

混菌发酵苹果酵素工艺研究

刘秀娟^{1,2}, 李庆鹏^{2*}, 崔龙³, 陈云堂³, 倪娜⁴, 李华林^{1,2}

(1. 天津科技大学食品科学与工程学院, 天津 300222; 2. 农业农村部农产品质量安全收贮运管控重点实验室/中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100193; 3. 河南省科学院同位素研究所有限责任公司, 郑州 450015; 4. 内蒙古民族大学生命科学与食品学院, 通辽 028000)

摘要: **目的** 以洛川苹果为原料, 优化混菌发酵苹果酵素的工艺条件。**方法** 在单因素实验的基础上, 酵母菌发酵以酵母菌接种量、发酵温度、料液比为自变量, 植物乳杆菌发酵以白砂糖添加量、发酵温度、料液比为自变量, 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性为响应值, 通过响应面法得到单一菌种发酵的最佳条件。再通过考察菌种接种顺序、接种时间、总发酵时间对苹果酵素的总酸、SOD活性的影响, 得出混菌发酵苹果酵素的发酵条件。**结果** 苹果酵素的最优发酵工艺条件为: 白砂糖添加量为4%、酵母菌接种量为4%、植物乳杆菌接种量为3%、料液比为3:7(苹果浆:水, g/100 mL)。先接种酵母菌, 在31℃条件下发酵5 h, 再接种植物乳杆菌, 在34℃条件下发酵10 h结束。**结论** 优化的发酵工艺可利用酵母菌与植物乳杆菌之间的互利共生关系, 使发酵体系得到充分发酵, 从而得到清澈透亮、酸甜适宜的苹果酵素。

关键词: 苹果酵素; 酵母菌; 植物乳杆菌; 混菌发酵

Study on the process of mixed fermented apple Jiaosu

LIU Xiu-Juan^{1,2}, LI Qing-Peng^{2*}, CUI Long³, CHEN Yun-Tang³, NI Na⁴, LI Hua-Lin^{1,2}

(1. Food Science and Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222, China; 2. Key Laboratory of Agro-products Quality and Safety Control in Storage and Transport Process, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 3. Henan Academy of Sciences Isotope Research Institute Co., Ltd., Zhengzhou 450015, China; 4. College of Life Sciences and Food Engineering, Inner Mongolia National University, Tongliao 028000, China)

ABSTRACT: Objective To optimize the process conditions of mixed fermentation of apple Jiaosu taking Luochuan apple as raw materials. **Methods** On the basis of the single-factor experiment, the inoculation amount of yeast inoculation, fermentation temperature and liquid ratio were used as independent variables for *Saccharomyces cerevisiae* fermentation, the inoculation amount of white granulated sugar addition, fermentation temperature, liquid ratio were used as independent variables for *Lactobacillus plantarum* fermentation, and superoxide dismutase (SOD) activity was the response value, and the best conditions for single bacterial fermentation were obtained by the response surface method. The fermentation conditions of mixed fermented apple Jiaosu were obtained by examining

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFF0213505)、河南省科学院重大科研项目聚焦项目(210101005)、国家自然科学基金项目(31660467)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFF0213505), the Major Research Project Focus Projects of Henan Academy of Sciences (210101005), and the National Natural Science Foundation of China (31660467)

***通信作者:** 李庆鹏, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为农产品加工标准、贮藏保鲜、农产品加工副产物高值化利用。E-mail: lpq1122@qq.com

***Corresponding author:** LI Qing-Peng, Master, Associate Professor, Key Laboratory of Agro-products Quality and Safety Control in Storage and Transport Process, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China. E-mail: lpq1122@qq.com

the effects of the inoculation order, vaccination time and total fermentation time on the total acid and SOD activity of apple Jiaosu. **Results** The optimal fermentation conditions of apple enzymes were as follows: 4% white granulated sugar addition, 4% *Saccharomyces cerevisiae* inoculation, 3% *Lactobacillus plantarum* inoculation, and 3:7 solid liquid ratio (apple pulp:water, g/100 mL). Firstly, the yeast was inoculated, fermented for 5 h at 31 °C, then *Lactobacillus plantarum* was inoculated, fermented for 10 h at 34 °C. **Conclusion** The optimized fermentation process can make use of the mutually beneficial symbiotic relationship between *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum*, so that the fermentation system can be fully fermented, so as to obtain clear and bright, sweet and suitable apple Jiaosu.

KEY WORDS: apple Jiaosu; *Saccharomyces cerevisiae*; *Lactobacillus plantarum*; mixed fermentation

0 引言

苹果属蔷薇科苹果亚科植物,富含膳食纤维、多酚、黄酮、类胡萝卜素等活性成分^[1],具有抗氧化、抗癌等作用,可减少脂质氧化、降低胆固醇、降低心血管疾病和其他慢性疾病的发生风险^[2-3]。2019年中华人民共和国农业农村部数据显示,近5年全国苹果果园面积稳定190万hm²左右,2018年苹果产量接近4000万t,面积和产量均居世界首位。苹果自然腐烂造成的烂果率约10%;落地果、残次果占10%,采收运输粗放造成果品碰撞、刺伤损失约15%,用于加工的苹果不足20%^[4-5]。由此可见,我国存在苹果产能过剩、卖果难、运输成本居高不下、深加工产品品种严重不足等问题。

洛川苹果产自陕西省洛川县。洛川是全国苹果优生区之一,无霜期180d,人称“苹果之乡”。洛川苹果果型端正美观、大小一致;表皮为鲜红色、着色比较均匀;果面光滑、色泽鲜亮;果肉为黄白色、肉质细嫩致密,有淡淡的果香味,汁多酥脆,有蜂蜜味,酸甜适口。

食用酵素是一种以动物、植物和食用菌等为原料,经微生物发酵制得的含有特定生物活性成分的可食用酵素产品^[6]。食用酵素具有平衡机体、消炎杀菌、抗氧化、降低心脑血管疾病风险功能,并且可以延长易腐原料的保质期、改善蛋白质和碳水化合物的消化性以及产品的感官特性等^[7-10]。

目前酵素发酵方法主要指单菌发酵和混菌发酵。单菌发酵即仅利用一种菌进行发酵;混菌发酵是指利用原料中自然分布的微生物或者使用两种及以上微生物进行的发酵方式^[11]。混菌发酵后产品因微生物之间的互利共生关系而具有更丰富的代谢产物^[12]。目前,食用酵素利用的微生物主要为酵母菌、乳酸菌、醋酸菌以及霉菌等^[13-14]。酵母菌为兼性厌氧型,在有氧和无氧条件下,会利用葡萄糖大量合成乙醇、CO₂和水,在此过程中,一些中间代谢产物被排除胞外,例如乳酸、酒石酸和苹果酸等^[11]。乳酸菌可以促进二次代谢物的形成,如细菌素、乙醇、醋酸、芳香化合物、胞外多糖、生物活性肽和维生素^[15-16]。用乳酸菌发酵

