

王迪, 王颖, 张艳莉, 等. 芸豆酵素发酵过程中组分及抗氧化功能研究 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(18): 18–24. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020120042

WANG Di, WANG Ying, ZHANG Yanli, et al. Components and Antioxidant Activity during the Fermentation Process of Kidney Bean Jiaosu[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(18): 18–24. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020120042

· 研究与探讨 ·

# 芸豆酵素发酵过程中组分及抗氧化功能研究

王 迪<sup>1</sup>, 王 颖<sup>1,2,3,4,\*</sup>, 张艳莉<sup>1</sup>, 佐兆杭<sup>1</sup>, 刘淑婷<sup>1</sup>, 张 裕<sup>1</sup>, 李志芳<sup>1</sup>

(1. 黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江大庆 163319;

2. 国家杂粮工程技术研究中心, 黑龙江大庆 163319;

3. 粮食副产物加工与利用教育部工程研究中心, 黑龙江大庆 163319;

4. 黑龙江省农产品加工与质量安全重点实验室, 黑龙江大庆 163319)

**摘要:**以紫花芸豆为原料制备芸豆酵素, 探究其发酵过程中 pH、总酸、还原糖、可溶性固形物、总酚、黄酮含量的变化规律, 并分析各成分与抗氧化活性参数(还原力、ABTS<sup>+</sup>自由基清除率)的相关性。结果表明, 芸豆酵素发酵过程中 pH 持续降低后趋于平缓趋势, 总酸变化规律与之相反; 还原糖含量由发酵初期小幅度上升至 11.2 mg/mL, 随之不断下降并于发酵 48 h 达到最低值 3.55 mg/mL; 可溶性固形物含量由 17.07% 持续降低至 6.01%; 总酚含量总体呈现上升趋势, 仅在发酵 32 h 有所下降, 并于发酵结束达到最大值 367.92 mg/mL; 黄酮含量呈现持续升高趋势并于发酵 48 h 达到 92.24 μg/mL 后趋于稳定, 芸豆酵素的抗氧化能力(还原力、ABTS<sup>+</sup>自由基清除率)总体呈现持续增长趋势并于发酵后期达稳定状态, 分别于发酵 56 h 时达到最大值(0.88 μmol/L、88.12%)。功能成分与抗氧化能力参数相关性表明, 总酚、黄酮与还原力和 ABTS<sup>+</sup>自由基清除能力具有显著的正相关性 ( $P < 0.05$ )。

**关键词:**芸豆, 酵素, 代谢产物, 抗氧化活性, 相关性

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)18-0018-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020120042



本文网刊:

## Components and Antioxidant Activity during the Fermentation Process of Kidney Bean Jiaosu

WANG Di<sup>1</sup>, WANG Ying<sup>1,2,3,4,\*</sup>, ZHANG Yanli<sup>1</sup>, ZUO Zhaohang<sup>1</sup>, LIU Shuting<sup>1</sup>, ZHANG Yu<sup>1</sup>, LI Zhifang<sup>1</sup>

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

2. National Coarse Cereals Engineering Research Center, Daqing 163319, China;

3. Engineering Research Center of Processing and Utilization of Grain By-Products, Ministry of Education, Daqing 163319, China;

4. Key Laboratory of Agro-Products Processing and Quality Safety of Heilongjiang Province, Ministry of Education, Daqing 163319, China)

**Abstract:** Kidney bean Jiaosu was prepared from purple kidney bean, pH, total acid, reducing sugar, soluble solid, total phenol and flavone were used as evaluation indexes of active constituents, and the variation rule of each component content were explored, the correlation between each component in the fermentation process and antioxidant activity parameters (reduction power, ABTS free radical scavenging rate) was analyzed. The results showed that during the fermentation

收稿日期: 2020-12-07

**基金项目:**国家重点研发计划项目“杂粮产业链一体化示范”(2020YFD1001400);国家重点研发计划项目“杂粮食品精细化加工关键技术合作研究及应用示范”(2018YFE0206300);黑龙江省自然科学基金研究团队项目“杂粮与主粮复配科学基础及慢病干预机制”(TD2020C003);黑龙江省“杂粮生产与加工”优势特色学科资助项目(黑教联[2018]4号);黑龙江省自然科学基金面上项目(C2018047);黑龙江八一农垦大学“三横三纵”科研团队支持计划——杂粮营养与质量安全创新团队(TDJH201806)。

**作者简介:**王迪(1996-),女,硕士研究生,研究方向:食品科学,Email:disansui@126.com。

\*通信作者:王颖(1979-),女,博士,教授,研究方向:农产品加工与贮藏工程及食品质量安全,Email:wychen@156.com。

process of kidney bean Jiaosu, pH decreased continuously and then tended to be flat, the change law of total acid was opposite. The content of reducing sugar increased from the initial stage of fermentation to 11.2 mg/mL, subsequently, it kept decreasing and reached the minimum value of 3.55 mg/mL after 48 h fermentation. The soluble solid content decreased from 17.07% to 6.01%. The total phenol content showed an upward trend on the whole, decreased only at 32 h of fermentation, and reached a maximum of 367.92 mg/mL at the end of fermentation. The flavones content showed a trend of continuous increase and tended to be stable after fermentation for 48 h, reaching 92.24 g/mL. The antioxidant capacity of kidney bean Jiaosu (reducing power, ABTS free radical scavenging rate) showed a continuous growth trend and reached a stable state in the late fermentation period, reaching the maximum value (0.88, 88.12%) at 56 h of fermentation. The correlation between functional components and antioxidant capacity parameters showed that the total phenols and the flavones were significantly positively correlated with reducing power and ABTS<sup>+</sup> free radical scavenging capacity ( $P < 0.05$ ).

