

黄酒米浆水制备农用酵素营养液发酵过程中营养成分的变化

方 晟^{1,2}, 周紫琳¹, 郑凤丽¹, 王珍珍^{2,3,4}, 毛建卫^{2,3,4}, 单之初⁵

(1. 绍兴文理学院元培学院医药与健康分院, 绍兴 312000; 2. 浙江省农产品化学与生物加工技术重点实验室, 杭州 310023; 3. 浙江省农业生物资源生化制造协同创新中心, 杭州 310023; 4. 浙江科技学院生物与化学工程学院/轻工学院食品科学与工程系, 杭州 310023; 5. 浙江塔牌绍兴酒有限公司, 绍兴 312000)

摘 要: 黄酒米浆水是黄酒酿造浸米工序中的副产物, 属于高浓度有机废水, 用之是宝, 弃之严重污染环境。采用米浆水代替清水作为配料水, 以叶菜类废弃物包括萝卜叶、白菜叶和莴笋叶为植物原料, 混合红砂糖, 自然发酵制备农用酵素营养液, 研究其发酵过程中主要营养成分的变化规律。结果表明, 利用黄酒米浆水制备的农用酵素营养液各营养成分在发酵过程中显著高于用清水制备的对照组 ($P<0.05$)。不同植物材料制备的米浆水农用酵素营养液各营养成分变化趋势类似, 总糖含量呈下降趋势, 钾离子含量呈先升高后降低再升高变化, 总氮、总磷、总酸和游离氨基酸含量整体均呈上升趋势; 以萝卜叶农用酵素营养液为例, 发酵 90 d 时, 总糖含量下降 76.68%, 总氮、总磷、钾离子、总酸和游离氨基酸总量分别上升 40.56%、53.58%、22.83%、33.08% 和 183.4%; 17 种游离氨基酸中丙氨酸含量最高, 为 3 677.4 mg·L⁻¹, 提高 638.6%。不同植物材料制备的农用酵素营养液均含有较丰富的养分, 但养分含量差异明显 ($P<0.05$); 其中萝卜叶农用酵素营养液发酵各时段总氮、总磷、总糖和总酸含量的平均值较高, 分别为 4.67 mg·mL⁻¹、628.20 mg·L⁻¹、5.22% 和 13.30 g·L⁻¹; 萝卜叶农用酵素营养液发酵 90 d 时游离氨基酸总量最高, 为 14 157.3 mg·L⁻¹; 莴笋叶农用酵素营养液发酵各时段钾离子含量平均值较高, 达到 95.22 mmol·L⁻¹。

关键词: 农用酵素营养液; 黄酒米浆水; 营养成分

中图分类号: TQ446; TS261.9

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2018)06-1004-08

Changes in nutrition components of agricultural Jiaosu nutrient solutions produced from rice milk during fermentation process

FANG Sheng^{1,2}, ZHOU Zilin¹, ZHENG Fengli¹, WANG Zhenzhen^{2,3,4}, MAO Jianwei^{2,3,4}, SHAN Zhichu⁵

(1. Branch College of Medicine and Health, Yuanpei College Shaoxing University, Shaoxing 312000; 2. Key Laboratory of Agricultural Products Chemical and Biological Processing Technology of Zhejiang Province, Hangzhou 310023; 3. Zhejiang Provincial Collaborative Innovation Center of Agricultural Biological Resources Biochemical Manufacturing, Hangzhou 310023; 4. School of Biological and Chemical Engineering/School of Light Industry, Zhejiang University of Science & Technology, Hangzhou 310023; 5. Zhejiang Pagoda Brand Shaoxing Rice Wine Co.Ltd., Shaoxing 312000)

Abstract: Rice milk, the byproduct from producing yellow rice wine, is a kind of high concentration organic wastewater that could result in severe water pollution. In this study, changes in main nutrition components of agricultural Jiaosu nutrient solutions, which were fermented using rice milk instead of water and vegetable wastes (including radish leaves, cabbage leaves, and lettuce leaves), mixed with brown sugar as substrate during fermentation process, were investigated. The results showed that: all main nutrition components in solutions produced from rice milk were significantly greater than those of the control group ($P<0.05$); for solutions produced by different vegetable wastes, the changes of main nutrition components were similar. During fermentation, the contents of free amino acid, total phosphorus, total nitrogen, potassium ion content and total acid showed an increasing trend, while the level of total sugar dropped, potassium ion content rose firstly then decreased and then rose again; for instance, in solutions produced from radish leaves and rice milk after 90 days of fermentation, the total amount of sugar decreased

收稿日期: 2018-03-10

基金项目: 浙江省重点研发计划项目(2017C02009), 国家级大学生创新创业训练计划项目(201710349024), 浙江省农业生物资源生化制造协同创新中心开放基金项目(2016KF0040, 2016KF0114)和绍兴市科技计划项目(2014B70031)共同资助。

作者简介: 方晟, 讲师。E-mail: fany719@126.com

by 76.68 %, whereas the amount of total nitrogen, total phosphorus, potassium ion content, total acid and total free amino acid increased by 40.56 %, 53.58 %, 22.83 %, 33.08 % and 183.4 %, respectively; Alanine increased the most among the 17 free amino acids, grown by 638.6% with the concentration of $3\ 677.4\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. We also found a significant difference in nutrition components between solutions generated from different vegetable wastes including radish leaves, cabbage leaves, and lettuce leaves ($P<0.05$); average values of total nitrogen, total phosphorus, total sugar and total acid from radish leaf during fermentation period were around $4.67\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $628.20\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $5.22\ %$ and $13.30\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively, which are higher than the levels of other nutrition components. The total free amino acid content in solution after 90 days of fermentation was $14\ 157.3\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, which was also higher than those of the rest treatments. On the contrary, lettuce leaf Jiaosu nutrient solution had a higher potassium ion content, with the average amount of $95.22\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ in the period of fermentation.