食品可快速酸化食品,延长其保质期^[17],提高营养和感官品质,改善风味和质地,去除不良化合物^[18]。而醋酸菌主要用于工业生产酿造食醋及果醋饮品。而霉菌多用于制造豆腐乳、豆豉、酱及酱油等。酵母菌和乳酸菌是良好的发酵剂培养物,既可降低麦麸植酸含量、增加可溶性纤维、总酚含量和抗氧化剂,又可带来独特的风味^[19-22]。因酵母菌与植物乳杆菌之间存在互利共生关系,酵母菌产生的甘露糖可促进植物乳杆菌的生长,而植物乳杆菌的代谢产物为酵母菌的生长提供碳源,使发酵体系产生多种芳香物质^[23],故选用酵母菌与乳酸菌进行混菌发酵。李仲树等^[24]以多种新鲜水果为原料,添加酿酒酵母菌在18~25 °C发酵7~15d,再用醋酸菌进行二次发酵10~30d,经沉淀、萃取、混合过滤后制得五行酵素液。舒旭晨等^[25]以铁皮石斛鲜条为原料,以酵母菌和乳酸菌为混菌发酵剂,对石斛酵素发酵条件进行了优化研究,得到石斛酵素的优化条件,并发现石斛酵素羟基自由基清除率达到了34.79%,比优化前提升了108.45%,相比石斛自然浸出液及单菌发酵具有明显的优势。张海燕等^[26-27]对苹果酵素的自然发酵工艺进行了研究,并探究了该苹果酵素在生物活性物质、功效酶及抗氧化能力的动态变化,结果表明苹果酵素有良好的抗氧化能力。

本研究以洛川苹果为原料,采用混菌发酵技术进行发酵处理,开发出一种新的苹果加工产品,旨在丰富苹果加工产品品类、促进苹果的合理利用、缓解苹果的资源浪费情况。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

材料:洛林富士苹果(挑选大小均一、成熟度相近、无病虫害、无机械损伤、色泽一致的果实,淘宝馋蜀旗舰店);白砂糖(食品级,北京广达恒益科技有限公司);安琪耐高温酿酒高活性干酵母(食品级,北京睿恒安科技有限公司);冻干型乳酸菌粉-植物乳杆菌(食品级,北京萃峰科技有限公司);0.45 μm 滤膜(北京广达恒益科技有限公司)。

试剂:抗坏血酸(vitamin C, VC)(分析纯)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性检测试剂盒(北京索莱宝科

技术有限公司); 葡萄糖(食品级, 北京广达恒益科技有限公司); NaOH (0.1 mol/L, 北京绿源伯德生物科技有限公司)。

1.2 仪器与设备

YP1002 型电子天平(精确至 0.01 g, 上海佑科仪器仪表有限公司); PMK224ZH-E 型分析天平[精确至 0.0001 g, 奥豪斯仪器(上海)有限公司]; GX-3020-C 型电热鼓风干燥箱(深圳立辉环境检测设备有限公司); H2050R 型台式高速冷冻离心机(长沙高新技术产业开发区湘仪离心机仪器有限公司); CSHY473 型数显恒温水浴锅(北京利康科技发展有限公司); DHX 型智能型恒温恒湿培养箱(苏州国华仪器有限公司); ZHJH-C1109C 型超净工作台(上海智城分析仪器制造有限公司); LS-35HJ 型高压蒸汽灭菌锅(江阴滨江医疗设备有限公司); CSHY591 型混匀仪(长沙高新技术产业开发区湘仪离心机仪器有限公司); Spark 型多功能微孔板检测仪(瑞士 TECAN 集团公司); DW-86L626 型超低温冰箱(山东青岛海尔科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 制备工艺

(1)菌种预处理: 称取一定量的酵母菌按 1:100 (g:mL) 的比例加入纯化水, 混匀。酵母菌在 25 °C 水浴 20 min, 待用; 植物乳杆菌混匀后待用, 无需活化。

(2)酵母菌发酵

用清水洗净苹果后去核、切块, 浸泡在 0.1% 的抗坏血酸中 10 min, 打浆。然后按照料液比 3:7 (g/100 mL, 下同) 的加入苹果浆与水, 并添加 4% 的酵母菌(酵母菌液的质量与发酵体系样品质量的比值, 下同)、4% 的白砂糖、0.1% 的抗坏血酸, 在 31 °C 恒温培养箱中发酵 25 h。发酵完成后经 0.45 μm 滤膜过滤, 保存至 4 °C 冰箱。

(2)植物乳杆菌发酵

用清水洗净苹果后去核、切块, 浸泡在 0.1% 的抗坏血酸中 10 min, 打浆。然后按照料液比 3:7 加入苹果浆与水, 并添加 3% 的植物乳杆菌、4% 的白砂糖、0.1% 的抗坏血酸, 在 34 °C 恒温培养箱中发酵 15 h。发酵完成后经 0.45 μm 滤膜过滤, 保存至 4 °C 冰箱。

(3)混菌发酵

用清水洗净苹果后去核、切块, 浸泡在 0.1% 的抗坏血酸中 10 min, 打浆。然后按照料液比 3:7 加入苹果浆与水, 并添加 4% 的酵母菌、4% 的白砂糖、0.1% 的抗坏血酸, 在 31 °C 恒温培养箱中发酵 5 h。发酵 5 h 后加入 3% 的植物乳杆菌, 34 °C 下继续发酵 10 h, 发酵结束后经 0.45 μm 滤膜过滤, 保存至 4 °C 冰箱。

1.3.2 酵母菌发酵工艺单因素研究

白砂糖添加量、菌种添加量、发酵温度、发酵时间、料液比(苹果浆:水, g/100 mL)是影响发酵的主要因素。预实验结果显示酵母菌接种量(A)、发酵温度(B)、料液比(C)对

酵母菌发酵影响显著, 故以此为变量, 通过单因素实验和响应面实验优化酵母菌发酵苹果酵素的发酵工艺参数。

(1)酵母菌接种量单因素考察

酵母菌接种量(酵母菌液的质量与发酵体系样品质量的比值)为 1%、2%、3%、4%、5% 时, 料液比 3:7, 在 31 °C 条件下进行发酵, 发酵时间为 25 h, 测定酵素的总酸和 SOD 活性。重复 3 次实验, 取平均值。

(2)发酵温度单因素考察

在酵母菌接种量为 4%, 发酵温度为 23、27、31、35、39 °C 时, 料液比 3:7 的条件下进行发酵, 并测定酵素的总酸和 SOD 活性。重复 3 次实验, 取平均值。

