

不同添加物对发酵桑叶中降糖活性成分的影响

郭洁丽, 杨立梅, 高鑫, 林正山, 潘革波

Impacts of Different Additives on Hypoglycemic Components in Fermented Mulberry Leaves

GUO Jieli, YANG Limei, GAO Xin, LIN Zhengshan, and PAN Gebo

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023070280>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

桑叶生物碱的活性炭脱色工艺优化及其 α -葡萄糖苷酶抑制活性

Optimization of Activated Carbon Decolorization Process of Mulberry Leaf Alkaloids and Its α -glucosidase Inhibitory Activity

食品工业科技. 2020, 41(13): 162-167 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.13.026>

响应面-主成分分析法优化大曲发酵桑叶茶工艺

Optimization of Fermentation Technology of Daqu Mulberry Leaf Tea by Response Surface Method and Principal Component Analysis

食品工业科技. 2021, 42(17): 113-119 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020110166>

桑叶总黄酮提取纯化工艺及抗氧化性研究

Extraction, Purification and Antioxidant Activity of Total Flavonoids from Mulberry Leaves

食品工业科技. 2020, 41(10): 151-156 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.10.025>

超声-酶辅助低共熔溶剂提取桑叶总黄酮的工艺优化及其抗氧化活性研究

Optimization of Ultrasonic-Enzyme-Assisted Deep Eutectic Solvents Extraction Process of Total Flavonoids from Mulberry Leaves and Its Antioxidant Activity

食品工业科技. 2024, 45(3): 31-39 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023070033>

蛋白桑叶中蛋白质提取工艺优化及6种蛋白酶酶解物体外降血糖活性分析

Optimization of Protein Extraction and Analysis of Hypoglycemic Activity *in Vitro* of 6 Different Enzymatic Hydrolysates from Protein Mulberry Leaves

食品工业科技. 2023, 44(12): 232-241 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022110141>

外源添加物在鱼糜制品中的应用研究进展

Research Progress of the Application of Exogenous Additives in Surimi Products

食品工业科技. 2019, 40(15): 349-355 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.15.058>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

郭洁丽, 杨立梅, 高鑫, 等. 不同添加物对发酵桑叶中降糖活性成分的影响 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(13): 168–175. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023070280

GUO Jieli, YANG Limei, GAO Xin, et al. Impacts of Different Additives on Hypoglycemic Components in Fermented Mulberry Leaves[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(13): 168–175. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023070280

· 工艺技术 ·

不同添加物对发酵桑叶中降糖活性成分的影响

郭洁丽^{1,2}, 杨立梅¹, 高鑫¹, 林正山¹, 潘革波^{1,*}

(1.中国科学院苏州纳米技术与纳米仿生研究所, 江苏苏州 215123;

2.苏州市疾病预防控制中心, 江苏苏州 215004)

摘要:目的: 以桑叶嫩芽作为主要原料, 借鉴传统的红茶发酵工艺, 通过添加不同的促发酵物质来提高天然桑叶中降糖活性成分的含量。方法: 在单因素实验的基础上, 选取纤维素酶、果胶酶和茶多酚三种添加物为影响因素, 桑叶中总生物碱、总黄酮和总多糖的含量为综合评价指标进行正交优化试验, 以确定其最佳添加量。结果: 当纤维素酶、果胶酶和茶多酚的添加量分别为 0.6%、0.8% 和 0.9% 时, 和自然发酵相比, 添加物发酵的桑叶中总生物碱、总黄酮和总多糖的含量均有提升, 分别增加了 61.84%、45.02% 和 28.68%; 相较于天然桑叶, 其含量分别增加了 115.12%、80.19% 和 54.81%。结论: 添加促发酵的物质可以提高天然桑叶中降糖活性成分的含量, 为其后续在降糖方面的有效利用奠定了基础。

关键词:天然桑叶, 发酵, 添加物, 正交优化, 生物碱, 黄酮, 多糖

中图分类号: TS255.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2024)13-0168-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023070280



本文网刊:

Impacts of Different Additives on Hypoglycemic Components in Fermented Mulberry Leaves

GUO Jieli^{1,2}, YANG Limei¹, GAO Xin¹, LIN Zhengshan¹, PAN Gebob^{1,*}

(1.Suzhou Institute of Nano-Tech and Nano-Bionics (SINANO), Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215123, China;

2.Suzhou Center for Disease Control and Prevention, Suzhou 215004, China)

Abstract: Objective: To improve the contents of various hypoglycemic components in natural mulberry leaves, different fermentation-promoting substances were added to mulberry leaf shoots during their fermentation by means of that drawn on the experience of traditional black tea fermentation process. Method: Based on the single factor experiments, orthogonal optimization test was carried out to determine the optimal addition amount using cellulase, pectinase and tea polyphenols as influencing factors, and the contents of total alkaloids, total flavonoids and total polysaccharides in mulberry leaves as comprehensive evaluation indicators. Results: Compared with natural fermentation, the contents of total alkaloids, total flavonoids and total polysaccharides in mulberry leaves fermented by additives were increased by 61.84%, 45.02% and 28.68%, when the addition amounts of cellulase, pectinase and tea polyphenols were 0.6%, 0.8% and 0.9%, respectively. And their contents were 115.12%, 80.19% and 54.81% higher than those in natural mulberry leaves, respectively. Conclusion: The contents of hypoglycemic components in natural mulberry leaves can be improved by adding substances that promote fermentation, which lays a foundation for its subsequent effective utilization in hypoglycemia.

