DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.08.002

乳酸菌发酵葛根菌株筛选及协同发酵工艺优化研究

管咏梅[1,2],唐烨[1],李丽琴[1],董欢欢[3],潘华平[3],张华[3],朱卫丰[1,2],臧振中[1]
(1. 江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室,江西 南昌 330004;2. 经典名方现代中药创制全国重点实验室,江西 南昌 330004;3. 江西中医药大学药学院,江西 南昌 330004)

摘要:目的 筛选葛根发酵优势乳酸菌并优化菌株协同发酵工艺,为葛根功能产品开发提供理论依据。方法 通过监测6株乳酸菌发酵过程中菌活力、总酸、总黄酮含量及抗氧化活性等动态变化,结合层次分析法(analytic hierarchy process,AHP)-熵权法综合评价筛选优势乳酸菌,并基于优势菌协同发酵策略对菌株配比、接种量、料液比等关键工艺参数进行优化。结果 植物乳杆菌P9与鼠李糖乳酪杆菌为葛根发酵优势菌株,二者协同发酵最佳工艺条件为菌株配比3∶1、接种量10%、料液比1∶25、温度37 ℃、发酵3 d。在此条件下,协同发酵活菌数达8.96 lgCFU·mL^{-1},较植物乳杆菌P9和鼠李糖乳酪杆菌单菌发酵分别提升231.6%和31.83%;总酸含量达2.95 g·L^{-1},较鼠李糖乳酪杆菌单菌发酵提升91.6%;大豆苷元含量达1.32 mg·g^{-1},较植物乳杆菌P9和鼠李糖乳酪杆菌单菌发酵分别提升164%和238%。结论 乳酸菌协同发酵可整合单菌发酵优势并产生协同增效作用,显著提升发酵产物活性成分含量,为葛根发酵功能饮料及益生菌制剂开发提供了菌种选择依据和工艺优化策略。

关键词:葛根;乳酸菌;协同发酵;活菌数;总酸;大豆苷元;AHP-熵权法;响应面设计
中图分类号:R282.71 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2026)08-0006-08

Screening of Lactic Acid Bacteria Strains and Optimization of Synergistic Fermentation Process for *Pueraria lobata*

GUAN Yongmei[1,2],TANG Ye[1],LI Liqin[1],DONG Huanhuan[3],PAN Huaping[3],ZHANG Hua[3],ZHU Weifeng[1,2],ZANG Zhenzhong[1]
(1. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine,Ministry of Education,Jiangxi University of Chinese Medicine,Nanchang 330004,Jiangxi,China;
2. National Key Laboratory of Classic Formula Modern Chinese Medicine Creation,Nanchang 330004,Jiangxi,China;
3. School of Pharmacy,Jiangxi University of Chinese Medicine,Nanchang 330004,Jiangxi,China)

Abstract:*Objective* This study aimed to screen dominant lactic acid bacteria(LAB) for Gegen(*Pueraria lobata*) fermentation and optimize the synergistic fermentation processes to enhance the bioactive compound yields. *Methods* By monitoring the dynamic changes in bacterial activity,total acid,total flavonoids and antioxidant activity during the fermentation process of six strains of LAB,Analytic Hierarchy Process(AHP)-Entropy Weight Method was used to comprehensively evaluate and screen the dominant LAB and optimize the key process parameters such as strain ratio,inoculation amount and solid-liquid ratio based on the synergistic fermentation strategy of dominant bacteria. *Results Lactobacillus plantarum* P9 and *Lactobacillus rhamnosus* were the dominant strains for Gegen(*Pueraria lobata*) fermentation. The optimal process conditions for their synergistic fermentation were a strain ratio of 3∶1,inoculation volume of 10%,solid-liquid ratio of 1∶25,temperature of 37 ℃ and fermentation for 3 d. Under these conditions,the viable counts reached 8.96 lgCFU·mL^{-1}(231.6% higher than *Lactobacillus plantarum P*9 monoculture,31.83% higher than *Lactobacillus rhamnosus*),total acid content peaked at 2.95 g·L^{-1}(91.6% increase over *Lactobacillus rhamnosus* monoculture),and daidzein content achieved 1.32 mg·g^{-1}(164% and 238% enhancements compared to respective monocultures). *Conclusion* Microbial consortia integration synergistically amplified strain-specific advantages,significantly elevating bioactive metabolites and providing strain selection and process optimization strategy for the development of fermented functional beverages and probiotic preparations based on Gegen(*Pueraria lobata*).

Keywords:Gegen(*Pueraria lobata*);lactobacillus;complex fermentation;live bacterial count;total acid;daidzein;AHP-Entropy Weight Method;response surface design

葛根来源于豆科植物野葛 *Pueraria lobata*(Willd.)Ohwi 干燥根,具有解肌退热、生津止渴、升阳止泻等功效[1]。葛根作为药食两用中药,其不仅含有丰富的蛋白质、多糖等营养物质,还具有葛根素等异黄酮类药用成分,兼具传统食疗与现代营养科学特色,是大健康产业重点开发对象[2]。近年来,微生物发酵技术广泛应用于药食同源中药活性成分提升、功能产品开发

基金项目:江西省重点研发计划项目(20224BBG71023);江西省研究生创新专项(YC2023-S764)
作者简介:管咏梅(1979-),女,河南周口人,教授,博士研究生导师,博士,研究方向:中药新制剂与新技术及食疗学。
通讯作者:臧振中(1979-),男,河南周口人,副教授,硕士研究生导师,博士,研究方向:中药炮制、中药制剂新工艺和新装备。E-mail:zangzhenzhongvip@163.com。

等方面,逐渐成为中医药、食品科学等领域研究热点[3]。杜静等[4]利用冠突散囊菌发酵葛根,使葛根总黄酮含量显著提升,葛根素、大豆苷元含量均有不同程度提高。陈艳艳等[5]发现乳杆菌发酵葛根可提高其抗氧化活性,并能增强解酒效果。ZHAO W J等[6]发现葛根发酵物能提高酒精性肝损伤大鼠过氧化氢酶、超氧化物歧化酶水平,降低脂质积累和炎症反应发生,缓解酒精性肝损伤。以上研究表明葛根经微生物发酵后,具有有效成分含量提高和功效增强的潜力。

针对当前葛根发酵研究存在的单一菌株发酵模式主导、多菌协同发酵策略的工艺优化系统性探究不足等问题,本研究通过监测6株乳酸菌发酵过程中菌活力、总酸及异黄酮类物质动态变化,分析菌株发酵特性,筛选适配菌株;并采用Box-Behnken响应面法对菌株复配比例、接种量和料液比等关键参数进行优化,构建多菌株协同发酵工艺模型。以期为乳酸菌发酵葛根菌株选择提供参考,为葛根多菌协同发酵功能性产品开发提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 试剂与菌种

无水乙醇、冰醋酸等:西陇科学股份有限公司;福林酚、3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid,DNS)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical,DPPH)、过硫酸钾等:上海源叶生物科技有限公司;无水碳酸钠、七水合硫酸亚铁等:上海阿拉丁生化科技股份有限公司;2,2′-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)[2,2′-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid),ABTS]、醋酸钠、水杨酸等:上海易恩化学技术有限公司,以上试剂均为分析纯。MRS琼脂培养基:杭州百思生物技术有限公司;葛根素、没食子酸、葡萄糖、大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、芒柄花苷、大豆苷元标准品(纯度均>98%):成都普菲德生物技术有限公司;乙腈、甲醇:美国天地有限公司。