(3)料液比单因素考察

在酵母菌接种量为 4%, 发酵温度为 31 °C 时, 料液比为 1:7、2:7、3:7、4:7、5:7 的条件下进行发酵, 测定酵素的总酸和 SOD 活性。重复 3 次实验, 取平均值。

1.3.3 酵母菌发酵工艺响应面优化

在单因素考察结果的基础上, 依据 Box-Behnken 原理, 以 SOD 活性为指标进行响应面优化。实验重复 3 次, 取平均值。具体内容见表 1。

表 1 酵母菌发酵工艺 Box-Behnken 设计因素和水平
Table 1 Design factors and levels of Box-Behnken for *Saccharomyces cerevisiae* fermentation process

水平	影响因素		
	A 酵母菌接种量 /%	B 发酵温度 /°C	C 料液比 (g/100 mL)
-1	3	27	2:7
0	4	31	3:7
1	5	35	4:7

1.3.4 植物乳杆菌发酵工艺单因素考察

根据预实验, 发现白砂糖添加量(X_1)、发酵温度(X_2)、料液比(X_3)对植物乳杆菌发酵影响显著, 故以此为变量, 通过单因素实验和响应面实验优化植物乳杆菌发酵苹果酵素的发酵工艺参数。

(1)白砂糖添加量单因素考察

在白砂糖添加量(白砂糖质量占发酵体系样品质量的比值)为 0%、2%、4%、6%、8%, 发酵温度为 33 °C, 料液比为 3:7 的条件下进行发酵, 并测定酵素的总酸和 SOD 活性。重复 3 次实验, 取平均值。

(2)发酵温度单因素考察

在白砂糖添加量为 2%, 发酵温度为 25、29、33、37、41 °C, 料液比为 3:7 的条件下进行发酵, 并测定酵素的总酸和 SOD 活性。重复 3 次实验, 取平均值。

(3)料液比单因素考察

在白砂糖添加量为 2%, 发酵温度为 33 °C, 料液比为 1:7、2:7、3:7、4:7、5:7 的条件下进行发酵, 测定酵素的总酸和 SOD 活性。重复 3 次实验, 取平均值。

1.3.5 植物乳杆菌发酵工艺响应面优化

在单因素考察基础上, 依据 Box-Behnken 原理, 以 SOD 活性为指标进行响应面优化。实验重复 3 次, 取平均值。具体内容见表 2。

表 2 植物乳杆菌发酵工艺 Box-Behnken 设计因素和水平
Table 2 Design factors and levels of Box-Behnken for *Lactobacillus plantarum* fermentation process

水平	影响因素		
	X ₁ 白砂糖添加量 /%	X ₂ 发酵温度 /°C	X ₃ 料液比 (g/100 mL)
-1	2	29	2:7
0	4	33	3:7
1	6	37	4:7

1.3.6 混菌发酵工艺单因素考察

(1) 接种顺序单因素考察

在发酵体系中, 酵母菌与乳酸菌的最适生长温度和时间存在差异, 当混合发酵时, 添加菌种的顺序极有可能出现菌种生长不良情况, 故需要进行对比实验, 确定接种顺序对酵素发酵的影响。

在发酵体系中添加 4% 的白砂糖、0.1% 的抗坏血酸、4% 的酵母菌、3% 的植物乳杆菌料液比为 3:7 时, 进行以下 3 组实验。且每组实验重复 3 次, 取平均值。

(a) 接种 4% 的酵母菌, 31 °C 发酵 5 h 后, 接种 3% 的植物乳杆菌, 34 °C 发酵 10 h, 测定发酵体系的总酸及 SOD 活性;

(b) 同时接种 4% 的酵母菌与 3% 的植物乳杆菌, 34 °C 发酵 15 h, 测定发酵体系的总酸及 SOD 活性;

(c) 接种 3% 的植物乳杆菌, 34 °C 发酵 5 h 后, 接种 4% 的酵母菌, 31 °C 发酵 10 h, 测定发酵体系的总酸及 SOD 活性。

(2) 接种时间单因素考察

其他条件不变, 接种 4% 的酵母菌, 31 °C 下恒温发酵, 分别在发酵时间为 0、5、10、15 h 时接种 3% 的植物乳杆菌, 34 °C 下发酵, 总的发酵时间为 15 h, 发酵完成后测定发酵体系的总酸及 SOD 活性。重复 3 次实验, 取平均值。

(3) 总发酵时间单因素考察

其他条件不变, 接种 4% 的酵母菌, 31 °C 发酵 5 h 后接种 3% 的植物乳杆菌, 34 °C 下恒温发酵, 分别在总的发酵时间为 5、10、15、20、25 h 时测定发酵体系的总酸及 SOD 活性。重复 3 次实验, 取平均值。

1.3.7 实验指标

(1) 总酸的测定

总酸在一定程度上可反映酵素发酵中微生物生长情况, 并且在发酵过程中, 总酸含量的升高, 可有效抑制有害微生物的滋生, 为发酵提供安全稳定的环境条件, 又能促进有益微生物的生长, 加快发酵进程。故按照 GB 12456—2021《食品安全国家标准 食品中总酸的测定》中 NaOH 滴定法进行测定, 由 0.1 mol/L NaOH 滴定, 并基于

乳酸的转化系数计算。按照 T/CBFIA 08003—2017《食用植物酵素》规定的液态食用植物酵素总酸含量应不小于 1.2 g/100 g。

(2) SOD 活力的测定

超氧化物歧化酶是一种以金属离子(铜/锌/锰/铁)作为中心元素的活性蛋白酶, 可有效清除活性氧, 对细胞体起到保护作用。SOD 活力表征物质清除活性氧的能力, 是评价果蔬汁抗氧化活性的指标之一^[28]。将酵素液以 8000 r/min 离心 10 min 后, 使用 SOD 酶试剂盒的测定酶活性。

1.3.8 数据处理

采用 SPSS 24.0 数据分析软件对结果进行统计学分析。使用 Origin 9.1 软件绘图, 使用 Design Expert 8.0.6 进行响应面分析。

2 结果与分析

2.1 酵母菌发酵工艺单因素考察结果

2.1.1 酵母菌接种量对苹果酵素总酸和 SOD 的影响

酶活是衡量发酵体系是否达成成熟的指标之一, 是酵素行业广泛测定和使用的营养指标^[29]。不同酵母菌接种量对苹果酵素的发酵影响见图 1。由图 1 可知, 随着酵母菌接种量的增加, 酵母菌 SOD 活性、总酸含量逐渐升高, 表明随着酵母菌接种量的增加, SOD 活性与总酸含量呈上升的趋势, 也就是说随着接种量的增加, 发酵速度越快。当接种量为 4% 时, SOD 活性最高, 为 51.25 U/g, 总酸含量为 1.77 g/kg; 在 4%~5% 时, SOD 活性、总酸含量明显降低, 可能与能利用有机酸的微生物大量繁殖有关^[30]。当接种量为 5% 时, SOD 活性降至 23.27 U/g, 总酸含量为 1.64 g/kg。故选用 3%、4%、5% 的酵母菌接种量作为后续优化条件。