Key words: natural mulberry leaves; fermentation; additives; orthogonal optimization; alkaloids; flavonoids; polysaccharides

收稿日期: 2023-08-10

作者简介: 郭洁丽 (1989-), 女, 博士, 研究方向: 农产品精深加工及综合利用, E-mail: 591238716@qq.com。

* 通信作者: 潘革波 (1976-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 有机化学, E-mail: gbpan2008@sinano.ac.cn。

桑叶为桑科植物桑(*Morus alba* L.)的干燥叶,性寒味甘苦、清肺润燥、益肝通气、清肝明目,是滋阴补血的绝佳药材,《神农本草经》中将其称之为“神仙叶”。桑树在我国种植范围广泛,生命力极强,每年可实现 3~6 次采摘,桑叶产量约占桑树可利用资源的 64%,生物量极大,因此桑叶在我国有着极大的资源优势^[1-2]。桑叶化学成分复杂,主要含有黄酮、生物碱、多酚、蛋白质、多糖、维生素、甾醇类、氨基酸等多种营养与生物活性成分。桑叶以极高的营养价值和药用价值,被国家卫生部首批列为药食同源物质,同时还被《中国药典》收载,成为食品科技界和医药界关注的热点^[3-5]。

桑叶自古以来就被传统中医应用于治疗“消渴症”,是我国用于消渴症(即糖尿病)的经典药材。相关研究表明,桑叶中的生物碱、黄酮和多糖均具有降血糖功效,其中生物碱的降糖活性最强。但是,天然桑叶中降糖活性成分的含量并不高,尤其是生物碱的含量极低^[6-7]。发酵处理不仅可以在一定程度上改善天然桑叶的青臭气和涩味,同时其内在成分在不同酶类催化条件下经过氧化、聚合、偶联等反应发生系列的生化转变,从而达到对天然桑叶中功能活性物质的有效调整和充分利用^[8-9]。目前利用微生物发酵来提高桑叶中活性成分含量方面的研究较多^[10-13],但通过添加非微生物类的促发酵物质来进行桑叶发酵方面的研究还未见报道。经过前期的调研,发现纤维素酶^[14-16]、果胶酶^[17-18]、淀粉酶^[19]、蛋白酶^[20]、糖^[21-22]、盐^[23]和茶多酚^[24-25]等物质均有促进发酵的作用。

本研究首次利用非微生物类添加物来促进天然桑叶发酵,探讨不同的添加物对发酵桑叶中降糖活性成分含量的影响,采用单因素和正交试验相结合的方式对促发酵物质进行优化后得到最佳组合及其添加量,以期为提高天然桑叶的附加值以及开发高效的桑叶降糖制剂提供一定的理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

桑叶嫩芽 浙江丽水地区秋季农桑(一芽两叶);纤维素酶(1×10^5 U/g)、果胶酶(3×10^4 U/g)、蛋白酶(2×10^5 U/g)、淀粉酶(1×10^4 U/g) 山东隆科特酶制剂有限公司;茶多酚(纯度 $\geq 98.5\%$) 上海士锋生物科技有限公司;4-羟基哌啶标准品、芦丁标准品、葡萄糖标准品(纯度均 $\geq 98\%$) 北京普天同创生物科技有限公司;雷氏盐(分析纯) 上海麦克林生化科技有限公司;白砂糖 太古食品贸易(中国)有限公司;食用盐 中盐福建盐业有限公司;无水乙醇、硫酸、盐酸(均为分析纯) 上海凌峰化学试剂有限公司;亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、丙酮、苯酚(均为分析纯) 国药集团化学试剂有限公司。

SN-HWS-50B 全自动智能型恒温恒湿培养箱 上海尚普仪器设备有限公司;DNG-9036A 电热恒温鼓风干燥箱 上海精宏实验设备有限公司;BSA124S-

CW 电子天平 赛多利斯(上海)贸易有限公司;HH-6 数显恒温水浴锅 上海力辰邦西仪器科技有限公司;SHK-Ⅲ循环水式多用真空泵 郑州科泰实验设备有限公司;TGL-15B 离心机 上海安亭科学仪器厂;N4S 紫外分光光度计 上海仪电分析仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 发酵桑叶的制备 借鉴传统红茶的加工方法,并参考文献[26-27]中的方法进行桑叶发酵。首先将挑选、清洗后沥干水分的桑叶嫩芽在室内弱光处进行摊晾,萎凋至叶色转为暗绿色,叶质变软,手捏成团;将萎凋过后的桑叶以打圈的方式进行揉捻,使其细胞破碎从而让汁液充分外溢,粘附于桑叶表面,揉捻程度以手握紧汁溢而不成滴为宜;然后将揉捻好的桑叶揉搓成大小适中的球状,用纯棉纱布包好后置于恒温恒湿培养箱中进行发酵(根据前期实验结果设定发酵条件为发酵时间 8.70 h,发酵温度 40 ℃ 和发酵湿度 85%);最后将发酵完成的桑叶置于 50 ℃ 烘箱中干燥 12 h,然后利用多功能粉碎机将干燥桑叶粉碎后过 60 目筛备用。

1.2.2 添加物的筛选 首先在桑叶制备工艺的揉捻过程中分别加入质量分数为 0.8% 的纤维素酶、果胶酶、蛋白酶、淀粉酶、茶多酚、盐和糖等七种添加物(基于前期的文献调研)进行初步筛选,根据发酵桑叶中降糖活性成分的含量变化从上述多种添加物中优选出三种进行单因素实验。

1.2.3 单因素实验 在其他条件固定不变的情况下(详见上述 1.2.1 中发酵桑叶的制备方法),在揉捻过程中分别加入质量分数为 0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0% 和 1.2% 的纤维素酶^[14-15],探讨不同添加量的纤维素酶对发酵桑叶中总生物碱、总多糖和总黄酮含量的影响,得出纤维素酶的最佳添加量区间范围。同理,考察不同添加量(0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0% 和 1.2%)的果胶酶^[17]和茶多酚^[24,28]对发酵桑叶中降糖活性成分的含量影响,依次得出果胶酶和茶多酚的最佳添加量区间范围。

1.2.4 正交试验 在单因素实验结果的基础上,固定其他条件(详见 1.2.1 中发酵桑叶的制备方法),以总生物碱、总黄酮和总多糖的含量作为综合评价指标,纤维素酶(A)、果胶酶(B)和茶多酚(C)添加量为影响因素设计三因素三水平正交试验。正交试验设计如表 1 所示,每个因素设置 3 个水平,共 9 个试验组(T1~T9),每组设置 3 个重复。

表 1 正交试验因素水平
Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素		
	A纤维素酶添加量(%)	B果胶酶添加量(%)	C茶多酚添加量(%)
1	0.5	0.7	0.7
2	0.6	0.8	0.8
3	0.7	0.9	0.9

