

盐地碱蓬发酵动力学模型构建及抗氧化功能评价

徐晶¹, 赵学群², 王珍珍³, 殷树鹏¹, 沈晓艳⁴, 沙如意^{3,*}, 毛建卫^{3,*}

(1. 山东科技职业学院生物与化学工程系, 山东 潍坊 261053;

2. 北京中医药养生工程研究院, 北京 102200; 3. 浙江科技学院生物与化学工程学院, 浙江 杭州 310023;

4. 潍坊高新生物园发展有限公司, 山东 潍坊 261205)

摘要: 对盐地碱蓬发酵过程中不同发酵时间的酵母菌、乙醇、还原糖、pH值、可滴定酸、总酚等代谢产物及羟自由基清除率、超氧阴离子自由基清除率、还原力等抗氧化指标进行跟踪检测, 研究其发酵动力学和抗氧化能力。采用SGompertz、DoseResp、Logistic和Boltzmann模型建立盐地碱蓬发酵动力学模型; 利用相关性分析与主成分分析法构建盐地碱蓬发酵的综合评价指标体系。结果表明, 用DoseResp和Boltzmann方程建立酵母菌生长动力学模型, 用SGompertz方程建立乙醇产量生成动力学模型, 用Logistic方程建立还原糖基质消耗动力学模型, 拟合系数 R^2 分别为0.977、0.995、0.982, 均呈良好拟合效果; 相关性分析结果表明, 总酚和有机酸是盐地碱蓬发酵液中抗氧化能力主要来源; 主成分分析表明, 综合评价指标呈先升高趋于稳定再下降的趋势, 综合考虑发酵终点为第8天。该研究揭示了盐地碱蓬发酵过程中代谢产物以及抗氧化活性的变化规律, 为盐地碱蓬发酵液的精准制备提供理论基础。

关键词: 盐地碱蓬; 发酵; 代谢产物; 动力学模型; 抗氧化功能; 综合评价指标

Fermentation Kinetic Modeling and Antioxidant Evaluation of *Suaeda salsa*

XU Jing¹, ZHAO Xuequn², WANG Zhenzhen³, YIN Shupeng¹, SHEN Xiaoyan⁴, SHA Ruyi^{3,*}, MAO Jianwei^{3,*}

(1. Department of Biological and Chemical Engineering, Shandong Vocational College of Science and Technology, Weifang 261053, China; 2. Beijing Traditional Chinese Medicine Health Engineering Research Institute, Beijing 102200, China; 3. School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science & Technology, Hangzhou 310023, China; 4. Weifang High-tech Biomedical Park Development Co. Ltd., Weifang 261205, China)

Abstract: The changes of yeast count, ethanol, reducing sugar, pH, titratable acidity and total phenols as well as antioxidant properties such as hydroxyl and superoxide anion radical scavenging activities and reducing power during *Suaeda salsa* fermentation by yeast were studied. The SGompertz, DoseResp, Logistic and Boltzmann models were used to investigate the fermentation kinetics. Meanwhile, a comprehensive evaluation index (CEI) system of *S. salsa* fermentation was developed by correlation analysis (CA) and principal component analysis (PCA). The growth kinetic model of yeast was established using the DoseResp and Boltzmann equations, the kinetic model of ethanol production was established using the SGompertz equation, and the kinetic model of reducing sugar consumption was established using the Logistic equation. The fitting coefficients (R^2) of these models were 0.977, 0.995 and 0.982, respectively, indicating excellent goodness of fit. CA showed that total phenols and organic acid were the major contributors to the antioxidant capacity of fermented *S. salsa*. PCA showed that the CEI value increased first, then leveled off, and finally decreased. The fermentation endpoint was on the eighth day in overall consideration. The results of this study provide a theoretical basis for the precision preparation of fermented *S. salsa*.

Keywords: *Suaeda salsa*; fermentation; metabolites; kinetic model; antioxidant activity; comprehensive evaluation index

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220413-153

中图分类号: TS255

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2023) 06-0172-08

收稿日期: 2022-04-13

基金项目: 中国博士后科学基金项目 (2018M632475); 潍坊市科技发展计划项目 (2021GX040)

第一作者简介: 徐晶 (1981—) (ORCID: 0000-0002-6514-9055), 女, 讲师, 博士, 研究方向为天然产物的研究及应用。

E-mail: jingx1981@126.com

*通信作者简介: 沙如意 (1982—) (ORCID: 0000-0002-3505-1225), 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

毛建卫 (1964—) (ORCID: 0000-0002-4371-9301), 男, 教授, 硕士, 研究方向为农业生物资源生化制造。

E-mail: zjhmjw@163.com

引文格式:

徐晶, 赵学群, 王珍珍, 等. 盐地碱蓬发酵动力学模型构建及抗氧化功能评价[J]. 食品科学, 2023, 44(6): 172-179.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220413-153. <http://www.spkx.net.cn>

XU Jing, ZHAO Xuequn, WANG Zhenzhen, et al. Fermentation kinetic modeling and antioxidant evaluation of *Suaeda salsa*[J]. Food Science, 2023, 44(6): 172-179. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220413-153.

