

微生物固态发酵芡实工艺优化及抗氧化活性分析

陈亚蓝^{1,2} 陈顺心^{1,2} 侯贺丽^{1,2} 陈威立¹ 朱 静^{1,2}

(1. 信阳农林学院食品科学与工程学院,河南 信阳 464000;

2. 河南省大别山特色食物资源综合利用工程技术研究中心,河南 信阳 464000)

摘要: [目的]利用微生物固态发酵提高芡实功能成分的转化效率。[方法]以芡实为原料,以总黄酮和总多酚含量为指标,筛选出优势菌种,再用优势菌进行正交试验,探究发酵温度、发酵时间、料液比、接种量和碳源添加量对发酵后芡实活性成分的影响,并以DPPH自由基清除率、总抗氧化性和ABTS自由基清除率为指标分析芡实的体外抗氧化活性。[结果]优势菌为黑曲霉H,最优发酵工艺条件为发酵时间5 d、发酵温度35 °C、料液比1:2 (g/mL)、接种量11%、碳源添加量2%,此条件下总黄酮含量为9.036 mg/g,比发酵前的提高了6.24倍,总多酚含量为109.284 mg/g,比发酵前的提高了4.68倍。芡实发酵后对DPPH自由基、ABTS自由基清除率的IC₅₀分别为0.023,0.024 mg/mL。维生素C阳性对照对铁离子的还原能力与发酵后的基本相同,且高于发酵前的。[结论]利用微生物对芡实原料进行发酵可有效提升其活性成分含量和抗氧化能力,具有良好的应用前景。

关键词: 芡实;固态发酵;总黄酮;总多酚;抗氧化活性

Process optimization for microbial solid-state fermentation of *Euryale ferox* and antioxidant activity analysis

CHEN Yalan^{1,2} CHEN Shunxin^{1,2} HOU Heli^{1,2} CHEN Weili¹ ZHU Jing^{1,2}

(1. College of Food Science and Engineering, Xinyang Agriculture and Forestry University, Xinyang, Henan 464000, China; 2. Henan Province Dabie Mountain Characteristic Food Resources Comprehensive Utilization Engineering Technology Research Center, Xinyang, Henan 464000, China)

Abstract: [Objective] To improve the transformation of functional components in the *Euryale ferox* by microbial solid-state fermentation. [Methods] *Euryale ferox* is taken as the raw material to screen out the dominant strains, with the total flavonoid and total polyphenol content as indicators. Then, orthogonal experiments are conducted on the dominant bacteria to investigate the effects of fermentation temperature, fermentation time, material-liquid ratio, inoculation amount, and carbon source addition amount on the active components of the fermented *Euryale ferox*. The *in vitro* antioxidant activity of *Euryale ferox* is analyzed, with DPPH free radical scavenging rate, total antioxidant activity, and ABTS free radical scavenging rate as indicators. [Results] The dominant bacterium is *Aspergillus niger* H, and the optimal fermentation condition is as follows: fermentation time 5 days, fermentation temperature 35 °C, material-liquid ratio of 1:2 (g/mL), inoculation amount of 11%, and carbon source addition amount of 2%. Under these conditions, the total flavonoid content is 9.036 mg/g, which is 6.24 times higher than that of the unfermented one, and the total polyphenol content is 109.284 mg/g, which is 4.68 times higher than that of the unfermented one. The IC₅₀ values of DPPH and ABTS free radical scavenging rates of fermented *Euryale ferox* are 0.023 and 0.024 mg/mL, respectively. The reducing ability of vitamin C positive control to iron ions is basically the same as that after fermentation, and is higher than that before fermentation. [Conclusion] It is feasible to use microbial to ferment the raw materials of *Euryale ferox*, which improves the extraction content and antioxidant activity of its active ingredients, demonstrating an ideal application prospect.

基金项目: 河南省重点研发专项(编号:231111312800);河南省高校研究性教学改革与实践研究项目(编号:2022SYJXLX119);河南省科技发展计划(编号:242102110090)

通信作者: 朱静(1983—),女,信阳农林学院副教授,博士。E-mail:zhujingcy@163.com

收稿日期: 2024-08-17 **改回日期:** 2025-07-13

引用格式: 陈亚蓝,陈顺心,侯贺丽,等.微生物固态发酵芡实工艺优化及抗氧化活性分析[J].食品与机械,2025,41(11):152-159.

Citation: CHEN Yalan, CHEN Shunxin, HOU Heli, et al. Process optimization for microbial solid-state fermentation of *Euryale ferox* and antioxidant activity analysis[J]. Food & Machinery, 2025, 41(11): 152-159.

Keywords: *Euryale ferox*; solid-state fermentation; total flavonoid; total polyphenol; antioxidant activity

芡实,睡莲科水生草本植物芡的干燥成熟种仁,又名鸡头米等,主要分布在亚热带和温带,为药食两用材料,具有补脾、止泻、除湿、益肾固精等功效^[1-2]。芡实中除了含有碳水化合物、矿物质、蛋白质等人体所需的营养成分外,还含有多酚、黄酮、甾醇类以及脑苷脂类化合物等生物活性物质^[3-4]。