1.2.5 桑叶总生物碱的提取及含量测定 精确称取 1.000 g 发酵桑叶样品,用 20 mL 25% 乙醇-0.05 mol/L HCl 溶液室温提取 3 h,滤渣重复提取一次,滤液旋转蒸发至干燥状态,然后用适量的纯水溶解,过 HPD-100 大孔树脂,纯水洗脱,流出液旋转蒸发至干燥,最后用 0.05 mol/L HCl 溶液定容至 10 mL,即得生物碱待测液。采用雷氏盐比色法^[29-30]测定发酵桑叶中总生物碱的含量,以不同浓度的 4-羟基喹啉标准溶液及其吸光度为横、纵坐标绘制标准曲线,得到标准曲线方程为 $y=0.0523x-0.0422$, $R^2=0.9995$ 。通过标准曲线方程换算,计算出不同桑叶样品中总生物碱的质量浓度(mg/g)。

1.2.6 桑叶总黄酮的提取及含量测定 精确称取 1.000 g 发酵桑叶样品,加入 40 mL 70% 乙醇溶液,70 ℃ 水浴恒温提取 2 h,滤渣重复提取一次,滤液用 70% 乙醇溶液定容至 100 mL,即得黄酮待测液。采用硝酸铝-亚硝酸钠法^[31-32]测定发酵桑叶中总黄酮的含量,以不同浓度的芦丁标准溶液及其吸光度为横、纵坐标绘制标准曲线,得到标准曲线方程为 $y=0.0739x+0.0109$, $R^2=0.9997$ 。通过标准曲线方程换算,计算出不同桑叶样品中总黄酮的质量浓度(mg/g)。

1.2.7 桑叶总多糖的提取及含量测定 精确称取 0.500 g 发酵桑叶样品,加入沸水 40 mL,沸水浴 1 h,滤渣重复提取一次,滤液用蒸馏水定容至 100 mL,即得多糖待测液。采用苯酚-硫酸法^[33-34]测定发酵桑叶中总多糖的含量,以不同浓度的葡萄糖标准溶液及其吸光度为横、纵坐标绘制标准曲线,得到标准曲线方程为 $y=7.710x-0.0108$, $R^2=0.9998$ 。通过标准曲线方程换算,计算出不同桑叶样品中总多糖的质量浓度(mg/g)。

1.3 数据处理

所有实验均重复三次,实验结果以平均值±标准差表示。使用 Origin 2022 软件进行作图。采用 SPSS 26.0 进行单因素方差(One-way ANOVA)分析和 Duncan 法多重比较分析样品间的差异性,当 $P<0.05$ 被认为具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 不同添加物质对发酵桑叶降糖活性成分含量的影响

从图 1 可以看出,添加不同的促发酵物质均会对桑叶中降糖活性成分的含量产生一定的影响。从桑叶总生物碱的含量变化来看,不同促发酵物质对其影响顺序为:纤维素酶>茶多酚>果胶酶>蛋白酶>糖>淀粉酶>盐,添加纤维素酶和茶多酚发酵后总生物碱的含量显著高于其他添加物($P<0.05$),且二者之间差异不显著($P>0.05$),和自然发酵相比,其含量分别增加了 14.48% 和 13.47%;从桑叶总黄酮的含量变化来看,不同促发酵物质之间呈现显著性差异($P<0.05$),其顺序依次为:茶多酚>纤维素酶>果胶酶>淀粉酶>盐>糖>蛋白酶,添加茶多酚发酵后总黄酮的含量最高,和自然发酵的相比,其含量增加了

19.26%;从桑叶总多糖的含量变化来看,不同促发酵物质对其影响顺序为:茶多酚>纤维素酶>果胶酶>淀粉酶>糖>蛋白酶>盐,其中茶多酚、纤维素酶和果胶酶的含量显著高于其他添加物($P<0.05$),且三者之间的差异不显著($P>0.05$),和自然发酵的相比,其含量分别增加了 8.06%、7.92% 和 7.50%。添加纤维素酶和果胶酶的发酵效果优于其他酶类,可能是因为它们破坏了植物细胞壁的表面结构,使纤维素网状结构变得松散,从而使得发酵反应的比表面积增大^[35-36]。前期研究发现,自然发酵后桑叶中降糖活性成分含量的提升并不理想,其原因可能是茶叶中的茶多酚含量远高于天然桑叶^[37-38]。上述实验结果证明,选择合适的添加物可以有效促进天然桑叶的发酵,综合不同添加物质对发酵桑叶中总生物碱、总多糖和总黄酮含量的影响,选取纤维素酶、果胶酶和茶多酚作为正交优化试验的单因素添加物。

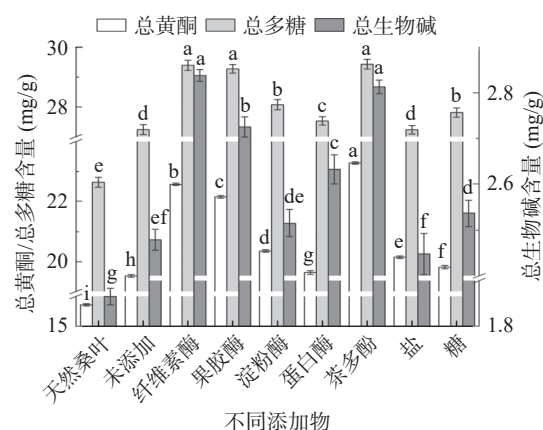


图1 不同添加物对发酵桑叶中降糖活性成分含量的影响

Fig.1 Effects of different additives on the contents of hypoglycemic components in fermented mulberry leaves

