

# 蓝莓酵素中复合菌种添加比例的确定 及发酵工艺优化

白琳, 茹先古丽·买买提依明, 丁帅杰, 许俊锋, 徐兵洁, 郑霞, 艾合买提江·艾海提, 刘军  
(新疆大学生命科学与技术学院, 新疆乌鲁木齐 830046)

**摘要:** 以蓝莓为主要原料, 植物乳杆菌、乳酸片球菌、嗜酸乳杆菌、副干酪乳杆菌、鼠李糖乳杆菌为发酵菌种, 研究蓝莓酵素的发酵工艺条件, 提高产品质量。以超氧化物歧化酶(SOD)活力、总可溶性固形物(TSS)含量、pH值为指标, 首先通过均匀设计确定五种不同菌种最佳接种体积比例, 然后研究发酵时间、温度、发酵液初始菌密度以及初始可溶性固形物含量的单因素实验, 最后通过响应面法优化发酵工艺, 以期发酵出SOD活性高且使消费者满意的蓝莓酵素产品。结果表明, 均匀设计确定出植物乳杆菌、乳酸片球菌、嗜酸乳杆菌、副干酪乳杆菌、鼠李糖乳杆菌的最佳接种体积比例分别为22.45%、42.86%、14.29%、16.33%、4.10%, 响应面优化出的最佳发酵工艺为发酵时间36 h, 发酵温度37℃, 初始接种量调整为 $5.5 \times 10^6$  CFU/mL, 初始总可溶性固形物含量调为11°Brix, 发酵后蓝莓酵素的SOD活力最终达到87.45 U/g。综上所述, 本研究通过均匀设计优化出了复合菌种最佳接种体积比例以及通过响应面法优化出了最佳发酵工艺。

**关键词:** 发酵; 均匀设计; 响应面; 蓝莓酵素; 菌种比例

文章编号: 1673-9078(2021)05-91-99

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.5.0975

## The Adding Ratios of Multiple Strains in the Blueberry Jiaosu and Optimization of Fermentation Process

BAI Lin, RUXIANGULI·Maimaitiyiming, DING Shuai-jie, XU Jun-feng, XU Bing-jie, ZHENG Xia,  
AIHEMAITIJIANG·Aihaiti, LIU Jun

(College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

**Abstract:** Five different strains including *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* were used to ferment blueberry jiaosu. Using superoxide dismutase (SOD) activity, total soluble solids (TSS) content, and pH value as indicators, in the beginning, uniform design was used to determine the best inoculation ratio of five different strains. Secondly, there were four single factor experiments including fermentation time, temperature, initial bacterial density and initial TSS content. Finally, the fermentation process was optimized by response surface method. The goal of this work is fermenting blueberry jiaosu products with high SOD activity. The results showed that the optimal inoculation ratios of *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* are 22.45%, 42.86%, 14.29%, 16.33%, 4.10%, respectively. The optimized fermentation conditions are: 36 h of time, 37 °C of temperature,  $5.5 \times 10^6$  CFU/mL of the initial inoculation amount, 11 °Brix of the initial TSS content. After fermentation, the SOD activity of blueberry jiaosu finally reached 87.45 U/g. In summary, this study optimized the best inoculation ratio of multiple strains through uniform design and optimized the optimal fermentation process through response surface methodology.

引文格式:

白琳, 茹先古丽·买买提依明, 丁帅杰, 等. 蓝莓酵素中复合菌种添加比例的确定及发酵工艺优化[J]. 现代食品科技, 2021, 37(5): 91-99, +37

BAI Lin, RUXIANGULI·Maimaitiyiming, DING Shuai-jie, et al. The adding ratios of multiple strains in the blueberry jiaosu and optimization of fermentation process [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(5): 91-99, +37

收稿日期: 2020-10-23

作者简介: 白琳(1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 果蔬发酵

通讯作者: 艾合买提江·艾海提(1969-), 男, 副教授, 研究方向: 食品科学; 刘军(1972-), 男, 副教授, 博士, 研究方向: 食品功效与产业化

**Key words:** fermentation; uniform design; response surface; blueberry jiaosu; strains ratio

蓝莓 (*Vaccinium spp.*) 又名越橘、笃斯、都柿等, 属杜鹃花科越橘属多年灌木果树。原产于北美洲与东亚, 主要分布于朝鲜、日本等国家, 在我国主要分布在黑龙江、安徽怀宁县、吉林长白山等地区<sup>[1,2]</sup>。蓝莓果实呈小而圆的颗粒状, 果皮为蓝紫色, 果味酸甜可口, 香味独特。果实中富含花青素、SOD (超氧化物歧化酶) 活力、各种维生素、蛋白质以及糖类等<sup>[3,4]</sup>。

