

雪花梨酵素二步发酵工艺优化

张笑莹^{1,2}, 赵江丽², 李月^{1,2}, 程玉豆², 王永霞^{1*}, 关军锋^{2*}

(1. 河北工程大学生命科学与食品工程学院, 河北邯郸 056000)

(2. 河北省农林科学院生物技术与食品科学研究所, 河北石家庄 050050)

摘要: 该试验对二步发酵法制备雪花梨酵素的工艺进行了优化。以雪花梨为原料, 采用 Plackett-Burman 试验从影响酵母菌发酵的 6 因素中筛选出料液比、发酵温度、接种量、发酵时间 4 个显著影响因素, 在此基础上以总酚含量和蛋白酶活力为评价指标通过 Box-Behnken 试验对酵母菌的发酵条件进行优化, 以超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD) 活力和可滴定酸含量为评价指标, 采用单因素试验对植物乳杆菌的发酵条件进行优化, 并以总酚含量、蛋白酶活力、SOD 活力、可滴定酸含量、pH 值及可溶性固形物含量 (Soluble Solids Content, SSC) 确定最终植物乳杆菌接种时间, 最终确定酵母菌和植物乳杆菌二步发酵制备雪花梨酵素最佳工艺参数为: 发酵液起始 pH 值 4.5、料液比 1:1、糖添加量 13%, 一步发酵接种酵母菌 0.14%、在 26 °C 下发酵 24 h 后, 二步发酵接种植物乳杆菌 1.50%、在 39 °C 下发酵 36 h。此条件制得雪花梨酵素酸甜适中, 色泽均匀, 体态澄清, 无杂质, 具有发酵梨果特有香气, 总酚含量 32.32 μg/mL, 蛋白酶活力 45.15 U/mL, SOD 活力 1 140 U/mL, 可滴定酸 4.43 g/L, pH 值 3.49, SSC 11.3 Brix%, 符合食用液态植物酵素对理化指标的要求。该结果可为雪花梨酵素的综合开发提供理论依据。

关键词: 雪花梨; 酵素; 酵母菌; 植物乳杆菌; 工艺优化

文章编号: 1673-9078(2023)07-32-41

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.7.0950

Optimization of the Two-step Fermentation Process for Xuehua Pear Ferment

ZHANG Xiaoying^{1,2}, ZHAO Jiangli², LI Yue^{1,2}, CHENG Yudou², WANG Yongxia^{1*}, GUAN Junfeng^{2*}

(1. College of Life Science and Food Engineering, Hebei University of Engineering, Handan 056000, China)

(2. Institute of Biotechnology and Food Science, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050050, China)

Abstract: Fermentation experiments were performed on Xuehua pears using the Plackett-Burman experimental design to optimize the two-step fermentation process for the preparation of Xuehua pear ferment. Four out of six factors indicating yeast fermentation were identified as significant; the solid-to-liquid ratio, fermentation temperature, inoculum size, and fermentation time. On this basis, the Box-Behnken design was used to optimize the yeast fermentation conditions based on total phenolic content and protease activity, and a single-factor design was used to optimize the conditions for *Lactobacillus plantarum* fermentation based on superoxide dismutase (SOD) activity and titratable acidity. The final timing for *L. plantarum* inoculation was determined based on the total phenolic content, protease activity, SOD activity, titratable acidity, pH, and soluble solids content (SSC). The results suggest that the optimal parameters for the two-step fermentation of Xuehua pears by yeast and *L. plantarum* are an initial broth pH of 4.5, solid-to-liquid ratio of 1:1, sugar content of 13%, yeast inoculum size of 0.14% for the first fermentation step, fermentation period and temperature of 24 hours and 26 °C for the first fermentation step, a *L. plantarum* inoculum size of

引文格式:

张笑莹, 赵江丽, 李月, 等. 雪花梨酵素二步发酵工艺优化[J]. 现代食品科技, 2023, 39(7): 32-41.

ZHANG Xiaoying, ZHAO Jiangli, LI Yue, et al. Optimization of the two-step fermentation process for xuehua pear ferment [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(7): 32-41.

收稿日期: 2022-07-27

基金项目: 财政部和农业农村部: 现代农业产业(梨)技术体系资助项目(CARS-28-23)

作者简介: 张笑莹(1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 799520357@qq.com

通讯作者: 王永霞(1972-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 食品加工与质量安全控制, E-mail: wyxhd2004@126.com; 共同通讯作者: 关军锋(1966-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 果品贮藏加工, E-mail: junfeng-guan@263.net

1.50% for the second fermentation step, and a fermentation period and temperature of 36 hours and 39 °C for the second fermentation step. Xuehua pear ferment obtained under these conditions shows an appropriate level of sourness and sweetness, uniform color, and an aroma unique to fermented pears, whilst being clear and free of impurities. The physicochemical indices of the obtained ferment are a total phenolic content of 32.32 µg/mL, protease activity of 45.15 U/mL, SOD activity of 1 140 U/mL, titratable acidity of 4.43 g/L, pH value of 3.49, and SSC of 11.3 Brix%, which are in line with the requirements of edible liquid plant-based ferments. The results obtained can be used as a theoretical reference for the comprehensive development of Xuehua pear ferments.

Key words: Xuehua Pear; ferment; yeast; *Lactobacillus plantarum*; process optimization

食用植物酵素多以果蔬、谷物、菌类为原料,经微生物发酵制得^[1]。其富含植物原料本身的营养、化学成分及发酵产生的多种次级代谢产物和活性成分,如氨基酸、多酚、功效酶等,具有解酒护肝^[2]、提高免疫力^[3]、预防心血管疾病、糖尿病等多种慢性病^[4]的作用。

食用植物酵素制备方法包括自然发酵法和菌种发酵法,发酵菌种以酵母菌、乳酸菌最为常见^[5,6]。发酵过程中,酵母菌分泌的蛋白酶、脂肪酶会分解原料中的蛋白质、脂肪等,生成癸酸乙酯、苯乙醇、辛酸等香气成分,赋予食品独特的爽口感和风味^[7];乳酸菌则通过水解基质中的乳糖、蛋白质及脂肪,产生易于吸收的单糖、有机酸、维生素等多种营养成分^[8]。酵母菌和乳酸菌之间存在代谢互补机制,酵母菌的代谢产物二氧化碳促进乳酸菌的生长,乳酸菌的代谢产物乳酸可为酵母菌代谢提供能量^[9,10],混菌发酵可以得到更加丰富的代谢产物^[11]。但乳酸菌的增殖速率比酵母菌快,会很快消耗掉发酵基质中的能量物质^[12],抑制酵母菌增殖发酵,因此,采用先酵母菌后乳酸菌的二步发酵法既可以避免混菌发酵时不同菌种之间的营养竞争导致的发酵过程难以控制,还能更好发挥酵母菌产香、产乙醇性能,保留乳酸菌产生的酚酸类成分,提高发酵产品的抑制杂菌能力和功效成分含量^[13]。