注:同一指标不同小写字母表示数值间具有显著性差异($P<0.05$),图2~图5同。

2.2 单因素实验

2.2.1 不同添加量的纤维素酶对发酵桑叶中降糖活性成分含量的影响 不同添加量纤维素酶对发酵桑叶中降糖活性成分含量的影响如图 2 所示。在 0~0.6% 的范围内,随着纤维素酶添加量的增加,发酵桑叶中总生物碱、总黄酮和总多糖的含量均显著增加($P<0.05$)。当纤维素酶的添加量在 0.6%~0.8% 范围内,桑叶总生物碱和总多糖的含量无明显变化($P>0.05$),但当添加量高于 0.8% 后其含量显著降低($P<0.05$)。在酶的添加量 $\geq 0.6\%$ 后,桑叶总黄酮的含量无显著变化($P>0.05$)。纤维素酶有助于植物细胞壁的分解,可以酶解并破坏天然桑叶的细胞壁表面结构,使其纤维素网状结构变得松散,不仅有利于细胞内容物的释放,而且还有利于参与桑叶发酵反应物质的接触,进而促进发酵反应的有序进行^[35]。随着纤维素酶添加量的增加,其对细胞壁的破坏程度也随之增大,进而使得桑叶发酵速率提升;但当酶的添加量过多时,酶解的部分纤维素和过多的酶会附着在发酵

桑叶的表面,从而阻碍桑叶的进一步发酵^[39-40]。综合不同添加量的纤维素酶对发酵桑叶中总生物碱、总多糖和总黄酮含量的影响,选取适宜的纤维素酶添加量为 0.6%。

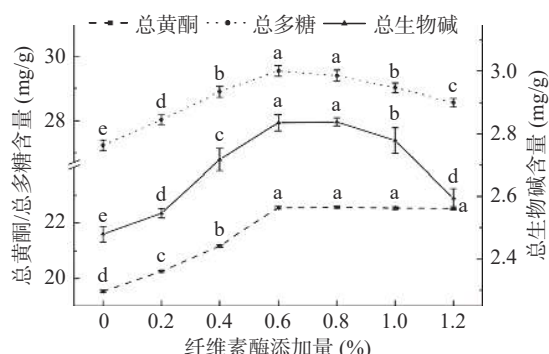


图2 纤维素酶添加量对发酵桑叶中降糖活性成分含量的影响
Fig.2 Effects of cellulase addition on the contents of hypoglycemic components in fermented mulberry leaves

2.2.2 不同添加量的果胶酶对发酵桑叶中降糖活性成分含量的影响 不同添加量果胶酶对发酵桑叶中降糖活性成分含量的影响如图 3 所示。和自然发酵桑叶相比,果胶酶的添加量在一定范围内,发酵桑叶中总生物碱和总多糖(0~0.4%)、总黄酮(0.2%~0.4%)的含量均无明显变化($P>0.05$),这是因为当果胶酶添加量远低于底物桑叶时,由于酶的数量有限,并不能将桑叶细胞壁有效破坏,酶解反应不彻底;继续增加果胶酶的添加量后,发酵桑叶中总生物碱和总多糖(0.4%~0.8%)、总黄酮(0.4%~1.0%)的含量均显著增加($P<0.05$),这是因为随着果胶酶浓度的增加,大量的酶作用于底物桑叶,致使不溶性的果胶、纤维素等成分降解,桑叶细胞壁遭到破坏,内容物外溢,进而促进发酵反应的有序进行^[18,41]。在酶的添加量 0.8%~1.2% 范围内,发酵桑叶总生物碱和总多糖的含量变化差异不显著($P>0.05$),总生物碱的含量在添加量高于 0.8% 后略有降低,而总多糖则呈现先升后降的趋势;总黄酮的含量在添加量 $\geq 1.0\%$ 后含量变化差异不显著($P>0.05$),这是因为当果胶酶的浓度过高时,酶颗粒会在桑叶表面聚集,不利于其内容物的溶出,从而阻碍发酵反应的进行^[15,42]。上述结果表明,适量

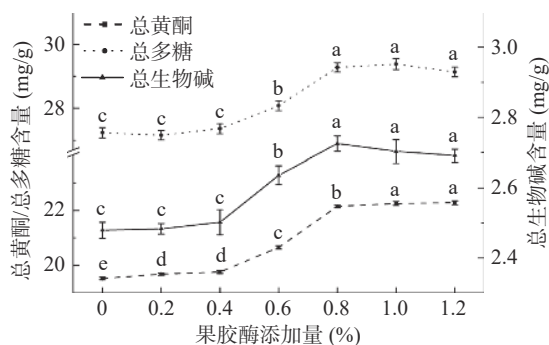


图3 果胶酶添加量对发酵桑叶中降糖活性成分含量的影响
Fig.3 Effects of pectinase addition on the contents of hypoglycemic components in fermented mulberry leaves

的果胶酶会对细胞壁起到一定的破坏作用从而促进桑叶的发酵;过低或过高添加量的果胶酶均不利于发酵反应的有序进行和桑叶中降糖活性成分的积累。综合不同添加量的果胶酶对发酵桑叶中总生物碱、总多糖和总黄酮含量的影响,选取适宜的果胶酶添加量为 0.8%。

2.2.3 不同添加量的茶多酚对发酵桑叶中降糖活性成分含量的影响 不同添加量茶多酚对发酵桑叶中降糖活性成分含量的影响如图 4 所示。当添加量在一定的范围内,发酵桑叶中总生物碱和总黄酮(0~0.2%)、总多糖(0~0.4%)的含量无明显变化($P>0.05$);继续增加茶多酚的添加量,总生物碱和总黄酮(0.2%~0.8%)和总多糖(0.4%~1.0%)的含量均显著增加($P<0.05$);当茶多酚在一定的添加量时,总生物碱和总黄酮(添加量为 0.8%)和总多糖(添加量为 1.0%)的含量达到最高值;随着茶多酚添加量的继续增加,总生物碱和总黄酮(添加量 $\geq 0.8\%$)、总多糖(添加量 $\geq 1.0\%$)含量的差异不显著($P>0.05$)。上述的研究结果表明,添加适量的茶多酚可以有效促进桑叶的发酵,而添加过低或过高添加量的茶多酚均不利于发酵反应的有序进行以及桑叶中降糖活性成分的积累。茶叶(如乌龙茶、红茶和黑茶等)可以在自然条件下实现有效发酵,前期实验发现桑叶的自然发酵效果不佳,借鉴传统的不同类型茶叶发酵并对比分析二者之间的成分差异,分析原因可能是由于茶叶中茶多酚含量约占有机物含量的 18%~36%,远高于天然桑叶^[43-44]。综上所述,向天然桑叶中添加适量的茶多酚来促进发酵是行之有效的。综合不同添加量的茶多酚对发酵桑叶中总生物碱、总多糖和总黄酮含量的影响,选取适宜的茶多酚添加量为 0.8%。

