

DOI:10.11686/cyxb2025291

http://cyxb.magtech.com.cn

李武, 李佳静, 李洁冰, 等. 苜蓿皂苷发酵和超声提取工艺条件优化研究. 草业学报, 2026, 35(7): 201—216.

LI Wu, LI Jia-jing, LI Jie-bing, *et al.* Optimization of fermentation and ultrasound-assisted extraction parameters for alfalfa saponins. Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(7): 201—216.

苜蓿皂苷发酵和超声提取工艺条件优化研究

李武^{1**}, 李佳静^{1**}, 李洁冰¹, 李振舟⁴, 郭明^{1,2,3}, 牛岩⁵, 孙浩^{1,2,3}, 李德锋^{1,2,3}, 史莹华^{1,2,3}, 李振田^{1,2,3}, 刘伯帅^{1,2,3}, 崔亚奎^{1,2,3}, 王志昌^{1,2,3}, 李永涛⁴, 朱晓艳^{1,2,3*}

(1. 河南农业大学动物科技学院, 河南 郑州 450046; 2. 河南省草地资源创新与利用重点实验室, 河南 郑州 450046; 3. 河南省牧草工程技术研究中心, 河南 郑州 450046; 4. 河南农业大学动物医学院, 河南 郑州 450046; 5. 河南省畜牧局饲草饲料站, 河南 郑州 450002)

摘要:旨在优化苜蓿皂苷的发酵和超声提取工艺。选用酿酒酵母、枯草芽孢杆菌和干酪乳杆菌为发酵菌株,在单因素试验中比较3种单菌及1:1:1复合菌的发酵效果,系统分析发酵时间(24、48、72、96 h)、葡萄糖添加量(0.05、0.10、0.15、0.20 g)、发酵料液比[1:0.8、1:1.2、1:1.6、1:2.0 (g:mL)]和菌液添加量(0.04、0.06、0.08、0.10 mL)对皂苷得率的影响,并评估菌型与发酵参数的交互作用,每个处理设3个独立重复。基于结果筛选出最优菌型及关键发酵参数,采用Box-Behnken响应面法优化发酵工艺,并通过3次独立验证试验评估模型的拟合度与可重复性。进一步以最优发酵产物为原料,考察超声时间(45、60、75、90 min)、超声料液比(1:10、1:20、1:30、1:40)和超声温度(25、37、49、61 °C)对皂苷得率的影响,分析超声参数与菌型的交互效应,建立响应面模型并优化提取工艺。结果表明:3种菌1:1:1组合发酵效果优于单菌发酵($P<0.05$),最优发酵条件为料液比1:1.27、发酵时间50.3 h、菌添加量0.062 mL,皂苷得率为11.68%;在发酵联合超声条件(料液比1:23.1、超声时间72.7 min、超声温度47.3 °C)下,皂苷得率提升至13.87%,较对照组提高98.4%($P<0.05$)。本研究构建了高效、绿色的发酵—超声协同提取工艺,为苜蓿皂苷的高效提取与后续高值化开发提供了技术支持。

关键词:苜蓿皂苷; 益生菌发酵; 超声提取; 工艺优化; 生物活性成分

Optimization of fermentation and ultrasound-assisted extraction parameters for alfalfa saponins

LI Wu^{1**}, LI Jia-jing^{1**}, LI Jie-bing¹, LI Zhen-zhou⁴, GUO Ming^{1,2,3}, NIU Yan⁵, SUN Hao^{1,2,3}, LI De-feng^{1,2,3}, SHI Ying-hua^{1,2,3}, LI Zhen-tian^{1,2,3}, LIU Bo-shuai^{1,2,3}, CUI Ya-lei^{1,2,3}, WANG Zhi-chang^{1,2,3}, LI Yong-tao⁴, ZHU Xiao-yan^{1,2,3*}

1. College of Animal Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, China; 2. Henan Key Laboratory of Innovation and Utilization of Grassland Resources, Zhengzhou 450046, China; 3. Henan Forage Engineering Technology Research Center, Zhengzhou 450046, China; 4. College of Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, China; 5. Henan Provincial Animal Husbandry Bureau Forage and Feed Station, Zhengzhou 450002, China

Abstract: This study aimed to optimize the fermentation and ultrasound-assisted extraction processes for alfalfa

收稿日期:2025-07-14;改回日期:2025-10-09

基金项目:河南省高等学校重点科研项目(26A230010),2023年度河南农业大学科技创新基金项目(2023CXZX010),2024年第五批河南省创新研发专项子课题(30603371),国家留学基金青年骨干教师出国研修项目(留金项[2023]54号),国家现代农业产业技术体系(CARS-34)和河南省优质饲草与动物健康科技创新团队(22IRTSTHN022)资助。

作者简介:李武(1998—),男,河南信阳人,在读硕士。E-mail: 15294728201@163.com;李佳静(1998—),女,河南新乡人,硕士。E-mail: jing15464@163.com。 ** 共同第一作者 These authors contributed equally to this work.

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: zxy_0512@163.com

(*Medicago sativa*) saponins. *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis*, and *Lactobacillus casei* were selected as fermentation strains for testing. Single-factor experiments were conducted to compare three single strains and their 1:1:1 mixed culture fermentation, and to systematically evaluate the influence of fermentation time (24, 48, 72, and 96 hours), glucose addition (0.05, 0.10, 0.15, and 0.20 g per g of alfalfa powder), fermentation solid-to-liquid ratio [1:0.8, 1:1.2, 1:1.6, and 1:2.0 (g:mL)], and strain inoculum volume (0.04, 0.06, 0.08, and 0.10 mL) on the saponin yield. The interactions between strain type and fermentation parameters were also assessed, with three independent replicates for each treatment. Based on the results, the optimal strain type combination and key fermentation parameters were determined, and a Box-Behnken design (BBD) was applied to further optimize the fermentation conditions. Model fit and reproducibility were evaluated through three independent validation experiments. Furthermore, using the optimal fermented product as the raw material, the effects of ultrasonication time (45, 60, 75, and 90 min), ultrasonication solid-to-liquid ratio (1:10, 1:20, 1:30, and 1:40), and ultrasonication temperature (25, 37, 49, and 61 °C) on saponin yield were investigated. The interactions between ultrasonication parameters and strain type were analyzed, and BBD was employed to optimize the extraction process. The results showed that the 1:1:1 mixed-culture fermentation achieved a significantly higher saponin yield than single-strain fermentation ($P<0.05$). The optimal fermentation conditions were a solid-to-liquid ratio of 1:1.27, a fermentation time of 50.3 hours, and a strain inoculation volume of 0.062 mL. Under this regime the saponin yield was 11.68%. Under the combined fermentation and ultrasound-assisted extraction conditions (solid-to-liquid ratio 1:23.1, ultrasonication time 72.7 min, and temperature 47.3 °C), the saponin yield increased to 13.87%, which was 98.4% higher than that of the control ($P<0.05$). This study developed an efficient and eco-friendly fermentation-ultrasound synergistic extraction process, providing technical support for the efficient extraction and subsequent high-value utilization of alfalfa saponins.

Key words: alfalfa saponins; probiotic fermentation; ultrasonic extraction; process optimization; bioactive components

紫花苜蓿(*Medicago sativa*)是一种多年生豆科牧草,因其蛋白质含量高、适口性好、适应性广,被誉为“牧草之王”^[1-2]。除营养价值高、营养成分种类齐全外,苜蓿还富含多种生物活性物质,如皂苷、黄酮、多糖等^[2]。苜蓿皂苷是苜蓿中一种重要的三萜类次生代谢产物,广泛分布于植物体各组织中,平均总含量约为2.0%~2.2%^[3]。研究表明,苜蓿皂苷具有抗菌、抗炎、抗氧化、免疫调节等多种生物学功能^[4-6],在畜禽饲料中添加可有效提升动物生产性能、改善肉蛋品质和肠道健康,在绿色饲料添加剂开发中具有广阔的应用前景^[7-10]。目前,苜蓿皂苷提取主要采用有机溶剂提取、正丁醇分级提取及物理辅助技术(如超声、微波)^[11-12]。然而,皂苷分子多包裹于细胞壁木质素网络中,木质素结构复杂且难降解,传统方法往往存在提取效率低、能耗高、溶剂残留及环境负担大等问题,限制了其工业化应用^[13]。因此,开发绿色、高效的提取工艺已成为研究热点。

微生物发酵技术近年来被广泛应用于植物活性成分的提取与高值化利用,具有绿色环保、能耗低、工艺可调等优势^[14]。在发酵过程中,益生菌可分泌多种细胞壁降解相关酶,协同破坏细胞壁结构,促进皂苷等活性成分的释放与转化,从而提高提取率和生物利用度^[15-16]。不同菌种在代谢产物和酶系组成上存在差异,决定了其对发酵效果的贡献。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)可分泌多种胞外水解酶(如纤维素酶、半纤维素酶、淀粉酶和蛋白酶),有效降解植物细胞壁,打破细胞屏障并协同切断皂苷糖苷键,促进细胞内皂苷的释放与游离化^[17-18]。干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)通过乳酸发酵产生有机酸,降低体系pH值,在抑制杂菌生长的同时,减少外源酶对皂苷的破坏,改善发酵环境稳定性并有助于活性成分的保持^[19-20]。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)具有较强的协同发酵能力,其分泌的 β -葡萄糖苷酶和转移酶可催化 β -葡萄糖苷键断裂,促进皂苷糖链逐步水解或糖基转移,实现皂苷分子结构的修饰与活性提升^[21-22]。因此,将3种菌株联合应用,可在理论上通过“细胞壁破坏—糖苷键切

