

浆水发酵过程中有机酸的变化及其抑菌性能和体外抗氧化能力

张哲川^{1,2}, 梁晓琳^{1,2}, 张玉双², 薛旭宁², 丁波², 刘红娜^{1,2*}

¹西北民族大学 生物医学研究中心 中国-马来西亚国家联合实验室 兰州 730030

²西北民族大学生命科学与工程学院 兰州 730030

摘要 浆水是以包菜、萝卜和芹菜等为原料的传统特色发酵食品。以浆水为发酵基质,探究发酵过程中浆水有机酸的变化及对抑菌性能和体外抗氧化能力的影响。结果表明,浆水发酵过程中酸度逐渐升高,pH值逐渐降低,在4d后趋于稳定,此时浆水发酵初步成熟。在有机酸测定中,乳酸含量最高(3.331 mg/mL),发酵过程中乳酸、苹果酸和酒石酸含量先降低后升高;乙酸先升高后降低;柠檬酸含量总体呈升高趋势。浆水的抑菌效果随发酵时间的延长先增大后减小,在发酵7d达到最大值,此时金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌圈直径分别为12.5 mm和11.4 mm。发酵5d浆水的总黄酮含量达到最大值3.64 mg/L,发酵6d总酚含量达到最大值52.44 mg/L。采用4种模型(DPPH自由基清除率、ABTS⁺自由基清除率、亚铁离子浓度及还原力)分析浆水发酵过程中的抗氧化活性,发现浆水体外抗氧化能力逐渐提高。本研究为浆水品质分析、发酵工艺标准化和工业化提供参考。

关键词 浆水; 发酵时间; 有机酸; 抑菌性能; 体外抗氧化活力

文章编号 1009-7848(2024)04-0159-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.04.016

浆水是以包菜、萝卜和芹菜等为原料的传统特色发酵食品。其生产工艺为蔬菜经过热烫后加入面汤,再添加浆水引子,经微生物菌群促其发酵制酸,成熟的浆水口感酸醇,气味清香,色泽略白^[1]。浆水在发酵期间,乳酸菌增殖,并产生大量有机酸,乳酸菌具有调节并改善肠道微生物的功效,可以解腻开胃、增进食欲,具有良好的营养价值与保健功效^[2-3]。乳酸菌还能够产生多种抑菌物质,如有机酸和细菌素等,其中有机酸能够维持浆水的酸-碱动态平衡,可以抑制浆水中腐败菌的生长,影响浆水的口感和品质^[4]。目前对浆水有机酸以及抑菌性能已有广泛研究,以期改善食品的品质及风味,延长货架期。目前有机酸的研究主要集中在不同发酵和接种方式中有机酸的组成分析和检测方法的选择等方面^[5-6]。关于抑菌方面的研究主要集中在不同乳酸菌的筛选和抑菌成分的确^[7]。王芮东等^[8]通过高效液相色谱法分析经过不同方式发酵的萝卜泡菜中有机酸的变化,得出随发酵时

间的延长,不同方式发酵的泡菜有机酸总量均呈下降趋势。吴燕等^[9]筛选出多株乳酸菌,以抑菌圈的大小来评价抑菌性能,并对抑菌物质中的成分进行研究。Gizachew等^[7]从不同食物(干酪、奶酪、凝乳)中分离出不同种类的乳酸菌,并对乳酸菌的抑菌作用进行分析,其中对绿脓杆菌上的抑制性能最优。而关于浆水发酵过程中有机酸及抑菌性能的研究较少。

人类的多种疾病如免疫损伤、衰老和癌症等,均被证实与体内的自由基和活性氧有关^[8]。Bobinaite等^[9]研究发现浆果中的黄酮、多酚、有机酸等活性物质具有降低氧化应激,清除自由基以及保护食物源大分子的作用。乔支红等^[10]对不同地区的酸浆老汤进行发酵处理,发现抗氧化能力均有所增强。然而,目前尚无关于浆水发酵过程中抗氧化能力的变化研究。

本研究通过测定浆水发酵过程中的酸度、pH值、乳酸菌数和有机酸含量等指标的变化,以及对抑菌性能和体外抗氧化活性的分析,探究发酵浆水中有机酸和抑菌性能的变化,以及抗氧化活性的变化,从而为浆水的品质分析、发酵工艺的标准化和工业化提供参考。

收稿日期: 2023-08-27

基金项目: 甘肃省自然科学基金项目(21JR11RA019);中央高校基本科研业务费专项资金项目资助项目(31920220045)

第一作者: 张哲川,男,硕士生

通信作者: 刘红娜 E-mail: 2772751931@qq.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

西芹 (*Apium graveolens* Linn)、包菜 (结球甘蓝, *Brassica oleracea* var. *capitata*)、白萝卜 (*Raphanus sativus*), 市售; 浆水发酵引子, 采集自兰州市榆中县夏官营镇居民自制的浆水老汤; 面粉, 中粮集团有限公司。

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH)、2,4,6-三吡啶基三嗪 (ABTS)、2,2-联氨-双二铵盐 (TPTZ), 南京双领化玻有限公司; 福林酚、亚硝酸钠、芦丁、氯化铝、碳酸钠、石油醚、冰乙酸、没食子酸盐酸、氢氧化钠、铁氰化钾、乙醇、三氯乙酸、酚酞, 中国医药(上海)试剂公司; 所有试剂均为国产分析纯级。

1.2 主要仪器

PHSJ-3F 型实验室 pH 计, 上海仪电科学仪器有限公司; LC-20A Prominence 高效液相色谱仪, 日本岛津公司; 721 型分光光度计, 龙尼科仪器(上海)有限公司; 75X 型比色皿, 上海精密仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 浆水的制备 参考侯智勇等^[2]的方法, 选择新鲜蔬菜洗净后切成 3~4 cm 的小段, 放进 500 mL 沸水中焯水 3 min。加入 15 g 面粉, 加入过程中不断搅拌, 防止面粉在水中结成小面团。罐装后冷却至室温, 随后加入 30 g 浆水发酵引子。