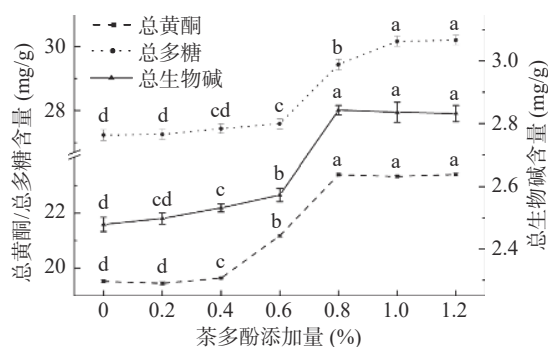


图4 茶多酚添加量对发酵桑叶中降糖活性成分含量的影响
Fig.4 Effects of tea polyphenols addition on the contents of hypoglycemic components in fermented mulberry leaves

2.3 组合添加物的正交试验

2.3.1 正交试验的极差分析 通过直观分析法比较表 2 中极差值的大小可知,不同添加物对发酵桑叶中总生物碱含量的影响程度大小依次为纤维素酶(A)>茶多酚(C)>果胶酶(B),说明纤维素酶对发酵桑叶总生物碱含量的影响最大,其次是茶多酚、果胶酶。根据 K_1 值的大小确定最优水平,三因素对总生

表 2 正交试验极差分析
Table 2 Range analysis of orthogonal experiment

试验号	试验因子			总生物碱(mg/g)	总黄酮(mg/g)	总多糖(mg/g)
	A	B	C			
1	1	1	1	3.585±0.032	25.731±0.054	32.128±0.166
2	1	2	3	3.749±0.026	28.012±0.067	33.927±0.179
3	1	3	2	3.679±0.019	27.065±0.043	33.318±0.162
4	2	1	3	3.976±0.043	27.423±0.035	34.832±0.186
5	2	2	2	3.914±0.028	27.793±0.051	34.153±0.157
6	2	3	1	3.852±0.014	26.365±0.073	32.765±0.192
7	3	1	2	3.756±0.052	26.726±0.065	34.628±0.173
8	3	2	1	3.715±0.032	27.115±0.083	33.597±0.149
9	3	3	3	3.813±0.028	27.785±0.056	34.652±0.176
总生物碱	K ₁	3.671	3.782	3.717	A>C>B	
	K ₂	3.921	3.799	3.800		
	K ₃	3.771	3.781	3.846		
	极差R	0.250	0.018	0.129		
总黄酮	K ₁	26.936	26.627	26.404	C>B>A	
	K ₂	27.194	27.640	27.195		
	K ₃	27.121	26.984	27.653		
	极差R	0.258	1.013	1.249		
总多糖	K ₁	32.890	34.437	33.212	A>C>B	
	K ₂	34.757	34.350	34.489		
	K ₃	34.734	33.593	34.679		
	极差R	1.867	0.843	1.466		

物碱的最优组合为 A₂B₂C₃;以桑叶总黄酮含量为考察指标,通过极差分析得到三因素对总黄酮含量的影响次序为茶多酚(C)>果胶酶(B)>纤维素酶(A),最优组合为 A₂B₂C₃;同理,以桑叶总多糖含量为考察指标,三因素对总多糖含量的影响次序为纤维素酶(A)>茶多酚(C)>果胶酶(B),最优组合为 A₂B₁C₃。综上所述,桑叶发酵最优方案为 A₂B₁C₃,即纤维素酶为 0.6%、果胶酶为 0.7% 或 0.8%、茶多酚 0.9%。

2.3.2 正交试验的方差分析 由表 3 和表 4 正交试

表 3 正交试验方差分析

Table 3 Analysis of variance for orthogonal experiment							
指标	方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
总生物碱	校正模型	0.121	6	0.020	76.164	0.013	*
	截距	129.118	1	129.118	4888465.709	<0.001	**
	A	0.095	2	0.047	179.131	0.006	**
	B	0.001	2	0.000	1.161	0.463	
	C	0.025	2	0.013	48.198	0.020	*
	误差	0.001	2	0.000			
总黄酮	校正模型	4.086	6	0.681	21.801	0.045	*
	截距	6601.725	1	6601.725	211340.864	<0.001	**
	A	0.106	2	0.053	1.696	0.371	
	B	1.585	2	0.792	25.365	0.038	*
	C	2.395	2	1.198	38.343	0.025	*
	误差	0.062	2	0.031			
总多糖	校正模型	11.996	6	1.999	40.677	0.024	*
	截距	10481.733	1	10481.733	213250.915	<0.001	**
	A	6.888	2	3.444	70.066	0.014	*
	B	1.292	2	0.646	13.140	0.071	
	C	3.817	2	1.908	38.825	0.025	*
	误差	0.098	2	0.049			

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

验方差分析的结果可知,总生物碱、总黄酮和总多糖校正模型的 P 值均小于 0.05,表明校正模型对实验结果的影响显著,正交试验具有可信度。纤维素酶(A)和茶多酚(C)对发酵桑叶总生物碱和总多糖含量的影响均为显著水平(P<0.05),最优组合均为 A₂C₃;果胶酶(B)对二者的含量影响不显著(P>0.05),说明果胶酶(B)不是发酵桑叶总生物碱和总多糖含量变化的主要决定因素。对于发酵桑叶总黄酮的含量而言,果胶酶(B)和茶多酚(C)对其含量的影响为显著水平(P<0.05),说明二者是影响发酵桑叶总黄酮含量的主要因素,最优组合为 B₂C₃。综合上述发酵桑叶中总生物碱、总黄酮和总多糖含量的最优组合,得到最优组合为 A₂B₂C₃。

表 4 正交试验方差分析多重比较

Table 4 Multiple comparison analysis of variance of orthogonal experiment				
指标	因素	水平		
		1	2	3
总生物碱	A	3.671 ^c	3.921 ^a	3.771 ^b
	B	3.782	3.799	3.781
	C	3.717 ^b	3.800 ^a	3.846 ^a
总黄酮	A	26.936	27.194	27.121
	B	26.227 ^b	27.640 ^a	26.984 ^b
	C	26.404 ^b	27.195 ^a	27.653 ^a
总多糖	A	32.890 ^b	34.757 ^a	34.734 ^a
	B	34.437	34.350	33.593
	C	32.212 ^b	34.489 ^a	34.679 ^a