中华人民共和国轻工行业标准 QB/T 5323-2018 对植物酵素的定义是指可以用于食品加工的植物为主要原料, 添加或不添加辅料, 经微生物发酵制得的含有特定生物活性成分的用于种植业、养殖业、土壤改良的酵素产品<sup>[5]</sup>。传统的发酵食品多种多样, 例如泡菜<sup>[6]</sup>、奶制品<sup>[7,8]</sup>、果酒<sup>[9]</sup>、豆腐乳<sup>[10]</sup>等都与人们的生活息息相关。近年来, 随着发酵产品的发展, 酵素产品也逐渐走进了人们的生活, 引起人们的重视。李国英等人<sup>[11]</sup>用酵母菌制备了木瓜酵素, 王领等人<sup>[12]</sup>用酵母菌制备了火龙果酵素, 郭艳萍等人<sup>[13]</sup>用酵母菌制备了葡萄酵素, 李飞等人<sup>[14]</sup>由多种有益菌制备了苹果酵素, 蒋增良等人<sup>[15]</sup>通过自然发酵得到具有天然微生物酵素的功能性产品。酵素中含有 SOD (超氧化物歧化酶) 活力, 它是一种以超氧阴离子为底物的酶<sup>[16]</sup>, 具有抗氧化、抗衰老<sup>[17]</sup>功效。发酵液中的糖和酸的含量是判断菌种的发酵速度及感官评价的重要指标。不同的菌种在发酵过程中对发酵液的影响不同。植物乳杆菌可以为发酵液提供独特的酸味<sup>[18]</sup>, 乳酸片球菌能维持肠道微生态平衡、提高机体生长性能、辅助增强机体免疫力<sup>[19]</sup>, 嗜酸乳杆菌具有抗菌性能<sup>[20]</sup>, 报道称副干酪乳杆菌可以提高蓝莓的抗氧化活性<sup>[21]</sup>, 鼠李糖乳杆菌具有耐胆汁盐、耐酸和耐抗生素生物学特性, 能够很好地耐受宿主消化道环境, 帮助宿主调节肠道菌群平衡<sup>[22]</sup>。

植物酵素多种多样, 学者们对发酵过程中工艺参数的优化研究颇多<sup>[23,24]</sup>, 但对于蓝莓酵素的研究非常少, 并且很少有多种菌种发酵蓝莓果汁的研究。本文利用五种不同的菌种发酵蓝莓果汁, 以超氧化物歧化酶 (SOD) 活力、可溶性固形物含量 (TSS)、pH 值为指标, 首先通过均匀设计确定发酵菌种接种体积比例, 然后设计不同的发酵时间、温度、发酵液初始菌密度以及初始可溶性固形物含量的单因素实验, 最后通过响应面法优化发酵工艺, 以期发酵出 SOD 活性高且使消费者满意的蓝莓酵素产品。通过对蓝莓进行发酵, 对充分利用蓝莓资源、发展特色经济具有重大意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

蓝莓, 购自安徽怀宁县; SOD 试剂盒, 南京建成有限公司; 冰乙酸、碳酸钠 (均属于分析纯), 天津市盛奥化学试剂; MRS 肉汤培养基, 北京奥博星生物技术有限公司; 果胶酶 (500 u/mg)、纤维素酶 (50 u/mg)、半纤维素酶 (20 u/mg), 诺维信有限公司; 植物乳杆菌 *bio-52467*、乳酸片球菌 *bio-56623*、嗜酸乳杆菌 *bio-53058*、副干酪乳杆菌 *bio-03644*、鼠李糖乳杆菌 *bio-52962*, 中国微生物菌种保藏中心。

### 1.2 仪器与设备

高端破碎料理机 MD-767, 中山市韩菱电器有限公司; 分析天平 FA 1004, 上海越平科学仪器有限公司; GXZ 智能型光照培养箱, 宁波市科技园区新江南仪器有限公司; 721G 可见分光光度计、DHP-9052 电热恒温培养箱, 上海齐欣科学仪器有限公司; 酸度计 PHS-3C, 上海杲森仪器设备有限公司; 高精度手持式色差仪 3 nh, 致芯电子五金工具。

### 1.3 指标测定方法

#### 1.3.1 菌种的活化与培养

将购买得到的菌种在无菌操作台上倒入装有 30 mL 的无菌 MRS 肉汤培养基中, 在 37 °C 下活化 16~24 h, 保证培养基中的细胞密度达到 8.00~9.00 log(CFU/mL) (利用血球计数板在显微镜下计数)。培养至 2~3 代用于接种。

#### 1.3.2 蓝莓酵素制备过程

将蓝莓解冻后用高端破碎料理机破碎 (蓝莓果汁的初始 TSS 含量为 9 °Brix), 然后在 55 °C 下加酶酶解 3 h。果胶酶、纤维素酶、半纤维素酶的总添加量 (质量) 为 0.8%, 添加比例为 2:1:1。酶解后在 85 °C 下灭菌 15 min。待温度冷却至 37 °C, 将菌种接入蓝莓果汁中。最后用棉花将瓶口塞紧后在 37 °C 恒温培养箱中静态发酵。

#### 1.3.3 菌种中细胞密度计数

发酵液中的菌密度利用血球计数板进行计数。计数后, 将细胞密度以 CFU/mL 表示。所有操作均重复三次。计算公式如下:

$$CFU/mL = 80 \times \text{小格细胞总数} / 80 \times 400 \times 10^4 \times \text{稀释倍数} \quad (1)$$

表1 均匀设计因素水平表

Table 1 Uniform design factor level table

因素水平	植物乳杆菌 $X_1/\%$	乳酸片球菌 $X_2/\%$	嗜酸乳杆菌 $X_3/\%$	副干酪乳杆菌 $X_4/\%$	鼠李糖乳杆菌 $X_5/\%$
1	0.17	0.33	0.14	0.16	0
2	0.18	0.34	0.15	0.17	0.01
3	0.19	0.35	0.16	0.18	0.02
4	0.20	0.36	0.17	0.19	0.03
5	0.21	0.37	0.18	0.20	0.04
6	0.22	0.38	0.19	0.21	0.05
7	0.23	0.39	0.20	0.22	0.06
8	0.24	0.40	0.21	0.23	0.07
9	0.25	0.41	0.22	0.24	0.08
10	0.26	0.42	0.23	0.25	0.09