雪花梨是我国著名白梨品种,富含碳水化合物、蛋白质、脂肪、果酸、维生素、矿物质等多种营养成分,具有清心润肺、止咳平喘、醒酒解毒等功效^[14]。与其他梨果相比,雪花梨含糖量更高,营养价值与药用价值更为丰富,被誉为“天下第一梨”,是加工制品的上等原料,而雪花梨多为鲜食,也可被加工成梨干^[15]、梨膏^[16]、梨酒^[17]等产品,未见雪花梨酵素产品及相关研究报道。本研究采用酵母菌、植物乳杆菌二步发酵法制备雪花梨酵素,并以蛋白酶活力、超氧化物歧化酶(SOD)活力、总酚、可滴定酸含量等为考核指标,通过单因素、Plackett-Burman及Box-Behnken试验对发酵工艺进行优化,以期雪花梨酵素的研究和开发提供试验基础,为混菌发酵的工艺研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

雪花梨:于商业采收期采自河北省赵县范庄果园“雪花”梨种植基地,选取成熟度均匀,大小均一,无霉烂、病害、损伤的梨果为试验用果。

LP45-1000 植物乳杆菌购自河北一然生物科技有限公司;安琪高活性干酵母购自湖北安琪酵母股份有限公司。

葡萄糖、邻苯三酚(AR)罗恩试剂;胰蛋白胨、酵母浸粉、磷酸氢二钾、琼脂(AR),北京拜尔迪生物技术有限公司;L-酪氨酸(AR),北京百瑞极生物技术有限公司;福林酚、酪蛋白(AR),北京博奥拓达科技有限公司;重铬酸钾(AR),北京红星化工厂;牛肉浸粉(AR),青岛海博生物技术有限公司;没食子酸(AR),上海BBI生命科学有限公司;碳酸钠、酚酞(AR),天津市永大化学试剂有限公司;三氯化铁(AR),天津市大茂化学试剂厂;氢氧化钠(AR),天津市福晨化学试剂厂;浓盐酸(HPLC级),成都市科隆化学品有限公司;硫酸镁、无水乙酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、柠檬酸二氨、乙二胺四乙酸二钠盐二水(EDTA)、三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)(AR),生工生物工程(上海)股份有限公司;无水乙醇(AR),天津市致远化学试剂;硫酸锰(HPLC级),上海麦克林生化科技有限公司;吐温80,北京酷来搏科技有限公司。

1.2 仪器与设备

电子天平,赛多利斯科学仪器有限公司;高速冷冻离心机,北京博励行仪器有限公司;UV-2600型紫外可见分光光度计,日本岛津公司;SW-CJ-2FD型超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;BSD-250型振荡培养箱,SPX-250B-D型振荡培养箱,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;MLS-3780型高压蒸汽灭菌锅,三洋电机株式会社;DK-98-II型电热恒温水浴锅,天津市泰斯特仪器有限公司;RS2200QUV超纯

水系统, 上海乐枫生物科技有限公司。PAL-1 型数显糖度计, 日本 ATAGO 公司; S210 型 pH 计, 梅特勒托利多科技(中国)有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 菌种活化和培养

酵母菌: 适量酵母菌粉于 100 mL 灭菌 YPD 液体培养基中溶解, 28 °C 恒温培养箱培养至悬浮液状态, 吸取 50 μ L 菌液于 YPD 固体培养基进行涂布, 28 °C 恒温培养箱内培养 24~48 h 至菌落长成。经过两次继代培养, 得到纯化菌株, 挑取纯化单菌落于 YPD 液体培养基, 在恒温培养箱下静置培养 24~48 h, 收集菌体, 以生理盐水调节菌数为 10^6 CFU/mL^[18]。待用。

植物乳杆菌: 采用 MRS 培养基于 37 °C 恒温培养, 其他活化、培养方法同酵母菌^[18]。

1.3.2 雪花梨酵素制备工艺流程及操作要点

梨果挑选→清洗→去核→切分→装罐→调整料液比、糖度、pH→灭菌→接种→避光发酵→过滤→成品

操作要点: 新鲜雪花梨经无菌水清洗, 去核切分为 3~5 mm 薄片, 与无菌水按一定质量比装罐, 用经紫外杀菌 30 min 的葡萄糖调节糖度、无水柠檬酸和柠檬酸钠调 pH 值, 经 85 °C 高温灭菌锅灭菌 15 min, 冷却后接种酵母菌、植物乳杆菌避光发酵, 发酵结束纱布过滤取上清液保存于 -20 °C 超低温冰箱中待测。

1.3.3 理化指标测定方法

可滴定酸含量测定参照 GB/T 12456-2021《食品中总酸的测定》; 总酚含量测定采用 Folin-Ciocalteu 法^[19]; 蛋白酶活力测定参照 GB/T 23527-2009《蛋白酶活力测定法》(福林法); 超氧化物歧化酶(SOD)活力测定参照 GB/T 5009.171-2003《保健食品中超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定》(修改的 Marklund 方法); 乙醇含量的测定采用重铬酸钾法^[20]; pH 值采用 pH 计测定; 可溶性固形物(SSC)含量采用 PAL-1 数显糖度计测定。

1.3.4 一步酵母菌发酵工艺优化

以总酚含量和蛋白酶活力为评价指标对酵母菌发酵的工艺参数进行优化。

首先, 通过单因素试验依次对酵母菌发酵的起始 pH 值(3.6、3.8、4、4.5、5)、糖添加量(9%、11%、13%、15%、17%, *m/m*)、料液比(1:1、1:2、1:3、1:4、1:5, *m/m*)、接种量(0.05%、0.10%、0.15%、0.20%、0.25%, *m/m*)、发酵时间(12、24、36、48、72 h)和发酵温度(19、22、25、28、30 °C) 6 个因素进行筛选; 然后, 利用 Plackett-Burman 原理设计试验考察各因素对酵母菌发酵结果的影响情况, 在单因

素试验基础上, 每个因素选取低(-1)和高(+1)两个水平, 选用试验次数为 $N=12$ (G、H 作为两个虚拟变量用于误差估计), 筛选出对结果具有显著影响($P<0.05$)的因素。最后, 采用 Box-Behnken 原理设计 4 因素 3 水平响应曲面试验对酵母菌发酵条件进行优化, 因素和水平如表 1 所示。