1.3.2 pH 值和酸度的测定 采用 pH 计检测浆水发酵过程中的 pH 值。酸度的测定参考杜欣^[1]的方法。

1.3.3 乳酸菌数的测定 参照《食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验》(GB 4789.35-2016)^[3]的方法, 采用平板计数法对浆水中乳酸菌数进行测定。

1.3.4 有机酸的测定 取 8 mL 样品浆水于 10 mL 离心管中, 在 8 000 r/min 条件下离心 10 min, 取离心后的上清液, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤后上机测定。取一定量的乳酸、乙酸、柠檬酸、苹果酸和富马酸 5 种标品与超纯水混合, 分别制成 1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 mg/mL 的混合标准溶液。

高效液相色谱检测条件参考方晟等^[13]的方法: 色谱柱为 Agilent TC-C18 柱 (250 mm \times 4.6 mm

i.d., 5 μm); 流动相 A 为 0.1% 甲酸, 流动相 B 为甲醇; 流动相 A: 流动相 B=95:5, 进行等度洗脱; 检测波长 210 nm; 流速 0.4 mL/min; 进样量 20 μL ; 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.3.5 抑菌性能的测定

1.3.5.1 供试菌液的制备 以金黄色葡萄球菌与大肠杆菌为指示菌, 将两种菌种分别于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中培养 24 h, 挑取典型菌落至 100 mL LB 液体培养基, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床 200 r/min 培养 12 h。取 5 mL 培养后的菌液至新的 100 mL LB 液体培养基, 并放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床 200 r/min 中复苏 2 h。将复苏培养的菌液 5 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体用 PBS 溶液溶解、混匀, 相同条件下再次离心 2 次。最后将收集的菌体用 PBS 缓冲溶液溶解、摇匀, 采用比浊法调整菌液浓度为 $C=1\times 10^6$ CFU/mL (麦氏比浊管 $M=0.5$)。

1.3.5.2 抑菌圈的测定 将稀释后的菌液均匀涂布于 LB 固体培养基表面, 利用打孔器均匀打孔后向孔内注入 80 μL 不同发酵期的浆水。注入完毕后用封口膜密封好放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内保存 2 h 后, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中培养 12 h, 用游标卡尺测量抑菌圈直径 (mm), 以抑菌圈大小表征抑菌效果^[4]。

1.3.6 还原糖的测定 参照《食品安全国家标准 食品中还原糖的测定》(GB 5009.7-2016)^[5]的方法, 测定浆水发酵过程中还原糖质量浓度。

1.3.7 总酚质量浓度的测定 参照朱晓庆等^[6]的方法, 采用福林-酚比色法测定浆水中总酚的质量浓度, 结果依据标准曲线计算, 以没食子酸质量计量。

1.3.8 浆水中总黄酮的萃取和浓度测定 参照何玲等^[7]的试验方法, 并适当修改: 从浆水中称取 5 g 芹菜, 石油醚脱色处理, 90% 的乙醇溶液按照 1:5 的料液比于三角瓶中, 在 70 $^{\circ}\text{C}$ 下, 采用超声处理 30 min, 重复上述操作 2 次后过滤, 然后减压蒸干, 以少量 90% 的乙醇溶液进行溶解, 过滤后取滤液 10 mL, 并加入 30% 乙醇溶液定容至 50 mL, 得到待测液备用。结果依据标准曲线计算, 以芦丁质量计量。

1.3.9 体外抗氧化活性测定

1.3.9.1 DPPH 自由基清除率测定 参照 Kuntal 等^[8]的方法, 并适当修改: 样品经 8 000 r/min 离心

10 min,取 2 mL 上清液,加入 2 mL 0.5 mmol/L 的 DPPH 溶液,振荡并摇匀,随后于室温下避光静置 30 min,在波长 517 nm 处测定吸光度。DPPH 清除率计算方法如式(1)所示:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%)=(A_0-A_1)/A_0 \times 100 \quad (1)$$

式中, A_0 ——单个 DPPH 溶液吸光度值; A_1 ——甲醇溶液与样品溶液的吸光度值。

1.3.9.2 ABTS 阳离子自由基清除能力的测定 按照 Xiao 等^[19]的方法,并适当修改。配制 2.45 mmol/L 的过硫酸钾溶液和 7 mmol/L 的 ABTS 溶液,按照 1:2 的比例(V/V)混合后避光静置 16 h。使用前以乙醇溶液对该工作液进行稀释,使其在波长 734 nm 的吸光度为 0.70 ± 0.02 。准备浆水上清液样品,加入 1.2 mL ABTS 溶液混合摇匀,反应 6 min,测定波长 734 nm 处的吸光度,ABTS 阳离子自由基清除率计算方法如式(2)所示。

$$\text{ABTS 阳离子自由基清除率}(\%)=(1-A_0/A_1) \times 100 \quad (2)$$

式中, A_0 ——样品溶液与 ABTS 溶液的吸光度值; A_1 ——甲醇溶液与 ABTS 溶液的吸光度值。

1.3.9.3 亚铁离子还原力的测定 参照 Yu 等^[19]的方法,并适当修改:使用醋酸钠和冰醋酸混合配制浓度为 0.3 mol/L, pH 值为 3.6 的醋酸缓冲液;使用浓度为 40 mmol/L 的 HCl 溶液稀释并配制 10 mmol/L 的 TPTZ 溶液以及 20 mmol/L 的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶液,将上述溶液按 10:1:1 的比例(V/V/V)混合,配制得到亚铁离子还原力溶液。

浆水上清液 0.2 mL,加入 1 mL 亚铁离子还原力溶液,在 37 °C 水浴中恒温反应 20 min,测定波长 593 nm 处的吸光度,配制梯度 FeSO_4 标准溶液(100~1 400 $\mu\text{mol/L}$),绘制标准曲线: $y=0.03x+0.0063$ ($R^2=0.996$),通过标准曲线计算亚铁离子浓度以表示亚铁离子还原力。

