

# 滁菊酵素发酵工艺优化及生物活性功能探究

李志宏, 王等福, 彭梦阳, 蒋丽娜, 吴敬茹, 安建鲁\*

滁州学院生物与食品工程学院, 安徽 滁州

收稿日期: 2024年7月10日; 录用日期: 2024年8月19日; 发布日期: 2024年8月28日

## 摘要

课题以滁菊为原料, 利用白糖和乳酸菌发酵制备滁菊酵素, 并探索其实验条件下的最佳发酵工艺及生物活性功能, 为滁菊产品的开发提供依据。以黄酮含量、总酚含量、自由基清除能力、SOD酶活力等为评价指标, 通过单因素试验及响应面法对滁菊酵素发酵工艺进行优化。结果表明, 滁菊酵素最佳发酵工艺为初始pH 2.2, 滁菊添加量0.786 g, 白糖添加量13.621 g。在此工艺条件下, 滁菊酵素的总酚含量达到0.1696 mg/ml。滁菊酵素表现出了较强的抗氧化性和抑菌性, 测得滁菊酵素对DPPH自由基清除率88%, 对ABTS自由基清除率61%, SOD酶活力达96.30 U/ml, 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌抑菌的抑菌直径分别为27.67 mm和28.19 mm。

## 关键词

滁菊, 酵素, 响应面法, 抗氧化性, 抑菌性

# Optimization of Fermentation Process and Exploration of Bioactive Function of *Chrysanthemum morifolium* 'Chuju' Enzyme

Zhihong Li, Dengfu Wang, Mengyang Peng, Lina Jiang, Jingru Wu, Jianlu An\*

School of Biological Science and Food Engineering, Chuzhou University, Chuzhou Anhui

Received: Jul. 10<sup>th</sup>, 2024; accepted: Aug. 19<sup>th</sup>, 2024; published: Aug. 28<sup>th</sup>, 2024

## Abstract

This study used *Chrysanthemum morifolium* 'Chuju' as a raw material to prepare enzyme through

\*通讯作者。

文章引用: 李志宏, 王等福, 彭梦阳, 蒋丽娜, 吴敬茹, 安建鲁. 滁菊酵素发酵工艺优化及生物活性功能探究[J]. 食品与营养科学, 2024, 13(3): 337-347. DOI: 10.12677/hjfn.2024.133043

fermentation with sugar and lactic acid bacteria. The aim was to explore the optimal fermentation process and bioactive functions under experimental conditions, providing a basis for the development of *C. morifolium* 'Chuju' products. The fermentation process of *C. morifolium* 'Chuju' enzyme was optimized using single factor experiments and response surface methodology, with flavonoid content, total phenol content, free radical scavenging capacity, and SOD enzyme activity as evaluation indices. The results showed that the optimal fermentation conditions for *C. morifolium* 'Chuju' enzyme were an initial pH of 2.2, 0.786 g of *C. morifolium* 'Chuju', and 13.621 g of sugar. Under these conditions, the total phenol content of the *C. morifolium* 'Chuju' enzyme reached 0.1696 mg/ml. The *C. morifolium* 'Chuju' enzyme exhibited strong antioxidant and antibacterial properties, with a DPPH free radical scavenging rate of 88%, an ABTS free radical scavenging rate of 61%, SOD enzyme activity of 96.30 U/ml, and inhibition diameters against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* of 27.67 mm and 28.19 mm, respectively.

## Keywords

*Chrysanthemum morifolium* 'Chuju', Enzyme, Response Surface Methodology, Antioxidant Activity, Antibacterial Activity

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

滁菊是安徽省十大皖药之一和国家道地药材,被列入药食同源目录,有平肝、明目及疏风散热等功效,具有较高的药用价值,目前已被纳入国家中药材计划管理品种[1]。现代生物学分析表明,滁菊含有黄酮、酚类、挥发油、萜类和多糖等化合物。相较于其他菊花,滁菊中总黄酮量和硒含量更高,且易被人体吸收[2]。此外,滁菊中的多糖还具有促进免疫活性的作用[3]。另外,近年来对滁菊的研究表明,滁菊中富含的黄酮、挥发油、氨基酸和微量元素等天然成份,在抗氧化、抗衰老、消炎杀菌、保护心血管、预防高血糖、改善缺血心肌血液供给、抗肿瘤等方面也有其作用[4] [5]。赵梦琦等构建小鼠高胆固醇模型,将不同浓度的滁菊黄酮进行灌胃给药,并检测相关血液生化指标和肝脏药理学检测,证明滁菊黄酮能够通过 13 种关键成分作用于 50 个关键靶点上,并通过关键通路发挥抗氧化作用,减少脂质过氧化物的产生,避免胆固醇的累积[6]。林琳等测定滁菊精油对单核细胞增生李斯特菌的最低抑菌浓度为 2.5 mg/ml,表现出良好的抑菌作用[7]。缪成贵等提取滁菊总黄酮,并研究其对油脂过氧化的抑制效果,结果表明,滁菊总黄酮在抗氧化方面发挥有效作用[8]。俞浩等建立了心肌缺血再灌注损伤大鼠模型,通过滁菊总黄酮的灌胃给药,能够降低血清中血清肌酸激酶、乳酸脱氢酶活性,降低急性心肌缺血大鼠心肌梗死范围[9]。董克江等通过高脂饲料饲喂小鼠,建立高血糖症小鼠模型,同时给予不同浓度的滁菊水提液进行干预,通过测定干预后血糖的变化,证明滁菊水提液能够抑制高脂饮食诱导的高血糖效应[10]。

