基于主成分分析方法筛选乳酸菌发酵葛根酵素

杨 玉[1]， 李红艳[1]， 邓泽元[1]， 傅小华[2]， 赖长龙[1]， 范亚苇[1*]
([1]南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室 南昌 330047
[2]江西百禾药业有限公司 江西樟树 331200)

摘要 以 6 株乳酸菌纯种发酵葛根酵素，发酵结束后测定葛根酵素的活菌数、pH 值、总酸、还原糖含量、总酚含量，采用两种体外抗氧化活性测定方法(ABTS 和 FRAP)评价发酵酵素的抗氧化能力，通过高效液相色谱法测定葛根酵素中葛根素等主要异黄酮的含量和乳酸等主要有机酸的含量。通过主成分分析(PCA)方法来拟合整体的数据并建立综合评价模型，优选出适合发酵葛根酵素的菌种。结果显示，发酵的葛根酵素活菌数均达到 8.0 lg(CFU/mL)，pH 值降至 3.60 以下；还原糖含量减少 9.1%~17.9%，总酸含量最高达 8.47 g/1 000 g，有机酸的组成和含量变化显著；葛根酵素的总酚含量变化不显著，体外抗氧化活性得到有效保持。此外，发酵后大豆苷元和染料木素最多增加了 40.7%和 39.9%。PCA 结果显示：前 3 个主成分的累计方差贡献率为 85.9%，可综合反映发酵酵素的品质。德氏乳杆菌保加利亚亚种 GIM1.155(1.825 分)、嗜酸乳杆菌 GIM1.321(1.174 分)和植物乳杆菌 R4(0.621 分)的综合评价总得分排名靠前，表明它们在生长代谢和功能作用方面表现更优。与纯种发酵相比，采用这 3 株菌作为复合发酵剂制备的葛根酵素的品质有所改善。研究结果可为葛根酵素的复合发酵提供理论参考。

关键词 葛根酵素；乳酸菌；主成分分析；复合发酵
文章编号 1009-7848(2023)03-0196-10 **DOI**：10.16429/j.1009-7848.2023.03.021

葛根原名葛，为豆科（Legulninosae）葛属（*Pueraria* DC.）[1]。常见的葛根主要指野葛【*Pueraria Lobata* （Willd.） Ohwi】和粉葛（*Pueraria thomsonii* Benth.）的干燥根[2]。《中华本草》记载了葛根的传统用途，包括生津止渴、止泻止吐、对抗感冒、解肌退热、治疗头痛、解酒护肝和治疗某些心血管疾病等。葛根因药用和营养价值，常被用作草药、膳食补充剂以及添加到功能性食品中。许多研究证明葛根作为药食同源的食品，不仅含有较多的活性物质，而且药用方面也具有非常高的价值。Shukla 等[3]研究表明葛根具有肾保护活性，用其提取物可以改善慢性高血糖引发的肾损伤，延缓糖尿病的发展。Jung 等[4]发现在肥胖小鼠模型中用葛根可以预防饮食诱导的肥胖、糖耐量损伤和骨骼肌萎缩。也有研究报道长期服用葛根提取物可以降低血清总胆固醇、血压和空腹血糖水平[5]。大量研究也证实葛根具有抗氧化活性、抗糖尿病活性、抗炎活性、免疫调节活性和抗癌活性等药理活性[6]。

酵素是以动、植物和菌类等为原料经微生物发酵后得到的含有特定生物活性成分的功能性发酵产品[7]。植物酵素中含有多样的活性物质，例如植物多糖、植物多酚类物质、膳食纤维、有机酸和氨基酸等。酵素的制备与抗氧化活性研究逐渐成为研究热点。国内酵素行业仍属于一个新兴产业，各方面研究和应用还比较迟缓，且消费者对酵素的认识还存在一定争议。酵素中主要的微生物为乳酸菌、酵母菌、醋酸菌和霉菌，微生物的作用不仅可以改变酵素的成分并使其产生一些新的活性成分，还能增加营养价值和增强功能活性。食品中普遍使用的益生细菌包括各种乳酸杆菌、双歧杆菌和乳酸链球菌等。益生菌可刺激有益微生物的生长并减少病原体的数量，给人类和动物带来许多有益的健康影响。除了传统发酵乳制品外，非乳制品发酵产品，如发酵型果汁和发酵型蔬菜汁等也越来越被认为是满足日常饮食需求的功能性饮料，其中植物酵素产品受到全世界消费者的欢迎[8]。

在酵素生产过程中人工加入发酵剂可以控制产品质量的稳定性，增加酵素中的生物活性物质和提高生产效率。例如，白首乌酵素经乳酸菌和酵

收稿日期：2022-03-18
第一作者：杨玉，女，硕士生
通信作者：范亚苇 E-mail：yaweifan@ncu.edu.cn

母菌发酵后其功效酶含量增加且不良风味得到控制[9]。蓝莓果渣酵素经复合发酵后,其蛋白酶、脂肪酶、SOD 酶等活性成分的含量显著提高[10]。研究发现,相比单菌发酵而言,复合发酵不仅使发酵后产品风味更加丰富,而且能提高酵素的活性物质含量和抗氧化活性[11]。乳酸菌在共培养过程中表现出高水平的代谢多样性,菌株之间存在积极的相互作用,可以加强发酵过程的控制,为发酵食品提供更多的益处[12]。在酵素的生产过程中,其质量难以统一。需要建立产品质量标准,并积极开发新技术,提高酵素制品质量和安全性,同时降低生产成本。

本文以葛根为发酵原料,淀粉酶酶解后接种乳酸菌进行酵素发酵。探究不同乳酸菌发酵葛根酵素后 pH 值、总酸、还原糖含量、总酚含量、体外抗氧化活性、主要异黄酮含量和有机酸含量的差异。利用主成分分析方法对各评价指标进行分析,为筛选适合发酵葛根酵素的复合发酵剂提供新途径。