表2 均匀设计试验方案

Table 2 Uniform design table of the experiment

因素水平	植物乳杆菌 $X_1/\%$	乳酸片球菌 $X_2/\%$	嗜酸乳杆菌 $X_3/\%$	副干酪乳杆菌 $X_4/\%$	鼠李糖乳杆菌 $X_5/\%$
1	0.17	0.34	0.16	0.20	0.06
2	0.18	0.36	0.19	0.25	0.02
3	0.19	0.38	0.22	0.19	0.09
4	0.20	0.40	0.14	0.24	0.05
5	0.21	0.42	0.17	0.18	0.01
6	0.22	0.33	0.20	0.23	0.08
7	0.23	0.35	0.23	0.17	0.04
8	0.24	0.37	0.15	0.22	0
9	0.25	0.39	0.18	0.16	0.07
10	0.26	0.41	0.21	0.21	0.03

### 1.3.4 pH值的测定

利用台式酸度计进行pH值的检测。检测前,将酸度计用pH4.00、6.86、9.10的标准缓冲液在25℃下进行校准。参照GB 10468-1989方法进行测定<sup>[25]</sup>。所有操作均重复三次。

### 1.3.5 总可溶性固形物(TSS)含量的测定

利用手持糖度计来检测总可溶性固形物(TSS)含量,检测前将糖度计用蒸馏水调零。所有操作均重复三次。

### 1.3.6 超氧化物歧化酶(SOD)活性的检测

根据试剂盒检测方法,将蓝莓汁发酵液在4000 r/min下离心15 min,取上清液进行测定。将取得的上清液用0.1 mol/L pH 7.0~7.4的磷酸缓冲液稀释成不同浓度进行最佳取样量的摸索。最后按照操作表进行试验。所有操作均重复三次。

## 1.4 均匀设计确定接种体积比例

均匀设计具有使所有实验点均匀分散,没有整齐可比的特点。它使得试验次数最小化,试验简单化。

本试验根据吉梦雯<sup>[26]</sup>的研究方法进行略微的修改进行了五因素十水平( $U_{11}(11^{10})$ )的实验设计。均匀设计中,以SOD活性、pH值、TSS含量为响应值,以五种菌种(包括植物乳杆菌、乳酸片球菌、嗜酸乳杆菌、副干酪乳杆菌、鼠李糖乳杆菌)的接种体积比例为因素。在37℃下,将初始TSS含量调整为11°Brix,以下面十种不同菌种比例进行试验,发酵36 h。均匀设计因素水平表如表1所示。根据均匀设计因素水平表得出十组均匀设计试验方案如表2所示。

## 1.5 单因素试验

### 1.5.1 发酵时间对蓝莓酵素指标的影响

将蓝莓发酵液在37℃、初始菌密度为 $10^6$  CFU/mL(接种体积比例为植物乳杆菌22.45%、乳酸片球菌42.86%、嗜酸乳杆菌14.29%、副干酪乳杆菌16.33%、鼠李糖乳杆菌4.1%)以及初始可溶性固形物含量控制在11°Brix,分别发酵24、28、32、36、40 h,测定每组发酵液的SOD活力、pH值、TSS含量。

### 1.5.2 发酵温度对蓝莓酵素指标的影响

将蓝莓发酵液初始菌密度控制在  $10^6$  CFU/mL (接种体积比例为植物乳杆菌 22.45%、乳酸片球菌 42.86%、嗜酸乳杆菌 14.29%、副干酪乳杆菌 16.33%、鼠李糖乳杆菌 4.1%)、初始可溶性固形物含量为 11 °Brix, 将蓝莓发酵液在 23、30、37、44、51 °C 下发酵 36 h, 测定每组发酵液的 SOD 活力、pH 值、TSS 含量。

### 1.5.3 发酵液中初始菌密度对蓝莓酵素指标的影响

将蓝莓发酵液初始可溶性固形物含量控制为 11 °Brix, 将蓝莓发酵液的初始菌密度分别控制为  $5 \times 10^5$ 、 $10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $10^7$ 、 $5 \times 10^7$  CFU/mL (接种体积比例为植物乳杆菌 22.45%、乳酸片球菌 42.86%、嗜酸乳杆菌 14.29%、副干酪乳杆菌 16.33%、鼠李糖乳杆菌 4.1%), 在 37 °C 下发酵 36 h, 测定每组发酵液的 SOD 活力、pH 值、TSS 含量。

### 1.5.4 初始可溶性固形物含量对蓝莓酵素指标的影响

将蓝莓发酵液的初始菌密度控制为  $10^6$  CFU/mL (接种体积比例为植物乳杆菌 22.45%、乳酸片球菌 42.86%、嗜酸乳杆菌 14.29%、副干酪乳杆菌 16.33%、鼠李糖乳杆菌 4.1%)。初始可溶性固形物含量为 9 °Brix, 在此基础上将发酵液初始 TSS 含量调整为 9、11、13、15、17 °Brix, 在 37 °C 下发酵 36 h, 测定每组发酵液的 SOD 活力、pH 值、TSS 含量。

### 1.6 响应面法优化最佳发酵工艺

以发酵时间、发酵温度、发酵液初始菌密度、初始可溶性固形物含量为因素, SOD 活力为响应值利用 Design-Expert.V8.0.6 软件依据 Box-Behnken 的原理进行四因素三水平的响应面试验设计。响应面实验的因

素水平表如表 3 所示。

表 3 因素水平表

因素	水平		
	-1	0	1
A 发酵时间/h	32	36	40
B 发酵温度/°C	30	37	44
C 初始菌密度/ $10^6$ CFU/mL	1	5.5	10
D 初始可溶性固形物含量/°Brix	9	11	13