1.3.9.4 还原力的测定 参照朱晓庆等^[19]方法,并适当修改:将 0.2 mL 上清液加入 1 mL 0.2 mol/L (pH 6.6) 的磷酸盐缓冲液,1 mL 1% 的铁氰化钾溶液混合后振荡摇匀,在 50 °C 条件下反应 30 min。冷却至室温后,加入 1 mL 10% 体积分数的三氯乙酸溶液,混匀后以 3 000 r/min 离心 10 min。将 1 mL 上清液加入 1% 的三氯化铁溶液,混匀,室温下静置 10 min。空白对照采用蒸馏水,测定波长

700 nm 处的吸光度。以样品溶液和空白对照溶液的吸光度差来表示还原力。

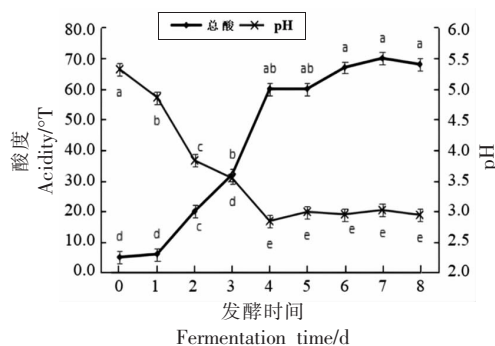
1.4 数据统计与分析

所有数据均为 3 次重复后所取的平均值,统计分析均采用 SPSS 23.0 软件,多重比较均采用 Duncan's,作图采用 Origin Pro 8.0。

2 结果与分析

2.1 pH 值和酸度的变化

如图 1 所示,随着发酵时间的延长,浆水的 pH 值逐渐降低,pH 值从发酵初始到第 4 天的 5.32 下降至 2.84,发酵 4~8 d,其 pH 值稳定在 2.9。而酸度在发酵初始时的 5°T 增长至第 4 天的 60°T 后保持稳定。主要是由于浆水中含有淀粉、蛋白质、无机盐以及小分子糖类,适合微生物的生长,pH 值和酸度的变化可以反应浆水在发酵过程中形成的游离 H^+ 和有机酸的变化情况^[20]。Jayabalan 等^[21]发现,发酵液会产生二氧化碳,它在水中溶解产生的碳酸根离子会和有机酸中的氢离子结合发生反应,起到一个缓冲的作用,使其保持一个稳定的 pH 值。

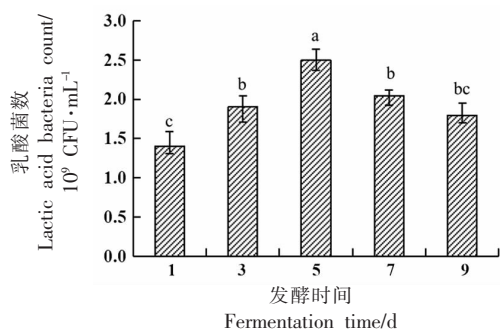


注:同一曲线中不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

图 1 发酵过程中浆水的 pH 值与酸度变化
Fig.1 Changes of pH value and acidity during Jiangshui fermentation

2.2 不同发酵时间对乳酸菌数的影响

乳酸菌是可通过发酵糖类从而产生大量乳酸的一类细菌的总称,其具有产生抑菌物质(细菌、有机酸)的能力,在这些物质中,有机酸会消耗一定细胞的能量,从而对细胞膜造成破坏^[4]。如图 2 所示,随着发酵时间的延长,乳酸菌数量逐渐上



注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

图2 不同发酵时间对乳酸菌数的影响

Fig.2 Effect of different fermentation time on lactic acid bacteria count

升。在发酵 1~3 d 时,乳酸菌数量增长缓慢。这可能是由于此时浆水中只有少量的明串珠菌和短乳杆菌^[4]。在发酵 3~5 d 时,浆水发酵中期乳酸菌增长较为迅速。这是因为醋酸菌等好氧菌在浆水发酵初期迅速繁殖,乳酸及其它酸的累积增加使浆水 pH 值降低,而低 pH 值会抑制其它微生物的

生长,从而为乳酸菌的增殖创造有利条件。在第 5 天后,乳酸菌数逐渐下降,这可能是随着发酵时间的延长天然营养素减少所致^[22]。浆水在最初的阶段,葡萄糖会被分解成 CO₂ 和乙醇,而产生的乙醇会与酸性反应生成酯,从而使得发酵产物的香味更加浓郁。直至发酵后期,霉菌的出现,使得浆水腐败,品质下降,风味不再酸爽可口^[17]。

2.3 不同发酵时间对有机酸的影响

有机酸对浆水风味的形成以及品质至关重要。在检测的 5 种有机酸中,乳酸的含量最高,为 3.331 mg/mL。辛博^[23]在浆水接种发酵方面的研究表明,乳酸菌的生长繁殖能产生乳酸。乳酸的酸味比较温和,且乳酸具有一定的抑菌和防腐效果,可以延长浆水的保质期。表 1 为发酵过程中有机酸含量的变化,乳酸的含量先升高后降低,在第 5 天达到最高值为 3.331 mg/mL,第 9 天降到最低值为 1.784 mg/mL,不同发酵时间乳酸含量的差异较显著($P < 0.05$),且乳酸含量的变化趋势与浆水中乳酸菌数的变化趋势一致。

表 1 不同发酵时间有机酸的变化

Table 1 Changes of organic acids in different fermentation time

有机酸种类	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d
乳酸/mg · mL ⁻¹	2.244 ± 0.21 ^b	2.146 ± 0.13 ^{bc}	3.331 ± 0.18 ^a	2.566 ± 0.16 ^b	1.784 ± 0.08 ^c
乙酸/mg · mL ⁻¹	0.365 ± 0.09 ^b	0.296 ± 0.12 ^c	0.272 ± 0.14 ^c	0.596 ± 0.26 ^{ab}	0.612 ± 0.15 ^a
柠檬酸/mg · mL ⁻¹	0.088 ± 0.02 ^c	0.061 ± 0.01 ^c	0.179 ± 0.04 ^{bc}	0.216 ± 0.03 ^b	0.496 ± 0.02 ^a
苹果酸/mg · mL ⁻¹	0.427 ± 0.03 ^b	0.567 ± 0.25 ^a	0.529 ± 0.11 ^a	-	-
酒石酸/mg · mL ⁻¹	-	0.069 ± 0.03 ^{bc}	0.094 ± 0.02 ^b	0.082 ± 0.04 ^a	0.068 ± 0.01 ^{bc}