**Key words:** kidney bean; Jiaosu; metabolism products; antioxidant activity; correlation

现如今越来越多消费者追求营养的多样性、易于吸收性和平衡性, 酵素发酵饮料作为新型功能性食品逐渐被大众喜爱。食用酵素是以一种或多种新鲜果蔬、豆谷类、药食两用食材等为原料, 经多种益生菌发酵制得的富含酶、益生菌、矿物质和次生代谢产物等营养成分的功能性微生物发酵产品<sup>[1-2]</sup>, 具有解酒护肝<sup>[3-4]</sup>、美白抗氧化<sup>[5-7]</sup>、降糖降脂<sup>[8-10]</sup>等功效。

芸豆(*Phaseolus vulgaris* Linn)学名菜豆, 属蝶形花科的小宗杂粮作物<sup>[11]</sup>, 是栽培面积仅次于黄豆的豆类农作物<sup>[12]</sup>。芸豆富含蛋白质、维生素、皂苷等营养成分, 芸豆膳食纤维<sup>[13]</sup>、山奈酚<sup>[14-15]</sup>、槲皮素<sup>[16]</sup>可持续性调控机体糖代谢紊乱, 改善胰腺组织内质网应激及线粒体功能, 维持血糖水平稳态。芸豆抗性淀粉<sup>[17]</sup>、 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂<sup>[18]</sup>可以降低高脂血症大鼠血脂代谢水平, 改善氧化应激并调控肠道微生物平衡。黄酮类化合物对心血管疾病<sup>[19-20]</sup>、癌症<sup>[21-22]</sup>等老年疾病有积极的预防、缓解和治疗作用。芸豆提取物还具有补肾利气、抗炎抑菌<sup>[23-24]</sup>、利尿消肿等多种功效, 是开发功能性食品的优质原料。

基于芸豆主要以鲜食为主, 存在加工形式及企业较少、综合利用程度差等问题, 同时目前鲜见复合益生菌发酵芸豆酵素的研究, 其代谢产物及抗氧化能力亦没有报道。监测发酵体系代谢产物及抗氧化活性, 是反映芸豆酵素发酵进程、产品品质和营养价值的重要依据。因此, 本文以芸豆酵素为研究对象, 研究不同发酵时间代谢产物变化规律, 分析其抗氧化能力, 为芸豆高值利用及精深加工产业链提供新思路, 同时为综合开发兼具芸豆和益生菌营养保健价值的芸豆酵素产品提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

紫花芸豆 黑龙江省黑河市; 白砂糖 市售; 安琪牌活性干酵母 湖北安琪酵母股份有限公司; 植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) 东北农业大学菌库; 嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*) 中国工业微生物菌种保藏中心; 耐高温  $\alpha$ -淀粉酶(20000 U/mL)、糖化酶(10000 U/mL) 上海源叶生物科技有限公司; 2,4,6-三吡啶基三嗪(TPTZ) 北京中生瑞

泰科技有限公司; 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS) 美国 Sigma 公司; 葡萄糖、氯化铁、氢氧化钠、福林酚(10%)、碳酸钠、3,5-二硝基水杨酸、亚硝酸钠、硝酸铝、无水乙醇 国产分析纯试剂。

BS224S 电子天平 赛多利斯科学仪器有限公司; JYL-Y912 料理机 九阳股份有限公司; S220 pH 计 瑞典波通仪器公司; DGG-9023A 电热鼓风干燥箱 上海森信实验仪器有限公司; V-5100B 可见分光光度计 上海元析仪器有限公司; HH-1S 数显电热恒温水浴锅 上海达洛科学仪器有限公司; DRP-9082 电热恒温培养箱 上海培因实验仪器有限公司; YXQ-30SII 立式压力蒸汽灭菌器 济南捷岛分析仪器有限公司; H1850R 冷冻离心机 湖南湘仪仪器有限公司; BCV-6S1 超净工作台 浙江赛德仪器设备有限公司; ATC-32 手持式折光仪 上海淋誉贸易有限公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 工艺流程

芸豆去皮清洗→打浆均质→液化→糖化→离心→灭菌→接种→发酵→后发酵

1.2.2 菌种的活化与培养 取甘油保存的菌液 100  $\mu$ L 于 MRS 液体培养基中, 37  $^{\circ}$ C 恒温培养 24 h, 无菌操作台中划线接入 MRS 固体培养基中培养(37  $^{\circ}$ C, 24 h), 连续接种 3 代, 使其充分活化。挑取斜面培养基生长较好菌落接种至液体培养基中培养(37  $^{\circ}$ C, 24 h), 摇匀后移取 10%(v/v)菌液至液体培养基(37  $^{\circ}$ C, 24 h), 得到扩大培养的乳酸菌菌悬液, 待用。活性干酵母于 10 倍体积蒸馏水中溶解, 30~35  $^{\circ}$ C 恒温水浴锅中活化 30 min, 待用。

1.2.3 芸豆酵素的制备 紫花芸豆清洗后去皮, 按 1:3(g/mL)料水比打浆。双酶法进行水解, 液化条件: $\alpha$ -淀粉酶添加量 200  $\mu$ L/100 mL、pH6.0、酶解温度 97  $^{\circ}$ C、时间 20 min; 糖化条件: 加酶量 200  $\mu$ L/100 mL、pH4.5、温度 60  $^{\circ}$ C、时间 30 min。酶解液于高速离心机中以  $1.0 \times 10^4$  r/min 离心 15 min, 得到芸豆清汁。调清汁 pH4.0, 添加 6% 白砂糖后灭菌。接种 0.2%