### 1.7 色差测定

色差的测定根据苗文娟等人<sup>[27]</sup>的描述稍作修改。首先在 50 mL 离心管中放入试管 2/3 体积左右发酵液, 用离心机在 4000 r/min 下离心 20 min。然后取上清液用色差仪测定发酵液的  $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$  值, 用下列公式计算:

$$\Delta E = \sqrt{((\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2)} \quad (2)$$

其中,  $L$  代表明暗度,  $a$  代表红绿色,  $b$  代表黄蓝色,  $\Delta E$  值越大, 代表发酵液在发酵前后生物颜色变化越大。

### 1.8 数据处理

使用 Design-Expert.V8.0.6 进行响应面分析, 利用 Origin 2019b 64Bit 版本和 Excel 2016 软件进行作图。使用 SPSS 24.0 进行二次多项式回归分析, 确定  $p < 0.05$  的统计学上的显著性差异。所有数据分析均重复三次。

## 2 结果与分析

### 2.1 均匀设计确定菌种比例结果与分析

表 4 均匀设计实验结果

Table 4 Results of uniform design experiments

因素水平	植物乳杆菌 $X_1/\%$	乳酸片球菌 $X_2/\%$	嗜酸乳杆菌 $X_3/\%$	副干酪乳杆菌 $X_4/\%$	鼠李糖乳杆菌 $X_5/\%$	SOD 活力 (U/g)	pH 值	TSS 含量 (°Brix)
1	0.17	0.34	0.16	0.20	0.06	79.24	1.88	11.7
2	0.18	0.36	0.19	0.25	0.02	63.13	1.92	11.2
3	0.19	0.38	0.22	0.19	0.09	77.63	1.95	10.3
4	0.20	0.40	0.14	0.24	0.05	79.88	1.93	11.2
5	0.21	0.42	0.17	0.18	0.01	78.27	1.93	11.4
6	0.22	0.33	0.20	0.23	0.08	45.42	1.95	11.3
7	0.23	0.35	0.23	0.17	0.04	74.73	1.94	11.5
8	0.24	0.37	0.15	0.22	0	68.93	1.96	11.6
9	0.25	0.39	0.18	0.16	0.07	78.60	1.98	11.7
10	0.26	0.41	0.21	0.21	0.03	78.92	1.98	11.8

由于在十组试验中, 每组试验的 pH 值基本不变, TSS 含量同样也基本保持不变, 故以 SOD 活力为响应值运用 SPSS 24 软件进行二次多项式逐步回归方程分析, 建立回归方程如下所示:

$$Y = -541.674 + 3074.218X_2 - 696.647X_1X_4 - 4055.946X_2^2 - 260.484X_3X_4 - 6504.056X_5^2 + 1948.948X_5 - 6420.412X_1X_5 + 831.198X_1X_2$$

回归方程中  $R^2=0.99$ ,  $F=99.85$ ,  $P=0.08<0.1$  (由于样本量小, 达到了边缘性显著), 证明方程可以较准确的预测出最佳条件。综上, 预测出蓝莓酵素的最佳接种体积比例分别为植物乳杆菌 22.45%、戊糖片球菌 42.86%、嗜酸乳杆菌 14.29%、副干酪乳杆菌 16.33%、鼠李糖乳杆菌 4.1%, 此时 SOD 活力达到 89 U/g。根据预测出的最佳条件进行验证试验, 得出蓝莓酵素发酵后的 SOD 活力为 82 U/g。

## 2.2 响应面法优化最佳发酵工艺

### 2.2.1 单因素实验结果

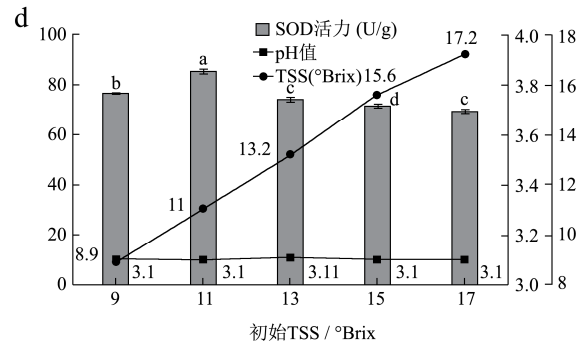
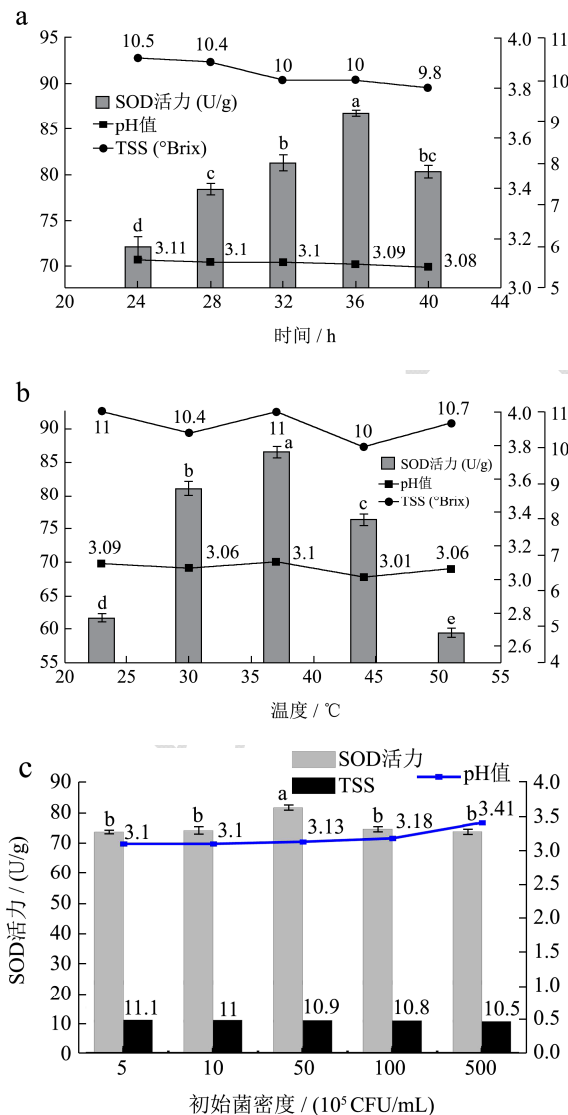