表 1 响应面试验因素及水平

Table 1 Factors and levels used in Box-Behnken design

水平	因素			
	A 料液比	B 发酵温度/°C	C 接种量/%	D 发酵时间/h
1	1:1	22	0.10	24
2	1:2	25	0.15	36
3	1:3	28	0.2	48

1.3.5 二步植物乳杆菌发酵工艺优化

在一步酵母菌最优条件发酵的基础上开展二步乳酸菌发酵, 以 SOD 活力和可滴定酸含量为评价指标, 通过单因素试验依次对植物乳杆菌的发酵时间(12、24、36、48、60 h)、接种量(0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%, *m/m*)和发酵温度(30、34、37、39、41 °C)进行筛选。

1.3.6 两步发酵时间选择

在一步酵母菌和二步植物乳杆菌最优发酵工艺条件基础上主要考察植物乳杆菌最佳接种时间。以总酚含量、蛋白酶活力、SOD 活力、可滴定酸含量、pH 及 SSC 为评价指标, 对一步、二步发酵时间进行筛选。在 26 °C 条件下, 保证发酵液充分溶氧, 接种酵母菌发酵, 发酵时间设定为 12、24 和 36 h, 然后在 37 °C 条件下接种植物乳杆菌, 至发酵终点, 其它发酵条件均为最优工艺条件。

1.3.7 数据分析

使用 IBM SPSS 21 软件对单因素试验数据进行分析, 3 次重复试验的数据结果以平均值 \pm 标准差表示; 采用 Design-Expert 10.0.8 软件进行 Plackett-Burman 和 Box-Behnken 试验设计, Minitab 17.0 软件对结果进行分析; 采用 Excel 2021 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 酵母菌发酵的单因素试验结果

在料液比 1:3、糖添加量 13%、起始 pH 值 4.0、接种量 0.15%、发酵温度 30 °C 和发酵时间 24 h 基础上, 依次对酵母菌发酵的起始 pH 值、糖添加量、料液比、接种量、发酵时间和温度进行优化, 结果见图 1 所示。

酵母菌能够分泌蛋白酶分解雪花梨中的蛋白质等

营养成分,产生多种酚类物质^[21]。因此以蛋白酶活力和总酚含量为酵母菌发酵雪花梨酵素是否达到成熟的判定指标。酵母菌适宜生存 pH 值为 4.5~5^[7],当起始 pH 值为 3.6~5 时,酵母菌发酵雪花梨酵素中总酚含量和蛋白酶活力均随 pH 值的升高先增加后降低,当起始 pH 值为 4.5 时总酚含量和蛋白酶活力达到最大值,分别为 29.72 $\mu\text{g/mL}$ 和 23.81 U/mL (图 1a)。符合酵母菌最适生存 pH 值,所以确定酵母菌发酵的最佳起始 pH 值为 4.5。

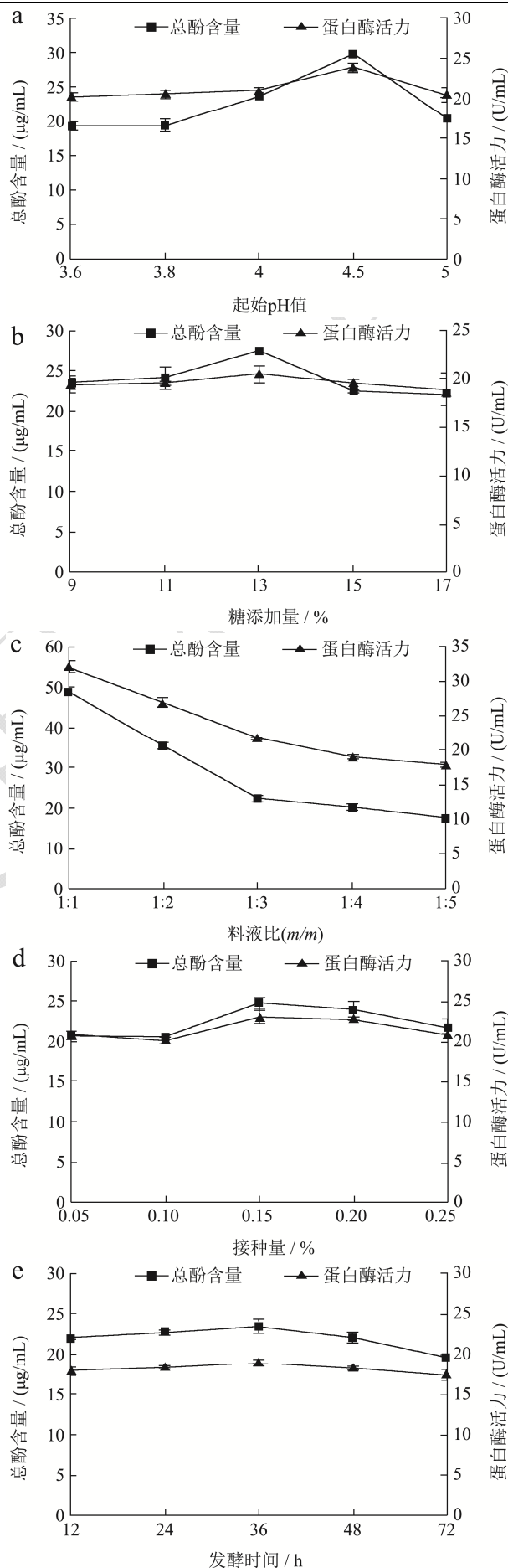
糖为微生物生长代谢的主要碳源,糖添加量过少发酵基质营养不足无法促进菌种发酵,添加量过多导致发酵液渗透压过高,微生物细胞脱水使得活力低下,抑制菌种生长^[11]。酵母菌发酵雪花梨酵素中总酚含量和蛋白酶活力亦随糖添加量的增加呈先升后降的变化趋势,当糖添加量为 13% 时总酚含量和蛋白酶活力均达到最大值,分别为 27.44 $\mu\text{g/mL}$ 、20.50 U/mL (图 1b)。所以控制酵母菌发酵的糖添加量为 13%。

雪花梨果块和水的料液 ($m/m, g:g$) 比也会影响酵母菌发酵结果,随着料液比的减小,酵母菌发酵雪花梨酵素中总酚含量和蛋白酶活力均呈现极显著下降趋势,当料液比为 1:1 时发酵液总酚含量和蛋白酶活力均最高,分别为 48.87 $\mu\text{g/mL}$ 和 32.08 U/mL (图 1c)。当料液比低于 1:1 致使酵母菌发酵期间产生的酚类物质和蛋白酶活力远远低于稀释率。故选择 1:1 料液比为酵母菌发酵最佳条件。