酵母菌于 32 ℃ 恒温振荡预发酵 24 h, 再接种 3% 复配乳酸菌(植物乳杆菌:嗜酸乳杆菌=1:1)32 ℃ 恒温发酵 24 h。4 ℃ 后发酵并保藏。分别在发酵 0、8、16、24、32、40、48、56 h 时取样, 离心后取上清液, 待测。

**1.2.4 pH 和总酸含量的测定** 采用精密 pH 计测定不同发酵时间的芸豆酵素的 pH。参考 GB/T 12456-2008《食品中总酸的测定方法》测定各样品总酸含量。

**1.2.5 还原糖含量的测定** 采用 3,5-二硝基水杨酸法进行测定<sup>[25]</sup>。取 0.05、0.01、0.15、0.20、0.25、0.30 mL 葡萄糖标准溶液(1 mg/mL)于 10 mL 试管中, 去离子水补至 1 mL, 加入 3 mL DNS 试剂, 混匀后在沸水浴中加热 5 min, 冷却后定容至 10 mL, 室温放置 30 min, 去离子水作为空白对照, 520 nm 下测定吸光度, 绘制标准曲线。取稀释待测液, 按照标准曲线步骤测定吸光度, 根据标准曲线线性方程  $y=0.1218x-0.1523$ ,  $R^2=0.9952$  计算发酵液中还原糖含量(以葡萄糖计)。

**1.2.6 可溶性固形物的测定** 使用折光仪测定各样品可溶性固形物含量。打开进光板, 用柔软绒布将折光棱镜擦拭干净。将蒸馏水数滴, 滴在折光棱镜上, 轻轻合上进光板, 使溶液均匀分布于棱镜表面, 并将仪器进光板对准光源或明亮处, 调整明暗分界线置于零位。擦净蒸馏水, 取一滴芸豆酵素溶液代替蒸馏水滴于折光棱镜上, 记录视场相应刻度值。

**1.2.7 总酚含量的测定** 采用 Folin-Ciocalteus 法测定<sup>[26]</sup>, 200  $\mu$ L 样品溶液与 0.5 mL 福林酚混匀, 加入 2.3 mL 去离子水, 放置 1 min 后加入 7.5%(g/mL)碳酸钠溶液 2 mL, 混匀, 室温下暗反应 2 h。测定 760 nm 波长下的吸光度值, 去离子水代替样品作为空白对照。没食子酸(0~250  $\mu$ g/mL)标准溶液的线性回归方程为  $y=0.0045x-0.0022$ ( $R^2=0.9905$ )。

**1.2.8 黄酮含量的测定** 采用  $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$  比色法测定<sup>[27]</sup>。取 500  $\mu$ L 待测发酵液, 加入 5%  $\text{NaNO}_2$  溶液 150  $\mu$ L, 摇匀静置 6 min。加入 10%  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  溶液 150  $\mu$ L, 摇匀静置 6 min。再加入 4%  $\text{NaOH}$  溶液 2 mL, 95% 乙醇定容, 摇匀静置 15 min, 510 nm 处测吸光值。

**1.2.9 抗氧化活性的测定**

**1.2.9.1 还原力的测定** 参照武悦等<sup>[28]</sup>的方法制备 FRAP 试剂。1 mL 发酵原液与 5 mL FRAP 试剂混合, 37 ℃ 水浴中反应 10 min, 以去离子水为空白对照, 于 593 nm 处测定吸光度值。 $\text{FeSO}_4$ (0~50  $\mu$ mol/L)标准溶液的线性回归方程为  $y=0.0307x-0.0132$ ( $R^2=0.9975$ )。

**1.2.9.2 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除能力的测定** 参照白海娜等<sup>[29]</sup>的方法制备 ABTS 溶液, 1.5 mL 酵素原液中加入 1.5 mL ABTS 溶液, 蒸馏水代替 ABTS 溶液作

为对照管, 蒸馏水代替酵素原液作为空白管, 室温避光放置 6 min, 734 nm 测定其吸光度, 计算公式如下:

$$\text{清除率}(\%) = [A_1 - (A_2 - A_3)] / A_1 \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中:  $A_1$ : 1.5 mL ABTS 溶液与 1.5 mL 蒸馏水的吸光度值;  $A_2$ : 1.5 mL ABTS 溶液与 1.5 mL 酵素原液的吸光度值;  $A_3$ : 1.5 mL 酵素原液与 1.5 mL 蒸馏水的吸光度值。

### 1.3 数据处理

试验均进行 3 次重复操作, 所有数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。采用 Origin 8.0 等软件对数据进行处理与分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 pH 和总酸含量的变化

pH 是衡量发酵过程是否正常的重要条件, 酸度是衡量酵素成熟度及发酵液品质的主要指标之一<sup>[30]</sup>。由图 1 可知, 发酵液 pH 随着发酵时间的延长而不断降低, 总酸含量则逐渐升高。经 48 h 发酵, 芸豆酵素 pH 由 4.01 降低至 3.44, 总酸含量从发酵初期 0.03 g/100 mL 至后期增至 0.57 g/100 mL。发酵前期总酸含量增幅明显, 分析原因该阶段酵母菌大量增殖, 在厌氧条件下利用发酵液中的糖原产生  $\text{CO}_2$  及乙醇, 部分  $\text{CO}_2$  溶于发酵液, 同乳酸作用, 降低发酵液 pH 的同时增加总酸含量。接种乳酸菌后其分泌酶水解发酵液中碳源为单糖后进一步利用产生大量乳酸、苹果酸等有机酸, 导致发酵液 pH 持续降低, 总酸含量稳定增长。芸豆酵素发酵 56 h 时, 发酵液营养物质基本被完全消耗, 乳酸菌利用有机酸作为代替碳源来维持自身增殖代谢等生物过程, 使得总酸含量小幅度升高。发酵体系含多种有机酸, 可抑制部分有害菌的生长, 同时形成了芸豆酵素的独特风味<sup>[31]</sup>。

