

混菌发酵制备黑皮鸡枞菌-桑黄果醋工艺优化及其生物活性评价

孟月,周倩,杜静婷,施俊凤*

(山西农业大学 食品科学与工程学院,山西 晋中 030031)

摘要:该研究以食药两用菌粉(黑皮鸡枞菌、桑黄)协同水果(梨、苹果、葡萄)为原料,利用前期筛选得到的四株具有降糖降脂功效的益生菌发酵制备黑皮鸡枞菌-桑黄果醋,通过单因素和响应面试验优化其发酵工艺,并评价其生物活性。结果表明,酒精发酵最佳工艺为乳酸菌接种量2%、酵母菌接种量3%、发酵温度32℃、发酵时间4 d。在此条件下,酒精度为 $(11.2\pm 0.20)\%$ vol;醋酸发酵最佳工艺为醋酸菌接种量25%、发酵温度35℃、发酵时间8 d。在此条件下,黑皮鸡枞菌-桑黄果醋总酸含量达 (7.3 ± 0.16) g/100 mL,感官评分为97分。成品果醋中总酚含量为1.09 mg没食子酸当量(gallic acid equivalent, GAE)/mL,总黄酮含量为0.61 mg芦丁当量(rutin equivalent, RE)/mL;铁离子还原力为2.46 mmol/L, DPPH自由基清除率和ABTS⁺自由基清除率分别为89%和97%; α -淀粉酶抑制率和 α -葡萄糖苷酶抑制率分别为85.59%、80.31%;胆固醇清除率、胰脂肪酶抑制率分别为76%、66.57%。黑皮鸡枞菌-桑黄果醋口感柔和,气味独特,具有较强的抗氧化及降糖降脂功效。

关键词:黑皮鸡枞菌-桑黄果醋;益生菌;工艺优化;抗氧化;降糖降脂功效

中图分类号:TS201.3;TS275.4 文章编号:0254-5071(2025)11-0123-10 doi:10.11882/j.issn.0254-5071.2025.11.019

引文格式:孟月,周倩,杜静婷,等.混菌发酵制备黑皮鸡枞菌-桑黄果醋工艺优化及其生物活性评价[J].中国酿造,2025,44(11):123-132.

Process optimization and biological activity evaluation of *Hymenopellis raphanipes*-*Phellinus igniarius* fruit vinegar prepared by mixed-strain fermentation

MENG Yue, ZHOU Qian, DU Jingting, SHI Junfeng*

(College of Food Science and Engineering, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030031, China)

Abstract: In this study, using edible and medicinal fungal powder (*Hymenopellis raphanipes* and *Phellinus igniarius*), combined with fruits (pear, apple, grape) as raw materials, the *H. raphanipes*-*P. igniarius* fruit vinegar was prepared by fermentation with four probiotic strains that had been previously screened for their blood glucose-lowering and lipid-lowering effects. The fermentation process was optimized through single-factor tests and response surface methodology, and its biological activities were evaluated. The results showed that the optimal conditions for alcohol fermentation were as follows: lactic acid bacteria inoculum 2%, yeasts inoculum 3%, fermentation temperature 32℃, and time 4 d. Under these conditions, the alcohol content reached $(11.2\pm 0.20)\%$ vol. The optimal conditions for acetic acid fermentation were as follows: acetic acid bacteria inoculum 25%, fermentation temperature 35℃ and time 8 d. Under these conditions, the total acid content of the *H. raphanipes*-*P. igniarius* fruit vinegar reached (7.3 ± 0.16) g/100 mL, with sensory score of 97 points. The total phenol content in the finished fruit vinegar was 1.09 mg gallic acid equivalent (GAE)/mL, and the total flavonoid content was 0.61 mg rutin equivalent (RE)/mL. The reducing power of iron ions was 2.46 mmol/L, and the radical scavenging rates of DPPH and ABTS⁺ were 89% and 97%, respectively. The inhibition rates of α -amylase and α -glucosidase were 85.59% and 80.31%, respectively. The cholesterol clearance rate and pancreatic lipase inhibition rate were 76% and 66.57%, respectively. *H. raphanipes*-*P. igniarius* fruit vinegar had mild taste and unique aroma, and it had strong antioxidant and hypoglycemic and lipid-lowering effect.

Key words: *Hymenopellis raphanipes*-*Phellinus igniarius* fruit vinegar; probiotics; process optimization; antioxidant; hypoglycemic and hypolipidemic effect

食药两用菌作为传统的药食同源食物,含有丰富的必需氨基酸,具有低脂肪、高蛋白的特点^[1-2]。其中的多糖类物质还具有增强免疫、调节代谢、抗氧化、抗衰老的效果^[3]。黑皮鸡枞菌(*Hymenopellis raphanipes*)和桑黄(*Phellinus igniarius*)均为“药食同源”的珍稀菌类,黑皮鸡枞菌中含有18种氨基酸,包括苏氨酸、亮氨酸、赖氨酸等人体必需氨基

酸,其营养价值接近肉类^[4]。桑黄中的黄酮类化合物含量较高,具有减轻炎症反应、延缓衰老的作用^[5]。

随着糖尿病、高血压、高血脂等慢性疾病的患病人数日益增多,关于改善血糖、血脂问题的研究也更加广泛,其中果醋的降糖降脂功效是目前此类研究的热点之一。许世林等^[6]以石榴为原料发酵果醋,发现其能降低小鼠空腹血

收稿日期:2025-08-15

修回日期:2025-09-19

基金项目:山西重点研发计划课题(202402140601015-03);山西省现代农业产业技术体系建设项目岗位专家(2025CYJSTX10-15)

作者简介:孟月(2000-),女,硕士研究生,研究方向为微生物发酵。

*通讯作者:施俊凤(1977-),女,研究员,博士,研究方向为果蔬采后病害和生物防治。

糖(fast blood glucose,FBG)、总胆固醇(total cholesterol,TC)和甘油三酯(triglyceride,TG)的含量,升高胰岛素敏感指数(insulin sensitivity index,ISI),显示出较强的改善血糖血脂功效。杜丽娟等^[7]研究发现,香蕉醋可有效提高 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制率,对甘氨酸胆酸钠和牛黄胆酸钠的结合率分别为38.91%和45.61%,也表现出良好的降糖降脂功能。此外,水果在发酵过程中,还可以形成具有独特香味的营养功能物质,天然的酸性条件也可促进发酵周期缩短和发酵产物货架期的延长^[8]。综上,将营养丰富的食药菌与水果协同发酵制备果醋有望实现降糖降脂、延缓衰老等功效,具有广阔的发展前景。

目前,针对食药菌与水果复合发酵果醋的研究已取得一定进展。如以食药菌(如香菇、灵芝、黑皮鸡枞菌等)和水果(如苹果、葡萄、山楂等)为主要原料,通过微生物(酵母菌、醋酸菌等)协同发酵而成的果醋含有多种活性成分,其中的多糖和三萜类化合物具有增强免疫力、延缓衰老、抗肿瘤作用^[9]。魏哲珍等^[10]利用响应面法优化黑莓灵芝醋的发酵工艺,优化后的果醋营养含量及感官品质均显著提升。熊巍^[11]将灵芝、木瓜和红曲米相结合发酵木瓜灵芝醋并分析及功能成分,发现该醋含有 γ -氨基丁酸、多糖等多种营养成分,具有保健功效。