断—环境稳定”三重途径实现协同增效,兼顾皂苷的释放、转化与稳定。与此同时,超声辅助提取技术依托空化和剪切等物理效应,可加速细胞破裂和目标成分释放,已被广泛证明可显著提升植物活性物质的提取效率^[23-24]。研究表明,微生物发酵联合超声辅助提取技术可实现植物活性成分的协同增效提取^[25-26],但针对苜蓿皂苷的系统性研究尚不多见。

基于上述背景,本研究以枯草芽孢杆菌、干酪乳杆菌和酿酒酵母为发酵菌株,利用其在细胞壁降解、体系酸化及皂苷糖苷键转化方面的互补特性,构建复合发酵体系。结合超声辅助提取技术,系统评估复合菌发酵—超声协同作用对苜蓿皂苷提取效率的影响,优化关键工艺参数,明确协同工艺的可行性与增效性。研究旨在建立一种高效、绿色的苜蓿皂苷提取工艺,为苜蓿皂苷的高效提取与后续高值化开发提供理论依据与技术支持,推动其在饲料添加剂、功能食品及医药等领域的应用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究于2024年在河南省草地资源创新与利用重点实验室开展,苜蓿草粉由河南农业大学原阳科教园区苜蓿基地(114°57′11″ E, 35°06′24″ N)提供,其主要营养成分含量为(%):干物质93.6、粗蛋白质24.3、粗脂肪2.5、粗灰分11.6、中性洗涤纤维25.3、酸性洗涤纤维21.7。试验菌株:酿酒酵母(*S. cerevisiae*, S117分离株)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*, B117分离株)和干酪乳杆菌(*L. casei*, L117分离株),均为本实验室保存的高活性菌株。

1.2 发酵菌液制备

分别采用LB培养基(Luria-Bertani medium:每100 mL加入NaCl 1.00 g,蛋白胨1.00 g,酵母膏0.50 g),YPD培养基(yeast extract-peptone-dextrose medium:每100 mL加入蛋白胨2.00 g,葡萄糖2.00 g,酵母膏1.00 g)和MRS培养基(De Man, rogus and sharpe medium:每100 mL加入葡萄糖2.00 g,乙酸钠0.75 g,蛋白胨1.50 g,硫酸镁0.03 g,牛肉膏1.50 g,柠檬酸铵0.20 g,酵母膏0.75 g,磷酸氢二钾0.20 g)。固体培养基每100 mL多添加2 g的琼脂粉,121 °C高压灭菌20 min后用于培养枯草芽孢杆菌、酿酒酵母及干酪乳杆菌^[27]。使用无菌接种环从对应种属的固体平板挑取单菌落,接种于5 mL相应液体培养基中,在37 °C、200 r·min⁻¹条件下摇床培养12 h。随后,分别按2%(v/v)接种量将酿酒酵母和枯草芽孢杆菌接入三角瓶液体培养基(装液比20%, v/v)并继续培养12 h(200 r·min⁻¹);将干酪乳杆菌以2%(v/v)接种至三角瓶液体培养基(装液比90%, v/v),于37 °C静置培养12 h。培养结束测定菌液浊度,并调整活菌浓度至(1×10⁸)~(8×10⁸) cfu·mL⁻¹,分装后于4 °C冷藏备用。

1.3 构建皂苷标准曲线

以齐墩果酸(≥98%,北京索莱宝科技有限公司)为对照品,采用香草醛—高氯酸显色法测定苜蓿皂苷含量^[28]。在该方法基础上,根据试验条件进行了适当调整:于560 nm波长下使用酶标仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]测定吸光度。以浓度为横坐标(X),吸光度为纵坐标(Y)绘制齐墩果酸标准曲线,回归方程为 $Y=26.176X+0.035$ ($R^2=0.9991$),据此计算样品皂苷得率。

1.4 发酵参数优化

取1.00 g预先过0.3 mm筛处理的苜蓿草粉,置于烧杯中,121 °C高压灭菌20 min后备用。以发酵温度37 °C、发酵时间48 h、发酵料液比1:1.2(g:mL)、菌添加量0.06 mL、葡萄糖添加量0.10 g为基础条件,对照以等体积无菌蒸馏水替代菌液以保持料液比一致。在单因素试验中,设置4种菌型:3种单菌(酿酒酵母、枯草芽孢杆菌、干酪乳杆菌)及其1:1:1复合菌,考察4个发酵参数对皂苷得率的影响。每个发酵参数设4个水平:发酵时间(24、48、72和96 h)、葡萄糖添加量(0.05、0.10、0.15和0.20 g)、发酵料液比(1:0.8、1:1.2、1:1.6和1:2.0)和菌添加量(0.04、0.06、0.08和0.10 mL),每个水平设3个独立重复,每个样品测定2次,取平均值作为最终结果,用于分析菌型和发酵参数对苜蓿皂苷得率的影响,并评估两者之间的交互作用。基于单因素试验结果,筛选出显著影响皂苷得率的最优菌型与发酵参数,采用Box-Behnken响应面优化试验(Box-Behnken design, BBD),建立回归模型并预测最优工艺条件。在模型预测条件下,进行3次独立验证试验,计算平均值及标准差,评估模型拟合度及工艺的稳定性 and 可重复性,确定苜蓿皂苷发酵提取的最优工艺参数。

1.5 超声参数优化

取各菌型在最优发酵条件下制得的发酵苜蓿草粉样品各 1.00 g,置于烧杯中。以 40%(v/v)乙醇为提取溶剂,超声时间 45 min、超声料液比 1:20(g:mL)、超声功率 100 W、超声温度 37℃为基础条件进行超声辅助提取。对照组为未发酵苜蓿草粉,在相同条件下处理。在单因素试验中,分别考察超声时间(45、60、75和 90 min)、超声料液比(1:10、1:20、1:30和 1:40)和超声温度(25、37、49和 61℃)3个因素对皂苷得率的影响。在各因素试验中同步设置 4 种菌型发酵样品及未发酵对照,以评估超声参数、菌型及其交互作用。每个处理设 3 个独立重复,每个样品测定 2 次,取平均值作为最终结果。基于单因素试验结果,筛选出显著影响皂苷得率的最优菌型与超声参数,进一步采用响应面法优化提取工艺,建立回归模型并进行方差分析。最终在模型预测的最优条件下进行 3 次独立验证试验,计算平均值及标准差,评估模型拟合度及工艺的稳定性 and 可重复性。

1.6 皂苷得率的测定

取 1.00 g 发酵后的苜蓿草粉(对照不加菌液),加 20 mL 40%(v/v)乙醇,于超声清洗仪(宁波新芝生物科技股份有限公司)37℃、功率 50% 条件下超声提取 45 min,抽滤,得滤液。取 0.2 mL 滤液于 10 mL 具塞试管,按标准曲线方法进行显色反应^[28],测定其吸光度值,依据标准曲线回归方程计算苜蓿皂苷得率。

$$\text{皂苷得率}(\%) = \frac{C \times V \times n}{m} \times 100$$

式中: C 为超声提取后所得皂苷的质量浓度, $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; V 为抽滤后的滤液体积, mL; m 为发酵后的苜蓿草粉质量, mg; n 为稀释倍数。

超声优化试验中皂苷得率的测定方法与上述步骤一致,取不同超声处理条件下的滤液 0.2 mL,进行显色反应并测定吸光度,按相同计算公式计算皂苷得率。

1.7 数据统计分析

采用 Excel 2021 整理试验数据,利用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。通过单因素和双因素方差分析评估菌种类型、发酵参数、超声参数及其交互作用对皂苷得率的影响,组间差异用 Duncan 多重比较法进行显著性检验。结果以“平均值±标准误”[mean±standard error of the mean (SEM)]表示, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P > 0.05$ 表示差异不显著。图表的绘制均通过 Origin 2021 软件完成。

2 结果与分析

2.1 发酵参数优化

2.1.1 发酵时间 由图 1 可知,菌种类型和发酵时间对苜蓿皂苷得率有极显著影响($P < 0.001$),且两者之间存在极显著的交互作用($P < 0.001$)。与未加菌对照相比,单菌与复合菌在 48 和 72 h 均显著提高皂苷得率($P < 0.05$),且以复合菌发酵效果最佳。随着发酵时间延长,皂苷得率呈先升高后降低的趋势,48 h 发酵效果最优($P < 0.05$)。因此,确定复合菌发酵 48 h 为最佳条件,并将 24、48 和 72 h 作为发酵时间因素纳入响应面优化。

2.1.2 发酵料液比 与发酵时间的结果一致(图 2),菌种类型和料液比对苜蓿皂苷得率同样具有极显著影响($P < 0.001$),且两者存在极显著交互作用($P < 0.001$)。与对照组相比,除料液比 1:0.8 与 1:2.0 外,3 种菌复合发酵均表现最佳($P < 0.05$)。随着料液比增大,皂苷得率呈先增加后降低趋势,料液比 1:1.2 时

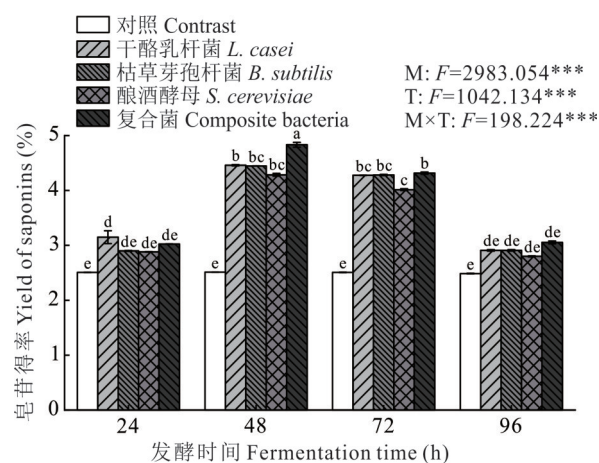


图 1 菌种类型和发酵时间对苜蓿皂苷得率的影响

Fig. 1 Effects of strain type and fermentation time on alfalfa saponin yield

M: 菌种类型 Strain type; T: 发酵时间 Fermentation time. ***: $P < 0.001$. 相同处理下,小写字母不同表示不同菌种类型间差异显著($P < 0.05$)。下同。Within the same treatment, different lowercase letters indicate significant differences among strain types ($P < 0.05$). The same below.