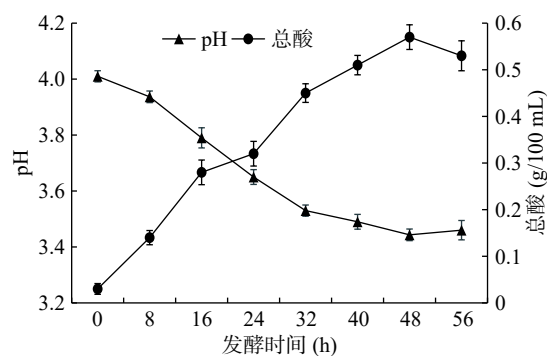


图 1 芸豆酵素发酵过程中 pH、总酸含量变化  
Fig.1 Changes of pH and total acid content in the fermentation process of kidney bean Jiaosu

### 2.2 还原糖含量与可溶性固形物含量的变化

糖作为碳源是微生物发酵的重要营养物质, 其含量的变化是反应酵素液中微生物活动情况的指标之一<sup>[32]</sup>。由图 2 所示, 还原糖含量仅在前 8 h 呈现上升趋势, 而后随着发酵时间的延长而不断降低。这可能是由于发酵初期优势菌种酵母菌在蔗糖酶的作用下将蔗糖转化为果糖和葡萄糖, 使发酵液中还原糖含

量增加。发酵 8~24 h 时, 还原糖含量下降较快, 该阶段酵母菌已适应此时发酵环境, 大量的葡萄糖和果糖被利用生成乙醇用于代谢生长。发酵液中果糖等游离糖利于乳酸菌等厌氧微生物增殖生长, 接种乳酸菌其自身分泌  $\beta$ -半乳糖苷酶等水解酶分解乳糖成葡萄糖和半乳糖, 并通过糖酵解等代谢途径将葡萄糖转化成乳酸, 还原糖逐渐减少。发酵 48 h 时, 还原糖含量为 3.55 mg/mL 并趋于平缓, 证明发酵已基本结束。

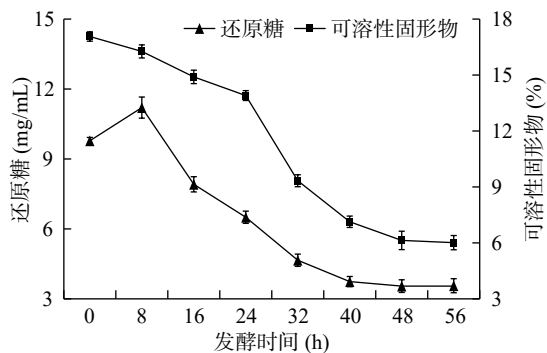


图 2 芸豆酵素发酵过程中还原糖、可溶性固形物含量变化  
Fig.2 Changes of reducing sugar and soluble solids content in the fermentation process of kidney bean Jiaosu

可溶性固形物含量可较为直观反映发酵液品质, 若含量过高, 发酵体系渗透压升高易破坏发酵菌种细胞壁及细胞膜特性, 导致生长周期停滞或凋亡; 含量过低, 发酵液口感酸, 影响产品风味<sup>[33]</sup>。由图 2 可知, 芸豆酵素可溶性固形物含量随发酵时间的延长持续下降并趋于稳定, 经 48 h 的发酵, 发酵液中可溶性固形物含量由 17.07% 降低至 6.13%, 发酵体系环境适宜, 营养物质充足, 微生物在该阶段迅速繁殖, 大量且持续利用碳水化合物, 使得芸豆酵素可溶性固形物含量逐渐降低。

### 2.3 总酚与黄酮含量的变化

芸豆酵素发酵过程中总酚含量的变化见图 3。总酚含量在发酵阶段呈先迅速上升后小幅度下降而后继续增长的趋势。杨小幸等<sup>[30]</sup>研究表明发酵体系中酚类物质含量的变化与发酵原料、发酵工艺条件及微生物种类密切相关。与未发酵清汁相比, 发酵 24 h 的芸豆酵素总酚含量显著增长约 1.4 倍, 分析原因是原料中酚类物质溶出, 其一发酵前期发酵液营养物质充足, 微生物大量繁殖代谢产生次生代谢产物, 这些有机酸及酶类可溶出芸豆中的酚类物质; 其二高糖浓度形成高渗透压体系, 导致原料大量酚类物质的溶出并呈游离态<sup>[34]</sup>。发酵 32 h 时, 总酚含量略微降低, 可能是由于多酚类物质具有抑菌效果, 一定浓度的酚类物质会抑制微生物的生长<sup>[35]</sup>, 因此发酵液中优势菌种会产生降解酚类的物质来维持自身正常繁殖代谢。此外, 蛋白质可以与多酚类物质的多元氢键和疏水键发生反应, 也是可能造成多酚含量下降的因素之一<sup>[36]</sup>。随着发酵时间的延长, 部分微生物逐渐适应发酵环境中的高浓度酚, 将一些大分子酚类物质降解