近年来,将乳酸菌加入到酿醋工艺中的研究日益增多,乳酸菌的加入不但使醋的风味与功能协同提升,并且其代谢产生的乳酸与醋酸协同作用,使酸味更柔和醇厚,同时生成己酸乙酯、乳酸乙酯等芳香酯类及胞外多糖,极大丰富了果醋的香气层次与饱满口感。而且有研究表明,添加乳酸菌不仅保留了果醋原有的有机酸及多酚,更引入了活性益生菌及其代谢产物(如B族维生素、细菌素),形成兼具“益生菌”与“益生元”特性的合生元体系,显著促进肠道健康并增强免疫力^[12]。此外,益生菌防治高脂高糖病症的效果也是许多研究者的重点关注方向。杨晓华等^[13]从甘蔗渣中筛选出一株具有降糖功效的植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)P6,能够有效抑制 α -淀粉酶的活性,改善糖代谢。乳酸菌的发酵还会降低环境的pH值,有效抑制杂菌污染,提高生产稳定性和产品抗氧化性,延长货架期。然而,现有研究多集中于单一食药菌或单一水果的发酵组合,且对发酵微生物的选择多局限于酵母菌与醋酸菌,针对益生菌(乳酸菌+醋酸菌)协同发酵以强化食药菌-水果复合体系功能活性的研究仍较为匮乏。

为进一步探索食药菌果醋的功能特性,本研究利用实验室前期筛选出的具有降糖降脂功效的两株乳酸菌和两株醋酸菌作为发酵菌种,选择黑皮鸡枞菌、桑黄和3种水果(梨、苹果、葡萄)为原料发酵制备黑皮鸡枞菌-桑黄果醋。以酒精度和总酸含量为评价指标,采用单因素及响应面法优化果醋发酵工艺,分析不同发酵阶段果醋总酚、

总黄酮等功能成分的动态变化,研究果醋的体外抗氧化活性及其降糖降脂功效。为食药菌-水果复合益生菌发酵产品的开发提供理论依据与技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 原料与菌株

干制黑皮鸡枞菌、干制桑黄、梨、苹果、葡萄:市售;食用白砂糖、活性干酵母:安琪酵母股份有限公司;副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)G-3-8、植物乳植杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)G-3-18(从山西泡菜中筛得)、巴氏醋杆菌(*Acetobacter pasteurianus*)d739、果实醋杆菌(*Acetobacter pomorum*)d1042(从醋醅中筛得):中国普通微生物菌种保藏管理中心。

1.1.2 试剂

α -淀粉酶标准品(5 U/mg)、 α -葡萄糖苷酶标准品(50 U/mg)、胆固醇标准品(>95%)、胰脂肪酶标准品(15 U/mg)、甘氨酸胆酸钠标准品($\geq 98\%$)、3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid,DNS)、对硝基苯酚- α -D-吡喃葡萄糖苷(p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside,PNPG)($\geq 99\%$)、4-硝基苯基辛酸酯(4-nitrophenyl octanoate,PNP-C)($\geq 90\%$)、没食子酸($\geq 98\%$)、芦丁($\geq 98\%$):上海源叶生物科技有限公司;可溶性淀粉、邻苯二甲醛、三氯乙酸、氢氧化钠、无水碳酸钠、亚硝酸钠、硝酸铝(均为分析纯):天津市方大同正化工有限公司;茚三酮、考马斯亮蓝G250、福林酚(均为分析纯):北京索莱宝科技有限公司;乙腈、甲酸、浓硫酸、无水乙醇、盐酸(均为分析纯):天津市北辰区方正试剂厂;葡萄糖($\geq 99\%$):天津市凯通化学试剂有限公司;酵母膏(生化试剂):北京奥博星生物技术有限责任公司。

1.1.3 培养基

MRS肉汤培养基:青岛海博生物技术有限公司;MRS固体培养基:MRS肉汤培养基中加入2.5%琼脂;醋酸菌液体培养基:1%葡萄糖、1%酵母膏、2%无水乙醇,121℃高压灭菌20 min。

1.2 仪器与设备

AK002高精度糖度仪:深圳测友仪器有限公司;MK-21高速离心机:湖南迈克实验仪器有限公司;AL204电子天平:上海梅特勒-托利多仪器有限公司;M9酒精计:深圳美得美仪表有限公司;JC100D高压蒸汽灭菌锅:山东德强净化科技有限公司;J-HH-2A水浴锅:上海皓庄仪器有限公司;SWP-2超净工作台:广州康恒仪器有限公司;722N紫外可见分光光度计:上海分析仪器厂;HWS-500H恒温培养箱:宁波杨辉仪器有限公司;JADZ-5.5-10G箱式电阻炉:上海跃进医疗器械有限公司;RE52-99旋转蒸发仪:上海亚荣生化仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 黑皮鸡枞菌-桑黄果醋制备工艺流程及操作要点

水果(梨、葡萄、苹果)→清洗→打浆→加入研磨过筛的黑皮鸡枞菌、桑黄菌粉→黑皮鸡枞菌-桑黄果浆→调整糖度→灭菌→酵母菌、乳酸菌活化→接种→酒精发酵→黑皮鸡枞菌-桑黄果酒→调整酒精度→醋酸菌活化→接种→醋酸发酵→过滤、灭菌→黑皮鸡枞菌-桑黄果醋

操作要点:

黑皮鸡枞菌-桑黄果浆制备:将干制黑皮鸡枞菌和干制桑黄分别研磨成菌粉后,40目筛过筛三次备用。挑选无创伤的梨、葡萄、苹果清洗切分后,按照料液比1:6(g:mL)加入蒸馏水打浆。参照前期预实验结果,取500 mL水果浆加入5%食药菌粉(黑皮鸡枞菌:桑黄=1:1)混合均匀,待用。

糖度调整:调整果浆初始可溶性固形物含量为18°Bx。

灭菌:121℃灭菌20 min,冷却至室温。

活化酵母菌:参考庞情等^[14]的方法并略作修改。将酵母菌与2%的白砂糖水按1:30(g:mL)的液料比混合均匀后,32℃恒温活化30 min,期间不断搅拌,直至酵母液出现密集气泡即为活化成功。

活化乳酸菌:参考王婷婷^[15]的方法并略作修改,将副干酪乳杆菌G-3-8和植物乳杆菌G-3-18分别接种于MRS肉汤中,32℃培养24 h,调整最终浓度为 1×10^8 CFU/mL,作为乳酸菌种子液。酒精发酵前将1%乳酸菌种子液接种到500 mL MRS肉汤中,32℃培养24 h,10 000 r/min离心10 min,弃上清;重复离心2次后,加入500 mL无菌水重悬菌泥,备用。