<http://www.spkx.net.cn>

盐地碱蓬 (*Suaeda salsa*), 又名黄须菜、赤碱蓬, 藜科碱蓬属一年生草本植物, 生于盐碱荒地上, 耐盐能力强^[1-2], 是一种食用价值和药用价值都很高的野生植物^[3]。盐地碱蓬含有丰富的微量元素、维生素、氨基酸和蛋白质等营养元素, 以及总酚、多糖、黄酮等抗氧化成分^[4], 具有抗炎、抗氧化、降糖、降脂、抗癌等效能^[5-6]。研究发现其对羟自由基具有很强的消除作用, 对1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基和超氧阴离子自由基具有一定的抑制作用^[7]。长期以来人们把盐地碱蓬当作普通的野菜使用, 目前对盐地碱蓬的开发仅限于传统食品物理加工水平^[8-11], 尚鲜见生物加工研究的应用, 存在产品附加值低等问题。运用微生物发酵技术对其进行高值化开发研究, 深入讨论发酵过程中活性物质和抗氧化能力的变化, 选取合适的综合评价指标 (comprehensive evaluation index, CEI) 确定发酵状态, 可进一步增强其营养价值及保健功效。

本研究以盐地碱蓬为原料进行发酵, 探究酵母菌的生长动力学模型、乙醇产量生成动力学模型、还原糖基质消耗动力学模型, 通过跟踪检测发酵过程中总酚、可滴定酸含量和pH值的变化, 确定其与抗氧化指标的相关性, 构建不同时间段的盐地碱蓬发酵CEI体系, 确定最佳发酵时间, 旨在为盐地碱蓬发酵产品开发和精准制备提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

盐地碱蓬, 2021年10月采于山东潍坊滨海地区。

酵母粉 (食品级) 徐州大自然食品有限公司; 发酵糖浆 (果葡糖浆-酵母浸膏质量比10:1); 吩嗪硫酸甲酯 (phenazine methosulfate, PMS)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)、硝基四氮咪唑蓝 (nitro blue tetrazolium chloride monohydrate, NBT) 上海麦克林生化科技有限公司; 3,5-二硝基水杨酸 (化学纯)、没食子酸 (标准品) 上海士锋生物科技有限公司; 重铬酸钾、酒石酸钾钠、硫酸亚铁、福林-酚、氢氧化钠、水杨酸钠、三氯乙酸、结晶酚、无水亚硫酸钠、无水碳酸钠、硫酸、乙醇、H₂O₂、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、三氯化铁、铁氰化钾均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

TU-1810紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司; CX31RTSF生物显微镜 奥林巴斯 (中国) 有限公司; PHS-3E pH计 上海仪电科学仪器股份有限公司; 316型10L不锈钢发酵罐 杭州源缘圆酵素科技有限公司; GI100DS立式自动压力蒸汽灭菌器 致微 (厦门) 仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 盐地碱蓬发酵工艺流程

工艺流程: 盐地碱蓬→去腐枝→清洗、切碎→加入发酵糖浆→灭菌→接种→恒温厌氧发酵→发酵液→样品测定。

选用无腐烂的盐地碱蓬茎叶, 无菌水清洗, 自然沥干后切碎, 按照盐地碱蓬-发酵糖浆-水质量比2:1:6比例混匀, 60℃条件下杀菌30 min, 冷却至室温, 接种1%活化后的酵母菌, 加入到已灭菌的15 L发酵罐中, 封口, 置于干燥阴凉处发酵29 d。每天取样, 样品4 000 r/min离心10 min, 取上清液, -20℃保存, 待测。

1.3.2 发酵动力学模型的建立

采用血球计数板测定酵母菌浓度; 采用重铬酸钾氧化分光光度法测定乙醇含量^[12], 乙醇标准曲线方程为 $y=0.471x+0.013$, $R^2=0.995$, 其中 y 为吸光度, x 为质量浓度 (mg/mL); 采用3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量^[13], 葡萄糖标准曲线方程为 $y=0.979x-0.001$, $R^2=0.998$, 其中 y 为吸光度, x 为质量浓度 (mg/mL)。

1.3.3 总酚含量测定

采用福林-酚法^[14]。将发酵液稀释20倍, 取0.5 mL, 加入2.5 mL的10% (V/V) 福林-酚溶液, 避光静置3 min, 加入2 mL 27.5 g/L Na₂CO₃溶液, 混匀, 25℃反应1 h, 于765 nm波长处测吸光度, 没食子酸标准曲线方程为 $y=0.008x+0.001$, $R^2=0.999$, 其中 y 为吸光度, x 为质量浓度 (mg/L)。

1.3.4 可滴定酸含量及pH值测定

采用滴定法测定可滴定酸含量^[15], 取2 mL上清液稀释至20 mL, 分别移取样品稀释液5 mL、去离子水25 mL, 酚酞指示剂2滴于锥形瓶中, 用已经标定的氢氧

化钠溶液进行滴定；每1 mL氢氧化钠滴定液（0.1 mol/L）相当于6.404 mg枸橼酸（ $C_6H_8O_7$ ），滴定终点为30 s内不褪色，重复测定3次。参照GB/T 10468—1989《水果和蔬菜产品pH值的测定方法》测定pH值。

