食品工业科技
Science and Technology of Food Industry
ISSN 1002-0306,CN 11-1759/TS

《食品工业科技》网络首发论文

题目：　槐花水提液发酵工艺优化及其抗氧化活性分析
作者：　王国凯，龚荣英，杨灵丽，刘文龙，晋海军，田维毅
DOI：　10.13386/j.issn1002-0306.2023110296
网络首发日期：　2024-03-14
引用格式：　王国凯，龚荣英，杨灵丽，刘文龙，晋海军，田维毅．槐花水提液发酵工艺优化及其抗氧化活性分析[J/OL]．食品工业科技．https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023110296

网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

网络首发时间：2024-03-14 13:43:15
网络首发地址：https://link.cnki.net/urlid/11.1759.TS.20240312.1758.012

作者简介：王国凯（1998-），男，硕士研究生，研究方向：药食两用中药民族药基础研究与应用开发，E-mail：qq@206352967。
*通信作者：田维毅（1972-），男，博士，教授，研究方向：药食同源资源开发利用研究，E-mail：743094997@qq.com。
*通信作者：晋海军（1980-），男，博士，讲师，研究方向：药食同源食品开发利用研究，E-mail：haijunjin@aliyun.com。
基金项目：贵州省科技支撑计划项目(黔科合支撑[2021]一般 131)。

槐花水提液发酵工艺优化及其抗氧化活性分析

王国凯，龚荣英，杨灵丽，刘文龙，晋海军*，田维毅*

（贵州中医药大学，贵州 贵阳 550025）

摘　要：为筛选发酵改善槐花水提液口感的微生物，优化其发酵工艺，考察发酵对其抗氧化活性的影响。本研究利用微生物群单菌、混菌发酵技术，筛选改善槐花水提液口感的微生物，通过单因素试验结合 Box-Benhnken 响应面优化法，确定槐花水提液最佳发酵工艺，并检测发酵前后抗氧化活性变化。结果表明，发酵改善槐花水提液口感的最佳菌种组合为瑞士乳杆菌:保加利亚乳杆菌:嗜热链球菌＝1:1:1，最佳发酵工艺条件：发酵时间 24 h、接菌量 3%、发酵温度 21 ℃，此条件下发酵液的感官评分 79.01 分，总黄酮浓度 0.3225 mg/mL。发酵后槐花水提液对 DPPH 自由基清除率由发酵前的 86.5%降低到 67.39%（$P<0.001$），对超氧阴离子自由基清除率由发酵前的 89.22%降低到 81.10%（$P<0.01$）。槐花水提液发酵后总黄酮含量（0.3225 mg/mL）较发酵前（0.3012 mg/mL）增加，多糖含量发酵后（1.14 mg/mL）较发酵前（1.43 mg/mL）减少（$P<0.05$）。本研究获得了口感改善效果较好的槐花水提液，可为今后槐花资源的深度开发利用及延长槐花产业链提供技术资料。

关键词：槐花，口感改善，发酵工艺，抗氧化活性

Optimisation of fermentation process of aqueous extract of *Sophora japonica* and analysis of its antioxidant activity

WANG Guokai, GONG Rongying, YANG Lingli, LIU Wenlong, JIN Haijun*, TIAN Weiyi*

(Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

Abstract: This experiment aims to screen the microorganisms used for fermentation to improve

the taste of *Sophora japonica* aqueous extract, optimize its fermentation process, and investigate the effect of fermentation on antioxidant activity. In this study, we used microbial single and mixed fermentation techniques to screen for microorganisms that can improve the taste of *Sophora japonica* aqueous extract. Through single factor experiments combined with Box Benhnken response surface optimization method, we determined the optimal fermentation process for *Sophora japonica* aqueous extract and detected changes in antioxidant activity before and after fermentation. The results showed that the optimal bacterial combination for improving the taste of *Sophora japonica* aqueous extract through fermentation was *Lactobacillus suis*: *Lactobacillus bulgaricus*: *Streptococcus thermophilus* ＝1:1:1. The optimal fermentation process conditions were: fermentation time of 24 hours, inoculation amount of 3%, fermentation temperature of 21 ℃. Under these conditions, the sensory score of the fermentation broth was 79.01 points, and the total flavonoid concentration was 0.3225 mg/mL. After fermentation, the DPPH radical scavenging rate of the aqueous extract of *Sophora japonica* decreased from 86.5% to 67.39% ($P<0.001$), and the scavenging rate of superoxide anion radicals decreased from 89.22% to 81.10% ($P<0.01$). The total flavonoid content of the aqueous extract of *Sophora japonica* increased after fermentation (0.3225 mg/mL) compared with that before fermentation (0.3012 mg/mL), and the polysaccharide content decreased ($P<0.05$) after fermentation (1.14 mg/mL) compared with that before fermentation (1.43 mg/mL).This study obtained a aqueous extract of *Sophora japonica* with good taste improvement effect, which can provide technical data for the deep development and utilization of *Sophora japonica* resources and the extension of its industrial chain in the future.

Key words: *Sophora japonica*; Taste improvement; Fermentation process; Antioxidant activity

中图分类号：TQ920.6　　文献标志码：　A

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2023110296

槐花为豆科植物槐(*Sophorajaponica* L.)的干燥花及花蕾[1]，性苦，微寒，归肝、大肠经。槐花在我国各地普遍都有生长，越南、日本及朝鲜也有分布[2]。槐花营养丰富，含黄酮类、多糖类等物质[3-4]。具有止血、抗氧化、抗炎、降血糖、抗肿瘤、神经保护等作用[5-9]。

槐花作为一种传统药食两用中药，食用起来还普遍存在着苦、涩等问题，《神农本草经》、《本草纲目》、《中华本草》均指出槐花味苦，其苦、涩味会影响人们对槐花资源的开发利

用。目前槐花在食品工业中的应用，多集中在保健饮料的开发方面，通过添加甜味剂（甜蜜素、阿巴斯甜、木糖醇等）改善槐花水提液口感，开发相关饮品[10]。若能改善槐花水提液口感，则将极大促进槐花资源在食品领域的深度开发利用。

目前，改善食品苦涩味的方法主要有化学法、酶法、微生物发酵法，其中微生物发酵法具有降低中药毒副作用、节省药材资源、保护生态环境等优点[11]。中药发酵就是在适当的温度、湿度、水分等条件下，利用微生物对药物进行发酵改变药物的特性，增强或产生新的药效，扩大药物应用范围，改善中药口感，是中药的重要加工方法[12-14]。

近几年，对发酵槐花的研究主要集中在改善槐花关键香味化合物及其抗氧化活性等方面[15-16]，相关发酵产品有槐花米酒、槐花茶酒、槐花精油[17-19]。本研究利用十种益生菌对槐花水提液进行发酵，筛选对槐花水提液口感改善效果较好的菌种，运用响应面法优化槐花水提液发酵的最佳工艺，分析发酵前后槐花水提液对 DPPH、超氧阴离子自由基清除能力的影响，以期获得改善槐花口感的最佳发酵条件，可为今后槐花资源的深度开发利用及延长槐花产业链提供技术资料。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