注:同行数值,肩标不同小写字母表示差异显著(P<0.05),相同或无字母表示差异不显著(P>0.05)。

2.3.3 验证实验 综合上述 2.3.1 极差分析和 2.3.2

方差分析的实验结果,得出添加物的最佳组合为 $A_2B_2C_3$,即纤维素、果胶酶和茶多酚的添加量分别为 0.6%、0.8% 和 0.9%。由于该组合不在正交试验设计之内,所以需对上述最佳组合进行验证性实验。在上述条件下,测得发酵桑叶中总生物碱、总黄酮和总多糖的含量分别为 4.012 ± 0.028 、 28.315 ± 0.056 和 35.046 ± 0.149 mg/g,均高于正交试验表中各组分的最高含量,从而确定 $A_2B_2C_3$ 组合为发酵桑叶添加物的最佳组合。

2.4 对比实验

不同类型桑叶中降糖活性成分的含量如图 5 所示。和未发酵的天然桑叶相比,自然发酵和添加物发酵处理后桑叶中不同降糖活性成分的含量均有所增加。添加物组的桑叶总生物碱的含量最高且显著高于自然发酵组和未发酵组($P < 0.05$),其含量分别增加了 61.84% 和 115.12%,这和梅玉立等^[45]利用植物乳杆菌发酵桑叶粉后其生物碱含量明显升高的研究结果相一致。和未发酵组的桑叶总黄酮含量相比,自然发酵组和添加物发酵组的含量明显增加,其中添加物发酵组最高且显著高于自然发酵组和未发酵组($P < 0.05$),其含量分别增加了 45.02% 和 80.19%。赵慧玲等^[46]和梅玉立等^[45]发现自然发酵和植物乳杆菌发酵后总黄酮含量明显增加,这和本实验中发酵桑叶总黄酮的研究结果相一致。添加物发酵组和自然发酵组桑叶总多糖的含量均高于未发酵组,且添加物发酵组显著高于自然发酵组和未发酵组($P < 0.05$),其含量分别增加了 28.68% 和 54.81%,这和杨清^[9]发现自然发酵和黑曲霉发酵均可以提升桑叶中总多糖的含量,且黑曲霉的发酵效果优于自然发酵的研究结果相一致。综上所述,通过发酵处理可以实现天然桑叶中降糖活性成分含量的有效提升。值得注意的是,适当的添加促发酵物质可以在上述自然发酵的基础上更大幅度地提高降糖活性成分的含量,可以更加高效地发挥其降糖作用,进而促进桑叶资源的合理利用。

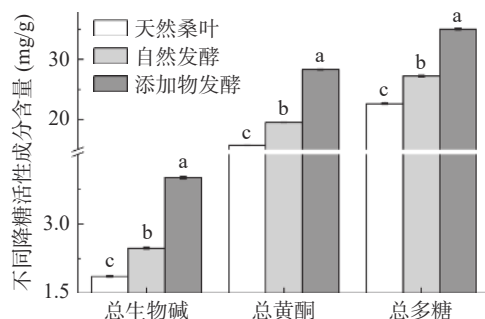


图 5 不同类型桑叶中降糖活性成分含量的对比
Fig.5 Comparison of the contents of hypoglycemic components in different mulberry leaves

3 结论

采用添加不同促发酵物质的方式来促进天然桑叶的发酵,以此来提高发酵桑叶中降糖活性成分的含量。经过前期实验筛选出纤维素酶、果胶酶和茶多

酚三种添加物作为自变量,以桑叶中总生物碱、总黄酮和总多糖的含量作为综合评价指标,在单因素实验的基础上通过正交试验确定最佳添加量为纤维素酶 0.6%、果胶酶 0.8%、茶多酚 0.9%。在此优化条件下,发酵桑叶中总生物碱、总黄酮和总多糖的含量分别为 4.012 ± 0.028 、 28.315 ± 0.056 和 35.046 ± 0.149 mg/g。和自然发酵的桑叶相比,添加促发酵物质后桑叶中总生物碱、总黄酮和总多糖的含量均显著增加($P < 0.05$),其含量分别提升了 61.84%、45.02% 和 28.68%;和天然桑叶相比,其含量分别提升了 115.12%、80.19% 和 54.81%。研究结果表明,添加适量的促发酵物质有利于桑叶中降糖活性成分的积累,这对于桑叶资源在保健降糖方面的高效利用具有重要的意义。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] 王贺. 新疆药桑叶生物碱的提取及不同活性成分降血糖作用的研究[D]. 阿拉尔:塔里木大学, 2016. [WANG H. Study on extract technology of alkaloids and hypoglycemic effect on different active components from *Morus nigra* L. in Xinjiang Province[D]. Aeral: Tarim University, 2016.]
- [2] ZHANG R Y, ZHANG Q, ZHU S, et al. Mulberry leaf (*Morus alba* L.): A review of its potential influences in mechanisms of action on metabolic diseases[J]. *Pharmacological Research*, 2022, 175: 106029.
- [3] MA G Q, CHAI X Y, HOU G G, et al. Phytochemistry, bioactivities and future prospects of mulberry leaves: A review[J]. *Food Chemistry*, 2022, 372: 131335.
- [4] 李来成, 张士凯, 许方舟, 等. 桑叶综合利用的研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(2): 397-404. [LI L C, ZHANG S K, XU F Z, et al. Research progress of mulberry leaf comprehensive utilization[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(2): 397-404.]
- [5] POLUMACKANYCZ M, WESOŁOWSKI M, VIAPIANA A, et al. *Morus alba* L. and *Morus nigra* L. leaves as a promising food source of phenolic compounds with antioxidant activity[J]. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2021, 76(4): 458-465.
- [6] 何美霞. 桑叶各降糖有效部位的药效比较及其相关机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2015. [HE X X. Comparing the hypoglycemic activity of constituents from mulberry leaves and its mechanism study[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2015.]
- [7] HUSSAIN F, RANA Z, SHAFIQUE H, et al. Phytopharmacological potential of different species of *Morus alba* and their bioactive phytochemicals: A review[J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2017, 7(10): 950-956.
- [8] 李莎, 王艳辉, 杨加虎, 等. 桑叶发酵综合利用的研究进展[J]. 北方蚕业, 2022, 43(2): 1-6. [LI S, WANG Y H, YANG J H, et al. Research progress of comprehensive utilization of mulberry leaf fermentation[J]. *North Sericulture*, 2022, 43(2): 1-6.]
- [9] 杨清. 桑红茶工艺研究及其品质分析[D]. 重庆: 西南大学, 2010. [YANG Q. Process and quality analysis of mulberry black