1.3.5 抗氧化能力评价

1.3.5.1 超氧阴离子自由基清除能力测定

采用PMS/NADH体系还原NBT法^[16]。取盐地碱蓬发酵液50 μ L，加入到950 μ L磷酸缓冲液（0.1 mol/L，pH 7.4）中，再加入1 mL 120 μ mol/L PMS溶液、1 mL 936 μ mol/L NADH溶液和1 mL 300 μ mol/L NBT溶液，反应5 min，去离子水作参比，于560 nm波长处测吸光度。其中PMS、NADH和NBT溶液均用0.1 mol/L pH 7.4的磷酸缓冲液配制。超氧阴离子自由基清除率按式（1）计算：

$$\text{超氧阴离子自由基清除率}/\% = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

式中： A_0 为空白对照液吸光度； A_1 为样品测定管吸光度； A_2 为样品本底管吸光度。

1.3.5.2 羟自由基清除能力测定

采用Fenton法^[17]。取盐地碱蓬发酵液335 μ L，加入到1.4 mL 6 mmol/L H_2O_2 溶液中，再加0.6 mL 20 mmol/L水杨酸钠溶液和2 mL 1.5 mmol/L硫酸亚铁溶液，在37 $^{\circ}$ C恒温水浴1 h，以去离子水为参比，于562 nm波长处测定吸光度。

$$\text{羟自由基清除率}/\% = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

式中： A_0 为空白对照液吸光度； A_1 为样品测定管吸光度； A_2 为样品本底管吸光度。

1.3.5.3 还原力测定

采用铁氰化钾法^[18]。取盐地碱蓬发酵液30 μ L，加入到2.5 mL磷酸缓冲液（0.2 mol/L，pH 6.6）中，再加2.5 mL 10 g/L铁氰化钾溶液，50 $^{\circ}$ C反应30 min，凉水冷却，然后加入2.5 mL 100 g/L三氯乙酸溶液，迅速摇匀，离心后取2.5 mL上清液，加入2.5 mL去离子水和0.5 mL 1 g/L三氯化铁溶液，去离子水为参比溶液，于700 nm波长处测定吸光度。

1.4 数据处理和分析

使用Origin 9.0软件对不同发酵时间代谢产物和抗氧化性能指标的变化情况进行绘图，数据用 $\bar{x} \pm s$ （ $n=3$ ）表示；应用Origin 9.0软件中SGompertz模型、DoseResp模型、Logistic模型和Boltzmanm模型对实验测得的菌数量、乙醇含量和还原糖含量数据进行非线性拟合，选取拟合度高的动力学模型进行定量描述；应用Excel进行数据统计，SPSS 20软件进行相关性分析及主成分分析（principal component analysis, PCA）。

2 结果与分析

2.1 代谢产物及抗氧化能力变化

2.1.1 酵母菌浓度、还原糖含量和乙醇含量变化

了解发酵过程中菌体生长、底物消耗和产物生成之间的动态平衡和内在规律^[19-20]，有利于进一步探索各发酵参数之间联系，为发酵工艺控制提供参考。

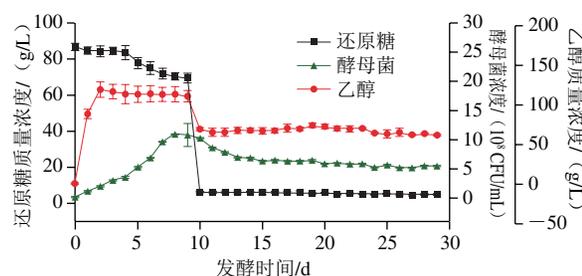


图1 发酵过程中酵母菌浓度、乙醇含量、还原糖含量的变化曲线

Fig. 1 Changes in yeast concentration, ethanol content and reducing sugar content during fermentation

如图1所示，在发酵的前7 d，由于营养物质充足，酵母菌快速进入对数生长期；第8天达到稳定期，随后酵母菌数增速放缓，最高达到 1.090×10^8 CFU/mL；第10天开始进入衰亡期，随着底物的逐渐消耗，酵母细胞能量消耗殆尽，在自身酶的作用下发生自溶导致数量减少。

还原糖质量浓度随发酵时间的延长而减少，在0~9 d逐渐降低到69.350 g/L，到第10天迅速降为6.150 g/L，此时还原糖基本被酵母菌消耗，与酵母菌体的生长曲线时间点相一致，变化较为显著。在实际生产过程中，可以通过检测盐地碱蓬发酵液的还原糖含量，判断发酵进行的程度。

乙醇质量浓度在0~2 d增长迅速，达117.880 g/L，3 d后趋于平稳，10 d后迅速降至68.090 g/L，后趋于平稳。发酵前期，酵母菌作为优势菌群利用糖类物质代谢生成乙醇，随着酵母菌的衰亡，乙醇被其他优势菌群消耗生成乳酸、醋酸等^[21]。因此乙醇的变化可能与酵母菌的生长周期相关。

2.1.2 可滴定酸含量与pH值变化

发酵过程中，酸度在一定程度上反映微生物生长代谢情况，是衡量发酵液成熟度的理化指标，pH值是判断发酵过程是否正常的重要指标之一。盐地碱蓬发酵过程中可滴定酸含量与pH值随时间变化如图2所示。