酵母菌接种量对发酵雪花梨酵素总酚含量和蛋白酶活力的影响见图 1d。当接种量为 0.15% 时,总酚含量和蛋白酶活力均最高,分别为 24.80 $\mu\text{g/mL}$ 和 23.09 U/mL。接种量为 0.05% 和 0.10% 时,两组酵母菌发酵雪花梨酵素样品中总酚含量和蛋白酶活力均无显著差异,可能是初始菌种接入量过低,发酵处于消耗环境营养基质阶段,发酵产物的累积量尚小。接种量大于 0.15% 发酵样品中总酚含量和蛋白酶活力随接种量的增加逐渐降低,可能与接种量偏大导致发酵液黏度过大、溶氧不足,影响发酵产物的合成。因此选择 0.15% 酵母菌接种量进行发酵。

酵母菌发酵雪花梨酵素中总酚含量和蛋白酶活力随发酵时间的延长先升后降 (图 1e)。当发酵时间为 36 h 时,总酚含量和蛋白酶活力达到峰值,分别为 23.53 $\mu\text{g/mL}$ 、18.94 U/mL。因此酵母菌发酵最佳时间为 36 h。

随着发酵温度的升高,酵母菌发酵雪花梨酵素中总酚含量和蛋白酶活力先升后降 (图 1f)。当温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 时,发酵液总酚含量和蛋白酶活力最高,分别为 20.76 $\mu\text{g/mL}$ 、20.88 U/mL,故酵母菌发酵最佳发酵温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 。



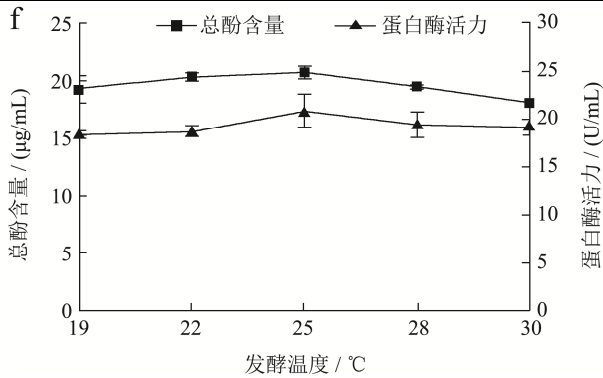


图1 不同因素对酵母菌发酵雪花梨酵素中总酚含量和蛋白酶活力的影响

Fig.1 Effects of different factors on total phenol content and protease activity in yeast fermented Xuehua pear ferment

2.2 各因素对酵母菌发酵影响的 Plackett-Burman 试验结果

以蛋白酶活力为响应值，在单因素试验基础上设计 Plackett-Burman 试验，分析各因素对酵母菌发酵结果影响的显著性，各因素水平设计见表 2 和试验结果见表 3 和表 4。

对表 3 结果进行回归模型线性分析，得到各因素对酵母菌发酵液蛋白酶活力的回归方程： $Y=30.58-0.53A+1.02B+4.50C-1.77D-1.55E-3.19F$ 。

由方差分析可知（表 4），主效应 P 值为 0.002 9 < 0.01，表明 Plackett-Burman 试验设计因素在所选取的高低水平范围内对酵母菌发酵雪花梨酵素中蛋白酶活力的影响极显著，其决定系数 R^2 为 0.956 5，调整确定

系数 R^2_{Adj} 为 0.904 4，说明模型解析了输出流程 95.65% 的变异，且能解释 90.44% 响应值的变化，模型拟合度高，试验设计可靠。本模型的精密度 (Adeq Precision) 为 14.305 > 4，进一步说明该模型设计可靠。C (料液比) 和 F (发酵温度) 对酵母菌发酵影响极显著 ($P < 0.01$)，D (接种量) 和 E (发酵时间) 影响显著 ($P < 0.05$)，A (起始 pH) 和 B (糖添加量) 影响不显著 ($P > 0.05$)。

表 2 Plackett-Burman 试验设计因素及水平

Table 2 Factors and levels of the Plackett-Burman design

水平	A	B	C	D	E	F
-1	3.8	9%	1:3	0.10%	24	22
+1	4.5	13%	1:1	0.20%	48	28

表 3 Plackett-Burman 试验设计及响应值

Table 3 Plackett Burman design and response values

序号	因素								蛋白酶活力 / (U/mL)
	A	B	C	D	E	F	G	H	
1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	40.56
2	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	20.56
3	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	33.58
4	1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	27.98
5	1	-1	1	1	-1	1	1	1	30.81
6	-1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	30.11
7	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	26.69
8	1	-1	1	1	1	-1	1	-1	34.35
9	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	27.82
10	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	35.15
11	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	39.48
12	1	1	-1	1	1	1	-1	1	19.89

表 4 Plackett-Burman 试验方差分析

Table 4 ANOVA of Plackett-Burman experiments

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	447.05	6	74.51	18.34	0.002 9	significant
A	3.33	1	3.33	0.82	0.406 9	
B	12.40	1	12.40	3.05	0.141 0	
C	242.46	1	242.46	59.67	0.000 6	**
D	37.67	1	37.67	9.27	0.028 6	*
E	28.95	1	28.95	7.13	0.044 4	*
F	122.24	1	122.24	30.09	0.002 7	**
残差	20.32	5	4.06			
总差	467.37	11				
R^2	0.956 5	R^2_{Adj}	0.904 4			