- tea[D]. Chongqing: Xinan University, 2010.]
- [10] GUO N, ZHU Y W, JIANG Y W, et al. Improvement of flavonoid aglycone and biological activity of mulberry leaves by solid-state fermentation[J]. *Industrial Crops & Products*, 2020, 148: 112287.
- [11] 樊杰, 郝祥蕊, 吴小珍, 等. 响应面法优化发酵对桑叶蛋白含量的影响[J]. *天津农业科学*, 2022, 28(8): 1-7. [FAN J, HAO X R, WU X Z, et al. Effects of optimized fermentation on the protein contents in mulberry leaves by response surface methodology[J]. *Tianjin Agricultural Sciences*, 2022, 28(8): 1-7.]
- [12] 崔艺燕, 王超普, 彭 苏, 等. 桑叶发酵工艺优化及营养价值评价[J]. *动物营养学报*, 2022, 34(9): 6110-6120. [CUI Y Y, WANG P C, PENG S, et al. Optimization of technology and evaluation of nutritional value on fermented mulberry leaves[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2022, 34(9): 6110-6120.]
- [13] ZHANG Q, SUN Q, TAN X, et al. Characterization of γ -aminobutyric acid (GABA)-producing *Saccharomyces cerevisiae* and coculture with *Lactobacillus plantarum* for mulberry beverage brewing[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2020, 129(4): 447-453.
- [14] HE L W, ZHOU W, WANG C, et al. Effect of cellulase and *Lactobacillus casei* on ensiling characteristics, chemical composition, antioxidant activity, and digestibility of mulberry leaf silage[J]. *Journal of Dairy Science*, 2019, 102(11): 9919-9931.
- [15] 牟佳红, 梁安雯, 覃超琳, 等. 酶解与发酵联合处理对黑木耳还原糖含量及抗氧化性能的影响[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(7): 139-147. [MOU J H, LIANG A W, QIN C L, et al. Effect of enzymatic hydrolysis combined with fermentation treatment on reducing sugar content and antioxidant performance of *Auricularia auricula*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(7): 139-147.]
- [16] MU L, XIE Z, HU L X, et al. Cellulase interacts with *Lactobacillus plantarum* to affect chemical composition, bacterial communities, and aerobic stability in mixed silage of high-moisture amaranth and rice straw[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 315: 123772.
- [17] 陈林, 苏珊, 吴应梅, 等. 红阳猕猴桃酵素发酵工艺优化及其体外抗氧化活性[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(4): 224-233. [CHEN L, SU S, WU Y M, et al. Optimization of fermentation process for Hongyang kiwifruit Jiaosu and antioxidant activity *in vitro*[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2021, 37(4): 224-233.]
- [18] 南立军, 吴佳珍, 赵 玲, 等. 不同发酵条件对小台农芒果酒中的 V_C 含量及风味的影响[J]. *楚雄师范学院学报*, 2022, 37(3): 24-32. [NAN L J, WU J Z, ZHAO L, et al. Effects of different fermentation conditions on vitamin C content and flavor of Xiaotainong mango wine[J]. *Journal of Chuxiong Normal University*, 2022, 37(3): 24-32.]
- [19] 吴婕, 王磊, 杨柳. 甜玉米发酵酒液化工艺的研究[J]. *粮食与油脂*, 2019, 32(11): 70-73. [WU J, WANG L, YANG L, et al. Study on the liquefaction technology for sweet corn fermented wine[J]. *Cereals & Oils*, 2019, 32(11): 70-73.]
- [20] HENG X Y, CHEN H Y, LU C X, et al. Study on synergistic fermentation of bean dregs and soybean meal by multiple strains and proteases[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2022, 154: 112626.
- [21] ZHANG L Y, YANG Y J, LÜ R Z, et al. The bacterial community and fermentation quality of mulberry (*Morus alba*) leaf silage with or without *Lactobacillus casei* and sucrose[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 293: 122059.
- [22] 马兆瑞, 祝战斌, 张坐省. 不同加糖方式和加糖量对苹果酒风味的影响[J]. *酿酒*, 2003, 30(4): 89-90. [MA Z R, ZHU Z B, ZHANG Z X. The influence of adding sugar to apple must by different method and different content[J]. *Liquor Making*, 2003, 30(4): 89-90.]
- [23] PENAS E, FRIAS J, SIDRO B, et al. Impact of fermentation conditions and refrigerated storage on microbial quality and biogenic amine content of sauerkraut[J]. *Food Chemistry*, 2010, 123(1): 143-150.
- [24] ZHAO L, ZHOU T, YAN F F, et al. Synergistic inhibitory effects of procyanidin B2 and catechin on acrylamide in food matrix[J]. *Food Chemistry*, 2019, 296: 94-99.
- [25] ROMERO M L M, VON S M, MARTINEZ M J. The effect of green tea polyphenols addition on the physicochemical, microbiological and bioactive characteristics of yogurt[J]. *British Food Journal*, 2021, 123(7): 2380-2397.
- [26] 韩粮. 桑叶红茶加工工艺优化和开发[J]. *广东蚕业*, 2018, 52(11): 7-11. [HAN L. Optimization and development of processing technology of mulberry leaf black tea[J]. *Guangdong Sericulture*, 2018, 52(11): 7-11.]
- [27] 孙国霞, 王俊, 龚敏, 等. 不同叶位桑叶及发酵温度对桑红茶中活性成分含量的影响[J]. *蚕业科学*, 2011, 37(6): 1061-1066. [SUN G X, WANG J, GONG M, et al. Influences of mulberry leaf position and fermentation temperature on contents of active ingredients in mulberry black tea[J]. *Science of Sericulture*, 2011, 37(6): 1061-1066.]
- [28] CUTRIM C S, CORTEZ M A S. A review on polyphenols: Classification, beneficial effects and their application in dairy products[J]. *International Journal of Dairy Technology*, 2018, 71(3): 564-578.
- [29] 李凡, 袁雅渔, 钱文春, 等. 桑叶中总生物碱和1-脱氧野尻霉素的含量考察[J]. *中国药学杂志*, 2008, 43(3): 176-179. [LI F, QIU Y Y, QIAN W C, et al. Determination and investigation of total alkaloids and 1-deoxynojirimycin in Folium Mori[J]. *Chinese Journal of Pharmacy*, 2008, 43(3): 176-179.]
- [30] 刘凡, 李平平, 廖森泰, 等. 98份不同桑树品种资源的桑叶总生物碱及1-脱氧野尻霉素含量测定[J]. *蚕业科学*, 2012, 38(2): 185-191. [LIU F, LI P P, LIAO T S, et al. Determination of total alkaloids and 1-deoxynojirimycin contents in leaves of 98 mulberry variety resources[J]. *Science of Sericulture*, 2012, 38(2): 185-191.]
- [31] 高林森, 温吉更, 李亚丽, 等. 河北省不同地区、不同品种及生长时期桑叶中总黄酮含量分析[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(2): 18-21. [GAO L S, WEN J G, LI Y L, et al. Analysis of flavonoids in mulberry leaves from different regions, different varieties and growth periods[J]. *Food Research and Development*, 2020, 41(2): 18-21.]
- [32] WANG L H, SUN X Y, FAN L, et al. Dynamic changes in phenolic compounds, colour and antioxidant activity of mulberry wine during alcoholic fermentation[J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 18: 254-265.
- [33] MA Q Q, SANTHANAM R K, XUE Z H, et al. Effect of different drying methods on the physicochemical properties and antioxidant activities of mulberry leaves polysaccharides[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 119: 1137-1143.
- [34] 杨斌旺, 刘平古, 刘龙飞, 等. 药桑叶多糖的脱蛋白工艺与抗氧化活性研究[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(10): 156-160. [YANG B W, LIU P G, LIU L F, et al. Study on deproteinization process and antioxidant activity of polysaccharide from *Morus ni-*

