)	ABTS自由基 清除率(%)
金银花叶凉茶	7.11±0.01 ^a	22.51±1.52 ^a	84.23±3.32 ^a	85.30±2.14 ^a
茶1	5.32±0.02 ^c	17.42±1.34 ^b	65.23±2.10 ^c	78.41±2.35 ^c
茶2	5.67±0.01 ^b	17.28±1.60 ^b	73.29±2.54 ^b	80.12±2.03 ^b
茶3	3.66±0.03 ^d	12.66±1.22 ^c	60.86±2.33 ^d	75.38±1.98 ^d

注:表中同一列不同字母代表差异显著($P<0.05$)。

体外抗氧化性评价。由于反应机制和特性差异,通常需要使用两种及以上方法来测定抗氧化能力。

因此,本实验对比了金银花叶凉茶与市场上三种凉茶绿原酸、总黄酮含量与抗氧化活性来判断金银花叶凉茶的品质。由表4可知,绿原酸含量及抗氧化活性均为金银花叶凉茶>市场茶2>市场茶1>市场茶3,且差异显著($P<0.05$),说明本研究金银花叶凉茶中活性成分相对较多,品质较好。

2.4 活性成分与抗氧化性相关性分析

由图5可知,金银花叶凉茶中绿原酸及总黄酮含量都与 DPPH 自由基清除率和 ABTS 自由基清除率呈正相关关系,相关系数均大于 0.9,表明绿原酸与黄酮类物质都属于金银花叶凉茶中有效抗氧化活性成分,金银花叶凉茶抗氧化活性的增加一部分原因是绿原酸、总黄酮等物质含量增加导致。

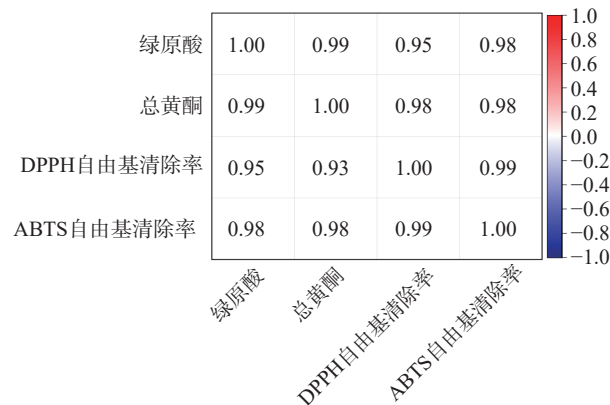


图5 绿原酸含量、总黄酮含量与 DPPH 自由基、ABTS 自由基清除率的相关性分析

Fig.5 Correlation analysis of chlorogenic acid content, total flavonoids content and DPPH, ABTS free radical clearance rate

2.5 香气成分的测定

选取本研究与市面中不同抗氧化能力和营养物质含量的四组茶(金银花叶茶、茶1、茶2、茶3)挥发性成分比较。结果如表5所示,四组金银花叶茶中挥发性物质共检出 42 种,主要分为 5 类(醇类、酯类、酸类、醛酮类、烷类),其中酯类和醇类是茶样中主要挥发性物质。本研究的金银花叶凉茶中共检测挥发性物质 32 种,茶1组 26 种,茶2组 22 种,茶3组 17 种。四组茶的差异性可能是因为不同发酵方式和处理工艺导致挥发性成分种类不一致。总体而言,金银花叶凉茶挥发性物质种类和含量较多,抗氧化能力突出,优于选取的三种市面茶种类,具有很好的营养价值和实用性,是一款功能性饮用茶。

采用主成分分析(principal component analysis)的方法对各组茶挥发性成分进行直观分析。由表6可知,主成分1、2累积贡献率达到76.9%,表明主要的香气成分得到了保留,可以反映原始变量的主要信息。PC1解释了44.9%的变异,PC2解释了32.0%的变异,由图6可知,四种凉茶香气成分明显不同,其中茶2、茶3距离比较近,说明这两种产品的相似程度