1　材料与方法

1.1　菌株

植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)R4、干酪乳杆菌(*Lacticaseibacillus casei*)M1-7、葡萄酒乳杆菌(*Liquorilactobacillus vini*)MM-3、玉米乳杆菌(*Lacticaseibacillus zeae*)MM-6,均来自自然发酵的酵素;嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)GIM1.321、德氏乳杆菌保加利亚亚种(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)GIM1.155,广东省微生物菌种保藏中心。

1.2　材料和试剂

干葛根块、自然发酵酵素,江西百禾药业有限公司;中温 α-淀粉酶、糖化酶,河南万邦实业有限公司;色谱级乙腈,美国 Sigma 公司;有机酸标准品(纯度>99%)、异黄酮标准品(纯度>98%)、色谱级甲酸,北京索莱宝科技有限公司。

1.3　主要仪器与设备

EXL800 全自动酶标仪,美国 Biotek Instruments 有限公司;Agilent1100 型高效液相色谱仪,安捷伦科技有限公司;LDZX-50KBS 立式压力蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械公司;HPX-160BSH 恒温恒湿箱,上海新苗医疗器械制造有限公司;SHZ-A 水浴恒温振荡器,上海博迅实业有限公司。

1.4　试验方法

1.4.1　葛根酵素的制备　将干葛根块粉碎后过 30 目筛,葛根粉和水按一定比例混合,使原料充分吸水后,于 90 ℃水浴糊化 10 min。参考文献[13]方法,将 0.2% α-淀粉酶与原料混合后于 50 ℃水浴摇床中液化 30 min,加入糖化酶糖化 2 h,用量 0.3%,温度 62 ℃。酶解结束后补足一定水量,使可溶性固形物含量为 10°Brix。115 ℃高压蒸汽灭菌,时间为 15 min,待到葛根发酵基料冷却。通过前期试验发现葛根酵素发酵 48 h 后其活菌数、pH 值和总酸趋于稳定。6 株乳酸菌在 35 ℃培养 20 h 后都有较高的菌量。葛根酵素的制备,在 48 h 后停止发酵,温度控制在 35 ℃,总接种量为 2%(以体积分数计)。

1.4.2　不同乳酸菌纯种发酵葛根酵素的质量分析与评价

1.4.2.1　乳酸菌活菌计数　采用稀释平板计数法检测样液中的总活菌数(Total viable count, TVC)。于超净工作台中将样液梯度稀释,分别取 100 μL 10^{-4},10^{-5},10^{-6} 样液稀释液进行涂布。将平板培养基倒置放入恒温恒湿箱内,35 ℃培养 48 h,计数。

1.4.2.2　pH 值和总酸的测定

1)pH 值的测定　参考国家标准 GB 5009.237-2016《食品 pH 值的测定》[14]。

2)总酸(TA)的测定　参考国家标准 GB 12456-2021《食品中总酸的测定》[15]。

1.4.2.3　还原糖的测定　还原糖含量(Reducing sugar content, RSC)测定根据文献[16]方法配制 DNS 试剂。取 1 mL 稀释后样液于具塞试管中,加 3 mL DNS 试剂,混匀。试管沸水浴 5 min,冷却后定容 25 mL,静置 30 min,测定波长 520 nm 处的吸光值。以葡萄糖为标准品,绘制标准曲线。

1.4.2.4　总酚的测定　总酚含量(Total phenols content, TPC)测定参照文献[17]并稍作修改。将 20 μL 样品和 100 μL 0.1 mol/L 福林酚试剂混合于 96 孔酶标板中,静置避光反应 5 min。在 96 孔酶标板中加入 80 μL 10% Na_2CO_3,30 min 后测定

波长765 nm处的吸光值。根据没食子酸(GAE)标准曲线计算样品中的总酚含量，结果表示为mg GAE/100 mL样品。

1.4.2.5 抗氧化活性的测定

1）ABTS·+自由基清除能力 根据文献[18]方法测定，用去离子水配制ABTS工作液。取200 μL ABTS工作液与20 μL样品溶液或空白溶液混合于96孔酶标板中，室温避光静置6 min后，测定波长734 nm处的吸光值。用VC为标准品，根据标准曲线计算样品的ABTS·+自由基清除能力，结果表示为mg VC/mL样品。

2）FRAP抗氧化能力 参照文献[19]方法测定，配制新鲜的TPTZ工作液，取300 μL与10 μL样品溶液或空白溶液混合于96孔酶标板中，室温避光静置4 min后测定593 nm处吸光值。以$FeSO_4$作标准品，根据标准曲线计算样品的FRAP抗氧化能力，结果表示为μmol Fe^{2+}/mL样品。

1.4.2.6 主要有机酸的测定 参考国家标准GB 5009.157-2016《食品中有机酸的测定》[20]。

1）供试品溶液的制备 取葛根酵素液2 mL于离心机离心，转速10 800 r/min，时间5 min，上清液过微孔滤膜(0.22 μm)，得酵素供试品溶液。

2）色谱条件 采用Agilent ZORBAX SB-Aq色谱柱(4.6 mm×250 mm，5 μm)，流动相为20 mmol/L磷酸二氢钠水溶液（pH2），流速0.8 mL/min，等梯度洗脱。柱温35 ℃，进样量5 μL，检测波长210 nm。

3）混合标准品溶液的制备 称取草酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、乙酸、柠檬酸、琥珀酸标照品各10 mg，用超纯水溶解配制成混合标准品溶液，按以上色谱条件进行测定。

1.4.2.7 主要异黄酮的测定

1）供试品溶液的制备 同1.4.2.6节。

2）色谱条件 采用Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），流动相为甲醇和0.1%甲酸水溶液，流速0.5 mL/min，洗脱梯度为0~5 min，5%~10%甲醇；5~8 min，10%~30%甲醇；8~15 min，30%~40%甲醇；15~20 min，40%~60%甲醇；20~30 min，60%~100%甲醇；30~33 min，100%~10%甲醇；33~38 min，10%~5%甲醇；柱温35 ℃，进样量10 μL，检测波长254 nm。

3）混合标准品溶液的制备 称取葛根素、大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素标准品各10 mg，用70%甲醇准确配制成混合标准品溶液，按以上色谱条件测定。