- gra leaves[J]. *Food Research and Development*, 2020, 41(10): 156–160.]
- [35] 丁浩, 吴永杰, 邵涛, 等. 纤维素酶和木聚糖酶对象草青贮发酵品质及体外消化率的影响[J]. *草地学报*, 2021, 29(11): 2601–2608. [[DING H, WU Y J, SHAO T, et al. Effects of cellulase and xylanase on fermentation quality and *in vitro* digestibility coefficient of napier grass[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2021, 29(11): 2601–2608.]
- [36] MA X B, WANG D L, CHEN W J, et al. Effects of ultrasound pretreatment on the enzymolysis of pectin: Kinetic study, structural characteristics and anti-cancer activity of the hydrolysates[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 79: 90–99.
- [37] HE H F, WEI K, YIN J F, et al. Insight into tea flavonoids: Composition and chemistry[J]. *Food Reviews International*, 2021, 37(8): 812–823.
- [38] 陈露, 尹礼国, 张超, 等. 茶多酚在发酵食品中的应用研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(2): 339–346. [CHEN L, YIN L G, ZHANG C, et al. Review on the application of tea polyphenols in fermented foods[J]. *Food Fermentation Industries*, 2023, 49(2): 339–346.]
- [39] 穆易君, 陈洋, 孙晶, 等. 纤维素酶-超声联合提取菠菜中总黄酮及其成分分析[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(19): 187–193. [[MU Y J, CHEN Y, SUN J, et al. Extraction of total flavonoids from spinach by cellulase ultrasound and its composition analysis[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(19): 187–193.]
- [40] 刘华玲, 王跃强. 纤维素酶酶解山楂浆工艺研究[J]. *现代食品*, 2022, 28(13): 80–82. [LIU H L, WANG Y Q. Research on enzymatic hydrolysis of hawthorn pulp with cellulase[J]. *Process Technology*, 2022, 28(13): 80–82.]
- [41] 宋超男. 蓝锭果-沙棘发酵果汁研制及功能性评价[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2021. [[SONG C N. Preparation and functional evaluation of the fermented juice of *Lonicera caerulea* and *Hippophae rhamnoides*[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2021.]
- [42] 张霁红, 康三江, 胡生海, 等. 果胶酶对早酥梨醋发酵品质的影响研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(23): 9177–9182. [ZHANG J H, KANG S J, HU S H, et al. Effect of pectinase on fermentation quality of Zaosu pear vinegar[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2021, 12(23): 9177–9182.]
- [43] CHAN E C, TEI P P, SOH E Y, et al. Antioxidant and antibacterial properties of green, black, and herbal teas of *Camellia sinensis*[J]. *Pharmacognosy Research*, 2011, 3(4): 266–272.
- [44] XU A N, LAI W Y, CHEN P, et al. A comprehensive review on polysaccharide conjugates derived from tea leaves: Composition, structure, function and application[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, 114: 83–99.
- [45] 梅玉立, 黄先智, 丁晓雯. 响应面法优化发酵对桑叶生物碱、黄酮和多糖含量的影响[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(6): 1764–1772. [MEI Y L, HUANG X Z, DING X W. Effects of optimized fermentation on the content of alkaloids, flavonoids and polysaccharides in mulberry leaves by response surface methodology[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2022, 13(6): 1764–1772.]
- [46] 赵慧玲, 王佳燕, 吕慧, 等. 干燥方式对桑叶主要活性成分及抗氧化活性的影响[J]. *食品工业*, 2020, 41(8): 191–195. [ZHAO H L, WANG J Y, LÜ H, et al. Effects of drying methods on the main active ingredients and the antioxidant activity of mulberry leaves[J]. *Food Industry*, 2020, 41(8): 191–195.]