酒精发酵:分别将1%~5%活化后的酵母菌和乳酸菌(G-3-8:G-3-18=1:1)加入果浆中,混合均匀后进行酒精发酵,发酵温度为28~36℃,发酵2~6 d,每日测定酒精度。

活化醋酸菌:将巴氏醋杆菌d739和果实醋杆菌d1042分别接种于醋酸菌液体培养基中,35℃培养24 h,制得醋酸菌种子液,调整最终浓度为 1×10^8 CFU/mL。考虑到醋酸发酵通入氧气后会损耗发酵液,为保证补液的同时减少对产品风味物质的影响。在醋酸发酵之前,将1%的醋酸菌种子液接种于500 mL醋酸菌液体培养基中,35℃培养24 h,10 000 r/min离心10 min,弃上清;重复离心2次后,加入500 mL的无菌水重悬菌泥,备用。

醋酸发酵:将果酒的酒精度用无菌水调整为5%vol,加入10%~30%活化后的醋酸菌(d739:d1042=1:1),混合均匀后进行醋酸发酵,发酵温度为29~37℃,发酵4~10 d,每日测定总酸含量。

过滤、灭菌:发酵结束后,过滤取上清醋液进行高温杀菌(121℃、20 min),冷却保存,即得黑皮鸡枞菌-桑黄果醋成品。

1.3.2 黑皮鸡枞菌-桑黄果醋酒精发酵工艺优化

(1)单因素试验

采用单因素轮换法,分别考察酵母菌接种量(1%、2%、

3%、4%、5%)、乳酸菌接种量(1%、2%、3%、4%、5%)、发酵温度(26℃、28℃、30℃、32℃、34℃)、发酵时间(2 d、3 d、4 d、5 d、6 d)对黑皮鸡枞菌-桑黄果酒酒精度的影响。

(2)响应面试验

在单因素试验基础上,选择乳酸菌接种量(A)、酵母菌接种量(B)、发酵温度(C)、发酵时间(D)为影响因素,以酒精度(Y)为响应值设计响应面试验优化酒精发酵工艺,试验因素与水平见表1。

表1 酒精发酵条件优化响应面试验因素与水平
Table 1 Factors and levels of response surface tests for alcohol fermentation conditions optimization

水平	A 乳酸菌接种量/ %	B 酵母菌接种量/ %	C 发酵温度/ ℃	D 发酵时间/ d
-1	1	2	30	3
0	2	3	32	4
1	3	4	34	5

1.3.3 黑皮鸡枞菌-桑黄果醋醋酸发酵工艺优化

(1)单因素试验

取酒精度调整为5%vol的黑皮鸡枞菌-桑黄果酒500 mL,采用单因素轮换法,分别考察醋酸菌接种量(10%、15%、20%、25%、30%),醋酸发酵温度(29℃、31℃、33℃、35℃、37℃),发酵时间(2 d、4 d、6 d、8 d、10 d)对黑皮鸡枞菌-桑黄果醋总酸含量的影响。

(2)响应面试验

根据单因素试验结果,以醋酸菌接种量(A)、发酵温度(B)、发酵时间(C)为自变量,以总酸含量(Y)为响应值设计响应面试验,试验因素与水平见表2。

表2 醋酸发酵条件优化响应面试验因素与水平
Table 2 Factors and levels of response surface tests for acetic acid fermentation conditions optimization

水平	A 醋酸菌接种量/%	B 发酵温度/℃	C 发酵时间/d
-1	20	33	6
0	25	35	8
1	30	37	10

1.3.4 分析检测

(1)总酚、总黄酮含量测定

在发酵期间每天取适量样品,6 000 r/min离心10 min,取上清作为待测液备用。采用Folin-Ciocateu比色法测定总酚含量^[16],结果以没食子酸当量(gallic acid equivalent, GAE)计(mgGAE/mL),其中标准曲线回归方程为 $y=2.1071x-0.0002$, $R^2=0.9991$ 。总黄酮含量参考王梅燕等^[17]的方法,芦丁标准曲线回归方程为 $y=0.5857x-0.0024$, $R^2=0.9992$,测定结果以芦丁当量(rutin equivalent, RE)计(mgRE/mL)。

(2)抗氧化活性

铁离子还原力:采用铁离子还原抗氧化能力(ferric reducing antioxidant power, FRAP)法^[18],以FeSO₄为标准品,在波长593 nm处测吸光度值,获得标准曲线回归方程为 $y=1.1393x-0.0053$, $R^2=0.9993$,计算黑皮鸡枞菌-桑黄黑皮鸡枞菌果醋的铁离子还原力。

DPPH自由基清除率:参考陈春风^[19]的方法,在波长517 nm处测定吸光度值,计算DPPH自由基清除率。

ABTS⁺自由基清除率:参考冯怡婷等^[20]的方法,加入1 mL ABTS工作液后样品在波长734 nm处测吸光度值,计算ABTS⁺自由基清除率。

(3)降糖降脂功效

α -淀粉酶抑制率:参考刘祎等^[21]的方法,以可溶性淀粉消耗量计算; α -葡萄糖苷酶抑制率:参考陈家领等^[22]的方法,在波长405 nm测定吸光度值;胆固醇脱除率:采用邻苯二甲醛法^[23]测定胆固醇含量,计算脱除率。标准曲线回归方程为 $y=1.9886x-0.0007$,相关系数 $R^2=0.9997$,其中 x 表示胆固醇标准品质量浓度(mg/mL), y 表示波长550 nm处吸光度值;胰脂肪酶抑制率^[24]:以蒸馏水为对照组,在波长316 nm处测定吸光度值后计算胰脂肪酶抑制率。

1.3.5 感官评价

选取20名食品专业人员(男:女=1:1)进行黑皮鸡枞菌-桑黄果醋的感官评定,满分为100分,评价标准见表3。

表3 黑皮鸡枞菌-桑黄果醋感官评价标准
Table 3 Sensory evaluation standards of *Hymenopellis raphanipes*-*Phellinus igniarius* fruit vinegar

项目	评分标准	感官评分/分
色泽 (20分)	浅琥珀色,透亮均匀	16~20
	棕黄色,稍浑浊	11~15
	深褐色,浑浊	0~10
气味 (30分)	菌菇清香与果香协调,无杂味	21~30
	香气较淡或有轻微发酵异味	11~20
	刺鼻酸味或霉味	0~10
口感 (25分)	酸味柔和,酸甜平衡,后味回甘	26~35
	酸度偏高或偏低,刺激感明显	16~25
	过酸或有苦涩味,刺激感明显	0~15
	酸度适中,柔和圆润,激发食欲	7~10
酸度 (10分)	偏酸或偏淡,但可接受	3~7
	尖酸或寡淡	1~2
	澄清透明,无悬浮物	11~15
澄清度 (15分)	轻微浑浊,少量沉淀	6~10
	浑浊,明显絮状物	0~5

1.3.6 数据处理

所有样品均重复测定3次,使用Excel 2010软件处理数据,采用Design-Expert 13.0进行响应面试验设计与分析,SPSS 25.0软件对试验结果进行方差分析($P<0.05$ 认为差异显著),Origin 2021软件绘图。