为单体酚或小分子量酚类物质<sup>[34]</sup>, 发酵 56 h 时, 发酵液总酚含量进一步增长至 367.90 mg/mL。

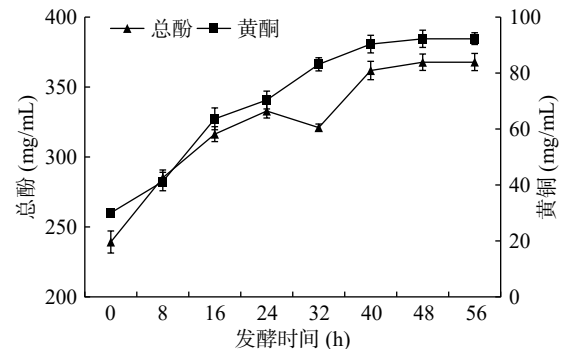


图 3 芸豆酵素发酵过程中总酚、黄酮含量变化  
Fig.3 Changes of total phenol content and flavonoid content during fermentation of kidney bean Jiaosu

由图 3 可知, 芸豆酵素发酵过程中总黄酮含量呈现持续升高的趋势, 由初期 30.02 mg/mL 迅速上升至 56 h 的 92.31 mg/mL, 增涨约 3 倍且具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。发酵前期优势菌种酵母菌生长代谢旺盛产生乙醇, 溶解了大部分不溶或难溶于水的黄酮类物质, 造成发酵液黄酮含量的迅速增加。整个发酵过程中, 发酵体系中黄酮类物质始终以不同速率累积, 一方面, 发酵液的高渗环境及微生物的活动致使植物细胞破裂, 原料中抗氧化物质渗出与合成, 同时酵母菌及乳酸菌代谢产生酶系将部分碳源转化为可以发生显色反应的邻苯二酚结构<sup>[37]</sup>。另一方面, 发酵后期糖苷与游离态黄酮类物质结合的黄酮醇配糖体被水解, 造成发酵液黄酮类物质含量的进一步升高<sup>[38]</sup>。

### 2.4 还原力的变化

由图 4 可知, 接种酵母菌和乳酸菌后, 发酵液还原力均显著高于未发酵清汁, 且还原力随发酵时间的延长呈现不断上升的变化趋势。分析原因, 酵母菌和乳酸菌均可通过产生 NADH 氧化酶、SOD、GSH-Px 等过氧化酶类物质清除活性氧<sup>[39]</sup>。酵母菌单独发酵时, 还原力最高可达 0.72  $\mu\text{mol/L}$ , 可能是由于酵母菌自身含有的细胞壁多糖能够清除如超氧阴离子自由基等活性氧。发酵 56 h 时, 芸豆酵素还原力为 0.88  $\mu\text{mol/L}$ , 乳酸菌自身具备的抗氧化能力主要是

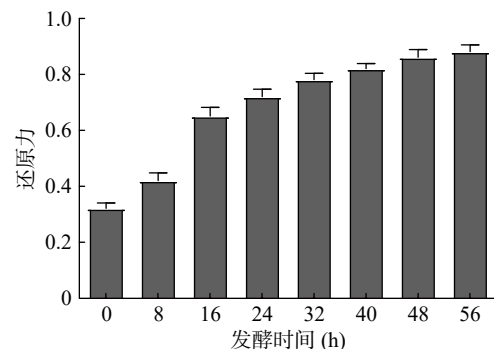


图 4 芸豆酵素发酵过程中还原力变化  
Fig.4 Reduction force changes during fermentation of kidney bean Jiaosu

表1 芸豆酵素发酵过程中各参数相关性

Table 1 Correlation of various parameters in the fermentation process of kidney bean Jiaosu

类别	pH	TAN	TRS	TSS	TF	TP	RP	HR
pH	1	-0.990**	0.976**	0.953**	-0.992**	-0.938**	-0.981**	-0.957**
TAN	/	1	-0.956**	-0.961**	0.993**	0.956**	0.979**	0.958**
TRS	/	/	1	0.948**	-0.963**	-0.878**	-0.948**	-0.898**
TSS	/	/	/	1	-0.938**	-0.881**	-0.902**	-0.850**
TF	/	/	/	/	1	0.959**	0.993**	0.977**
TP	/	/	/	/	/	1	0.963**	0.964**
RP	/	/	/	/	/	/	1	0.988**
HR	/	/	/	/	/	/	/	1

注: TAN、TRS、TSS、TF、TP、RP、HR分别表示指标总酸、还原糖、可溶性固形物、总酚、黄酮、还原力、ABTS; “\*”表示显著相关( $P<0.05$ ); “\*\*”表示极显著相关( $P<0.01$ )。

代谢产物及菌体表面的抗氧化物质发挥作用。范昊安等<sup>[40]</sup>研究表明相较于发酵初期, 苹果梨酵素的还原力显著升高。适当的延长发酵时间有利于芸豆酵素还原力的增强。