提取效果最优($P<0.05$)。因此,确定复合菌发酵、料液比 1:1.2 为最佳组合,并进一步选择料液比 1:0.8、1:1.2 和 1:1.6 作为响应面试验的考察水平。

2.1.3 菌添加量 如图 3 所示,菌种类型和菌添加量对皂苷得率均呈极显著影响($P<0.001$),二者之间存在极显著的交互作用($P<0.001$)。在菌添加量为 0.04~0.06 mL 区间内,菌量偏低可能导致发酵启动缓慢、微生物活性不足,影响皂苷释放;而当菌添加量超过 0.06 mL,菌量过高易引发营养竞争、代谢产物积累,进而抑制菌体增殖及细胞壁降解能力,导致提取效率下降。复合菌发酵、菌添加量为 0.06 mL 时苜蓿皂苷得率达到最高水平($P<0.05$)。因此,后续响应面优化试验选定菌添加量为 0.04、0.06 和 0.08 mL 作为考察梯度。

2.1.4 葡萄糖添加量 由图 4 可知,菌种类型和葡萄糖添加量对皂苷得率均有极显著影响($P<0.01$),且两者存在显著的交互作用($P<0.05$)。经单菌或复合菌发酵处理后,皂苷得率均显著高于对照组($P<0.05$),但不同发酵处理组之间差异不显著($P>0.05$)。考虑到该因素对优化空间贡献有限,未将其纳入后续响应面优化试验。

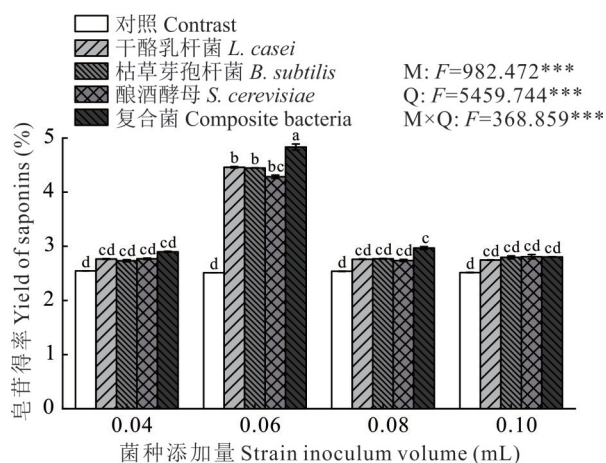


图 3 菌种类型和菌添加量对苜蓿皂苷得率的影响
Fig. 3 Effects of strain type and inoculum volume on alfalfa saponin yield

Q: 菌种添加量 Strain inoculum volume.

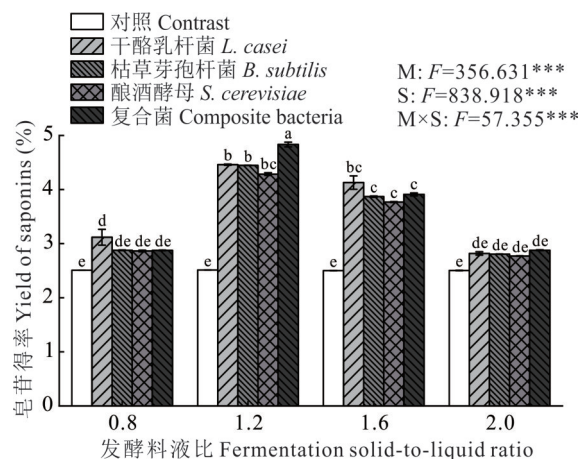


图 2 菌种类型和发酵料液比对苜蓿皂苷得率的影响
Fig. 2 Effects of strain type and fermentation solid-to-liquid ratio on alfalfa saponin yield

S: 发酵料液比 Fermentation solid-to-liquid ratio.

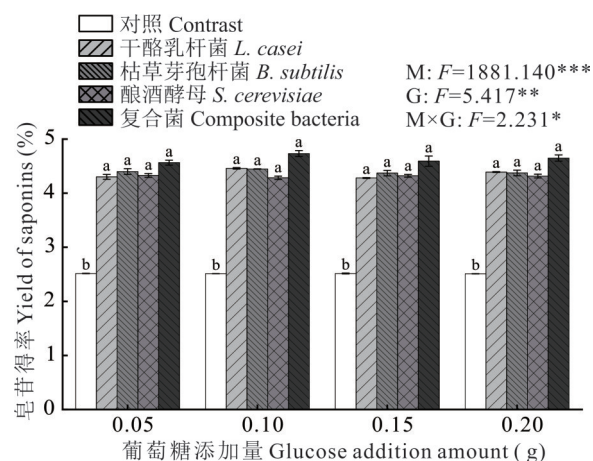


图 4 菌种类型和葡萄糖添加量对苜蓿皂苷得率的影响
Fig. 4 Effects of strain type and glucose addition amount on alfalfa saponin yield

G: 葡萄糖添加量 Glucose addition amount. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

2.1.5 Box-Behnken 响应面分析 根据单因素试验结果,筛选出料液比(A)、发酵时间(B)和菌添加量(C)为影响皂苷得率的关键因素,并确定其最优范围。进一步采用 Box-Behnken 响应面设计(表 1),以皂苷得率为响应值,优化发酵工艺参数。采用 Design-Expert 13 软件对表 2 中的数据进行多元回归分析,得到二次多元回归方程:
$$Y=11.67+0.4303A+0.3721B+0.1210C-0.1418AB+0.3864AC-0.2259BC-0.5923A^2-0.2040B^2-0.4436C^2$$

方差分析结果显示(表 3),模型决定系数为 $R^2=0.9843$,调整后 $R^2_{Adj}=0.9640$,表明模型拟合良好、预测性能较强。模型整体显著($P<0.0001$),且失拟项不显著($P=0.0862$),进一步验证了模型的可靠性。各因素中,料液比、发酵时间及其二次项对皂苷得率均表现为显著影响($P<0.05$),响应关系呈非线性趋势。因素影响顺序为:料液比>发酵时间>菌添加量。

根据回归方程,绘制了主要因素间交互作用对皂苷得率影响的等高线图与响应面图(图5~7)。表3、图5和图7显示,料液比与发酵时间、发酵时间与菌添加量之间交互作用不显著($P>0.05$),响应面整体平缓,对皂苷得率影响有限。表3和图6中,料液比与菌添加量交互作用显著($P=0.0140$),等高线呈明显椭圆形,响应面呈现清晰梯度,便于预测皂苷得率的最优参数组合。

表1 发酵工艺 Box-Behnken 设计因素与水平

Table 1 Factors and levels of Box-Behnken design for fermentation process

水平 Level	发酵料液比 Fermentation solid-to-liquid ratio (A)	发酵时间 Fermentation time (B, h)	菌添加量 Strain inoculum volume (C, mL)
-1	0.8	24	0.04
0	1.2	48	0.06
1	1.6	72	0.08

表2 发酵工艺 Box-Behnken 设计方案及结果

Table 2 Box-Behnken design scheme and results for fermentation process

编号 Number	发酵料液比 Fermentation solid-to-liquid ratio (A)	发酵时间 Fermentation time (B)	菌添加量 Strain inoculum volume (C)	皂苷得率 Yield of saponins (%)
1	-1	0	1	9.79
2	-1	0	-1	10.23
3	0	0	0	11.50
4	1	0	-1	10.70
5	0	0	0	11.62
6	0	-1	-1	8.50
7	1	-1	0	9.04
8	-1	1	0	9.30
9	0	1	-1	9.70

编号 Number	发酵料液比 Fermentation solid-to-liquid ratio (A)	发酵时间 Fermentation time (B)	菌添加量 Strain inoculum volume (C)	皂苷得率 Yield of saponins (%)
10	1	0	1	11.81
11	-1	-1	0	8.28
12	0	0	0	11.70
13	0	-1	1	9.11
14	0	0	0	11.61
15	1	1	0	9.50
16	0	0	0	11.90
17	0	1	1	9.41

表3 发酵工艺皂苷得率回归模型的方差分析

Table 3 Analysis of variance for the regression model of saponin yield in fermentation process

方差来源 Source of variance	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom (df)	均方 Mean square	F 值 F-value	P 值 P-value	显著性 Significance
模型 Model	24.72	9	2.75	48.67	<0.0001	**
发酵料液比 Fermentation solid-to-liquid ratio (A)	1.48	1	1.48	26.25	0.0014	**
发酵时间 Fermentation time (B)	1.11	1	1.11	19.62	0.0030	**
菌种添加量 Strain inoculum volume (C)	0.12	1	0.12	2.07	0.1929	NS
AB	0.08	1	0.08	1.42	0.2716	NS
AC	0.60	1	0.60	10.58	0.0140	*
BC	0.20	1	0.20	3.62	0.0990	NS
A ²	1.48	1	1.48	26.17	0.0014	**
B ²	17.59	1	17.59	311.65	<0.0001	**
C ²	0.83	1	0.83	14.68	0.0064	**
残差 Residual	0.40	7	0.06			
失拟项 Lack of fit	0.31	3	0.10	4.64	0.0862	NS
纯误差 Pure error	0.09	4	0.02			
总离差 Total deviation	25.12	16				
R ²	0.9843					
R ² _{Adj}	0.9640					

*, $P<0.05$; **, $P<0.01$; NS: $P>0.05$. 下同 The same below.

