

荞麦酵母发酵工艺优化及其发酵前后活性成分变化

Optimization on buckwheat fermentation process by Yeast and changes of active ingredient before and after fermentation

徐斌^{1,2} 王丹^{1,2} 张岚^{1,2} 朴春红³ 宋春梅^{1,2}

XU Bin^{1,2} WANG Dan^{1,2} ZHANG Lan^{1,2} PIAO Chun-hong³ SONG Chun-mei^{1,2}

(1. 吉林医药学院公共卫生学院, 吉林 吉林 132013; 2. 吉林省中医药管理局二级实验室, 吉林 吉林 132013; 3. 吉林农业大学食品科学与工程学院, 吉林 长春 130118)

(1. Department of Public and Health, Jilin Medical University, Jilin, Jilin 132013, China; 2. Lever Two Laboratory of Administration of Traditional Chinese Medicine of Jilin Province, Jilin, Jilin 132013, China; 3. Institute of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China)

摘要:研究酵母发酵荞麦的最佳工艺参数,为开发荞麦保健发酵食品提供参考依据。以荞麦为原料,采用安琪酵母发酵,以总黄酮含量作为评价指标,对加水量、发酵温度、接种量、发酵时间进行单因素试验和正交试验,确定最佳发酵工艺。其最佳发酵条件为:加水量 75%,发酵温度 32℃,接种量 0.5%,发酵时间 6 h,总黄酮含量由发酵前的 4.895 mg/g 升高到 5.314 mg/g;槲皮素含量从发酵前的 1.468 mg/g 下降为 1.099 mg/g。

关键词:荞麦;发酵;总黄酮;槲皮素

Abstract: To research the best optimum parameters of yeast fermentation, provides reference for the development of buckwheat health fermented food. Buckwheat was selected as raw material, which was fermented by AnQi yeast, and the total content of flavonoids was chosen as the evaluation indexes. Through the single factor test and orthogonal test, including water addition, fermentation temperature, inoculation quantity and fermentation time, the optimal fermentation technology was gotten. The optimal fermentation conditions were: water addition 75%, fermentation temperature 32℃, inoculation quantity 0.5%, and fermentation time 6 h. Under the conditions, the total flavonoids content was from 4.895 mg/g to 5.314 mg/g, while, the quercetin content decreased from 1.468 mg/g to 1.099 mg/g.

基金项目: 吉林省科技厅重大科技攻关项目(编号: 20160519013JH);吉林省教育厅“十三五”科学技术研究(编号:吉教科合字[2016]第 240 号);吉林省科技厅青年科研基金项目(编号:20150520133JH);吉林省教育厅科学技术研究项目(编号:吉教科合字[2016]第 239 号)

作者简介:徐斌(1972—),男,吉林医药学院副教授,硕士。

E-mail:xb-jl@163.com

收稿日期:2017-04-01

Keywords: Buckwheat; fermentation; total flavonoids; quercetin

荞麦(buckwheat)俗称甜麦,系蓼科荞麦属植物,与其他禾谷类粮食作物相比,荞麦不仅含有丰富的脂肪、维生素、膳食纤维、矿物质等营养成分,还含有其他粮食作物所没有的黄酮类、多酚类化合物等,具有药食两用价值^[1-2]。其中黄酮类化合物是荞麦最为重要的生物活性物质之一,赋予荞麦多种生理功能,例如降血糖、降尿酸、降血脂、防便秘等功效^[3]。黄酮类化合物(flavonoids)亦称生物类黄酮,主要成分有芦丁、槲皮素、山柰酚等。发酵食品是指利用对人体有益的微生物加工制作而成的一类食品^[4],将食品发酵不但可以提高原产品的经济价值,还可以有效改善食品的营养价值,增加其稳定性。经过发酵可使荞麦中的复杂成分在微生物的作用下分解成具有生物活性物质的简单成分,这样可以增强机体对荞麦中营养物质的消化吸收,另外荞麦发酵类食品的研发也大大促进了荞麦产业的发展^[5]。国内外大多研究集中在荞麦黄酮类化合物的提取,但对荞麦发酵制品中黄酮类化合物的研究报道多为营养成分定性分析^[6],张英等^[7]发现荞麦花叶经过发酵后黄酮含量下降,且可能产生了新物质。李静娟等^[8]研究荞麦面包制作过程对荞麦黄酮的影响,得出发酵可一定程度地提高荞麦总黄酮的含量,而焙烤过程显著地降低荞麦总黄酮的含量。近几年食物发酵对植物活性成分的影响引起了人们的关注,关于利用酵母发酵荞麦,研究黄酮含量的变化鲜见报道。本研究拟利用酵母发酵荞麦,以总黄酮为指标优化发酵条件,并研究黄酮和槲皮素在发酵过程中的含量变化,旨在为开发以荞麦为主要原料、以发酵为主要生产工艺的食品以及相关研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