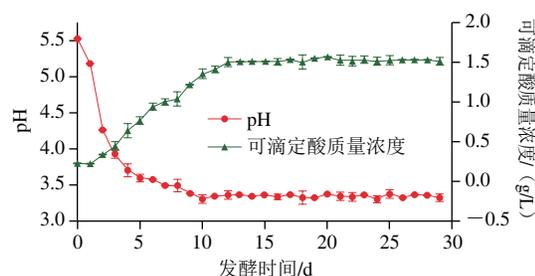


图2 发酵过程中pH值与可滴定酸含量变化

Fig. 2 Changes in pH and total titratable acidity during fermentation

在发酵过程中,可滴定酸含量先明显上升再动态平衡,pH值先迅速下降后趋于平衡。在发酵0~10 d,可滴定酸质量浓度由0.220 g/L快速升高到1.220 g/L,pH值由5.530迅速下降到3.380,可能是由于在此期间,盐地碱蓬在高渗透压下有机酸的大量溶出,而且发酵初期营养成分丰富,有利于微生物代谢产生乳酸、醋酸等次生代谢产物^[22]。10 d后,pH值基本趋于平衡,到12 d,可滴定酸质量浓度增至1.510 g/L后趋于稳定。可滴定酸含量与pH值趋于稳定的时间差别与盐地碱蓬中新产生的有机酸的缓冲性有关。发酵至10 d,随着底物的消耗、pH值的降低,酵母菌开始进入衰亡期,其繁殖代谢有机酸受到影响,另外,发酵后期乳酸发酵占主导,将多元酸降解成一元酸,导致总酸上升趋势受到影响^[23]。

2.1.3 总酚含量变化

酚类物质具有抗氧化活性^[24],盐地碱蓬发酵过程中总酚含量随时间变化如图3所示。在发酵过程中,总酚含量呈现先增加后降低,最后趋于动态平衡的变化趋势。发酵0~8 d,总酚质量浓度呈上升趋势,第8天急速上升达最高值0.860 g/L,在这个时期微生物生长代谢旺盛,消耗原料成分进而转化成酚类物质,使得盐地碱蓬中总酚含量增加。9 d之后总酚质量浓度开始下降,到12 d降至0.700 g/L,后维持动态平衡,可能由于这个阶段酚类含量到达一定质量浓度后会抑制益生菌生长^[25],微生物为了生长产生消耗酚类的物质,降解部分酚类物质,最终维持酚类物质含量平衡。

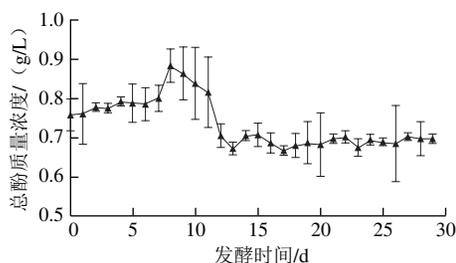


图3 发酵过程中总酚含量变化

Fig. 3 Changes in total phenolic content during fermentation

2.1.4 羟自由基清除率

羟自由基能够引起间充质干细胞以及DNA的氧化损伤^[26],其清除率是体现发酵液抗氧化能力的重要指标之一。如图4所示,随着发酵时间的延长,盐地碱蓬发酵液的羟自由基清除率在2~8 d之间迅速上升,在第8天达到最高,为57.430%,相对发酵起始提高了18.580%。之后羟自由基清除率降低,到12 d降至52.720%后达到动态平衡,可能是由于微生物的衰亡造成的。由此可见,在发酵0~8 d内适当延长发酵时间有利于提高羟自由基清除能力。有研究表明,酚类物质可以提供大量氢离子,

通过共振杂化趋于稳定,从而促进自由基清除能力的提高^[27]。另外,酵母菌细胞壁上多糖具有一定的羟自由基清除力,因此盐地碱蓬发酵液的羟自由基清除能力可能与酚类、多糖等代谢产物有关。

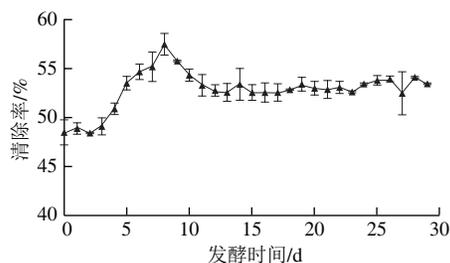


图4 盐地碱蓬发酵液对羟自由基的清除率

Fig. 4 Hydroxyl radical scavenging effect of fermented *S. salsa*

2.1.5 超氧阴离子自由基的清除率

超氧阴离子自由基在单线态氧、过氧化氢等活性氧物质的形成中起着重要作用,这些物质可以导致脂类、蛋白质和核酸等氧化损伤^[28]。如图5所示,随着发酵时间的延长,超氧阴离子自由基清除率呈先增加后降低的趋势,在第8天达到最高,为75.900%,相对发酵起始提高了26.000%,随后到12 d降至57.830%后达到动态平衡,有研究发现,超氧阴离子自由基的清除力可能与带有羟基的酚类和部分黄酮类物质相关^[29]。因此,超氧阴离子自由基清除率的变化可能与发酵过程中酚类及黄酮含量变化有关。

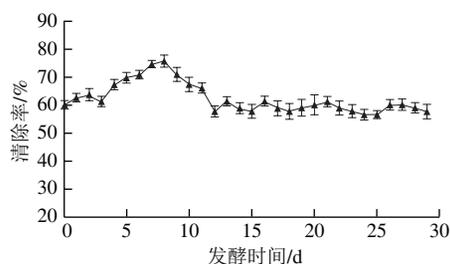


图5 盐地碱蓬发酵液对超氧阴离子自由基的清除率

Fig. 5 Superoxide anion scavenging effect of fermented *S. salsa*

2.1.6 还原力

还原力是一种综合性抗氧化评价指标,与多种抗氧化机理相关,在一定范围内,还原力越大,抗氧化活性越强^[30]。如图6所示,随着发酵时间的延长,还原力呈现先降低后增加又降低的趋势,这与上述两种抗氧化指标的趋势有相似性,但仍存在差别。在发酵前期,还原力降低后呈增加趋势,第9天达到最高0.140,相对发酵起始提高了3.970%,维持3 d后开始降低,到12 d达到0.110,后维持动态平衡。研究表明,还原力不仅与自由基清除能力有关,还与过氧化物的分解、过多金属离子催化剂