槐花药材　安徽庆春堂药业有限公司；实验菌种　米曲霉、黑曲霉、酿酒酵母、枯草芽孢杆菌、戊糖乳杆菌、瑞士乳杆菌、植物乳杆菌、保加利亚乳杆菌、嗜酸乳杆菌、嗜热链球菌均为冻干菌种，购于中国工业微生物菌种保藏管理中心；芦丁标准品　贵州迪大科技有限公司；无水乙醇　天津市富宇精细化工有限公司；95%乙醇　重庆万盛川东化工有限公司；硝酸铝　天津市科密欧化学试剂有限公司；氢氧化钠　广东汕头市西陇化工厂；葡萄糖标准品　北京索莱宝科技有限公司；浓硫酸　重庆川东化工有限公司；甲醇　天津市富宇精细化工有限公司；苯酚　成都市科龙化工试剂厂；亚硝酸钠　重庆江川（集团）有限公司；ELISA KIT 酶联免疫检测试剂　南京博研生物科技有限公司。

UV-2700 紫外分光光度计　日本岛津；MOD-B3R 低温大容量摇床　上海旻泉仪器有限公司；UPT-1-20T 纯水机　力辰科技有限公司；JJ224BF 电子分析天平　常熟市双杰测试仪器厂；　SW-CJ-2FD 超净工作台　苏州安泰空气技术有限公司；LRH-250 生物培养箱　上海一恒科学仪器有限公司；D2M-80L-11 高压灭菌锅　上海申安医疗器械厂；Sorvall ST 40R 离心机　美国赛默飞世尔科技公司；Aynergy2 酶标仪　成都百乐科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 工艺流程 改善槐花口感的发酵工艺及抗氧化活性研究路线见图 1。

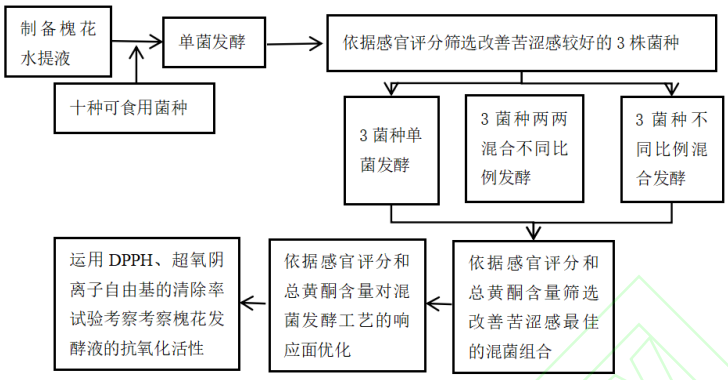

图 1 槐花水提液发酵工艺流程图

Fig.1 *Sophora japonica* aqueous extract fermentation process flow chart

1.2.2 槐花水提液的制备 称取所购买的槐花 100 g，用适量自来水浸润后，再加入十倍量的自来水煎煮 1 h，然后用纱布过滤后加入八倍量水，再煎煮 1 h 过滤，将 2 次水煎液合并浓缩成料液比为 1:10 的水提液。将槐花水提液放入三角瓶，121℃高压灭菌 30 min。

1.2.3 槐花水提液的单菌发酵 参照孙葳[20]方法，活化处理试验菌种，制备成可用于发酵的菌悬液。将十种益生菌（米曲霉、黑曲霉、酿酒酵母、枯草芽孢杆菌、戊糖乳杆菌、瑞士乳杆菌、植物乳杆菌、保加利亚乳杆菌、嗜酸乳杆菌、嗜热链球菌）分别接入槐花水提液中，在转速 200 r/min，25 ℃以及自然 pH 下培养 24 h。

1.2.4 槐花发酵液的感官评价 感官评价标准参考洋槐花酱[21]的感官方法，根据槐花特性略有改动。感官评价小组由食品质量与安全专业 10 名学生及老师（5 男 5 女）组成，对评价人员进行感官分析理论、识别感官特性和气味等感官描述性培训，同时要求其在感官评价前应避免吸烟、吃口香糖等行为，以减少感官评定的误差，分别对槐花发酵液的口感、质地、气味进行评分，满分为 100 分，具体感官评分指标见表 1。

表 1 发酵槐花水提液感官评分标准

Table 1 Sensory Scoring Criteria of Fermented *Sophora japonica* Aqueous Extracts

评分项目	评分标准	分数（100）
口感（0~50）	口感细腻，苦涩味改变或少许苦涩味，入口无不适反应	40~50
	口感细腻，苦涩味明显，入口无不适反应	20~40
	口感粗糙，难以下咽，入口有不适反应	0~20
质地（0~15）	均匀，无沉淀	10~15
	不均匀，有少量沉淀	5~10
	不均匀，有大量沉淀	0~5
气味（0~35）	槐花味浓郁伴随发酵香气，闻之无不适反应	20~35

槐花气味清淡，闻之无不适反应	10~20
无槐花气味，有大量异味，闻之有不适反应	0~10

1.2.5 槐花水提液的混菌发酵

1.2.5.1 不同菌种拮抗试验 采用滤纸片抑菌圈法[22]：取瑞士乳杆菌种子液 100 μL 涂布于 MRS 培养基表面。将两片无菌小滤纸贴在培养基表面，分别吸取 2.5 μL 嗜热链球菌与保加利亚乳杆菌的种子液滴在两个滤纸片上，37 ℃恒温培养 24 h，观察是否出现拮抗反应。

1.2.5.2 混菌发酵 选取单菌发酵中口感较好的菌种，在接菌量 4%、转速 200 r/min、温度 25 ℃及自然 pH 条件下，培养 24 h。接菌比例参考刺五加-五味子的混菌发酵比例[23]，略有改动，具体接菌比例见表 2。

表 2 混菌发酵比例

Table 2 Sterilization ratio

编号	混合菌种	接菌比例(4 %)
1	瑞士乳杆菌:嗜热链球菌	1:3
2	瑞士乳杆菌:嗜热链球菌	2:2
3	瑞士乳杆菌:嗜热链球菌	3:1
4	瑞士乳杆菌:保加利亚乳杆菌	1:3
5	瑞士乳杆菌:保加利亚乳杆菌	2:2
6	瑞士乳杆菌:保加利亚乳杆菌	3:1
7	嗜热链球菌:保加利亚乳杆菌	1:3
8	嗜热链球菌:保加利亚乳杆菌	2:2
9	嗜热链球菌:保加利亚乳杆菌	3:1
10	瑞士乳杆菌:嗜热链球菌:保加利亚乳杆菌	2:1:1
11	瑞士乳杆菌:嗜热链球菌:保加利亚乳杆菌	1:2:1
12	瑞士乳杆菌:嗜热链球菌:保加利亚乳杆菌	1:1:2
13	瑞士乳杆菌:嗜热链球菌:保加利亚乳杆菌	1:1:1
14	瑞士乳杆菌	4
15	保加利亚乳杆菌	4
16	嗜热链球菌	4
17	（不接菌）空白对照	0