图1 发酵时间、温度、初始菌密度及初始 TSS 含量对蓝莓酵素 SOD 活力、pH 值及 TSS 含量的影响

Fig.1 The influence of fermentation time, temperature, initial bacterial density and initial soluble solid content on the SOD activity, pH value and TSS content of blueberry juice

发酵时间、温度、初始菌密度及初始 TSS 含量对蓝莓酵素 SOD 活力、pH 值及 TSS 含量的影响如图 1 所示。从图 1 中可以看出, 在不同的发酵条件下, pH 值与 TSS 含量基本保持不变。图 1d 的 TSS 含量变化幅度大, 这是因为初始 TSS 含量的不同。因而, 将 SOD 活力作为主要指标进行单因素实验。由图 1a 所知, 发酵到 36 h 时, SOD 活力达到最高为 86.67 U/g。当发酵时间小于 36 h 时, 菌种的发酵速度正在加快, SOD 活力未达到最大值。当发酵时间超过 36 h 时, 由于发酵液中的菌种所利用的碳水化合物减少, 使得发酵速度减慢, 因而 SOD 活力下降。综上所述, 当发酵到 36 h 时可以停止发酵。由图 1b 所示, 当发酵温度为 37 °C 时, SOD 活性达到最高为 86.44 U/g。当发酵温度低于或者高于 37 °C 时, 都不利于菌种的生长, 使得 SOD 活力下降, 因而 37 °C 最适合发酵蓝莓酵素, 这与梁贵秋等人<sup>[28]</sup>的研究结果(发酵最适温度为 35~40 °C)基本一致。由图 1c 可以看出, 当发酵液中菌密度为  $5 \times 10^6$  CFU/mL 时, SOD 活性最高达到 81.64 U/g。当初始接种量低于  $5 \times 10^6$  CFU/mL 时, 菌种不能充分利用发酵液中的碳源等营养物质使得 SOD 活力未达到最高值。当高于  $5 \times 10^6$  CFU/mL 时, 菌密度因过饱和快速发酵, 产大量的有机酸使得 SOD 活力下降<sup>[20]</sup>。因而可以将发酵液中的初始菌密度调整为  $5 \times 10^6$  CFU/mL。由图 1d 可以看出, 当发酵液的初始可溶性固形物含量为 11 °Brix 时, SOD 活性达到最高为 85.9 U/g, 当 TSS 含量低于 11 °Brix 时, 菌种所需要利用的碳源不够, 发酵速度下降因而使得 SOD 活力降低, 当高于 11 °Brix 时, 发酵液中糖量过高抑制了菌种的生长和代谢, 使得 SOD 活力降低。因而将发酵液中的初始 TSS 含量调为 11 °Brix。

表 5 响应面优化蓝莓酵素发酵工艺实验次数及结果

Table 5 The experiments and results of response surface optimization of blueberry jiaosu fermentation process

序号	发酵时间 A/h	发酵温度 B/°C	初始菌密度 C/(10 <sup>6</sup> CFU/mL)	初始可溶性固形物含量 D/(°Brix)	SOD 活力/(U/g)
1	32	30	5.5	11	64.4
2	40	30	5.5	11	67.72
3	32	44	5.5	11	66.56
4	40	44	5.5	11	69.04
5	36	37	1	9	71.84
6	36	37	10	9	73.52
7	36	37	1	13	66.2
8	36	37	10	13	74.88
9	32	37	5.5	9	63.28
10	40	37	5.5	9	65.76
11	32	37	5.5	13	64.32
12	40	37	5.5	13	67.6
13	36	30	1	11	67.36
14	36	44	1	11	71.32
15	36	30	10	11	70.08
16	36	44	10	11	72.64
17	32	37	1	11	61.16
18	40	37	1	11	68.96
19	32	37	10	11	65.88
20	40	37	10	11	66.48
21	36	30	5.5	9	72.2
22	36	44	5.5	9	70.36
23	36	30	5.5	13	67.36
24	36	44	5.5	13	74.32
25	36	37	5.5	11	89.28
26	36	37	5.5	11	88.44
27	36	37	5.5	11	88.4
28	36	37	5.5	11	89.04
29	36	37	5.5	11	85.6

表 6 蓝莓酵素 SOD 活力的多项式模型的方差分析

Table 6 Analysis of variance to blueberry jiaosu of SOD activity

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值	显著性
模型	14	1879.60	134.26	53.06	<0.0001	**
A 发酵时间	1	33.20	33.20	13.12	0.0028	**
B 发酵温度	1	19.05	19.05	7.53	0.0158	*
C 接种量	1	23.07	23.07	9.12	0.0092	**
D 糖添加量	1	0.43	0.43	0.17	0.6853	
AB	1	0.18	0.18	0.070	0.7956	
AC	1	12.96	12.96	5.12	0.0401	*
AD	1	0.16	0.16	0.06	0.8051	
BC	1	0.49	0.49	0.19	0.6666	