2 结果与分析

2.1 酒精发酵工艺优化

2.1.1 单因素试验结果

不同因素对黑皮鸡枞菌-桑黄果酒酒精度的影响见图1。

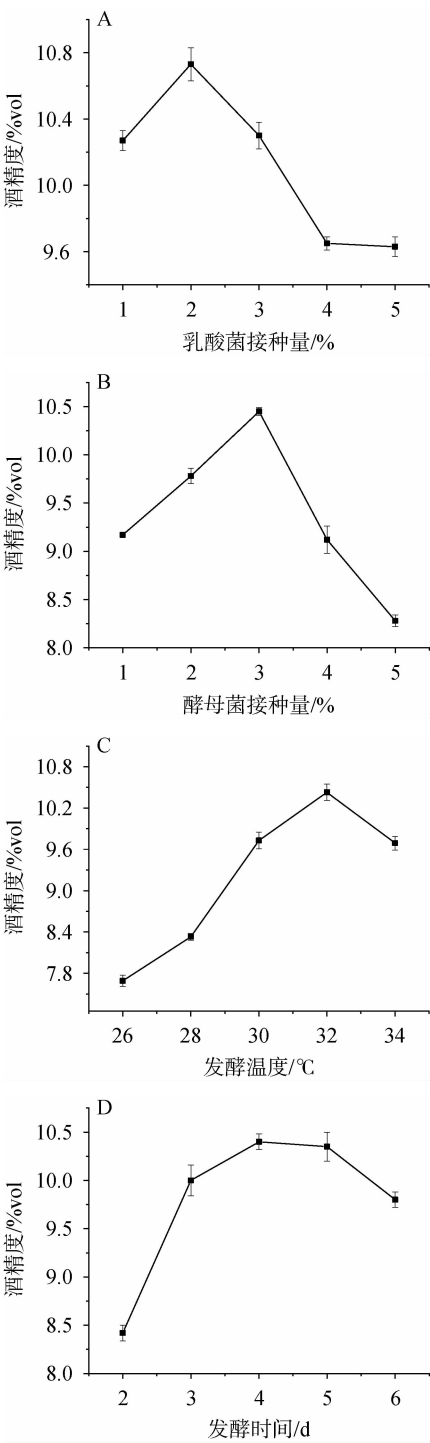


图1 乳酸菌接种量(A)、酵母菌接种量(B)、发酵温度(C)及发酵时间(D)对黑皮鸡枞菌-桑黄果酒酒精度的影响
Fig. 1 Effect of lactic acid bacteria inoculum (A), yeast inoculum (B), fermentation temperature (C) and time (D) on the alcohol content of *Hymenopellis raphanipes*-*Phellinus igniarius* fruit wine

由图1A可知,随乳酸菌接种量的变化,果酒的酒精度整体变化不大。当乳酸菌接种量在1%~2%时,果酒的酒精度呈上升趋势;在乳酸菌接种量为2%时酒精度达到最高值,为10.60%vol;乳酸菌接种量为2%~5%时,果酒酒精度呈下降趋势,这可能是由于乳酸菌与酵母菌在发酵中竞争碳源,过量的乳酸菌会消耗可发酵糖,导致酵母菌可用的糖源减少,从而降低酒精产量^[25]。因此,选择最佳乳酸菌接种量为2%。

由图1B可知,当酵母菌接种量为1%~3%时,果酒的酒精度呈上升趋势;在酵母菌接种量为3%时,酒精度到达最高值,为10.33%vol;酵母菌接种量为3%~5%时,酒精度呈下降趋势,这可能由于过量的酵母快速消耗葡萄糖等发酵底物,导致后续发酵缺乏营养物质支撑,乙醇转化能力降低^[26]。因此,选择最佳酵母菌接种量为3%。

由图1C可知,当发酵温度为26~32℃时,果酒的酒精度呈上升趋势;发酵温度为32℃时,酒精度最高,为10.43%vol;发酵温度为32~34℃时,酒精度呈下降趋势。因此,选择最佳发酵温度为32℃。

由图1D可知,当发酵时间为2~4 d时,果酒的酒精度呈上升趋势;在发酵第4天时达到最高值,为10.37%vol;发酵时间为4~6 d时,酒精度逐渐下降。因此,选择最佳发酵时间为4 d。

2.1.2 响应面试验结果

基于单因素试验结果,以乳酸菌接种量(A)、酵母菌接种量(B)、发酵温度(C)、发酵时间(D)为自变量,以酒精度(Y)为响应值,利用Design-Expert 13.0 软件设计4因素3水平的响应面试验,结果见表4。将表4数据进行二次多项回归拟合,得到回归方程 $Y=11.5+0.025A+0.175B-0.075C+0.175D+0.05AB-0.025AC-0.1AD+0.4BC-0.325BD+0.05CD-2.5625A^2-1.6625B^2-1.6875C^2-1.7375D^2$,为验证其可靠性,对方程进行方差分析,结果见表5。

表4 酒精发酵条件优化响应面试验设计与结果

Table 4 Design and results of response surface tests for alcohol fermentation conditions optimization

试验号	A	B	C	D	Y 酒精度/%vol
1	1	2	32	4	7.0
2	3	2	32	4	7.3
3	1	4	32	4	7.1
4	3	4	32	4	7.6
5	2	3	30	3	8.1
6	2	3	34	3	7.6
7	2	3	30	5	8.4
8	2	3	34	5	8.1
9	1	3	32	3	7.1
10	3	3	32	3	7.2
11	1	3	32	5	7.5

续表

试验号	A	B	C	D	Y 酒精度/%vol
12	3	3	32	5	7.2
13	2	2	30	4	8.5
14	2	4	30	4	7.9
15	2	2	34	4	7.7
16	2	4	34	4	8.7
17	1	3	30	4	7.3
18	3	3	30	4	7.2
19	1	3	34	4	7.3
20	3	3	34	4	7.1
21	2	2	32	3	7.2
22	2	4	32	3	8.5
23	2	2	32	5	8.3
24	2	4	32	5	8.3
25	2	3	32	4	11.7
26	2	3	32	4	11.2
27	2	3	32	4	11.4
28	2	3	32	4	11.5
29	2	3	32	4	11.7

表5 酒精发酵条件优化回归模型方差分析

Table 5 Variance analysis of regression model for alcohol fermentation conditions optimization