葛根饮片:江西鸿邦中药饮片有限公司。鼠李糖乳酪杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)HCS01-013、植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)HCS03-001、罗伊氏粘液乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)HCS02-001、副干酪乳酪杆菌(*Lactobacillus paracasei*)HCS17-040、发酵黏液乳杆菌(*Limosilactobacillus fermentum*)HCS08-005:江西仁仁健康菌种资源库;植物乳杆菌P9(*Lactiplantibacillus plantarum P9*):华润江中科研中心。

1.2 仪器与设备

UV-2550紫外可见分光光度计:日本岛津科技公司;BSA124S型分析天平:北京赛多利斯科学仪器有限公司;TECAN Spark型多功能酶标仪:帝肯实验器材有限公司;LPC-V-15B型超净工作台:山东新华医疗器械股份有限公司;SQ-ZL型立式蒸汽灭菌器:河南三强医疗器械有限责任公司;SHA-C水浴恒温振荡器:常州恩培仪器制造有限公司;DNP-9052BS-Ⅲ型电热恒温培养箱:上海新苗医疗器械制造有限公司;Sorvall LYNX 6000型高速冷冻离心机:赛默飞世尔科技有限公司;PHS-25型pH计:梅特勒托利多仪器有限公司;Agilent 1260型高效液相色谱仪:安捷伦科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 葛根发酵液样品制备 将葛根饮片粉碎,过3号筛待用。取葛根粉末适量,加入25倍量水,置于高压蒸汽灭菌器中灭菌,灭菌结束待葛根基质冷却后以10%(m/V)的接种量接种乳酸菌菌液于葛根基质中,后将其置于水浴恒温震荡器中37 ℃发酵。于相应发酵时间点取出,将葛根基质离心,取上清液即得葛根发酵液,待测。具体流程如图1所示。

1.3.2 菌活力及理化指标测定 乳酸菌活力测定:参考GB 4789.2-2022《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》[7];pH和总酸含量测定:分别参考GB 5009.237-2016《食品pH值的测定》[8]和GB 12456-2021《食品中总酸的测定》第二法[9];还原糖含量测定:参考文献[10],以葡萄糖为标准品,得到线性回归方程A=0.976 8C-0.066 4(R^2=0.999 1);总黄酮含量测定:参考文献[11],以葛根素为标准品,得到线性回归方程A=0.072 1C+0.017(R^2=0.999 2);总酚含量测定:参考文献[12],以没食子酸为标准品,得线性回归方程A=4.450 2C+0.026 5(R^2=0.999 6)。

1.3.3 抗氧化活性测定 参考文献[13]稍作修改。DPPH自由基清除率测定:吸取25 μL稀释样品与175 μL 0.10 mmol·L^{-1} DPPH-乙醇溶液室温下避光反应60 min,后在517 nm处测定吸光值,记为A_1,以无水乙醇代替DPPH-乙醇溶液,记为A_2,以无水乙醇代替样品,记为A_0,DPPH自由基清除率=[1-(A_1-A_2)/A_0]×100%。ABTS·$^+$自由基清除率测定:吸取25 μL稀释样品与175 μL ABTS·$^+$溶液室温下避光反应40 min,后在734 nm处测定吸光值,记为A_1,稀释后的ABTS$^+$溶液在734 nm处吸光值记为A_0,ABTS·$^+$自由基清除率=(A_0-A_1)/A_0×100%。铁离子还原能力测定:吸取20 μL稀释样品与200 μL FRAP试剂室温下避光反应30 min,后在593 nm处测定吸光值,铁离子还原能力以$FeSO_4$当量表示,单位为μmol $FeSO_4$·g^{-1}。羟基自由基清除率测定:吸取1 mL水杨酸溶液于10 mL试管中,分别加入1 mL $FeSO_4$溶液、1 mL稀释样品,1 mL H_2O_2溶液,在37 ℃水浴30 min后于510 nm处测定吸光度,记为A_1,以1 mL水代替1 mL样品,记为A_0,羟基自由基清除率=(A_0-A_1)/A_0×100%。

1.3.4 异黄酮含量测定 (1)供试品及对照品溶液制备:将葛根发酵液稀释一定倍数,0.22 μm微孔滤膜滤过,备用。精密称取大豆苷、大豆苷元、芒柄花苷、染料木苷、黄豆黄苷标准品适量,配制成单一对照品溶液,后分别吸取适量单一对照品溶液配制成混合对照品溶液。

(2)高效液相色谱(high performance liquid chromatography,HPLC)色谱条件:COSMOSIL 5 C_{18}-MS-Ⅱ色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);以乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相梯度洗脱:0~10 min,11%乙腈;10~15 min,11%~15%乙腈;25~35 min,15%~25%乙腈;35~40 min,20%~30%乙腈;40~55 min,30%~50%乙腈;55~60 min,50%~11%乙腈;体积流量1.0 mL·min^{-1};检测波长254 nm;柱温30 ℃;进样量10 μL。

(3)方法学考察:线性关系考察:精密称取大豆苷、黄豆黄

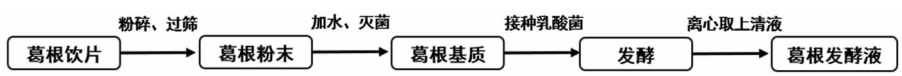


图1 葛根发酵流程

苷、染料木苷、芒柄花苷、大豆苷元标准品适量，配制成浓度分别为 0.10、0.04、0.03、0.03、0.02 mg·mL^{-1}混合标准品母液，精密移取上述母液稀释制得系列标准工作液，后按该项下色谱条件测定，以对照品浓度为横坐标 X，峰面积为纵坐标 Y 进行线性拟合，结果见表 1。

表 1 大豆苷等 5 种成分线性回归方程与线性范围

成分	回归方程	R^2	线性范围/(μg·mL^{-1})
大豆苷	$Y=31.903X+6.763\ 7$	0.999 7	0.79～50.00
黄豆黄苷	$Y=29.853X+2.456\ 8$	0.999 7	0.63～20.00
染料木苷	$Y=34.020X+1.581\ 9$	0.999 9	0.47～15.00
芒柄花苷	$Y=34.662X+0.922\ 9$	1.000 0	0.23～15.00
大豆苷元	$Y=37.493X+5.547\ 1$	0.999 0	0.31～10.00

精密度试验：将混合对照品溶液，按该项下色谱条件，连续进样 6 次，计算大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、芒柄花苷、大豆苷元峰面积 RSD 值分别为 0.35%、0.20%、0.45%、0.50%、0.43%，均小于 2%，表明仪器精密度良好。

重复性试验：取“1.3.1”项下同一葛根发酵液 6 份，制备成供试品溶液，按该项下色谱条件进样，计算大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、芒柄花苷、大豆苷元峰面积 RSD 分别为 0.35%、0.28%、0.26%、1.45%、0.21%，均小于 2%，表明该方法重复性良好。

稳定性试验：取同一供试品溶液，按该项下色谱条件分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样，计算大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、芒柄花苷、大豆苷元峰面积 RSD 分别为 0.76%、2.10%、0.75%、0.79%、2.02%，均小于 3%，表明样品在 24 h 内稳定。

加样回收率试验：取“1.3.1”项下同一葛根发酵液 6 份，加入混合对照品适量，制备成供试品溶液，按该项下色谱条件进样，计算大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、芒柄花苷、大豆苷元平均加样回收率分别为 108.66%、98.68%、107.43%、108.17%、110.46%；RSD 分别为 0.28%、1.22%、1.02%、2.86%、1.57%。