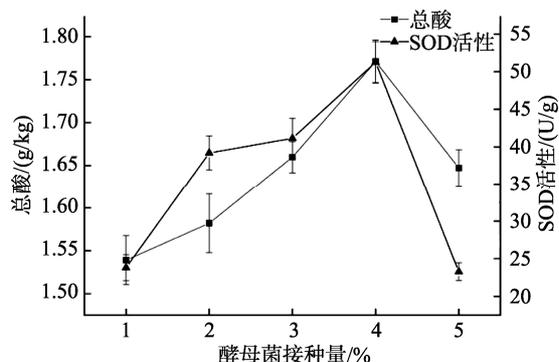


图 1 酵母菌接种量对 SOD 活性、总酸含量的影响(n=3)
Fig.1 Effects of *Saccharomyces cerevisiae* inoculation on SOD activities and total acid content (n=3)

2.1.2 发酵温度对苹果酵素总酸和 SOD 的影响

由图 2 可知, 随着温度的升高, 发酵液的 SOD 活性、总酸含量逐渐升高, 在 31 °C 时, SOD 活性为 36.27 U/g, 总酸含量为 1.75 g/kg。当温度大于 31 °C 时, SOD 活性、总酸含量缓

慢下降, SOD 活性从 36.27 U/g 下降至 23.91 U/g, 总酸含量从 1.75 g/kg 降至 1.70 g/kg。在 35~39 °C 之间变化趋势减缓, 其主要原因是发酵液中的酵母菌活力下降, 发酵速度减缓。故选定后续的优化条件为发酵温度 27、31 和 35 °C。

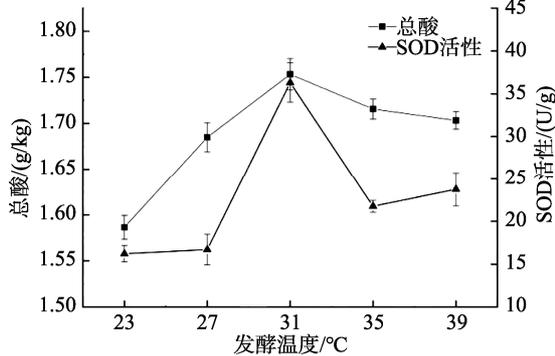


图 2 发酵温度对 SOD 活性、总酸含量的影响(n=3)

Fig.2 Effects of fermentation temperatures on SOD activities and total acid content (n=3)

2.1.3 料液比对苹果酵素总酸和 SOD 的影响

由图 3 可知, 随着料液比的增加, SOD 活性、总酸含量逐渐升高, 在料液比为 3:7 时, SOD 活性为 37.92 U/g, 总酸含量为 1.93 g/kg。当料液比大于 3:7 时, 其 SOD 活性、总酸含量降低后趋于稳定。当料液比为 5:7 时, 酵母菌不足以充分利用发酵液中的物质, 使得发酵速度减缓, 并逐渐停止。故选定料液比 2:7、3:7 和 4:7 作为响应面优化条件。

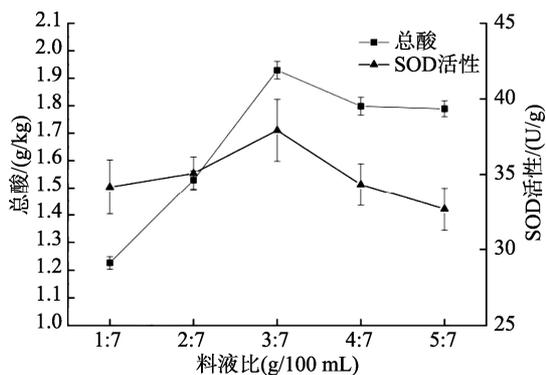


图 3 料液比对 SOD 活性、总酸含量的影响(n=3)

Fig.3 Effects of liquid ratios on SOD activities and total acid content (n=3)

2.1.4 酵母菌发酵工艺响应面优化结果

在单因素实验的基础上, 以酵母菌接种量(A)、发酵温度(B)和料液比(C) 3 个因素为自变量, 以 SOD 活性为响应值(Y₁), 优化苹果酵素的发酵工艺。结果见表 3。利用 Design Expert 8.0.6 软件, 对表 3 的数据建立二次回归模型, 拟合的二次多元回归方程如下:

$$Y_1 = -708.20 + 75.25A + 34.02B + 32.69C - 0.76AB + 0.78AC + 0.14BC - 6.76A^2 - 0.50B^2 - 6.35C^2$$

表 3 酵母菌发酵工艺的 Box-Behnken 设计及结果
Table 3 Box-Behnken design and results of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation process

编号	因素及水平			Y ₁ /(U/g)
	A/%	B/°C	C (g/100 mL)	
1	0	0	0	27.2097
2	0	0	0	28.3595
3	-1	1	0	17.378
4	0	1	1	18.3236
5	0	0	0	25.3055
6	1	0	1	14.7501
7	1	1	0	10.6694
8	-1	0	-1	14.4369
9	-1	0	1	12.2591
10	-1	-1	0	7.56296
11	0	1	-1	8.17309
12	0	0	0	23.2715
13	0	-1	1	15.7929
14	0	0	0	30.4937
15	1	0	-1	13.7972
16	1	-1	0	12.9408
17	0	-1	-1	7.90916

由表 3~4 发现, 模型 P<0.01, 失拟项 P>0.05, 说明回归模型具有较高的拟合度。R² 为 0.9074, 表明实测值和预测值间的拟合度较高。其中, 一次项 A、B、C 和交互项 AB、BC、AC 无显著影响, 二次项 A²、B²、C² 有显著影响。由 F 值大小可知, 影响因素的主次顺序为酵母菌接种量>料液比>发酵温度。

表 4 回归模型分析
Table 4 Regression model analysis

参数	平方和	自由度	均方	F	P
模型	796.25	9	88.47	7.62	0.0069
A	0.034	1	0.034	4.92	0.9584
B	13.36	1	13.36	1.15	0.3190
C	35.32	1	35.32	3.04	0.1247
AB	36.52	1	36.52	3.14	0.1195
AC	2.45	1	2.45	0.21	0.6599
BC	1.28	1	1.28	0.11	0.7492
A ²	192.67	1	192.67	16.59	0.0047
B ²	271.21	1	271.21	23.35	0.0019
C ²	169.92	1	169.92	14.64	0.0065
残差	81.29	7	11.61	-	-
失拟项	50.45	3	16.82	2.18	0.2329
净误差	30.85	4	7.71	-	-
总和	877.55	16	-	-	-