微生物酵素是以多种蔬果、谷类、菌菇类等植物原料,经微生物发酵后获得的一类保健产品,其中含有各种活性物、生物酶以及益生菌,营养丰富,具有较高的经济价值[11] [12]。酵素具备多种保健功效,例如抗氧化、增强免疫力、调节肠胃功能、抗疲劳、调节人体酸碱平衡、促进血液循环及新陈代谢、降血脂、减肥,以及解酒护肝等,能够辅助预防疾病,补充营养,具有促进人体健康的潜在价值[13]。

目前有关滁菊酵素的研究相对较少。开发滁菊酵素产品、优化发酵工艺不仅能够拓宽滁菊的应用领域,挖掘滁菊中潜在的经济价值,还可以扩增酵素原料的范围,有助于推动酵素工业的创新与发展。章

苇虹等以滁菊和水果为主要原料,在不接种其他微生物的情况下,采用单因素试验法和正交试验法对滁菊水果酵素的发酵过程进行了研究,并成功制成滁菊水果酵素成品[14]。张微微等以滁菊和葛根为原料,采用均匀设计法和方差分析优化超声提取滁菊葛根黄酮提取物,利用真空旋转浓缩提取液,快速制作了滁菊葛根露酒[15]。

本研究则以滁菊为发酵基质进行酵素发酵,通过响应面法优化发酵工艺,旨在有效提高滁菊酵素产量和质量,并评估酵素的抗氧化性和抑菌性等生物活性,具有较强的科学和应用意义。相较于传统的单因素实验和正交实验,响应面法能够节约实验资源,降低研发成本,在酵素发酵工艺优化领域具有广泛的应用价值,可在酵素产业中推动生产效率和经济性的提升。

此外,通过对滁菊酵素抗氧化性、抑菌性等生物活性的初步研究,可以对其清除自由基、增强免疫力能力进行评价,并为进一步开发滁菊酵素产品提供一定的理论和技术支持。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 材料与试剂

试验材料:滁菊、白砂糖;试验菌种:乳酸菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌;试验试剂:氢氧化钠、酚酞指示剂、考马斯亮蓝 G-250、无水乙醇、没食子酸、福林酚、柠檬酸、磷酸氢二钠、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、氯化钾、蒸馏水、氯化钠、DPPH、ABTS、过硫酸钾、芦丁标准品、亚硝酸钠、硝酸铝、碳酸钠。

### 2.2. 仪器与设备

试验仪器:SHIMADZU 紫外可见分光光度计、A6-001 精密天平、Portable Refractometer、FY-50 反压高温蒸煮锅、Blue pard 隔水式培养箱、TG-WS 台式高速离心机、SW-CJ-2FD 型双人单面净化工作台等。

### 2.3. 试验方法

#### 2.3.1. 工艺流程

工艺流程:滁菊→充分浸泡→过滤→药品称量→灌装及灭菌→接菌→恒温发酵→分离→发酵液→澄清→成品。

#### 2.3.2. 主要成分的测定

(1) 黄酮:利用亚硝酸钠法测定,以芦丁为标准品测定待测样品中的黄酮含量。准确称取芦丁标准品 3.0 mg,用 60%乙醇定容至 10 ml,得到 0.3 mg/ml 的芦丁标准溶液。分别取标准液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 ml,转至 10 ml 容量瓶中,分别加入 2.4 ml 60%乙醇,摇匀;再加入 0.4 ml 5%  $\text{NaNO}_2$  溶液,混匀后在室温避光下静置 6 min;分别加入 0.4 ml 10%  $\text{AlNO}_3$  溶液,摇匀避光静置 6 min;分别加入 4 ml 4%  $\text{NaOH}$  溶液,摇匀,最后加入 60%乙醇定容至刻度,室温下避光反应 15 min,在 508 nm 处测定吸光度值。以吸光度值为纵坐标,芦丁标准液浓度为横坐标,绘制黄酮测定标准曲线。通过相同的方法测定待测溶液的吸光度,带入标准曲线中计算其黄酮含量。

(2) 蛋白质:利用考马斯亮蓝 G-250 法测定[16],以牛血清白蛋白为标准品测定样品中的蛋白质含量。准确称取牛血清白蛋白 0.1 g,用去离子水定容至 100 ml,获得 1 mg/ml 的蛋白质标准溶液,取 10 ml 该标准溶液定容至 100 ml,获得 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的标准溶液。分别取标准液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 ml,用去离子水定容至 1.0 ml,获得梯度浓度的标准蛋白溶液。分别加入 5.0 ml 考马斯亮蓝试剂,混匀后室温静置 10 min。在 595 nm 处测定并记录反应产物吸光度值,以吸光度值为纵坐标,蛋白质标准液浓度为横坐标,绘制蛋白质测定标准曲线。通过相同的方法测定待测溶液的吸光度,带入标准曲线中计算其蛋白质含量。