1.3.5 基于 AHP－熵权法筛选葛根发酵优势乳酸菌 （1）AHP 权重确定：AHP 是一种常用的主观赋权法，本实验以菌活力、总酸含量、大豆苷元含量作为评价指标，经过主观分析，确定各指标优先顺序为大豆苷元含量＞总酸含量＞活菌数，参考 AHP 中各层次评分标准构建两两比较优先判断矩阵，见表 2。依据 AHP 权重计算方法得出菌活力、总酸含量、大豆苷元含量权重系数分别为 0.11、0.31、0.58，对各个权重系数进行一致性检验，CI＝0.001 8≠0，CR＝0.003 5＜0.1，表明矩阵通过一致性检验，权重系数设置合理有效[14]。

表 2 3 项指标优先判断矩阵

指标	活菌数(j_1)	总酸(j_2)	大豆苷元(j_3)
活菌数(i_1)	1(α_{i1j1})	1/3(α_{i1j2})	1/5(α_{i1j3})
总酸(i_2)	3(α_{i2j1})	1(α_{i2j2})	1/2(α_{i1j3})
大豆苷元(i_3)	5(α_{i3j1})	2(α_{i3j2})	1(α_{i3j3})

（2）熵权法权重确定：以活菌数、总酸含量、大豆苷元含量为指标，将其进行正向化处理得到正向化值 X，后进行数据归一化，计算信息熵值 e，最后计算各指标权重系数 ω。①正向化值(X)＝$(X_{ij}-X_{jMin})/(X_{jMax}-X_{jMin})$；②第 j 项指标第 i 个样本归一化值 $(P_{ij})=\frac{x_{ij}}{\sum_{i=1}^{n}x_{ij}}$；③信息熵值 $(e_j)=k\times\sum_{i=1}^{n}[P_{ij}\times\ln(P_{ij})]$，其中 $k=1/\ln(n)$；④各指标权重系数 $\omega_j=\frac{d_j}{\sum_{j=1}^{m}d_j}$，$d_j=1-e_j$。

（3）AHP－熵权法组合权重确定及综合评分：AHP－熵权法是一种常见的主客观相结合的评价方法，该决策方式有助于提高结果可靠性和科学性[15]。利用矩阵思想计算组合权重，计算主、客观权重要系数 α_i 和 β_i，$\alpha_i=v_i/(v_i+w_i)$，$\beta_i=w_i/(v_i+w_i)$，其中 v_i 为 AHP 权重系数，w_i 为熵权法权重系数。组合权重 $Q_i=\frac{v_1\alpha_1+w_1\beta_1}{\sum_{i=1}^{n}(v_1\alpha_1+w_1\beta_1)}$，$n$ 为指标个数。综合评分(Z)＝$Q_{活菌数}\times$(活菌数/活菌数最大值)$\times100+Q_{总酸}\times$(总酸含量/总酸含量最大值)$\times100+Q_{大豆苷元}\times$(大豆苷元含量/大豆苷元含量最大值)$\times100$。

1.3.6 基于 Box－Behnken 响应曲面设计优化葛根发酵工艺 （1）单因素试验：以活菌数、总酸含量、大豆苷元含量作为评价指标按“1.3.5”项进行综合评分，固定发酵温度 37 ℃、发酵时间 3 d，考察不同复配比例植物乳杆菌 P9∶鼠李糖乳酪杆菌(1∶0、8∶1、6∶1、4∶1、2∶1、1∶1、1∶2、1∶4、0∶1)、接种量(6%、8%、10%、12%、14%)、料液比(1∶15、1∶20、1∶25、1∶30、1∶35)对其影响。

（2）基于响应面实验设计优化葛根发酵工艺：根据前期单因素试验和单菌发酵结果，选择植物乳杆菌 P9 复配鼠李糖乳酪杆菌比例(X_1)、接种量(X_2)、料液比(X_3)作为考察因素，利用 DesignExpert 13.0 软件，设计 3 因素 3 水平表，见表 3，并以活菌数(Y_1)、总酸含量(Y_2)、大豆苷元含量(Y_3)3 项指标根据 AHP－熵权法得到的综合评分(OD)作为响应值，进行 Box－Behnken 响应曲面设计。

表 3 响应面设计因素、水平表

因素	水平		
	－1	0	1
复配比例	6∶1	4∶1	2∶1
接种量/(%)	8	10	12
料液比/(g∶mL)	1∶20	1∶25	1∶30

1.3.7 数据处理与统计分析 利用 SPSS 26.0 分析数据，Origin 2021 软件作图。Design－Expert. 13.0 进行响应曲面设计及绘图。每组实验平行 3 次，结果以平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。

2 结果与分析

2.1 菌活力及理化指标动态变化

通过系统监测 6 株乳酸菌在葛根基质中的生长代谢过程(插页Ⅲ图 2)，可有效了解不同菌株发酵特性。结果表明，所有菌株均能较好适应葛根基质环境(插页Ⅲ图 2A)，菌活力变化显示，多数菌株于发酵第 1 天达到稳定期，仅发酵乳杆菌延至第 2 天，其中鼠李糖乳酪杆菌表现出最优生长特性，植物乳杆菌相对不足。pH 与总酸动态监测结果显示(插页Ⅲ图 2B、插页Ⅲ图 2C)，各菌株发酵液 pH 随发酵时间呈梯度下降，总酸含量持续累积并于第 3 天达到稳态，产酸效率呈现显著菌株特异性，其中鼠李糖乳酪杆菌产酸能力最低(1.85 g·L^{-1})，其余菌株产酸量均高于 3.0 g·L^{-1}。还原糖消耗规律显示(插页Ⅲ图 2D)，5 株菌株发酵第 1 天，葛根中还原糖均因乳酸菌生长消耗而含量下降，而罗伊氏乳杆菌由于其产生纤维素酶、淀粉酶等将葛根基质中淀粉、多糖等转化为葡萄糖，而其自身处于生长初期，消耗还原糖较少，导致总体还原糖含量增加[16]，随后也进入消耗阶段，该特性表明乳酸菌碳源代谢具有多

样性。

通过动态监测 6 株乳酸菌发酵过程总黄酮、总酚含量变化(插页Ⅲ图 2E、插页Ⅲ图 2F),发现总黄酮与总酚呈现阶段特异性代谢规律。发酵初期(0 ~ 1 d),菌株通过分泌纤维素酶和果胶酶解构葛根细胞壁,促进黄酮类物质释放,使总黄酮含量显著提升,其中鼠李糖乳酪杆菌提升 17.89%,幅度最大;总酚含量呈现菌株特异性,植物乳杆菌 P9 与鼠李糖乳酪杆菌分别提升 5.11% 和 4.97%,而副干酪乳杆菌降低 4.47%。发酵中期(1 ~ 2 d),β - 葡萄糖苷酶介导的结合态苷类分解导致总黄酮与总酚含量同步下降。发酵后期(4 ~ 5 d),总黄酮因游离苷元积累出现二次上升,但仍然低于未发酵组;总酚则在多酚氧化酶催化下发生酚酸转化,导致含量降低。此代谢规律与 ANX 等[17]、ZHOU Y 等[18]报道的酶促分子重排机制密切相关[19-20]。

综上,6 株乳酸菌发酵葛根过程中,总黄酮与总酚的复杂代谢动态受多酶系时序调控影响,难以作为稳定质控指标;而菌活力与总酸含量呈规律变化,可作为发酵进程的可靠评价参数,为后续菌株筛选提供量化依据。