目前,有关芡实中多酚及黄酮类物质的研究多集中在结构分析及生物活性等方面。李美红等^[4]利用95%甲醇回流提取芡实黄酮并分离出5,7,4'-三羟基-二氢黄酮和5,7,3',4',5'-五羟基二氢黄酮。孙海林等^[5]研究表明,芡实中多酚类成分主要包括鞣花酸、柯里拉京、老鹳草素、阿魏酸、没食子酸等;黄酮类成分主要包括柚皮素、5,7,3,4,5'-五羟基二氢黄酮、(-)-表儿茶素-3-O-没食子酸酯等。王瑀^[6]利用95%乙醇提取芡实功能成分,其黄酮类成分为柚皮素和(-)-表儿茶素-3-O-没食子酸酯。而有关利用微生物发酵或种子萌发的方式富集芡实中活性物质的研究较少。彭灿灿等^[7]研究表明,微生物发酵转化可有效提高药食同源原料中生物活性物质含量,并有效提高其生物利用率。闫雍雍等^[8]利用干酪乳杆菌发酵芡实,其上清液中总酚和总黄酮含量显著增加,且其他芡实发酵研究也多以乳酸菌为发酵菌种的发酵饮品工艺优化研究,鲜有以真菌为出发菌株固态发酵富集芡实中总黄酮和多酚物质的研究。试验拟以5种真菌为出发菌株对芡实进行固态发酵,筛选出优势菌种,探索富集总黄酮和多酚类物质的最优发酵工艺,并分析其体外抗氧化活性,以期为芡实的深度开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

芡实:市售;
白地霉 S12 (*Galactomyces geotrichum* CCTCC AF2012005)、白地霉 S13 (*Geotrichum* sp. CCTC C AF2012006):中国典型微生物保藏中心(武汉);
黑曲霉 H、青霉 Q(分离自土壤)、酵母 A2(分离自商城筒鲜鱼):信阳农林学院食品科学与工程学院实验室;
硝酸铝、氢氧化钠、亚硝酸钠、无水乙醇、维生素 C、水杨酸、无水碳酸钠、过硫酸钾、甲醇、铁氰化钾、三氯乙酸、三氯化铁、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、葡萄糖等:分析纯,郑州派尼化学试剂厂;
芦丁标准品:95%,上海源叶生物科技有限公司;
没食子酸标准品:98%,合肥博美生物科技有限责任公司;

DPPH、ABTS:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 主要仪器与设备

高速破碎机:RS-FS553型,北京科伟永兴仪器有限公司;

电子天平:WT-H50001型,五鑫衡器有限公司;

电热鼓风干燥箱:JC101-2A型,上海翱艺仪器有限公司;

电热恒温水浴锅:HH-6型,上海翱艺仪器有限公司;

紫外—可见分光光度计:A390型,上海翱艺仪器有限公司;

超声波清洗机:UC-5240L型,深圳市佳源达科技有限公司;

循环水式多用真空泵:SHB-IIIA型,上海沪析实业有限公司;

旋转蒸发仪:UC-5240L型,北京科伟永兴仪器有限公司;

真空冷冻干燥机:WT-H50001型,北京科伟永兴仪器有限公司;

恒温培养箱:SPX-150C型,上海博迅实业有限公司医疗设备厂。

1.2 试验方法

1.2.1 样品预处理 芡实于60℃干燥2 h,粉碎,过60目筛,密封,待用。

1.2.2 培养基配制及菌种活化

(1) PDA培养基:去皮土豆100 g,切块,加入400 mL蒸馏水煮沸20 min,8层纱布过滤,加入10 g无水葡萄糖,加蒸馏水至500 mL,121℃灭菌20 min(固体培养基需另加入10 g琼脂)。

(2) YPD培养基:精确称取2 g酵母膏、2 g蛋白胨、4 g葡萄糖,加蒸馏水至200 mL,121℃灭菌20 min(固体培养基需另加入4 g琼脂)。

(3) 菌种活化:分别将冻存的白地霉 S12、白地霉 S13、黑曲霉 H 和青霉 Q 接种至 PDA 固体培养基上,将酵母 A2 接种至 YPD 固体培养基上,30℃培养3 d。接种至液体培养中,传代两次以保持菌的活性。

1.2.3 接种和发酵 称取3 g芡实粉末,按料液比1:3 (g/mL)加入蒸馏水,搅拌混匀,121℃灭菌20 min,冷却,于无菌操作台中接种6.5×10⁶ CFU/mL的菌液(9%),33℃发酵3 d。

1.2.4 菌种筛选 灭菌后,按料液比1:3 (g/mL)制备3种不同的固体培养基:空白组(水+原料)、试验A组(水+原料+菌种)、试验B组(水+原料+菌种+碳源),碳源

为添加 2% 灭菌后的葡萄糖溶液。将活化好的菌种按 9% 的接种量接种至培养基上, 30 ℃ 固态发酵 3 d。以总黄酮和总多酚提取率为指标筛选优势菌株。

1.2.5 单因素试验 通过菌种筛选, 选择优势菌种进行单因素试验, 固定菌种接种量 9%, 发酵时间 3 d, 发酵温度 33 ℃、碳源添加量 2% 和料液比 1:3 (g/mL)。分别考察料液比 [(1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 (g/mL))]、发酵时间 (2, 3, 4, 5, 6 d)、发酵温度 (28, 30, 33, 35, 37 ℃)、接种量 (5%, 7%, 9%, 11%, 13%)、碳源添加量 (1.0%, 1.5%, 2.0%, 2.5%, 3.0%) 对芡实发酵后总黄酮和总多酚含量的影响。

1.2.6 正交试验 在单因素试验基础上, 选择发酵温度、发酵时间、料液比、接种量 4 个因素进行 $L_9(4^3)$ 正交试验, 优化芡实的最佳发酵条件。

1.2.7 活性物质测定 参照秦晶晶等^[9]的方法, 将发酵好的培养基分别移入离心管中, 加入 30 mL 体积分数为 70% 的乙醇, 用超声波辅助乙醇法于 40 ℃、120 W 提取 2 h, 采用紫外分光光度法测其总黄酮、总多酚含量。