注：*表示差异显著， $P < 0.05$ ；**表示差异极显著， $P < 0.01$ ；此结果仅说明限定高低水平下的显著性。

2.3 酵母菌发酵条件优化的响应面试验结果

2.3.1 响应面试验结果与方差分析

选取料液比、发酵温度、接种量和发酵时间设计 4 因素 3 水平响应面试验对酵母菌发酵雪花梨酵素的工艺进行进一步优化，各因素水平、试验设计和结果

见表 5。各因素对总酚含量 (Y_1) 的多元二次回归拟合方程为: $Y_1=31.23+4.52A-4.61B+8.14C-4.97D+7.25AB+4.01AC-5.00AD+3.44BC+15.95BD-5.95CD-2.04A^2+7.30B^2+0.34C^2+1.14D^2$; 方差分析及显著性检验结果显示 (表 6), 模型主效应 P 值小于 0.000 1, 表明模型差异极显著 ($P<0.01$), 失拟项为 0.077 6, 无显著性影响 ($P>0.05$), 无失拟因素存在, 表明回归模型有效; 各因素对总酚含量的影响依次为 C 接种量>D 发酵时间>B 发酵温度>A 料液比, 一次项 A、B、C、D 极显著 ($P<0.01$), 二次项 B^2 极显著 ($P<0.01$), 交互项 AB、BD 极显著 ($P<0.01$), AD、CD 显著 ($P<0.05$); 模型决定系数 R^2 为 0.943 9, 校正系数 R^2_{Adj} 为 0.878 5, 表明模型可以解释 87.85% 的响应值变化, 各因素对总酚含量影响结果与模型预测值具有良好一致性, 精密度为 14.364>4, 进一步说明模型设计可靠, 表明该模型可对不同工艺条件下酵母菌发酵雪花梨酵素的总酚含量进行分析和预测。

对蛋白酶活力 (Y_2) 的拟合方程为: $Y_2=20.49+1.95A-5.41B-4.90C-6.82D-0.13AB-3.67AC-2.87AD+1.93BC+3.92BD-4.03CD+1.27A^2+1.71B^2+4.55C^2+4.50D^2$ 。方差分析及显著性检验结果显示 (表 7), 模型主效应 P 值小于 0.000 1, 表明模型差异极显著 ($P<0.01$), 失拟项为 0.127, 无显著性影响 ($P>0.05$), 表明回归模型存在合适。各因素对蛋白酶活力的影响依次为 D 发酵时间>B 发酵温度>C 接种量>A 料液比。一次项 B、C、D 极显著 ($P<0.01$), A 显著 ($P<0.05$), 二次项 C^2 、 D^2 极显著 ($P<0.01$), 交互项 AC、BD、CD 显著 ($P<0.05$)。模型决定系数 R^2 为 0.943 2, 校正系数 R^2_{Adj} 为 0.876 9, 说明该模型能解释 87.69% 的响应值变化, 各因素对蛋白酶活力影响结果与模型预测值具有良好一致性, 精密度 13.586>4, 进一步说明模型设计可靠。因此, 该模型可对酵母菌发酵雪花梨酵素工艺优化试验中蛋白酶活力结果进行分析和预测。

表 5 Box-Behnken 设计方案及响应值

Table 5 Box-Behnken design and response

试验号	A 料液比	B 发酵温度/°C	C 接种量/%	D 发酵时间/h	总酚含量/($\mu\text{g/mL}$)	蛋白酶活力/(U/mL)
1	1:2	22	0.20	36	24.78	46.45
2	1:2	28	0.15	24	23.61	23.46
3	1:1	25	0.15	24	37.02	45.80
4	1:2	25	0.10	24	38.85	22.49
5	1:1	25	0.10	36	39.16	20.35
6	1:2	25	0.20	24	39.06	52.93
7	1:2	22	0.15	24	41.54	59.82
8	1:3	22	0.15	36	31.45	44.07
9	1:1	25	0.15	48	18.76	18.17
10	1:3	25	0.15	24	25.86	30.83
11	1:2	25	0.10	48	31.86	26.88
12	1:1	22	0.15	36	31.72	43.73
13	1:2	25	0.20	48	15.95	33.52
14	1:2	22	0.10	36	36.49	40.53
15	1:1	25	0.20	36	18.12	45.90
16	1:3	25	0.15	48	19.06	23.19
17	1:1	28	0.15	36	19.03	45.91
18	1:2	28	0.15	48	18.12	50.66
19	1:3	25	0.10	36	25.57	20.40
20	1:2	25	0.15	36	19.18	30.30
21	1:2	28	0.20	36	18.69	42.40
22	1:2	28	0.10	36	22.70	22.74
23	1:2	22	0.15	48	20.37	23.21
24	1:2	25	0.15	36	21.31	32.73
25	1:3	28	0.15	36	19.27	17.27
26	1:3	25	0.20	36	19.19	29.92
27	1:2	25	0.15	36	20.99	30.67

表 6 总酚含量回归模型方差分析

Table 6 Variance analysis of regression model for total phenol content

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	3 584.47	14	256.03	14.43	<0.000 1	**
A-料液比	244.66	1	244.66	13.79	0.003	**
B-发酵温度	255.41	1	255.41	14.4	0.002 6	**
C-接种量	795.83	1	795.83	44.86	<0.000 1	**
D-发酵时间	297	1	297	16.74	0.001 5	**
AB	210.07	1	210.07	11.84	0.004 9	**
AC	64.2	1	64.2	3.62	0.081 4	
AD	99.94	1	99.94	5.63	0.035 2	*
BC	47.21	1	47.21	2.66	0.128 8	
BD	1 017.92	1	1 017.92	57.37	<0.000 1	**
CD	141.58	1	141.58	7.98	0.015 3	*
A ²	22.1	1	22.1	1.25	0.286 2	
B ²	284.58	1	284.58	16.04	0.001 7	**
C ²	0.61	1	0.61	0.034	0.856 2	
D ²	6.97	1	6.97	0.39	0.542 6	
残差	212.9	12	17.74			
失拟项	209.49	10	20.95	12.28	0.077 6	
纯误差	3.41	2	1.71			
总计	3 797.38	26				
R^2	0.943 9	R^2_{Adj}	0.878 5			

注: *表示差异显著, $P < 0.05$, **表示差异极显著, $P < 0.01$, 下同。

表 7 蛋白酶活力回归模型方差分析

Table 7 Variance analysis of regression model for protease activity

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	1 642.18	14	117.3	14.23	<0.000 1	**
A-料液比	45.74	1	45.74	5.55	0.036 3	*
B-发酵温度	351.36	1	351.36	42.64	<0.000 1	**
C-接种量	288.4	1	288.4	35	<0.000 1	**
D-发酵时间	557.85	1	557.85	67.7	<0.000 1	**
AB	0.067	1	0.067	8.12E-03	0.929 7	
AC	53.78	1	53.78	6.53	0.025 2	*
AD	32.85	1	32.85	3.99	0.069 1	
BC	14.83	1	14.83	1.8	0.204 6	
BD	61.41	1	61.41	7.45	0.018 3	*
CD	65.05	1	65.05	7.89	0.015 8	*
A ²	8.58	1	8.58	1.04	0.327 8	
B ²	15.67	1	15.67	1.9	0.193 1	
C ²	110.19	1	110.19	13.37	0.003 3	**
D ²	108.09	1	108.09	13.12	0.003 5	**
残差	98.88	12	8.24			
失拟项	96.23	10	9.62	7.26	0.127	
纯误差	2.65	2	1.32			
总计	1 741.06	26				
R^2	0.943 2	R^2_{Adj}	0.876 9			