### 2.5 ABTS<sup>+</sup>自由基清除率的变化

ABTS 是一种稳定存在的自由基, 可与抗氧化成分发生反应而使体系褪色, 清除自由基能力由样品对其吸光度的影响所反映<sup>[41]</sup>。芸豆酵素发酵过程中 ABTS<sup>+</sup>自由基清除率的变化如图 5 所示, 发酵过程中 ABTS<sup>+</sup>自由基清除率呈现先快速上升后趋于平缓的趋势。发酵前 32 h, ABTS<sup>+</sup>自由基清除率从 30.01% 迅速上升至 82.49%, 随后以小幅度趋势上升至发酵后期趋于平缓, 整个发酵过程芸豆酵素 ABTS<sup>+</sup>自由基清除率增涨约 3 倍。研究表明<sup>[30]</sup>, ABTS 自由基清除能力与高浓度酚类、有机酸等物质的芳香环数量、分子数量和羟基取代基的性质密切相关。Floegel 等<sup>[42]</sup>发现酚类化合物与 ABTS<sup>+</sup>自由基清除率存在密切关系, 分析其可能是造成芸豆酵素具有高 ABTS<sup>+</sup>自由基清除能力的主要因素。

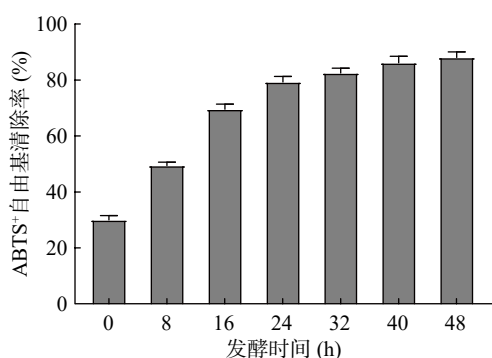


图5 芸豆酵素发酵过程中 ABTS<sup>+</sup>自由基清除率变化  
Fig.5 ABTS<sup>+</sup> radical scavenging rate during kidney bean fermentation

### 2.6 相关性分析

芸豆酵素复合发酵过程中还原糖、总酚、黄酮等功能成分与还原力、ABTS<sup>+</sup>自由基清除率相关性分析结果如表 1 所示。还原力与 ABTS<sup>+</sup>自由基清除率呈现极显著正相关性( $P<0.01$ ), 与周偏等<sup>[36]</sup>对诺丽酵素的研究结果一致。芸豆酵素黄酮与还原力呈极

显著正相关( $r=0.99, P<0.01$ ), 与 ABTS<sup>+</sup>自由基清除率呈极显著正相关( $r=0.98, P<0.01$ ); 总酚与还原力、ABTS<sup>+</sup>自由基清除率均呈极显著正相关( $r=0.96, P<0.01$ ), 表明黄酮类物质和多酚类物质是芸豆酵素发酵过程中重要的抗氧化物质。

### 3 结论

探究芸豆酵素发酵过程中代谢产物含量以及抗氧化活性的动态变化规律, 结果表明, pH 呈现持续下降的趋势, 总酸变化趋势与之相反。发酵初期还原糖含量小幅度上升后不断降低至 3.56 mg/mL。发酵 56 h 时可溶性固形物含量达到最低 6.01%。总酚含量总体呈现上升趋势, 仅在发酵 32 h 时略微降低。与未发酵芸豆清汁相比, 发酵 48 h 的芸豆酵素黄酮含量显著提高 3 倍( $P<0.05$ )。还原力和 ABTS<sup>+</sup>自由基清除率呈现迅速升高后趋于平缓的趋势, 发酵大幅度提升芸豆酵素的抗氧化能力, 抗氧化活性的提高与总酚和黄酮含量的变化显著正相关( $P<0.05$ )。代谢产物含量的变化规律可以较为直观反映发酵体系周期进程以及发酵液生物活性物质积累情况。芸豆酵素代谢产物和抗氧化性的研究可为酵素产品的开发及推广利用提供一定的理论依据及数据支持。

### 参考文献

- [1] 文浩, 郑序影, 代佳丽, 等. 温度对水果酵素发酵性能的影响[J]. 中国食品学报, 2020, 20(2): 189-195. [Wen H, Zheng X Y, Dai J L, et al. Effect of temperature on fermentation performance of fruit enzyme[J]. Chinese Journal of Food Science, 2020, 20(2): 189-195.]
- [2] 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. [Jiang Z L, Liu X Q, Wang Z Z, et al. Analysis of organic acids of grape enzyme and its antioxidant activity *in vitro*[J]. Chinese Journal of Food Science, 2017, 17(5): 255-262.]
- [3] 杨志鹏, 周宝琳, 刘新利, 等. 一种具有潜在解酒护肝功能酵素的开发及其生物活性评价[J]. 食品科技, 2019, 44(1): 154-159. [Yang Z P, Zhou B L, Liu X L, et al. Development and bioactivity evaluation of an enzyme with potential antialcoholism and hepatoprotective function[J]. Food Science and Technology, 2019, 44(1): 154-159.]
- [4] 曲佳乐, 赵金凤, 皮子凤, 等. 植物酵素解酒护肝保健功能研