2.2 抗氧化活性动态变化

通过系统评估 6 株乳酸菌发酵过程中抗氧化活性动态变化(插页Ⅲ图 3),发现不同菌株对不同自由基清除体系呈现差异化规律。随发酵时间延长,ABTS·$^+$自由基和羟基自由基清除能力均呈现下降趋势,其中鼠李糖乳酪杆菌 ABTS·$^+$自由基清除能力在发酵第 2 ~ 3 天下降幅度最大,下降约 5%,其余菌株在第 1 ~ 2 天幅度较大,约 10%;羟基自由基清除能力均在发酵第 0 ~ 1 天骤降至 20% 左右,后均趋于稳定。各菌株 DPPH 自由基清除能力和铁离子还原能力呈现不规则波动;但铁离子还原能力整体上呈现下降趋势。综上,葛根经 6 株乳酸菌发酵后抗氧化能力普遍下降,此现象与张曼等[21]报道的多菌种发酵石榴皮会使其 DPPH 和 ABTS 自由基清除能力下降、张阳阳等[22]红茶菌发酵体系自由基清除率降低规律具有一致性。这可能是葛根内源抗氧化成分(如黄酮苷、酚酸等)在发酵过程中发生微生物介导的酶解转化,导致其自由基清除能力降低[23]。

2.3 异黄酮成分含量动态变化

通过 HPLC 定量分析揭示乳酸菌发酵过程中葛根异黄酮苷类成分的酶促转化规律(插页Ⅳ图 4)。结果显示,大豆苷、黄豆黄苷等苷类成分含量随发酵时间呈负相关趋势,可能是发酵过程中乳酸菌代谢产生 β - 葡萄糖苷酶以及特定水解酶等将苷类进行分解导致含量下降[24]。菌株特异性分析发现,鼠李糖乳酪杆菌、植物乳杆菌 P9 对大豆苷等结合态苷类成分转化能力较强,同时生成大豆苷元含量较高,而植物乳杆菌相对较弱。在发酵 4 ~ 5 d,鼠李糖乳酪杆菌将葛根中大豆苷含量从 7.30 mg·g^{-1}转化至 0.32 mg·g^{-1},黄豆黄苷含量从 0.82 mg·g^{-1}转化至 0.32 mg·g^{-1},其余苷类成分在第 5 天也基本转化完全;而植物乳杆菌在发酵过程转化能力明显不足,葛根发酵液中苷及苷元含量无显著变化。LIU L H 等[25]从 11 株乳酸菌中筛选出鼠李糖乳杆菌 L08,其发酵苹果渣时表现出较高的 β - 葡萄糖苷酶活性,对槲皮苷、根皮苷等结合态苷类物质具有较强转化能力,间接验证了该菌株在葛根发酵中对大豆苷等结合态苷转化的潜在优势。

2.4 基于 AHP - 熵权法筛选优势乳酸菌

基于菌株生长动力学、总酸积累及异黄酮转化效率的动态关联分析,采用 AHP - 熵权法综合评价模型,以发酵 3 d 为关键节点,对 6 株乳酸菌的菌活力、总酸产量及大豆苷元转化量进行多指标分析。结果见表 4,植物乳杆菌 P9(95.20 ± 3.86)分与鼠李糖乳酪杆菌(68.99 ± 4.31)分综合评分显著优于其他菌株($P < 0.05$),其中植物乳杆菌 P9 展现出高 β - 葡萄糖苷酶活性及产酸效率,而鼠李糖乳酪杆菌具备更优的生长活力。基于此,采用协同发酵增效策略,通过两菌株复配提升苷元转化率,缩短发酵周期,为后续菌株复配发酵工艺优化提供依据。

表 4 发酵第 3 天 6 株乳酸菌发酵各指标情况及综合评分($n = 3$)

菌株	活菌数/(lgCFU·mL^{-1})	总酸含量/(g·L^{-1})	大豆苷元含量/(mg·g^{-1})	综合评分/(分)
鼠李糖乳酪杆菌	8.84 ± 0.05^a	1.54 ± 0.02^e	0.39 ± 0.04^b	68.99 ± 4.31^b
植物乳杆菌 P9	8.44 ± 0.07^c	3.32 ± 0.03^b	0.50 ± 0.04^a	95.20 ± 3.86^a
植物乳杆菌	8.24 ± 0.14^d	3.36 ± 0.01^a	0.10 ± 0.01^e	49.23 ± 1.09^e
罗伊氏黏液乳杆菌	8.72 ± 0.04^{ab}	3.29 ± 0.02^b	0.14 ± 0.02^e	54.38 ± 2.02^e
副干酪乳酪杆菌	8.44 ± 0.03^c	2.84 ± 0.01^d	0.13 ± 0.03^e	49.22 ± 4.29^e
发酵黏液乳杆菌	8.67 ± 0.05^b	3.09 ± 0.02^c	0.14 ± 0.04^e	52.46 ± 5.40^e

注:按列进行多重比较,标有不同小写字母表示组间差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 基于优势菌协同发酵策略优化葛根发酵工艺

2.5.1 植物乳杆菌 P9 复配鼠李糖乳酪杆菌不同比例考察

如表 5 所示,所有复配组的菌活力均显著高于植物乳杆菌 P9 单菌体系($P < 0.05$),其中 1∶1 配比组活菌数达(8.99 ± 0.08)lgCFU·mL^{-1},较两单菌体系分别提升 41.25%(vs 鼠李糖乳酪杆菌)和 209.03%(vs 植物乳杆菌 P9)。产酸特性显示,复配组总酸含量介于 2.36 g·L^{-1}和 2.98 g·L^{-1}之间,较鼠李糖乳酪杆菌单菌发酵(1.62 g·L^{-1})具有显著提升($P < 0.05$),但仍低于植物乳杆菌 P9 单菌发酵(3.38 g·L^{-1}),提示菌种复配过程中产酸能力仍然由植物乳杆菌 P9 主导。苷类转化效率呈现比例效应,当鼠李糖乳酪杆菌占比≥50% 时,大豆苷元含量与鼠李糖乳酪杆菌单菌发酵差异无统计学意义($p > 0.05$);当植物乳杆菌 P9 占比 > 50% 时,除复配比例 8∶1 无显著提高,其余比例均显著高于植物乳杆菌 P9 单菌发酵($P < 0.05$),当复配比例为 4∶1 时,显著高于其他复配比例($P < 0.05$),且较植物乳杆菌 P9 单菌发酵提升 140%,同时综合评分最佳。基于 AHP - 熵权模型综合评价,4∶1 配比组综合得分(95.41 ± 1.31)分显著优于其他配比($P < 0.05$),该结果验证了菌株协同发酵的可行性,故选定 4∶1 配比进行后续工艺研究。

表 5 植物乳杆菌 P9 复配鼠李糖乳酪杆菌不同比例各指标情况及综合评分($n = 3$)

植物乳杆菌 P9∶鼠李糖乳酪杆菌	活菌数/(lgCFU·mL^{-1})	总酸含量/(g·L^{-1})	大豆苷元含量/(mg·g^{-1})	综合评分/(分)
1∶0	8.50 ± 0.02^e	3.38 ± 0.03^a	0.50 ± 0.04^{de}	63.32 ± 1.69^d
8∶1	8.73 ± 0.04^c	2.98 ± 0.05^b	0.54 ± 0.04^d	62.87 ± 2.44^d
6∶1	8.84 ± 0.07^b	2.85 ± 0.09^c	0.70 ± 0.06^c	69.68 ± 3.08^c
4∶1	8.88 ± 0.04^b	2.92 ± 0.05^{bc}	1.20 ± 0.02^a	95.41 ± 1.31^a
2∶1	8.62 ± 0.02^d	2.56 ± 0.02^e	1.02 ± 0.11^b	83.18 ± 5.54^b
1∶1	8.99 ± 0.08^a	2.59 ± 0.03^e	0.49 ± 0.07^{de}	57.51 ± 3.52^e
1∶2	8.89 ± 0.06^b	2.76 ± 0.06^d	0.44 ± 0.05^{de}	56.23 ± 2.38^e
1∶4	8.84 ± 0.04^b	2.36 ± 0.04^f	0.46 ± 0.04^{de}	54.37 ± 1.50^e
0∶1	8.84 ± 0.05^b	1.62 ± 0.00^g	0.43 ± 0.05^e	47.60 ± 2.19^f