2.3.2 交互作用影响结果

为更直观反映各因素及其交互作用对响应值的影响,对上述回归方程绘制三维响应面及其等高线图,考察交互项对响应值的影响。三维响应面图以坡度反映交互作用强弱,响应曲面坡度越陡峭,表明该因素越显著,坡度平缓反之。等高线图则以形状反映交互作用强弱,形状呈现椭圆形或马鞍形,表示两因素交互作用显著,圆形则相反^[22]。

料液比和发酵温度(图 2a)、发酵温度和发酵时间(图 2c)对酵母菌发酵雪花梨酵素中总酚含量的影响,三维响应面图曲面均陡峭,等高线图均呈马鞍形,表明交互作用极显著;料液比和发酵时间(图 2b)、接种量和发酵时间(图 2d),三维响应面图曲面均较陡峭,等高线图均呈椭圆形,表明交互作用显著;料液比和接种量、发酵温度和接种量均有交互作用,但不显著,这与方差分析结果一致。

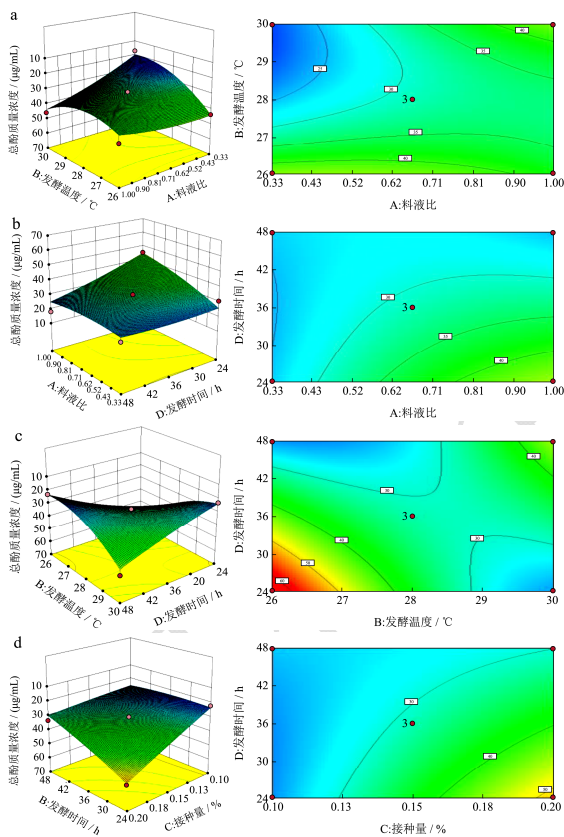


图2 各因素交互作用对酵母菌发酵雪花梨酵素中总酚含量影响的响应面和等高线图

Fig.2 Response surface and contour plot of the interaction of various factors on the effect of yeast fermentation Xuehua pear ferment total phenol content

料液比和接种量(图 3a)、发酵温度和发酵时间(图 3b)及接种量和发酵时间(图 3c)对酵母菌发酵雪花梨酵素蛋白酶活力的影响,三维响应面图曲面均较陡峭,等高线图均呈椭圆形,表明交互作用显著,

而料液比和发酵温度、料液比和发酵时间及发酵温度和接种量均有交互作用,但均不显著,与方差分析结果一致。

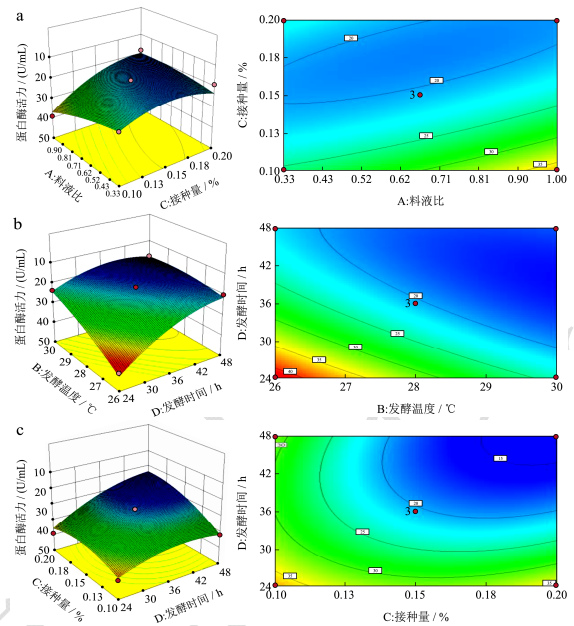


图3 各因素交互作用对酵母菌发酵雪花梨酵素蛋白酶活力影响的响应面和等高线图

Fig.3 Response surface and contour plot of the interaction of various factors on the effect of yeast fermentation Xuehua pear enzyme protease activity

2.3.3 最佳条件预测及验证试验

经统计分析,得到酵母菌发酵雪花梨酵素总酚含量最高、蛋白酶活力最大的最优工艺条件为:料液比 1:1,发酵温度 26.02 °C,接种量 0.14%,发酵时间 24.80 h。此条件模型预测总酚含量高达 60.13 μg/mL,蛋白酶活力高达 49.22 U/mL,比优化前有明显提高。

结合实际情况及可操作性,将工艺参数调整为料液比 1:1,发酵温度 26 °C,接种量 0.14%,发酵时间 25 h,重复试验 3 次,得到发酵液总酚含量 60.16 μg/mL,蛋白酶活力 49.18 U/mL,与预测值接近,表明该工艺可行。

2.4 植物乳杆菌发酵的单因素试验结果

在一步酵母菌最优条件发酵的基础上,依次对二步植物乳杆菌的发酵时间、接种量和发酵温度进行优化,结果见图 4。

植物乳杆菌是乳酸菌的一种,有较强的产乳酸能力,与酵母菌复合发酵可显著提高发酵液 SOD 活性^[21]。因此,以 SOD 活力和可滴定酸作为植物乳杆菌发酵雪花梨酵素是否达到成熟的判定指标。植物乳杆菌发酵雪花梨酵素中 SOD 活力及可滴定酸均随发酵时间的延长先升后降(图 4a),当发酵时间为 48 h 时,

SOD 活力和可滴定酸达到峰值, 分别为 1 120 U/mL, 5.49 g/L。当发酵时间超过 48 h 后, 二者显著下降, 这与发酵时间的延长, 发酵基质中的营养物质减少, 微生物的繁殖降低, 进而影响酵素营养物质和活性成分的生成有关。故植物乳杆菌发酵时间最佳为 48 h。