1.4.3 基于主成分分析选择发酵剂 将6株乳酸菌纯种发酵的葛根酵素和未发酵的葛根基料的品质指标进行主成分分析（Principal component analysis，PCA），根据不同乳酸菌发酵酵素的基本理化指标和功能活性指标等相关特性，筛选出适合的复合发酵菌种。

1.4.4 选定的复合发酵剂的验证 将基于主成分分析得到的复合菌种按相同比例（总接种量2%）接种于葛根发酵基料中，发酵结束时取样，测定样品的活菌数、pH值、总酸、还原糖含量、总酚含量、体外抗氧化活性、主要异黄酮含量和主要有机酸含量。

1.5 数据分析

使用Microsoft Excel、SIMCA14.1、SPSS Statistics 22.0软件进行数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同乳酸菌纯种发酵葛根酵素的特性

用6株乳酸菌发酵葛根酵素样品，将未发酵的葛根酵素基料(Control)作为对照，酵素发酵结束后相关指标测定结果见表1。

2.1.1 葛根酵素的活菌数、pH和总酸 从表1可以看出，发酵后的葛根酵素中活菌数均达到8 lg(CFU/mL)，其中经GIM1.155发酵的葛根酵素活菌数最高达8.86 lg(CFU/mL)。葛根酵素基料的pH值为5.49，经乳酸菌发酵后，某些酸类物质增多，各葛根酵素组的pH值都降至3.60以下。总酸含量也因微生物的作用而增高，其中GIM1.321酵素的总酸含量为8.47 g/1 000 g，是葛根基料组含量的5.6倍，其次是M1-7、R4、MM-3、GIM1.155和MM-6。这说明6株乳酸菌均能适应葛根酵素基料的发酵环境，且都有一定的产酸能力和耐酸能力。

2.1.2 葛根酵素的还原糖含量 乳酸菌在发酵时消耗了碳源，造成还原糖含量减少。葛根酵素初始还原糖含量为66.87 mg/mL。经48 h发酵，GIM1.

表 1　不同乳酸菌发酵葛根酵素的特性

Table 1　Haracterization of *Pueraria lobata* enzymes fermented with different LAB species

	R4	M1-7	MM-3	MM-6	GIM1.321	GIM1.155	对照
活菌数/$\times10^8$ CFU·mL^{-1}	5.66 ± 0.50^{b}	1.11 ± 0.08^{d}	1.16 ± 0.15^{d}	2.10 ± 0.30^{c}	7.00 ± 0.65^{a}	7.20 ± 0.36^{a}	0.00 ± 0.00^{e}
pH 值	3.45 ± 0.00^{c}	3.45 ± 0.04^{c}	3.50 ± 0.03^{c}	3.59 ± 0.05^{b}	3.47 ± 0.01^{c}	3.58 ± 0.01^{b}	5.49 ± 0.04^{a}
总酸/g·(1 000 g)$^{-1}$	7.95 ± 0.43^{bc}	8.38 ± 0.02^{ab}	7.75 ± 0.31^{cd}	6.26 ± 0.07^{e}	8.47 ± 0.28^{a}	7.35 ± 0.10^{d}	1.52 ± 0.10^{f}
还原糖/mg·mL^{-1}	57.41 ± 0.55^{d}	58.85 ± 0.68^{c}	60.76 ± 0.91^{b}	57.92 ± 0.37^{cd}	54.93 ± 0.77^{e}	57.71 ± 0.40^{cd}	66.87 ± 0.15^{a}
总酚/mg GAE·(100 mL)$^{-1}$	38.43 ± 0.58^{a}	36.85 ± 0.29^{b}	38.35 ± 0.64^{a}	36.93 ± 0.19^{b}	38.58 ± 0.26^{a}	38.15 ± 0.22^{a}	38.32 ± 0.58^{a}
ABTS/mg VC·mL^{-1}	1.06 ± 0.00^{ab}	1.00 ± 0.04^{c}	1.04 ± 0.02^{bc}	1.06 ± 0.00^{ab}	1.05 ± 0.00^{ab}	1.06 ± 0.00^{ab}	1.09 ± 0.00^{a}
FRAP/μmol Fe^{2+}·mL^{-1}	1.38 ± 0.01^{b}	1.37 ± 0.04^{b}	1.38 ± 0.02^{b}	1.40 ± 0.02^{b}	1.06 ± 0.02^{d}	1.25 ± 0.02^{c}	1.48 ± 0.02^{a}
草酸/mg·mL^{-1}	0.87 ± 0.01^{bc}	0.83 ± 0.01^{c}	0.85 ± 0.03^{c}	0.87 ± 0.01^{bc}	0.90 ± 0.03^{ab}	0.93 ± 0.01^{a}	0.87 ± 0.03^{bc}
酒石酸/mg·mL^{-1}	8.96 ± 0.13^{bc}	8.55 ± 0.51^{c}	8.77 ± 0.23^{c}	8.83 ± 0.11^{c}	9.45 ± 0.18^{ab}	9.85 ± 0.07^{a}	8.42 ± 0.41^{c}
苹果酸/mg·mL^{-1}	2.32 ± 0.07^{cd}	2.19 ± 0.06^{d}	2.52 ± 0.05^{bc}	2.47 ± 0.05^{bc}	2.53 ± 0.04^{b}	2.89 ± 0.11^{a}	2.24 ± 0.21^{d}
乳酸/mg·mL^{-1}	12.76 ± 0.35^{a}	12.53 ± 0.34^{a}	10.37 ± 0.29^{b}	10.87 ± 0.43^{b}	12.73 ± 0.63^{a}	10.35 ± 0.40^{b}	0.94 ± 0.06^{c}
乙酸/mg·mL^{-1}	0.46 ± 0.03^{b}	0.31 ± 0.02^{d}	0.23 ± 0.01^{e}	0.37 ± 0.01^{cd}	0.38 ± 0.01^{cd}	0.42 ± 0.00^{bc}	0.66 ± 0.08^{a}
柠檬酸/mg·mL^{-1}	0.31 ± 0.02^{c}	0.08 ± 0.01^{e}	1.17 ± 0.06^{b}	0.20 ± 0.01^{d}	0.09 ± 0.00^{e}	0.20 ± 0.01^{d}	1.59 ± 0.04^{a}
琥珀酸/mg·mL^{-1}	1.56 ± 0.08^{ab}	0.86 ± 0.05^{d}	0.54 ± 0.06^{e}	1.45 ± 0.01^{bc}	1.48 ± 0.04^{bc}	1.69 ± 0.08^{a}	1.39 ± 0.06^{c}
葛根素/μg·mL^{-1}	306.16 ± 3.06^{cd}	295.82 ± 9.49^{d}	310.48 ± 5.10^{bc}	310.91 ± 10.06^{bc}	319.93 ± 4.46^{ab}	320.90 ± 6.53^{ab}	331.59 ± 3.07^{a}
大豆苷/μg·mL^{-1}	56.92 ± 1.19^{c}	41.55 ± 1.75^{e}	48.82 ± 0.68^{d}	47.33 ± 3.61^{d}	57.73 ± 1.77^{bc}	61.31 ± 0.87^{ab}	64.42 ± 1.17^{a}
染料木苷/μg·mL^{-1}	9.96 ± 0.22^{cd}	7.83 ± 0.53^{e}	2.82 ± 0.13^{f}	8.68 ± 0.71^{de}	10.18 ± 0.11^{c}	11.81 ± 1.36^{b}	13.65 ± 0.48^{a}
大豆苷元/μg·mL^{-1}	19.97 ± 0.50^{cd}	24.63 ± 0.87^{b}	26.57 ± 0.66^{a}	23.52 ± 0.65^{b}	20.72 ± 0.21^{c}	19.25 ± 1.64^{cd}	18.89 ± 0.44^{d}
染料木素/μg·mL^{-1}	1.51 ± 0.04^{c}	2.25 ± 0.08^{a}	2.28 ± 0.03^{a}	2.07 ± 0.11^{b}	1.56 ± 0.02^{c}	1.56 ± 0.00^{c}	1.63 ± 0.09^{c}