注:按列进行多重比较,标有不同小写字母表示组间差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5.2 葛根发酵工艺接种量考察

如表 6 所示,随接种量的增加,菌活力、总酸含量、大豆苷元含量呈现先升后降的趋势。当接种量为 8% 时,菌活力和总酸含量达到峰值;当接种量为

10%时,大豆苷元含量达到峰值。适度提高接种量可促进 β-葡萄糖苷酶基因表达,从而提升底物转化效率;而接种量超载(>10%)可能会导致碳源竞争加剧,代谢副产物浓度超过菌株耐受阈值,从而抑制菌体增殖及酶活性。这与杨金梅等[11]在葛根发酵体系中的密度效应研究一致。综合评价,选择 10%接种量进行后续研究。

表 6 不同接种量下各指标情况及综合评分($n=3$)

接种量	活菌数/(lgCFU·mL^{-1})	总酸含量/(g·L^{-1})	大豆苷元含量/(mg·g^{-1})	综合评分/(分)
6%	8.93±0.06^{a}	2.90±0.05^{b}	0.37±0.07^{e}	63.51±2.67^{d}
8%	8.97±0.04^{a}	3.09±0.07^{a}	0.78±0.06^{b}	79.76±2.43^{b}
10%	8.86±0.08^{ab}	2.92±0.05^{b}	1.34±0.00^{a}	97.26±0.63^{a}
12%	8.80±0.04^{b}	2.87±0.04^{b}	0.62±0.07^{c}	71.67±2.54^{c}
14%	8.76±0.05^{b}	2.85±0.06^{b}	0.48±0.06^{d}	66.70±1.97^{d}

注:按列进行多重比较,标有不同小写字母表示组间差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.5.3 葛根发酵工艺料液比考察 研究发现,随着料液比的增加,葛根发酵液中总酸含量逐步下降,可能是加水量的增加导致葛根基质占比减少,发酵液总酸浓度下降,无法体现不同料液比下乳酸菌的产酸能力,故将其换算成单位葛根基质的产酸量进行比较。如表 7 所示,随着料液比的增加,菌活力无趋势变化;产酸能力、大豆苷元含量、综合评分呈现先增后减的趋势,当料液比为 1∶25 时综合评分最佳,该比例下既保障了菌体的高密度增殖,又避免了高黏度体系对 β-葡萄糖苷酶扩散的抑制,故选择 1∶25 为最佳料液比条件。

表 7 不同料液比下各指标情况及综合评分($n=3$)

接种量	活菌数/(lgCFU·mL^{-1})	总酸含量/(mg·g^{-1})	大豆苷元含量/(mg·g^{-1})	综合评分/(分)
1∶15	8.99±0.03^{a}	61.65±0.68^{e}	0.69±0.00^{c}	69.65±0.35^{d}
1∶20	8.96±0.05^{ab}	68.52±0.75^{d}	0.93±0.11^{b}	81.16±4.50^{c}
1∶25	8.86±0.08^{b}	73.05±1.37^{b}	1.34±0.00^{a}	97.98±0.63^{a}
1∶30	8.93±0.05^{ab}	76.14±1.08^{a}	0.98±0.00^{b}	86.05±0.30^{b}
1∶35	8.53±0.05^{c}	70.77±1.59^{c}	0.57±0.04^{d}	67.90±1.70^{d}

注:按列进行多重比较,标有不同小写字母表示组间差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.5.4 基于响应面实验设计优化葛根发酵工艺 基于单因素实验结果发现,复配比例、接种量及料液比对发酵体系的菌活力、产酸特性及大豆苷元转化率均呈现显著调控作用。故采用 3 因素 3 水平 Box-Behnken 设计,以菌种配比(X_1)、接种量(X_2)和料液比(X_3)为自变量,基于 AHP-熵权法综合评分(Y)为响应值,构建 17 组实验矩阵(表 8),其相应指标及综合评分结果见表 8。通过 Design Expert 13.0 进行响应面分析,获得二次多项式回归模型:$Y = 94.07 + 2.54X_1 - 2.53X_2 + 3.17X_3 + 1.10X_1X_2 + 0.98X_1X_3 + 3.42X_2X_3 - 13.48X_1^2 - 8.08X_2^2 - 7.31X_3^2$($R^2=0.955\,9$,$Adjusted R^2=0.899\,2$)方差分析结果如表 9,回归模型显著性 P 值为 0.000 6<0.001,回归模型极具显著性;失拟项显著性 P 值为 0.582 1>0.05,失拟项不显著,表明该回归方程在整个回归区域内的拟合情况良好。各因素对葛根发酵液综合评分影响程度为接种量(X_2)>料液比(X_3)>复配比例(X_1)。

利用 Design-Expert 13.0 软件作出各因素交互作用的三维响应面和等高线,结果如插页Ⅳ图 5 所示。接种量(X_2)与料液比(X_3)的曲面较陡,交互作用较强;复配比例(X_1)与料液比(X_3)的曲面较缓,交互作用较弱。在回归模型的基础上对发酵条件进行优化,预测得出葛根发酵的最佳工艺参数为植物乳杆菌 P9∶鼠李糖乳酪杆菌 2.7∶1、接种量 9.51%、料液比 1∶25.98(g∶mL),综合评分为 90.94。结合实际操作将参数调整为:植物乳杆菌 P9∶鼠李糖乳酪杆菌 3∶1、接种量 10%、料液比 1∶25(g∶mL)。

表 8 响应面试验设计及结果

试验序号	复配比例(X_1)	接种量(X_2)	料液比(X_3)	活菌数/(lgCFU·mL^{-1})	总酸含量/(mg·g^{-1})	大豆苷元含量/(mg·g^{-1})	综合评分/(分)
1	1	1	0	8.80	74.70	0.78	71.76
2	0	0	0	8.85	77.40	1.52	99.13
3	0	-1	-1	8.85	70.68	1.23	86.48
4	0	1	-1	8.91	68.16	0.67	65.95
5	0	-1	1	8.98	79.02	1.09	84.56
6	-1	-1	0	8.99	79.05	0.83	75.44
7	0	0	0	8.88	74.85	1.39	93.62
8	1	0	-1	8.82	66.60	0.86	71.74
9	0	0	0	8.88	77.55	1.26	89.79
10	-1	0	-1	8.86	69.96	0.69	67.07
11	1	-1	0	8.96	72.75	0.93	76.78
12	0	0	0	8.89	72.75	1.36	91.73
13	0	0	0	8.85	72.60	1.49	96.06
14	1	0	1	8.70	75.60	1.05	81.44
15	-1	1	0	8.75	74.40	0.62	66.02
16	0	1	1	8.87	77.58	0.91	77.72
17	-1	0	1	8.92	77.04	0.78	72.85