表 5 金银花叶凉茶与市场上三种凉茶挥发性成分比较
Table 5 Comparison of volatile components between *Lonicera japonica* leaves herbal tea and three kinds of herbal tea on the market

序号	挥发性化合物	金银花叶茶 (mg/L)	茶1 (mg/L)	茶2 (mg/L)	茶3 (mg/L)
A1	3-甲硫基丙醇	3.34	3.40	3.44	3.44
A2	苯乙醇	3.28	3.14	3.24	3.28
A3	1-辛醇	3.23	3.08	3.23	3.23
A4	2,3-丁二醇	—	3.23	3.08	6.45
A5	2-乙基己醇	2.94	—	—	2.94
A6	苯甲醇	3.31	—	—	—
A7	1-壬醇	3.19	—	—	—
A8	丙醇	2.76	—	—	—
A9	新薄荷醇	2.76	—	—	—
A10	正己醇	1.78	—	—	—
A11	(R)-1,2-丙二醇	—	3.05	—	—
A12	正丁醇	—	1.71	—	—
A13	3-甲基-1-戊醇	—	—	3.05	—
A14	庚酸乙酯	3.10	3.28	3.34	2.76
A15	辛酸乙酯	2.67	2.67	2.67	5.71
A16	正己酸乙酯	2.05	2.03	2.03	1.78
A17	乙酸异戊酯	1.93	1.93	1.93	1.78
A18	癸酸乙酯	3.31	3.38	3.38	—
A19	月桂酸乙酯	2.01	2.10	2.08	—
A20	棕榈酸乙酯	1.99	2.08	1.99	—
A21	乙酸乙酯	3.89	—	3.89	3.77
A22	乙酸苯乙酯	1.93	1.93	—	1.93
A23	壬酸乙酯	2.49	2.92	—	—
A24	乙酸己酯	—	1.84	1.84	—
A25	反式-2-己烯酸乙酯	2.79	—	—	—
A26	乙酸苄酯	2.05	—	—	—
A27	癸酸3-甲基丁酯	—	2.76	—	—
A28	丙酸-2-苯乙酯	—	—	2.86	—
A29	乙酸	1.93	1.95	1.95	1.95
A30	辛酸	2.80	2.80	—	2.46
A31	苯甲酸	6.00	—	—	—
A32	癸酸	—	2.76	—	—
A33	2-甲基四氢噻吩-3-酮	—	—	3.37	—
A34	十二甲基环六硅氧烷	5.75	2.86	2.67	2.55
A35	六甲基环三硅氧烷	2.80	8.29	5.97	5.97
A36	十甲基环五硅氧烷	2.67	5.59	2.80	5.31
A37	十四烷	5.68	2.49	2.80	—
A38	十二烷	2.95	—	8.29	5.28
A39	八甲基环四硅氧烷	2.97	3.10	—	—
A40	十六烷	—	2.80	—	—
A41	二十七烷	3.10	—	—	—
A42	2-亚甲基戊二腈	2.87	—	—	—

表 6 金银花叶凉茶主成分特征值及贡献率
Table 6 Characteristic values and contribution rates of principal components of *Lonicera japonica* leaves herbal tea

主成分	特征值	贡献率(%)
1	13.44	44.9
2	9.70	32.0

较高,而茶 1 和金银花叶茶与其他两种产品相距较远,说明茶 1 和金银花叶茶香气成分较为独特,这可能是由于它们含有的挥发性成分总量较大及种类较多的原因^[34]。2-乙基己醇、苯甲醇、1-壬醇、丙醇、新薄荷醇、正己醇是金银花叶茶中特征性醇类物质;反式-2-己烯酸乙酯、乙酸苄酯是金银花叶茶中特征性酯类物质;苯甲酸及二十七烷、2-亚甲基戊二腈等共同构成金银花叶茶特征性风味成分。