转下页

接上页

BD	1	19.36	19.36	7.65	0.0152	*
CD	1	12.25	12.25	4.84	0.0451	*
A <sup>2</sup>	1	1208.46	1208.46	477.56	<0.0001	**
B <sup>2</sup>	1	454.89	454.89	179.77	<0.0001	**
C <sup>2</sup>	1	497.11	497.11	196.45	<0.0001	**
D <sup>2</sup>	1	478.55	478.55	189.11	<0.0001	**
残差	14	35.43	2.53			
失拟项	10	26.71	2.67	1.23	0.4568	Not significant
总利差	28	1915.03				

注: \*\*具有高度显著性 ( $p < 0.01$ ); \*具有显著性 ( $p < 0.05$ ); (\*)较显著 ( $0.05 < p < 0.1$ );  $R^2 = 0.9815$ ,  $R_{Adj} = 0.9630$ 。

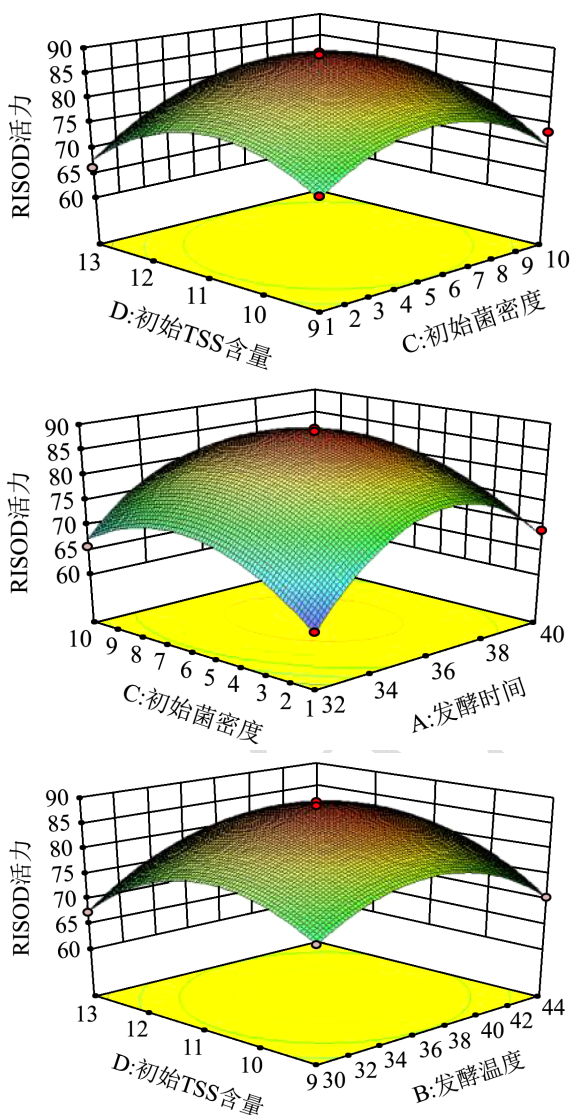


图2 因素相互作用对蓝莓酵素 SOD 活力的影响

Fig.2 The influence of the interaction of factors on the SOD activity of blueberry juice

### 2.2.2 响应面法优化发酵工艺

依据单因素实验结果,可以看出各个单因素对蓝莓酵素的 pH 值及 TSS 含量影响基本一致,因而在进行响应面设计时,将 SOD 活力选择为响应值进行响

应面实验设计。本研究设计了四因素三水平共 29 次试验的响应面分析,采用 Box-Behnken 原理对试验结果进行分析<sup>[29]</sup>,得到蓝莓酵素 SOD 活力的二次回归方程为:

$$Y = 88.15 + 1.66A + 1.26B + 1.39C - 0.19D - 0.21AB - 1.80AC + 0.20AD + 0.35BC + 2.2BD + 1.75CD - 13.65A^2 - 8.37B^2 - 8.75C^2 - 8.59D^2$$

由方差分析图(表 5)可以看出,模型的  $p < 0.0001$ ,具有高度显著性,证明该模型能很好的预测及优化发酵工艺。而失拟项的  $P$  值为 0.4568 ( $p > 0.05$ ),证明该模型对试验拟合度好。从表中还可以看出,发酵时间和接种量对蓝莓酵素 SOD 活力的影响具有高度显著性 ( $p < 0.01$ ),发酵温度对 SOD 活力影响具有显著性 ( $p < 0.05$ ),而糖添加量对蓝莓酵素 SOD 的影响不具有显著性 ( $P = 0.6853$ )。从表 5 及图 2 可以看出当某两个因素保持不变时,另外两个因素相互作用时对蓝莓酵素 SOD 活力的影响。可以看出,A 因素与 C 因素、B 因素与 D 因素、C 因素与 D 因素之间的相互作用曲线变化趋势比较明显,这说明这几个因素的相互作用对蓝莓酵素 SOD 活力的影响具有显著性 ( $p < 0.05$ )。根据响应面结果预测出蓝莓酵素的最佳发酵工艺为发酵时间 36.22 h,发酵温度 37.52 °C,初始接种量调整为  $5.82 \times 10^6$  CFU/mL,初始可溶性固形物含量调整为 11.01 °Brix,在此工艺条件下,蓝莓酵素的 SOD 活力最终可以达到 88.29 U/g。为了验证响应面法优化的结果的准确性,本研究用优化出的工艺条件进行了 5 次试验。试验过程中为了方便操作,将蓝莓酵素的发酵工艺调整为发酵时间 36 h,发酵温度 37 °C,初始接种量为  $5.5 \times 10^6$  CFU/mL,初始可溶性固形物含量为 11 °Brix,发酵后蓝莓酵素的 SOD 活力平均达 87.45 U/g,与预测值很接近,由此证明,该模型可以很好的预测蓝莓酵素的发酵工艺。刘鑫<sup>[2]</sup>等人用植物乳杆菌和酵母菌发酵蓝莓酵素,发酵出的酵素中 SOD 活力达到 81.27 U/g < 87.45 U/g,由此说明,