荞麦:甜荞麦,吉林省辽源市;

酵母:安琪酵母股份有限公司;

芦丁和槲皮素:标准品(HPLC \geq 98%),上海原叶生物有限公司;

亚硝酸钠、乙醇、硝酸铝、氢氧化钠、碳酸钠、丙酮:分析纯,天津市大茂化学试剂厂。

1.2 仪器与设备

旋转蒸发器:EV311型,美国莱伯泰科公司;

酶标仪:SyNERGYH1/H1M型,美国伯腾仪器有限公司;

中草药粉碎机:ZN-500型,长沙岳麓区中南制药机械厂;

离心机:TGL20M-II型,湖南凯达科学仪器有限公司;

电子天平:FA1104N型,上海精密科学仪器有限公司;

紫外分光光度计:UV-1800型,上海欣茂仪器有限公司;

超声振荡提取器:KQ-100DB型,昆山市超声仪器有限公司;

霉菌培养箱:MJP-150型,上海精宏实验设备有限公司;

电热恒温干燥箱:202-1AB型,天津市泰斯特仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 荞麦发酵流程及操作要点

酵母活化



荞麦→粉碎过筛→干燥→加入酵母液→混匀制团→发酵

(1) 将荞麦去除杂质,经中药粉碎机粉碎并过40目筛,于干燥箱中在60℃烘干至恒重,备用。

(2) 酵母使用前,应加入一定量30℃左右蒸馏水进行活化。之后加入荞麦粉,混合均匀并揉成均匀的荞麦面团。

1.3.2 单因素试验 参照文献[8]和[9],分别对加水量、发酵温度、接菌量、发酵时间4个因素做单因素试验,3次重复,考察各个因素对酵母发酵荞麦后其中黄酮含量的影响。

(1) 加水量:接菌量为0.5%,发酵温度为30℃,发酵时间为8h,将加水量(占荞麦质量百分比)分别设定为70%,75%,80%,85%,90%进行发酵,测定发酵荞麦中黄酮含量,确定最佳加水量。

(2) 发酵温度:加水量为80%,接菌量为0.5%,发酵时间为8h,将发酵温度分别设定为24,26,28,30,32℃进行发酵,测定发酵荞麦中黄酮含量,确定最佳发酵温度。

(3) 接菌量:加水量为80%,发酵时间为8h,发酵温度为30℃,将接菌量分别设定为0.3%,0.4%,0.5%,0.6%,0.7%进行发酵,测定发酵荞麦中黄酮含量,确定最佳接菌量。

(4) 发酵时间:接菌量为0.5%,发酵温度为30℃,加水量为80%,将发酵时间分别设定为2,4,6,8,10,12h进行发酵,测定发酵荞麦中黄酮含量,确定最佳发酵时间。

1.3.3 正交试验 在单因素试验结果基础上,以加水量、发酵温度、接菌量和发酵时间4个条件为考察因素,进行三水平四因素正交试验,以总黄酮含量为评价指标,确定最佳发酵工艺条件。