Key words: agricultural Jiaosu nutrient solution; rice milk; nutrition component

农用酵素营养液是以天然植物组织或经济作物残体废弃物及加工副产物如叶片、花朵和果实等为主要原料,按一定比例加入糖类物质和水,经多种有益菌发酵而成的植物酵素制剂,含有作物所需的氮、磷、钾和氨基酸等营养物质和酚类等生长调节物质,可用于蔬菜、果树、花卉和中草药等的叶喷或根施,具有促进作物生长发育、增强作物对病虫害抗性等功效^[1-3]。农用酵素营养液制备工艺的影响因素众多,其发酵过程缺乏标准化调控手段,导致产品品质和功效差异较大,而发酵原料和发酵时间是影响农用酵素营养液品质的关键因素^[4-5]。因此,有必要开展对不同原料农用酵素营养液发酵过程营养成分的研究,探究其发酵阶段主要营养成分的变化规律,为农用酵素营养液发酵过程的有效调控提供依据。

黄酒米浆水是黄酒酿造浸米工序中的副产物,是黄酒生产的主要废弃物,属于高浓度有机废水。同时,米浆水中含有丰富的氨基酸、蛋白质、淀粉、糖类、脂肪、维生素、矿物质和微量元素等等,还有大量的乳酸菌、酵母菌等有益菌。因此,生产过程中米浆水未经妥善处置和利用而直接排放,不但会造成环境的危害,还会导致资源的浪费。现有的黄酒米浆水的资源化利用程度较低,其净化处理则普遍采用好氧、厌氧好氧联合等生化处理工艺或吸附、混凝和离子交换等物化处理工艺,但相应的处理成本、设备投入高昂。米浆水的处置和回收利用仍是多数黄酒企业亟待解决的主要问题之一^[6-7]。

本研究采用黄酒米浆水代替清水,以菜市场每天产生的大量叶菜类废弃物萝卜叶、白菜叶和莴笋叶为植物原料,混合红糖,自然发酵制备农用酵素营养液,目前鲜见相关报道。通过研究发酵过程中17种游离氨基酸、总氮、总磷、钾离子、总糖和总酸含量的变化规律,探讨黄酒米浆水、植物原料种类及发酵时间对农用酵素营养液主要营养成分的影

响,以期为实现黄酒米浆水和作物残体废弃物的资源化高值利用,以及解决农用酵素营养液的发酵机理、产品质量控制等方面存在的问题提供一定的技术依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

萝卜叶、白菜叶、莴笋叶,红砂糖,市场采购;黄酒米浆水(糯米浸米13 d),由浙江省塔牌绍兴酒有限公司提供;乙腈,色谱纯;游离氨基酸标准品(HPLC \geq 98%)、异硫氰酸苯酯(HPLC \geq 98%)、葡萄糖标准品(HPLC \geq 98%)、三乙胺、正己烷、蒽酮、邻苯二甲酸氢钾、钼酸铵、磷酸二氢钾、亚铁氰化钾、硝酸钾、乙二醇、冰乙酸、硫脲、硫酸锌和碱性过硫酸钾等,均为分析纯。

高效液相色谱仪,离心机,紫外可见分光光度计,钾离子选择性电极,手提式压力蒸汽灭菌锅。

1.2 试验方法

1.2.1 农用酵素营养液的制备 用无菌水冲洗萝卜叶、白菜叶和莴笋叶植物材料,在无菌操作台中自然晾干。按照红砂糖:植物材料:黄酒米浆水=1:3:9的比例(质量比),先将红砂糖与植物材料混匀,置入消毒后干燥的发酵罐中压实,再向发酵罐中加入黄酒米浆水,用透气材料封住发酵罐后加盖,在常温下发酵;用去离子水代替黄酒米浆水,采用萝卜叶和红砂糖为原料,按照上述方法及配比制备对照组农用酵素营养液;每组试验重复3次。

1.2.2 农用酵素营养液发酵过程中营养成分的测定

发酵0 d起,每15 d对农用酵素营养液取样至第90天,样品经高速离心机 $6\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min后,测定其中总氮、总磷、钾离子、总糖和总酸的含量,分析其变化规律。总氮含量测定采用碱性过硫酸钾消解紫外法^[8];总磷含量测定采用钼酸铵分光光度法^[9];钾离子含量测定采用离子选择性

电极法^[10]；总糖含量测定采用蒽酮比色法^[11]；总酸含量测定采用酸碱滴定法^[12]。

发酵 0 d、45 d 和 90 d 对农用酵素营养液取样，采用高效液相色谱法测定 17 种游离氨基酸含量^[13]。色谱条件：色谱柱型号：C18，5 μm ，4.0 mm \times 250 mm；流速：1.0 mL \cdot min⁻¹；柱温：40 $^{\circ}$ C；检测波长：25 nm；流动相：0.02 mol \cdot L⁻¹ 乙酸钠、乙腈和水梯度洗脱。

1.2.3 数据处理 采用 SPSS18.0 进行数据分析，用单因子方差分析 (ANOVA) 及 Duncan 检验法 ($P < 0.05$) 研究指标间的差异。

2 结果与分析

2.1 农用酵素营养液发酵过程中总氮含量的变化

由表 1 可见，Tr4 (萝卜叶+清水) 的总氮含量

在发酵过程中呈不规则变化，且变化明显 ($P < 0.05$)；其余处理的总氮含量在发酵 0~45 d 之间出现波动后随发酵进行持续上升 ($P < 0.05$)，其中 Tr3 (莴笋叶+米浆水) 发酵 90 d 时的总氮含量最高，为 (5.76 \pm 0.1) mg \cdot mL⁻¹，相较 0 d 增长 54.67%。可见发酵时间对农用酵素营养液总氮含量有一定影响。罗蕊等^[14]对不同发酵时间下的梨果实源营养液进行测定，发现发酵 45 d 时总氮含量最高，达到 10.01 mg \cdot mL⁻¹。发酵各时段总氮含量平均值为：Tr1 (4.67 mg \cdot mL⁻¹) > Tr3 (4.41 mg \cdot mL⁻¹) > Tr2 (4.37 mg \cdot mL⁻¹) > Tr4 (0.92 mg \cdot mL⁻¹)。Tr4 (萝卜叶+清水) 总氮含量从发酵 0 d 时的 (0.33 \pm 0.01) mg \cdot mL⁻¹ 升高到 90 d 时的 (1.16 \pm 0.00) mg \cdot mL⁻¹，在发酵过程中显著低于以米浆水代替清水的其他处理 ($P < 0.05$)。