1.2.6 总黄酮及多糖的含量测定

1.2.6.1　总黄酮标准曲线的绘制　称取 10 mg 的芦丁标准品，用 50%乙醇水溶液定容至 50 mL，摇匀，可得到浓度为 0.2 mg/mL 的芦丁标准贮备液。参考文献[24]方法进行线性范围和回归方程的考察，具体过程如下：采用硝酸铝显色法，以芦丁为对照品，在 430－600 nm 波长范围内测定吸光度，在 510.18 nm 处有最大吸收波长，选用 510 nm 为测定波长。以吸光度值为纵坐标（A），以对照品浓度为横坐标（C）绘制标准曲线。得线性回归方程为 A＝2.3841C－0.0322，R^2＝0.9996。结果表明，芦丁浓度在 0.05～0.4 mg/mL 之间有良好线性关系。

1.2.6.2　总黄酮含量测定　参考文献[25]取样品溶液 0.28 mL，按 1.2.6.1 方法处理，以空白试剂为对照，于 510 nm 下进行检测，得到样品吸光度，代入回归方程中得到槐花发酵液总黄酮浓度。

1.2.6.3　多糖标曲的绘制　参考文献[26]称取葡萄糖标品 4 mg，倒入 50 mL 容量瓶，溶解，配制成 0.08 mg/mL 的溶液。分别移取 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 葡萄糖标准品溶液于试管中，加 1 mL 5%苯酚溶液、5 mL 浓硫酸溶液，将试管放入水浴锅，5 min 沸水浴，用紫外-可见分光光度仪在 490 nm 处检测样品的吸光度，横坐标为葡萄糖浓度（C），纵坐标为吸光度（A），绘制葡萄糖标准曲线，得回归方程为 A＝1.11C－0.8119，R^2＝0.9992。

1.2.6.4　多糖含量测定　将槐花水提液以 4000 r/min 离心 10 min 后，取上清液加无水乙醇 8 mL，放置 24 h，4000 r/min 离心 10 min，弃上清液，加 80%乙醇溶液 10 mL，洗涤，4000 r/min 离心 10 min，加水溶解沉淀，将其转移至 25 mL 容量瓶中，水定容。按 1.2.6.3 方法处理，以空白试剂为对照，于 490 nm 下进行检测，得到样品吸光度，代入回归方程得到槐花水提液多糖浓度。

1.2.7　响应面法对改善槐花水提液口感发酵工艺优化

1.2.7.1　考察发酵温度对槐花水提液的影响　在接菌量 4%、发酵时间 24 h 的条件下，考察不同发酵温度（15、20、25、30、35 ℃）对槐花水提液感官评分及总黄酮浓度的影响。

1.2.7.2　考察接菌量对槐花水提液的影响　在发酵温度 25 ℃、发酵时间 24 h 的条件下，考察不同接菌量（1%、2%、3%、4%、5%）对槐花水提液感官评分及总黄酮浓度的影响。

1.2.7.3　考察发酵时间对槐花水提液的影响　在发酵温度 25 ℃、接菌量 4%的条件下，考察不同发酵时间（12、24、36、48、60 h）对槐花水提液感官评分及总黄酮浓度的影响。

1.2.7.4　槐花水提液发酵的响应面优化实验　根据单因素试验结果，选取发酵温度、发酵时间和接菌量三个因素，进行三因素三水平试验设计见表 3。利用 Box-Behnken 进行响应面优化试验设计。

表 3　响应面分析因素与水平

Table 3　Response surface analysis factors and levels

因素	水平		
	-1	0	1
A 发酵温度（℃）	15	20	25
B 接菌量（%)	2	3	4
C 发酵时间（h）	12	24	36

1.2.8　槐花发酵液的抗氧化活性分析

1.2.8.1　清除 DPPH 自由基能力的测定　将发酵前与发酵后的槐花水提液在 4500 r/min 下，离心 10 min，取上清液，按照 ELISA KIT 酶联免疫检测试剂盒-DPPH 自由基清除能力说明书进行操作。DPPH 清除率的计算方法为：

$$\text{DPPH 自由基清除率（\%）} = [（1 - （A_{测定} - A_{对照}）\div A_{空白}）] \times 100$$

式中：$A_{测定}$表示测定管的吸光度，$A_{对照}$表示对照管的吸光度，$A_{空白}$表示空白管的吸光度。

1.2.8.2　清除超氧阴离子自由基能力的测定　将发酵前与发酵后的槐花水提液在 4500 r/min 下，离心 10 min，取上清液按照 ELISA KIT 酶联免疫检测试剂盒-超氧阴离子自由基清除能力说明书进行操作。超氧阴离子清除率的计算方法为：

$$\text{超氧阴离子清除率 } I\% = [1 - （A_{测定} - A_{对照}）\div A_{空白}] \times 100\%$$

式中：$A_{测定}$表示测定管的吸光度，$A_{对照}$表示对照管的吸光度，$A_{空白}$表示空白管的吸光度。

1.3　数据处理

本实验中的实验数据均以平均数±标准差表示。采用 SPSS22、GraphPad Prism 8 和 Design-Expert 12 软件进行分析和绘图。

2　结果与分析

2.1　筛选发酵菌种

2.1.1　单菌发酵实验

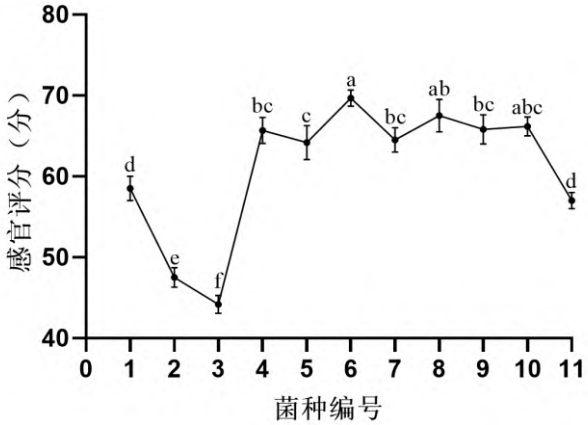

图 2　槐花单菌发酵感官评分

Fig.2　Sensory Score of *Sophora japonica* moniliformis Fermentation

注：不同小写字母表示组内差异显著（$P < 0.05$），相同小写字母表示组内差异不显著（$P > 0.05$）；1 号米曲霉、2 号黑曲霉、3 号酿酒酵母、4 号枯草芽孢杆菌、5 号戊糖乳杆菌、6 号瑞士乳杆菌、7 号植物乳杆菌、8 号保加利亚乳杆菌、9 号嗜酸乳杆菌、10 号嗜热链球菌、11 号空白组。

由图 2 可知，不同菌种发酵对槐花水提液的感官评分影响显著（$P < 0.05$），经瑞士乳杆菌、保加利亚乳杆菌与嗜热链球菌发酵的槐花水提液感官评分相对较高。前人文献也指出[27-28]，瑞士乳杆菌、保加利亚乳杆菌与嗜热链球菌对改善食品风味有显著作用，因此本研究选取这三个菌种进行混菌发酵试验。