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	67.01	14	4.79	101.52	<0.000 1	**
A	0.007 5	1	0.007 5	0.16	0.696 0	
B	0.367 5	1	0.367 5	7.80	0.014 4	*
C	0.067 5	1	0.067 5	1.43	0.251 3	
D	0.367 5	1	0.367 5	7.80	0.014 4	*
AB	0.010 0	1	0.010 0	0.21	0.652 2	
AC	0.002 5	1	0.002 5	0.05	0.821 2	
AD	0.040 0	1	0.040 0	0.84	0.372 6	
BC	0.640 0	1	0.640 0	13.58	0.002 5	**
BD	0.422 5	1	0.422 5	8.96	0.009 7	**
CD	0.010 0	1	0.010 0	0.21	0.652 2	
A ²	42.59	1	42.59	903.49	<0.000 1	**
B ²	17.93	1	17.93	380.29	<0.000 1	**
C ²	18.47	1	18.47	391.82	<0.000 1	**
D ²	19.58	1	19.58	415.38	<0.000 1	**
残差	0.660 0	14	0.047 1			
失拟项	0.480 0	10	0.048 0	1.07	0.519 1	
纯误差	0.180 0	4	0.045 0			
总和	67.67	28				

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

由表5可知,该回归模型极显著($P<0.01$),失拟项不显著($P>0.05$),决定系数 $R^2=0.990\ 2$,说明该模型拟合效果较

好,具有统计学意义。由 P 值可知,交互项 BC 、 BD 和二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 对黑皮鸡枞菌-桑黄果酒酒精度影响极显著($P<0.01$),一次项 B 、 D 对酒精度影响显著($P<0.05$),其他项对结果影响不显著($P>0.05$)。由 F 值可知,各因素对黑皮鸡枞菌-桑黄果酒酒精度的影响顺序依次为酵母菌接种量(B)=发酵时间(D)>发酵温度(C)>乳酸菌接种量(A)。

各个因素间交互作用对黑皮鸡枞菌-桑黄果酒酒精度影响的响应面及等高线见图2。响应面越陡峭、等高线形状趋于椭圆说明各因素间交互作用越大,反之则越小。由图2可知, BC 和 BD 间交互作用对酒精度影响的响应面均呈凸面,坡度较陡,且等高线呈椭圆形,说明酵母菌接种量(B)和发酵温度(C)、酵母菌接种量(B)和发酵时间(D)的交互作用对酒精度影响较大,这与方差分析结果一致。

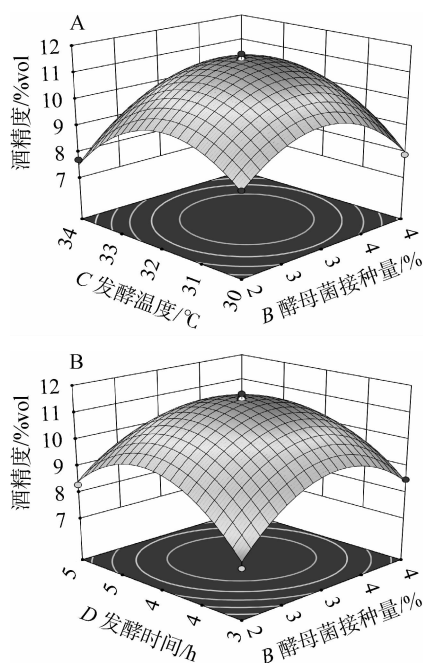


图2 各因素间交互作用对黑皮鸡枞菌-桑黄果酒酒精度影响的响应面及等高线

Fig. 2 Response surface plots and contour lines of effect of interaction between various factors on alcohol content of *Hymenopellis raphanipes*-*Phellinus igniarius* fruit wine

通过响应面法优化所得的酒精发酵最佳工艺条件为乳酸菌接种量2.506%、酵母菌接种量3.055%、酒精发酵温度31.961℃、酒精发酵时间4.031 d,此时酒精度预测值为10.865%vol。为方便实际操作,调整最佳酒精发酵工艺条件为乳酸菌接种量2%、酵母接种量3%、发酵温度32℃、酒精发酵时间4 d。在此条件下进行3次发酵工艺平行验证试验,所得果酒的酒精度实际值为 $(11.2\pm0.2)\%$ vol,与预测值接近,说明该发酵工艺可行。

2.2 醋酸发酵工艺优化

2.2.1 单因素试验结果

不同醋酸发酵因素对黑皮鸡枞菌-桑黄果醋总酸含量的影响见图3。由图3A可知,当醋酸菌接种量为10%~25%时,果醋总酸含量呈上升趋势;当醋酸菌接种量为25%时,总酸含量最高,为6.64 g/100 mL;接种量为25%~30%时,总酸含量呈下降趋势,且在发酵过程中出现密集泡沫。因此,选取最佳醋酸菌接种量为25%。

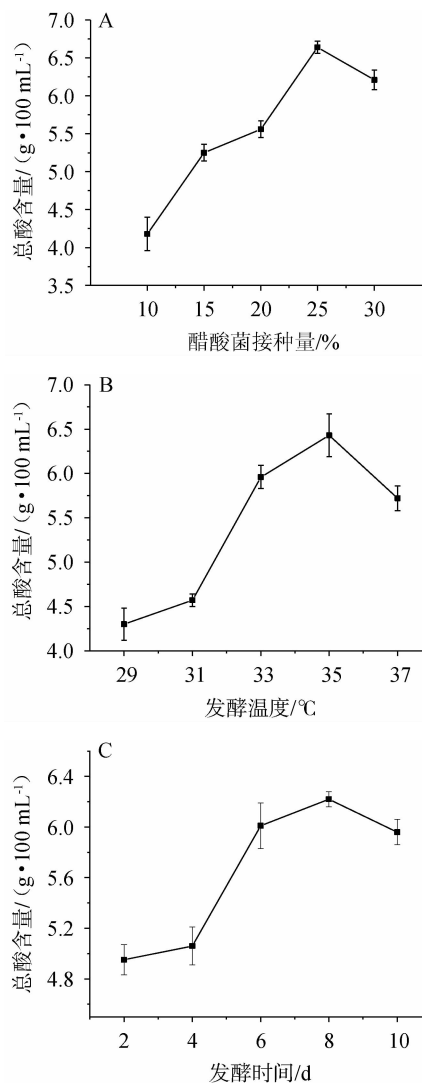


图3 醋酸菌接种量(A)、发酵温度(B)及发酵时间(C)对黑皮鸡枞菌-桑黄果醋总酸含量的影响

Fig. 3 Effect of acetic acid bacteria inoculum (A), fermentation temperature (B) and time (C) on the total acid content of *Hymenopellis raphanipes*-*Phellinus igniarius* fruit vinegar

由图3B可知,当发酵温度为29~35℃时,果醋总酸含量呈上升趋势;当发酵温度为35℃时,总酸含量达到最高,为6.43 g/100 mL;发酵温度为35~37℃时,总酸含量下降,这说明高温抑制了醋酸菌的生长速率,影响其产酸能力。因此,选取最佳醋酸发酵温度为35℃。

由图3C可知,当发酵时间为2~8 d时,果醋总酸含量呈上升趋势;当发酵时间为第8天时,果醋的总酸含量最

高,为6.22 g/100 mL;发酵时间为8~10 d时,总酸含量逐渐下降。因此,选取最佳发酵时间为8 d。

2.2.2 响应面试验结果

基于单因素试验结果,以总酸含量(Y)为响应值,以醋酸菌接种量(A)、发酵温度(B)、发酵时间(C)为自变量,采用Design-Expert 13.0 软件进行3因素3水平的响应面试验,结果见表6。对响应面试验结果进行二次多项回归拟合,得到黑皮鸡枞菌-桑黄果醋总酸含量与各因素间的回归方程 $Y=7.20+0.045A+0.125B+0.0825C+0.125AB+0.11AC+0.035BC-0.7625A^2-0.4275B^2-0.3775C^2$,为验证其可靠性,对方程进行方差分析,结果见表7。