注:同行不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$);-, 未检出(<0.001 mg/mL)。

乙酸可以产生醋香味并为浆水提供愉悦的后酸感。乙酸的含量变化与乳酸呈相反趋势,随着发酵时间的延长,乳酸菌增殖后,伴随着乳酸含量的升高乙酸含量开始降低。乙酸的含量在第 9 天达到最高值为 0.612 mg/mL,在第 5 天达到最低值为 0.272 mg/mL。与王芮东等^[5]对萝卜泡菜发酵过程中有机酸变化研究结果类似。

柠檬酸产生的酸味具有一定的清爽感,可以提升浆水的感官性状,增强饮用者的食欲。通过不同有机酸含量对比分析可以发现,与乳酸和乙酸相比,柠檬酸含量较低,总体呈先下降后上升的趋势,发酵 1~3 d 由 0.088 mg/mL 降到最低值 0.061

mg/mL,之后又上升至第 9 天的 0.496 mg/mL 达到最高值。李维妮等^[24]表明乳酸菌能够利用三羧酸循环来产生柠檬酸,使得其含量升高。

苹果酸产生的酸味浓烈,在口中酸味滞留时间长,利于浆水形成独特爽口的酸味特征^[25]。在浆水发酵第 3 天的苹果酸含量达到 0.567 mg/mL,在发酵 3~5 d 苹果酸含量总体呈降低的趋势($P < 0.05$),乳酸含量呈升高趋势。朱仙娜等^[26]在对黄酒生产过程中的浸米浆水有机酸检测时,同样发现苹果酸具有先升高后降低的趋势。这可能是因为在发酵过程中苹果酸等二元酸可以不断消耗转化成乳酸等一元酸^[27]。可能是受发酵后期微生物代谢

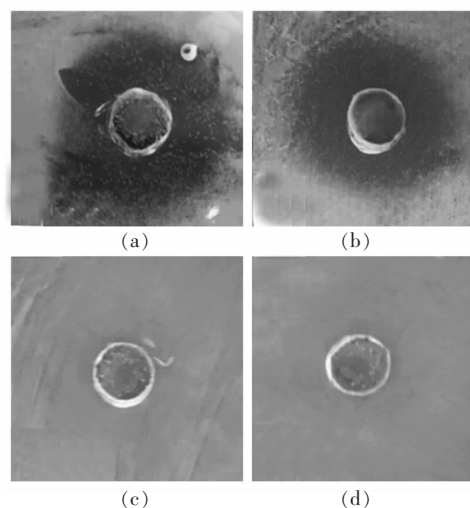
的影响,在第 7 天和第 9 天,未检出苹果酸。

酒石酸有良好的缓冲性并具有特殊香味。在发酵过程中,酒石酸的含量较低。在第 1 天未检出酒石酸,发酵 3~9 d,酒石酸的含量先升高后降低。在第 5 天达到最高值 0.094 mg/mL,第 3 天和第 9 天的含量较为接近,无显著差异($P>0.05$)。张培等^[28]发现发酵浆水中乳酸的含量远高于酒石酸的含量,与本研究一致。酒石酸含量在发酵中后期开始降低,是因为酒石酸能够被乳酸菌降解生成乳酸^[24]。

2.4 不同发酵时间对抑菌性能的影响

浆水中的有机酸(乳酸、醋酸等)和黄酮类化合物等有效地抑制一些腐败菌的生长。如图 3 所示,与对照组相比,经过乳酸菌的发酵作用,浆水对金黄色葡萄球菌与大肠杆菌均有良好的抑制作用,且对金黄色葡萄球菌的抑制作用强于对大肠杆菌的抑制作用。发酵后的浆水的抑菌作用可能来源于 2 个方面,一方面由于黄酮类物质具有一定的抑菌效果;另一方面,乳酸菌对 CO_2 、过氧化氢、酸性物质、多肽和蛋白质等具有广泛的抑制作用^[14],其中酸性物质会大量消耗细菌的细胞能量,影响其稳定性,而细菌素可以导致靶向菌膜内的能量外泄和物质流出^[29]。

从表 2 可以看出,浆水对两种菌的抑制效果在第 3 天后较为显著,发酵期总体抑制效果先增强后减弱。在第 7 天,抑菌圈均达到最大值,金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径达到 12.5 mm,大肠杆菌的抑菌圈直径达到 10.1 mm,抑菌效果均达到最好。第 3 天和第 5 天的抑菌圈直径相比,无显著性



注:a, b 均为第 7 天的抑菌直径,其中 a 的指示菌为金黄色葡萄球菌,c 为对照组;b 的指示菌为大肠杆菌,d 为对照组。

图 3 不同发酵时间对抑菌活性的影响

Fig.3 Effect of different fermentation time on antibacterial activity

差异($P>0.05$)。在发酵 7~9 d,抑菌圈开始减小,抑菌效果开始减弱,而抑菌效果始终强于发酵初期($P<0.05$)。本研究中浆水的抑菌性能变化趋势与乳酸菌数目、乳酸等有机酸含量的变化趋势相似,这与何玲等^[17]对不同温度下浆水发酵液的抑菌效果变化与乳酸菌和乳酸等指标的关联性一致。推测浆水发酵过程中抑菌效果的增强与发酵前、中期乳酸菌的增殖、有机酸总量的增多及酸度的上升相关,而后期随着乳酸菌活性的下降,乳酸减少且酸度不再增加,抑菌效果有所减弱。

表 2 不同发酵时间的抑菌圈直径(mm)

Table 2 Diameter of inhibition zone for different fermentation time (mm)