2.1.2　三菌种拮抗试验

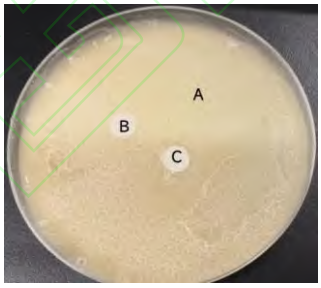

图 3　三菌拮抗实验

Fig.3　Three bacteria antagonism experiment

注：A：瑞士乳杆菌、B：保加利亚乳杆菌、C：嗜热链球菌

由图 3 可知瑞士乳杆菌、保加利亚乳杆菌与嗜热链球菌共培养未出现抑菌圈，前人文献也指出[29-30]，三菌可进行混菌发酵。说明三菌混合培养后不会影响彼此的生长和繁殖，可用于发酵槐花水提液。

2.1.3　混菌筛选

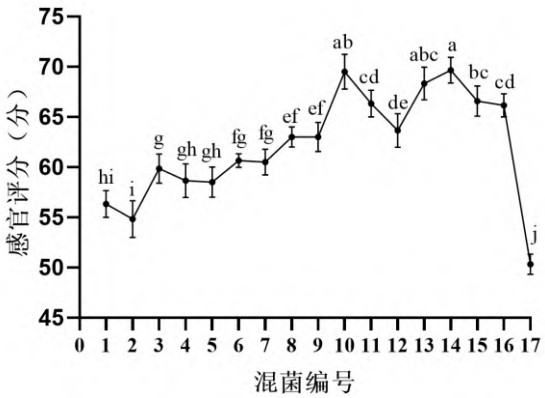

图 4　槐花混菌发酵感官评分

Fig.4　Sensory scores of mixed bacteria fermentation of *Sophora japonica*

注：不同小写字母表示组内差异显著（$P < 0.05$），相同小写字母表示组内差异不显著（$P > 0.05$）。

瑞士乳杆菌、嗜热链球菌与保加利亚乳杆菌按表 2 比例进行混菌发酵，依据感官评分筛选出前 3 的混菌组合。由图 4 可知，瑞士乳杆菌:嗜热链球菌:保加利亚乳杆菌（2:1:1）、瑞士乳杆菌:嗜热链球菌:保加利亚乳杆菌（1:1:1）、瑞士乳杆菌三组混菌组合发酵对槐花水提液口感改善效果较好。由于三组感官评分差别不大，再分别检测三组混菌组合发酵后总黄酮含量（见表 4）。

表 4　混菌发酵液总黄酮含量

Table 4　Total flavonoids content of mixed bacterial fermentation solution

编号	0	瑞士乳杆菌:嗜热链球菌:保加利亚乳杆菌（2:1:1）	瑞士乳杆菌:嗜热链球菌:保加利亚乳杆菌（1:1:1）	瑞士乳杆菌
总黄酮浓度(mg/mL)	0.3054 ± 0.0093^{b}	0.2928 ± 0.0113^{c}	0.3174 ± 0.0108^{a}	0.2748 ± 0.0073^{d}

注：不同小写字母表示组内差异显著（$P < 0.05$），相同小写字母表示组内差异不显著（$P > 0.05$）。

由表 4 可知，当瑞士乳杆菌:嗜热链球菌:保加利亚乳杆菌＝1:1:1 时，槐花水提液总黄酮含量较高。因此选择瑞士乳杆菌:嗜热链球菌:保加利亚乳杆菌（1:1:1）为发酵槐花水提液最佳混菌组合。

2.2　单因素实验结果

2.2.1　发酵温度对槐花水提液感官评分及总黄酮浓度的影响

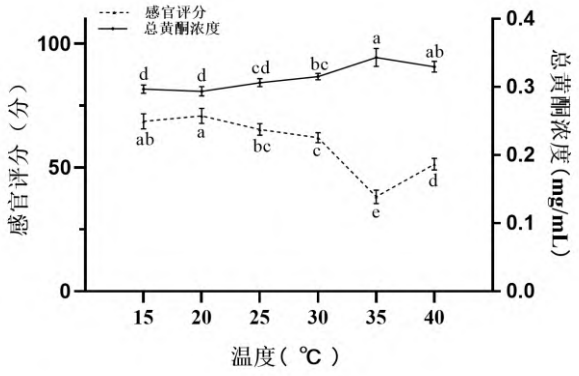

图 5　发酵温度对槐花水提液感官评分及总黄酮浓度的影响

Fig.5　Effect of fermentation temperature on sensory score and total flavonoid concentration of aqueous extract of *Sophora japonica*

注：不同小写字母表示组内差异显著（$P < 0.05$），相同小写字母表示组内差异不显著（$P > 0.05$）。

由图 5 可知，随着发酵温度升高，感官评分先增加后减少，当温度为 20 ℃时，感官评分最高为 70.5 分。总黄酮浓度随着发酵温度升高逐渐升高，在 35 ℃时达到最大为 0.34 mg/mL，但其感官评分最低。当发酵温度从 15 ℃上升到 20 ℃时，总黄酮浓度变化不大，感官评分上升可能是因为发酵产生了一些风味物质。当发酵温度从 20 ℃上升到 35 ℃时，总黄酮浓度逐渐上升，感官评分下降可能因为黄酮类化合物的含量与苦味有一定相关性[31]，总黄酮浓度升高后，导致感官评分降低。综合考虑发酵温度选择在 15、20、25 ℃进行响应面试验。

2.2.2　接菌量对槐花水提液感官评分及总黄酮浓度的影响

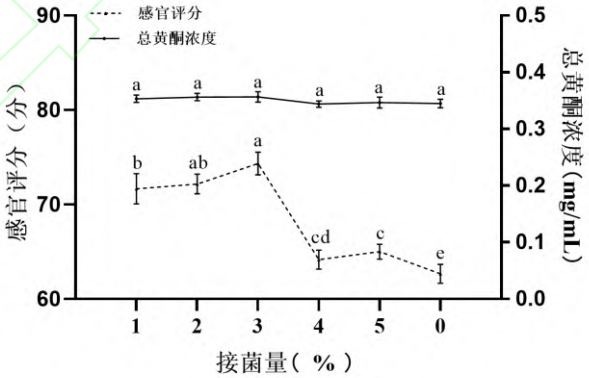

图 6　接菌量对槐花水提液感官评分及总黄酮浓度的影响

Fig.6　Effect of bacterial inoculation on sensory score and total flavonoid concentration of aqueous extract of *Sophora japonica*