表6 醋酸发酵条件优化响应面试验设计与结果				
Table 6 Design and results of response surface tests for acetic acid fermentation conditions optimization				
试验号	A 醋酸菌接种量/%	B 发酵温度/℃	C 发酵时间/d	总酸含量/(g·100 mL ⁻¹)
1	20	33	8	6.00
2	30	33	8	5.77
3	20	37	8	6.00
4	30	37	8	6.27
5	20	35	6	5.95
6	30	35	6	5.89
7	20	35	10	6.01
8	30	35	10	6.39
9	25	33	6	6.28
10	25	37	6	6.46
11	25	33	10	6.26
12	25	37	10	6.58
13	25	35	8	7.26
14	25	35	8	7.21
15	25	35	8	7.22
16	25	35	8	7.13
17	25	35	8	7.18

表7 醋酸发酵条件优化回归模型方差分析						
Table 7 Variance analysis of regression model for acetic acid fermentation conditions optimization						
变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	4.52	9	0.501 8	76.95	<0.000 1	**
A	0.016 2	1	0.016 2	2.48	0.159 0	
B	0.125 0	1	0.125 0	19.17	0.003 2	**
C	0.054 5	1	0.054 5	8.35	0.023 3	*
AB	0.062 5	1	0.062 5	9.58	0.017 4	*
AC	0.048 4	1	0.048 4	7.42	0.029 6	*
BC	0.004 9	1	0.004 9	0.751 4	0.414 8	
A ²	2.45	1	2.45	375.38	<0.000 1	**
B ²	0.769 5	1	0.769 5	118.00	<0.000 1	**
C ²	0.600 0	1	0.600 0	92.01	<0.000 1	**

续表						
变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
残差	0.045 6	7	0.006 5			
失拟项	0.036 2	3	0.012 1	5.14	0.073 8	不显著
纯误差	0.009 4	4	0.002 3			
总和	4.56	16				

由表7可知,该回归模型极显著($P<0.01$),失拟项不显著($P>0.05$),决定系数 $R^2=0.990\ 0$,说明该模型拟合效果较好,具有统计学意义。由P值可知,一次项B和二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 对总酸含量影响极显著($P<0.01$),一次项C、交互项AB、AC对总酸含量影响显著($P<0.05$),其他项对结果影响不显著($P>0.05$)。由F值可知,各因素对黑皮鸡枞菌-桑黄果醋的总酸含量影响顺序依次为发酵温度(B)>发酵时间(C)>醋酸菌接种量(A)。

各个因素间交互作用对黑皮鸡枞菌-桑黄果醋总酸含量影响的响应面及等高线见图4。由图4可知,AB和AC间交互作用对总酸含量影响的响应面均呈凸面,坡度较陡,且等高线呈椭圆形,说明醋酸菌接种量(A)和发酵温度(B)、醋酸菌接种量(A)和发酵时间(C)的交互作用对果醋总酸含量影响较大,这与方差分析结果一致。

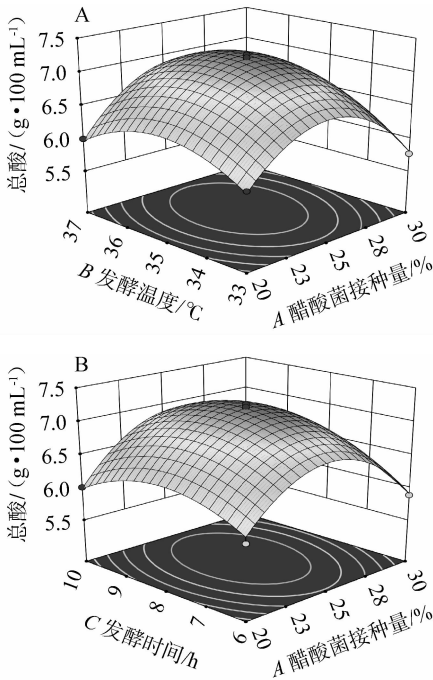


图4 各因素间交互作用对黑皮鸡枞菌-桑黄果醋总酸含量影响的响应曲面图及等高线

Fig. 4 Response surface plots and contour lines of effect of interaction between various factors on total acid content of *Hymenopellis raphanipes*-*Phellinus igniarius* fruit vinegar

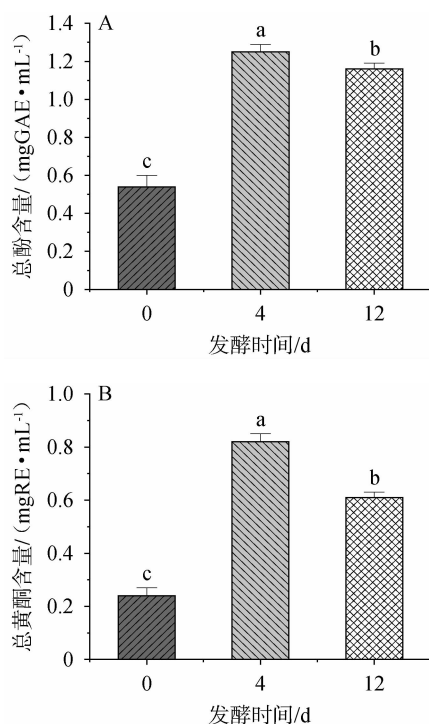
通过响应面法优化得到醋酸发酵最佳工艺条件为醋酸菌接种量25.256%、发酵温度35.319℃、发酵时间8.248 d,

此时总酸含量预测值为7.216 g/100 mL。结合实际操作可行性,调整黑皮鸡枞菌-桑黄果醋的醋酸发酵条件为醋酸菌接种量25%、发酵温度35℃、发酵时间8 d。在此条件下进行3次平行验证试验,所得果醋的总酸含量实际值为(7.3±0.16) g/100 mL,与模型预测值接近,说明响应面优化结果具有科学性和可参考性。

2.3 黑皮鸡枞菌-桑黄果醋的生物活性评价

2.3.1 黑皮鸡枞菌-桑黄果醋的总酚、总黄酮含量

在最佳发酵条件下制备得到黑皮鸡枞菌-桑黄果醋,测定不同发酵阶段总酚、总黄酮含量,结果见图5。由图5可知,果醋中总酚、总黄酮含量均随发酵时间的增加呈先升后降的趋势,发酵0~4 d时迅速升高,4~12 d时缓慢下降。第4天时总酚、总黄酮含量达到峰值,分别为1.21 mgGAE/mL、0.82 mgRE/mL,在发酵第12天时,总酚和总黄酮含量分别为1.09 mgGAE/mL和0.61 mgRE/mL,相比发酵第0天仍显著增加。说明发酵后的果醋功能成分含量明显提高。这可能是由于发酵液中的微生物代谢产生以及水果中的有机酸促进多酚类和黄酮类物质的溶出^[27]。