(3) 总酚：通过福林酚法测定样品中的总酚含量[17]，量取 1.0 ml 待测样品与 4 ml 60%乙醇充分混匀，静提 10 min，10,000 r/min 离心 10 min，取上清液进行总酚含量测定。吸取 0.1 ml 上清液，加入 0.3 ml 0.5 mol/l 的福林酚试剂，充分混匀后加入 0.5 mol/L 碳酸钠溶液 1.2 ml，混匀，室温避光反应 1 h，吸取 200  $\mu$ l 于 96 孔酶标板，于酶标仪测定 765 nm 处吸光值。以没食子酸标准品制作标准曲线，结果以每 100 ml 滁菊酵素中含有的 mg 没食子酸当量(mgGAE/100g)表示。

(4) 总酸：利用酸碱滴定法测定[18]，取适当稀释的样品溶液于锥形瓶中，以酚酞作为酸碱指示剂，用标定后的氢氧化钠进行滴定。根据消耗碱液的体积计算总酸含量(以乳酸计)，并根据以下公式计算总酸的含量。

$$X = \frac{[c \times (V_1 - V_2) \times k \times F]}{m} \times 100$$

公式中的符号含义如下：X 为计算得出的总酸含量，单位为 g/100 g；c 为氢氧化钠标准滴定液浓度，单位为 mol/L；V<sub>1</sub> 为滴定样品时所消耗的氢氧化钠标准滴定液体积，单位为 ml；V<sub>2</sub> 为空白试验时所消耗的氢氧化钠标准滴定液的体积，单位为 ml；k 为酸的换算系数，乳酸按 0.09 计算；F 为样品稀释的倍数；m 为样品的质量，单位为 g；100 为换算系数。

### 2.3.3. 单因素试验

(1) 发酵时间：称取滁菊 0.5 g，放入灭菌发酵罐中，取无菌水 200 ml 浸泡滁菊，浸泡 24 h，获得滁菊浸出液；称取蔗糖 15 g，并量取滁菊浸出液 150 ml 到灭菌发酵罐中，用柠檬酸、磷酸氢二钠调节 pH 至 4.4。将发酵基质于 121℃ 灭菌 20 min，取出冷却，接种 0.1 g 乳酸菌，在 30℃ 条件下分别发酵 5、6、7、8、9 d。

(2) 滁菊添加量：分别称取滁菊 0.1、0.25、0.5、0.75、1 g，放入灭菌发酵罐中，取无菌水 200 ml 浸泡滁菊，浸泡 24 h，获得滁菊浸出液；称取蔗糖 15 g，并量取滁菊浸出液 150 ml 到灭菌发酵罐中，用柠檬酸、磷酸氢二钠调节 pH 至 4.4。将发酵基质于 121℃ 灭菌 20 min，取出冷却，接种 0.1 g 乳酸菌，在 30℃ 条件下发酵 7 d。

(3) 蔗糖添加量：称取滁菊 0.5 g，放入灭菌发酵罐中，取无菌水 200 ml 浸泡滁菊，浸泡 24 h，获得滁菊浸出液；分别称取蔗糖 9、12、15、18、21 g，并量取滁菊浸出液 150 ml 到灭菌发酵罐中，用柠檬酸、磷酸氢二钠调节 pH 至 4.4。将发酵基质于 121℃ 灭菌 20 min，取出冷却，接种 0.1 g 乳酸菌，在 30℃ 条件下发酵 7 d。

(4) pH 值：称取滁菊 0.5 g，放入灭菌发酵罐中，取无菌水 200 ml 浸泡滁菊，浸泡 24 h，获得滁菊浸出液；分别称取蔗糖 15 g，并量取滁菊浸出液 150 ml 到灭菌发酵罐中，用柠檬酸、磷酸氢二钠调节 pH 分别至 2.4、3.4、4.4、5.4、6.4。将发酵基质于 121℃ 灭菌 20 min，取出冷却，接种 0.1 g 乳酸菌，在 30℃ 条件下发酵 7 d。

### 2.3.4. 响应面优化实验

**Table 1.** Horizontal coding table of experimental factors on response surfaces

**表 1.** 响应面实验因素水平编码表

水平	A 发酵初始 pH	B 滁菊添加量/g	C 白糖添加量/g
-1	2.2	0	12
0	3.2	0.4	15
1	4.2	0.8	18

在单因素试验结果的基础上,依据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理,以总酚含量为响应值,选择初始 pH 值(A)、滁菊添加量(B)和白糖添加量(C)为三因素,用 Design-Expert 软件的 Box-betoken 中心组合设计三因素三水平的响应面试验,响应面试验因素水平编码见表 1。