表 1 不同原料制备的农用酵素营养液发酵过程中总氮含量变化

Table 1 Changes of total nitrogen in agricultural Jiaosu nutrient solutions during fermentation mg \cdot mL⁻¹

| 处理 Treatments | 发酵时间/d Fermentation time | | | | | | | 平均值 Mean value |
|------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------|
| | 0 | 15 | 30 | 45 | 60 | 75 | 90 | |
| 1 | 3.88 \pm 0.00 ^{f1} | 4.85 \pm 0.00 ^e | 4.20 \pm 0.02 ^{e1} | 4.25 \pm 0.01 ^{d1} | 4.83 \pm 0.00 ^{c1} | 5.22 \pm 0.01 ^{b1} | 5.46 \pm 0.02 ^{a2} | 4.67 |
| 2 | 3.71 \pm 0.02 ^{g2} | 4.63 \pm 0.01 ^{c3} | 3.79 \pm 0.00 ^{f2} | 4.04 \pm 0.01 ^{e2} | 4.36 \pm 0.01 ^{d2} | 4.88 \pm 0.01 ^{b2} | 5.15 \pm 0.01 ^{a3} | 4.37 |
| 3 | 3.72 \pm 0.01 ^{e2} | 4.90 \pm 0.01 ^{c1} | 3.63 \pm 0.01 ^{f3} | 3.95 \pm 0.02 ^{d3} | 3.71 \pm 0.00 ^{e3} | 5.20 \pm 0.01 ^{b1} | 5.76 \pm 0.01 ^{a1} | 4.41 |
| 4(CK) | 0.33 \pm 0.01 ^{g3} | 0.87 \pm 0.00 ^{e4} | 1.31 \pm 0.02 ^{a4} | 0.80 \pm 0.00 ^{f4} | 1.03 \pm 0.00 ^{c4} | 0.97 \pm 0.01 ^{d3} | 1.16 \pm 0.00 ^{b4} | 0.92 |

注: Tr1: 米浆水与萝卜叶制备的农用酵素营养液; Tr2: 米浆水与白菜叶制备的农用酵素营养液; Tr3: 米浆水与莴笋叶制备的农用酵素营养液; Tr4: 清水与萝卜叶制备的农用酵素营养液。同行数据末尾不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)，相同小写字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)；同列数据末尾不同数字表示差异显著 ($P < 0.05$)，相同数字表示差异不显著 ($P > 0.05$)。下同。

Note: Tr1: agricultural Jiaosu nutrient solution produced from radish leaves and rice milk; Tr2: agricultural Jiaosu nutrient solution produced from cabbage leaves and rice milk; Tr3: agricultural Jiaosu nutrient solution produced from lettuce leaves and rice milk; Tr4: agricultural Jiaosu nutrient solution produced from radish leaves and water. Different small letters within the same row indicate significant difference ($P < 0.05$), while the same small letters indicates no significant difference ($P > 0.05$); different numbers within the same column indicates significant difference ($P < 0.05$), while the same numbers indicate no significant difference ($P > 0.05$). The same below.

表 2 不同原料制备的农用酵素营养液发酵过程中总磷含量变化

Table 2 Changes of total phosphorus in agricultural Jiaosu nutrient solutions during fermentation mg \cdot L⁻¹

| 处理 Treatments | 发酵时间/d Fermentation time | | | | | | | 平均值 Mean |
|------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------|
| | 0 | 15 | 30 | 45 | 60 | 75 | 90 | |
| 1 | 452.21 \pm 0.88 ^{g3} | 488.20 \pm 1.56 ^{f2} | 788.24 \pm 1.00 ^{a1} | 626.65 \pm 0.71 ^{e3} | 661.31 \pm 2.20 ^{d3} | 686.26 \pm 0.37 ^{c1} | 694.53 \pm 0.85 ^{b1} | 628.20 |
| 2 | 458.13 \pm 0.67 ^{f1} | 476.23 \pm 2.36 ^{e3} | 694.17 \pm 0.86 ^{a2} | 686.61 \pm 1.72 ^{b2} | 675.56 \pm 0.57 ^{d2} | 681.19 \pm 1.42 ^{c2} | 684.52 \pm 0.33 ^{b2} | 622.34 |
| 3 | 454.73 \pm 1.12 ^{e2} | 501.22 \pm 0.86 ^{f1} | 675.51 \pm 0.71 ^{d3} | 698.37 \pm 0.80 ^{a1} | 688.18 \pm 1.55 ^{b1} | 672.33 \pm 1.20 ^{e3} | 680.46 \pm 1.14 ^{c3} | 624.40 |
| 4(CK) | 0.22 \pm 0.00 ^{g4} | 0.84 \pm 0.00 ^{f4} | 0.99 \pm 0.00 ^{e4} | 0.93 \pm 0.00 ^{d4} | 1.04 \pm 0.01 ^{b4} | 0.91 \pm 0.00 ^{e4} | 1.06 \pm 0.00 ^{a4} | 0.86 |

2.2 农用酵素营养液发酵过程中总磷含量的变化

表 2 表明，各处理中农用酵素营养液的总磷含量总体均呈上升趋势，且在 0~30 d 之间增加最明显 ($P < 0.05$)，之后变化幅度减小。发酵 90 d 时 Tr1 (萝卜叶+米浆水) 的总磷含量最高，为 (694.53 \pm

0.85) mg \cdot L⁻¹，相较 0 d 时的 (452.21 \pm 0.88) mg \cdot L⁻¹ 增长 53.58%。发酵各时段总磷含量平均值为：Tr1 (628.20 mg \cdot L⁻¹) > Tr3 (624.40 mg \cdot L⁻¹) > Tr2 (622.34 mg \cdot L⁻¹) > Tr4 (0.86 mg \cdot L⁻¹)。Tr4 (萝卜叶+清水) 总磷含量从发酵 0 d 时的 (0.22 \pm 0.00)

mg·L⁻¹ 升高到 90 d 时的 (1.06±0.00) mg·L⁻¹, 远低于其他各处理 ($P<0.05$)。刘艳娜等^[15]发现 5 种芳香植物源营养液中薄荷营养液的总磷含量最高, 达到 0.27 mg·L⁻¹, 显著高于对照品南国春叶面肥。由此可见, 利用米浆水制备的农用酵素营养液总磷含量较高。植物材料中的磷大部分以核酸、磷脂和植