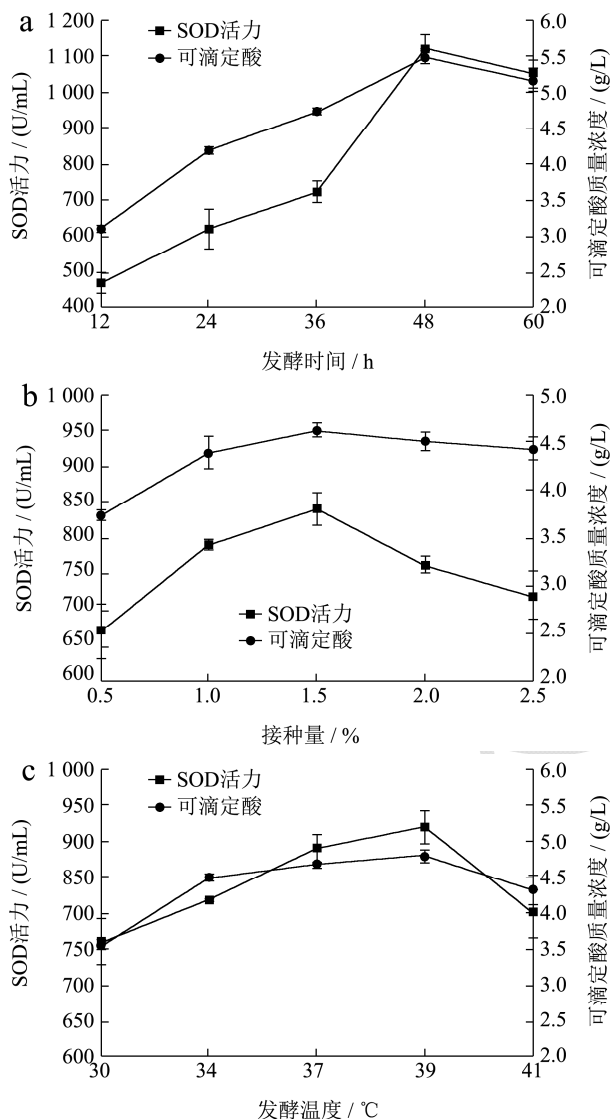


图4 各因素对植物乳杆菌发酵雪花梨酵素 SOD 活力和可滴定酸含量的影响

Fig.4 Effects of various factors on SOD activity and titrable acid content in *Lactobacillus plantarum* fermented Xuehua pear ferment

菌种接种量的多少直接影响发酵的进行, 接种量过低, 所需发酵时间较长, 且极易产生杂菌, 抑制乳酸菌的生长, 进而酶活降低; 接种量过高, 导致微生物极易衰老, 同样影响发酵液营养及活性成分的生成^[23]。植物乳杆菌发酵雪花梨酵素 SOD 活力和可滴定酸随接种量的增加先升后降 (图 4b)。当接种量为 1.50% 时, 发酵液 SOD 活力和可滴定酸达到最高, 分别为 840 U/mL 和 4.64 g/L。因此植物乳杆菌最佳接种

量为 1.5%。

随着发酵温度的升高, 植物乳杆菌发酵雪花梨酵素 SOD 活力和可滴定酸均先上升后下降 (图 4c)。当发酵温度为 39 °C 时, 均达到最大值, 分别为 920 U/mL, 4.80 g/L。当温度大于 39 °C, 二者含量显著降低。在营养充足的前提下, 升温过程加剧了植物乳杆菌的繁殖速率, 使得发酵液酶活性和产酸量增加, 而温度过高导致菌种竞争营养加剧, 不利于活菌数的增加, 进而影响发酵液酶活和产酸量^[24]。因此植物乳杆菌发酵温度选择 39 °C。

2.5 一步、二步发酵时间优化

初设发酵总时长为 60 h, 由表 8 可知, 当酵母菌发酵 12 h 后接种植物乳杆菌, 发酵液中 SOD 活力、可滴定酸和可溶性固形物含量最高, 但总酚含量、蛋白酶活力及 pH 值最低。当酵母菌发酵 24 h 后接种植物乳杆菌, 发酵液蛋白酶活力和 pH 值最高, 总酚含量、SOD 活力及可溶性固形物含量较高, 虽然可滴定酸最低但与 36 h 较高可滴定酸含量无显著差异 ($P>0.05$)。当酵母菌发酵 36 h 后接种植物乳杆菌, 发酵液总酚含量最高, 蛋白酶活力、可滴定酸和 pH 值较高, 但 SOD 活力和可溶性固形物含量最低。分析原因, 前期酵母菌发酵会消耗大量糖分等营养物质, 导致植物乳杆菌接入可利用糖分减少, 而酵母菌发酵产生的 CO₂、乙醇等物质抑制杂菌生长的同时也会激活植物乳杆菌的活性, 但发酵时间过长也会抑制植物乳杆菌的生长, 使得发酵液总酚含量、酶活、可滴定酸、SSC、pH 值均会下降。综合考虑, 酵母菌发酵 24 h 后接种植物乳杆菌共发酵 36 h, 得到最终发酵液总酚含量 32.32 μg/mL, 蛋白酶活力 45.15 U/mL, SOD 活力 1140 U/mL, 可滴定酸 4.43 g/L, pH 值 3.49, SSC 11.3 Brix%。符合一步酵母菌最优发酵时长, 且也与植物乳杆菌最优发酵时长下发酵液中的 SOD 活力及可滴定酸值接近。

2.6 雪花梨酵素品质分析

采用酵母菌-植物乳杆菌二步发酵制得的雪花梨酵素呈亮黄色、有光泽且颜色均匀; 体态澄清, 无杂质、沉淀; 具有梨果特有果香气, 并伴有发酵香味; 口感柔和, 酸甜适中、爽口。pH 值 $3.49 \leq 4.5$ 、乙醇含量 $0.32 \leq 0.5$ (g/100 g)、总酸 (以乳酸计) $4.43 \geq 0.8$ (g/100 g), 符合 QB/T 5323-2018《植物酵素》标准中液态植物酵素一般理化指标的要求。相较其他梨酵素^[25,26], 其发酵时间更短, SSC 含量、可滴定酸含量及 SOD 活力更高。

表8 酵母菌、植物乳杆菌发酵时间对发酵终点各指标的影响

Table 8 Effect of fermentation time of yeast *Lactobacillus plantarum* on various indexes of fermentation end point