注：小写字母表示同行不同种类间的显著性差异（$P<0.05$）。下同。

321 组的还原糖含量为 54.93 mg/mL，相比发酵前降低最多，约 17.9%。其它组还原糖也有减少，MM-3 的含量下降最少，为 9.1%。

2.1.3　葛根酵素的总酚含量　葛根酵素的总酚含量变化不大，R4、MM-3、GIM1.321 和 GIM1.155 相较于葛根基料组无显著性差异。M1-7 的总酚含量最低，为 36.85 mg GAE/100 mL。据报道干酪乳杆菌在发酵时使游离态酚类含量下降，导致抗氧化活性下降，这可能是 M1-7 总酚含量较低的原因[21]。有研究表明植物乳杆菌在发酵饮料过程中可将糖基化的酚类化合物去糖基化，从而把可溶性键合态酚类化合物和不溶性结合态酚类化合物从植物细胞壁中释放出来，提高总酚含量[22]。此次试验中未发现植物乳杆菌发酵的葛根酵素总酚含量显著增加的现象。

2.1.4　葛根酵素的抗氧化活性　由表 1 可知用不同菌种制备的葛根酵素的 ABTS·$^{+}$自由基清除能力和 FARP 抗氧化能力。R4、MM-6、GIM1.321 和 GIM1.155 发酵酵素的 ABTS·$^{+}$自由基清除能力与未发酵

的葛根基料组比较，没有显著差异，分别为1.06，1.06，1.05 mg VC/mL和1.06 mg VC/mL，仅M1-7和MM-3差异显著，分别为1.00 mg VC/mL和1.04 mg VC/mL。发酵后葛根酵素的FRAP抗氧化能力与对照组的1.48 μmol Fe^{2+}/mL相比有一些下降，其中下降最多的为GIM1.155，降低了15.5%。

2.1.5 葛根酵素的主要有机酸含量 不同菌种发酵后葛根酵素的有机酸组成发生变化，其含量与发酵前相差较大。葛根酵素中乳酸含量大幅增加，而在葛根酵素基料中检测的量很少。乳酸的积累可以抑制其它细菌或真菌的生长。6种酵素中都含有较多的酒石酸、苹果酸、乳酸和琥珀酸，未发酵的葛根基料含有更多的乙酸和柠檬酸。在发酵后测得少量的草酸、乙酸和柠檬酸。有机酸的种类和含量与发酵原料、发酵菌种和发酵方式等都有关。在不同菌种发酵的酵素中，因乳酸菌的差异，故有机酸也呈现不一致的变化。发酵后酒石酸含量增加可能是乳酸菌将糖类物质代谢为酒石酸。发酵后柠檬酸含量下降，这可能是柠檬酸进入乳酸菌生长代谢的三羧酸循环，被代谢为其它下游有机酸。草酸、苹果酸和琥珀酸在发酵后部分样品中的含量有所增加，在部分样品中含量有所下降，表现出不规则的变化。草酸可由糖酵解途径的产物草酰乙酸生成，也可被部分乳酸菌降解。琥珀酸可在三羧酸循环中积累，也可进一步被琥珀酸脱氢酶氧化。发酵后乙酸含量没有增加，说明以同型乳酸发酵为主。乳酸菌发酵后产生的有机酸可创造对病原体增殖不利的环境，乳酸等有机酸的增加还可以提高发酵食品的防腐性和安全性。