等多种抗氧化机理相关^[31]。因此,还原力的变化较好反映了发酵过程中抗氧化能力的变化。

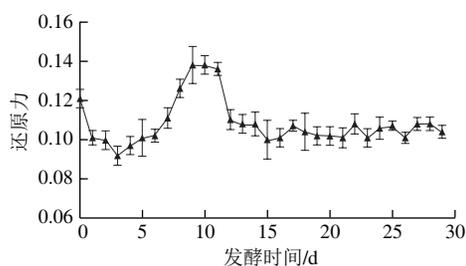


图6 盐地碱蓬发酵过程中还原力的变化

Fig. 6 Changes in reducing power of *S. salsa* during fermentation

2.2 盐地碱蓬发酵动力学模型的建立

酵母菌在0~9 d处于对数生长期以及稳定期,10 d后进入菌体衰亡期,底物消耗逐渐减弱,这也预示着发酵基本完成。本研究拟对0~9 d区间建立酵母菌的发酵动力学模型。采用经典“S”模型中的SGompertz模型、DoseResp模型、Logistic模型和Boltzmann模型对不同发酵时间盐地碱蓬发酵液中酵母菌的生长、乙醇产量生成、还原糖基质消耗情况进行非线性拟合,选取拟合效果较好的模型对发酵过程进行定量描述,建立发酵动力学模型。

2.2.1 酵母菌生长动力学模型

采用SGompertz模型、DoseResp模型、Logistic模型及Boltzmann模型对发酵过程中酵母菌生长情况进行拟合(表1),拟合系数分别为0.975、0.977、0.968、0.977,DoseResp和Boltzmann模型的拟合系数一致,均高于其他两种模型,拟合度较好。

表1 酵母菌生长的拟合方程

Table 1 Fitting equations with correlation coefficients for yeast count

模型	拟合方程	拟合系数 R^2
SGompertz	$y = 17.447e^{-e^{-0.28(x-1.80)}}$	0.975
DoseResp	$y = 0.006 + \frac{12.948}{1 + 10^{(5.503-x) \times 0.242}}$	0.977
Logistic	$y = \frac{-20.437}{1 + (\frac{x}{8.456})^{2.104}} + 21.050$	0.968
Boltzmann	$y = \frac{-12.948}{1 + e^{\frac{x-5.503}{1.793}}} + 12.954$	0.977

如图7所示,这两种模型发酵过程中酵母菌随时间的变化曲线与其拟合曲线的吻合程度极高,说明实验值与预测值能够很好地拟合,可以较好表述盐地碱蓬发酵过程种酵母菌生长情况,因此,选用DoseResp模型和Boltzmann模型拟合酵母菌的生长曲线。

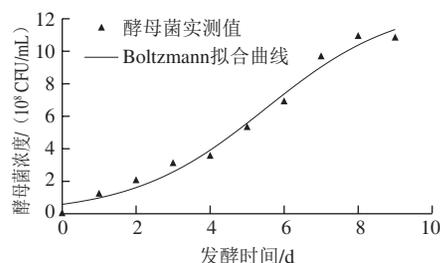
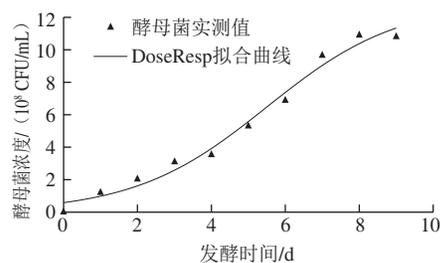


图7 发酵动力学模型下的酵母菌生长拟合曲线

Fig. 7 Fitting curves of yeast count under fermentation kinetic models

2.2.2 乙醇生成动力学模型

SGompertz模型、DoseResp模型、Logistic模型及Boltzmann模型对乙醇产量的拟合情况见表2,经对比可知,4种模型的拟合系数分别为0.995、0.994、0.994、0.994,其中SGompertz模型拟合系数 R^2 为0.995,对产物生成的拟合效果最佳。

表2 乙醇产量的拟合方程

Table 2 Fitting equations with correlation coefficients for ethanol production

模型	拟合方程	拟合系数 R^2
SGompertz	$y = 113.194 4e^{-e^{-0.001(x-0.001)}}$	0.995
DoseResp	$y = -9.530 \times 10^{-6} + \frac{113.194}{1 + 10^{(0.930-x) \times 7.620}}$	0.994
Logistic	$y = \frac{-113.194}{1 + (\frac{x}{0.953})^{25.282}} + 113.194$	0.994
Boltzmann	$y = \frac{-113.194}{1 + e^{\frac{x-0.949}{0.042}}} + 113.194$	0.994

乙醇产量与预测值模拟的拟合曲线如图8所示,SGompertz模型能较好反映盐地碱蓬发酵过程中乙醇产量的变化,因此,选用SGompertz模型拟合乙醇产量生成曲线。