1.3.4 总黄酮含量的测定

(1) 芦丁标准曲线的绘制:称取芦丁标准品0.0117g,置于50mL容量瓶中,加入95%乙醇定容,得到234g/mL芦丁标准溶液,备用。分别移取芦丁标准溶液0.00,0.05,0.10,0.20,0.30,0.40,0.50,1.00,1.50mL于试管中,补加95%乙醇至1.5mL,摇匀,然后加入0.25mL4%NaNO₂溶液,静置6min,再加入0.25mL10%Al(NO₃)₃溶液,静置6min,最后加入1.5mL4%NaOH溶液,混匀。分别取200mL于96孔板上,用酶标仪在可见光波长510nm处测定其吸光度值并记录。以芦丁浓度(g/mL)为横坐标,吸光度值(A)为纵坐标,绘制标准曲线,得线性回归方程: $Y=0.0065X-0.007$, $R^2=0.9992$ 。

(2) 样品中总黄酮提取及含量测定:取0.5g荞麦样品于15mL离心管中,加入15mL酸性丙酮溶液(丙酮:蒸馏水:乙酸=70:29.5:0.5,体积比),密封,并放置在恒温震荡培养箱上,在20℃、200r/min的条件下震荡4h(对荞麦中黄酮成分进行提取),震荡结束后,将荞麦提取液在黑暗条件下静置12h(对荞麦中成分继续进行提取),之后在10000r/min条件下离心10min,得到上清液。准确移取0.5mL待测液按1.3.4(1)标准曲线的绘制方法测定吸光度,根据标准曲线方程计算总黄酮质量。3次重复试验。按式(1)计算荞麦总黄酮含量^[10-11]。

$$X = \frac{[(A_1 - A_0) + 0.007 \times V_{\text{总}}] \times V_2}{0.0065 \times V_1 \times m \times 1000} \quad (1)$$

式中:

X——荞麦中总黄酮的含量,mg/g;

A₁——样品管吸光度;

A₀——空白管吸光度;

V_总——样品管体积,mL;

V₁——吸取供试液体积,mL;

V₂——样品供试液体积,mL;

m——样品质量,g。

1.3.5 槲皮素含量测定

(1) 槲皮素标准曲线的绘制:精密称取槲皮素标准品4.92mg,置于50mL容量瓶中,加入60%乙醇溶解,定容至50mL,所得浓度为9.84mg/mL的标准溶液,备用。准确吸取上述槲皮素标准溶液0.0,0.5,1.0,1.5,2.0,2.5mL置于10mL比色管中,加入60%乙醇溶解,定容至刻度。采用紫外分光光度法在370nm波长下进行测定,以槲皮素(g/mL)为横坐标,吸光度(A)为纵坐标绘制标准曲线,得线性回归方程: $Y=0.03492X+0.0014$, $R^2=0.9932$ 。

(2) 样品中槲皮素提取及含量测定:称取荞麦样品1g于锥形瓶中,加80%乙醇25mL溶解,超声振荡提取(50℃,30min,100W),并在真空泵中抽滤,加少量体积分数80%乙醇清洗滤渣后过滤,重复2次,合并滤液,得到滤液后倒入

旋转蒸发器,于 50 ℃ 旋转蒸发浓缩,将浓缩液用 60% 乙醇定容至 100 mL。准确移取待测液 0.5 mL 于 10 mL 比色管中,按 1.3.5(1) 标准曲线测定方法依次加入各种试剂,以试剂空白做参比,按式(2)计算荞麦槲皮素含量^[12]。

$$X = \frac{C \times V \times V_2}{V_1 \times m \times 1\,000}, \quad (2)$$

式中:

X ——样品中槲皮素的含量,mg/g;

C ——样品管槲皮素浓度,mg/mL;

$V_{\text{总}}$ ——样品管体积,mL;

V_1 ——吸取供试液体积,mL;