不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下同。

图5 不同发酵阶段黑皮鸡枞菌-桑黄果醋的总酚、总黄酮含量变化
Fig. 5 Changes in total phenol and total flavonoid contents of *Hymenopellis raphanipes*-*Phellinus igniarius* fruit vinegar at different fermentation stages

2.3.2 黑皮鸡枞菌-桑黄果醋的抗氧化活性

由图6可知,果醋铁离子还原能力、DPPH自由基清除率和ABTS⁺自由基清除率均随发酵时间的增加不断升高,表

明随着发酵时间的增加,果醋的抗氧化能力逐渐增强。发酵第12天时,果醋的铁离子还原能力、DPPH·自由基清除率和ABTS⁺自由基清除率分别达2.46 mmol/L、89%和97%,相比发酵前抗氧化活性显著提高($P<0.05$)。说明本研究所制备的黑皮鸡枞菌-桑黄果醋具有良好的抗氧化活性。

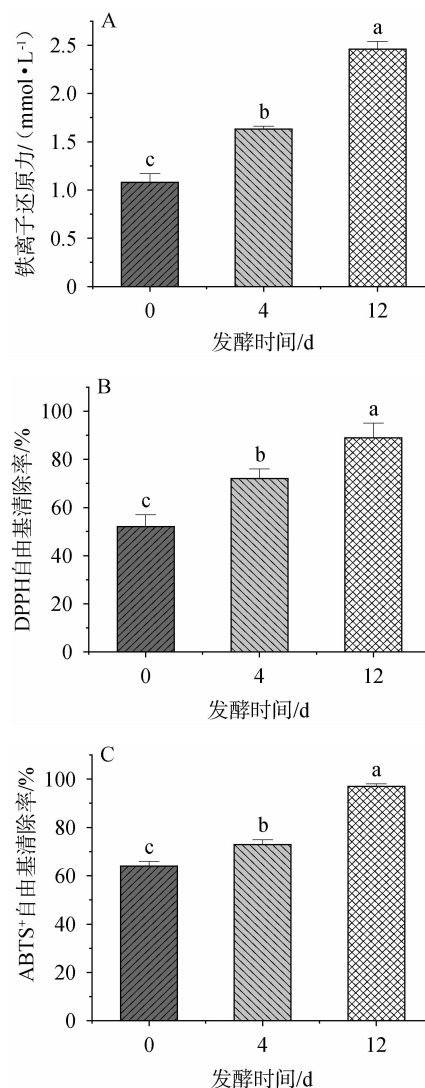


图6 不同发酵阶段黑皮鸡枞菌-桑黄果醋的抗氧化活性变化
Fig. 6 Changes in antioxidant activity of *Hymenopellis raphanipes*-*Phellinus igniarius* fruit vinegar at different fermentation stages

2.3.3 黑皮鸡枞菌-桑黄果醋的降糖降脂功效

由图7A、图7B可知,果醋的 α -淀粉酶抑制率和 α -葡萄糖苷酶抑制率均随发酵时间的增加显著升高($P<0.05$),其中0~4 d时增加较为迅速,4~12 d时增加趋于缓慢。发酵第12天时, α -淀粉酶抑制率和 α -葡萄糖苷酶抑制率分别为85.59%、80.31%,相比发酵前分别提高了3.8倍和2.4倍。这可能由于酒精发酵阶段酵母菌在无氧环境下将葡萄糖转化为酒精同时释放出多种抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性的物质^[28]。醋酸发酵阶段醋酸菌消耗乙醇产酸,发

酵液中的乙酸含量增加,乙酸也会抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的活性,从而使果醋中 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制率持续增加^[29]。

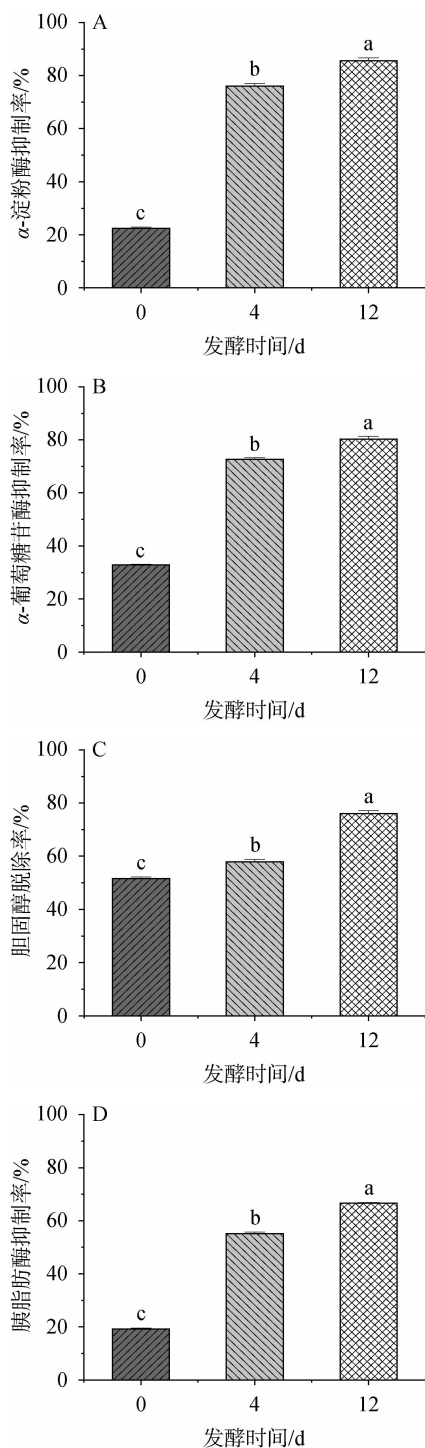


图7 不同发酵阶段黑皮鸡枞菌-桑黄果醋的降糖降脂功效变化

Fig. 7 Changes in hypoglycemic and hypolipidemic effect of *Hymenopellis raphanipes*-*Phellinus igniarius* fruit vinegar at different fermentation stages

由图7C、图7D可知,果醋的胆固醇脱除率和胰脂肪酶抑制率均随发酵时间的增加显著升高($P<0.05$)。发酵第

12天时,果醋的胆固醇脱除率和脂肪酶抑制率分别为76%和66.57%。这可能是因为发酵过程中微生物代谢会分解胆汁盐,促进胆固醇代谢,从而起到降脂的作用^[30]。综上,本研究所制备的黑皮鸡枞菌-桑黄果醋具有良好的降糖降脂功效。

2.4 黑皮鸡枞菌-桑黄果醋的感官评价结果

从色泽、气味、口感、酸度、澄清度五个方面对本研究所制备黑皮鸡枞菌-桑黄果醋进行感官评分。结果表明,经过12 d的发酵,最终得到的黑皮鸡枞菌-桑黄果醋色泽微黄,澄清透明且无沉淀,气味独特,融合了醋香和菌菇香气,口感柔和不刺激且酸度适中,无苦涩味,感官评分为97分。