2.1.6 葛根酵素的主要异黄酮含量 葛根中的异黄酮类化合物主要有葛根素、大豆苷元、大豆苷、染料木素和染料木苷[23]。通过测定发现在葛根酵素中含量最多的是葛根素，约300 μg/mL，而发酵前葛根基料中为331.59 μg/mL，发酵后葛根素含量下降。GIM1.321和GIM1.155组与葛根基料组相比没有显著性差异，M1-7的葛根素含量最低，为295.82 μg/mL。发酵过程中葛根素可能会因乳酸菌的代谢活动而被转化为其它形式。酵素中大豆苷的含量也比葛根基料中低。与对照组相比，发酵后多组葛根酵素中大豆苷元和染料木素的含量显著增加，其中MM-3组大豆苷元和染料木素的含量各增加了40.7%和39.9%。有研究表明在未发酵的大豆中，糖苷形式的异黄酮含量最多，其中大豆苷和染料木苷含量最高，而经乳酸菌的代谢异黄酮的存在形式受到影响[24]。研究发现一些乳酸菌具有*O*-脱甲基酶、*O*-糖苷酶、*C*-糖苷酶和氢化酶活性，其中部分乳杆菌和双歧杆菌可将大豆提取物中*O*-糖苷大豆苷和染料木苷生物转化为大豆苷元和染料木素[25]。在葛根酵素的发酵中也发现糖苷形式的异黄酮含量减少，而苷元类异黄酮含量增加的现象。

2.2 主成分分析结果

基于不同乳酸菌发酵葛根酵素和未经发酵的葛根发酵基料的活菌数、pH变化量(ΔpH)、总酸、还原糖变化量(ΔRSC)、总酚含量、体外抗氧化能力、主要异黄酮含量和主要有机酸含量共19项指标，采用降维分析方法建立主成分分析模型。由表2可知，前3个主成分(PC)的累计贡献率达85.9%，因此前3个主成分可以代表大部分指标的信息。

由表3可知PC1的模型方差贡献率为42.3%，主要反映大豆苷、乙酸、大豆苷元、染料木苷、葛根素、ΔpH、总酸、ABTS·⁺自由基清除能力、乳酸和染料木素的变异信息，以产酸和主要异黄酮的影响为主。PC2的方差贡献率为34.3%，主要反映活菌数、酒石酸、FRAP抗氧化能力、ΔRSC、草酸和柠檬酸的变异信息。PC3的方差贡献率为9.3%，主要反映总酚、柠檬酸、染料木苷、苹果酸和琥珀酸的变异信息。

从图1可看出，不同乳酸菌发酵的葛根酵素和未发酵的葛根发酵基料组区分度良好。结合图2的PCA载荷图来看，R4、GIM1.321和GIM1.155组分布在PC1和PC2正向端，与活菌数、酒石酸、

表2 主成分的特征值及贡献率

Table 2 Characteristic value and contribution rate of each pincipal component

主成分	特征值	方差贡献率/%	方差累计贡献率/%
1	8.04	42.336	42.336
2	6.52	34.311	76.647
3	1.76	9.274	85.922

苹果酸、琥珀酸和草酸呈正相关，说明在这 3 组中这些指标的数值相对较高。与文献[26]报道的植物乳杆菌和嗜酸乳杆菌发酵果汁后对其非挥发性的酸类物质贡献较大的结果类似。而 R4、GIM1.321 和 GIM1.155 组与大豆苷元和染料木素的相关性为负，表明这 3 组中它们的含量相对较低。葛根发酵基料组位于 PC1 的正轴附近，说明其和葛根素、大豆苷、染料木苷、ABTS·⁺自由基清除能力和乙酸表现为正相关的关系。对照组中检测到的葛根素、大豆苷和染料木苷的含量比发酵组高，可能是因为发酵过程中乳酸菌的代谢影响异黄酮的结构，发酵后各种异黄酮的含量发生改变。而 M1-7、MM-3 和 MM-6 分布在 PC1 和 PC2 的负向端，与大豆苷元和染料木素呈正相关，可能是这些乳酸菌将异黄酮糖苷转化为其糖苷配基的能力较强，与文献报道的部分乳酸菌可将大豆苷和染料木苷 *O*-糖苷脱糖基化的现象类似[25]。

根据各主成分得分(Y_1-Y_3)，以各主成分对应的方差贡献率为权重，构建综合评价模型：$Y=0.42Y_1+0.34Y_2+0.09Y_3$。根据该模型计算各组综合总得分，见表 4。综合总得分前三的为德氏保加利亚乳杆菌 GIM1.155、嗜酸乳杆菌 GIM1.321 和植物乳杆菌 R4。结合 PCA 得分可知这 3 株菌发酵的葛根酵素综合品质更优。植物乳杆菌、嗜酸乳杆菌和德氏保加利亚乳杆菌常被用作食品发酵菌种，也有研究发现它们复合发酵与单菌发酵相比更能提高发酵产品品质[27-28]。最终选择 R4、GIM1.321 和 GIM1.155 作为复合发酵剂。

表 3　不同菌株发酵葛根酵素品质载荷矩阵

Table 3　Quality load matrix of *Pueraria lobata* enzymes fermented by different strains

指标	PC1 (42.3%)	PC2 (34.3%)	PC3 (9.3%)
活菌数	0.025	0.378	−0.038
pH 变化量(ΔpH)	−0.287	0.216	0.000
总酸	−0.279	0.220	0.013
还原糖变化量(ΔRSC)	−0.189	0.313	−0.118
总酚	0.166	0.121	0.421
ABTS	0.272	0.011	0.055
FRAP	0.041	−0.320	−0.121
草酸	0.166	0.274	0.210
酒石酸	0.025	0.348	0.210
苹果酸	0.026	0.264	0.333
乳酸	−0.275	0.226	−0.095
乙酸	0.319	−0.046	−0.238
柠檬酸	0.177	−0.271	0.351
琥珀酸	0.212	0.240	−0.307
葛根素	0.287	0.036	0.283
大豆苷	0.320	0.120	0.125
染料木苷	0.287	0.095	−0.345
大豆苷元	−0.289	−0.152	0.262
染料木素	−0.257	−0.220	0.155

2.3　复合发酵的验证试验

在主成分分析基础上，选择 R4、GIM1.321 和 GIM1.155 作为葛根酵素发酵的复合发酵剂，对其功能特性进行研究，同时将复合发酵组与单菌发酵组进行比较，结果见表 5。