### 2.3.5. 抗氧化性及抑菌试验

#### (1) 抗氧化性实验:

DPPH 清除率采用 DPPH 法测定[19]。准确吸取滁菊酵素稀释液 4 ml、0.02 mg/ml DPPH 溶液 4 ml,震荡混匀,25℃条件下孵育 30 min,用分光光度计在 517 nm 处测定其吸光值,记为  $A_1$ ;取滁菊酵素稀释液 4 ml、无水乙醇 4 ml,震荡混匀,25℃条件下孵育 30 min,用分光光度计在 517 nm 处测定其吸光值,记为  $A_2$ ;空白组以 4 ml 无水乙醇和 DPPH 混匀对照,于 25℃条件下孵育 30 min,用分光光度计在 517 nm 处测定其吸光值  $A_0$ ,每组测定重复三次。用以下公式计算滁菊酵素的 DPPH 清除率。

$$\text{DPPH 自由基清除能力}(\%) = \left[ \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \right] \times 100$$

公式中的符号含义如下: $A_0$ 为空白对照液吸光度; $A_1$ 为样品测定管吸光度; $A_2$ 为样品本底管吸光度。

ABTS 清除率采用 ABTS 法测定[17]。用 5 mmol/L, pH 7.4 的 PBS 缓冲液配置 7 mmol/L ABTS,加入过硫酸钾,使其最终浓度为 2.45 mmol/L,在室温条件下黑暗静置 12~16 h 备用。测定前用 PBS 将 ABTS 溶液稀释至 734 nm 波长处吸光度为  $0.7 \pm 0.02$ ;准确吸取 10  $\mu\text{l}$  适当稀释的滁菊酵素加入 5 ml ABTS 稀释液中,30℃温度下孵育 5 min。在 734 nm 波长处测定反应液的吸光度,记为  $A_1$ ;取 10  $\mu\text{l}$  去离子水加入 5 ml ABTS 稀释液中,在 30℃温度下反应 5 min,在 734 nm 波长处测定吸光度,记为  $A_0$ ;取 10  $\mu\text{l}$  滁菊酵素稀释液加入到 5 ml 去离子水中,在 30℃温度下反应 5 min,在 734 nm 波长处测定吸光度,记为  $A_2$ 。

$$\text{ABTS 自由基清除能力}(\%) = \left[ \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \right] \times 100$$

公式中的符号含义如下: $A_0$ 为空白对照液的吸光度; $A_1$ 为样品测定管的吸光度; $A_2$ 为样品本底管的吸光度。

SOD 酶活性测定采用连苯三酚自氧化法测定[20]。在 25℃条件下,在 4.5 ml 50 mmol/L pH 8.3 的磷酸缓冲液中加入 10  $\mu\text{l}$  50 mmol/L 的连苯三酚,迅速摇匀,在 325 nm 波长下,每隔 30 s 测吸光度值一次,记作  $A_0$ ;在 25℃条件下,在上述磷酸缓冲液中加入 10  $\mu\text{l}$  适当稀释的滁菊酵素发酵液以及 10  $\mu\text{l}$  50 mmol/L 的连苯三酚,迅速摇匀,在 325 nm 波长下,每隔 30 s 测吸光度值一次,记作  $A_1$ 。根据以下公式计算滁菊酵素的 SOD 酶活性。

$$\text{酶活性}(\text{U/ml}) = \frac{(A_0 - A_1)}{(A_0 \times 50\%)} \times \text{反应液总体积} \times \text{样品稀释液倍数} / \text{样品液体积}$$

(2) 抑菌性实验:采用牛津杯 - 抑菌实验法[21]。用移液器吸取 1 ml 适量活化的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌菌液,用生理盐水进行系列稀释,得到菌悬液;将 20~25 ml 融化后冷却至 46℃左右的固体培养基倒入灭菌培养皿中,静置凝固后吸取 200  $\mu\text{l}$  菌悬液于平板上涂布。用镊子将灭菌牛津杯置于涂布菌液的培养皿中。每个平皿中均匀放置 3 个牛津杯,其中 2 个牛津杯中分别加入 200  $\mu\text{l}$  酵素样品,另取等量无菌水作为对照加入剩余牛津杯中。每种菌种做两个平板,互为对照;将平板置于 37℃条件下培养 2 d,测定并记录其抑菌圈直径。