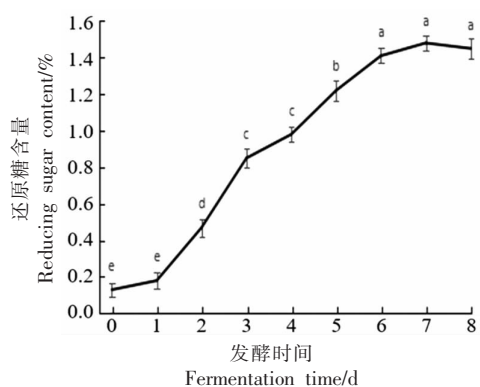
指示菌菌种	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d
金黄色葡萄球菌	5.2 ± 0.21 ^c	9.6 ± 0.26 ^b	10.8 ± 0.32 ^{ab}	12.5 ± 0.40 ^a	11.3 ± 0.37 ^a
大肠杆菌	4.9 ± 0.19 ^c	6.4 ± 0.18 ^b	7.5 ± 0.26 ^b	10.1 ± 0.43 ^a	8.4 ± 0.29 ^a

注:同行不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

2.5 还原糖含量的变化

如图 4 所示,浆水发酵过程中还原糖含量从第 2 天开始增长至第 6 天的 1.41%后趋于稳定。这主要是由于在发酵过程中,浆水所含的酵母菌、醋酸菌及乳酸菌等菌类增多,并且浆水中含有淀

粉、蛋白质、无机盐等营养物质,微生物能利用这些营养物质进行相关反应,得到一些产物如还原糖、有机酸等物质^[20]。而发酵 6 d 后还原糖含量开始趋于稳定,可能是由于发酵液中糖的产生和代谢含量维持在一个平衡的范围内^[30]。



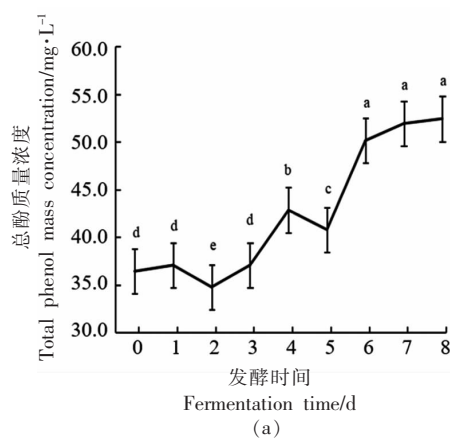
注:不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

图4 发酵过程中浆水所含还原糖的变化

Fig.4 Changes of reducing sugar content in Jiangshui fermentation

2.6 总酚和总黄酮质量浓度的变化

总酚具有抗氧化活性,如图 5a 所示,随着发酵时间的延长,浆水中总酚的质量浓度从发酵最初的 36.41 mg/L 升至第 8 天的 52.44 mg/L。这主要是由于在发酵过程中新生成了一些酚类物质,



注:同一曲线不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

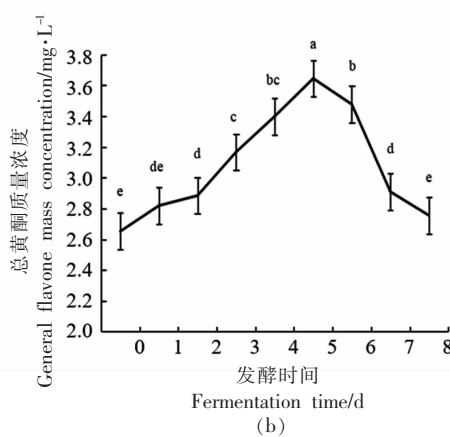


图5 浆水发酵过程中总酚及总黄酮质量浓度的变化

Fig.5 Changes of mass concentration of total phenol and general flavone in Jiangshui fermentation

2.7 抗氧化活性的变化

如图 6a 所示,DPPH 自由基清除率随着发酵时间的延长,从初始时的 4% 上升到 30% ($P<0.05$)。这可能是由于发酵前加入的面汤中,含有的淀粉以及维生素可溶性糖等物质可以为微生物的生长提供充足的碳源,发酵过程中产生大量的乳酸菌及醋酸菌,并且伴随着乳酸、醋酸、乙醇及黄酮物质急剧增长,DPPH 自由基的清除率显著

增加。然而发酵后期发酵液中的乳酸菌活性会降低,从而导致 DPPH 自由基清除能力略有下降^[18]。如图 6b 所示,ABTS⁺自由基清除率从初始时的 31.62% 上升至第 8 天的 65.61% ($P<0.05$)。这主要是由于酚类化合物可以增加 ABTS⁺自由基清除能力。蒋增良等^[35]研究发现,另一种发酵制品葡萄酵素在发酵期间,其 ABTS⁺自由基清除能力随着总酚浓度的增加而增强,并且二者有明显的相