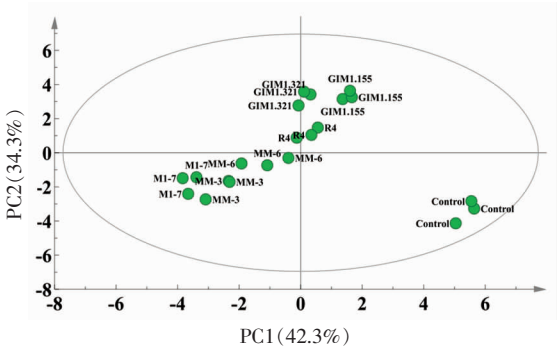

图 1　PCA 得分图

Fig.1　Factor scores in principal component coordinate systems

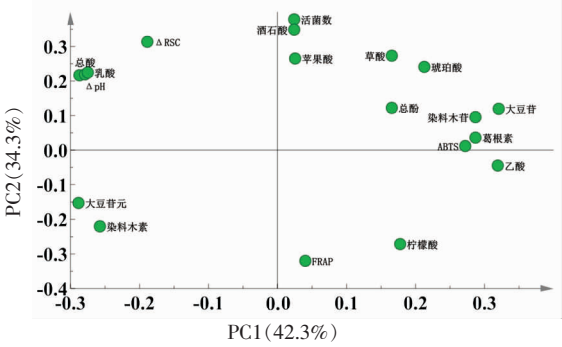

图 2　PCA 载荷图

Fig.2　Loading scatter plot in principal component coordinate systems

表 4 不同菌株发酵葛根酵素的综合得分和排名

Table 4 Composites scores and rankings of *Pueraria lobata* enzymes fermented by different strains

菌种	各主成分得分			总得分 Y	排名
	Y_1	Y_2	Y_3		
R4	0.259	1.151	−1.119	0.621	3
M1−7	−3.627	−1.761	−1.318	−1.979	6
MM−3	−2.573	−2.028	2.529	−1.192	5
MM−6	−1.137	−0.540	−0.819	−0.605	4
GIM1.321	0.120	3.252	0.287	1.174	2
GIM1.155	1.540	3.357	0.481	1.825	1

表 5 验证结果

Table 5 Verification results

	复合发酵剂	R4	GIM1.321	GIM1.155
活菌数/$\times10^8$ CFU·mL^{-1}	7.96 ± 0.33^a	5.66 ± 0.50^b	7.00 ± 0.65^a	7.20 ± 0.36^a
pH 值	3.45 ± 0.01^b	3.45 ± 0.00^b	3.47 ± 0.01^b	3.58 ± 0.01^a
总酸/g·(1 000 g)$^{-1}$	8.59 ± 0.10^a	7.95 ± 0.43^b	8.47 ± 0.28^{ab}	7.35 ± 0.10^c
还原糖/mg·mL^{-1}	56.55 ± 0.29^b	57.41 ± 0.55^{ab}	54.93 ± 0.77^c	57.71 ± 0.40^a
总酚/mg GAE·(100 mL)$^{-1}$	39.29 ± 0.15^a	38.43 ± 0.58^b	38.58 ± 0.26^b	38.15 ± 0.22^b
ABTS/mg VC·mL^{-1}	1.19 ± 0.00^a	1.06 ± 0.00^b	1.05 ± 0.00^b	1.06 ± 0.00^b
FRAP/μmol Fe^{2+}·mL^{-1}	1.36 ± 0.01^a	1.38 ± 0.01^a	1.06 ± 0.02^c	1.25 ± 0.02^b
草酸/mg·mL^{-1}	0.87 ± 0.00^b	0.87 ± 0.01^b	0.90 ± 0.03^b	0.93 ± 0.01^a
酒石酸/mg·mL^{-1}	8.65 ± 0.11^d	8.96 ± 0.13^c	9.45 ± 0.18^b	9.85 ± 0.07^a
苹果酸/mg·mL^{-1}	1.98 ± 0.08^d	2.32 ± 0.07^c	2.53 ± 0.04^b	2.89 ± 0.11^a
乳酸/mg·mL^{-1}	13.39 ± 0.30^a	12.76 ± 0.35^a	12.73 ± 0.63^a	10.35 ± 0.40^b
乙酸/mg·mL^{-1}	0.84 ± 0.00^a	0.46 ± 0.03^b	0.38 ± 0.01^c	0.42 ± 0.00^c
柠檬酸/mg·mL^{-1}	0.36 ± 0.01^a	0.31 ± 0.02^b	0.09 ± 0.00^d	0.20 ± 0.01^c
琥珀酸/mg·mL^{-1}	1.18 ± 0.05^c	1.56 ± 0.08^{ab}	1.48 ± 0.04^b	1.69 ± 0.08^a
葛根素/μg·mL^{-1}	315.22 ± 5.25^{ab}	306.16 ± 3.06^b	319.93 ± 4.46^a	320.90 ± 6.53^a
大豆苷/μg·mL^{-1}	58.18 ± 0.58^b	56.92 ± 1.19^b	57.73 ± 1.77^b	61.31 ± 0.87^a
染料木苷/μg·mL^{-1}	9.71 ± 0.51^b	9.96 ± 0.22^b	10.18 ± 0.11^b	11.81 ± 1.36^a
大豆苷元/μg·mL^{-1}	19.09 ± 0.19^a	19.97 ± 0.50^a	20.72 ± 0.21^a	19.25 ± 1.64^a
染料木素/μg·mL^{-1}	1.51 ± 0.02^a	1.51 ± 0.04^a	1.56 ± 0.02^a	1.56 ± 0.00^a

葛根酵素经 R4、GIM1.321 和 GIM1.155 这 3 株菌复合发酵后，菌体密度分别比 R4、GIM1.321 和 GIM1.155 单菌发酵组高，活菌数达 8.9 lg (CFU/mL)；pH 值比 GIM1.321 和 GIM1.155 单独发酵的酵素低，为 3.45。复合发酵后总酸含量为 8.59 g/1 000 g，比单菌发酵时有所增加。有机酸中乳酸含量进一步增加，说明复合发酵有利于乳酸的积累。然而，也发现乙酸含量比单菌组的含量高，以及部分有机酸减少。复合发酵后，葛根酵素的总酚含量增到 39.29 mg GAE/100mL。与单菌发酵组相比，复合发酵酵素的 ABTS·$^+$自由基清除能力明显提高，同时 FRAP 抗氧化能力与部分单菌发酵组相比也显著增强。复合发酵酵素中葛根素、大豆苷和染料木素的含量比单菌发酵酵素中的含量低，可能是复合发酵剂将异黄酮糖苷转化为其糖苷配基的能力更强。大豆苷元和染料木素这两种苷元类异黄酮的含量在复合发酵组和单菌发酵组中没有太大差异。复合发酵剂发酵葛根酵素后整体品质得到提高。