表 9 回归模型方差分析

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1 804.22	9	200.47	16.87	0.000 6
X_1-复配比例	51.71	1	51.71	4.35	0.075 4
X_2-接种量	218.51	1	218.51	18.39	0.003 6
X_3-料液比	80.20	1	80.20	6.75	0.035 5
X_1X_2	4.84	1	4.84	0.41	0.543 7
X_1X_3	3.84	1	3.84	0.32	0.587 4
X_2X_3	46.85	1	46.85	3.94	0.087 5
X_1^2 ♂	765.58	1	765.58	64.42	<0.000 1
X_2^2 ♂	275.01	1	275.01	23.14	0.001 9
X_3^2 ♂	224.79	1	224.79	18.91	0.003 4
残差	83.19	7	11.88		
失拟项	29.63	3	9.88	0.74	0.582 1
纯误差	53.56	4	13.39		
总误差	1 887.42	16			

根据预测最佳发酵工艺后所调整的发酵条件,平行制备 3 份葛根发酵液,对发酵液各指标进行测定,并进行综合评分,验证结果如表 10,在此发酵条件下,菌活力平均值为 8.96 lg CFU·mL^{-1},RSD 为 0.39%;总酸含量平均值为 73.65 mg·g^{-1}(2.95 g·L^{-1}),RSD 为 0.93%;大豆苷元含量平均值为 1.32 mg·g^{-1},RSD 为 3.42%;综合评分平均值为 90.78,RSD 为 1.81%,与预测值相对偏差 0.18%。表明本实验根据 AHP-熵权法优选出的葛根发酵最佳工艺具有可行性和准确性。

表 10 工艺验证结果

工艺验证	活菌数/(lgCFU·mL^{-1})	总酸含量/(mg·g^{-1})	大豆苷元含量/(mg·g^{-1})	综合评分/(分)
样品 1	8.93	74.25	1.28	89.70
样品 2	9.00	73.80	1.37	92.67
样品 3	8.96	72.90	1.30	89.97
均值	8.96	73.65	1.32	90.78
RSD	0.39%	0.93%	3.42%	1.81%

3 讨论与结论

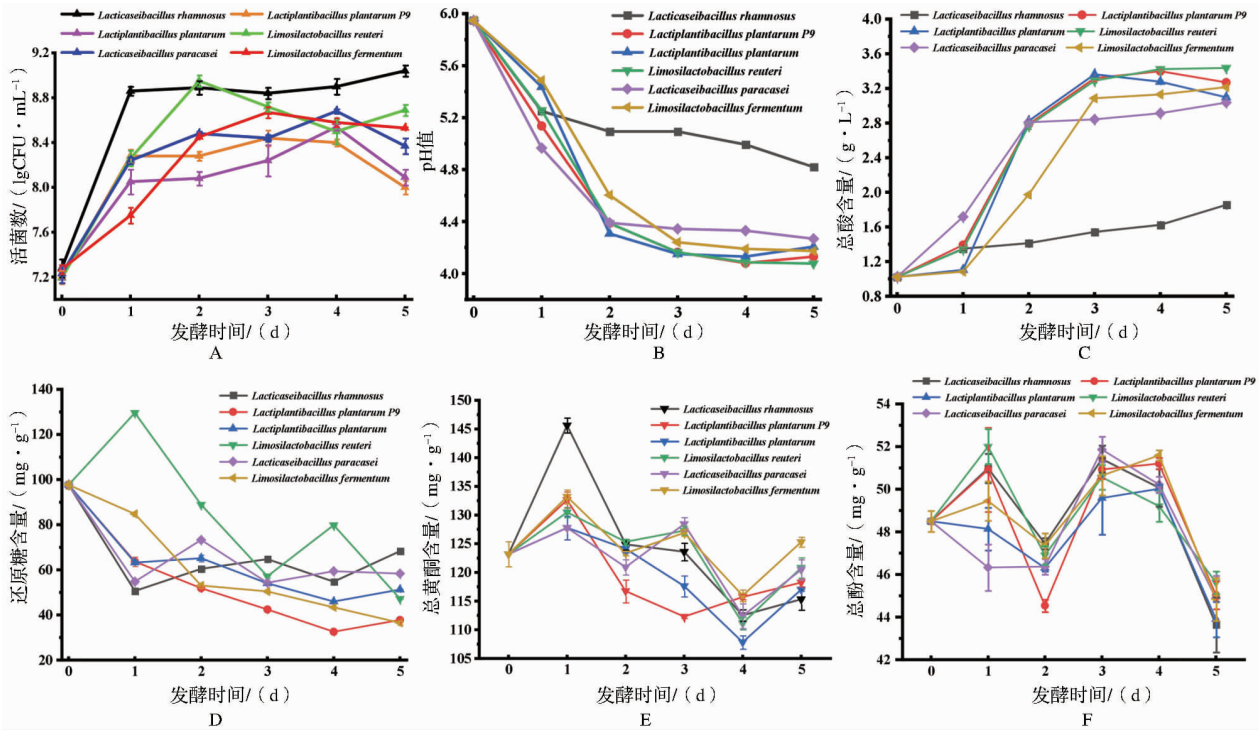
葛根作为传统药食同源中药,富含异黄酮类活性成分,其多以结合态糖苷形式存在,需在肠道中转化成游离型苷元才能被机体消化吸收,致使其生物利用度受限[3]。利用微生物发酵技术,可使发酵基质中结合态苷类成分经特定代谢酶转化成游离苷元而提高机体吸收效率[26],如李洁等[27]利用植物乳杆菌发酵全豆乳,发酵后豆乳中大豆苷元含量提升为原豆乳的 3.1 倍,染料木素含量提升为原豆乳的 7.7 倍,经发酵后豆乳营养保健价值得到了显著提升。此外乳酸菌发酵过程中,有机酸类物质积累,不仅能够赋予葛根独特风味和营养,一定程度上还能抑制有害微生物生长,有助于提高发酵食品安全性[28]。本研究通过分析 6 株乳酸菌动态代谢特征,筛选出植物乳杆菌 P9 具有高 β-葡萄糖苷酶活性及产酸效率,鼠李糖乳酪杆菌具备更优的生长活力,为葛根发酵过程优势菌株。将两者复配发酵构建功能互补菌群,经响应面优化后确定最佳工艺:植物乳杆菌 P9 与鼠李糖乳酪杆菌菌株配比 3∶1、接种量 10%、料液比 1∶25、温度 37 ℃、发酵时间 3 d,在此条件下,活菌数达 8.96 lgCFU·mL^{-1},较单菌发酵分别提升 231.6% 和 31.83%;总酸含量达 2.95 g·L^{-1},较鼠李糖乳酪杆菌单菌发酵提升 91.6%;大豆苷元含量达 1.32 mg·g^{-1},较单菌发酵分别提升 164% 和 238%,实现了菌株协同发酵增效,提示葛根经乳酸菌协同发酵后,相比于乳酸菌单菌发酵和未发酵具有风味改良与营养强化的双重价值,这可为葛根功能成分生物增效提供新路径,为药食两用植物多菌协同发酵提供理论依据。未来还需进一步明确菌群互做对葛根活性成分的转化机制、代谢副产物对苷元稳定性的影响规律以及菌种比例动态调控策略。本研究基于菌株协同发酵策略优化工艺参数,为开发高活性葛根益生菌制剂、功能性发酵饮料等产品奠定了技术基础,对扩大药食同源资源的利用具有重要实践意义。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2020.
[2] 朱卫丰, 李佳莉, 孟晓伟, 等. 葛属植物的化学成分及药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(6): 1311-1331.
[3] 董凡, 李浩然, 王少平, 等. 中药发酵的现代研究进展与展望[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(2): 628-633.
[4] 杜静, 王琪琪, 王云胜, 等. 冠突散囊菌发酵对葛根的活性物质和抗氧化活性的影响[J]. 食品工业科技, 2021, 42(1): 121-125, 131.
[5] 陈艳艳, 于波, 潘黛安, 等. 乳杆菌发酵葛根水提液工艺研究及其解酒功效探讨[J]. 中国酿造, 2020, 39(8): 182-186.
[6] ZHAO W J, PENG D, LI W J, et al. Probiotic-fermented *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi alleviates alcoholic liver injury by enhancing antioxidant defense and modulating gut microbiota[J]. J Sci Food Agric, 2022, 102(15): 6877-6888.
[7] 国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准:食品微生物学检验 菌落总数测定: GB 4789.2—2022[S]. 北京: 中国标准出版社, 2022.
[8] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 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.
[9] 中华人民共和国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.