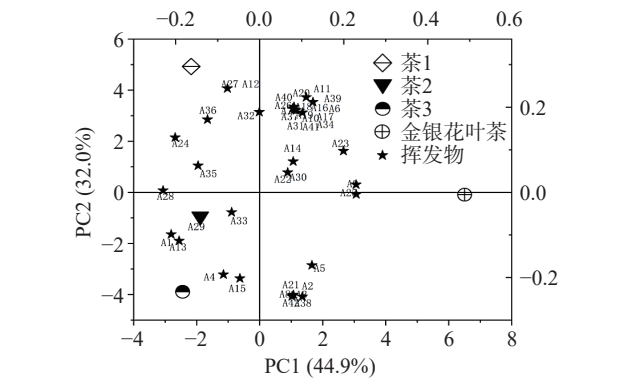


图 6 金银花叶凉茶挥发性成分主成分分析
Fig.6 Principal component analysis of volatile components of *Lonicera japonica* leaves herbal tea

2.6 感官品评

分别从口感、色泽及香气三个方面对金银花叶凉茶及茶 1、茶 2、茶 3 进行了感官品评。结果如图 7 所示。可看出,本研究金银花叶凉茶感官品评分数最高,达到了 85 分,这可能与乳酸菌发酵改善凉茶口感及色泽有关。

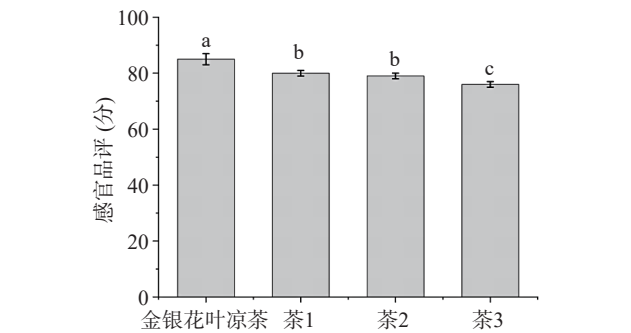


图 7 金银花叶凉茶感官品评
Fig.7 Sensory evaluation of *Lonicera japonica* leaves herbal tea

注: 图中不同小写字母表示差异显著 $P<0.05$ 。

3 讨论与结论

本研究首先按照料水比 1:60、浸提温度 80 ℃、浸提时间 40 min 的浸提条件制备金银花叶浸提液,将保加利亚乳酸杆菌(*L. plantarum* 758)进行渐进驯化培养并用于金银花叶凉茶发酵。以 DPPH 自由基清除率、ABTS 自由基清除率、乳酸含量为指标,利用直观分析法,分析了发酵工艺中发酵时间、发酵温度、乳酸菌接种量和糖添加量对金银花发酵凉茶工艺的影响并进行了正交工艺优化。得到最优工艺组合为:发酵时间 24 h、发酵温度 38 ℃、接种量 4% 及

糖添加量 7%。此时,金银花叶凉茶绿原酸含量达到 7.11%,总黄酮含量为 22.51%,DPPH 自由基清除率为 84.23%±3.32%,ABTS 自由基清除率为 85.30%±2.14%,均显著高于市场上的三种凉茶($P<0.05$);金银花叶凉茶中挥发性物质种类(32 种)及含量均高于选取的茶 1(26 种),茶 2(22 种),茶 3(17 种),表明按此工艺获得的金银花叶乳酸杆菌发酵叶凉茶具有良好的保健功能与酸甜适宜的口感。

在今后的研究中,可考虑采用两种或两种以上微生物混合发酵金银花叶浸提液,利用混菌发酵的协同增效作用,研究混菌发酵对金银花叶凉茶营养成分、风味物质的改善作用,本研究利用金银花叶发酵凉茶为提高金银花叶的附加产值提供新思考。