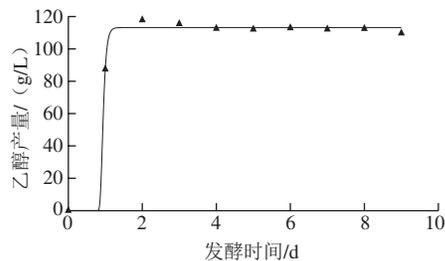


图8 发酵动力学SGompertz模型下的乙醇产量生成拟合曲线

Fig. 8 Fitting curves of ethanol production under fermentation kinetic model

2.2.3 还原糖基质消耗动力学模型

不同模型对还原糖含量的拟合方程见表3, 对拟合系数进行比较后得出, DoseResp模型、Logistic模型及 Boltzmann模型拟合系数分别为0.980、0.982、0.980, Logistic模型的R²更趋近1, 能较好地反映盐地碱蓬发酵过程还原糖消耗的变化。

表3 还原糖基质消耗的拟合方程

Table 3 Fitting equations with correlation coefficients for reducing sugar content

模型	拟合方程	拟合系数R ²
SGompertz	—	—
DoseResp	$y=69.368+\frac{16.297}{1+10^{(5.308-x)\times(-0.459)}}$	0.980
Logistic	$y=\frac{16.598}{1+(\frac{x}{5.375})^{5.592}}+68.718$	0.982
Boltzmann	$y=\frac{16.297}{1+e^{\frac{x-5.308}{0.945}}}+69.368$	0.980

注: —.该模型未拟合出方程。

Logistic模型还原糖实际消耗值与预测值模拟拟合曲线复合度较好(图9), 因此, 选用Logistic模型拟合还原糖基质消耗曲线。

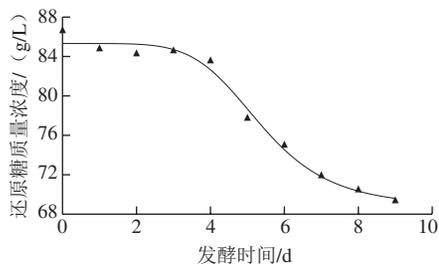


图9 发酵动力学Logistic模型下的还原糖基质消耗拟合曲线

Fig. 9 Fitting curves of reducing sugar content under fermentation kinetic model

2.3 抗氧化功能评价

2.3.1 相关性分析

随着发酵的进行, 盐地碱蓬的抗氧化活指标羟自由基、超氧阴离子自由基、还原力发生变化, 这可能与可滴定酸、总酚等代谢产物相关, 通过相关性分析确定各组分之间的内在联系。

表4 发酵过程中各参数的相关性

Table 4 Correlation of various parameters during fermentation

项目	乙醇	pH值	可滴定酸	总酚	羟自由基	超氧阴离子自由基	还原力
乙醇	1.000	-0.125	-0.368	0.549**	0.171	0.673**	0.112
pH值		1.000	-0.847**	0.252	-0.710**	0.066	-0.355
可滴定酸			1.000	-0.559**	0.596**	-0.418*	0.272
总酚				1.000	0.191	0.869**	0.537**
羟自由基					1.000	0.390*	0.592**
超氧阴离子自由基						1.000	0.436*
还原力							1.000

注: *. P<0.05; **. P<0.01。

由表4可知, 总酚含量与超氧阴离子自由基清除率、还原力这2个抗氧化力指标显著正相关(P<0.01), pH值和可滴定酸与抗氧化力指标羟自由基清除率都显著负相关(P<0.01)。可见盐地碱蓬发酵液中的总酚具有良好的超氧阴离子自由基清除能力和还原力, 有机酸具有良好的羟自由基清除能力。研究表明^[32], 由于酚类化合物易于脱去氢离子共振杂化达到稳定状态, 因此具备抗氧化能力, 与结论中总酚含量和抗氧化指标具有相关性一致。因此, 总酚和有机酸是盐地碱蓬发酵液中抗氧化能力主要来源, 酚类物质和有机酸含量越高, 抗氧化功效显著提升。

2.3.2 PCA

盐地碱蓬发酵过程中代谢产物复杂, 相关性分析的部分指标存在信息重叠问题, 为了更进一步表明代谢产物与抗氧化活性等综合指标信息, 采用PCA法对各个参数进行降维处理。

使用SPSS软件, 将30个不同时间点的盐地碱蓬发酵液中的7个参数变量进行PCA, PC的特征值和方差贡献率见表5。以特征值大于1为标准, 最终从影响发酵的7个变量中提取出2个PC, PC1贡献率为42.417%, PC2贡献率为39.085%, 两个PC累计贡献率为81.502%, 即可反映原始7个变量81.502%的信息, 符合PCA要求。由表6可得出, PC1反映了乙醇、pH值、可滴定酸、还原力的变异信息, PC2反映了总酚、羟自由基、超氧阴离子自由基、还原力的变异信息。故通过降维获得PC1、PC2代替原来的7个变量(Z_{乙醇}、Z_{pH}、Z_酸、Z_酚、Z_{羟基}、Z_{超氧}、Z_{还原力}), 经换算, 它们之间的关系式为:

$$PC1=0.554Z_{乙醇}+0.552Z_{pH}+0.425Z_{酸}+0.067Z_{酚}+0.179Z_{羟基}-0.287Z_{超氧}+0.299Z_{还原力}$$

$$PC2=0.032Z_{乙醇}-0.062Z_{pH}-0.002Z_{酸}-0.554Z_{酚}+0.531Z_{羟基}+0.522Z_{超氧}+0.365Z_{还原力}$$