多菌种发酵可以提高蓝莓酵素的 SOD 活力。除此之外,实验得出蓝莓果实的 SOD 活力为 59.05 U/g<87.45 U/g,增加了 48%,这说明发酵有效增加了蓝莓果实的 SOD 活性。

### 2.3 蓝莓酵素色差分析

表 7 蓝莓酵素在发酵前后的颜色特性的变化

Table 7 Changes in the color characteristics of blueberry jiaosu before and after fermentation

样本	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$H^*$	$C^*$	$\Delta E$
新鲜果汁	-66.32	0.82	-0.63	0.56	36.8	-
蓝莓酵素	-65.10	0.67	-0.38	0.28	32.91	1.25

表 7 展示了蓝莓酵素在发酵前后的颜色特性的变化,包括  $L^*$  (亮度)、 $a^*$  (红绿色)、 $b^*$  (黄蓝色)、 $H^*$  (透明度)、 $C^*$  (色彩角)、 $\Delta E$  (色差)。蓝莓酵素颜色的变化与花青素的含量相关<sup>[30]</sup>。从表中可以看出,发酵后,蓝莓酵素的  $L^*$ 、 $b^*$  值下降,这与花青素含量密切相关。而  $a^*$  值也呈现了轻微的下降趋势,这可能是由于在发酵过程中的灭菌过程对花青素的分子结构造成了破坏,使得花青素含量下降从而导致  $a^*$  值降低,但发酵后的果汁总体呈现暗红色<sup>[31]</sup>。然而, $\Delta E$  值只有 1.25,这表明在发酵前后蓝莓酵素的颜色改变并不明显。

### 3 结论

五种不同的菌种被用于发酵蓝莓酵素,以 SOD 活性、pH 值、TSS 含量为指标,首先通过均匀设计确定每种菌种接种体积比例为植物乳杆菌 22.45%、乳酸片球菌 42.86%、嗜酸乳杆菌 24.29%、副干酪乳杆菌 16.33%、鼠李糖乳杆菌 4.1%。接着通过响应面法优化出最佳发酵工艺为发酵时间 36 h,发酵温度 37 °C,初始接种量为  $5.5 \times 10^6$  CFU/mL,初始可溶性固形物含量调整为 11 °Brix,发酵后蓝莓酵素的 SOD 活力最终达到 87.45 U/g。通过对蓝莓进行发酵,不仅提高了蓝莓产业的经济效益,而且对于蓝莓的营养价值有一定的提高。适合于发酵蓝莓酵素的有益菌种多种多样,本研究仅挑选了五种菌种,还有大量的菌种等待我们去探索研究。

### 参考文献

[1] 杨培青.蓝莓果渣酵素制备工艺的研究[D].沈阳:沈阳农业大学食品学院,2016  
YANG Pei-qing. Study on the preparation technology of blueberry pomace leaven [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2016

[2] 刘鑫,朱丹,牛广财,等.蓝莓酵素发酵工艺优化[J].中国酿造,2018,37(3):171-175  
LIU Xin, ZHU Dan, NIU Guang-cai, et al. Optimization of fermentation process of blueberry enzyme [J]. China Brewing, 2018, 37(3): 171-175

[3] 吴航.蓝莓果汁乳酸菌饮料的工艺[J].食品安全导刊,2017,24:96  
WU Hang. Process of blueberry juice lactic acid bacteria beverage [J]. China Food Safety Magazine, 2017, 24: 96

[4] 徐青,李冰晶,罗丽平,等.蓝莓多糖的提取分离及生物活性研究进展[J].现代化工,2019,39(5):38-41  
XU Qing, LI Bing-jing, LUO Li-ping, et al. Study on extraction, separation and biological activity of blueberry polysaccharides [J]. Modern Chemical Industry, 2019, 39(5): 38-41

[5] QB/T 5323-2018 植物酵素[S].中华人民共和国工业和信息化部,2018  
QB/T 5323-2018 Plant Jiaosu [S]. Ministry of industry and information technology of the people's republic of China, 2018

[6] 张同建.泡菜工业生产研究进展[J].现代食品,2020,5:73-75  
ZHANG Tong-jian. Research progress of pickle industry [J]. Modern Food, 2020, 5: 73-75

[7] 丁建平,谭园园.一种含有植物甾醇酯的酸奶及其生产工艺[P].陕西省:CN111296572A,2020  
DING Jian-ping, TAN Yuan-yuan. Yogurt containing phytosterol ester and its production process [P]. Shanxi: CN111296572A, 2020

[8] Abesinghe A M N L, Islam N, Vidanarachchi J K, et al. Effects of ultrasound on the fermentation profile of fermented milk products incorporated with lactic acid bacteria [J]. International Dairy Journal, 2019, 90: 1-14