素等有机磷形态存在, 除米浆水本身总磷含量丰富外, 可能由于米浆水中大量益生菌产生的磷酸酶、蛋白酶等, 促进植物材料中有机磷水解为磷酸盐, 并分泌有机酸使难溶性磷酸盐溶解, 使液体中总磷含量增加^[16]。

表 3 不同原料制备的农用酵素营养液发酵过程中钾离子含量变化

Table 3 Changes of potassium ion content in agricultural Jiaosu nutrient solutions during fermentation mmol·L⁻¹

| 处理 Treatments | 发酵时间/d Fermentation time | | | | | | | 平均值 Mean value |
|------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------|
| | 0 | 15 | 30 | 45 | 60 | 75 | 90 | |
| 1 | 75.11±0.83 ^{d2} | 94.26±0.69 ^{c1} | 101.21±1.13 ^{b3} | 106.23±0.66 ^{a2} | 86.54±0.09 ^{d3} | 81.44±0.88 ^{e1} | 92.26±1.84 ^{c2} | 91.01 |
| 2 | 77.51±1.69 ^{d2} | 92.43±0.72 ^{b1} | 103.36±0.19 ^{a2} | 102.51±1.29 ^{a3} | 92.76±0.54 ^{b2} | 75.74±0.29 ^{d3} | 89.13±0.64 ^{c3} | 90.49 |
| 3 | 80.23±0.71 ^{e1} | 89.46±1.81 ^{d2} | 106.84±0.01 ^{b1} | 113.31±0.68 ^{a1} | 99.50±1.62 ^{c1} | 78.36±1.88 ^{e2} | 98.81±0.77 ^{c1} | 95.22 |
| 4(CK) | 8.32±0.23 ^{f3} | 18.90±0.56 ^{d3} | 29.54±1.46 ^{b4} | 31.75±0.35 ^{a4} | 21.27±0.06 ^{c4} | 11.62±0.80 ^{e4} | 18.72±0.92 ^{d4} | 20.02 |

表 4 不同原料制备的农用酵素营养液发酵过程中总糖含量变化

Table 4 Changes of total sugar in agricultural Jiaosu nutrient solutions during fermentation %

| 处理 Treatments | 发酵时间/d Fermentation time | | | | | | | 平均值 Mean value |
|------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------|
| | 0 | 15 | 30 | 45 | 60 | 75 | 90 | |
| 1 | 13.27±0.05 ^{a1} | 6.16±0.00 ^{b3} | 4.14±0.01 ^{c2} | 3.19±0.01 ^{e2} | 3.44±0.12 ^{d1} | 3.24±0.08 ^{e1} | 3.09±0.00 ^{f1} | 5.22 |
| 2 | 10.97±0.01 ^{a3} | 4.59±0.14 ^{b4} | 3.59±0.00 ^{c3} | 1.27±0.00 ^{d4} | 1.26±0.02 ^{d4} | 0.85±0.02 ^{e4} | 0.78±0.04 ^{f4} | 3.33 |
| 3 | 12.37±0.01 ^{a2} | 7.23±0.01 ^{b2} | 4.23±0.09 ^{c2} | 1.56±0.02 ^{d3} | 1.38±0.01 ^{e3} | 1.36±0.01 ^{e3} | 1.31±0.00 ^{e3} | 4.21 |
| 4(CK) | 12.33±0.11 ^{a2} | 7.45±0.00 ^{b1} | 5.03±0.08 ^{c1} | 3.34±0.00 ^{d1} | 2.33±0.01 ^{e2} | 2.11±0.02 ^{f2} | 2.25±0.01 ^{e2} | 4.98 |

表 5 不同原料制备的农用酵素营养液发酵过程中总酸含量变化

Table 5 Changes of total acid in agricultural Jiaosu nutrient solutions during fermentation g·L⁻¹

| 处理 Treatments | 发酵时间/d Fermentation time | | | | | | | 平均值 Mean value |
|------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------|
| | 0 | 15 | 30 | 45 | 60 | 75 | 90 | |
| 1 | 11.35±0.04 ^{e1} | 11.02±0.15 ^{f12} | 12.35±0.13 ^{d1} | 14.20±0.03 ^{c1} | 14.28±0.07 ^{c1} | 14.78±0.16 ^{b1} | 15.11±0.01 ^{a1} | 13.30 |
| 2 | 11.27±0.15 ^{e1} | 10.74±0.05 ^{d2} | 11.33±0.19 ^{c2} | 13.26±0.03 ^{b2} | 13.83±0.44 ^{a12} | 13.99±0.25 ^{a2} | 13.87±0.01 ^{a3} | 12.61 |
| 3 | 10.97±0.06 ^{e2} | 11.36±0.14 ^{d1} | 11.44±0.01 ^{d2} | 13.17±0.27 ^{c2} | 13.38±0.08 ^{b2} | 13.66±0.38 ^{b2} | 14.17±0.16 ^{a2} | 12.59 |
| 4(CK) | 0.94±0.02 ^{d3} | 3.32±0.12 ^{c3} | 3.92±0.05 ^{b3} | 7.37±0.05 ^{a3} | 7.29±0.02 ^{a3} | 7.47±0.22 ^{a3} | 7.35±0.15 ^{a4} | 5.38 |