- 究[J]. 食品科技, 2013, 38(9): 51-55. [Qu J L, Zhao J F, Pi Z F, et al. Study on the function of plant enzyme to cure alcohol and protect liver[J]. 2013, 38(9): 51-55.]
- [5] 田中清隆, 王力群, 白井祐史, 等. 李子酵素分解物 Clairju 在美白化妆品中的应用研究[J]. 日用化学品科学, 2014, 37(11): 31-35. [Tianzhong Q L, Wang L Q, Jiuqing Y S, et al. Study on application of plum-enzyme decomposing clairju in whitening cosmetics[J]. Household Chemicals Science, 2014, 37(11): 31-35.]
- [6] Yan Y H, Zhang F, Chai Z Y, et al. Mixed fermentation of blueberry pomace with *L. rhamnosus* GG and *L. plantarum*-1: Enhance the active ingredient, antioxidant activity and health-promoting benefits[J]. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 2019, 131: 110541.
- [7] Shao Y, Wang L, Chen C S, et al. Antioxidant capacity of fermented soybeans and their protective effect on protein oxidation in largemouth bass(*Micropterus salmoides*) during repeated freezing-thawing(FT) treatments[J]. *LWT*, 2018, 91: 213-221.
- [8] Cao C X, Wu R, Zhu X Y, et al. Ameliorative effect of *Lactobacillus plantarum* WW-fermented soy extract on rat fatty liver via the PPAR signaling pathway[J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 60: 103439.
- [9] Zhang Y, Sun Q, Li Z W, et al. Fermented soybean powder containing *Bacillus subtilis* SJLH001 protects against obesity in mice by improving transport function and inhibiting angiogenesis[J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 59: 60-70.
- [10] Gao H, Wen J J, Hu J L, et al. Fermented *Momordica charantia* L. juice modulates hyperglycemia, lipid profile, and gut microbiota in type 2 diabetic rats[J]. *Food Research International (Ottawa Ont)*, 2019, 121: 367-378.
- [11] 刘淑婷, 王颖, 王志辉, 等. 不同品种芸豆淀粉及其抗性淀粉结构和物化特性比较[J]. 中国食品学报, 2020, 20(4): 49-56. [Liu S T, Wang Y, Wang Z H, et al. Comparison of structure, physicochemical properties of kidney bean starch and its resistant starch of different varieties[J]. Chinese Journal of Food Science, 2020, 20(4): 49-56.]
- [12] 马萍, 程天赋, 郭增旺, 等. 紫花芸豆肽修复 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 HepG2 细胞的氧化应激损伤[J]. 食品科学, 2020, 41(1): 175-182. [Ma P, Cheng T F, Guo Z W, et al. Repair of oxidative stress injury of HepG2 cells induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with purple kidney bean peptides[J]. *Food Science*, 2020, 41(1): 175-182.]
- [13] Pérez-Ramírez Iza F, Becerril-Ocampo Laura J, Reynoso-Camacho Rosalía, et al. Cookies elaborated with oat and common bean flours improved serum markers in diabetic rats[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2018, 98(3): 998-1007.
- [14] Zhang Y L, Liu D M. Flavonol kaempferol improves chronic hyperglycemia-impaired pancreatic beta-cell viability and insulin secretory function[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2011, 670(1): 325-332.
- [15] Zhang Z F, Ding Y, Dai X Q, et al. Epigallocatechin-3-gallate protects proinflammatory cytokine induced injuries in insulin-producing cells through the mitochondrial pathway[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2011, 670(1): 311-316.
- [16] Alona Yurchenko, Daryna Krenytska, Olexii Savchuk, et al. The evaluation of lipid peroxidation and oxidative modification of proteins in blood serum under obesity development and the consumption of aqueous kidney beans *Phaseolus vulgaris* pods extract[J]. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 2020, 33(1): 38-44.
- [17] Tanaka Miku, Honda Yuji, Miwa Shoji, et al. Comparison of the effects of roasted and boiled red kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on glucose/lipid metabolism and intestinal immunity in a high-fat diet-induced murine obesity model[J]. *Journal of Food Science*, 2019, 84(5): 1180-1187.
- [18] 陈一昆, 李钦, 赵璿, 等. 芸豆提取物  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂对 SD 大鼠的减肥效果研究[J]. 食品科技, 2012, 37(10): 207-210. [Chen Y K, Li Q, Zhao J, et al. Effect of  $\alpha$ -amylase inhibitor of kidney bean extract on weight loss in SD rats[J]. Food Science and Technology, 2012, 37(10): 207-210.]
- [19] Prasain J K, Carlson S H, Wyss J M. Flavonoids and age-related disease: Risk, benefits and critical windows[J]. *Maturitas*, 2010, 66(2): 163-171.
- [20] Bondonno Nicola P, Dalgaard Frederik, Kyrø Cecilie, et al. Flavonoid intake is associated with lower mortality in the Danish diet cancer and health cohort.[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 3651.
- [21] Chuwa Agapiti Hipoliti, Sone Kenbun, Oda Katsutoshi, et al. Kaempferol, a natural dietary flavonoid, suppresses 17 $\beta$ -estradiol-induced survivin expression and causes apoptotic cell death in endometrial cancer[J]. *Oncology Letters*, 2018, 16(5): 6195-6201.
- [22] Jana Neuwirthová, Břetislav Gál, Pavel Smilek, et al. Potential of the flavonoid quercetin to prevent and treat cancer-current status of research[J]. *Klinicka Onkologie: Casopis Ceske A Slovenske Onkologicke Spolecnosti*, 2018, 31(3): 184-190.
- [23] Mukta Roy, Ayesha Sarker, Md Abul Kalam Azad, et al. Evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of dark red kidney bean(*Phaseolus vulgaris*) protein hydrolysates[J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2020, 14(1): 303-313.
- [24] Gan R Y, Deng Z Q, Yan A X, et al. Pigmented edible bean coats as natural sources of polyphenols with antioxidant and antibacterial effects[J]. *LWT*, 2016, 73: 168-177.
- [25] 邵颖, 陈安徽, 陈尚龙, 等. 植物酵素发酵过程中理化成分变化规律及其对果蝇寿命的影响[J]. 现代食品科技, 2018, 34(3): 25-31. [Shao Y, Chen A H, Chen S L, et al. Changes of physicochemical components of plant enzymes during fermentation and their effects on life span of *Drosophila melanogaster*[J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(3): 25-31.]
- [26] 蒋增良, 毛建卫, 黄俊, 等. 葡萄糖素在天然发酵过程中体外抗氧化性能的变化[J]. 中国食品学报, 2014, 14(10): 29-34. [Jiang Z L, Mao J W, Huang J, et al. Changes of antioxidant activity of grape enzyme *in vitro* during natural fermentation[J]. Chinese Journal of Food Science, 2014, 14(10): 29-34.]
- [27] 化志秀, 芦艳, 鲁周民, 等. 红枣醋发酵阶段主要成分及抗氧化性的变化[J]. 中国食品学报, 2013, 13(8): 248-253. [Hua Z X, Hu Y, Lu Z M, et al. Changes of main components and