注：不同小写字母表示组内差异显著（$P < 0.05$），相同小写字母表示组内差异不显著（$P > 0.05$）。

由图 6 可知，总黄酮浓度随着接菌量的增加变化不大。但随着接菌量的增加，感官评分有所下降，当接菌量为 3%时，感官评分最高为 72.33 分。当接菌量从 1%增加到 3%时，感官评分上升可能是因为接菌量的增加导致槐花水提液发酵更加充分。当接菌量从 3%增加到 5%时，感官评分下降可能是因为接菌量超过 3%以后，大量的细菌对营养和生存空间的竞争也越大，这种竞争使细菌生长和繁殖的速度减慢[32]，导致槐花水提液发酵不充分。最终确定接菌量选择在 2%、3%、4%进行响应面试验。

2.2.3　发酵时间对槐花水提液感官评分及总黄酮浓度的影响

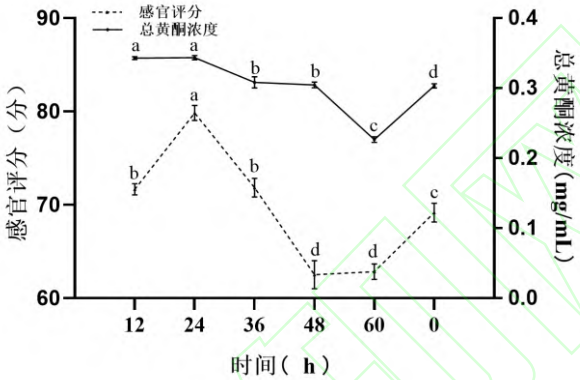

图 7　发酵时间对槐花水提液感官评分及总黄酮浓度的影响

Fig.7　Effect of fermentation time on sensory score and total flavonoid concentration of aqueous extract of *Sophora japonica*

注：不同小写字母表示组内差异显著（$P < 0.05$），相同小写字母表示组内差异不显著（$P > 0.05$）。

从图 7 中可知随着发酵时间的增加，感官评分先升高后下降，当发酵时间为 24 h 时，感官评分最高为 79.83 分。当发酵时间从 12 h 增加到 24 h 时，总黄酮浓度变化不大，感官评分逐渐上升可能是在发酵的初期，随着发酵时间的延长，发酵液中的风味物质在混菌的发酵作用下不断产生，感官评分逐渐升高。当发酵时间从 24 h 增加到 60 h 时，总黄酮浓度逐渐下降，感官评分也逐渐下降，可能是因为发酵时间过长时，混菌的代谢产物大量积累，影响了产品质量，导致感官评分下降[33]。综合考虑发酵时间选择在 12、24、36 h 进行响应面试验。

2.3　响应面法优化发酵条件

2.3.1　响应面实验设计与结果分析

在单因素试验的基础上，选取温度、接菌量、时间 3 个因素作为变量进行响应面分析，经 Box-Behnken 响应面法设计，共有 17 个试验点，总黄酮含量和感官评分为响应值，结果见表 5。

表 5　Box-Benhnken 实验设计与结果

Table 5　Box-Benhnken experimental design and results

实验号	A：温度（℃）	B：接菌量（%)	C：时间（h）	感官评分	总黄酮含量（mg/mL)
1	25	3	36	76.67±1.34	0.3026±0.0137
2	20	3	24	79.33±1.87	0.3189±0.0086
3	20	3	24	79.00±1.56	0.3275±0.0154
4	25	4	24	77.67±1.47	0.3046±0.0148
5	15	4	24	76.33±2.21	0.3056±0.0144
6	20	4	12	76.17±1.72	0.3060±0.0119
7	15	3	12	76.67±1.52	0.3035±0.0172
8	20	4	36	77.70±1.39	0.3097±0.0129
9	25	3	12	77.17±1.58	0.3080±0.0069
10	20	3	24	78.33±1.21	0.3173±0.0172
11	20	2	12	77.33±1.89	0.3081±0.0193
12	20	2	36	76.67±2.01	0.3049±0.0136
13	20	3	24	78.67±2.41	0.3277±0.0106
14	15	3	36	76.30±1.38	0.3033±0.0113
15	15	2	24	76.67±1.69	0.3060±0.0163
16	25	2	24	76.17±1.73	0.3027±0.0128
17	20	3	24	79.00±1.49	0.3202±0.0157

依据 Design-expert 12.0 软件对槐花发酵液的感官评分和总黄酮含量进行回归拟合，得到回归方程：感官评分＝78.87＋0.2138A＋0.1288B＋0.4600AB－0.0325AC＋0.5475BC－1.210A^2－0.9455B^2－0.9530C^2，总黄酮含量＝0.3223＋0.0005B－0.0006C＋0.0006AB－0.0013AC＋0.0017BC－0.0102A^2－0.0074B^2－0.0078C^2。

对二次回归方程预测模型进行显著性检验，得感官评分的方差分析结果见表 6。感官评分回归模型[34]*P* 值＜0.01，模型的相关性极显著，并且方程失拟项 *P* 值为 0.3758，呈不显著

（P＞0.05），由此证明，该模型可以用来反应感官评分与影响因素之间的关系，实验方法可靠。由 F 值可知，各因素对感官评分影响强度顺序为：A＞B＞C。两因素相互作用对槐花发酵液感官评分的影响：BC＞AB＞AC。A、B、C 的平方项具有极显著性（P＜0.01）。说明该回归模型可以用于优化槐花发酵液的理论预测。

表 6　感官评分响应面试验方差分析

Table 6　Analysis of variance of sensory scoring response surface test

方差源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	17.89	9	1.99	11.96	0.0018	**
A-温度	0.3655	1	0.3655	2.20	0.1817	
B-接菌量	0.1326	1	0.1326	0.7978	0.4014	
C-时间	0.0000	1	0.0000	0.0000	1.0000	
AB	0.8464	1	0.8464	5.09	0.0586	
AC	0.0042	1	0.0042	0.0254	0.8778	
BC	1.20	1	1.20	7.21	0.0313	*
A^2	6.17	1	6.17	37.12	0.0005	**
B^2	3.76	1	3.76	22.65	0.0021	**
C^2	3.82	1	3.82	23.01	0.0020	**
残差	1.16	7	0.1662			
失拟项	0.5866	3	0.1955	1.36	0.3758	
纯误差	0.5769	4	0.1442			
总和	19.06	16				

注：*为差异显著（P < 0.05），**为差异极显著（P < 0.01）。

总黄酮含量的方差分析结果见表 7，模型的 P 值为 0.0073（＜0.01），说明该模型显著性良好，失拟值 P 值为 0.9076（＞0.05)，失拟不显著，即说明其他因素对感官评分影响小。由 F 值可知，对槐花发酵液总黄酮含量的影响程度：C＞B＞A；两因素相互作用对槐花发酵液总黄酮含量的影响：BC＞AC＞AB，A、B、C 的平方项具有极显著性（P＜0.01）。说明该回归模型可以用于优化槐花发酵液的理论预测。

表 7　总黄酮含量响应面试验方差分析

Table 7　Analysis of variance of total flavonoid content response surface test

方差源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.0011	9	0.0001	7.51	0.0073	**
A-温度	1.805E-08	1	1.805E-08	0.0012	0.9738	
B-接菌量	2.301E-06	1	2.301E-06	0.1471	0.7127	
C-时间	3.163E-06	1	3.163E-06	0.2023	0.6665	
AB	1.311E-06	1	1.311E-06	0.0838	0.7805	
AC	6.734E-06	1	6.734E-06	0.4307	0.5326	
BC	0.0000	1	0.0000	0.7701	0.4093	