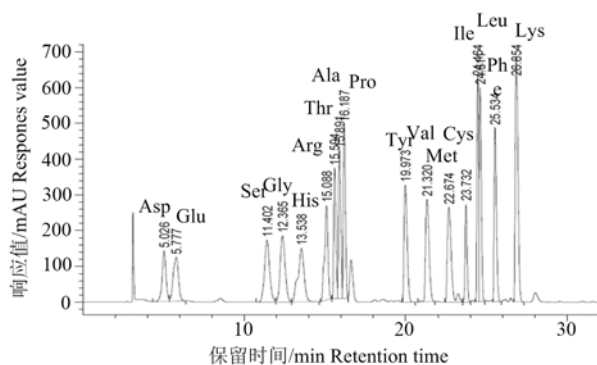


图 1 游离氨基酸标准品色谱图

Figure 1 Chromatograms of amino acids standard

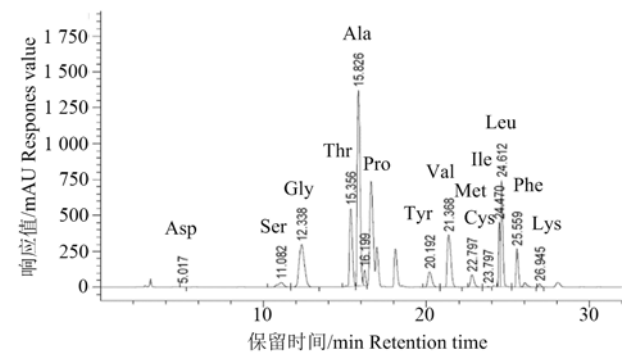


图 2 发酵 90 d 萝卜叶农用酵素营养液样品氨基酸色谱图

Figure 2 Amino acids chromatogram of agricultural Jiaosu nutrient solution produced from radish leaves after 90 days of fermentation

2.3 农用酵素营养液发酵过程中钾离子含量变化

如表 3 所示, 各处理中农用酵素营养液的钾离

子含量随发酵进行呈现先升高后下降再升高的趋势, 且变化明显 ($P<0.05$)。发酵 0~45 d 期间液

体中钾离子含量随植物材料的降解显著升高，被微生物吸收利用后逐渐降低，可能由于微生物衰亡后部分细胞自溶，发酵 90 d 时又回升。Tr2（白菜叶+米浆水）的钾离子含量于发酵 30 d 时达到最高，其余处理的钾离子含量均于发酵 45 d 时达到峰值，其中 Tr3（莴笋叶+米浆水）的最高，为 $(113.31 \pm 0.68) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

发酵各时段钾离子含量平均值为：Tr3 ($95.22 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) > Tr1 ($91.01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) > Tr2 ($90.49 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) > Tr4 ($20.02 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。Tr1（萝卜叶

+米浆水）的钾离子含量在发酵过程中显著高于对照 Tr4 ($P < 0.05$)，与余下两组比较，除 0 d 和 15 d 与 Tr2 差异不显著外，均存在显著性差异 ($P < 0.05$)，但钾离子含量水平相对接近。耿健等^[17]分析测定了孔雀草、紫苏、神香草、薄荷和香矢车菊 5 种芳香植物源营养液的矿质养分含量，发现神香草营养液中钾离子含量最高，达到 $589.01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。由于糯米中钾多以水溶性小分子形式在浸米过程中大量溶出，利用米浆水制备的农用酵素营养液钾离子含量较为丰富。

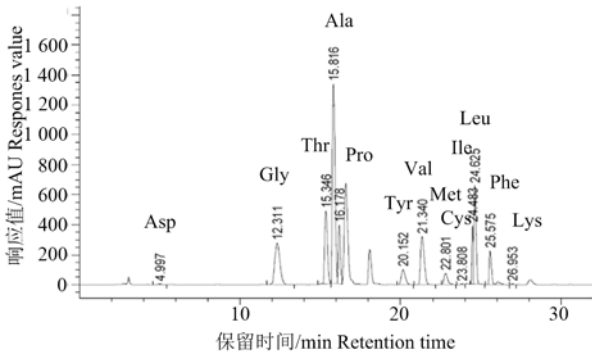


图 3 发酵 90 d 白菜叶农用酵素营养液样品氨基酸色谱图
Figure 3 Amino acids chromatogram of agricultural Jiaosu nutrient solution produced from cabbage leaves after 90 days of fermentation

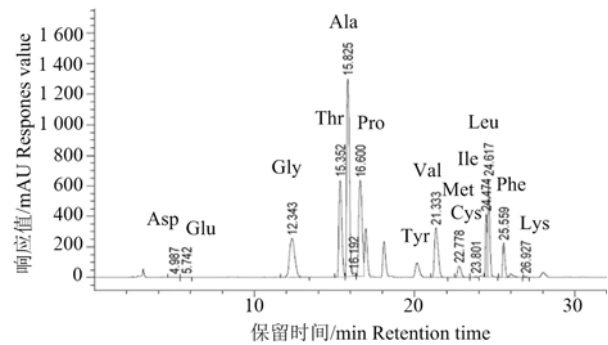


图 4 发酵 90 d 莴笋叶农用酵素营养液样品氨基酸色谱图
Figure 4 Amino acids chromatogram of agricultural Jiaosu nutrient solution produced from lettuce leaves after 90 days of fermentation

表 6 不同原料制备的农用酵素营养液发酵过程中 18 种游离氨基酸含量变化

Table 6 Changes of free amino acid contents in agricultural Jiaosu nutrient solutions during fermentation