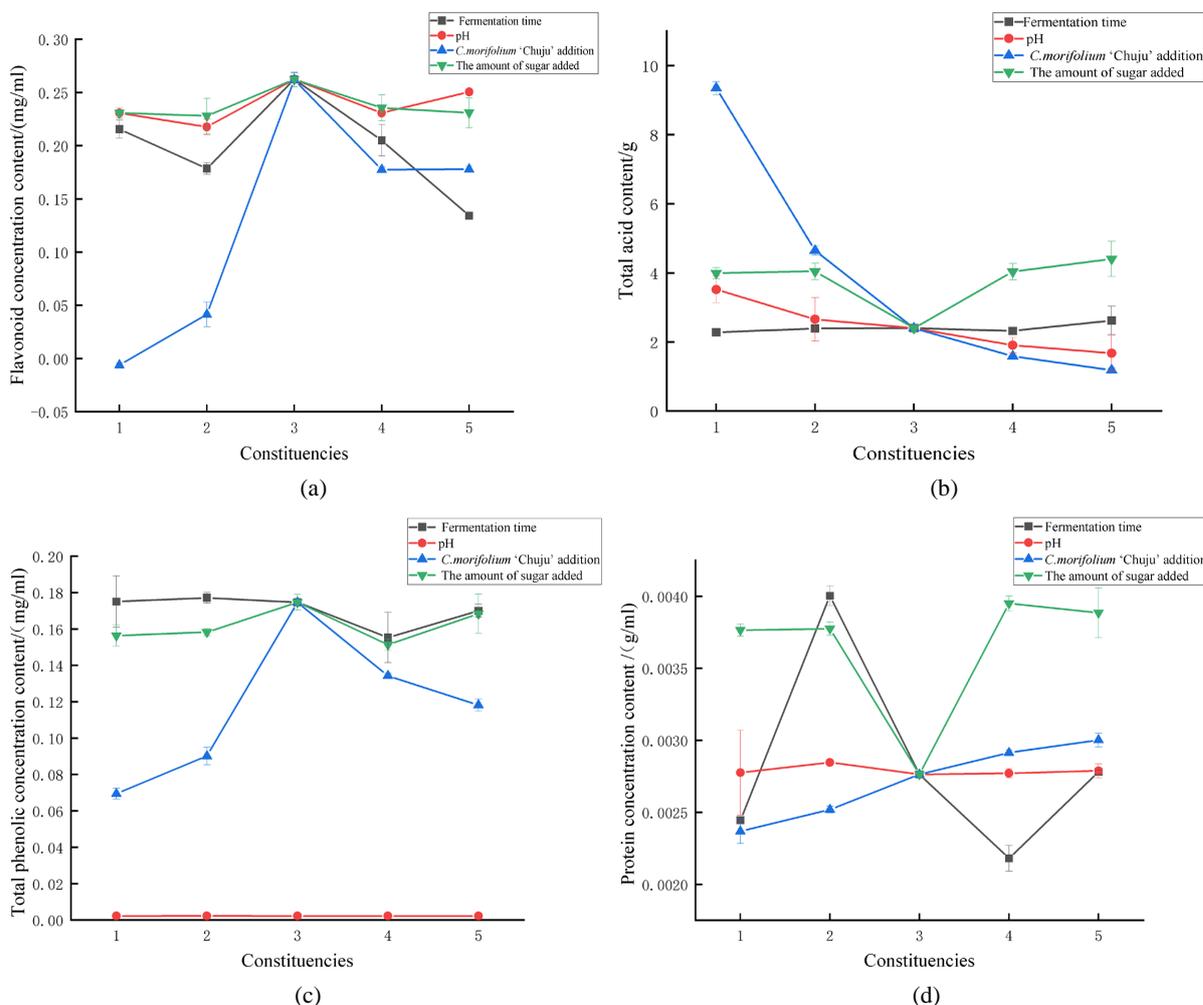
## 2.4. 数据处理

通过 Origin 及 SPSS 软件进行数据处理及可视化分析,每项试验设置三组平行,并通过 Duncan 新复极差法进行显著性分析。

### 3. 结果与分析

#### 3.1. 单因素实验

发酵时间、发酵初始 pH、滁菊添加量、白糖添加量对滁菊酵素黄酮、总酸、总酚和蛋白质浓度的影响如图 1 所示。对于黄酮、总酚而言，当滁菊添加量 0.5 g，白糖添加量 15 g 时含量最高；对于总酸而言，其整体变化趋势不稳定，综合考虑在发酵时间 5 d，pH 2.2，滁菊添加量 0.1 g，白糖添加量 9 g 时，总酸含量最高；对于蛋白质浓度而言，最适发酵条件为发酵时间 6 d，pH 3.4，滁菊添加量 0.25 g，白糖添加量 12 g。



**Figure 1.** The influence of various factors on the biological activity index of *C. morifolium* 'Chuju' enzyme

**图 1.** 各因素对滁菊酵素生物活性指标的影响

#### 3.2. 响应面优化

##### 3.2.1. 响应面试验结果与方差分析

通过 Design-Expert 12 对实验数据进行多元回归拟合分析，得到总酚含量(Y)对发酵初始 pH 值(A)、滁菊添加量(B)、白糖添加量(C)的二次多项回归模型方程为： $Y = 0.1163 + 0.0044A + 0.0137B + 0.0086C - 0.0114AB + 0.0091AC - 0.159BC + 0.0274A^2 + 0.0112B^2 - 0.0119C^2$ 。滁菊酵素响应面实验设计及结果见表 2。

**Table 2.** Experimental design and results of response surface of *C. morifolium* 'Chuju' enzyme**表 2.** 滁菊酵素响应面实验设计及结果