V_2 ——样品供试液体积,mL;

m ——样品质量,g。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 加水量的选择 由图 1 可知,发酵荞麦中总黄酮的含量随着加水量的增加先增加后降低,当加水量小于 80% 时,荞麦总黄酮含量随着加水量的增加而增加;当加水量大于 80% 时,荞麦总黄酮含量随着加水量的增加呈先下降后增加趋势;当含水量达到 90% 时,荞麦总黄酮含量达到最大。这表明随着加水量的增加,荞麦在发酵过程中黄酮含量增加,但当加水量达到一定量时,可能影响了酵母繁殖,影响了荞麦发酵,使黄酮含量降低。在试验过程中当加水量大于 80% 时,荞麦面成团性较差,因此加水量取 80% 左右为宜。

2.1.2 发酵温度的选择 由图 2 可知,荞麦总黄酮的含量随

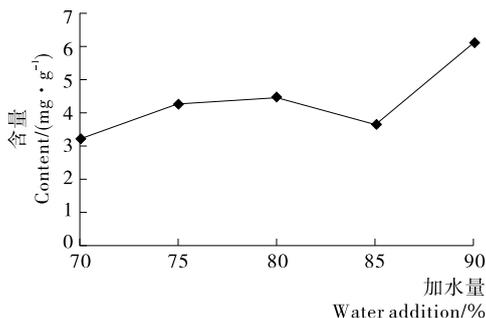


图 1 加水量对总黄酮含量的影响

Figure 1 Effect of water addition to content of total flavonoids

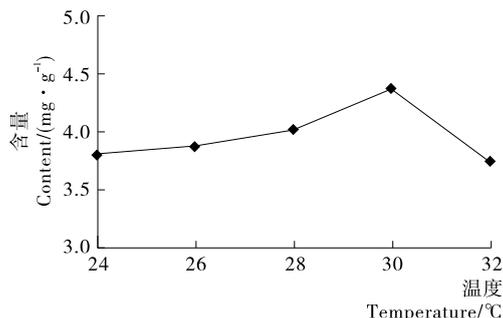


图 2 发酵温度对总黄酮含量的影响

Figure 2 Effect offermentation temperature to content of total flavonoids

着发酵温度的上升先增加后降低,发酵温度为 30 ℃ 时,总黄酮含量达到最大。温度过低或过高,都会影响酵母活力,因此发酵温度取 30 ℃ 左右为宜。

2.1.3 接菌量的选择 由图 3 可知,荞麦总黄酮的含量随着接菌量的增加呈现先下降后上升再下降的趋势,在该趋势中,当接菌量为 0.6% 时,荞麦总黄酮含量达到最大。当接菌量达到一定比例时,酵母菌利用荞麦程度较高,使荞麦中黄酮类物质转化程度增加,但是当接菌量较高时,酵母菌生长可能会受到抑制,而且对荞麦的利用也会降低,另外考虑生产成本,确定接菌量取 0.6% 左右为宜。

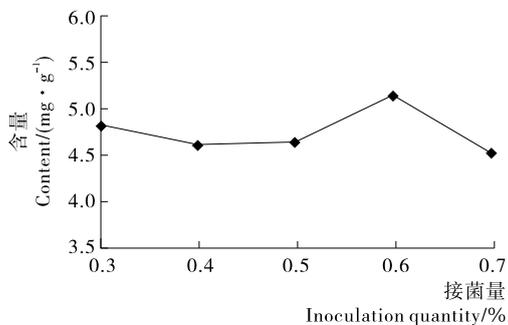


图 3 接菌量对总黄酮含量的影响

Figure 3 Effect of inoculation quantity to content of total flavonoids

2.1.4 发酵时间的选择 由图 4 可知,荞麦总黄酮的含量随着发酵时间的延长呈现先上升后下降的趋势,在该趋势中,当发酵时间为 4 h 时,荞麦总黄酮含量达到最大。发酵时间较长时,酵母利用荞麦可能会产生其他酵母代谢产物,黄酮类物质也可能随着发酵时间的延长而转化成其他活性成分。因此发酵时间取 4 h 左右为宜。