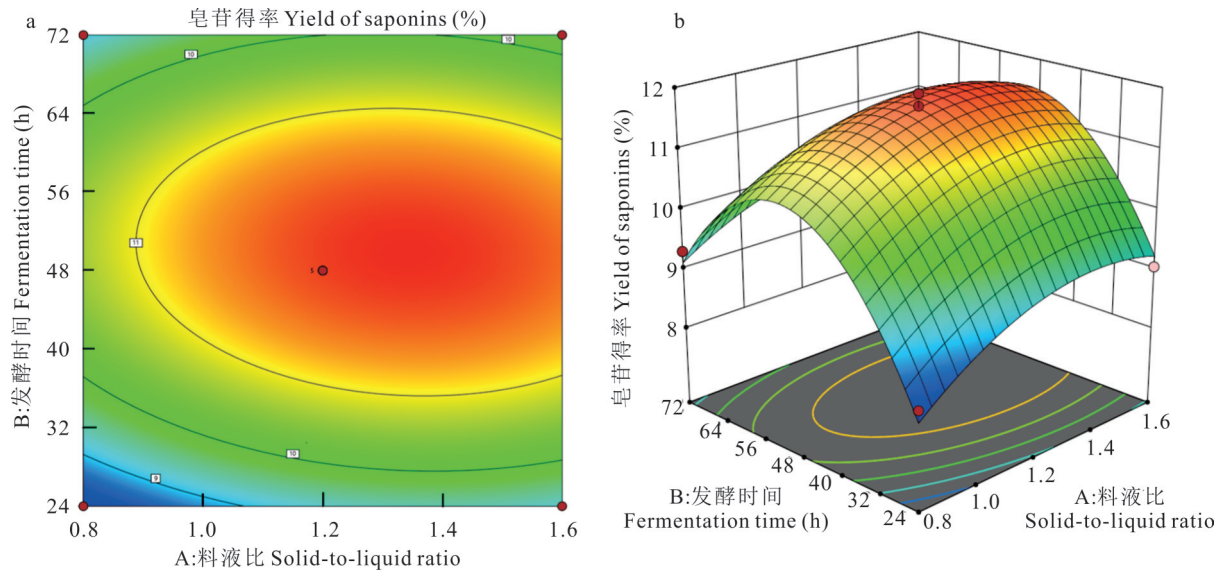


图 5 发酵料液比(A)与发酵时间(B)交互作用的等高线图(a)和响应面图(b)
Fig. 5 Contour plot (a) and response surface plot (b) of the interaction between fermentation solid-to-liquid ratio (A) and fermentation time (B)

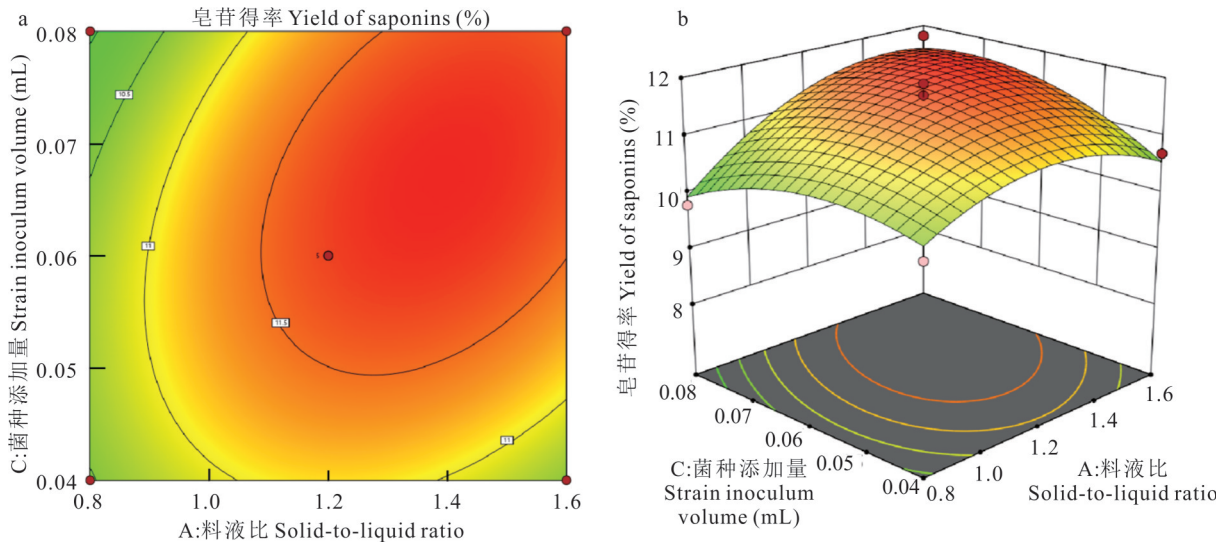


图 6 发酵料液比(A)与菌添加量(C)交互作用的等高线图(a)和响应面图(b)
Fig. 6 Contour plot (a) and response surface plot (b) of the interaction between fermentation solid-to-liquid ratio (A) and strain inoculum volume (C)

基于响应面分析结果,结合表 4 不同发酵因素取值范围与预测区间,确定苜蓿皂苷发酵工艺的最优条件为(表 5):复合菌 1:1:1 组合,料液比 1:1.27、发酵时间 50.3 h、复合菌添加量 0.062 mL。在此条件下,模型预测皂苷得率为 11.75%。为验证模型的准确性与工艺可行性,开展 3 次平行试验,皂苷实测得率为 11.68%,较未加菌处理提高了 67.1%($P<0.05$),与模型预测值高度一致。说明该响应面模型拟合度良好、预测能力可靠,可为苜蓿皂苷优化发酵工艺提供有效指导。

2.2 超声参数优化

2.2.1 超声时间 如图 8 所示,菌种类型和超声时间对皂苷得率均有极显著影响($P<0.001$),且存在极显著的交互作用($P<0.001$)。与对照相比,复合菌发酵协同超声提取效果最佳($P<0.05$)。随着超声时间延长,复合

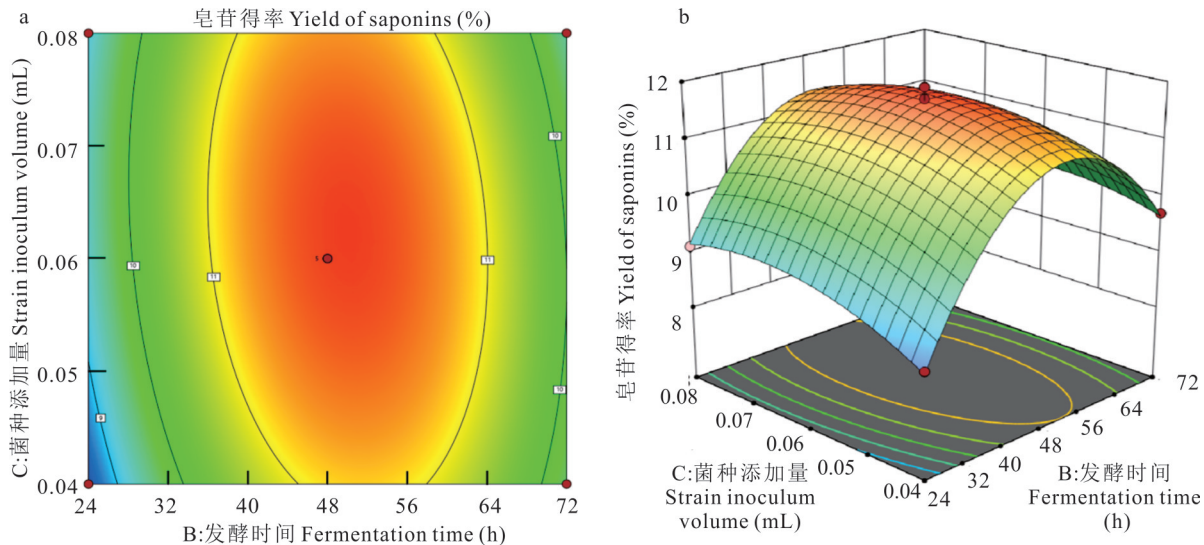


图 7 发酵时间(B)与菌添加量(C)交互作用的等高线图(a)和响应面图(b)

Fig. 7 Contour plot (a) and response surface plot (b) of the interaction between fermentation time (B) and strain inoculum volume (C)

表 4 不同发酵因素取值范围与预测区间

Table 4 Value ranges and prediction intervals of different fermentation factors							
项目	评价标准	变量下限	变量上限	权重下限	权重上限	影响程度	
Items	Evaluation criteria	Variable lower limit	Variable upper limit	Weight lower limit	Weight upper limit	Degree of influence	
发酵料液比 Fermentation solid-to-liquid ratio (A)	区间内 Within the range	0.8	1.6	1	1	3	
发酵时间 Fermentation time (B, h)	区间内 Within the range	24	72	1	1	3	
菌添加量 Strain inoculum volume (C, mL)	区间内 Within the range	0.04	0.08	1	1	3	
皂苷得率 Yield of saponins (%)	最大值 Maximum	8.28	11.90	1	1	3	

表 5 苜蓿皂苷最优发酵工艺与提取得率

Table 5 Optimal fermentation technology and extraction yield of alfalfa saponins								
发酵工艺			模型预测皂苷得率		模型验证皂苷得率		理想程度	
Fermentation process			Model prediction of saponin yield (%)		Model validation of saponin yield (%)		Desirability	
发酵料液比	发酵时间	菌添加量	复合菌组	未加菌组	复合菌组	未加菌组	P 值	
Fermentation solid-to-liquid ratio	Fermentation time (h)	Strain inoculum volume (mL)	Composite bacteria group	No bacteria group	Composite bacteria group	No bacteria group	P-value	
1:1.27	50.3	0.062	11.75	7.21	11.68±0.15a	6.99±0.39b	0.0177	0.95

不同小写字母表示组间差异显著($P<0.05$),下同。Different lowercase letters indicate significant difference between groups ($P<0.05$). The same below.