增加。然而发酵后期发酵液中的乳酸菌活性会降低,从而导致 DPPH 自由基清除能力略有下降^[18]。

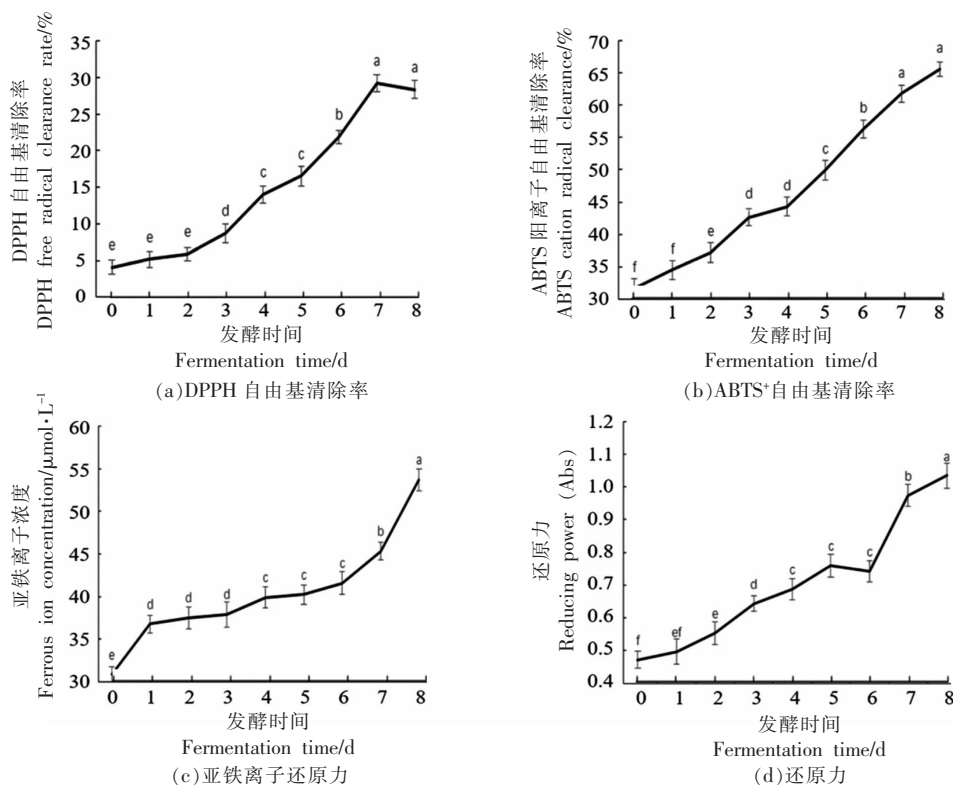
如图 6b 所示,ABTS⁺自由基清除率从初始时的 31.62% 上升至第 8 天的 65.61% ($P<0.05$)。这主要是由于酚类化合物可以增加 ABTS⁺自由基清除能力。蒋增良等^[35]研究发现,另一种发酵制品葡萄酵素在发酵期间,其 ABTS⁺自由基清除能力随着总酚浓度的增加而增强,并且二者有明显的相

关性。

如图 6c 可知,随着发酵时间的延长,亚铁离子浓度从发酵初始的 $30.86 \mu\text{mol/L}$ 到第 8 天增至 $53.69 \mu\text{mol/L}$ ($P<0.05$),这主要是由于发酵过程中,浆水发酵液中的三价铁离子与黄酮类物质结合,破坏了黄酮的分子结构。随着氧化还原反应的进行,铁离子被还原成亚铁离子^[36],使亚铁离子浓度增加。Xiao 等^[19]发现抗氧化能力的显著增加主要是由于微生物的发酵,同时表明亚铁离子还原力的变化与黄酮类物质的转化和释放有着密切联系。

还原力代表了发酵过程中抗氧化物质提供电子能力的强弱,在一定范围内,发酵液中的还原力

和抗氧化活性呈正相关。如图 6d 所示,随着发酵时间的延长,还原力从发酵初始的 0.472 上升至第 8 天的 1.034 ($P<0.05$),这可能是由于发酵环境中的自由基从微生物产生的某些物质中获得大量电子,使自由基不再活跃,获得一定的稳定性使反应停止^[37]。方晟等^[13]研究金佛手酵素的发酵过程发现,其羟基自由基清除力与乳酸和乙酸含量呈极显著正相关,同时超氧自由基清除能力变化与乳酸含量变化也具有显著的正相关,说明有机酸尤其是乳酸也会对抗氧化活性造成影响。此外,发酵浆水的抗氧化活性强弱还会受到发酵时物理和化学变化的影响^[38]。



注:同一曲线不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

图 6 浆水发酵过程中体外抗氧化活性的变化

Fig.6 Changes of antioxidant activity *in vitro* during Jiangshui fermentation

3 结论

本研究以芹菜、包菜、白萝卜、面粉为原材料,经过微生物发酵制成的浆水,具有丰富的有机酸,良好的抗菌性能和抗氧化活性。浆水在发酵到 4 d 时,初步发酵成熟,酸度和 pH 值趋于稳定。乳酸菌数检测结果表明,浆水发酵过程中,乳酸菌数先

升高后降低,第 5 天达到最大值。有机酸检测结果表明,乳酸是浆水最主要的有机酸,不同有机酸含量随发酵时间的延长而变化,其中乳酸和酒石酸在发酵 5 d 达到最大值,与乳酸菌数量的变化趋势一致。抗菌试验结果表明,浆水对金黄色葡萄球菌与大肠杆菌有抑制作用,且随着发酵时间的

延长,抑菌效果增加,在发酵7 d达到最大值,与乳酸菌数、乳酸含量、总黄酮含量的变化趋势一致。抗氧化活性研究结果表明,随着浆水发酵时间的延长,体外抗氧化性能逐渐增强。本研究为浆水的品质提升、发酵工艺的标准化和工业化提供借鉴和参考。