参考文献

- [1] XIAO O, LI M, CHEN D, et al. The dissipation, processing factors, metabolites, and risk assessment of pesticides in honeysuckle from field to table[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 431: 128519.
- [2] 朱文卿,任汉书,郑媛媛,等.金银花的功能性成分及其生物活性研究进展[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(13): 412-426. [ZHU W Q, REN H S, ZHENG Y Y, et al. Research progress on functional components and biological activity of honeysuckle[J]. *Food Industry Technology*, 2021, 42(13): 412-426.]
- [3] 邵佳,马海英.金银花制剂的抗病毒作用研究进展[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2022, 20(14): 200-203. [TAI J, MA H Y. Research progress on antiviral effects of honeysuckle preparations[J]. *Modern Distance Education in Chinese Medicine*, 2022, 20(14): 200-203.]
- [4] FENG Y F, QIN G Z, JING Z X, et al. Anaphylaxis effect and substance basis of honeysuckle extract[J]. *Chinese Herbal Medicines*, 2021, 13(3): 403-409.
- [5] BAO T, KARIM N, XIE L, et al. Simulated gastrointestinal digestion and colonic fermentation of blue honeysuckle: Phenolic profile and protectivity on ethyl carbamate-induced oxidative damage[J]. *Process Biochemistry*, 2022, 120: 74-84.
- [6] GONZÁLEZ-GÓMEZ L, PEREIRA J A, MORANTE-ZARCERO S, et al. Green extraction approach based on μ SPEd® followed by HPLC-MS/MS for the determination of atropine and scopolamine in tea and herbal tea infusions[J]. *Food Chemistry*, 2022, 394: 133512.
- [7] 李建勋,王玉珍,卢嘉,等.金银花中有机磷农药残留分析及其冲泡过程迁移模型研究[J]. *食品科学技术学报*, 2020, 38(3): 119-126. [LI J X, WANG Y Z, LU J, et al. Analysis of organophosphorus pesticide residues in honeysuckle and its migration model during brewing process[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2020, 38(3): 119-126.]
- [8] 胡凯基,王浩楠,袁卉霞.我国金银花研究进展浅析[J]. *河北北方学院学报(自然科学版)*, 2022, 38(7): 38-42. [HU K J, WANG H N, YUAN H F. Analysis of the research progress of honeysuckle in China[J]. *Journal of Hebei North University (Natural Science Edition)*, 2022, 38(7): 38-42.]
- [9] 王会娟.两种金银花茶加工工艺及品质特点研究[D].泰安: 山东农业大学, 2015. [WANG H J. Study on processing technology and quality characteristics of two kinds of honeysuckle tea[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2015.]
- [10] 罗磊,张冰洁,关宁宁,等.金银花叶黄酮对衰老模型小鼠的体内抗氧化作用[J]. *食品科学*, 2017, 38(19): 171-176. [LUO L, ZHANG B J, GUAN N N, et al. Antioxidant effect of honeysuckle leaf flavonoids on senescence model mice[J]. *Food Science*, 2017, 38(19): 171-176.]
- [11] 罗磊,董金龙,朱文学,等.金银花过氧化物酶的三相分离纯化及酶学性质[J]. *食品科学*, 2017, 38(24): 20-27. [LUO L, DONG J L, ZHU W X, et al. Three-phase isolation and purification of honeysuckle peroxidase and enzymatic properties[J]. *Food Science*, 2017, 38(24): 20-27.]
- [12] LIU X, LÜ Y, ZHENG M, et al. Polyphenols from blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* var. *edulis*) berry inhibit lipid accumulation in adipocytes by suppressing lipogenesis[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 279: 114403.
- [13] 李世传,杜华英,熊建华,等.金银花叶抑菌成分的提取及效果研究[J]. *食品研究与开发*, 2015, 36(6): 6-10. [LI S C, DU H Y, XIONG J H, et al. Extraction and effect of bacteriostatic components in honeysuckle leaves[J]. *Food Research and Development*, 2015, 36(6): 6-10.]
- [14] 田存章,贺新平,曹乐乐,等.金银花叶总黄酮不同提取方法比较及其抗氧化活性研究[J]. *生物化工*, 2021, 7(4): 53-56. [TIAN C Z, HE X P, CAO L L, et al. Comparison of different extraction methods of total flavonoids from honeysuckle leaf and its antioxidant activity[J]. *Biochemical Technology*, 2021, 7(4): 53-56.]
- [15] YIASMIN M N, ISLAM M S, EASDANI M, et al. Fermentability of maitake polysaccharides processed by various hydrothermal conditions and fermented with probiotic (*Lactobacillus*) [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 209: 1075-1087.
- [16] XU Y, XIE Q, ZHANG W, et al. *Lactobacillus plantarum* GMNL-662 and *Lactobacillus plantarum* 299v prevent osteoporosis in mice with colitis by down-regulating *Akkermansia* in the gut microbiome[J]. *Journal of Functional Foods*, 2022, 99: 105328.
- [17] 盛守新.乳酸菌胞外多糖佐剂提高金黄色葡萄球菌疫苗免疫效果的研究[D].呼和浩特:内蒙古大学, 2019. [SHENG S X. Study on the improvement of immune effect of lactic acid bacteria exopolysaccharide adjuvant on *Staphylococcus aureus* vaccine[D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2019.]
- [18] 左云洋,胡萍,许浩翔,等.乳酸菌 SR10-1 发酵刺梨汁对葡聚糖硫酸钠诱导小鼠溃疡性结肠炎的缓解作用[J/OL]. *食品科学*: 1-10 [2023-02-17]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20221110.2138.044.html>. [ZUO Y Y, HU P, XU H X, et al. Effect of fermented prickly pear juice by lactic acid bacteria SR10-1 on dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis in mice[J/OL]. *Food Science*: 1-10 [2023-02-17]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20221110.2138.044.html>.]
- [19] 杜景涛,郑贞,陈骏,等.党参枸杞复合饮料的制备及其抗氧化活性研究[J]. *保鲜与加工*, 2021, 21(2): 109-115, 121. [DU J T, ZHENG Z, CHEN J, et al. Study on preparation and antioxidant