表5 PC的特征值和方差贡献率

Table 5 Eigenvalues and variance contribution rates of principal components

PC	特征值	方差贡献率/%	累计方差贡献率/%
1	2.969	42.417	42.417
2	2.736	39.085	81.502
3	0.834	11.917	93.419
4	0.310	4.427	97.847
5	0.078	1.112	98.959
6	0.063	0.896	99.855
7	0.010	0.145	100.000

表6 因子载荷矩阵

Table 6 Factor loading matrix

因子	PC1	PC2
乙醇	0.954	0.053
pH值	0.951	-0.103
可滴定酸	0.732	-0.004
总酚	0.115	-0.917
羟自由基	0.309	0.878
超氧阴离子自由基	-0.494	0.864
还原力	0.516	0.604

2.3.3 代谢产物与抗氧化活性的综合评价

基于PCA法,构建不同发酵时间盐地碱蓬发酵液的CEI。

$$CEI = \frac{2.969PC1 + 2.736PC2}{2.969 + 2.736}$$

不同时间盐地碱蓬发酵液的CEI值见图10, CEI值呈现急速增加后平稳,又下降再平稳的趋势,发酵前2 d CEI值急速增加到达60.074,第8天CEI值最高62.776,第10天急速下降47.372,保持平稳。

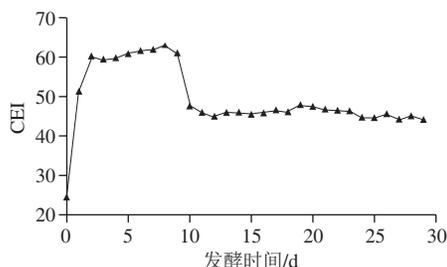


图10 盐地碱蓬发酵液CEI图

Fig. 10 Changes in comprehensive evaluation index of *S. salsa* during fermentation

3 结论

盐地碱蓬发酵主要集中在前9 d,运用发酵动力学模型模拟盐地碱蓬发酵过程,最终确定用DoseResp和Boltzmann方程建立酵母菌的生长动力学模型、用SGompertz方程建立乙醇产量生成动力学模型、用Logistic方程建立还原糖基质消耗动力学模型,相关系数分别为0.977、0.995、0.982。采用动力学模型与实际盐地碱蓬发酵情况符合度较高,均能较好的体现发酵动力学特征。

发酵过程中总酚质量浓度、羟自由基清除率、超氧阴离子自由基清除率呈先增加后降低的趋势,均在第8天达到最大值,分别为0.860 g/L、57.430%、75.900%;总酸质量浓度先增加后趋于稳定,在第12天质量浓度达到最高,为1.510 g/L; pH值先降低趋于稳定,第10天降至3.380;还原力呈先降低后增加再降低的趋势,第9天达到最高,为0.140。相关性分析表明总酚含量与超氧阴离子自由基清除率、还原力显著正相关,可滴定酸含量与羟自由基清除率显著正相关,这说明酚类物质和有机酸含量越高,抗氧化功效越强;PCA表明,通过降维获得2个PC可以代替7个变量进行抗氧化信息的表述;CEI分析表明,发酵至第3天CEI升高并趋于稳定,发酵第8天的CEI值最大,这个时间点可作为判定盐地碱蓬发酵终点或补充糖液依据。

参考文献:

- [1] LI J S, HUSSAIN T, FENG X H, et al. Comparative study on the resistance of *Suaeda glauca* and *Suaeda salsa* to drought, salt, and alkali stresses[J]. Ecological Engineering: The Journal of Ecotechnology, 2019, 140: 105593. DOI:10.1016/j.ecoleng.2019.105593.
- [2] WANG L, WANG X, JIANG L, et al. Reclamation of saline soil by planting annual euhalophyte *Suaeda salsa* with drip irrigation: a three-year field experiment in arid northwestern China[J]. Ecological Engineering: The Journal of Ecotechnology, 2021, 159: 106090. DOI:10.1016/j.ecoleng.2020.106090.
- [3] 张学杰, 樊守金, 李法曾. 中国碱蓬资源的开发利用研究状况[J]. 中国野生植物资源, 2003, 22(2): 1-3. DOI:10.3969/j.issn.1006-9690.2003.02.001.
- [4] 张国伟, 田春雨, 王自善, 等. 盐地碱蓬的化学成分、药理作用及开发利用[J]. 中医临床研究, 2021(3): 120-122; 136. DOI:10.3969/j.issn.1674-7860.2021.03.045.
- [5] LIU X X, LIU F, ZHAO S, et al. Purification of an acidic polysaccharide from *Suaeda salsa* plant and its anti-tumor activity by activating mitochondrial pathway in MCF-7 cells[J]. Carbohydrate Polymers: Scientific and Technological Aspects of Industrially Important Polysaccharides, 2019, 215: 99-107. DOI:10.1016/j.carbpol.2019.03.059.
- [6] 公衍玲, 刘菲, 金宏. 响应面试验优化盐地碱蓬总黄酮乙醇萃取工艺及其抗氧化、降糖、降脂活性[J]. 食品科学, 2016, 37(8): 1-7. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201608001.
- [7] 黄晓昆, 黄晓冬, 卞美君. 南方碱蓬叶黄酮类化合物含量及其体外抗氧化活性研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(3): 1432-1434, 1542. DOI:10.3969/j.issn.0517-6611.2010.03.130.
- [8] 步营, 栾宏伟, 沈艳奇, 等. 真空包装即食酸甜碱蓬菜的研制[J]. 保鲜与加工, 2020, 20(1): 170-174. DOI:10.3969/j.issn.1009-6221.2020.01.028.
- [9] 步营, 杨瑰琳, 朱文慧, 等. 泡椒风味碱蓬菜的研制开发[J]. 包装与食品机械, 2018, 36(4): 5-8. DOI:10.3969/j.issn.1005-1295.2018.04.002.
- [10] 汤纯, 刘锦冬, 姚瑶, 等. 五香即食碱蓬罐头的开发研究[J]. 美食研究, 2019, 36(3): 41-44. DOI:10.3969/j.issn.1009-4717.2019.03.008.
- [11] 朱文慧, 胡显杰, 步营, 等. 香辣即食调味碱蓬菜的研制开发[J]. 中国调味品, 2018, 43(10): 106-109. DOI:10.3969/j.issn.1000-9973.2018.10.021.
- [12] 林仁权, 胡文兰, 陈国亮. 重铬酸钾氧化分光光度法测定酒中乙醇含量[J]. 浙江预防医学, 2006, 18(3): 78-79. DOI:10.3969/j.issn.1007-0931.2006.03.053.
- [13] 杨泉女, 周权驹, 吴松健, 等. 3,5-二硝基水杨酸法与酶法测定甜玉米还原糖和蔗糖含量的比较[J]. 中国农业科技导报, 2017, 19(11): 125-131. DOI:10.13304/j.nykjdb.2017.0243.
- [14] 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. DOI:10.14188/j.ajsh.2018.03.003.
- [15] 王洋洋. 山楂酒发酵动力学及其香气物质研究[D]. 烟台: 烟台大学, 2016. DOI:10.7666/d.D01051068.
- [16] YE V G, CHEN H Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, 43(1): 27-32. DOI:10.1021/jf00049a007.
- [17] SHI M J, WEI X Y, XU J, et al. Carboxymethylated degraded polysaccharides from *Enteromorpha prolifera*: preparation and *in vitro* antioxidant activity[J]. Food Chemistry, 2017, 215: 76-83. DOI:10.1016/j.foodchem.2016.07.151.