序号	发酵初始 pH	滁菊添加量/g	白糖添加量/g	总酚浓度含量/(mg/ml)
1	2.2	0	15	0.129741
2	4.2	0	15	0.112985
3	2.2	0.8	15	0.126744
4	4.2	0.8	15	0.1224
5	2.2	0.4	12	0.176313
6	4.2	0.4	12	0.119448
7	2.2	0.4	18	0.0810629
8	4.2	0.4	18	0.127506
9	3.2	0	12	0.136247
10	3.2	0.8	12	0.154397
11	3.2	0	18	0.119421
12	3.2	0.8	18	0.115059
13	3.2	0.4	15	0.164848
14	3.2	0.4	15	0.114561
15	3.2	0.4	15	0.115698
16	3.2	0.4	15	0.118464
17	3.2	0.4	15	0.156338

进一步对回归模型进行方差分析, 结果见表 3。据表 3 可知, 该模型  $P < 0.0001$ , 极显著, 失拟项  $P$  值为  $0.2102 > 0.05$ , 不显著, 说明该方程合理可行; 决定系数  $R^2 = 0.9884$ , 调整决定系数  $R^2_{Adj} = 0.9734$ , 说明该模型能够解释 97.34 % 响应值的变化, 拟合程度较好, 可用该回归方程预测滁菊酵素发酵工艺条件。变异系数  $CV\% = 2.90\% < 10\%$ , 表明试验模型的可信度和精确度高。并且一次项 A、B、C 均对结果影响显著( $P < 0.05$ ), 交互项 AB、BC、AC 和二次项  $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$  对滁菊酵素总酚含量的影响极显著( $P < 0.01$ ), 各因素对滁菊酵素总酚含量影响的大小顺序为: 滁菊添加量(B) > 白糖添加量(C) > 发酵初始 pH 值(A)。

**Table 3.** Variance analysis of response surface model based on Box-Behnken design**表 3.** 基于 Box-Behnken 设计的响应曲面模型方差分析

来源	平方和	自由度	均方差	F 值	P 值	显著性水平
模型	0.0083	9	0.0009	66.18	< 0.0001	**
因素 A	0.0002	1	0.0002	11.12	0.0125	*
因素 B	0.0015	1	0.0015	106.57	< 0.0001	**
因素 C	0.0006	1	0.0006	42.24	0.0003	**
AB	0.0005	1	0.0005	36.76	0.0005	**
AC	0.0003	1	0.0003	23.71	0.0018	**