A^2	0.0004	1	0.0004	28.19	0.0011	**
B^2	0.0002	1	0.0002	14.72	0.0064	**
C^2	0.0003	1	0.0003	16.27	0.0050	**
残差	0.0001	7	0.0000			
失拟项	0.0000	3	4.249E-06	0.1757	0.9076	
纯误差	0.0001	4	0.0000			
总和	0.0012	16				

注：**为差异极显著（$P < 0.01$）。

2.3.2 响应曲面分析

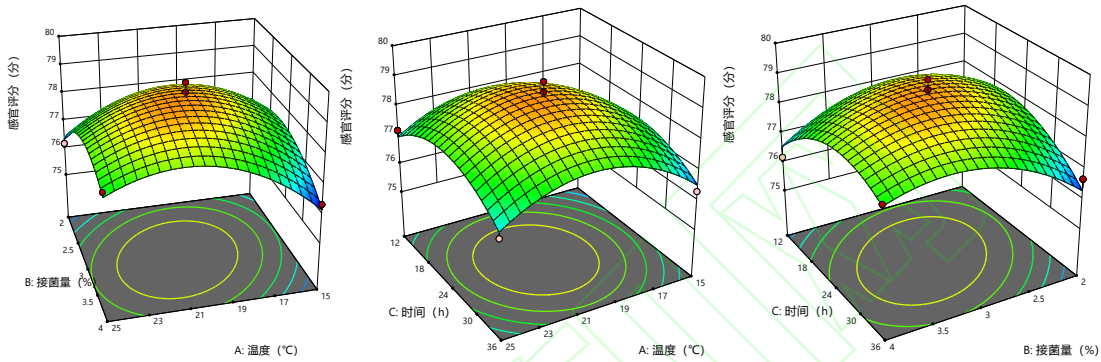

图 8 各因素交互作用对发酵槐花水提液感官评分影响的响应面图

Fig.8 Response surface plots of the effect of interaction of factors on sensory scores of aqueous extracts of fermented *Sophora japonica*

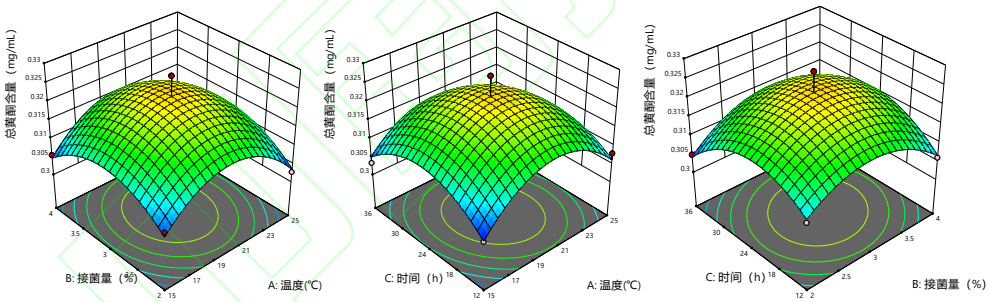

图 9 各因素交互作用对发酵槐花水提液总黄酮含量影响的响应面图

Fig.9 Response surface plots of the effect of interaction of factors on the total flavonoid content of aqueous extract of fermented *Sophora japonica*

从响应面图中可以看出，曲面越陡峭，影响因素的变化对响应值的影响也越大[35]。由图 8、图 9 可知，在本研究所选择的范围内，各影响因素之间的交互作用对槐花发酵液的感官评分及总黄酮含量的影响相似，感官评分与总黄酮含量均随着各影响因素的增加呈先增后降的趋势，响应面图存在最大值。

2.3.3 验证实验

经 Design-expert 12.0 软件对回归方程的预测分析，得槐花水提液的最佳发酵工艺条件为：发酵时间 24.33 h、发酵温度 20.54 ℃、接菌量 3.10%，理论预测感官评分、总黄酮浓

度分别为 78.88 分、0.322 mg/mL。结合工业生产实际情况，确定槐花水提液最佳发酵条件为：发酵时间 24 h，发酵温度 21 ℃，接菌量 3%。以确定的最佳发酵工艺进行 3 次验证性试验，结果见表 8。

表 8　响应面验证实验结果

Table 8　Response surface verification experiment

项目	感官评分	总黄酮浓度（mg/mL）
第一组	79.70	0.3207
第二组	78.33	0.3230
第三组	79.00	0.3239
平均值	79.01	0.3225

由表 8 可知，三组的感官评分平均值为 79.01 分，与预测值相差不大，相对误差为 0.16%。三组总黄酮含量的平均浓度为 0.3225 mg/mL，与理论分析结果 0.322 mg/mL 近似。综上可得，说明 Box-Behnken 响应面分析软件建立的模型准确可靠。

2.4　槐花水提取液发酵前后抗氧化活性及活性成分变化

2.4.1　槐花水提取液发酵前后的抗氧化能力分析

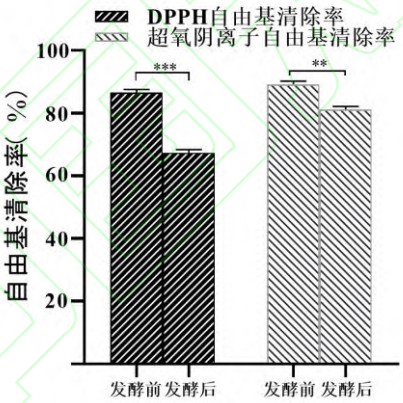

图 10 槐花水提液发酵前后抗氧化能力

Fig.10　Antioxidant capacity of aqueous extract of *Sophora japonica* before and after fermentation

注：**为差异极显著（$P < 0.01$），***为差异极其显著（$P < 0.001$）。

从图 10 可知，发酵前的槐花水提液对 DPPH 自由基的清除率为 86.5%，发酵后的清除率为 67.39%，对 DPPH 自由基的清除作用降低了 19.11%（$P < 0.001$）。发酵前的槐花水提液对超氧阴离子自由基的清除率为 89.22%，发酵后的清除率为 81.1%，对超氧阴离子自由基的清除作用降低了 8.12%（$P < 0.01$）。

研究表明，黄酮和多糖类成分与槐花抗氧化能力密切相关[36-37]，微生物发酵能改变黄酮和多糖的含量，主要是由于大分子物质消耗降解，小分子物质间的相互转化频繁。综合分析，槐花水提液发酵后抗氧化能力的降低主要与黄酮和多糖类成分的含量变化有关。