[9] 宋艺君,郭涛,刘世军,等.响应面法优化黄精-大枣果酒发酵工艺及其抗氧化活性[J].食品工业科技,2021,42(1):156-161  
SONG Yi-jun, GUO Tao, LIU Shi-jun, et al. Optimization of fermentation process and antioxidant activity of polygonati rhizoma-Jujube fructus fruit wine by response surface methodology [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(1): 156-161

[10] 马偲臆.不同霉对腐乳及全豆腐乳前发酵影响的研究[J].现代食品,2020,6:53-56  
MA Cai-yi. Study on the effect of different molds on the pre-fermentation of fermented bean curd and whole bean curd [J]. Modern Food, 2020, 6: 53-56



- [11] 李国英.“防癌酵素之王”-木瓜酵素[J].东方食疗与保健, 2008,12:10-11  
LI Guo-ying. "King of anti-cancer enzymes"-papaya enzyme [J]. Oriental Diet-Therapy and Health Care, 2008, 12: 10-11
- [12] 董银卯,何聪芬,王领,等.火龙果酵素生物活性的初步研究[J].食品科技, 2009,34(3):192-196  
DONG Yin-mao, HE Cong-fen, WANG Ling, et al. Study on the bioactivity of pitaya enzyme [J]. Food Science and Technology, 2009, 34(3): 192-196
- [13] 郭艳萍,赵金安.葡萄酵素天然发酵过程中抗氧化性能研究[J].食品研究与开发,2016,37(10):35-38  
GUO Yan-ping, ZHAO Jin-an. Changes in antioxidant activity of black heart grapes-ferment during natural fermentation process [J]. Food Research and Development, 2016, 37(10): 35-38
- [14] 李飞,王凤舞,潘越,等.苹果酵素抗氧化活性初步研究[J].青岛农业大学学报(自然科学版),2016,33(1):40-44  
LI Fei, WANG Feng-wu, PAN Yue, et al. The primary study of apple-fermentation antioxidant [J]. Journal of Qingdao Agricultural University (Natural Science), 2016, 33(1): 40-44
- [15] 蒋增良.天然微生物酵素发酵机理、代谢过程及生物活性研究[D].浙江理工大,2013.  
JIANG Zeng-liang. Study on mechanism, metabolic process and bioactivities of microbial naturalferments during fermentation [D]. Zhejiang, Sci-Tech University, 2013.
- [16] 刘雅琳,余金明,刘英.蔬果中超氧化物歧化酶活性测定及保鲜作用探究[J].南方农业,2020,14(12):120-122  
LIU Ya-lin, SHE Jin-ming, LIU Ying. Determination of superoxide dismutase activity in vegetables and fruits and exploration of its fresh-keeping effect [J]. South China Agriculture, 2020, 14(12): 120-122
- [17] Chen F Y, Lee M T, Huang H W. Sigmoidal concentration dependence of antimicrobial peptide activities: a case study on alamethicin [J]. Biophysical Journal, 2002, 82(2): 908-914
- [18] Muelas R, Marti D O A, Romero G, et al. Evaluation of individual lactic acid bacteria for the fermentation of goat milk: quality parameters [J]. LWT, 2018, 98: 506-514
- [19] 陈亚男,郭伟强,陈翠英,等.3株乳酸片球菌的鉴定及其耐酸耐盐特性和抑菌作用研究[J].动物医学进展,2020,41(7): 42-47  
CHEN Ya-nan, GUO Wei-qiang, CHEN Cui-ying, et al. Identification of 3 strains of *Pediococcus lactis* and their acid and salt tolerance characteristics and antibacterial effects [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2020, 41(7): 42-47
- [20] 徐清萍,郭苗苗,唐培鑫,等.嗜酸乳杆菌和乳酸乳球菌混合发酵菊芋泡菜的研究[J].中国调味品,2020,45(10):40-44  
XU Qing-pin, GUO Miao-miao, TANG Pei-xin, et al. Study on the mixed fermentation of *Jerusalem artichoke* with *Lactobacillus acidophilus* and *Lactococcus lactis* [J]. China Condiment, 2020, 45(10): 40-44
- [21] 郑莎莎,胡萍,王晓宇,等.干酪乳杆菌发酵番茄酸汤的工艺优化[J].现代食品科技,2020,36(7):218-226,234  
ZHENG Sha-sha, HU Ping, WANG Xiao-yu, et al. Optimization of tomato sour soup fermented by *Lactobacillus casei* [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(7): 218-226, 234
- [22] 张筠,赵晶,陈喜君,等.鼠李糖乳杆菌与嗜热链球菌协同发酵制备酸花生乳研究[J].食品工业科技,2020,41(24): 143-149,156  
ZHANG Yun, ZHAO Jing, CHEN Xi-jun, et al. Research on preparation of acid peanut milk by co-fermented of *Lactobacillus rhamnose* and *Streptococcus thermophilus* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(24): 143-149, 156
- [23] Coelho E, Vilanova M, Genisheva Z, et al. Systematic approach for the development of fruit wines from industrially processed fruit concentrates, including optimization of fermentation parameters, chemical characterization and sensory evaluation [J]. LWT - Food Science and Technology, 2015, 62(2): 1043-1052
- [24] 蒋增良.天然微生物酵素发酵机理、代谢过程及生物活性研究[D].杭州:浙江理工大学,2013  
JIANG Zeng-liang. Study on mechanism, metabolic process and bioactivities of microbial natural-ferments during fermentation [D]. Hangzhou: Zhejiang Sci-Tech University, 2013
- [25] GB/T 10468-1989,水果和蔬菜产品 pH 值的测定方法[S]  
GB/T 10468-1989, Fruit and Vegetable Products- Determination of pH [S]

(下转第 37 页)