菌发酵皂苷得率呈先升后降趋势,超声 75 min 时提取效果最优,显著高于其他 3 个时间点($P<0.05$)。超声时间过短(45~60 min)提取不完全,时间过长(>75 min)则可能导致活性成分降解。综合考虑,选取 60、75 和 90 min 作为超声时间因素水平,进入响应面优化试验。

2.2.2 超声温度 图 9 结果表明,超声温度及菌种类型对皂苷得率均表现出极显著影响($P<0.001$),二者之间亦存在极显著的交互作用($P<0.001$)。相比对照组,复合菌协同超声处理效果最为突出($P<0.05$)。在 25~49 ℃内,温度升高促进了分子运动与细胞壁渗透性,提升了皂苷的释放效率。超过 49 ℃时,活性成分可能因热敏

性而发生降解,导致得率下降。综合评估,确定复合菌发酵—超声协同提取的最优超声温度为 49℃($P<0.05$),据此,后续响应面优化试验的超声温度水平设为 37、49 和 61℃。

2.2.3 超声料液比 图 10 结果显示,菌种类型和料液比对苜蓿皂苷超声得率具有极显著影响($P<0.001$),且二者存在极显著的交互效应($P<0.001$)。3 种菌组合发酵协同超声处理效果最佳($P<0.05$)。在料液比 1:10~1:20 区间,因溶剂与原料接触不足,提取效率偏低;而当料液比超过 1:20,过量溶剂会削弱超声空化效应,降低皂苷释放效率。超声料液比 1:20 时,复合菌发酵提取皂苷得率最高($P<0.05$),因此后续响应面试验选用 1:10、1:20 和 1:30 进行优化分析。

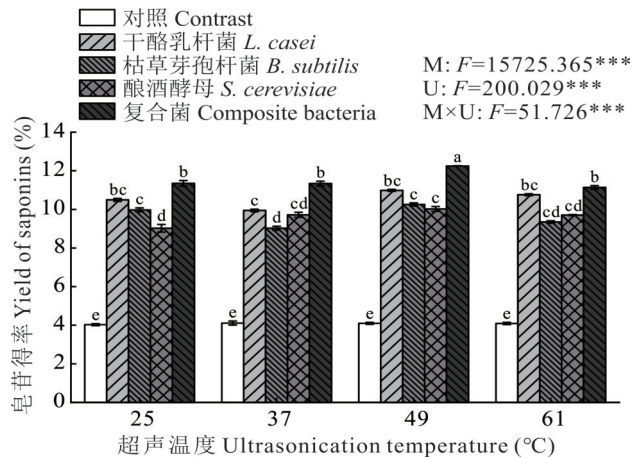


图 9 菌种类型和超声温度对苜蓿皂苷得率的影响
Fig. 9 Effects of strain type and ultrasonication temperature on alfalfa saponin yield
U: 超声温度 Ultrasonication temperature.

2.2.4 Box-Behnken 响应面分析 根据单因素试验结果,确定料液比(A)、超声时间(B)和超声温度(C)为影响皂苷超声得率的关键因素,并明确了其适宜范围。在此基础上,采用 Box-Behnken 响应面设计(表 6),以皂苷得率为响应值,优化超声提取工艺参数。采用 Design-Expert 13 软件对表 7 中的数据进行多元回归分析,得到二次多元回归方程: $Y=13.83+0.4320A-0.3460B-0.0727C+0.0836AB-0.0422AC-0.5471BC-0.4945A^2-0.7308B^2-0.1060C^2$ 。

方差分析结果显示(表 8),模型决定系数 $R^2=0.9615$,调整后 $R^2_{Adj}=0.9121$,表明模型拟合良好、预测性能较强。模型整体显著($P<0.001$),且失拟项不显著($P=0.1051$),进一步验证了模型的可靠性。各因素中,料液比、

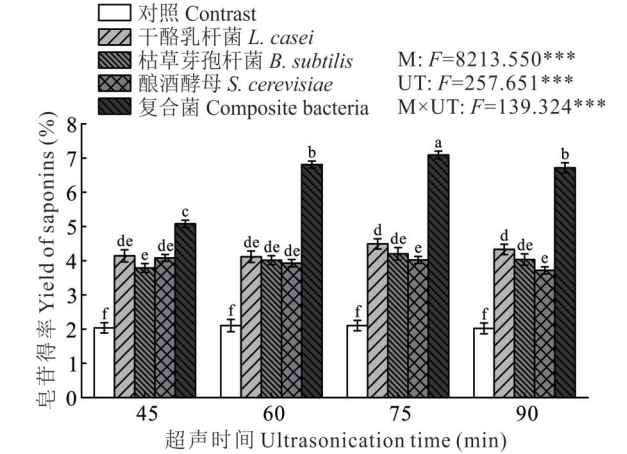


图 8 菌种类型和超声时间对苜蓿皂苷得率的影响
Fig. 8 Effects of strain type and ultrasonication time on alfalfa saponin yield
UT: 超声时间 Ultrasonication time.

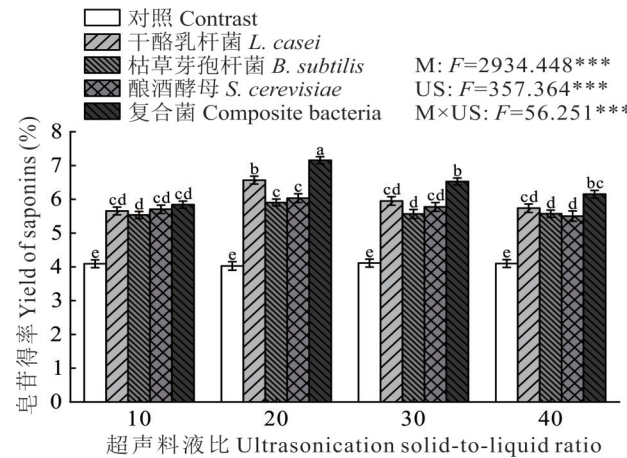


图 10 菌种类型和超声料液比对苜蓿皂苷得率的影响
Fig. 10 Effects of strain type and ultrasonication solid-to-liquid ratio on alfalfa saponin yield
US: 超声料液比 Ultrasonication solid-to-liquid ratio.

表 6 超声工艺 Box-Behnken 设计因素与水平
Table 6 Factors and levels of Box-Behnken design for ultrasonic process

水平	超声料液比	超声时间	超声温度
Level	Ultrasonication solid-to-liquid ratio (A)	Ultrasonication time (B, min)	Ultrasonication temperature (C, °C)
−1	10	60	37
0	20	75	49
1	30	90	61

表 7 超声工艺 Box-Behnken 设计方案及结果

Table 7 Box-Behnken design scheme and results for ultrasonic process

编号 Number	超声料液比 Ultrasonication solid-to-liquid ratio (A)	超声时间 Ultrasonication time (B)	超声温度 Ultrasonication temperature (C)	皂苷得率 Yield of sa- ponins (%)	编号 Number	超声料液比 Ultrasonication solid-to-liquid ratio (A)	超声时间 Ultrasonication time (B)	超声温度 Ultrasonication temperature (C)	皂苷得率 Yield of sa- ponins (%)
1	0	−1	−1	13.14	10	0	0	0	13.73
2	1	0	1	12.37	11	0	0	0	13.99
3	0	0	0	13.75	12	1	−1	0	12.99
4	0	1	1	12.04	13	−1	−1	0	12.62
5	1	1	0	12.76	14	0	0	0	13.64
6	0	0	0	14.06	15	0	−1	1	11.94
7	−1	1	0	12.06	16	−1	0	1	12.01
8	1	0	−1	13.39	17	−1	0	−1	11.35
9	0	1	−1	11.06					

表 8 超声工艺皂苷得率回归模型的方差分析

Table 8 Analysis of variance for the regression model of saponin yield in ultrasonic process

方差来源 Source of variance	平方和 Sum of squares	df	均方 Mean square	F 值 F-value	P 值 P-value	显著性 Significance
模型 Model	13.23	9	1.47	19.44	0.0004	**
超声料液比 Ultrasonication solid-to-liquid ratio (A)	1.49	1	1.49	19.74	0.0030	**
超声时间 Ultrasonication time (B)	0.96	1	0.96	12.66	0.0092	**
超声温度 Ultrasonication temperature (C)	0.04	1	0.04	0.56	0.4793	NS
AB	0.03	1	0.03	0.37	0.5624	NS
AC	0.71	1	0.71	9.43	0.0180	*
BC	1.20	1	1.20	15.83	0.0053	**
A ²	1.03	1	1.03	13.61	0.0078	**
B ²	2.25	1	2.25	29.73	0.0010	**
C ²	4.70	1	4.70	62.09	0.0001	**
残差 Residual	0.53	7	0.08			
失拟项 Lack of fit	0.40	3	0.13	4.05	0.1051	NS
纯误差 Pure error	0.13	4	0.03			
总离差 Total deviation	13.76	16				
R ²	0.9615					
R ² _{Adj}	0.9121					

超声时间及其二次项对皂苷得率均具有显著影响($P<0.01$),响应关系呈非线性趋势。因素影响顺序为:超声料液比>超声时间>超声温度。

根据回归方程,绘制了主要超声因素间交互作用对皂苷得率影响的等高线图与响应面图(图 11~13)。表 8 和图 11 显示,料液比与超声时间之间交互作用不显著($P=0.5624$),响应面呈近似对称结构,对皂苷得率的协同调控作用有限。表 8、图 12 和图 13 中,料液比与超声温度、超声时间与超声温度交互作用显著($P<0.05$),等高线趋于椭圆形,响应面呈现清晰梯度,便于预测皂苷得率的最优超声参数组合。