3 结论

自然发酵酵素的发酵周期长，发酵菌种不明和容易染杂菌等弊端明显，而人工接种乳酸菌发酵菌种能够很好地规避这些问题。本试验发现 6 株乳酸菌 R4、M1-7、MM-3、MM-6、GIM1.321 和 GIM1.155 在葛根发酵基料中具备较好的发酵性能。对发酵后酵素的基本特性和功能特性进行分析，使用主成分分析方法选择适合发酵葛根酵素的复合发酵剂。最后选出的 3 株乳酸菌分别是 R4、GIM1.321 和 GIM1.155。将它们作为复合菌种进行葛根酵素发酵,有利于提高其综合品质。

参 考 文 献

[1] 刘晓莹，张宁，郭乃菲，等. 乳酸菌发酵条件下葛根抗氧化能力研究[J]. 中国中医药现代远程教育，2018，16(13)：92-94.
LIU X Y，ZHANG L，GUO N F，et al. Study on the antioxidant capacity of Radix Puerariae under the condition of lactic acid bacteria fermentation[J]. Chinese Medicine Modern Distance Education of China，2018，16(13)：92-94.

[2] 楚纪明，马树运，李海峰，等. 葛根有效成分及其药理作用研究进展[J]. 食品与药品，2015，17(2)：142-146.
CHU J M，MA S Y，LI H F，et al. Progress in effective components and pharmacological effects of *Puerariae lobatae* Radix[J]. Food and Drug，2015，17(2)：142-146.

[3] SHUKLA R，PANDEY N，BANERJEE S，et al. Effect of extract of *Pueraria tuberosa* on expression of hypoxia inducible factor-1a and vascular endothelial growth factor in kidney of diabetic rats[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy，2017，93：276-285.

[4] JUNG H W，KANG A N，KANG S Y，et al. The root extract of pueraria lobata and its main compound，puerarin，prevent obesity by increasing the energy metabolism in skeletal muscle[J]. Nutrients，2017，9(1)：33.

[5] CHOI Y，BOSE S，SHIN N R，et al. Lactate-fortified puerariae radix fermented by *Bifidobacterium* breve improved diet-induced metabolic dysregulation via alteration of gut microbial communities[J]. Nutrients，2020，12(2)：276.

[6] BHARTI R，CHOPRA B S，RAUT S，et al. Pueraria tuberosa：A review on traditional uses，pharmacology，and phytochemistry[J]. Frontiers in Pharmacology，2021，11：582506.

[7] 韩齐，赵金敏，高小琴，等. 功能性酵素发展研究现状[J]. 食品工业科技，2019，40(1)：337-340，345.
HAN Q，ZHAO J M，GAO X Q，et al. Development status of functional fermented enzymes[J]. Science and Technology of Food Industry，2019，40(1)：337-340+345.

[8] PEYER L C，ZANNINI E，ARENDT E K. Lactic acid bacteria as sensory biomodulators for fermented cereal-based beverages[J]. Trends in Food Science & Technology，2016，54：17-25.

[9] 李凡，吕兵. 白首乌酵素发酵工艺的优化[J]. 食品工业科技，2019，40(3)：179-184.
LI F，LV B. Optimization of the fermentation process of *Cynanchum auriculatum* Royle ex wight ferment[J]. Science and Technology of Food Industry，2019，40(3)：179-184.

[10] 杨培青，李斌，颜廷才，等. 蓝莓果渣酵素发酵工艺优化[J]. 食品科学，2016，37(23)：205-210.
YANG P Q，LI B，YAN T C，et al. Fermentation of blueberry pomace for the production of biomass and protease activity[J]. Food Science，2016，37(23)：205-210.

[11] 朱丹实，吴逗逗，沈雨思，等. 多菌种混合发酵果蔬汁的研究进展[J]. 中国食品学报，2021，21(10)：343-352.
ZHU D S，WU D D，SHEN Y S，et al. Research progress on mixed fermentation of multiple strains for fruits and vegetables juice[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology，2021，21(10)：343-352.

[12] CANON F，NIDELET T，GUEDON E，et al. Understanding the mechanisms of positive microbial interactions that benefit lactic acid bacteria co-cultures[J]. Frontiers in Microbiology，2020，11：2088.

[13] 蒋鹏飞，罗强，施宝珠，等. 葛根酶解糖化过程中功能成分及微结构变化研究[J]. 食品工业，2017，38(6)：155-160.
JIANG P F，LUO Q，SHI B Z，et al. Changes of functional components and microstructure during enzymatic saccharification process of pueraria[J]. The

Food Industry, 2017, 38(6): 155-160.

[14] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品 pH 值的测定: GB 5009.237-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 1-8.
National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National Food Safety Standard of the People's Republic of China Determination of pH value of food: GB 5009.237-2016 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2016: 1-8.

[15] 国家市场监督管理总局, 国家卫生健康委员会. 食品安全国家标准 食品中总酸的测定: GB 12456-2021[S]. 北京: 中国标准出版社, 2021: 1-8.
State Administration for Market Regulation, National Health Commission of the People's Republic of China. National Food Safety Standard of the People's Republic of China Determination of total acids in food: GB 12456-2021[S]. Beijing: Standards Press of China, 2021: 1-8.

[16] 赵凯, 许鹏举, 谷广烨. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 534-536.
ZHAO K, XU P J, GU G Y. Study on determination of reducing sugar content using 3,5-dinitrosalicylic acid method[J]. Food Science, 2008, 29(8): 534-536.