1.2.8 总黄酮含量测定 参照秦晶晶等^[9]的方法稍作修改。精确称取 13.40 mg 芦丁标准品, 定容至 50 mL。分别移取 0, 0.1, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 mL 芦丁溶液至 10 mL 容量瓶中, 加 0.4 mL 质量分数 5% 的 $NaNO_2$ 溶液, 摆匀, 静置 6 min; 加入 0.4 mL 质量分数为 10% 的 $Al(NO_3)_3$ 溶液, 摆匀, 静置 6 min; 加入 4 mL 质量分数为 4% 的 NaOH 溶液, 用蒸馏水定容, 混匀, 静置 15 min, 测定 510 nm 处吸光度。以芦丁质量浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线得线性方程为 $y=0.0114x-0.0234$, $R^2=0.9905$ 。按式(1)计算提取液总黄酮含量。

$$R = \frac{C \times V \times V_2}{V_1 \times m \times 1000}, \quad (1)$$

式中:

R —芡实总黄酮含量, mg/g;

C —最终定容时溶液中总黄酮质量浓度, mg/L;

V —提取液最初定容体积, L;

m —芡实质量, g;

V_1 —总黄酮粗提液体积, mL;

V_2 —最终定容的体积, mL。

1.2.9 总多酚含量测定 参照张潇等^[10]的方法并修改。以没食子酸为标准品, 配制标准系列溶液, 反应完成后测定 760 nm 处吸光度。以没食子酸溶液质量浓度为横坐标, 吸光值为纵坐标, 绘制标准曲线得线性方程为 $y=0.0066x+0.032$, $R^2=0.9971$ 。按式(2)计算提取液中总多酚含量。

$$R = \frac{C \times V_0 \times V_2}{V_1 \times m \times 1000}, \quad (2)$$

式中:

R_2 —总多酚含量, mg/g;

C —最终定容时溶液中总多酚质量浓度, mg/L;

V_0 —提取液最初定容体积, L;

m —芡实质量, g;

V_1 —吸取总多酚最初定容后溶液体积, mL;

V_2 —溶液最终定容体积, mL。

1.2.10 抗氧化活性分析

(1) DPPH 自由基清除率测定: 参照章烨雯等^[11]的方法, 按式(3)计算 DPPH 自由基清除率。

$$A = 1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

A —自由基清除率, %;

A_0 —反应中反应液+无水乙醇吸光度;

A_1 —反应中反应液+乙醇溶液+样品溶液吸光度;

A_2 —样品液+乙醇的吸光度。

(2) 总抗氧化能力测定: 参照黄丽华等^[12]的方法。用 75% 乙醇溶液代替多酚提取液作零, 用维生素 C 为阳性对照。

(3) ABTS 自由基清除率测定: 参照李思淇等^[13]的方法, 按式(3)计算 ABTS 自由基清除率。

1.2.11 数据分析 试验数据以 “ $\bar{x} \pm s$ ” 表示, 采用 SPSS 20.0 软件进行方差分析和显著性分析, 利用 Origin 2018 软件绘图。

2 结果与讨论

2.1 菌种筛选

由表 1 可知, 发酵后, 芡实中总黄酮、总多酚含量均有不同程度的提升。除白地霉 S12 组发酵后黄酮含量较空白组无显著差异外, 其他发酵组均显著提升。其中黑曲霉 H+C 组发酵后总黄酮含量最高, 且与其他发酵组相比差异显著。黑曲霉 H+C 组发酵后总多酚含量最高, 且较空白组和其他发酵组差异显著。未添加碳源的 5 组中, 黑曲霉 H 发酵的总黄酮和总多酚含量较空白组和其他微生物发酵组提升较高, 且添加碳源后总黄酮和总多酚含量较单一黑曲霉 H 有显著提高。

植物中, 多酚与黄酮类物质常以可溶性和结合态两种形式存在^[14]。可溶性结构容易提取且易被吸收利用, 但与植物细胞壁中的纤维素、木质素、蛋白质、多糖等结合形式存在的多酚及黄酮类物质较多^[15-16], 简单的化学提取方式无法将其充分释放。黑曲霉能产生丰富的纤维素酶, 且较高的 β -葡萄糖苷酶活性有效提高水解纤维素、木质素的能力^[17-18]。因此, 黑曲霉 H 在芡实固态发酵过程中, 通过释放的纤维素酶系可有效破碎细胞壁, 促进黄酮和多酚类物质释放。且葡萄糖可为黑曲霉生长代谢

表1 菌种筛选结果表[†]

Table 1 Strain screening results

| 组别 | 黄酮含量/ (mg·g ⁻¹) | 与空白组 相比倍数 | 多酚含量/ (mg·g ⁻¹) | 与空白组 相比倍数 |
|----------|--------------------------------|--------------|--------------------------------|--------------|
| 空白 | 0.82±0.02 ^g | 1.00 | 13.64±2.14 ^e | 1.00 |
| 青霉Q | 1.08±0.07 ^{ef} | 1.32 | 18.18±0.54 ^{ed} | 1.33 |
| 青霉Q+C | 1.25±0.16 ^{de} | 1.52 | 14.77±1.07 ^e | 1.08 |
| 白地霉S12 | 0.93±0.05 ^{fg} | 1.13 | 15.91±1.07 ^{ed} | 1.17 |
| 白地霉S12+C | 1.35±0.02 ^d | 1.64 | 16.29±2.14 ^{ed} | 1.19 |
| 白地霉S13 | 1.43±0.03 ^d | 1.74 | 18.37±2.41 ^{ed} | 1.35 |
| 白地霉S13+C | 1.68±0.05 ^e | 2.05 | 28.60±1.88 ^{bc} | 2.10 |
| 酵母A2 | 1.36±0.04 ^d | 1.66 | 22.35±1.07 ^{ed} | 1.64 |
| 酵母A2+C | 1.75±0.04 ^{bc} | 2.13 | 28.03±3.75 ^{bc} | 2.05 |
| 黑曲霉H | 1.88±0.03 ^b | 2.29 | 29.55±1.07 ^b | 2.17 |
| 黑曲霉H+C | 2.12±0.04 ^a | 2.59 | 37.69±1.34 ^a | 2.76 |