注: -表示无此项, 下同。

利用 Design-Expert 8.0.6 软件对响应面法结果进行分析, 得出酵母菌接种量、发酵温度和料液比之间两两因素之间无交互作用, 与前文的数据分析结果相同。

2.1.5 酵母菌发酵方案的确定和验证

解析回归方程, 得出最优发酵方案为: 酵母菌接种量为 3.99%, 发酵温度为 31.35 °C, 料液比为 3.17:7, 在白砂糖添加量为 6%, 发酵时间为 25 h 的条件下, SOD 活性为 27.16 U/g。为了验证模型的准确性, 将酵母菌发酵方案改为酵母菌接种量为 4%, 发酵温度为 31 °C, 料液比为 3:7, 此时, SOD 活性为 29.36 U/g。此结果与理论预测值仅差 0.07%, 说明模型可以很好地预测苹果酵素的发酵工艺。

2.2 植物乳杆菌发酵工艺单因素考察结果

2.2.1 白砂糖添加量对苹果酵素总酸和 SOD 的影响

白砂糖可为苹果酵素发酵提供充足的碳源, 使植物乳杆菌等有益微生物得以大量繁殖, 同时代谢生成一些有益物质^[31]。由图 4 可知, 随着白砂糖添加量的增加, SOD 活性先上升后下降, 在白砂糖添加量为 2% 时, SOD 活性最高, 为 55.96 U/g, 总酸含量为 0.95 g/kg。当添加量超过 6% 时, SOD 活力下降至 28.68 U/g, 总酸含量下降至 0.88 g/kg。结果表明发酵液中糖添加量过高或过低, 都可能严重影响微生物的生长和产物的合成, 糖添加量过低, 发酵不完全, 产物少, 总酸、SOD 活性等均不高; 糖添加量过高, 发酵液的渗透压增加, 微生物正常生长代谢受到抑制, 发酵进程不能顺利进行, 总酸、SOD 活性均受到影响^[27]。故选定白砂糖添加量 0%、2% 和 4% 作为响应面优化条件。

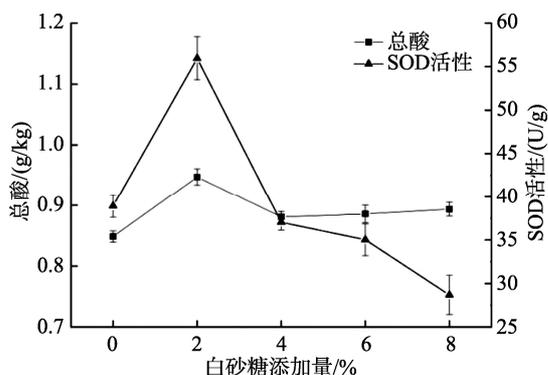


图 4 白砂糖添加量对 SOD 活性、总酸含量的影响 ($n=3$)

Fig.4 Effects of carbon source additions on SOD activities and total acid content ($n=3$)

2.2.2 发酵温度对苹果酵素总酸和 SOD 的影响

由图 5 可知, 随着温度的升高, SOD 活性、总酸含量显著升高; 在 33 °C 时, SOD 活性为 65.90 U/g, 总酸含量为 0.73 g/kg。当温度大于 33 °C 时, SOD 活性、总酸含量均逐渐降低。在 41 °C 时, SOD 活性为 41.69 U/g, 总酸含量为 0.58 g/kg。故后续优化实验条件为发酵温度 29、33 和 37 °C。

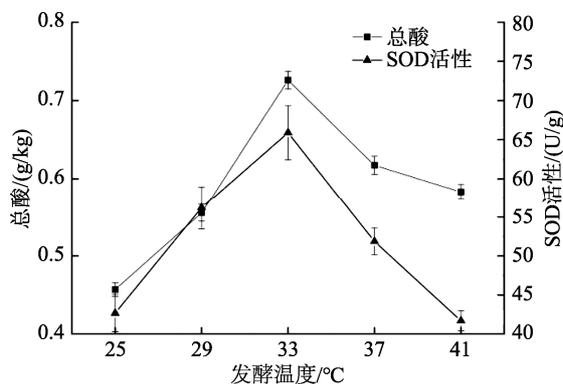


图 5 发酵温度对 SOD 活性、总酸含量的影响 ($n=3$)

Fig.5 Effects of fermentation temperatures on SOD activities and total acid content ($n=3$)

2.2.3 料液比对苹果酵素总酸和 SOD 的影响

由图 6 可知, 随着料液比的增加, SOD 活性明显升高, 在料液比为 3:7 时, 活性最大, 为 46.66 U/g, 而总酸含量为 0.73 g/kg。当料液比为 5:7 时, SOD 活性降至 34.67 U/g, 总酸含量降至 0.69 g/kg。这可能是由于水量增多, 会降低发酵体系中的糖浓度, 从而降低高渗透压, 使得微生物生长和发酵受到影响, 不利于发酵。只有在适量的料液比下苹果酵素才能发酵完全, 保证产品品质^[18]。故选定料液比 2:7、3:7 和 4:7 为后续优化条件。

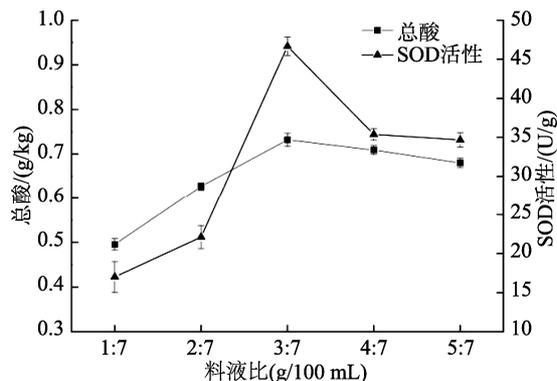


图 6 料液比对 SOD 活性、总酸含量的影响 ($n=3$)

Fig.6 Effects of liquid ratios on SOD activities and total acid content ($n=3$)

2.2.4 植物乳杆菌发酵工艺响应面优化结果

在单因素实验的基础上, 以白砂糖添加量 (X_1)、发酵温度 (X_2) 和料液比 (X_3) 3 个因素为自变量, 以 SOD 活性为响应值 (Y_2), 优化苹果酵素的发酵工艺。结果见表 5。利用 Design Expert 8.0.6 软件, 对表 5 的数据建立二次回归模型, 拟合的二次多元回归方程如下:

$$Y_2 = -606.76 - 0.12X_1 + 29.58X_2 + 99.36X_3 + 0.07X_1X_2 + 0.75X_1X_3 - 0.37X_2X_3 - 1.26X_1^2 - 0.43X_2^2 - 14.36X_3^2$$