| 氨基酸种类 Amino acid species | 游离氨基酸含量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Free amino acids content | | | | | |
|-----------------------------|---|-------------|-------------|-----------|-------------|-------------|
| | 处理 1 Tr1 | | | 处理 2 Tr2 | | |
| | 0 d | 45 d | 90 d | 0 d | 45 d | 90 d |
| Asp | 271.6±3.4 | ND | 21.3±0.7 | 252.6±1.1 | ND | 49.1±0.5 |
| Glu | 650.2±2.5 | 272.1±1.0 | ND | 660.1±3.9 | 49.3±0.1 | ND |
| Ser | 379.9±1.4 | 34.0±0.6 | 236.0±1.1 | 383.9±0.9 | 233.0±1.8 | ND |
| Gly | 175.2±2.8 | 449.9±1.0 | 1 283.4±4.9 | 163.3±0.9 | 378.7±0.4 | 1 166.0±1.6 |
| His | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| Arg | 576.5±2.8 | 59.2±1.4 | ND | 579.5±1.7 | 22.9±0.3 | ND |
| Thr | 122.2±2.9 | 1 370.5±3.4 | 2 258.7±2.4 | 126.2±0.6 | 983.9±0.3 | 2 011.0±1.9 |
| Ala | 497.9±0.6 | 1 969.5±2.9 | 3 677.4±1.8 | 487.7±1.8 | 1 741.8±2.7 | 3555.2±2.6 |
| Pro | 184.3±1.2 | 410.8±3.1 | 233.4±1.7 | 181.2±2.7 | 295.2±1.5 | 952.3±2.1 |
| Tyr | 285.4±1.5 | 404.2±3.3 | 740.5±1.3 | 292.5±1.6 | 357.3±2.6 | 711±1.1 |
| Val | 303.9±0.5 | 638.1±3.1 | 1 537.4±0.6 | 313.7±1.8 | 541.1±3.6 | 1 369.1±3.4 |
| Met | ND | ND | 427.7±0.9 | ND | ND | 386.2±0.8 |
| Cys | ND | 74.4±2.3 | 94.8±1.0 | ND | 75.0±0.2 | 89.1±0.5 |
| Ile | 645.2±0.7 | 1137.7±2.1 | 1 737.8±2.5 | 648.5±1.8 | 888.5±1.7 | 1 543.4±1.6 |
| Leu | 131.1±1.3 | 317.0±1.9 | 837.7±2.0 | 101.8±1.0 | 272.9±1.0 | 738.7±2.1 |
| Phe | 379.2±2.1 | 651.3±5.0 | 1 021.8±2.1 | 376.2±0.7 | 520.9±1.9 | 838.6±3.3 |
| Lys | 393.1±1.0 | 17.6±0.4 | 49.4±0.6 | 381.5±2.3 | 19.5±0.5 | 17.4±0.4 |
| 总量 Total | 4 995.7 | 7 806.3 | 14 157.3 | 4 948.7 | 6 380.0 | 13 427.3 |

续表 6 Continued table 6

| 氨基酸种类 Amino acid species | 游离氨基酸含量 Free amino acids content /mg·L ⁻¹ | | | | | |
|-----------------------------|--|-------------|-------------|-----------|------------|-----------|
| | 处理 3 Tr3 | | | 处理 4 Tr4 | | |
| | 0 d | 45 d | 90 d | 0 d | 45 d | 90 d |
| Asp | 286.6±0.7 | ND | 32.3±0.9 | 104.5±0.7 | 101.13±0.0 | 13.2±0.1 |
| Glu | 603.6±1.1 | 69.3±1.6 | 40.0±0.5 | 71.6±0.5 | 65.3±0.3 | 22.6±0.4 |
| Ser | 327.7±1.0 | 198.2±1.4 | ND | 22.3±0.2 | ND | ND |
| Gly | 153.2±0.2 | 366.2±0.8 | 1 117.8±1.6 | 67.5±0.3 | 336.1±0.5 | 442.5±0.3 |
| His | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| Arg | 583.4±0.2 | 16.1±0.7 | ND | ND | 45.1±0.9 | 12.3±0.1 |
| Thr | 125.2±0.1 | 1 213±1.1 | 2 690.9±1.7 | 24.6±0.4 | 199.7±1.4 | 336.2±0.6 |
| Ala | 463.4±1.5 | 1 694.7±2.0 | 3 474.9±1.1 | 86.7±0.1 | 132.5±2.1 | 221.6±0.6 |
| Pro | 210.3±2.9 | 242.6±1.9 | 52.3±0.9 | 34.5±0.3 | 55.6±0.2 | 22.1±1.1 |
| Tyr | 286.74±0.9 | 347.5±0.8 | 673.1±0.4 | 17.3±0.1 | 132±1.3 | 110.3±0.7 |
| Val | 313.1±1.1 | 532.0±1.3 | 1 382.1±1.8 | 11.6±0.4 | 421.3±0.9 | 433±0.6 |
| Met | ND | ND | 360.6±0.2 | ND | ND | ND |
| Cys | ND | 67.7±0.5 | 103.4±0.2 | ND | 32.1±0.6 | ND |
| Ile | 649.1±0.3 | 888.3±0.7 | 1 486.2±1.7 | 23.6±1.3 | 133.4±0.2 | 101.6±1.1 |
| Leu | 142.5±0.8 | 284.4±0.9 | 777.6±0.5 | 12.3±0.1 | 386.7±0.6 | 413.2±1.5 |
| Phe | 351.4±0.9 | 502.9±0.5 | 852.8±0.3 | 54.6±1.0 | 221.7±0.1 | 286.4±0.3 |
| Lys | 385.7±1.1 | 22.2±0.7 | 17.8±0.4 | 24.5±0.3 | 195.8±0.4 | 150.6±1.0 |
| 总量 Total | 4 881.9 | 6 445.1 | 13 061.8 | 555.6 | 2 458.4 | 2 565.6 |

注: Asp: 天冬氨酸; Glu: 谷氨酸; Ser: 丝氨酸; Gly: 甘氨酸; His: 组氨酸; Arg: 精氨酸; Thr: 苏氨酸; Ala: 丙氨酸; Pro: 脯氨酸; Tyr: 酪氨酸; Val: 缬氨酸; Met: 蛋氨酸; Cys: 胱氨酸; Ile: 异亮氨酸; Leu: 亮氨酸; Phe: 苯丙氨酸; Lys: 赖氨酸; Trp: 色氨酸。ND:未检出 (<1.0 mg·L⁻¹)

2.4 农用酵素营养液发酵过程中总糖含量的变化

如表 4 所示, 各处理中农用酵素营养液的总糖含量均在发酵 0~45 d 之间明显降低 ($P<0.05$), 这可能是因为发酵初期糖作为能源物质被微生物大量消耗, 同时乳酸菌等微生物分解糖产酸的速率较快, 产生如丙酮酸、柠檬酸以及苹果酸等重要的中间代谢物。随着总糖含量下降, 微生物增殖减缓, 使总糖含量渐趋于稳定^[18]。Tr2 (白菜叶+米浆水) 的总糖含量下降幅度较高, 发酵 90 d 时总糖含量为 (0.78±0.04)%, 相较发酵 0 d 时降低 92.85%。