[†] 小写字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

提供良好的生长环境^[19],因此,黑曲霉H为芡实固态发酵的最优菌株,且在此基础上添加2%葡萄糖为碳源的效果更好。

2.2 单因素试验

2.2.1 料液比对总黄酮和总多酚含量的影响 由图1可知,当料液比为1:1~1:5(g/mL)时,总黄酮和总多酚含量整体呈先上升后下降趋势,且在料液比为1:2(g/mL)时达到最大。Nguyen等^[20]研究表明,发酵时水分含量过高或过低均会抑制酶的产生。因此,水分含量过多或过少会抑制黑曲霉H产生相关纤维素酶,从而使得总黄酮和总多酚含量有所降低。故最优料液比为1:2(g/mL)。

2.2.2 发酵时间对总黄酮和总多酚含量的影响 由图2可知,总多酚和总黄酮含量在发酵第2~5天呈上升趋势,

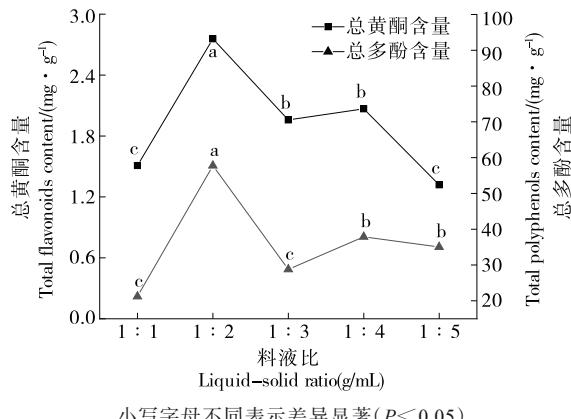


图1 料液比对总黄酮和总多酚含量的影响

Figure 1 Effect of material-liquid ratio on total flavonoid and total polyphenol content

发酵第4~5天的上升速度最大,发酵第5~6天呈下降趋势。发酵第2~4天,可能是发酵时间不足,黑曲霉H繁殖的数量少,相关次级代谢产物酶含量较少,因此总多酚和总黄酮含量缓慢增加。发酵第5天,黑曲霉H的菌浓度达到了适宜浓度,相关酶的数量和活力增加,因此总黄酮和总多酚含量达到峰值。发酵第6天,随着发酵时间的延长,黑曲霉H的生长进入了衰亡期,其数量减少,使其对总黄酮和总多酚的提取能力减弱,与牛丽亚等^[21~22]的研究结论一致。故最优发酵时间为5 d。

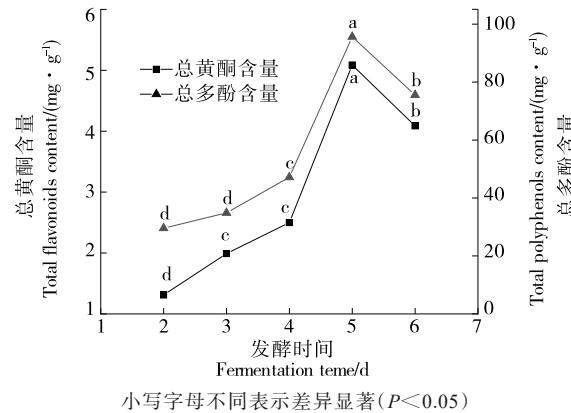


图2 发酵时间对总黄酮和总多酚含量的影响

Figure 2 Effect of fermentation time on total flavonoid and total polyphenol content

2.2.3 接种量对总黄酮和总多酚含量的影响 由图3可知,随着黑曲霉H接种量的增加,总黄酮和总多酚含量呈先上升后下降趋势,且在黑曲霉H接种量为9%时达到峰值。随着接种量的增加,黑曲霉H在培养基中的繁殖周期缩短,繁殖数量快速增加,纤维素酶产量提高,从而使总黄酮和总多酚释放量更多。当黑曲霉H接种量>9%

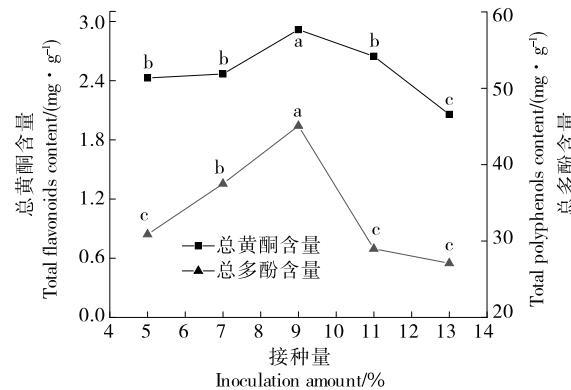


图3 接种量对总黄酮和总多酚含量的影响

Figure 3 Effect of inoculation amount on total flavonoid and total polyphenol content

时,可能因菌浓度过高,生存空间和条件有限,限制了黑曲霉 H 的繁殖并降低了酶活性,使得总黄酮和总多酚含量下降,与王妍等^[23-24]的研究结果一致。因此,最优黑曲霉 H 接种量为 9%。