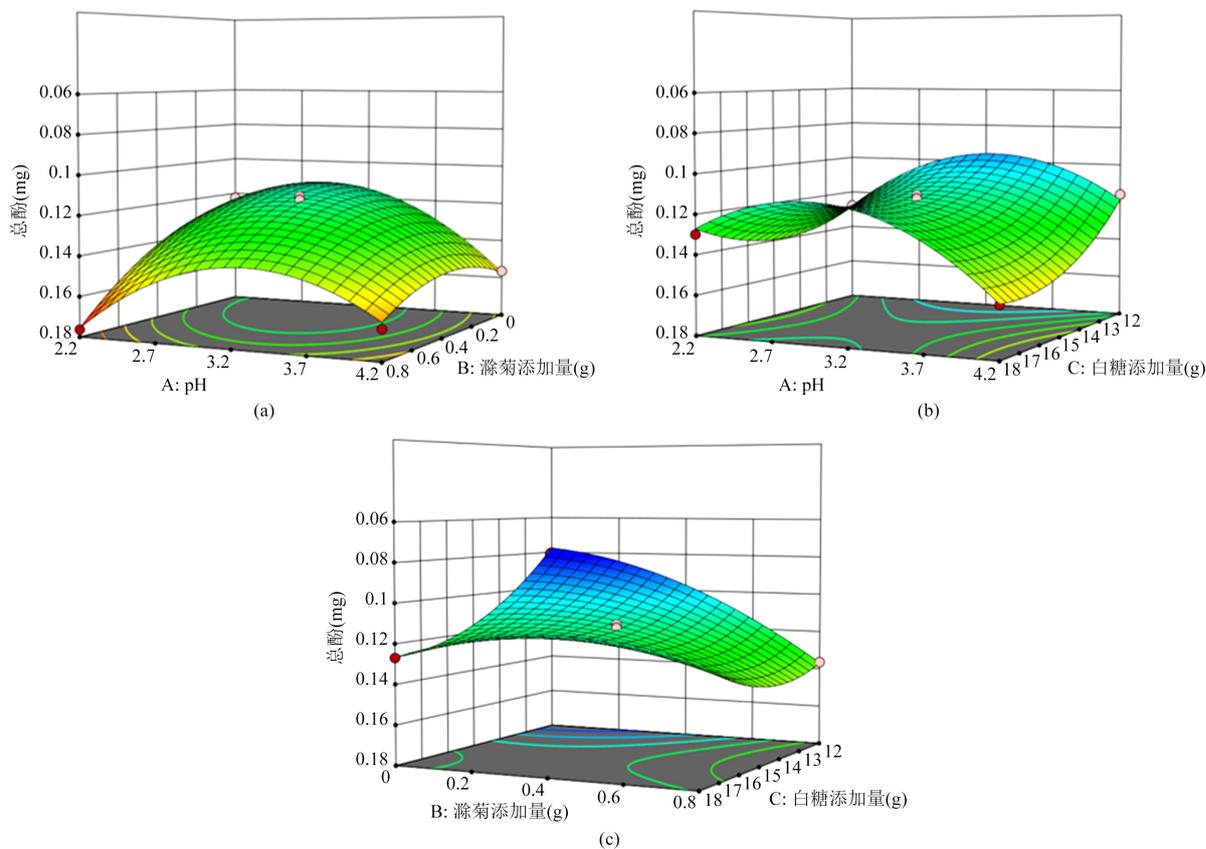
续表

BC	0.0010	1	0.0010	71.83	< 0.0001	**
A <sup>2</sup>	0.0032	1	0.0032	226.19	< 0.0001	**
B <sup>2</sup>	0.0005	1	0.0005	37.92	0.0005	**
C <sup>2</sup>	0.0006	1	0.0006	42.55	0.0003	**
残差	0.0001	7	0.0000			
失拟项	0.0001	3	0.0000	2.38	0.2102	不显著
纯误差	0.0000	4	8.802E-06			
总和	0.0084	16				

注：“\*”表示对结果影响显著( $P < 0.05$ )，“\*\*”表示对结果影响极显著( $P < 0.01$ )。

### 3.2.2. 响应面各因素的交互作用及等高线图

响应面和等高线图可以直观地反映各因素间交互作用对响应值的影响程度，响应曲面坡度越陡峭，等高线越密集，表明该因素对响应值的影响越显著，等高线越接近椭圆，两个因素间的交互作用越强；反之则各因素间交互作用对响应值的影响较小。各因素间交互作用对滁菊酵素总酚影响的响应面和等高线图见图2，可以看出pH与滁菊添加量的交互作用最强，影响最显著；滁菊添加量与白糖添加量的交互作用最弱且影响较小。



**Figure 2.** Response surface and contour diagram of the effect of the interaction between factors on total phenolic content  
**图 2.** 各因素间交互作用对总酚含量影响的响应面和等高线图

### 3.2.3. 滁菊酵素发酵最佳工艺验证试验

通过 Design-Expert 12 软件进行最大值分析,得到滁菊酵素发酵的最佳工艺条件为:初始 pH 值 2.212, 滁菊添加量为 0.786 g, 白糖添加量为 13.621 g, 在此条件下, 滁菊酵素总酚含量的预期值为 0.178 mg/ml, 在此条件下进行 3 次重复验证试验, 得到滁菊酵素总酚含量实际值为  $0.1696 \pm 0.0053$  mg/ml, 与预期值的相对误差为 4.9%, 与理论值误差较小, 说明该模型准确可靠。

## 3.3. 抗氧化活性

### 3.3.1. DPPH 自由基清除率测定

如表 4 所示,通过代入各组吸光度值至公式:  $\text{DPPH 自由基清除能力}(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100$ , 计算得出滁菊酵素的 DPPH 清除率为  $(88 \pm 0.008)\%$ 。这一结果表明滁菊酵素具有显著的 DPPH 自由基清除能力, 属于较高水平。

Table 4. Absorbance measurement tables for each group

表 4. 各组吸光度测量表

组别	A <sub>0</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>
	0.3686	0.1527	0.1077
吸光度	0.3488	0.1287	0.0826
	0.3721	0.1228	0.0798

### 3.3.2. ABTS 自由基清除率测定

如表 5 所示,通过代入各组吸光度值至公式:  $\text{ABTS 自由基清除能力}(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100$ , 计算得出滁菊酵素的 DPPH 清除率为  $(62 \pm 0.02)\%$ 。这一结果表明滁菊酵素具有良好的 ABTS 自由基清除能力。

Table 5. Absorbance measurement tables for each group

表 5. 各组吸光度测量表

组别	A <sub>0</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>
	0.668	0.3452	0.0985
吸光度	0.6511	0.3422	0.0864

### 3.3.3. SOD 酶活性测定

Table 6. Absorbance measurement tables for each group

表 6. 各组吸光度测量表

时间/s	30	60	120	150	180
对照	0.4263	0.4084	0.3889	0.3953	0.3927
1	0.342294	0.338	0.3791	0.3933	0.3682
2	0.3263	0.3584	0.3891	0.3024	0.3914
3	0.3393	0.3519	0.3274	0.3953	0.3895

如表 6 所示, 通过代入各组吸光度值至公式:

$$\text{酶活性 (U/ml)} = \frac{A0 - A1}{50\%} \times \text{反应液总体积} \times \frac{\text{样品稀释液倍数}}{\text{样品液体积}}$$

计算得出滁菊酵素的 SOD 酶活力为(96.30 ± 13.15) U/ml, 表明滁菊酵素具有较高 SOD 酶活性。

### 3.4. 抑菌性

滁菊酵素对大肠杆菌及金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径如表 7 所示, 滁菊酵素对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径分别为 26.67 mm 和 28.19 mm, 证明滁菊酵素对这两种细菌均展现出显著的抑制作用。通过进一步分析可知, 滁菊酵素对金黄色葡萄球菌的抑菌效果优于大肠杆菌, 这为后续深入研究滁菊酵素的抗菌机制提供了一定的实验依据。