2.2 正交试验

三水平四因素正交试验因素水平取值见表 1,结果见表 2。

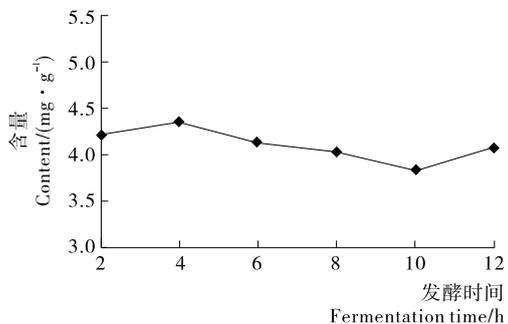


图 4 发酵时间对总黄酮含量的影响

Figure 4 Effect offermentation time to content of total flavonoids

表 1 因素水平表

Table 1 Factor level of experiment

水平	A 加水量/%	B 发酵温度/°C	C 接菌量/%	D 时间/h
1	75	28	0.5	2
2	80	30	0.6	4
3	85	32	0.7	6

表2 正交试验结果

Table 2 Result of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	含量/(mg·g ⁻¹)
1	1	1	1	1	3.040
2	1	2	2	2	2.702
3	1	3	3	3	3.040
4	2	1	2	3	2.778
5	2	2	3	1	2.667
6	2	3	1	2	2.834
7	3	1	3	2	2.811
8	3	2	1	3	3.036
9	3	3	2	1	2.818

k ₁	2.927	2.876	2.970	2.842	
k ₂	2.760	2.802	2.766	2.782	
k ₃	2.888	2.897	2.839	2.951	
R	0.167	0.095	0.204	0.169	
最优水平	A ₁	B ₃	C ₁	D ₃	

由表2可知,酵母发酵的最佳组合是A₁B₃C₃D₃,由于理论计算的最佳组合是A₁B₃C₁D₃,需要做验证性实验。经过验证,在该条件下荞麦总黄酮的含量为3.560 mg/g,确定A₁B₃C₁D₃为最优组合。荞麦发酵的最佳工艺条件为:加水量75%,发酵温度32℃,接菌量0.5%,发酵时间6h。总黄酮的含量为3.560 mg/g。通过极差R可以看出,各因素对荞麦总黄酮含量变化的影响作用顺序为:接菌量>发酵时间>加水量>发酵温度。

2.3 发酵前后总黄酮、槲皮素含量的变化

黄酮类化合物是荞麦中最重要的生物活性物质。由图5可知,发酵后荞麦面团中总黄酮含量呈增加趋势。李蒙蒙等^[5]研究不同酵母(果酒酵母、葡萄酒酵母、异常汉逊酵母)发酵对荞麦营养成分影响,通过测定发酵荞麦发现3株菌能显著提高荞麦中总多酚和总黄酮含量,且显著降低还原糖含量。本实验室前期研究^[13]表明,荞麦饲喂高脂膳食大鼠,可使其血清SOD、GSH-PX的活性增强及MDA的含量显著减少;可使其肝脏中SOD活性显著增强,MDA的含量显著减少,表明荞麦具有调节高脂膳食大鼠抗氧化的能力。李蒙蒙等^[5]的研究报道提出酵母能够显著提升荞麦的抗氧化特性,且发酵荞麦提取物的抗氧化活性与总黄酮成分含量呈相关性。因此,发酵荞麦相对未发酵荞麦具有更好的营养保健功能。由图5还可以看出,发酵后槲皮素含量略有降低。李家华等^[14]曾报道普洱茶发酵过程中槲皮素的含量一直呈下降

趋势,并推测可能是在发酵过程中微生物产生的糖苷酶水解生成槲皮素类之外的某些游离态黄酮醇苷元所致。槲皮素是一种多羟基黄酮类化合物^[15],经过酵母发酵后,槲皮素也可能转化成其他类黄酮类物质。