2.2.4 发酵温度对总黄酮和总多酚含量的影响 由图 4 可知,当发酵温度为 28~37 ℃时,随着发酵温度的升高,总黄酮和总多酚含量呈先升高后下降趋势,且在发酵温度为 35 ℃时达到峰值。温度对微生物的生长及代谢酶活力有重要影响,当发酵温度为 35 ℃时,可能加快了黑曲霉 H 的生长发育,使得产酶量有所增加,而发酵温度过高,黑曲霉 H 可能容易衰老,且固态发酵体系中理化环境发生变化,可能影响酶的合成与催化效果,与唐诗潮等^[25]的结论一致。故最优发酵温度为 35 ℃。

2.2.5 碳源添加量对总黄酮和总多酚的影响 由图 5 可知,当碳源添加量为 1%~3% 时,总黄酮和总多酚含量呈先增加后下降趋势,且在碳源添加量为 2% 时达到峰值。

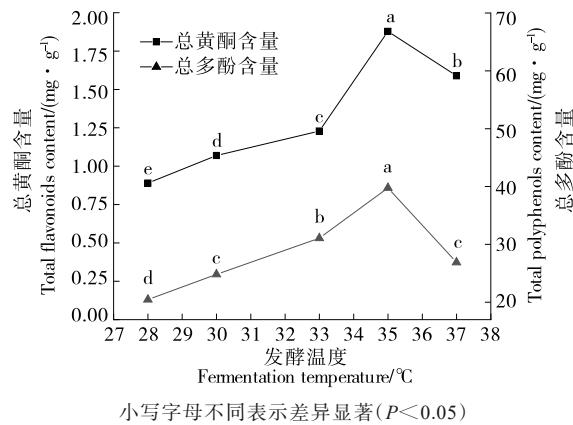


图 4 发酵温度对总黄酮和总多酚含量的影响

Figure 4 Effect of fermentation temperature on total flavonoid and total polyphenol content

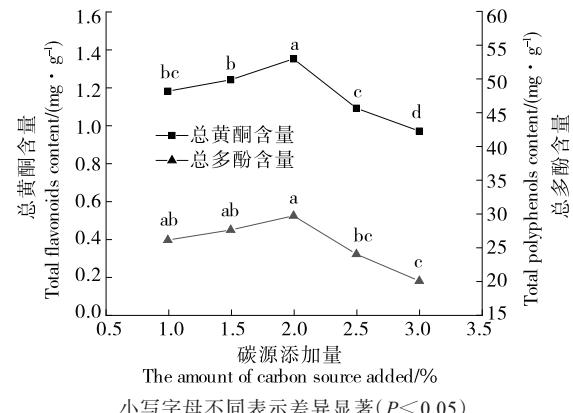


图 5 碳源添加量对总黄酮和总多酚含量的影响

Figure 5 Effect of carbon source addition amount on total flavonoid and total polyphenol content

当碳源添加量为 1%~2% 时,随着葡萄糖含量逐渐达到适宜浓度,黑曲霉 H 的繁殖速度增加,相关纤维素酶代谢增加,总黄酮和总多酚含量呈上升趋势;当碳源添加量为 2%~3% 时,随着碳源浓度的增加,黑曲霉 H 相关酶的代谢被抑制,因此总黄酮和总多酚含量有所下降。这与刘媛媛等^[19]的结论一致。因此,最佳碳源添加量为 2%。

2.2.6 方差分析 参照陈玮莹^[26]的方法用熵权法求得两者的综合评分,进行单因素方差分析求得 *F* 值和 *P* 值如表 2 所示。由表 2 可知,单因素组内显著性大小顺序为发酵时间 > 发酵温度 > 料液比 > 接种量 > 碳源添加量,因此选择发酵温度、发酵时间、料液比和接种量 4 个因素进行 $L_9(4^3)$ 正交试验,用以优化最佳发酵条件。

表 2 单因素试验方差分析

Table 2 Results of one-way ANOVA

| 因素 | <i>F</i> 值 | <i>P</i> 值 |
|-------|------------|-----------------------|
| 料液比 | 5.37 | 4.69×10^{-2} |
| 发酵时间 | 48.50 | 3.44×10^{-4} |
| 接种量 | 5.87 | 3.95×10^{-2} |
| 发酵温度 | 19.56 | 3.00×10^{-3} |
| 碳源添加量 | 4.58 | 6.32×10^{-2} |

2.3 正交试验

正交试验因素水平见表 3。参照陈玮莹^[26]的方法用熵权法求得总黄酮和总多酚含量的综合评分,结果见表 4。由表 5 可知,黑曲霉发酵麸实对综合评分的影响次序为发酵时间 > 料液比 > 发酵温度 > 接种量,固态发酵麸实的最优发酵工艺条件为发酵时间 5 d、发酵温度 35 ℃、料液比 1:2 (g/mL)、接种量 11%、碳源添加量 2%。此条件下的总黄酮含量为 9.04 mg/g,比未发酵时提高了 6.24 倍,总多酚含量为 109.28 mg/g,比未发酵时提高了 4.68 倍。

表 3 正交试验因素水平表

Table 3 Factors and levels of the orthogonal experiments

| 水平 | A 发酵时间/d | B 发酵温度/℃ | C 料液比 (g/mL) | D 接种量/% |
|----|----------|----------|--------------|---------|
| 1 | 4 | 33 | 1:1 | 7 |
| 2 | 5 | 35 | 1:2 | 9 |
| 3 | 6 | 37 | 1:3 | 11 |