activity of *Codonopsis* wolfberry compound drink[J]. *Preservation and Processing*, 2021, 21(2): 109–115, 121.]

[20] 白桂英, 叶淑红, 王琛柳, 等. 黑枸杞乳酸菌饮料发酵工艺优化及功能性成分研究[J]. *中国酿造*, 2022, 41(4): 157–162. [BAI G Y, YE S H, WANG C B, et al. Optimization of fermentation process and functional components of lactic acid bacteria beverage with black goji berries[J]. *China Brewing*, 2022, 41(4): 157–162.]

[21] 陈康, JOO O Y, 李洪军, 等. 金银花乳杆菌发酵凉茶的研制[J]. *食品科学*, 2016, 37(3): 131–136. [CHEN K, JOO O Y, LI H J, et al. Development of fermented herbal tea with *Lactobacillus* honeysuckle[J]. *Food Science*, 2016, 37(3): 131–136.]

[22] 卢超, 陈景鲜, 王国霞, 等. 基于 AHP-CRITIC 的 D-最优混料设计优化一款金银花茶饮[J]. *中国食品添加剂*, 2022, 33(7): 144–151. [LU C, CHEN J X, WANG X G, et al. D-optimal mixture design based on AHP-CRITIC optimizes a honeysuckle tea drink[J]. *China Food Additives*, 2022, 33(7): 144–151.]

[23] 马懿, 陈晓娟, 古丽珍, 等. 高压脉冲电场辅助提取紫薯酒渣花色苷[J]. *食品工业*, 2020, 41(8): 68–71. [MA Y, CHEN X J, GU Z L, et al. Anthocyanins from purple sweet potato lees assisted by high-voltage pulsed electric field[J]. *Food Industry*, 2020, 41(8): 68–71.]