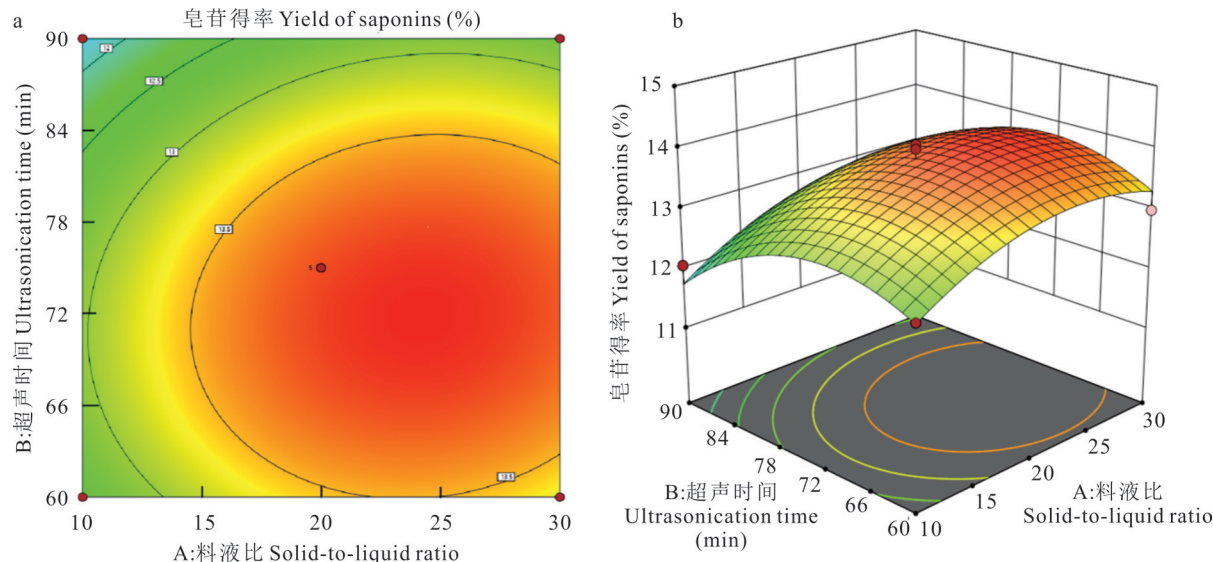


图 11 超声料液比(A)与超声时间(B)交互作用的等高线图(a)和响应面图(b)
Fig. 11 Contour plot (a) and response surface plot (b) of the interaction between ultrasonication solid-to-liquid ratio (A) and ultrasonication time (B)

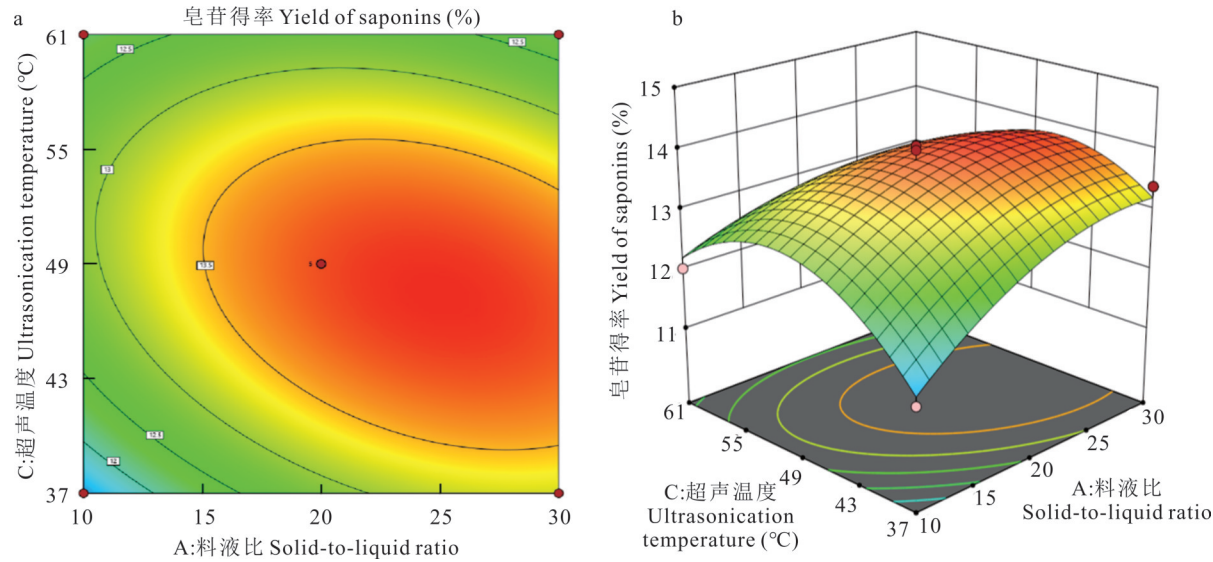


图 12 超声料液比(A)与超声温度(C)交互作用的等高线图(a)和响应面图(b)
Fig. 12 Contour plot (a) and response surface plot (b) of the interaction of ultrasonication solid-to-liquid ratio (A) and ultrasonication temperature (C)

基于响应面分析结果,结合表 9 中因素取值范围、权重设置及响应变量预测区间,确定发酵协同超声提取工艺的最优条件为(表 10):复合菌 1:1:1 发酵、料液比 1:23.1、超声时间 72.7 min、超声温度 47.3℃。在此条件下,模型预测苜蓿皂苷得率为 13.97%。为验证模型的可靠性,进行 3 次平行试验,实测苜蓿皂苷得率为 13.87%,较对照组提高了 98.4%($P<0.05$),与模型预测值高度一致,验证了模型的拟合性良好,具备实际应用指导价值。

3 讨论

近年来,微生物发酵作为提高植物性原料中活性成分释放与生物利用度的重要手段,受到了广泛关注,其效果受菌种特性及原料适配性的显著影响^[29]。苜蓿细胞壁富含纤维素、半纤维素和果胶,木质素含量相对较低,适合作为菌酶协同降解底物,有利于活性成分的释放。本研究筛选干酪乳杆菌、枯草芽孢杆菌及酿酒酵母进行复合

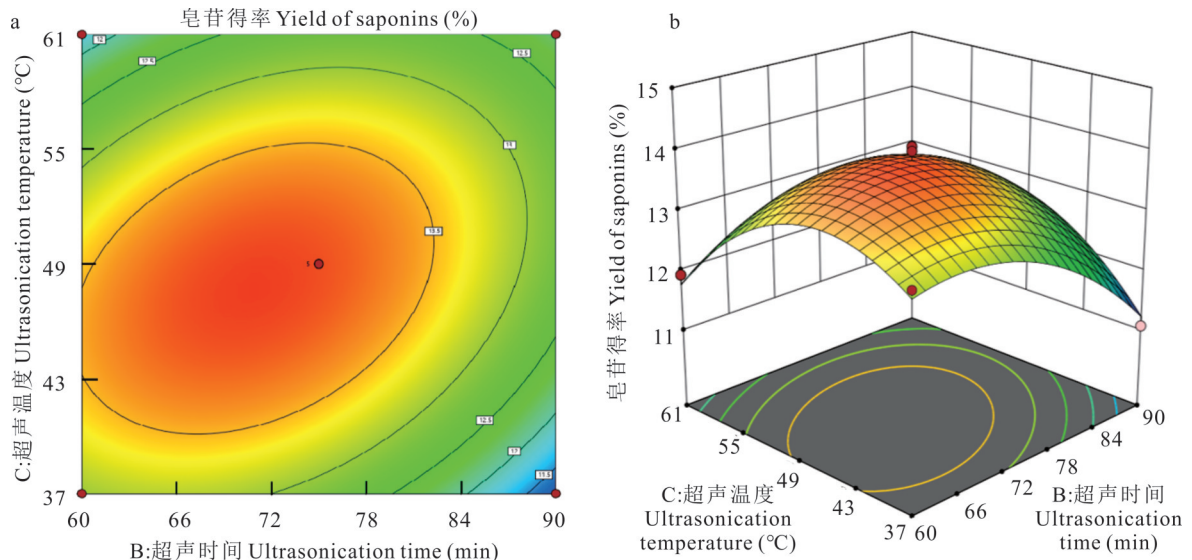


图 13 超声时间(B)与超声温度(C)交互作用的等高线图(a)和响应面图(b)

Fig. 13 Contour plot (a) and response surface plot (b) of the interaction of ultrasonication time (B) and ultrasonication temperature (C)

表 9 不同超声因素取值范围与预测区间

Table 9 Value ranges and prediction intervals of different ultrasonication factors						
项目 Items	评价标准 Evaluation criteria	变量下限 Variable low- er limit	变量上限 Variable upper limit	权重下限 Weight low- er limit	权重上限 Weight up- per limit	影响程度 Degree of in- fluence
超声料液比 Ultrasonication solid-to-liquid ratio (A)	区间内 Within the range	10	30	1	1	3
超声时间 Ultrasonication time (B, min)	区间内 Within the range	60	90	1	1	3
超声温度 Ultrasonication temperature (C, °C)	区间内 Within the range	37	61	1	1	3
皂苷得率 Yield of saponins (%)	最大值 Maximum	11.06	14.06	1	1	3