酵母菌 发酵时间/h	接种植物乳杆菌 共发酵时间/h	总酚 /($\mu\text{g}/\text{mL}$)	蛋白酶活力 /(U/mL)	SOD 活力 /(U/mL)	可滴定酸 /(g/L)	pH 值	SSC /(Brix%)
12	48	31.89 \pm 0.37 ^b	37.47 \pm 0.25 ^b	1 220 \pm 20 ^a	6.32 \pm 0.97 ^a	3.34 \pm 0.01 ^a	11.6 \pm 0.02 ^a
24	36	32.32 \pm 0.29 ^b	45.15 \pm 1.24 ^a	1 140 \pm 20 ^a	4.43 \pm 0.16 ^a	3.49 \pm 0.01 ^a	11.3 \pm 0.01 ^a
36	24	38.34 \pm 0.21 ^a	40.50 \pm 0.30 ^b	940 \pm 20 ^b	4.93 \pm 0.47 ^a	3.43 \pm 0.02 ^a	11.2 \pm 0.01 ^a

注:表中每列小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

3 结论

酵母菌和植物乳杆菌二步发酵制备雪花梨酵素的最优工艺参数为:发酵液起始 pH 值 4.5,料液比 1:1,糖添加量 13%,接种 0.14%酵母菌,在 26 °C 下发酵 24 h 后,接种 1.50%植物乳杆菌,再在 39 °C 下发酵 36 h。此工艺条件制备的雪花梨酵素酸甜适中,色泽均匀,体态澄清,无杂质,具有发酵梨果特有香气,且一般理化指标符合食用液态植物酵素要求。这一结果为雪花梨酵素产品的综合开发和指导生产实践提供理论依据,也为当地开发高端梨酵素产品,提高地区经济效益和社会效益做出贡献。

参考文献

- [1] 谢文佩,冯玲,王雨亭,等.食品酵素加工工艺研究进展[J].现代农业科技,2018,12:256-258,261.
- [2] Lin Y L, Lin H W, Chen Y C, et al. Hepatoprotective effects of naturally fermented noni juice against thioacetamide-induced liver fibrosis in rats [J]. Chin Med Assoc, 2017, 80(4): 212-221.
- [3] Zulkawi N, Ng K H, Zamberi R, et al. *In vitro* characterization and *in vivo* toxicity, antioxidant and immunomodulatory effect of fermented foods [J]. BMC Complement Altern Med, 2017, 17: 344-355.
- [4] Meng F J, Chen T T, Ma D W, et al. Reclamation of herb residues using probiotics and their therapeutic effect on diarrhea [J]. Mediators of Inflammation, 2017, 3: 1-8.
- [5] 王印壮,丁玉峰,段定定,等.葡萄酵素发酵过程中的酵母菌筛选及品质变化分析[J].食品与发酵工业,2022,48(10):70-77.
- [6] Verón H E, Gauffin C P, Fabersani E, et al. Cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) juice fermented with autochthonous *Lactobacillus plantarum* S-811 [J]. Food & Function, 2019, 10(2): 1085-1097.
- [7] 牟志勇,杨映津,王光强,等.酵母菌的益生功能及在食品中的应用[J].食品科学,2021,42(15):309-318.
- [8] 黄晓英,李启明,吴华星,等.传统发酵食品中具有抑菌活性乳酸菌筛选及其代谢产物稳定性分析[J].现代食品科技,2021,37(11):68-78.
- [9] 周映君,谢纯良,陈柏忠,等.不同酵母菌与植物乳杆菌复合发酵对新会柑酵素品质的影响[J].食品工业科技,2022,43(6):118-125.
- [10] Gori K, Mortensen H D, Arneborg N, et al. Ammonia production and its possible role as a mediator of communication for *Debaryomyces hansenii* and other cheese-relevant yeast species [J]. Journal of Dairy Science, 2007, 90(11): 5032-5041.
- [11] 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.
- [12] 刘维兵,王舸楠,王犁焯,等.葡萄海棠果酵素发酵工艺优化及体外抑菌与抗氧化活性的研究[J].食品工业科技,2019,40(16):118-125.
- [13] Seung H S, Chang S N, Dae H Y, et al. Effectiveness of banana additions for completion of stuck and sluggish fermentation of blueberry wine [J]. LWT - Food Science and Technology, 2015, 64(2): 1143-1148.
- [14] 陈四平,张盼盼.液质联用技术(LC-MS)分析雪花梨中化学成分[J].食品研究与开发,2015,36(24):146-148.
- [15] 李莉峰,叶春苗,韩艳秋.不同干燥方式对南果梨干理化指标及质构特性的影响[J].食品工业,2018,39(10):46-49.
- [16] 赵鹏广,刘伟,尚俊杰,等.护色与浓缩工艺对梨膏品质的影响[J].食品研究与开发,2019,40(13):138-144.
- [17] 刁体伟,陈晓姣,冷银江,等.植物源多酚对梨酒抗氧化能力及其感官品质的影响[J].食品与发酵工业,2022,48(23):93-101.
- [18] 杨培青,李斌,颜廷才,等.蓝莓果渣酵素发酵工艺优化[J].食品科学,2016,37(23):205-210.
- [19] Gerardi C, Durante M, Tufariello M, et al. Effects of time and temperature on stability of bioactive molecules, color and volatile compounds during storage of grape pomace flour [J]. Applied Sciences, 2022, 12(8): 3956.
- [20] 聂斌英,刘红民.油茶籽粕发酵制备乙醇的研究[J].中国油脂,2017,42(12):90-93.
- [21] 廖一漠,敖晓琳,康海燕,等.传统发酵食品中乳酸菌与酵母菌相互作用机制研究进展[J].食品与发酵工业,2023,49(3):340-346.
- [22] 吕明珊,袁艺洋,邢军,等.双响应值联合优化药桑葚酵素发酵工艺及其抗氧化性的研究[J].中国调味品,2022,47(2):97-103.
- [23] 杜斌,林栋,周笑犁,等.蓝莓皮渣酵素的制备及其理化特性[J].食品工业,2019,40(9):116-121.
- [24] 李娜,杨江华,韦宇拓.植物乳杆菌 ZJ316 高密度发酵条件优化[J].中国酿造,2021,40(5):43-48.
- [25] 吴慧,周亚娟,马双双.梨酵素制备及其品质影响因素分析[J].现代食品,2020(23):87-92,102.
- [26] 王瑜,李立郎,杨娟,等.刺梨酵素发酵工艺优化及发酵前后风味与活性成分分析[J].食品科技,2019,44(10):74-81.