[10] YANG M, JIANG Z D, WEN M C, et al. Chemical variation of Chenpi (citrus peels) and corresponding correlated bioactive compounds by LC-MS metabolomics and multibioassay analysis[J]. Front Nutr, 2022, 9: 825381.
[11] 杨金梅, 李冠文, 王辉敏, 等. 微生物发酵技术对粉葛化学成分的影响[J]. 食品工业科技, 2022, 43(23): 153-160.
[12] RASHEED H, DENG B W, AHMAD D, et al. Genetic diversity and genome-wide association study of total phenolics, flavonoids, and antioxidant properties in potatoes (solanum tuberosum L.)[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(23): 12795.
[13] 王悦, 田风华. 不同乳酸菌发酵对黑果腺肋花楸汁品质和抗氧化活性的影响[J]. 中国酿造, 2025, 44(4): 241-247.
[14] 王昱, 郭盛, 刘海峰, 等. Box-Behnken 响应面法优化复合益生菌发酵三七药渣工艺及体外抗氧化活性研究[J]. 南京中医药大学学报, 2024, 40(6): 555-568.
[15] 杨婷, 黄莹莹, 方杨冰, 等. 基于 AHP-熵权法结合正交试验设计优选岭南特色饮片制枳壳的发酵工艺及发酵前后成分对比研究[J]. 中草药, 2022, 53(20): 6443-6450.
[16] 邹开翔, 刘乐, 李新瑞, 等. 静息态罗伊氏乳杆菌代谢功能低聚糖及对食源致病菌的拮抗作用[J]. 食品科学, 2023, 44(24): 97-104.
[17] AN X, LI T T, HU J X, et al. Evaluation of physicochemical characteristics, bioactivity, flavor profile and key metabolites in the fermentation of goji juice by Lacticaseibacillus rhamnosus[J]. Food Chem X, 2024, 23: 101755.
[18] ZHOU Y, WANG R M, ZHANG Y F, et al. Biotransformation of phenolics and metabolites and the change in antioxidant activity in kiwifruit induced by *Lactobacillus plantarum* fermentation[J]. J Sci Food Agric, 2020, 100(8): 3283-3290.
[19] 奚佳玉, 苏圆锦, 董树清, 等. 微生物发酵转化黄酮类化合物研究进展[J]. 食品科学, 2024, 45(17): 326-334.
[20] ZHU Z H, WANG Y W, LIN D F, et al. Changes in polyphenols composition and antioxidative properties of hemp (Cannabis sativa L.) inflorescences pretreated by Ganoderma lucidum[J]. Ind Crops Prod, 2023, 195: 116422.
[21] 张曼, 周梦含, 司欣雨, 等. 不同微生物液态发酵石榴皮的品质研究[J]. 中国酿造, 2025, 44(4): 228-234.
[22] 张阳阳, 刘晓媛, 余鸿飞, 等. 红茶菌液猕猴桃果酒发酵动力学模型的建立及抗氧化活性分析[J]. 中国酿造, 2025, 44(3): 223-228.
[23] WANG M Z, OUYANG X Y, LIU Y R, et al. Comparison of nutrients and microbial density in goji berry juice during lactic acid fermentation using four lactic acid bacteria strains[J]. J Food Process Preserv, 2021, 45(1): 15059-15097.
[24] 韩婷, 程钢, 刘莹, 等. β-葡萄糖苷酶以及益生菌生物转化大豆异黄酮糖苷的研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(9): 333-337.
[25] LIU L H, ZHANG C Y, ZHANG H M, et al. Biotransformation of polyphenols in apple pomace fermented by β-glucosidase-producing lactobacillus rhamnosus L08[J]. Foods, 2021, 10(6): 1343.
[26] TELANG A M, JOSHI V S, SUTAR N, et al. Enhancement of biological properties of soymilk by fermentation[J]. Food Biotechnol, 2010, 24(4): 375-387.
[27] 李洁, 鲁皓, 刘柳, 等. 益生菌发酵豆乳对提高结合态大豆异黄酮转化的效果[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(9): 91-96.
[28] BERGENTALL M K, MALAFRONTE L, AS D, et al. Reduction of malic acid in bilberry juice by Lactiplantibacillus plantarum-mediated malolactic fermentation[J]. Eur Food Res Technol, 2024, 250(3): 811-820.