表 10 苜蓿皂苷最优超声工艺与提取得率

超声工艺 Ultrasonication process			模型预测皂苷得率 Model prediction of saponin yield (%)		模型验证皂苷得率 Model validation of saponin yield (%)		P 值 P-value	理想 程度 Desir- ability
超声料液比 Ultrasonication solid-to-liquid ratio	超声时间 Ultrasonication time (min)	超声温度 Ultrasonication temperature (°C)	复合菌组 Composite bacteria group	未加菌组 No bacteria group	复合菌组 Composite bacte- ria group	未加菌组 No bacteria group		
1:23.1	72.7	47.3	13.97	7.21	13.87±0.34a	6.99±0.39b	0.0042	0.96

发酵,结果表明,3种菌按1:1:1共同发酵显著优于单菌发酵。在优化条件(发酵时间50.3 h、料液比1:1.27、菌添加量0.062 mL)下,苜蓿皂苷得率达11.68%,较未添加菌剂的对照组提升67.1%。益生菌在代谢过程中可产纤维素酶、蛋白酶、有机酸等,有效破坏细胞壁结构,促进活性成分释放^[30-33]。此外,酵母与乳杆菌的协同代谢可增强发酵体系的稳定性,降低pH,抑制杂菌滋生,从而进一步提升发酵效果^[34]。本研究结果验证了复合菌发酵优于单菌发酵,有助于皂苷的高效释放,且与已有研究结果一致^[35]。与以往多采用单菌或双菌组合的研究不同,本研究创新性地构建了3菌协同发酵体系,菌种在厌氧环境下实现代谢互补,不仅显著提升了皂苷得率,还缩短了发酵周期,为苜蓿皂苷的绿色、高效提取提供了新的技术路径。

在提取工艺方面,超声辅助提取可通过空化效应和微射流作用破坏细胞结构,显著增强活性成分的释放^[36-37]。发酵—超声协同提取技术结合了发酵对细胞壁的预处理作用与超声在细胞壁破坏和成分释放方面的优势,具有绿色高效、能耗低等特点,展现出良好的工业化应用潜力。本研究基于响应面法优化超声提取参数,结果表明,在超声时间 72.7 min、料液比 1:23.1、超声温度 47.3 °C 条件下,苜蓿皂苷得率达 13.87%,较对照组提高 98.4%。研究发现,适宜的料液比有助于活性成分的充分溶出,同时兼顾提取效率与能耗控制;合理的超声时间可在破壁效率与成分稳定性之间实现平衡;而适当的超声温度则有助于促进目标成分的释放并避免热降解^[38-40]。与传统热醇提取和常规超声提取相比,本研究构建的发酵—超声协同提取工艺在提取效率、绿色环保性及工艺稳定性方面均表现出明显优势,符合现代功能性添加剂绿色高效开发的需求^[41-43]。此外,该工艺不仅显著提高了苜蓿的皂苷得率,也为苜蓿资源的高值化利用提供了新的技术路径。

尽管本研究取得了积极成果,但仍存在一定的局限性。首先,皂苷含量测定采用香草醛—高氯酸显色法,该方法主要反映样品中可显色的总皂苷元当量,无法区分糖苷型皂苷与脱糖后的皂苷元。由于未开展结构解析,尚不能确认复合发酵体系中微生物分泌的糖苷酶是否引起糖苷型皂苷的部分脱糖或降解,形成小分子皂苷元并引起显色值的表观升高,也未验证结构转化与生物活性变化之间的关系。因此,本研究结论主要反映发酵—超声协同处理对可显色皂苷元当量的提升作用,其具体化学结构变化及功能效应尚需进一步研究。未来可结合代谢组学、UPLC-Q-TOF-MS/MS 等技术,揭示发酵过程中皂苷单体的转化路径及结构—功能关联机制。同时,建议通过动物饲喂试验评估复合菌发酵—超声协同提取产物在畜禽中的安全性与饲用效果,为其在无抗养殖与功能性饲料领域的推广应用提供科学依据。总体而言,本研究创新性地构建了复合益生菌发酵联合超声辅助提取的绿色高效苜蓿皂苷提取工艺,显著提高了皂苷元当量和提取效率,优化了关键工艺参数,验证了发酵—超声协同效应在活性成分提取中的可行性。该工艺为苜蓿皂苷及其他植物活性成分的高值化开发与产业化应用提供了技术支撑,具有良好的应用前景。

4 结论

本研究构建了复合益生菌发酵协同超声辅助提取苜蓿皂苷的高效工艺体系。以干酪乳杆菌、枯草芽孢杆菌和酿酒酵母 1:1:1 复合发酵,结合 Box-Behnken 响应面优化工艺参数,确定最优发酵条件为料液比 1:1.27、发酵时间 50.3 h、菌添加量 0.062 mL,在此条件下皂苷得率达 11.68%。进一步优化超声提取工艺,确定最佳提取条件为料液比 1:23.1、超声时间 72.7 min、超声温度 47.3 °C,皂苷得率提升至 13.87%,较对照组提高 98.4%。本研究为苜蓿活性成分的高效提取与高值化开发提供了理论依据与技术支持,同时拓展了植物性饲料功能化加工的新路径,具有良好的推广与应用前景。

参考文献 References:

- [1] Zhu X Y, Chen W X, Li M Y, *et al.* Comprehensive evaluation of the nutritional value and contaminants of alfalfa (*Medicago sativa* L.) in China. *Frontiers in Nutrition*, 2025, 12: 1539462.
- [2] Ma J X, Huangfu W, Yang X, *et al.* “King of the forage”—alfalfa supplementation improves growth, reproductive performance, health condition and meat quality of pigs. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022, 9: 1025942.
- [3] Zhang L. Study on the extraction, separation and purification of saponins from Xinjiang *Medicago sativa* L. Urumqi: Xinjiang University, 2009.
张亮. 新疆紫花苜蓿皂苷的提取、分离及纯化工艺研究. 乌鲁木齐: 新疆大学, 2009.
- [4] Cui Y L, Li F, Zhu X Y, *et al.* Alfalfa saponins inhibit oxidative stress-induced cell apoptosis through the MAPK signaling pathway. *Redox Report: Communications in Free Radical Research*, 2022, 27(1): 1—8.
- [5] Zhang Y, Ma S, Li S R, *et al.* Effects of alfalfa saponin extract on immunity, antioxidant capacity and rumen micro flora of weaned Hu sheep. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2024, 51(7): 2799—2809.
张艳, 马森, 栗守仁, 等. 苜蓿皂苷提取物对断奶湖羊免疫、抗氧化能力和瘤胃微生物区系的影响. *中国畜牧兽医*, 2024, 51(7): 2799—2809.
- [6] Wang C Z, Wang Y H, Shi Y H, *et al.* Effects of alfalfa saponins on the lipid metabolism, antioxidation and immunity of weaned

- piglets. *Acta Prataculturae Sinica*, 2011, 20(4): 210—218.
- 王成章, 王彦华, 史莹华, 等. 苜蓿皂苷对断奶仔猪脂质代谢、抗氧化和免疫的影响. *草业学报*, 2011, 20(4): 210—218.
- [7] Yang F, Yang F, Zhai Z H, *et al.* Effects of alfalfa saponins on the production performance, serum biochemical factors, and immune factors in Small-Tailed Han sheep. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022, 9: 924373.
- [8] Li W Y, Liu X L, Hu M Y, *et al.* Effects of alfalfa saponins added to diet on production performance, antioxidant and immune performance of broiler chickens. *Chinese Journal of Animal Science*, 2024, 60(11): 320—325.
- 李文远, 刘旭乐, 胡明扬, 等. 日粮中添加苜蓿皂苷对肉仔鸡生产性能、抗氧化及免疫性能的影响. *中国畜牧杂志*, 2024, 60(11): 320—325.
- [9] Fan W N, Zhang X L, Shi P F, *et al.* Effects of dietary alfalfa saponins on laying performance, egg cholesterol concentration, and ATP-binding cassette transporters G5 and G8 expression in laying hens. *Journal of Applied Animal Research*, 2018, 46(1): 1051—1058.
- [10] Fan W N, Yang Y X, Shi Y Q, *et al.* Effects of dietary alfalfa saponin on digestive physiology in weaned piglets. *Indian Journal of Animal Research*, 2024, 58(3): 388—394.
- [11] Krakowska-sieprawska A, Rapińska K, Walczak-skierska J, *et al.* Comparison of various extraction techniques of *Medicago sativa*: yield, antioxidant activity, and content of phytochemical constituents. *Journal of AOAC International*, 2017, 100(6): 1681—1693.
- [12] Li B, Wei G P. Extraction process of alfalfa saponins with ultrasound. *Food Science and Technology*, 2012, 37(4): 187—189.
- 李波, 魏广培. 超声波提取苜蓿总皂苷优化工艺的研究. *食品科技*, 2012, 37(4): 187—189.
- [13] Hadidi M, Ibarz A, Pagan J. Optimisation and kinetic study of the ultrasonic-assisted extraction of total saponins from alfalfa (*Medicago sativa*) and its bioaccessibility using the response surface methodology. *Food Chemistry*, 2020, 309: 125786.
- [14] Wu Y P, Cui Y H, Zhu Y P, *et al.* Fermentation of Chinese herbal drugs by microorganism and its application to replacing antibiotics in breeding industry. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2024, 56(5): 146—151.
- 吴玉苹, 崔艳红, 朱艳平, 等. 微生物发酵中草药及其在养殖业中替抗应用. *畜牧与兽医*, 2024, 56(5): 146—151.
- [15] Ma X W, Xiao H B, Yang X, *et al.* Effects of fermented compound Chinese herbs on serum biochemical, antioxidant and reproductive hormone indices of dairy cows in late pregnancy. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2024, 36(4): 2434—2444.
- 马晓婉, 肖红波, 杨晓, 等. 益生菌发酵复方中草药对妊娠后期奶牛血清生化、抗氧化和生殖激素指标的影响. *动物营养学报*, 2024, 36(4): 2434—2444.
- [16] Wang C X, Wang Y X, Teng Y D, *et al.* Win-win cooperation between plant substrates and probiotics: Revealing biotransformation and bioactive metabolites in *Elaeagnus moorcroftii* Wall. ex Schlecht fermented by *Lactocaseibacillus paracasei* YL-29. *Food Science and Technology*, 2024, 204: 116442.
- [17] You X Y, Li Y C, Bu Q Y, *et al.* Biotransformation of ginsenoside Rd by fermentation of ginseng rhizome by *Bacillus subtilis* LM 4-2. *Food and Fermentation Industries*, 2024, 50(11): 38—47.
- 尤晓颜, 李亚春, 布青云, 等. 枯草芽孢杆菌 LM 4-2 发酵人参芦头生物转化人参皂苷 Rd 的研究. *食品与发酵工业*, 2024, 50(11): 38—47.
- [18] Tang W T, Tang T, Shen X M, *et al.* Research progress in fermentation technology of *Bacillus subtilis*. *Contemporary Chemical Industry*, 2024, 53(8): 1952—1958.
- 汤维涛, 唐堂, 沈雪梅, 等. 枯草芽孢杆菌发酵工艺研究进展. *当代化工*, 2024, 53(8): 1952—1958.
- [19] Li W Y, Zhu Q, Chen B, *et al.* Effects of different enzyme-microbe combinations on silage quality of *Pennisetum giganteum*. *Feed Research*, 2025, 48(14): 125—130.
- 李文优, 朱芹, 陈斌, 等. 添加不同复合菌酶对巨菌草青贮品质的影响. *饲料研究*, 2025, 48(14): 125—130.
- [20] Luo J Y, Lu J, Gao B, *et al.* Comprehensive in silico analysis of the probiotics, and preparation of compound probiotics-*Polygonatum sibiricum* saponin with hypoglycemic properties. *Food Chemistry*, 2023, 404: 134569.
- [21] Su M, Piao C H, Liang D C, *et al.* Screening and identification of β -glucosidase-producing yeast and its application in the bioconversion of ginsenoside Rg3. *Food Science*, 2018, 39(14): 172—178.
- 苏敏, 朴春红, 梁德春, 等. 产 β -葡萄糖苷酶酵母菌的分离鉴定及其在人参皂苷 Rg3 转化中的应用. *食品科学*, 2018, 39(14): 172—178.
- [22] Chen Z Y. Study on optimization of rare ginsenoside CK produced by *Saccharomyces cerevisiae*. Kunming: Yunnan University, 2021.
- 陈志毅. 酿酒酵母产稀有人参皂苷 CK 的优化研究. 昆明: 云南大学, 2021.