- [18] YILDIRIM A, MAVI A, KARA AA. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(8): 4083-4089. DOI:10.1021/jf0103572.
- [19] 张佩, 陈默, 胡国元. 胞内羧甲基茯苓多糖的发酵动力学[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(6): 49-53. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.022616.
- [20] SIVARATHNAKUMAR S, JAYAMUTHUNAGAI J, BASKAR G, et al. Bioethanol production from woody stem *Prosopis juliflora* using thermo tolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* and its kinetics studies[J]. Bioresource Technology: Biomass, Bioenergy, Biowastes, Conversion Technologies, Biotransformations, Production Technologies, 2019, 293. DOI:10.1016/j.biortech.2019.122060.
- [21] 尤雅, 段长青, 燕国梁. 扁平云假丝酵母与酿酒酵母混合发酵对葡萄酒乙醇含量及香气的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(20): 146-154. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201820022.
- [22] JAYABALAN R, SUBATHRADEVI P, MARIMUTHU S, et al. Analytical methods changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation[J]. Food Chemistry, 2008, 109(1): 227-234.
- [23] 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. DOI:10.16429/j.1009-7848.2020.05.020.
- [24] TARGINO DUTRA R L, DANTAS A M, MARQUE D A, et al. Bioaccessibility and antioxidant activity of phenolic compounds in frozen pulps of Brazilian exotic fruits exposed to simulated gastrointestinal conditions[J]. Food Research International, 2017, 100: 650-657. DOI:10.1016/j.foodres.2017.07.047.
- [25] CAGNO R D, CODA R, DE ANGELIS M, et al. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation[J]. Food Microbiology, 2013, 33(1): 1-10. DOI:10.1016/j.fm.2012.09.003.
- [26] LI X, HAN L, LI Y, et al. Protective effect of sinapine against hydroxyl radical-induced damage to mesenchymal stem cells and possible mechanisms[J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2016, 64(4): 319-325. DOI:10.1248/cpb.c15-00850.
- [27] KARAMAN Ş, TÜTEM E, BAŞKAN K S, et al. Comparison of total antioxidant capacity and phenolic composition of some apple juices with combined HPLC-CUPRAC assay[J]. Food Chemistry, 2010, 120(4): 1201-1209.
- [28] SUN L, ZHANG J, LU X, et al. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves[J]. Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research, 2011, 49(10): 2689-2696. DOI:10.1016/j.fct.2011.07.042.
- [29] NAGENDRA P K, YANG B, DONG X H, et al. Flavonoid contents and antioxidant activities from *Cinnamomum* species[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2009, 10(4): 627-632. DOI:10.1016/j.ifset.2009.05.009.
- [30] SIDDHURAJU P, MOHAN P S, BECKER K. Studies on the antioxidant activity of Indian Laburnum (*Cassia fistula* L.): a preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp[J]. Food Chemistry, 2002, 79(1): 61-67. DOI:10.1016/S0308-8146(02)00179-6.
- [31] 方晟, 陈犇, 沙如意, 等. 百合酵素自然发酵过程中有机酸及其体外抗氧化活性的变化[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(22): 39-46. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.022048.
- [32] SHAHIDI F, ALASALVAR C, LIYANA-PATHIRANA C M. Antioxidant phytochemicals in hazelnut kernel (*Corylus avellana* L.) and hazelnut byproducts[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(4): 1212-1220.