2.4 抗氧化活性分析

2.4.1 DPPH 自由基清除能力 由图 6 可知,发酵前后的麸实提取物和维生素 C 对 DPPH 自由基清除能力随质量浓度的增加逐渐增大。相同质量浓度下,3 种样品对 DPPH 自由基的清除能力顺序为维生素 C > 发酵后的麸实

表4 正交试验设计及结果

Table 4 Designs and results of the orthogonal experiments

| 试验号 | A | B | C | D | 总黄酮含量/总多酚含量/综合 | | 评分 |
|-------|-------|-------|-------|-------|-----------------------|-----------------------|-------|
| | | | | | (mg·g ⁻¹) | (mg·g ⁻¹) | |
| 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 5.96 | 81.06 | 37.59 |
| 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3.88 | 46.40 | 21.64 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 2.86 | 62.50 | 27.84 |
| 4 | 2 | 1 | 3 | 2 | 5.75 | 91.45 | 41.67 |
| 5 | 2 | 3 | 2 | 1 | 8.86 | 103.60 | 48.71 |
| 6 | 2 | 2 | 1 | 3 | 7.60 | 93.18 | 43.58 |
| 7 | 3 | 2 | 3 | 1 | 4.67 | 82.58 | 37.36 |
| 8 | 3 | 1 | 2 | 3 | 6.74 | 94.13 | 43.51 |
| 9 | 3 | 3 | 1 | 2 | 3.54 | 58.14 | 26.36 |
| k_1 | 29.02 | 35.60 | 30.52 | 35.90 | | | |
| k_2 | 44.65 | 39.51 | 43.27 | 35.21 | | | |
| k_3 | 35.74 | 34.30 | 35.62 | 38.31 | | | |
| R | 15.63 | 5.20 | 7.65 | 3.10 | | | |

表5 正交试验方差分析[†]

Table 5 ANOVA of orthogonal experiment

| 来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F值 | P值 |
|------|-----------|-------|--------|-------|-----------------------|
| A | 737.43 | 2.00 | 368.72 | 29.66 | 1.09×10^{-4} |
| B | 88.05 | 2.00 | 44.03 | 3.54 | 7.33×10^{-2} |
| C | 493.95 | 2.00 | 246.98 | 19.87 | 4.99×10^{-4} |
| D | 31.82 | 2.00 | 15.91 | 1.28 | 0.32 |
| 误差 | 111.87 | 9.00 | 12.43 | | |
| 总计 | 25 406.50 | 18.00 | | | |
| 校正总计 | 1 463.13 | 17.00 | | | |

[†] $R^2=0.924$, $R_{\text{Adj}}^2=0.856$ 。

提取物>发酵前的芡实提取物,维生素C的清除能力与发酵后的接近,且高于发酵前的。发酵前后的芡实提取物和

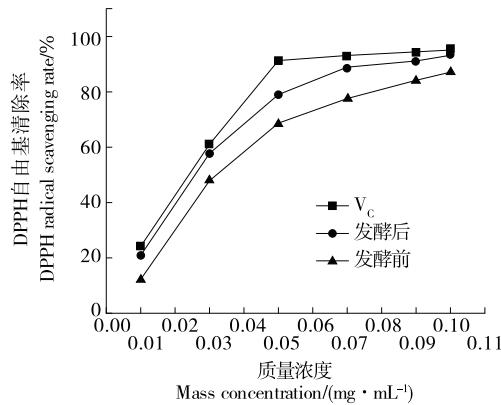


图6 芡实的DPPH自由基清除能力

Figure 6 DPPH free radical scavenging abilities of *Euryale ferox*

维生素C对DPPH自由基清除率的 IC_{50} 分别为0.032, 0.023, 0.020 mg/mL。说明发酵可以提升芡实的DPPH自由基清除能力。

2.4.2 ABTS自由基清除能力 由图7可知,随着样品质量浓度的增加,ABTS自由基清除率逐渐增加。相同质量浓度下,3种样品对ABTS自由基的清除能力顺序为发酵后的芡实提取物>维生素C>发酵前的芡实提取物。发酵前后的芡实提取物和维生素C对ABTS自由基清除率的 IC_{50} 分别为0.037, 0.024, 0.028 mg/mL。芡实发酵后对ABTS自由基的清除能力略高于维生素C,明显高于发酵前的,表明发酵能提升芡实的ABTS自由基清除能力。

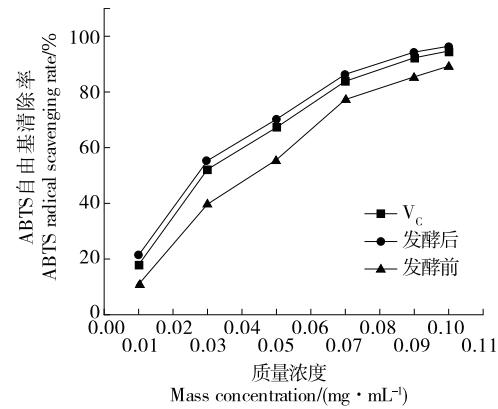


图7 芡实的ABTS自由基清除率能力

Figure 7 ABTS free radical scavenging abilities of *Euryale ferox*

2.4.3 总还原能力 由图8可知,发酵前后的芡实提取物和维生素C对铁离子的还原能力随着样品质量浓度的增大而增加。相同质量浓度下,3种样品对铁离子还原能力大小为维生素C>发酵后的芡实提取物>发酵前的芡实提取物,维生素C阳性对照对铁离子的还原能力与发酵后的基本相同,大于发酵前的。因此,发酵能提升芡实的