- [23] Wang J D T, Xu X, Zou X Q, *et al.* Effect of ultrasound assisted H_2O_2 degradation on longan polysaccharide: degradation kinetics, physicochemical properties and prebiotic activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 282(3): 136902.
- [24] Fu Z F, Wang H B, Deng Z Y, *et al.* Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing by response surface methodology and analysis of its antioxidant activity. *Cereals & Oils*, 2025, 38(4): 120–125.
傅志丰, 王慧宾, 邓朝阳, 等. 响应面法优化超声波辅助提取虎奶菇多酚工艺及其抗氧化活性分析. *粮食与油脂*, 2025, 38(4): 120–125.
- [25] Zhang L, Deng N N, Yagoub A E A, *et al.* Ultrasound-assisted probiotics fermentation suspension treatment under mild heat to improve the storage quality of freshly cut lotus root. *Food Chemistry*, 2022, 397: 133823.
- [26] Mamy D, Boateng I D, Chen X. Metabolomic changes in *Citrus reticulata* peel after conventional and ultrasound-assisted solid-state fermentation with *Aspergillus niger*: A focus on flavonoid metabolism. *Food Chemistry*, 2025, 467: 142224.
- [27] Li W, He W L, Ding K, *et al.* Effects of different treatment methods on antigenic protein and acid soluble protein in soybean meal. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 2020, 48(1): 25–32.
李旺, 何万领, 丁轲, 等. 不同处理方法对豆粕中抗原蛋白和酸溶蛋白的影响. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2020, 48(1): 25–32.
- [28] Wang C, Tang N C, Liu C Y. Extraction of total saponins from *Clinacanthus nutans* and its antioxidant activity. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2023, 42(5): 63–70.
王超, 唐年初, 刘诚毅. 忧遁草总皂苷的提取工艺及其抗氧化活性研究. *食品与生物技术学报*, 2023, 42(5): 63–70.
- [29] Wang G Q, Yang Z D, Wu Q, *et al.* Research advance of probiotics in the fermentation of Chinese herbal medicine. *Journal of University of Shanghai for Science and Technology*, 2024, 46(4): 357–363.
王光强, 杨忠达, 吴倩, 等. 益生菌发酵中草药的研究进展. *上海理工大学学报*, 2024, 46(4): 357–363.
- [30] Xie X X, Tang Z N, Liang S Z, *et al.* Preparation and safety evaluation of probiotic fermented compound dandelion powder. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2025, 52(7): 3420–3428.
谢欣欣, 唐梓宁, 梁孙圳, 等. 益生菌发酵复方蒲公英散的制备及安全性评价. *中国畜牧兽医*, 2025, 52(7): 3420–3428.
- [31] Cui Y P, Xu R, Chen Z Y, *et al.* Effects of mixed fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* on the polyphenol of honeysuckle extract. *Food and Fermentation Industries*, 2022, 48(5): 95–99.
崔亚鹏, 许锐, 陈泽元, 等. 酿酒酵母和植物乳杆菌混合发酵对金银花浸提液多酚物质的影响. *食品与发酵工业*, 2022, 48(5): 95–99.
- [32] Bai Y, Fang X Y, Jiang Y P, *et al.* Sequential fermentation of Ginkgo biloba seeds by *Bacillus subtilis natto* and *Lactobacillus plantarum* enhanced nutrition, flavor and lipid-lowering activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2025, 105(4): 2607–2620.
- [33] Luo Y Q, Hu Q, Lu Y, *et al.* Studies on nutrient composition of cotton meal fermented by *Bacillus subtilis-1*, *Saccharomyces cerevisiae* and their compound bacteria. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2020, 47(2): 452–459.
罗远琴, 胡倩, 芦岩, 等. 枯草芽孢杆菌、酿酒酵母及其复合菌发酵棉粕营养成分变化的研究. *中国畜牧兽医*, 2020, 47(2): 452–459.
- [34] Huang Y P, Yue Y Y, Wang Y Y, *et al.* Effects of synergistic of *Lactobacillus plantarum* R3 and *Saccharomyces cerevisiae* JY2 on the fermentation of wolfberry wine and its process optimization. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2025, 52(1): 143–154.
黄远鹏, 岳洋洋, 王燕燕, 等. 植物乳杆菌 R3 与酿酒酵母菌 JY2 协同发酵对枸杞酒的影响及工艺优化. *安徽农业大学学报*, 2025, 52(1): 143–154.
- [35] Zhang Q, Guo L D, Du X W. Research progress on probiotic fermentation of ginseng and its products. *Food and Fermentation Industries*, 2022, 48(13): 311–319.
张倩, 国立东, 都晓伟. 人参的益生菌发酵及其发酵产品研究进展. *食品与发酵工业*, 2022, 48(13): 311–319.
- [36] Ebenezer O F, Kouadio J E K, Zheng Y Y, *et al.* RSM-based process intensification for arabinoxylan and β -glucan extraction from Brewer's spent grain using ultrasound and microwave-assisted technologies. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*, 2025, 209: 110178.
- [37] Lin B B, Wang S S, Zhou A Q, *et al.* Ultrasound-assisted enzyme extraction and properties of Shatian pomelo peel polysaccharide. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2023, 98: 106507.
- [38] Xu B, Feng M, Tiliwa E S, *et al.* Multi-frequency power ultrasound green extraction of polyphenols from Pingyin rose:

- optimization using the response surface methodology and exploration of the underlying mechanism. *Food Science and Technology*, 2022, 156: 113037.
- [39] Jing B N, Wei L, Zhou Y, *et al.* Optimization of ultrasonic-assisted extraction process for total triterpenoids from *Lonicera confusa* and its antibacterial and antioxidant activity. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(1): 174–181.
景炳年, 魏磊, 周雍, 等. 山银花总三萜超声辅助提取工艺优化及其抗菌抗氧化活性研究. *食品工业科技*, 2021, 42(1): 174–181.
- [40] Li H, Zhai B T, Sun J, *et al.* Ultrasound-assisted extraction of total saponins from *Aralia taibaiensis*: process optimization, phytochemical characterization, and mechanism of α -glucosidase inhibition. *Drug Design, Development and Therapy*, 2022, 16: 83–105.
- [41] Wang Y, Guo S, Liu H F, *et al.* Optimization of composite probiotics fermentation process for Notoginseng Radix et Rhizoma residues by Box-Behnken response surface method and evaluation of their *in vitro* antioxidant activities. *Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine*, 2024, 40(6): 555–568.
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. *南京中医药大学学报*, 2024, 40(6): 555–568.
- [42] Liu L P, Wang Y Z, Yang L, *et al.* Research progress of application and mechanism of ultrasonic technology in microbial fermentation. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(6): 357–362.
刘利平, 王亚珍, 杨蕾, 等. 超声技术在微生物发酵中的应用及其机理研究进展. *食品工业科技*, 2021, 42(6): 357–362.
- [43] Nemes S A, Mitrea L, Teleky B E, *et al.* Integration of ultrasound and microwave pretreatments with solid-state fermentation enhances the release of sugars, organic acids, and phenolic compounds in wheat bran. *Food Chemistry*, 2025, 463(3): 141237.