2.4.2　槐花水提液发酵前后活性成分分析

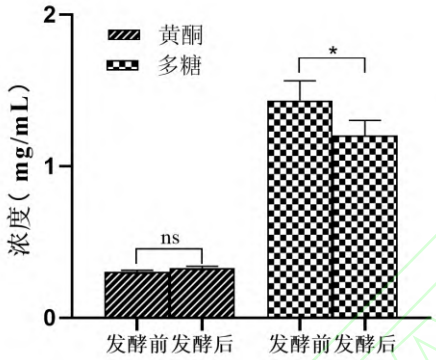

图 11　槐花水提液发酵前后成分变化

Fig. 11　Changes in the composition of *Sophora japonica* extract before and after fermentation

注：*为差异显著（$P < 0.05$），ns 为无显著性（$P > 0.05$）。

从图 11 可知，发酵槐花水提液能提高槐花黄酮类成分的含量，发酵前黄酮类成分含量为 0.3012 mg/mL，发酵后含量为 0.3225 mg/mL，含量提高了 7.2%。发酵前多糖类成分含量为 1.43 mg/mL，发酵后为 1.14 mg/mL，含量下降了 20.28%（$P < 0.05$）。

根据中国药典的记载，黄酮类成分是槐花的主要药用成分。槐花水提液发酵后黄酮含量上升可能是由于其含有的多酚类物质转化而来，多糖含量降低可能是由于接种瑞士乳杆菌、保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌进行发酵时，微生物生长过程中产生的酶对多糖进行降解和生物转化，导致多糖含量下降[38]。结果表明，槐花水提液发酵后抗氧化能力的降低可能主要与多糖类成分的减少有关

3　结论

本文采用响应面法对槐花水提液的发酵工艺进行优化，同时探究槐花水提液发酵前后的抗氧化活性变化。发酵槐花水提液最佳混菌组合及比例为瑞士乳杆菌:保加利亚乳杆菌:嗜热链球菌（1:1:1），发酵最优工艺条件为温度 21 ℃，时间 24 h，接菌量 3%。在该条件下得到的槐花水提液感官评分高达 79.01 分，总黄酮含量为 0.3225 mg/mL，含量提高了 7.2%，多糖含量为 1.14 mg/mL，含量下降了 20.28%。槐花水提液发酵后对 DPPH 自由基的清除率为 67.39%，清除率降低了 19.11%，对超氧阴离子自由基的清除率为 81.1%，清除率降低了 8.12%。经过益生菌发酵后的槐花水提液口感细腻，少许苦涩味，入口无不适反应，均匀，

无沉淀，槐花味浓郁伴随发酵香气，闻之无不适反应。发酵槐花水提液的研究，有效改善了口感不适问题，为槐花资源利用开辟了新途径。

参考文献：

[1] 胡婷婷，李金洋，左亚锋，等. 槐花和槐米的本草考证[J]. 辽宁中医药大学学报,2023,25(11):138-146. [HU T T, LI J Y, ZUO Y F, et al. Herbal textual research on huaihua（Sophorae flos）and huaimi（Sophorae immaturus）[J]. Journal of Liaoning University of TCM,2023,25(11):138-146.]

[2] HE X, BAI Y, ZHAO Z, et al. Local and traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of *Sophora japonica* L.: A review[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2016, 187: 160-182.

[3] JIANG S, SONG D, ZHAO H, et al. Bioactivity and component analysis of water extract of *sophora japonica* against hyperuricemia by inhibiting xanthine oxidase activity[J]. Foods, 2022, 11(23): 3772.

[4] 刘琳，程伟. 槐花化学成分及现代药理研究新进展[J]. 中医药信息,2019,36(04):125-128. [LIU L, CHENG W. Research progress in chemical constituents and modern pharmacology of *Sophora japonica*[J]. Information on Traditional Chinese Medicine, 2019,36(04):125-128.]

[5] LIU Y, HUANG W, JI S, et al. *Sophora japonica* flowers and their main phytochemical, rutin, regulate chemically induced murine colitis in association with targeting the NF-κB signaling pathway and gut microbiota[J]. Food Chemistry, 2022, 393: 133395.

[6] 王笑，王雨，张冰，等. 槐不同药用部位本草学、化学成分和药理作用研究进展[J]. 中草药,2018,49(18):4461-4467. [WANG X, WANG Y, ZHANG B , et al. Research progress on herbaceous, chemical constituents and pharmacological effects of different medicinal parts of *Sophora japonica*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2018,49(18):4461-4467.]

[7] 郭呈金. 研究中药槐花的药理作用及炮制[J]. 智慧健康,2018,4(01):153-154. [GUO C J. Study on the pharmacological action and preparation of chinese herb *sophora japonica*[J]. Smart Healthcare, 2018,4(01):153-154.]

[8] 牟登科，吴燕芬，周欢森. 槐花米中芦丁的抗氧化性及抑菌性研究[J]. 广东化工,2021,48(13):20-21. [MOU D K, WU Y F, ZHOU H S. Study on antioxidant activity and antibacterial property of rutin in sophora flower buds[J]. Guangdong Chemical Industry,2021,48(13):20-21.]

[9] 周慧吉，李廷钊，李波. 多模型评价槐花水提物的抗糖化作用及其活性成分研究[J]. 食品工业科技,2023,44(05):371-379. [ZHOU H J, LI T Z, LI B. Multi-model evaluation of anti-glycation effect of *Sophora japonica* flowers aqueous extract and its active components analysis[J]. Science and Technology of Food Industry,2023,44(05):371-379.]

[10]钱文文，辛宝，史传道. 槐花的营养保健功能及食品开发前景[J]. 农产品加工,2016(18):59-61. [QIAN W W, XIN B, SHI C D. Nutrition and processing of *sophra japonica*[J]. Farm Products Processing, 2016(18):59-61.]

[11]宋予震，史洪涛，范明夏，等. 微生物发酵中药研究进展[J]. 动物医学进展,2021,42(01):105-109. [SONG Y Z, SHI H T, FAN M X, et al. Research progress of microbial fermentation of traditional Chinese medicine[J]. Progress in Veterinary Medicine,2021,42(01):105-109.)]

[12] LI L, WANG L, FAN W, et al. The application of fermentation technology in traditional Chinese medicine: a review[J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2020, 48(04): 899-921.