参 考 文 献

- [1] 孟宪刚,张丽珂,周鸽鸽.传统发酵食品——浆水研究概况及发展前景展望[J].食品工业科技,2010,31(10):402-404.
MENG X G, ZHANG L K, ZHOU G G. Research and developing prospects of traditional fermentative food—Jiangshui[J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(10): 402-404.
- [2] 侯智勇,杨静.川北地区浆水菜发酵工艺优化研究[J].中国调味品,2016,41(5):68-71.
HOU Z Y, YANG J. An optimization study on fermentation process of serofluid dishes in North Sichuan Area[J]. China Condiment, 2016, 41(5): 68-71.
- [3] 代安娜,丁波,张晓蒙,等.不同工艺条件对浆水品质的影响及风味物质分析[J].中国食品卫生杂志,2021,33(4):497-502.
DAI A N, DING B, ZHANG X M, et al. Effect different process conditions on quality of Jiangshui and determination of flavor substances [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2021, 33(4): 497-502.
- [4] 吴燕,伏二伟,桑学财,等.传统浆水中乳酸菌的筛选及抑菌性能分析[J].食品研究与开发,2019,40(22):42-48.
WU Y, FU E W, SANG X C, et al. Isolation of lactic acid bacteria in Jiangshui celery and analysis of antimicrobial properties [J]. Food Research and Development, 2019, 40(22): 42-48.
- [5] 王芮东,李楠,卫博慧,等.不同发酵方式萝卜泡菜中有机酸的变化分析[J].中国调味品,2021,46(5):139-143.
WANG R D, LI N, WEI B H, et al. Analysis of the changes of organic acids in pickled radish with different fermentation methods [J]. China Condiment, 2021, 46(5): 139-143.
- [6] 张艳艳,孙晓康,张晓元,等.高效液相色谱一步法快速测定10种有机酸[J].食品与药品,2022,24(1):44-47.
ZHANG Y Y, SUN X K, ZHANG X Y, et al. Fast and effective determination of ten kinds of organic acids by HPLC [J]. Food and Drug, 2022, 24(1): 44-47.
- [7] GIZACHEW S, VAN BEECK W, ENGIDAWORK E. Antibacterial and immunostimulatory activity of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from ethiopian fermented dairy products [J]. Fermentation, 2023, 9(3): 258.
- [8] 唐珍,王含彦,郭冬梅.抗氧化剂与自由基对肿瘤的调节研究进展[J].四川医学,2022,43(9):932-935.
TANG Z, WANG H Y, GUO D M. Regulation of tumors by antioxidants and free radicals [J]. Sichua Medical Journal, 2022, 43(9): 932-935.
- [9] BOBINAITE R, VISKELIS P, VENSKUTONIS P R. Variation of total phenolics, anthocyanins, ellagic acid and radical scavenging capacity in various raspberry (*Rubus* spp.) cultivars [J]. Food Chemistry, 2012, 132(3): 1495-1501.
- [10] 乔支红,姜慧,王赫,等.酸浆发酵生产过程中体外抗氧化活性的研究[J].食品科技,2021,46(7):81-87.
QIAO Z H, JIANG H, WANG H, et al. Antioxidant of the acid whey during fermentation [J]. Food Science and Technology, 2021, 46(7): 81-87.
- [11] 杜欣.发酵黄浆水的抗氧化和抑菌活性研究[D].广州:华南理工大学,2014.
DU X. Studies on antioxidant and bacteriostatic activities of fermented soybean wheys [D]. Guangzhou: Chinese Master's Theses Full-text Database, 2014.
- [12] 国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局.食品微生物学检验乳酸菌检验:GB 4789.35-2016[S].北京:中国标准出版社,2016:1-12.
National Health and Family Planning Commission, National Medical Products Administration. Food microbiological test Lactobacillus test: GB 4789.35-2016[S]. Beijing. China Standards Press, 2016: 1-12.
- [13] 方晟,陈俊池,周瑾,等.金佛手酵素发酵过程中有机酸及其体外抗氧化性能分析[J].食品工业科技,2020,41(10):68-74.
FANG S, CHEN J D, ZHOU J, et al. Analysis of organic acids and their *in vitro* antioxidative performance during fermentation of golden bergamot fer-

- ment [J]. Food Industry Science and Technology, 2020, 41(10): 68-74.
- [14] 陆洲, 戴意强, RASHEED H A, 等. 植物乳杆菌 D1501 发酵黄浆水的抑菌活性及其中细菌素的分离与鉴定[J]. 食品科学, 2020, 41(24): 117-124.
- LU Z, DAI Y Q, RASHEED H A, et al. Antimicrobial activity of soy whey fermented by *Lactobacillus plantarum* D1501 and purification and identification of bacteriocin from it[J]. Food Science, 2020, 41(24): 117-124.
- [15] 国家卫生和计划生育委员会. 食品中还原糖的测定: GB 5009.7-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 1-24.
- National Health and Family Planning Commission. Determination of reduced sugars in food products: GB 5009.7-2016[S]. Beijing: China Standards Press, 2016: 1-24.
- [16] 朱晓庆, 陈义伦, 张亚伟, 等. 红茶菌发酵过程中抗氧化能力的变化规律[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(11): 111-114.
- ZHU X Q, CHEN Y L, ZHANG Y W, et al. The changes of antioxidant capability of kombucha tea during fermentation[J]. Food and Fermentation Industries, 2010, 36(11): 111-114.
- [17] 何玲, 罗佳, 郭宁, 等. 浆水芹菜发酵过程中硝酸还原酶活性和亚硝酸盐含量的变化[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007(9): 184-188, 194.
- HE L, LUO J, GUO N, et al. Change of nitrate reductase activity and nitrite content during Jiangshui celeries fermentation[J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 2007(9): 184-188, 194.
- [18] KUNTAL G, MOUSUMI R, ATANU A, et al. Role of probiotic *Lactobacillus fermentum* KKL1 in the preparation of a rice based fermented beverage[J]. Bioresource Technology, 2015, 188: 161-168.
- [19] XIAO Y, WANG L X, RUI X, et al. Enhancement of the antioxidant capacity of soy whey by fermentation with *Lactobacillus plantarum* B1-6[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 12: 33-44.
- [20] 李良凤. 浆水中益生菌群的研究及浆水发酵工艺的研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2013.
- LI L F. Research on probiotics in syrup water and fermentation process of syrup water [D]. Xi'an: Shaanxi University of Science and Technology, 2013.
- [21] JAYABALAN R, SUBATHRADEVI P, MARIMUTHU S, et al. Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation[J]. Food Chemistry, 2008, 109(1): 227-234.
- [22] 闵钟慢, 朱光泽, 岳喜庆. 不同来源产细菌素乳酸菌的分离筛选及鉴定研究[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(4): 36-39.
- MIN Z M, ZHU G Z, YUE X Q. Study on isolation and identification of lactic acid bacteria producing bacteriocin from different origins[J]. Food Research and Development, 2009, 30(4): 36-39.
- [23] 辛博. 浆水接种发酵中亚硝酸盐的控制研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2014.
- XIN B. Control research of nitrite in Jiangshui inoculated fermentation[D]. Xi'an: Shaanxi University of Science and Technology, 2014.
- [24] 李维妮, 张宇翔, 魏建平, 等. 益生菌发酵苹果汁工艺优化及有机酸的变化[J]. 食品科学, 2017, 38(22): 80-87.
- LI W N, ZHANG Y X, WEI J P, et al. Optimization of fermentation of apple juice by probiotics and organic acids evolution during fermentation[J]. Food Science, 2017, 38(22): 80-87.
- [25] 柳建华, 鲍长俊, 常惟丹, 等. 不同发酵方式下泡凉薯的营养成分分析及其风味物质的主成分分析[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(11): 212-218.
- LIU J H, BAO C J, CHANG W D, et al. Nutrition analysis of *Pachyrhizus erosus* pickles by different fermentation process and principal component analysis of the flavor compounds[J]. Food and Fermentation Industries, 2016, 42(11): 212-218.
- [26] 朱仙娜, 戴璐瑶, 张一斐, 等. 黄酒生产过程中浸米浆水有机酸含量变化研究[J]. 食品工业科技, 2018, 39(15): 26-30.
- ZHU X N, DAI L Y, ZHANG Y F, et al. Research on the change of organic acids content in rice milk during the process of chinese rice wine production[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(15): 26-30.
- [27] 陈雪娇, 钱永清, 单胜艳, 等. 胡萝卜发酵果蔬汁饮品发酵工艺研究[J]. 饮料工业, 2016, 19(4): 37-40.
- CHEN X J, QIAN Y Q, SHAN S Y, et al. Study on the fermentation technology of fermented carrot juice beverages[J]. Beverage Industry, 2016, 19(4):