由表 5~6 可知, 模型 $P < 0.0001$, 失拟项 $P > 0.05$, 说明回归模型具有较高的拟合程度。 R^2 为 0.9783, 表明实测值和预测值间拟合程度高。其中, 一次项 X_1 和交互项 X_1X_2 、

X_2X_3 、 X_1X_3 无显著影响, 一次项 X_2 、 X_3 和二次项 X_1^2 、 X_2^2 有显著影响, 二次项 X_3^2 有极显著影响。根据 F 值可知, 影响因素的主次顺序为料液比>发酵温度>白砂糖添加量。

表 5 植物乳杆菌发酵工艺的 Box-Behnken 设计及结果
Table 5 Box-Behnken design and results of the *Lactobacillus plantarum* fermentation process

编号	因素及水平			SOD 活性/(U/g)
	X_1 /%	X_2 /°C	X_3 (g/100 mL)	
1	0	0	0	43.4643
2	0	1	-1	20.1353
3	-1	0	1	23.4532
4	1	-1	0	27.0053
5	-1	-1	0	28.9305
6	-1	1	0	31.3633
7	1	1	0	31.8267
8	-1	0	-1	23.9138
9	1	0	1	23.5657
10	0	-1	-1	13.0778
11	0	0	0	41.0751
12	0	0	0	39.316
13	0	0	0	40.555
14	1	0	-1	18.0548
15	0	-1	1	23.7228
16	0	0	0	43.7718
17	0	1	1	24.8898

表 6 回归模型分析
Table 6 Regression model analysis

参数	平方和	自由度	均方	F	P
模型	1381.42	9	153.49	35.15-	<0.0001
X_1	6.49	1	6.49	1.49	0.2621
X_2	29.95	1	29.95	6.86	0.0345
X_3	52.27	1	52.27	11.97	0.0106
X_1X_2	1.43	1	1.43	0.33	0.5855
X_1X_3	8.91	1	8.91	2.04	0.1961
X_2X_3	8.67	1	8.67	1.99	0.2016
X_1^2	106.63	1	106.63	24.42	0.0017
X_2^2	196.00	1	196.00	44.88	0.0003
X_3^2	867.92	1	867.92	198.74	<0.0001
残差	30.57	7	4.37	-	-
失拟项	15.80	3	5.27	1.43	0.3591
净误差	14.77	4	3.69	-	-
总和	1411.99	16	-	-	-

利用 Design-Expert 8.0.6 软件对响应面实验结果进行分析, 得出白砂糖添加量、发酵温度、料液比之间两两因素无交互作用, 与前文的数据分析结果相同。

2.2.5 植物乳杆菌发酵方案的确定和验证

解析回归方程得最优发酵方案: 白砂糖添加量为 4%, 发酵温度为 33.69 °C, 料液比为 3.13:7, SOD 活性为 36.19 U/g。为了验证模型的准确性, 将植物乳杆菌发酵方案改为白砂糖添加量为 4%, 发酵温度为 34 °C, 料液比为 3:7, 此方案 SOD 活性为 37.53 U/g。此结果与理论预测值相差 0.04%, 说明模型可以很好地预测植物乳杆菌苹果酵素的发酵工艺。

2.3 混菌发酵工艺研究

2.3.1 接种时间对苹果酵素总酸和 SOD 的影响

由图 7 可知, 接种酵母菌后, 31 °C 恒温发酵 5 h 加入植物乳杆菌的发酵液的 SOD 活性和总酸含量达到最高, 分别为 33.09 U/g 和 1.26 g/kg, 表明此时的发酵体系可充分发挥两菌的优势, 可使发酵液发酵完全。故选定在 5 h 时接种植物乳杆菌。

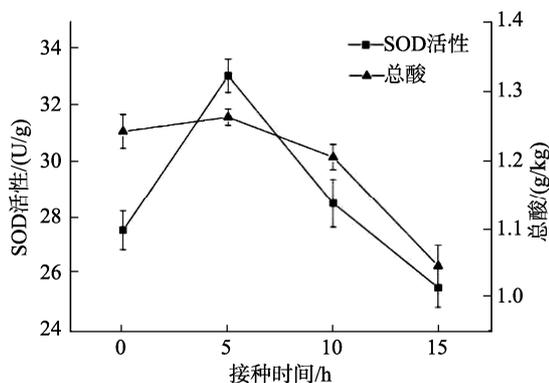
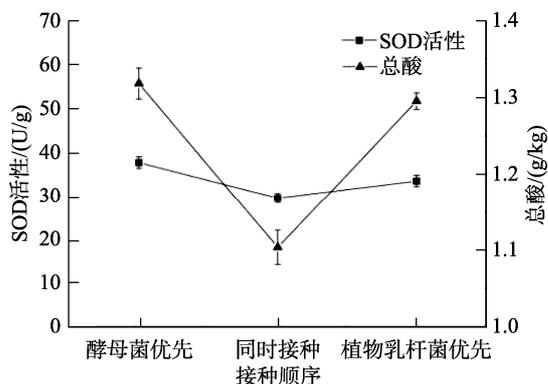


图 7 接种时间对 SOD 活性、总酸含量的影响($n=3$)

Fig.7 Effects of vaccination time on SOD activities and total acid content ($n=3$)

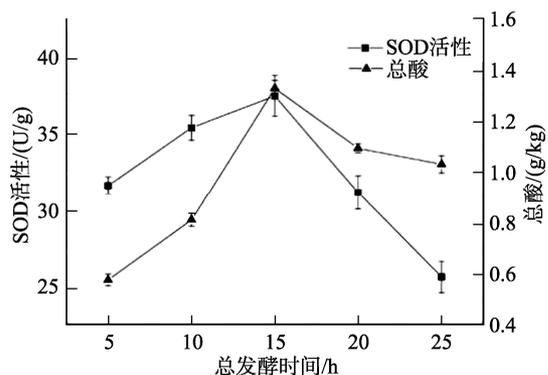
2.3.2 接种顺序对苹果酵素总酸和 SOD 的影响

由图 8 可知, 先接种 4% 的酵母菌, 后接种 3% 的植物乳杆菌进行发酵, 发酵液的 SOD 活性和总酸含量最大, 分别为 37.66 U/g 和 1.32 g/kg。同时接种酵母菌与植物乳杆菌进行发酵, SOD 活性和总酸含量最低, 分别为 29.53 U/g 和 1.10 g/kg。其主要原因是酵母菌为好氧菌, 植物乳杆菌为厌氧菌, 两者对氧气需求、所需发酵温度差异较大^[18], 同时接种无法达到发酵最佳条件。如果先接种植物乳杆菌, 酵母菌容易生长不良。而植物乳杆菌对营养物质的利用率高, 在营养物质大量消耗后添加酵母菌, 酵母菌将无法利用碳源产生代谢产物, 此时发酵液尚未发酵完全, 植物乳杆菌已发酵时间过长, 使得植物乳杆菌出现自溶或衰亡现象^[18]。故选定优先接种酵母菌、后接种植物乳杆菌。