Tr1 (萝卜叶+米浆水) 和 Tr4 (萝卜叶+清水) 发酵各时段的总糖含量高于其他处理, 且除发酵 0 d 的 Tr3 和 Tr4 及发酵 30 d 的 Tr1 和 Tr3 外, 各处理间总糖含量差异显著 ($P<0.05$)。农用酵素营养液中总糖含量主要来源于添加的糖类物质, 但可能由于植物材料携带的微生物种类和形态以及发酵过程中微生物间协同作用能力不同导致糖分解速率存在差异。发酵过程中总糖含量平均值为: Tr1 (5.22%) > Tr4 (4.98%) > Tr3 (4.21%) > Tr2 (3.33%)。

2.5 农用酵素营养液发酵过程中总酸含量的变化

由表 5 可知, 各处理中农用酵素营养液的总酸

含量都呈上升变化, 除 Tr3 外均在发酵 0~45 d 之间变化最明显 ($P<0.05$)。其中, Tr4 (萝卜叶+清水) 和 Tr2 (白菜叶+米浆水) 的总酸含量于发酵 45 和 60 d 后趋于稳定。农用酵素营养液中广泛存在米浆水携带或环境中接入的乳酸菌和醋酸菌等微生物, 可通过自身 TCA 循环产生以氨基酸、琥珀酸和腐植酸等为主的多种有机酸^[19-20]; 而随着总酸含量升高, 乳酸菌等微生物生长受到抑制, 导致其生长和产酸速度减缓^[21]。发酵 90 d 时 Tr1 (萝卜叶+米浆水) 的总酸含量最高, 为 (15.11±0.01) g·L⁻¹, 相较 0 d 增长 33.08%。发酵过程中 Tr4 (萝卜叶+清水) 的总酸含量明显低于以米浆水代替清水的其他处理 ($P<0.05$)。浸米工序后期米浆水中比例最大的微生物为乳酸菌, 其中乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 含量占 90%, 其代谢的主要产物是以乳酸为主的有机酸^[22-23]。发酵各时段总酸含量平均值为: Tr1 (13.30 g·L⁻¹) > Tr2 (12.61 g·L⁻¹) > Tr3 (12.59 g·L⁻¹) > Tr4 (5.38 g·L⁻¹)。

2.6 农用酵素营养液发酵过程中游离氨基酸含量的变化

图 1 为游离氨基酸标准品色谱图, 图 2、图 3

和图4分别为发酵90d时萝卜叶、白菜叶和莴笋叶农用酵素营养液样品氨基酸色谱图。从图1—图4中可知,利用米浆水和不同叶菜类废弃物制备的农用酵素营养液中游离氨基酸成分丰富。

从表6可见,随发酵时间延长,各处理中农用酵素营养液的游离氨基酸总量均显著上升($P < 0.05$)。发酵90d时Tr1(萝卜叶+米浆水)的游离氨基酸总量最高,为 $14\ 157.3\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,较0d的 $4\ 995.7\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,提高183.4%。植物材料在降解过程中,微生物与蛋白质接触增加,蛋白质经酶解以及发酵微生物细胞自溶产生大量氨基酸。发酵90d时,各处理中Asp(天冬氨酸)、Glu(谷氨酸)和Ser(丝氨酸),Tr1、Tr2、Tr3的Arg(精氨酸)和Lys(赖氨酸)以及Tr4的Pro(脯氨酸)含量较发酵0d显著下降($P < 0.05$),可能是这几种氨基酸在发酵过程中被微生物不断利用进行同化作用,而产生量较少,导致最终浓度降低;其余各种氨基酸在发酵90d时均有不同幅度上升,其中Tr1、Tr2和Tr3的Ala(丙氨酸)含量最高,Thr(苏氨酸)含量次之。以Tr1为例,发酵90d时Ala(丙氨酸)含量为 $(3\ 677.4 \pm 1.8)\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,较发酵0d提高638.6%;Thr(苏氨酸)含量为 $(2\ 258.7 \pm 2.4)\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,较发酵0d提高1748.4%。张夫道和孙羲^[24]以水稻为试材研究8种氨基酸的对水稻幼苗的营养作用,张政^[25]以黄瓜为试材研究5种不同极性氨基酸对黄瓜的营养效应,均发现作物对丙氨酸的吸附能力强于谷氨酸等其他种类氨基酸。而Tr4的Gly(甘氨酸)、Val(缬氨酸)和Leu(亮氨酸)含量较高,发酵90d时浓度分别为 $(442.5 \pm 0.3)\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $(433 \pm 0.6)\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $(413.2 \pm 1.5)\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。Tr4(萝卜叶+清水)发酵90d时游离氨基酸总量为 $2\ 565.6\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,远低于Tr1(萝卜叶+米浆水)($P < 0.05$)。米浆水中微生物数量巨大,除含有少量酵母菌和醋酸菌外,优势细菌为乳杆菌,大部分乳杆菌如干酪乳酸杆菌(*L. Casea*)、短乳酸杆菌(*L. brevas*)、植物乳酸杆菌(*L. planturum*)等具有较强酸性内肽酶、氨肽酶、羧肽酶、寡肽酶活力,能分解植物材料中肽、胨和多肽为氨基酸^[26];同时,米浆水营养丰富,含有各种氨基酸、维生素、核苷酸等,促进了有益微生物的快速生长繁殖,发酵微生物代谢产物及衰亡后细胞自溶也是农用酵素营养液中氨基酸的重要来源^[27-28]。

3 结论

利用黄酒米浆水和不同叶菜类废弃物制备的农用酵素营养液发酵过程中各营养组分的变化趋势类

似,除总糖含量呈下降趋势外,总氮、总磷、钾离子、总酸和游离氨基酸含量随着发酵时间的延长整体均呈上升趋势。米浆水中数量巨大的有益微生物自身增殖的同时,抑制了有害微生物的繁殖,发酵过程促进了有、无机养分水平的提高。