3 结论

本研究以黑皮鸡枞菌与桑黄两种食药两用菌粉协同水果(梨、苹果、葡萄)为原料,利用四株具有降糖降脂功效的益生菌发酵制备果醋,通过单因素试验和响应面法优化发酵工艺,并对所制备果醋进行生物活性评价。结果表明,酒精发酵最佳工艺为乳酸菌接种量2%、酵母菌接种量3%、发酵温度32℃、发酵时间4 d。在此优化条件下,酒精度为 $(11.2\pm0.2)\%$ vol。醋酸发酵最佳工艺为醋酸菌接种量25%,醋酸发酵温度35℃、醋酸发酵时间8 d。在此条件下,黑皮鸡枞菌-桑黄果醋总酸含量达 (7.3 ± 0.16) g/100 mL,感官评分97分,酸味柔和且口感独特。采用最佳工艺发酵后的果醋,其总酚、总黄酮含量分别为1.09 mgGAE/mL和0.61 mgRE/mL。铁离子还原力达到2.46 mmol/L, DPPH自由基和ABTS⁺自由基清除力分别达到89%和97%。 α -淀粉酶抑制率和 α -葡萄糖苷酶抑制率为85.59%与80.31%;胆固醇清除率、胰脂肪酶抑制率分别为76%、66.57%。综上,采用乳酸菌和醋酸菌混合发酵的黑皮鸡枞菌-桑黄果醋可显著提高体外抗氧化能力,具有改善血糖血脂的功能,本研究为食药两用菌复合发酵产品的开发提供了理论依据和技术支持。

参考文献:

- [1] 刘秋平,庞黎明,赵小林,等. 5种野生食用菌营养价值及安全性评价[J]. 食品研究与开发, 2025, 46(8): 205-210.
- [2] 罗晓莉,吴素蕊,华蓉,等. 6种常见野生食用菌的营养功能特性分析及产业发展建议[J]. 中国食用菌, 2024, 43(2): 1-10.
- [3] 谷莉,高琪,严冬,等. 我国食用菌育种研究现状[J]. 蔬菜, 2025(6): 27-42.
- [4] 梁锡坤,刘志锋,林晓霞,等. 黑皮鸡枞菌蛋白水解工艺优化及成分分析[J]. 现代牧业, 2024, 8(3): 42-50.
- [5] 田怡,肖光利,肖裕玲,等. 桑黄菌丝体红枣酸奶配方优化及风味物质分析[J]. 食品工业, 2025, 46(1): 61-67.
- [6] 许世林,李佳川,何晓磊,等. 响应面法优化石榴保健果醋发酵工艺及其降糖降脂活性[J]. 中国酿造, 2019, 38(3): 99-103.
- [7] 杜丽娟,孙钦菊,成显波,等. 香蕉醋的发酵工艺优化及其降血脂和降血糖功能研究[J]. 保鲜与加工, 2024, 24(6): 62-73.
- [8] 王付转,史雨梦,魏培培,等. 混合果汁发酵饮料的研制[J]. 农产品加

- 工,2024(8):5-9.
- [9] 徐彩芳. 菌果加工副产物发酵型醋饮料制备工艺研究[D]. 保定:河北大学,2010.
- [10] 魏哲珍,李晓松. 响应面分析黑莓灵芝醋加工调制与优化研究[J]. 中国食品添加剂,2019,30(9):55-61.
- [11] 熊巍. 木瓜灵芝果醋的研发及其功能成分分析[D]. 武汉:武汉工业学院,2011.
- [12] 周森林,周文月,杨明龙,等. 柚子柠檬葛根复合果醋的研制及其工艺优化[J]. 中国调味品,2024,49(11):93-101.
- [13] 杨晓华,洪嘉淇,王临好,等. 降糖活性乳酸菌的筛选及对2型糖尿病小鼠的改善作用[J]. 食品科学,2025,46(8):151-61.
- [14] 庞情,刘四新,余森艳,等. 百香果全果制备果醋发酵工艺研究[J]. 中国调味品,2023,48(5):98-103.
- [15] 王婷婷. 香蕉果醋加工工艺及抗氧化性研究[D]. 昆明:昆明理工大学,2012.
- [16] 谭晓舒,吴建文,梨贵卿,等. 火麻仁油总酚含量福林酚测定法的优化[J]. 食品研究与开发,2021,42(2):166-173.
- [17] 王梅燕,张君,陈梦婷,等. 橘皮总黄酮纯化工艺优化及其抗氧化活性与降糖活性评价[J]. 粮食与油脂,2025,38(5):120-125.
- [18] 马胜梅. 益生菌混菌发酵高酸度桑椹果醋的工艺研究[D]. 镇江:江苏大学,2020.
- [19] 陈春风. 红茶醋发酵菌株的筛选及发酵工艺的研究[D]. 武汉:华中农业大学,2022.
- [20] 冯怡婷,何洋,安琪尔,等. 云南甜米酒中乳酸菌的分离鉴定及其发酵甜米酒的抗氧化活性、挥发性成分研究[J]. 食品工业科技,2025,46(21):238-248.
- [21] 刘祎,张瀛心,苏冬雨,等. 三种黄酮对 α -淀粉酶抑制活性及其抑制机制研究[J]. 中国食品学报,2025,25(5):166-174.
- [22] 陈家领,王菁,林思敏,等. 基于代谢组学和网络药理学的新型康普茶组分分析及其调节代谢综合征功效预测[J]. 食品科学,2025,46(8):247-258.
- [23] 王巍. 具有降胆固醇功能益生菌的筛选[D]. 哈尔滨:黑龙江大学,2009.
- [24] 王泉. 沙棘叶中酚类物质的提取、封装及应用研究[D]. 西安:西北大学,2021.
- [25] 李先胜,姜铁民,陈历俊. 发酵乳中酵母菌和乳酸菌生长的相互影响[J]. 食品工业科技,2012,33(17):139-141.
- [26] FUTA Y, TAISUKE S, NOBUYUKI O, et al. Improvement of ethanol and 2,3-butanediol production in *Saccharomyces cerevisiae* by ATP wasting [J]. **Microb Cell Fact**, 2023, 22(1): 204.
- [27] DOU Z M, CHEN C, FU X, et al. A dynamic view on the chemical composition and bioactive properties of mulberry fruit using an *in vitro* digestion and fermentation model[J]. **Food Funct**, 2022, 13(7): 4142-4157.
- [28] WALKER G M, STEWART G G. *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages[J]. **Beverages**, 2016, 2(4): 30.
- [29] FATOKI O, ONILUDE A, EKANOLA Y, et al. Optimization of alpha-amylase inhibitor production in solid state fermentation[J]. **Front Pharmacol**, 2023, 14: 1073754.
- [30] BEGLEY M, HILL C, GAHAN C G. Bile salt hydrolase activity in probiotics[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2006, 72(3): 1729-1738.