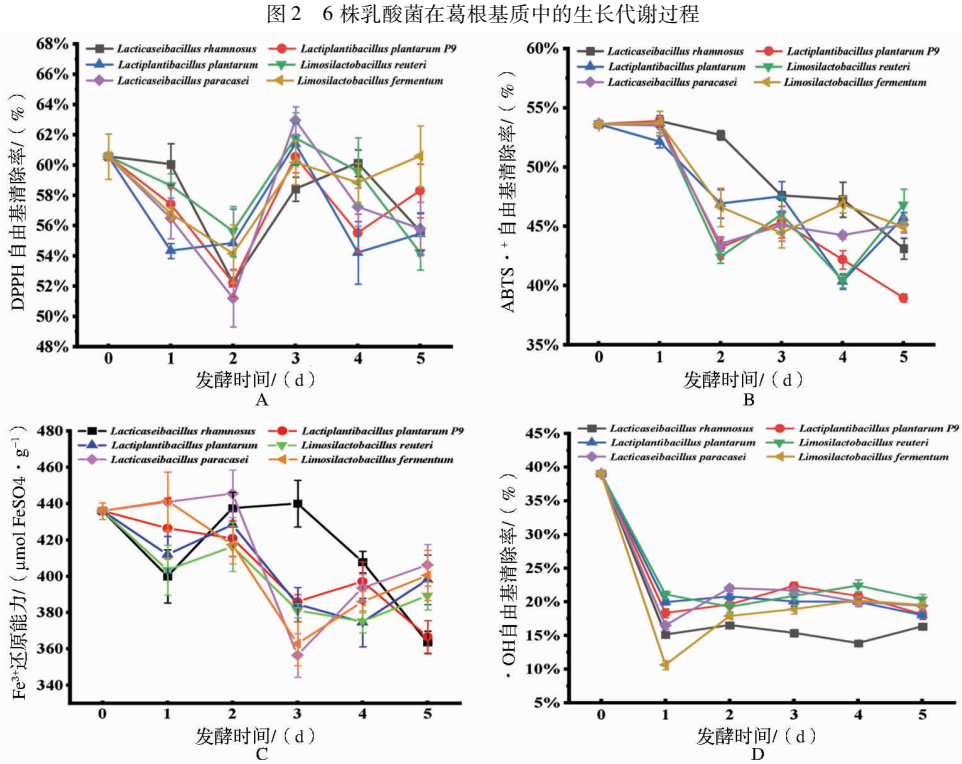
乳酸菌发酵葛根菌株筛选及协同发酵工艺优化研究

（正文见 6－11 页）



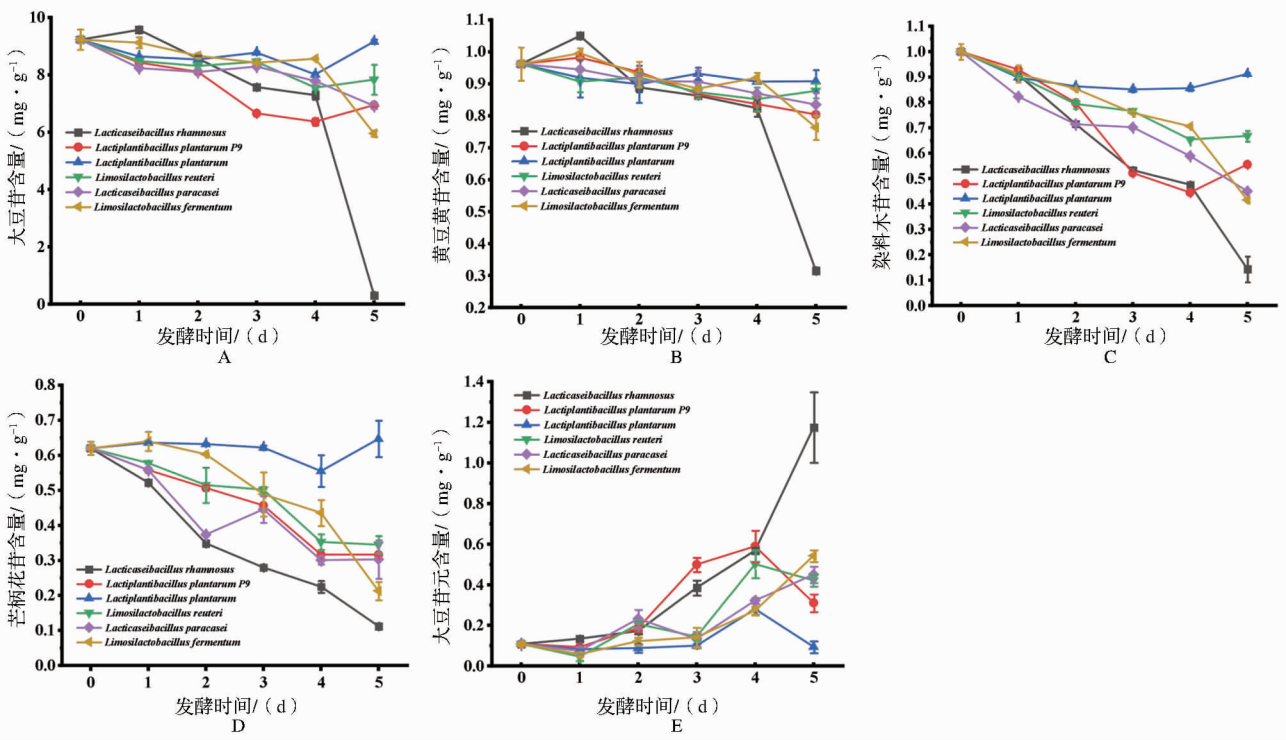
注：A. 活菌数变化，B. pH 值变化，C. 总酸含量变化，D. 还原糖含量变化，E. 总黄酮含量变化，F. 总酚含量变化。

图 2　6 株乳酸菌在葛根基质中的生长代谢过程



注：A. DPPH 自由基清除能力变化，B. ABTS・⁺自由基清除能力变化，C. FRAP 抗氧化能力变化，D. ・OH 自由基清除能力变化。

图 3　6 株乳酸菌葛根发酵液在不同发酵时间抗氧化活性动态变化



注：A. 大豆苷含量变化，B. 黄豆黄苷含量变化，C. 染料木苷含量变化，D. 芒柄花苷含量变化，E. 大豆苷元含量变化。

图 4 6 株乳酸菌葛根发酵液在不同发酵时间葛根异黄酮苷类成分的酶促转化规律

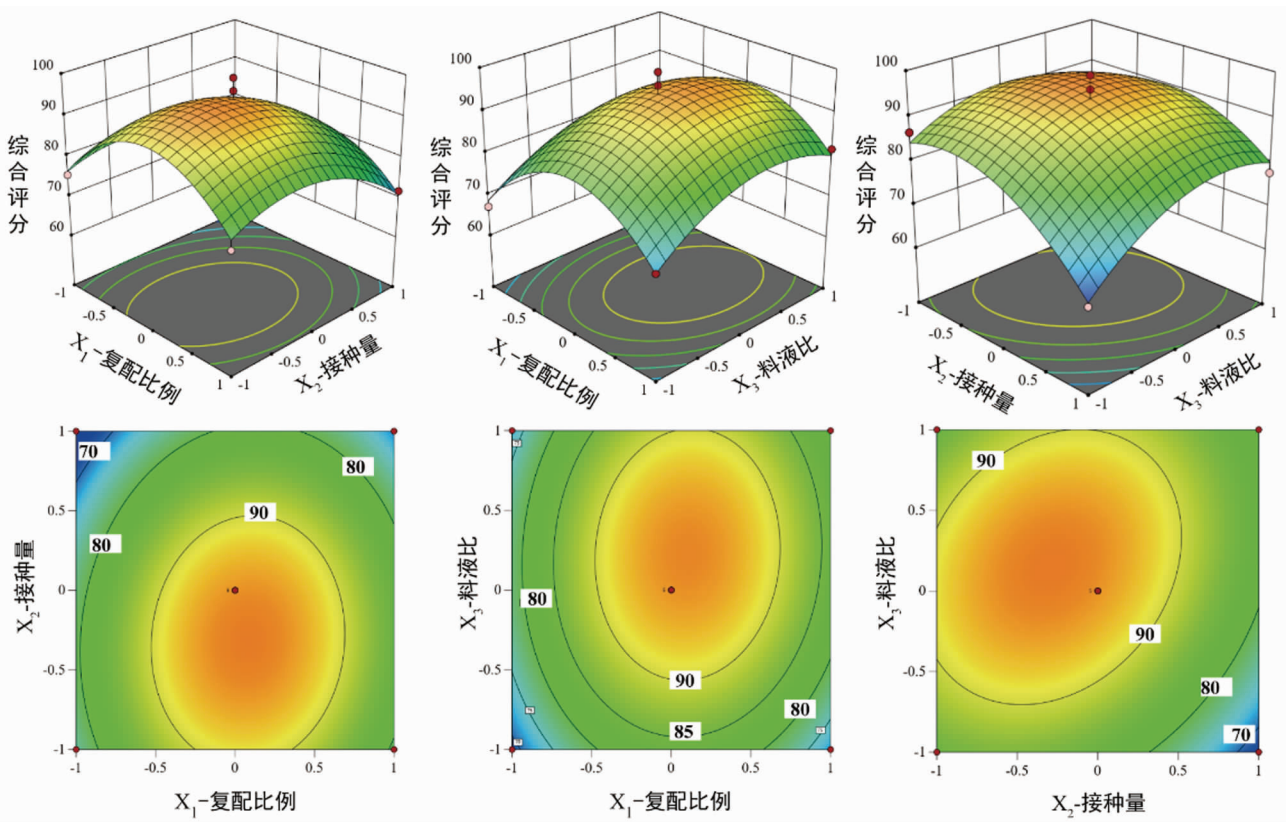


图 5 各因素之间交互作用响应曲面及等高线图