利用黄酒米浆水制备的农用酵素营养液各营养组分在发酵过程中显著高于用清水制备的农用酵素营养液。米浆水中乳杆菌等有益微生物数量巨大,且发酵产物和自溶产物及其丰富,促进了有益微生物的快速生长繁殖,有利于植物材料的降解、水溶性养分的溶出以及大分子物质的分解,发酵微生物的代谢产物及衰亡后细胞自溶也是营养液中营养成分的重要来源。

不同植物材料制备的农用酵素营养液均含有较丰富的养分,但三者养分含量差异明显。其中萝卜叶农用酵素营养液的总氮、总磷、总糖、总酸和游离氨基酸含量较高,莴笋叶农用酵素营养液的钾离子含量较高。这可能是因萝卜叶、白菜叶和莴笋叶中天然产物及携带微生物不同导致发酵过程中微生物群落结构和发酵速度不同。

综上所述,需要对黄酒米浆水以及农用酵素营养液中的优势菌种分离鉴定,探究微生物菌群变化与主要营养成分的相关性;并进一步延长发酵时间,研究发酵过程中活性物代谢规律及调控等。

参考文献:

- [1] 王荣娟, 戚亚平, 宋备舟, 等. 苹果果实发酵液对草莓防御酶系活性及抗病性的影响[J]. 中国农学通报, 2010, 26(16): 250-255.
- [2] 方晟, 毛建卫, 单之初, 等. 植物源作物酵素营养液研究进展及发展建议[J]. 农业工程, 2017, 7(4): 181-186.
- [3] 韩南容. 二十一世纪的有机农业[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2006: 183-198.
- [4] 李济宸, 王健, 李群, 等. 我国酵素菌引进、试验及应用概况[J]. 北京农业科学, 2000(3): 30-34.
- [5] 崔楠楠. 芳香植物营养液对沙梨生长发育、实品质及抗病性的影响[D]. 北京: 北京农学院, 2009.
- [6] 魏桃英, 张秋汀, 沈丽敏, 等. 对黄酒米浆水综合回用的研究[J]. 酿酒科技, 2016(2): 100-103.
- [7] 李博斌, 曾金红, 陈扉然, 等. 混凝吸附法处理黄酒酿造米浆废水的研究[J]. 酿酒科技, 2016(7): 97-99.
- [8] 刘艳. 碱性过硫酸钾消解-紫外分光光度法测定总氮的研究[J]. 绿色科技, 2012(10): 133-134.
- [9] 莫佳琳, 缪璐, 陆芳启, 等. 不同磷酸含量测定方法的比较研究[J]. 广东化工, 2015, 42(20): 126-128.
- [10] 邱会东, 熊伟. 离子选择性电极法快速测定含钾类药物实验[J]. 重庆科技学院学报(自然科学版), 2009, 11(4): 58-59.

- [11] 毕颖, 刘燕, 张平, 等. 蒽酮比色法测定大豆乳清废水中总糖含量[J]. 大豆通报, 2006(3): 24-25.
- [12] 全国食品工业标准化技术委员会. 食品中总酸的测定: GB/T 12456-2008 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [13] 全国食品发酵标准化中心. 黄酒中游离氨基酸的测定高效液相色谱法: QB/T 4356-2012[S]. 北京: 中国轻工业出版社, 2013.
- [14] 罗蕊, 张杰, 柳明娟, 等. 梨果实源营养液的制备及其对梨树叶片光合特性和果实品质的影响[J]. 中国农业科学, 2012, 45(16): 3337-3345.
- [15] 刘艳娜, 崔楠楠, 张杰, 等. 芳香植物源营养液对梨树的抑菌和营养效应[J]. 中国农业科学, 2011, 44(19): 3981-3990.
- [16] 赵小萍. 微生物的解磷机理及其影响因素[D]. 北京: 中国农业大学, 2001.
- [17] 耿健, 崔楠楠, 张杰, 等. 喷施芳香植物源营养液对梨树生长、果实品质及病害的影响[J]. 生态学报, 2011, 31(5): 1285-1294.
- [18] 黄伟菁, 戚亚平, 王荣娟, 等. 苹果果实匀浆发酵过程中营养组分的动态变化分析[J]. 北京农学院学报, 2009, 24(1): 1-4.
- [19] 杨小幸, 周家春, 陈启明, 等. 苹果酵素天然发酵过程中代谢产物的变化规律[J]. 食品科学, 2017, 38(24): 15-19.
- [20] TSUJI A, OKADA S, HOLS P, et al. Metabolic engineering of *Lactobacillus plantarum* for succinic acid production through activation of the reductive branch of the tricarboxylic acid cycle[J]. Enzyme Microb Tech, 2013, 53(2): 97-103.
- [21] 李海霞, 何国庆, 楼凤鸣, 等. 黄酒酿造中浸米浆水有机物组成及其微生物富集的研究[J]. 中国食品学报, 2011, 11(8): 168-174.
- [22] 朱小芳, 张凤杰, 俞剑燊, 等. 黄酒浸米水中细菌群落结构及优势菌代谢分析[J]. 食品科学, 2017, 38(10): 82-86.
- [23] 薛洁, 王异静, 刘岩, 等. 黄酒酿造中米浆水回用技术的研究[J]. 酿酒科技, 2009(9): 17-19.
- [24] 张夫道, 孙羲. 氨基酸对水稻营养作用的研究[J]. 中国农业科学, 1984, 5: 61-66.
- [25] 张政. 氨基酸态氮对黄瓜的营养效应[D]. 重庆: 西南农业大学, 2005.
- [26] 李平兰, 江汉湖. 产细菌素植物乳杆菌菌株的筛选及其细菌素生物学特征研究[J]. 食品与发酵工业, 1999, 25(1): 1-4.
- [27] 毛青钟, 俞关松. 黄酒浸米浆水中优势细菌的不同对发酵的影响[J]. 酿酒, 2010, 37(5): 69-73.
- [28] SOUFLEROS E H, BOULOUMPASI E, TSARCHOPOULOS C, et al. Primary amino acid profiles of Greek white wines and their use in classification according to variety, origin and vintage[J]. Food Chem, 2003, 80(2): 261-273.