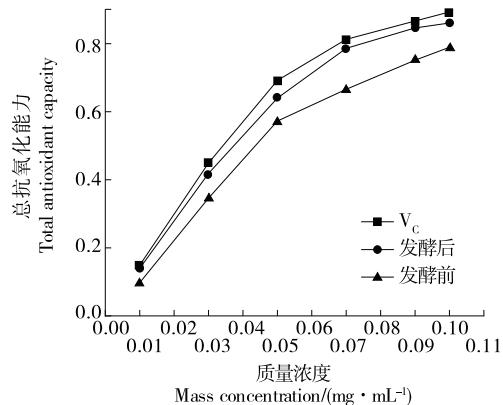


图8 芡实的总抗氧化能力

Figure 8 Total antioxidant ability of *Euryale ferox*

总抗氧化能力。

3 结论

以芡实为原料,总黄酮和总多酚含量为指标,从白地霉 S12、白地霉 S13、黑曲霉 H、青霉 Q 和酵母 A2 5 种菌种中筛选出发酵芡实的优势菌种为黑曲霉 H,最佳芡实发酵工艺条件为发酵时间 5 d、发酵温度 35 ℃、料液比 1:2 (g/mL)、接种量 11%、碳源添加量 2%,此条件下总黄酮含量为 9.036 mg/g,比发酵前提高了 6.24 倍,总多酚含量为 109.284 mg/g,比发酵前提高了 4.68 倍。发酵后,芡实对 DPPH 自由基、ABTS 自由基清除率的 IC_{50} 分别为 0.023, 0.024 mg/mL。维生素 C 阳性对照对铁离子的还原能力与发酵后的基本相同,大于发酵前的。综上,利用微生物对芡实原料进行发酵可提升其活性成分含量和抗氧化能力。后续可进一步深入研究黑曲霉 H 如何通过固态发酵手段提高芡实中黄酮及多酚类物质的释放量,以及基于发酵后芡实的功能产品开发。

参考文献

- [1] 林红强,王涵,谭静,等.药食两用中药—芡实的研究进展[J].特产研究,2019,41(2): 118-124.
LIN H Q, WANG H, TAN J, et al. Research progress on a medicinal and edible product-euryale ferox seeds[J]. Special Wild Economic Animal and Plant Research, 2019, 41(2): 118-124.
- [2] AHMED D, KUMAR V, VERMA A, et al. Retraction note: antidiabetic, antioxidant, antihyperlipidemic effect of extract of *Euryale ferox* Salisb with enhanced histopathology of pancreas, liver and kidney in streptozotocin induced diabetic rats[J]. BMC Complementary Medicine and Therapies, 2023, 23(1): 216.
- [3] 邓秋童,齐英,王秋红.芡实的炮制沿革及现代研究进展[J].中国药房,2022,33(15): 1 911-1 915.
DENG Q T, QI Y, WANG Q H. Processing evolution and modern research progress of *Euryale ferox*[J]. China Pharmacy, 2022, 33(15): 1 911-1 915.
- [4] 李美红,杨雪琼,万直剑,等.芡实的化学成分[J].中国天然药物,2007,5(1): 24-26.
LI M H, YANG X Q, WANG Z J, et al. Chemical constituents of the seeds of *Euryale ferox*[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2007, 5(1): 24-26.
- [5] 孙海林,张雅琼,谢小燕,等.芡实化学成分研究[J].中药材,2014,37(11): 2 019-2 021.
SUN H L, ZHANG Y Q, XIE X Y, et al. Studies on chemical constituents from seeds of *Euryale ferox*[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2014, 37(11): 2 019-2 021.
- [6] 王瑀.芡实化学成分及生物活性研究[D].济南:山东大学,2019: 1-2.
WANG Y. Chemical constituents and biological activity of *Euryale ferox* salisb[D]. Jinan: Shandong University, 2019: 1-2.
- [7] 彭灿灿,刘涛,邓俊勤,等.酶处理协同红曲菌固态发酵芡实对其化学成分的影响[J].食品与机械,2025,41(3): 17-25.
PENG C C, LIU T, DENG J J, et al. Effects of enzyme treatment combined with *Monascus* solid-state fermentation on chemical composition of *Poria cocos*[J]. Food & Machinery, 2025, 41(3): 17-25.
- [8] 同雍雍,卞倩,焦心语,等.干酪乳杆菌发酵芡实上清液的活性成分及抗氧化活性分析[J].食品工业科技,2022,43(24): 145-152.
YAN Y Y, BIAN Q, JIAO X Y, et al. Analysis of active components and antioxidant activity of *Lactobacillus casei* fermented *Euryales ferox* supernatant[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(24): 145-152.
- [9] 秦晶晶,钱慧琴,赵媛,等.柿叶总黄酮提取工艺优化及其抗氧化活性[J].食品工业科技,2020,41(13): 32-38, 45.
QIN J J, QIAN H Q, ZHAO Y, et al. Optimization of the extraction technology of total flavonoids and *in vitro* antioxidant activity of extract from persimmon leaves[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(13): 32-38, 45.
- [10] 张潇,周海旭,高晗,等.紫甘蓝中多酚提取工艺及抗氧化研究[J].河南科技学院学报(自然科学版),2023,51(5): 23-29.
ZHANG X, ZHOU H X, GAO H, et al. Study on the extraction technology of polyphenols from purple cabbage and its antioxidant[J]. Journal of Henan Institute of Science and Technology(Natural Science Edition), 2023, 51(5): 23-29.
- [11] 章烨雯,臧青民,陈荣,等.金橘叶中总黄酮的提取工艺优化及抗氧化活性研究[J].中国食品添加剂,2022,33(1): 46-54.
ZHANG Y W, ZANG Q M, CHEN R, et al. Optimization of processing technology of total flavonoids from *Fortunella margarita*(Lour.) Swingle leaves and its antioxidant activity[J]. China Food Additives, 2022, 33(1): 46-54.
- [12] 黄丽华,梁敏钰,侯婷华,等.水翁叶黄酮的提取及抗氧化活性分析[J].肇庆学院学报,2024,45(2): 9-15.
HUANG L H, LIANG M Y, HOU T H, et al. Extraction and analysis of antioxidant activity of flavone from the leaves of *cleistocalyx operculatus*[J]. Journal of Zhaoqing University, 2024, 45(2): 9-15.
- [13] 李思淇,李倩,于笛,等.玉叶金花黄酮提取工艺优化及抗氧化研究[J].食品科技,2023,48(7): 157-163.
LI S Q, LI Q, YU D, et al. Extraction process optimization and antioxidation of flavonoids from *Mussaenda pubescens* ait. F. [J]. Food Science and Technology, 2023, 48(7): 157-163.
- [14] FOGLIANO V, COROLLARO M L, VITAGLIONE P, et al. *In vitro* bioaccessibility and gut biotransformation of polyphenols present in the water-insoluble cocoa fraction[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2011, 55(Suppl 1): S44-S55.
- [15] LIU L, ZHANG R F, DENG Y Y, et al. Fermentation and complex enzyme hydrolysis enhance total phenolics and antioxidant activity of aqueous solution from rice bran