[13] YANG H Y, HAN L, LIN Y Q, et al. Probiotic fermentation of herbal medicine: Progress, challenges, and

opportunities[J]. Am J Chin Med. 2023;51(5):1105-1126.
[14] ZHANG L X, GAO W Y, WANG H Y. Review of traditional Chinese medicine processed by fermentation[J]. China journal of Chinese materia medica, 2012, 37(24): 3695-3700.
[15] 马利华. 乳酸菌发酵对槐花营养及抗氧化性的影响[J]. 食品工业科技,2009,30(05):200-202+207. [MA L H. Effect of lactobacillus fermentation on nutrients and function of *Sophora japonica*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2009,30(05):200-202+207.]
[16]ZHANG Q, MA Z, MENG Q, et al. Key aroma compounds and metabolic profiling of Debaryomyces hansenii L1‐1‐fermented Flos Sophorae[J]. Journal of Food Biochemistry, 2021, 45(5): e13711.
[17]贺莹. 响应曲面优化微波辅助提取槐花精油的工艺[J]. 食品工业,2020,41(06):28-31. [HE Y. Microwave-assisted extraction of essential oil from *Sophora japonica*[J]. Journal of food industry, 2020,41(06):28-31.]
[18]王鹏. 响应面法优化槐花枸杞复合米酒发酵工艺[J]. 中国酿造,2022,41(09):209-214. [WANG P. Optimization of fermentation technology of sophorae flower and wolfberry compound rice wine by response surface methodology[J]. China Brewing, 2022,41(09):209-214.]
[19] 张永瑞. 发酵型槐花茶酒的制作工艺优化[J]. 湖南农业科学,2020(03):67-70. [ZHANG Y R. Optimization of processing technology for fermented false acacia flower tea wine[J]. Hunan Agricultural Sciences, 2020(03):67-70.]
[20]孙葳. 菌种活化操作方法[J]. 食品安全导刊,2020(35):78. [SUN W. Method of strain activation[J]. China Food Safety Magazine, 2020(35):78.]
[21]张璐. 洋槐花酱的研制及工艺优化[J]. 中国调味品,2021,46(02):83-88. [ZHANG L. Development and process optimization of acacia flower sauce[J]. China Condiment, 2021,46(02):83-88.]
[22]赵君洁, 曾卫军, 李艳红, 等. 大丽轮枝菌拮抗芽孢菌株的分离、鉴定及两株菌抑菌特性研究[J]. 北京师范大学学报(自然科学版),2017,53(03):294-300. [ZHAO J J, ZENG W J, LI Y H, et al. Isolation and identification of antagonistic spore strains of Verticillium dahliae and study on antibacterial characteristics of two strains[J]. Journal of Beijing Normal University (Natural Science), 2017,53(03):294-300.]
[23]茆鑫, 郑剑斌, 李广耀, 等. 响应曲面法优化刺五加-五味子混菌发酵工艺的研究[J]. 食品科技,2023,48(09):57-64. [MAO X, ZHENG J B, LI G Y, et al. Response surface methodology for optimizing the fermentation process of acanthopanax senticosus and schisandra chinensis with mixed bacteria[J]. Food Science and Technology,2023,48(09):57-64.]
[24]CHEN Y, WANG J, WAN D. Determination of total flavonoids in three Sedum crude drugs by UV-Vis spectrophotometry[J]. Pharmacognosy Magazine,2010,6(24):259-63.
[25]王丽丽, 林清霞, 宋振硕, 等. 分光光度法测定茶叶中总黄酮含量[J]. 茶叶学报,2021,62(01):1-6. [WANG L L, LIN Q X, SONG Z S , et al. Spectrophotometric determination of total flavonoids in tea[J]. Acta Tea Sinica ,2021,62(01):1-6.]
[26]黄秋凌, 雷婷, 何子昕, 等. 苯酚-硫酸法测定消渴丸中多糖含量[J]. 中西医结合研究,2023,15(05):308-310+327. [HUANG Q L, LEI T, HE Z X, et al. Determination of polysaccharides in xiaoke pill by phenol-sulfuric acid method[J]. Research of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine,2023,15(05):308-310+327.]
[27]张恩馨, 刘娜, 刘玮, 等. 广谱抗菌活性瑞士乳杆菌 AJT 在发酵乳中的应用[J]. 中国乳品工业,2023,51(09):60-64. [ZHANG E X, LIU N, LIU W , et al. Application of *L. helveticus* AJT with broad-spectrum antibacterial activity in fermented milk[J]. China Dairy Industry,2023,51(09):60-64.]
[28]刘知非, 周婷, 胡晓磊, 等. 响应面法优化复合益生菌发酵枸杞汁的工艺研究[J]. 中国酿造,2021,40(04):95-99. [LIU Z F, ZHOU T, HU X L , et al. Optimization of fermentation technology of *Lycium*

barbarum juice with compound probiotics by response surface methodology[J]. China Brewing,2021,40(04):95-99.]

[29]李理，闵建. 应用益生菌发酵生产酸豆乳的研究[J]. 食品与发酵工业,2009,35(10):68-72. [LI L, MIN J. Study on the production of yogurt by probiotic fermentation[J]. Food and Fermentation Industries, 2009,35(10):68-72.]

[30]王孝研，李妍，柳羽丰. 四种乳酸菌组合在豆乳饮料中的发酵研究[J]. 化学工程师,2014,28(07):73-76. [WANG X Y, LI Y, LIU Y F. Study on fermentation of four lactobacillus combination in soybean milk[J]. Chemical Engineer,2014,28(07):73-76.]

[31]LI L, YAN X, CHEN F, et al. A comprehensive review of the metabolism of citrus flavonoids and their binding to bitter taste receptors[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2023, 22(3): 1763-1793.

[32]沈丹芸，董科，范紫玮，等. 响应面法优化水豆豉纯种发酵产大豆异黄酮的条件[J]. 中国调味品,2020,45(06):31-36. [SHEN D Y, DONG K, FAN Z W, et al. Optimization of pure breed fermentation conditions for soybean isoflavones produced by fermented soybeans with response surface methodology[J]. China Condiment,2020,45(06):31-36.]

[33]董璇，魏雨晴，吴珊珊，等. 植物基复合谷物发酵饮料工艺优化[J]. 皖西学院学报,2023,39(05):92-99. [DONG X, WEI Y Q, WU S S, et al. Process optimisation of plant-based composite grain fermented beverage[J]. Journal of West Anhui University,2023,39(05):92-99.]

[34]刘哲，叶英，李珊，等. 基于响应面设计的藜麦酒糟饼干配方优化[J]. 食品研究与开发,2021,42(17):129-136. [LIU Z, YE Y, LI S, et al. Response surface design optimization of biscuit formula using quinoa distiller's grains[J]. Food Research and Development, 2021,42(17):129-136.]

[35] YUAN S, XU C Y, XIA J, et al. Extraction of polysaccharides from Codonopsis pilosula by fermentation with response surface methodology[J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(12): 6660-6669.

[36] TAI Z, CAI L, DAI L, et al. Antioxidant activity and chemical constituents of edible flower of Sophora viciifolia[J]. Food Chemistry, 2011, 126(4): 1648-1654.

[37] 张玉梅，邢慧珍，刘会平，等. 槐花多糖的提取、纯化和抗氧化活性分析[J/OL]. 食品工业科技:1-13[2023-11-21]. https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023020274. [ZHANG Y M, XING H Z, LIU H P, et al. Extraction, purification and antioxidant activity of polysaccharides from *Sophora japonica*[J/OL]. Science and Technology of Food Industry:1-13[2023-11-21]. https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023020274.]

[38] 刘艳芳，高坤，冯杰，等. 酿酒酵母发酵降解灵芝胞外多糖组分分析及活性研究[J]. 菌物学报,2020,39(02):372-380. [LIU Y F, GAO K, FENG J, et al. Characteristics and immune‐enhancing activities of ganoderma lingzhi extracellular polysaccharide fermented with saccharomyces cerevisiae[J]. Mycosystema,2020,39(02):372-380.]