3 结论

本试验研究了酵母发酵荞麦的最佳工艺参数,并对比发酵前后活性物质变化。结果表明,其最佳发酵条件为:加水量75%,发酵温度32℃,接菌量0.5%,发酵时间6h;发酵后槲皮素含量略有降低,总黄酮含量升高。荞麦经过发酵后其中脂肪、淀粉、蛋白质等复杂成分在微生物作用下可产生醇类、核酸类、有机酸类、氨基酸类等具有生物活性物质,有利于人类对荞麦中营养物质的消化吸收,并改善荞麦制品的品质。本研究结果对研制荞麦发酵食品^[16]、促进荞麦的有效利用及促进人体健康具有借鉴意义。

参考文献

- [1] RUI Jing, HUA Qiang-li, CHANG Ling-hu, et al. Phytochemical and Pharmacological Profiles of three Fagopyrum Buckwheats[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17: 589-609.
- [2] NIDHI G, PRADEEP N P, RAJINDER S C. Differential transcript profiling through cDNA-AFLP showed complexity of rutin biosynthesis and accumulation in seeds of a nutraceutical food crop(Fagopyrum spp.) [J]. Research Article, 2012, 13: 231-241.
- [3] 王世霞, 李笑蕊, 负婷婷, 等. 不同品种苦荞麦营养与功能成分对比分析[J]. 食品与机械, 2016, 32(7): 5-9.
- [4] 纵伟, 盛欣昕, 谭洪卓, 等. 益生菌发酵苦荞粉酶解液制备工艺研究[J]. 食品与机械, 2009, 25(3): 14-16.
- [5] 李蒙蒙, 吴薇, 籍保平. 不同酵母固态发酵对荞麦抗氧化成分及抗氧化作用的影响[J]. 粮食与油脂, 2012, 37(10): 126-130.
- [6] 李敬鹏, 邓力, 金佳幸, 等. 基于黄酮保持率及糊化度及杂粮米挤压工艺优化[J]. 食品与机械, 2014, 30(4): 190-195.
- [7] 张英, 曹良顺, 张赛航. 荞麦花叶发酵提取物黄酮含量的测定[J]. 中国高新技术企业, 2015(20): 17-18.
- [8] 李静娟, 易建华, 朱振宝. 荞麦面包制作过程对荞麦黄酮的影响[J]. 食品工业科技, 2009(7): 140-141.
- [9] 彭海文, 周文美. 液态发酵法酿造荞麦酒发酵工艺研究[J]. 酿酒科技, 2012(8): 97-100.
- [10] 顾亮亮, 黄晓燕, 李月, 等. 金荞麦发酵茶生产工艺条件的优化[J]. 贵州农业科学, 2014, 42(4): 169-171.
- [11] 邹靖宇, 曹清明, 钟海雁. 油茶叶黄酮类化合物研究进展[J]. 食品与机械, 2014, 30(6): 243-246.
- [12] 车京梅, 马超, 金莉莉, 等. 紫外分光光度法测定水红花子中槲皮素的含量[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(3): 369.
- [13] 王丹, 沈楠, 于天龙, 等. 荞麦粉对高脂膳食大鼠体内抗氧化活性的影响[J]. 食品工业科技, 2015, 36(14): 370-372.
- [14] 李家华, 赵明, 胡艳萍, 等. 普洱茶发酵过程中黄酮醇类物质含量变化的研究[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2012, 34(2): 59-65.
- [15] 孙涓, 余世春. 槲皮素的研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2011, 25(3): 85-88.
- [16] 韩丹, 王晓丹, 陈霞, 等. 苦荞麦制作麦芽及其啤酒工艺研究[J]. 食品与机械, 2010, 26(1): 125-128.

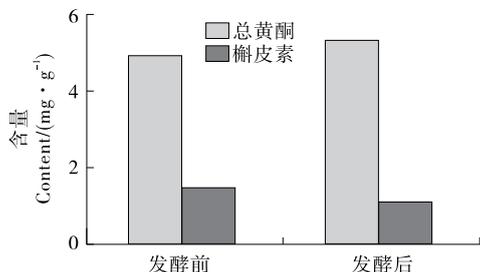


图5 荞麦发酵前后其活性成分变化

Figure 5 Change of active ingredients in buckwheat before and after fermentation