[17] LI J Q, LI W T, DENG Z Y, et al. Comparison of free, conjugated, and insoluble-bound phenolics and their antioxidant activities in oven-drying and freeze-drying bamboo (*Phyllostachys edulis*) shoot tips[J]. Journal of Food Science, 2021, 86(9): 4223-4243.

[18] 邹仕昱, 潘瑶, 陈璇, 等. 桑葚, 蓝莓和红薯复配物的自由基清除能力研究[J]. 中国食品学报, 2021, 21(1): 51-57.
ZOU S Y, PAN Y, CHEN X, et al. Studies on free radical scavenging ability of mulberry,blueberry and sweet potato complexes[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(1): 51-57.

[19] 曾林晖, 邓泽元, 余修亮, 等. 蜂胶黄酮的超声波提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2016,37(12): 295-300.
ZENG L H, DENG Z Y, YU X L, et al. Optimization of the ultrasound- assisted extraction of flavonoids from propolis and its antioxidant activity [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(12): 295-300.

[20] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中有机酸的测定: GB 5009.157-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 1-8.
National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National Food Safety Standard of the People's Republic of China Determination of organic acids in food: GB 5009.157-2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016: 1-8.

[21] 赖婷, 刘磊, 张名位, 等. 不同乳酸菌发酵对桂圆肉中酚类物质及抗氧化活性的影响[J]. 中国农业科学, 2016, 49(10): 1979-1989.
LAI T, LIU L, ZHANG M W, et al. Effect of lactic acid bacteria fermentation on phenolic profiles and antioxidant activity of dried longan flesh[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2016, 49(10): 1979-1989.

[22] BENINCASA C, MUCCILLI S, AMENTA M, et al. Phenolic trend and hygienic quality of green table olives fermented with *Lactobacillus plantarum* starter culture[J]. Food Chemistry, 2015, 186: 271-276.

[23] 高学清. 葛根和葛花的解酒护肝作用及其机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013.
GAO X Q. The hepatoprotective effect of Radix Puerariae and Puerariae Flos against the alcoholic liver injury in mice and its mechanisms[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2013.

[24] GAYA P, PEIROTEN A, MEDINA M, et al. Isoflavone metabolism by a collection of lactic acid bacteria and bifidobacteria with biotechnological interest[J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2016, 67(2): 117-124.

[25] GAYA P, PEIROTEN A, LANDETE J M. Transformation of plant isoflavones into bioactive isoflavones by lactic acid bacteria and bifidobacteria[J]. Journal of Functional Foods, 2017, 39: 198-205.

[26] CUI S, ZHAO N, LU W, et al. Effect of different *Lactobacillus* species on volatile and nonvolatile flavor compounds in juices fermentation[J]. Food Science & Nutrition, 2019, 7(7): 2214-2223.

[27] 刘锐, 黄玉开, 白卫东, 等. 蔬菜汁的乳酸菌发酵[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(4): 114-118.
LIU R, HUANG Y K, BAI W D, et al. Fermentation of lactic acid bacteria in mixed vegetable juice [J]. Food and Fermentation Industries, 2013, 39(4): 114-118.

[28] 吴万林，余元善，肖更生，等. 蓝莓汁乳酸菌的发酵特性[J]. 现代食品科技，2020，36(3)：159-166. WU W L，YU Y S，XIAO G S，et al. Fermentation characteristics of lactic acid bacteria in blueberry juice[J]. Modern Food Science and Technology，2020，36(3)：159-166.

Screening of *Pueraria lobata* Enzymes Fermentation by Lactic Acid Bacteria Based on Principal Component Analysis

Yang Yu[1]，Li Hongyan[1]，Deng Zeyuan[1]，Fu Xiaohua[2]，Lai Changlong[1]，Fan Yawei[1*]

([1]*Nanchang University*，*State Key Laboratory of Food Science and Technology*，*Nanchang 330047*

[2]*Jiangxi Baihe Pharmaceutical Co.*，*Ltd*，*Zhangshu 331200*，*Jiangxi*)

Abstract Six strains of lactic acid bacteria were used for *Pueraria lobata* enzymes pure fermentation. After fermentation，the number of viable bacteria count，pH values，total acidity，reducing sugar content，and total phenols content of *Pueraria lobata* enzymes were determined. Two *in vitro* antioxidant activity determination methods (ABTS and FRAP) were used to evaluate the antioxidant capacity of fermented *Pueraria lobata* enzymes. The contents of major isoflavones such as puerarin and major organic acids such as lactic acid in *Pueraria Lobata* enzymes were determined by high performance liquid chromatography. A principal component analysis (PCA) method was used to fit the overall data and establish a comprehensive evaluation model to select the strains suitable for fermentation of *Pueraria Lobata* enzymes. The results showed that the fermented *Pueraria lobata* enzymes all had a viable count of 8.0 lg (CFU/mL) and the pH value decreased to below 3.60. The reducing sugar content decreased from 9.1% to 17.9% after fermentation，and the total acid content reached up to 8.47 g/1 000 g. The composition and content of organic acids changed significantly. The total phenols content of *Pueraria lobata* enzymes did not change significantly after fermentation，and the *in vitro* antioxidant activity was effectively maintained. In addition，the contents of daidzein and genistein increased up to 40.7% and 39.9% after fermentation. The PCA results showed that cumulative variance contribution rate of the first three principal components was 85.9%，which could reflect the quality of the fermented enzyme comprehensively. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* GIM1.155 (1.825 points)，*Lactobacillus acidophilus* GIM1.321 (1.174 points) and *Lactiplantibacillus plantarum* R4 (0.621 points) ranked high in the overall evaluation score，indicating that they performed better in terms of growth，metabolism and functions. Compared with pure fermentation，the quality of *Pueraria lobata* enzymes prepared using these three strains as a mixed starter culture was improved. The results of the study can provide a theoretical reference for the mixed culture fermentation of *Pueraria lobata* enzymes.

Keywords *Pueraria lobata* enzymes；*Lactobacillus*；principal component analysis；mixed culture fermentation