- pretreated by steaming with α -amylase[J]. Food Chemistry, 2017, 221: 636-643.
- [16] 林登蕃, 郑志豪, 周映君, 等. 植物基食品中多酚的生物转化及生物活性研究进展[J]. 食品科学, 2024, 45(14): 319-327.
- LIN D F, ZHENG Z H, ZHOU Y J, et al. Research progress in biotransformation and biological activity of polyphenols in plant-based foods[J]. Food Science, 2024, 45(14): 319-327.
- [17] 张婷, 吕青阳, 同志英, 等. 高产纤维素酶黑曲霉菌株的筛选、鉴定及产酶条件优化[J/OL]. 饲料研究. (2025-03-07) [2025-04-11]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2114.s.20250306.1908.002.html>.
- ZHANG T, LYU Q Y, YAN Z Y, et al. Screening, characterization and optimization of enzyme-producing conditions of high cellulase-producing *Aspergillus niger* strains [J/OL]. Feed Research. (2025-03-07) [2025-04-11]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2114.s.20250306.1908.002.html>.
- [18] 陈娜, 付传颖, 张玉新, 等. 黑曲霉高产 β -葡萄糖苷酶菌株的诱变、筛选及发酵条件优化[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(4): 901-906.
- CHEN N, FU C Y, ZHANG Y X, et al. Mutagenesis, screening and optimization of fermentation conditions on *Aspergillus niger* high-yield β -glucosidase neuraminidase strain[J]. Genomics and Applied Biology, 2016, 35(4): 901-906.
- [19] 刘媛媛, 卢海强, 李家骏, 等. 黑曲霉NHF5产单宁酶的发酵优化及转录组学分析[J]. 食品科技, 2024, 49(8): 30-38.
- LIU Y Y, LU H Q, LI J J, et al. Medium optimization and transcriptomic analysis of tannase production by *Aspergillus niger* NHF5[J]. Food Science and Technology, 2024, 49(8): 30-38.
- [20] NGUYEN K A, KUMLA J, SUWANNARACH N, et al. Optimization of high endoglucanase yields production from polypore fungus, *Microporus xanthopus* strain KA038 under solid-state fermentation using green tea waste[J]. Biology Open, 2019, 8(11): bio047183.
- [21] 牛丽亚, 刘宛玲, 肖建辉, 等. 黑曲霉发酵法提取麦胚黄酮工艺的研究[J]. 食品工业, 2015, 36(11): 1-3.
- NIU L Y, LIU W L, XIAO J H, et al. Wheat germ flavonoids extracted by fermentation with *Aspergillus*[J]. The Food Industry, 2015, 36(11): 1-3.
- [22] 高燕, 刘昆仑, 朱晓艾, 等. 黑苦荞固态发酵富集总酚、总黄酮工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2024, 45(4): 1-10, 28.
- GAO Y, LIU K L, ZHU X A, et al. Optimization of total phenolics and total flavonoids enrichment process of black Tartary buckwheat by solid-state fermentation and its antioxidant activity[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2024, 45(4): 1-10, 28.
- [23] 王妍, 郑猛虎, 崔欣雨, 等. 微生物固态发酵工艺对红薯淀粉渣真蛋白含量的影响[J]. 饲料工业, 2022, 43(9): 35-40.
- WANG Y, ZHENG M H, CUI X Y, et al. Effect of microbial solid state fermentation process on the true protein content of sweet potato starch residue[J]. Feed Industry, 2022, 43(9): 35-40.
- [24] 王静, 董梦蝶, 李祥, 等. 黑曲霉固态发酵葡萄皮渣产木聚糖酶的工艺研究[J]. 饲料工业, 2023, 44(16): 100-106.
- WANG J, DONG M D, LI X, et al. Study on the process of producing xylanase with grape pomace fermented by *Aspergillus niger*[J]. Feed Industry, 2023, 44(16): 100-106.
- [25] 唐诗潮, 李晓凤, 袁琨. 不同培养条件对黑曲霉细胞生长及水解特性的影响研究[J]. 现代食品科技, 2017, 33(8): 195-200, 129.
- TANG S C, LI X F, YUAN K. Effect of culture conditions on the growth and hydrolytic performance of *Aspergillus niger*[J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(8): 195-200, 129.
- [26] 陈玮莹. 江西电网Z供电公司综合绩效评价研究[D]. 抚州: 东华理工大学, 2019: 20-22.
- CHEN W Y. Research on comprehensive performance evaluation of Z power supply branch of Jiangxi power grid[D]. Fuzhou: East China University of Technology, 2019: 20-22.