- 37–40.
- [28] 张培, 李昕, 刘芸, 等. HPLC法测定浆水中有机酸的含量[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(3): 183–186.
- ZHANG P, LI X, LIU Y, et al. Determination of organic acids in Jiangshui by high performance liquid chromatography[J]. Food and Fermentation Industries, 2013, 39(3): 183–186.
- [29] 杜欣, 李理, 刘冬梅. 碳源对益生菌发酵黄浆水抗氧化和抑菌活性的影响[J]. 现代食品科技, 2014, 30(2): 129–133, 197.
- DU X, LI L, LIU D M. Effect of carbon source on antioxidant and bacteriostatic activities of soybean whey fermented by probiotic bacterium [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(2): 129–133, 197.
- [30] 唐思颖, 涂传海, 胡文秀, 等. 红茶菌发酵黄浆水的体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2019, 40(17): 1–6.
- TANG S J, TU C H, HU W X, et al. Antioxidant activity of fermented soy whey with kombucha consortium[J]. Food Science, 2019, 40(17): 1–6.
- [31] WANG B N, HUANG Q Y, CHANDRASEKAR V, et al. Changes in phenolic compounds and their antioxidant capacities in jujube (*Ziziphus jujuba* Miller) during three edible maturity stages [J]. LWT –Food Science and Technology, 2016, 66: 56–62.
- [32] SUN T Y, LI J S, CHEN C. Effects of blending wheatgrass juice on enhancing phenolic compounds and antioxidant activities of traditional kombucha beverage [J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2015, 23(4): 709–718.
- [33] CHENG K C, WU J Y, LIN J T, et al. Enhancements of isoflavone aglycones, total phenolic content, and antioxidant activity of black soybean by solid-state fermentation with *Rhizopus spp.*[J]. European Food Research and Technology, 2013, 236(6): 1107–1113.
- [34] 何玲. 浆水芹菜营养成分与亚硝酸盐变化规律及加工机理研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2007.
- HE L. Research on changing regularity of nutrient, functional composition, nitrite of Jiangshui celery and mechanism of processing[D]. Xianyang: Northwest A&F University, 2007.
- [35] 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 in antioxidant activity of grape-ferment *in vitro* during natural fermentation process[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14(10): 29–34.
- [36] BENTE L, RUNE B. Validation of a quantitative assay for the total content of lipophilic and hydrophilic antioxidants in foods[J]. Food Chemistry, 2011, 127(2): 761–768.
- [37] NAKAMICHI W, YURIE H, HARUKA T, et al. Antioxidant activity of tempe fermented with three different *Rhizopus* species [J]. Food Science and Technology Research, 2023, 29(2): 141–146.
- [38] MATEOS –APARICIO I, MATEOS –PEINADO C, JIMÉNEZ–ESCRIG A, et al. Multifunctional antioxidant activity of polysaccharide fractions from the soybean byproduct okara[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 82(2): 245–250.

The Changes of Organic Acids and It's Bacteriostatic Properties and Antioxidant Capacity *in Vitro* during Jiangshui Fermentation

Zhang Zhechuan^{1,2}, Liang Xiaolin^{1,2}, Zhang Yushuang², Xue Xuning², Ding Bo², Liu Hongna^{1,2*}

(¹China–Malaysia National Joint Laboratory, Biomedical Research Center, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030

²Life Science and Engineering of College, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030)

Abstract Jiangshui is a traditional fermented vegetable food in Northwest China. In this study, Jiangshui was used as fermentation substrate to explore the changes of organic acids in Jiangshui during fermentation and their effects on bacteriostasis and antioxidation *in vitro*. The results showed that in the process of Jiangshui fermentation, the acidity increased gradually, the pH value decreased gradually, and tended to be stable after 4 days, when the Jiangshui fermentation was initially mature. In the determination of organic acid, the content of lactic acid was the highest, the content of lactic

acid (3.331 mg/mL), malic acid and tartaric acid first decreased and then increased, acetic acid increased at first and then decreased, and the content of citric acid increased as a whole. The bacteriostatic zone of Jiangshui against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* first increased and then decreased as the fermentation proceeds, and the maximum value was reached at the 7th day, of 12.5 mm and 11.4 mm, respectively. The mass concentration of total flavonoids in Jiangshui was 3.64 mg/L on the 5th day and 52.44 mg/L on the 6th day. DPPH radical scavenging rate, ABTS radical scavenging rate, ferrous ion concentration and reducing power four kinds of antioxidant models were used to analyze the antioxidant activity of Jiangshui during fermentation. It was found that the antioxidant capacity of Jiangshui increased gradually during fermentation. In this study, various indexes in the process of Jiangshui fermentation were measured and analyzed, so as to provide reference and reference for the quality analysis of Jiangshui, standardization and industrialization of Jiangshui fermentation process.

Keywords Jiangshui; fermentation time; organic acids; antibacterial performance; *in vitro* antioxidant activities