[24] 许陈思菡, 沈周媛, 袁琢越, 等. 藤茶总黄酮提取工艺优化与抗氧化活性物质基础研究[J]. *现代食品*, 2022, 28(11): 31–36, 41. [XU C S H, SHEN Z Y, YUAN Z Y, et al. Optimization of total flavonoid extraction process and basic study of antioxidant active substances in vine tea[J]. *Modern Food*, 2022, 28(11): 31–36, 41.]

[25] 刁体伟, 陈晓娟, 冷银江, 等. 植物源多酚对梨酒抗氧化能力及其感官品质的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(23): 93–101. [DIAO T W, CHEN X J, LENG Y J, et al. Effects of plant-derived polyphenols on antioxidant capacity and sensory quality of pear wine[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2022, 48(23): 93–101.]

[26] 刘佳奇, 熊涛, 李军波, 等. 乳酸菌发酵茶饮料的工艺优化及其发酵前后香气成分分析[J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(8): 109–114. [LIU J Q, XIONG T, LI J B, et al. Process optimization of lactic acid bacteria fermented tea beverage and analysis of aroma composition before and after fermentation[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2016, 42(8): 109–114.]

[27] BAI X, HAN M, YUE T, et al. Control of post-acidification and shelf-life prediction of apple juice fermented by *Lactobacillus* [J]. *Food Control*, 2022, 139: 109076.

[28] 杜冰, 姜龙波, 刘长海, 等. 木瓜发酵乳酸饮料的研究[J]. *食品科学*, 2008, 29(11): 752–755. [DU B, JIANG L B, LIU C H, et al. Study on papaya fermented lactic acid beverage[J]. *Food Science*, 2008, 29(11): 752–755.]

[29] 葛磊. 燕麦发酵饮料的研制[D]. 无锡: 江南大学, 2012. [GE L. Development of oat fermented beverages[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2012.]

[30] 郝恩光, 谭海生, 杨劲松, 等. 响应面法优化益生菌发酵香蕉金针菇饮料的工艺研究[J]. *中国酿造*, 2018, 37(9): 185–190. [XI E G, TAN H S, YANG J S, et al. Technology optimization of probiotic fermented banana and *Flammulina velutipes* beverage by response surface methodology[J]. *China Brewing*, 2018, 37(9): 185–190.]

[31] 徐安书, 胡敏, 何军. 茎瘤芥叶胡萝卜混合汁复合乳酸菌发酵饮料的研制[J]. *食品科学*, 2012, 33(14): 321–325. [XU A S, HU M, HE J. Development of fermented beverage with lactic acid bacteria mixed with carrot mixture[J]. *Food Science*, 2012, 33(14): 321–325.]

[32] 乐薇, 孔京华, 刘诗诗, 等. 基于破点分子印迹纸芯片法测定金银花绿原酸含量[J]. *食品科学*, 2022, 43(16): 253–260. [LE W, KONG J H, LIU S S, et al. Determination of honeysuckle chlorogenic acid content based on carbon point molecularly printed paper chip method[J]. *Food Science*, 2022, 43(16): 253–260.]

[33] 丁敏, 王丽玲, 秦玉川, 等. 金银花中绿原酸的水提取工艺研究[J]. *浙江林业科技*, 2022, 42(2): 15–20. [DING M, WANG L L, QIN Y C, et al. Study on water extraction process of chlorogenic acid from honeysuckle[J]. *Zhejiang Forestry Science and Technology*, 2022, 42(2): 15–20.]

[34] 曾鸣, 曾辉, 荣光, 等. 8 种市售金银花露饮料的挥发性化合物测定分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(23): 8942–8951. [ZENG M, ZENG H, RONG G, et al. Determination and analysis of volatile compounds of eight commercially available honeysuckle beverages[J]. *Journal of Food Safety and Quality Inspection*, 2020, 11(23): 8942–8951.]