- antioxidant activity of jujube vinegar during fermentation[J]. Chinese Journal of Food Science, 2013, 13(8): 248-253.]
- [28] 武悦, 赵婧, 王坤, 等. 黑豆丹贝发酵前后香气、酚类物质及抗氧化活性分析[J]. 核农学报, 2021, 35(2): 396-405. [Wu Y, Zhao J, Wang K, et al. Analysis of aroma, phenolic compounds and antioxidant activity of black bean and red shellfish before and after fermentation[J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 2021, 35(2): 396-405.]
- [29] 白海娜, 王振宇, 刘瑞海, 等. 白藜芦醇与黑木耳多糖协同清除 ABTS 自由基活性的研究[J]. 现代食品科技, 2014, 30(3): 64-68. [Bai H N, Wang Z Y, Liu R H, et al. Synergistic scavenging activity of resveratrol and *Auricularia auricula* polysaccharide on ABTS free radicals[J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(3): 64-68.]
- [30] 杨小幸, 周家春, 陈启明, 等. 苹果酵素天然发酵过程中代谢产物的变化规律[J]. 食品科学, 2017, 38(24): 15-19. [Yang X X, Zhou J C, Chen Q M, et al. Changes of metabolites during natural fermentation of apple enzyme[J]. Food Science, 2017, 38(24): 15-19.]
- [31] 郭红莲, 邢紫娟, 余巧银, 等. 天然枸杞酵素发酵的代谢产物分析[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(5): 48-55. [Guo H L, Xing Z J, Yu Q Y, et al. Analysis of metabolites from fermentation of natural *Lycium barbarum*[J]. Food Research and Development, 2018, 39(5): 48-55.]
- [32] 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. Study on the components and antioxidant activity of hawthorn enzyme during fermentation[J]. Food Research and Development, 2018, 39(22): 15-19.]
- [33] 吕慧威, 孙玉梅, 卢明春, 等. 自选酵母菌株草莓酒发酵特性比较[J]. 食品科学, 2010, 31(11): 197-201. [Lu H W, Sun Y M, Lu M C, et al. Comparison of fermentation characteristics of strawberry wine from self-selected yeast strains[J]. Food Science, 2010, 31(11): 197-201.]
- [34] 陈小伟, 范昊安, 张婷, 等. 咖啡果皮酵素发酵过程中代谢产物与抗氧化功能评价[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(9): 18-25. [Chen X W, Fan H A, Zhang T, et al. Evaluation of metabolites and antioxidant function of coffee pericarp enzymes during fermentation[J]. Food Research and Development, 2019, 40(9): 18-25.]
- [35] 陈小伟, 程勇杰, 蒋立新, 等. 草莓酵素发酵过程中代谢产物及抗氧化性的变化研究[J]. 中国食品学报, 2020, 20(5): 157-165. [Chen X W, Cheng Y J, Jiang L X, et al. Study on the changes of metabolites and antioxidant activity during strawberry fermentation[J]. Chinese Journal of Food Science, 2020, 20(5): 157-165.]
- [36] 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. Study on the changes of antioxidant activity and quality of nonolinase *in vitro* during natural fermentation[J]. China Brewing, 2018, 37(1): 92-96.]
- [37] 陈树俊, 郑婕. 响应面优化开菲尔粒发酵复合果蔬汁工艺及体外消化特性分析[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(3): 150-158. [Chen S J, Zheng J. Response surface optimization of kefir fermentation process and *in vitro* digestion characteristics of compound fruit and vegetable juice[J]. Food Research and Development, 2020, 41(3): 150-158.]
- [38] 李楠. 山楂果酒发酵过程中品质特性的变化规律[J]. 食品工业, 2019, 40(3): 60-63. [Li N. Changes of quality characteristics of hawthorn fruit wine during fermentation[J]. Food Industry, 2019, 40(3): 60-63.]
- [39] 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, Yi L, Sun S G, et al. Study on biological characteristics and antioxidant activity of Chinese jujube enzyme during fermentation[J]. Food and Fermentation Technology, 2014, 50(4): 30-33.]
- [40] 范昊安, 沙如意, 方晟, 等. 苹果梨酵素发酵过程中的褐变与抗氧化活性[J]. 食品科学, 2020, 41(14): 116-123. [Fan H A, Shao Y Y, Fang S, et al. Browning and antioxidant activity in apple pear during fermentation[J]. Food Science, 2020, 41(14): 116-123.]
- [41] 韦仕静, 刘涛, 葛亚中, 等. 西兰花酵素在发酵过程中生化指标变化及其抗氧化活性研究[J]. 现代食品科技, 2017, 33(8): 123-129. [Wei S J, Liu T, Ge Y Z, et al. Study on changes of biochemical indices and antioxidant activity of broccoli enzyme during fermentation[J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(8): 123-129.]
- [42] 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.