图 8 接种顺序对 SOD 活性、总酸含量的影响($n=3$)Fig.8 Effects of vaccination sequence on SOD activities and total acid content ($n=3$)

2.3.3 总发酵时间对苹果酵素总酸和 SOD 的影响

由图 9 可知, 接种酵母菌 5 h 后, 接种植物乳杆菌继续发酵, 在 5~15 h 时 SOD 活性、总酸含量明显升高, 可达到 37.44 U/g, 总酸含量为 1.33 g/kg。酵母菌与植物乳杆菌之间存在互利共生关系。酵母菌产生含有中链脂肪酸的甘露糖, 促进植物乳杆菌的生长, 而植物乳杆菌的代谢产物为酵母菌的生长提供碳源, 植物乳杆菌还可通过丙酮酸盐裂解酶将丙酮酸盐转化为甲酸盐, 或者将柠檬酸盐分解为乳酸盐、乙酰甲基原醇、双乙酰、2,3-丁二醇等芳香物质, 使发酵体系产生香气^[18]。故选定总发酵时间为 15 h。

图 9 总发酵时间对 SOD 活性、总酸含量的影响($n=3$)Fig.9 Effects of total fermentation time on SOD activities and total acid content ($n=3$)

2.4 验证实验

由上述实验可得, 混菌发酵的最佳工艺条件为: 添加 4% 的酵母菌、4% 的白砂糖、0.1% 的抗坏血酸, 在 31 °C 恒温培养箱中发酵 5 h。发酵 5 h 后加入 3% 的植物乳杆菌, 34 °C 下继续发酵 10 h。在最佳工艺条件下发酵苹果酵素, 其 SOD 活性为 36.47 U/g, 总酸含量为 1.29 g/kg。与上述实验结果相符, 此时过滤所得苹果酵素清澈透亮、质地均匀、酸甜适宜。因此, 可作为最优工艺参数。

3 结 论

实验采用单因素及响应面法优化酵母菌和植物乳杆菌的发酵工艺, 进而研究混菌发酵的发酵工艺, 可知混菌发酵的最佳工艺, 即添加 4% 的酵母菌、4% 的白砂糖、0.1% 的抗坏血酸, 在 31 °C 恒温培养箱中发酵 5 h。发酵 5 h 后加入 3% 的植物乳杆菌, 34 °C 下继续发酵 10 h, 过滤得清澈透亮、质地均匀、酸甜适宜的苹果酵素。

孙淑夷等^[32]通过研究荔枝汁混菌发酵工艺及其产物的功能活性成分发现, 发酵过程中, 发酵液的总糖含量会逐渐降低, 总酚和总酸含量逐渐增加, 微生物会大量利用葡萄糖, 使得发酵液中的酒石酸含量逐渐降低, 乳酸含量逐渐增加, 草酸、苹果酸、柠檬酸、琥珀酸、丙酮酸含量呈先增加后降低趋势。随着发酵时间的延长, SOD 酶活性呈增加趋势, 且主要增长阶段为酵母菌发酵阶段。其因为发酵过程中微生物不断增长, 微生物细胞会不断分泌出相应的功能酶, 再通过细胞自溶或物理方法使得细胞破裂释放出大量的酶, 从而导致发酵液中功能酶活性不断增加^[32]。以上研究结论与本研究结果相一致, 表明此结果是水果混菌发酵的共有特征。本研究采用酵母菌与植物乳杆菌对苹果汁进行混菌发酵, 丰富了苹果产品的种类, 具有广阔的市场发展前景。而混菌发酵苹果酵素的保质期尚无法确定, 为进一步延长产品保质期, 后续可开展苹果酵素贮藏技术及工艺的研究。

参考文献

- [1] KSCHONSEK J, WOLFRAM T, STÖCKL A, *et al.* Polyphenolic compounds analysis of old and new apple cultivars and contribution of polyphenolic profile to the *in vitro* antioxidant capacity [J]. *Antioxidants*, 2018, 7(1): 20.
- [2] VAFA MR, HAGHIGHATJOO E, SHIDFAR F, *et al.* Effects of apple consumption on lipid profile of hyperlipidemic and overweight men [J]. *Int J Prev Med*, 2011, 2(2): 94-100.
- [3] JEANELLE B, RUI HL. Apple phytochemicals and their health benefits [J]. *Nutr J*, 2004. DOI: 10.1186/1475-2891-3-5
- [4] 苏军萍. 制约苹果发展的因素及发展建议[J]. *果树资源学报*, 2020, 1(2): 92-93.
SU JP. Factors and development proposals that constrain apple's development [J]. *J Fruit Resour*, 2020, 1(2): 92-93.
- [5] 王田利. 中国苹果供给侧问题在 2019 年的暴露及应对措施[J]. *北方果树*, 2020, (1): 47-49, 56.
WANG TL. China's Apple supply-side problems in 2019 exposure and response measures [J]. *North Fruits*, 2020, (1): 47-49, 56.
- [6] 朱政, 周常义, 曾磊, 等. 酵素产品的研究进展及问题探究[J]. *中国酿造*, 2019, 38(3): 10-13.
ZHU Z, ZHOU CY, ZENG L, *et al.* Research progress and problems exploring of ferment product [J]. *China Brew*, 2019, 38(3): 10-13.
- [7] NOUT MJR. Food technologies: Fermentation [J]. *Encycl Food Saf*, 2014, 3: 168-177.
- [8] TAMANG JP, DONG HS, SU JJ, *et al.* Functional properties of microorganisms in fermented foods [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 578.
- [9] ADESULU AT, AWOJOBI KO. Enhancing sustainable development