**Table 7.** Antibacterial activity of *C. morifolium* 'Chuju' enzymes

**表 7.** 滁菊酵素抑菌活性

菌种	直径(mm)
大肠杆菌	27.67 ± 1.36
金黄色葡萄球菌	28.19 ± 0.67

## 4. 结论

本研究以滁菊为发酵原料, 经白糖、乳酸菌制备滁菊酵素, 通过响应面分析探究初始 pH、滁菊添加量、白糖添加量及发酵时间对滁菊酵素品质的影响, 并进一步测定滁菊酵素的抗氧化性及抑菌性。通过研究证明, 在实验室发酵条件下, 滁菊酵素的最佳发酵工艺条件为: 初始 pH 2.2、滁菊添加量 0.786 g、白糖添加量 13.621 g。在此优化条件下, 滁菊酵素的总酚含量达到 0.1696 mg/ml, DPPH 自由基清除率为 88%, ABTS 自由基清除率为 61%, SOD 酶活力为 96.3 U/ml, 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径分别为 26.67 mm 和 28.19 mm, 展现出优异的抗氧化性能与抑菌性能。本研究不仅为滁菊的综合利用提供了新途径, 也为酵素的科学发展提供了一定的理论依据。

## 基金项目

滁州学院科研启动基金项目(项目号 2022qd016)。

## 参考文献

- [1] 张新河. 滁菊产业发展的制约瓶颈与对策[J]. 基层农技推广, 2024, 12(3): 89-92.
- [2] 刘家莉. 滁菊产业发展的建议与思考[J]. 南方农业, 2021, 15(12): 195-196.
- [3] 韩天祥, 刘文科, 徐佳铭, 等. 滁菊多糖结构特性及其免疫活性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(3): 320-328.
- [4] Yue, J., Zhu, C., Zhou, Y., Niu, X., Miao, M., Tang, X., *et al.* (2018) Transcriptome Analysis of Differentially Expressed Unigenes Involved in Flavonoid Biosynthesis during Flower Development of *Chrysanthemum morifolium* 'Chuju'. *Scientific Reports*, 8, Article No. 13414. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31831-6>
- [5] 何晓伟, 张余. 滁菊挥发油成分分析及其应用研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2019, 30(9): 182-186.
- [6] 赵梦琦, 王洪东, 施高程, 等. 滁菊总黄酮对高胆固醇血症的改善作用及机制[J/OL]. 食品工业科技: 1-22. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023120223>, 2024-07-17.

- [7] Lin, L., Mao, X., Sun, Y., *et al.* (2018) Antibacterial Properties of Nanofibers Containing Chrysanthemum Essential Oil and Their Application as Beef Packaging. *International Journal of Food Microbiology*, **292**, 21-30. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.12.007>
- [8] 繆成贵, 陈庆榆, 何华奇. 滁菊总黄酮抗氧化作用研究[J]. 生物学杂志, 2012, 29(3): 42-44, 87.
- [9] 俞浩, 周国梁, 刘汉珍, 等. 滁菊总黄酮对大鼠急性心肌缺血保护作用的实验研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(13): 352-354, 358.
- [10] 董克江, 刘均涛, 陈岩, 等. 滁菊对高脂饮食性高血糖症的预防作用[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2013, 2(34): 185-186.
- [11] 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.
- [12] 赵芳芳, 莫雅雯, 蒋增良, 等. 功能性微生物酵素产品的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(7): 283-287.
- [13] 王玉荣, 史雅静, 侯名君, 等. 微生物酵素功能及应用情况综述[J]. 辽宁科技学院学报, 2019, 21(3): 28-30.
- [14] 章苇虹, 于士军, 张春艳, 等. 滁菊水果酵素制作工艺研究[J]. 现代农业科技, 2018(3): 256-258.
- [15] 张微微, 文骏驰, 孙艳辉, 等. 滁菊葛根露酒超声提取工艺研究[J]. 文山学院学报, 2021, 34(3): 5-7, 25.
- [16] 姜惠萍, 刘万顺, 宋福来, 等. 改良考马斯亮蓝试剂法测定壳聚糖及其衍生物中蛋白质含量[J]. 现代食品, 2022, 28(17): 173-178.
- [17] 崔燕, 宣晓婷, 朱宏芬等. 不同品种蓝莓制汁特性评价[J/OL]. 食品工业科技: 1-15. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023080204>, 2023-12-24.
- [18] 韩腾, 陆波, 韩永斌等. 怀远县糯米加工甜酒酿适用性研究[J/OL]. 食品工业科技: 1-17. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023080297>, 2023-12-24.
- [19] 蒋增良, 毛建卫, 黄俊, 等. 葡萄酵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.
- [20] 庞怀宇, 袁勤生. 连苯三酚自氧化法测定 SOD 活性的改进[C]//中国药学会生化与生物技术药物专业委员会. 第六届全国 SOD 学术研讨会论文集. 2009: 1.
- [21] 刘冬梅, 李理, 杨晓泉, 等. 用牛津杯法测定益生菌的抑菌活力[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(3): 110-111.