- through indigenous fermented food products in Nigeria [J]. Afr J Microbiol Res, 2014, 8(12): 1338–1343.
- [10] ADEKEMI TAD, SAMUEL OD, ADENIYI O. Synergistic microbial interactions between lactic acid bacteria and yeasts during production of Nigerian indigenous fermented foods and beverages [J]. Food Control, 2020, 110: 106963.
- [11] 尹欢, 方伟. 药食两用植物酵素活性成分及发酵机理研究进展[J]. 农产品加工, 2020, (3): 89–91, 94.
YU H, FANG W. Research progress on active components and fermentation mechanism of medicinal and edible plants ferment [J]. Farm Prod Process, 2020, (3): 89–91, 94.
- [12] 高庆超, 常应九, 马蓉, 等. 黑果枸杞酵素自然发酵过程中微生物群落的动态变化[J]. 食品与发酵工业, 2019, (13): 126–133.
GAO QC, CHANG YJ, MA R, *et al.* Dynamic changes in the microbiome during the natural fermentation of black fruit fermentation enzymes [J]. Food Ferment Ind, 2019, (13): 126–133.
- [13] WARDHANI DH, VÁZQUEZ JA, PANDIELLA SS. Optimisation of antioxidants extraction from soybeans fermented by *Aspergillus oryzae* [J]. Food Chem, 2010, 118: 731–739.
- [14] FENG YJ, ZHANG M, ARUN SM, *et al.* Recent research process of fermented plant extract: A review [J]. Trends Food Sci Technol, 2017, 65(1): 40–48.
- [15] LEROY F, LUC DV. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry [J]. Trends Food Sci Technol, 2004, 15(2): 67–78.
- [16] STANTON C, ROSS RP, FITZGERALD GF, *et al.* Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites [J]. Curr Opin Biotechnol, 2005, 16(2): 198–203.
- [17] CHWASTEK A, KLEWICKA E, KLEWICKI R, *et al.* Lactic acid fermentation of red beet juice supplemented with waste highbush blueberry-sucrose osmotic syrup as a method of probiotic beverage production [J]. J Food Process Preserv, 2016, 40: 780–789.
- [18] PENG W, MENG D, YUE T, *et al.* Effect of the apple cultivar on cloudy apple juice fermented by a mixture of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, and *Lactobacillus fermentum* [J]. Food Chem, 2020, 340: 127922.
- [19] ZHAO HM, GUO XN, ZHU KX. Impact of solid state fermentation on nutritional, physical and flavor properties of wheat bran [J]. Food Chem, 2017, 217: 28–36.
- [20] MANINI F, BRASCA M, PLUMED FC, *et al.* Study of the chemical changes and evolution of microbiota during sourdough like fermentation of wheat bran [J]. Cere Chem, 2014, 91(4): 342–349.
- [21] ZSOLT Z, HEGYI F, ERIKA ES, *et al.* Bran fermentation with lactobacillus strains to develop a functional ingredient for sourdough production [J]. Int J Nutr Food Sci, 2015, 4(4): 409–419.
- [22] TAPATI BD, SUBHOJIT C, KAVISH KJ, *et al.* Antioxidant phenolics and their microbial production by submerged and solid state fermentation process: A review [J]. Trends Food Sci Technol, 2016, 53: 60–74.
- [23] 王迪, 王颖, 张艳莉, 等. 芸豆酵素复合发酵工艺优化[J]. 食品与机械, 2019, 35(10): 206–209, 236.
WANG D, WANG Y, ZHANG YL, *et al.* Bean enzyme compound fermentation process optimization [J]. Food Mach, 2019, 35(10): 206–209, 236.
- [24] 李仲树, 李冠嘉, 李冠华, 等. 五行酵素液及其制备方法: 中国, 101904504A[P]. 2010-12-08.
LI ZS, LI GJ, LI GH, *et al.* Wuxing enzyme solution and its preparation method: China, 101904504A [P]. 2010-12-08.
- [25] 舒旭晨, 杜万根, 姜东, 等. 混菌发酵石斛酵素及其抗氧化活性研究[J]. 徐州工程学院学报(自然科学版), 2019, 34(2): 63–70.
SHU XC, DU WG, JIANG D, *et al.* Study on the fermentation of *Dendrobium* enzyme and its antioxidant activity [J]. J Xuzhou Inst Technol (Nat Sci Ed), 2019, 34(2): 63–70.
- [26] 张海燕, 康三江, 袁晶, 等. 苹果酵素自然发酵过程中生物活性物质的变化[J]. 中国酿造, 2021, 40(3): 111–114.
ZHANG HY, KANG SJ, YUAN J, *et al.* Changes of bioactive substances during natural fermentation of apple enzyme [J]. China Brew, 2021, 40(3): 111–114.
- [27] 张海燕, 康三江, 袁晶, 等. 苹果酵素自然发酵工艺优化及品质分析[J]. 中国酿造, 2020, 39(10): 145–151.
ZHANG HY, KANG SJ, YUAN J, *et al.* Apple enzyme natural fermentation process optimization and quality analysis [J]. China Brew, 2020, 39(10): 145–151.
- [28] 卢嘉懿, 李沛生, 李印, 等. 植物乳杆菌发酵不同果蔬汁的品质分析[J]. 食品工业, 2018, 39(12): 142–147.
LU JX, LI BS, LI Y, *et al.* Analysis of the quality of different fruit and vegetable juices fermented by plant *Lactobacillus* [J]. Food Ind, 2018, 39(12): 142–147.
- [29] 洪厚胜, 朱曼利, 李伟, 等. 葡萄果渣酵素的发酵工艺优化及其理化特性[J]. 食品科学, 2019, 40(8): 63–72.
HONG HS, JU ML, LI W, *et al.* The fermentation process optimization of grape pulp enzymes and their physical and chemical properties [J]. Food Sci, 2019, 40(8): 63–72.
- [30] 郭俊花, 许先猛, 马欣, 等. 利用苹果皮渣发酵制备天然酵素工艺优化及其对苹果品质的影响[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(1): 97–101.
GUO JH, XU XM, MA X, *et al.* The optimization of natural enzyme process and its effect on apple quality by fermentation of apple peel slag [J]. Jiangsu Agric Sci, 2018, 46(1): 97–101.
- [31] 冯红芳, 张晓黎, 吕连营, 等. 寒富苹果副产物苹果皮酵素的研制[J]. 辽宁农业科学, 2019, (3): 51–54.
FENG HF, ZHANG XL, LV LY, *et al.* Development of apple skin enzymes, a by-product of Hanfu apple [J]. Liaoning Agric Sci, 2019, (3): 51–54.
- [32] 孙淑夷. 荔枝汁混菌发酵工艺及其功能活性成分研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
SUN SY. Study on the fermentation process of litchi juice mixed with bacteria and its functional active ingredients [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016.

(责任编辑: 郑丽 张晓寒)

作者简介



刘秀娟, 硕士研究生, 主要研究方向为食品工程。

E-mail: 1159683907@qq.com



李庆鹏, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为农产品加工标准、贮藏保鲜、农产品加工副产物高值化利用。

E-mail: lpq1122@qq.com