

doi:10.3969/j.issn.2095-6002.2018.05.013

文章编号:2095-6002(2018)05-0082-10

引用格式:隋双,王萍. 响应面法优化笃斯越橘混合菌发酵工艺[J]. 食品科学技术学报,2018,36(5):82-91.

SUI Shuang, WANG Ping. Response surface methodology to optimize fermentation process of *Vaccinium uliginosum* L. by mixed bacteria[J]. Journal of Food Science and Technology, 2018,36(5):82-91.

响应面法优化笃斯越橘混合菌发酵工艺

隋双, 王萍*

(东北林业大学 林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: 采用酵母菌、植物乳杆菌及醋酸菌对笃斯越橘进行混合发酵,通过测定基础指标(pH值、蛋白质、还原糖含量)、活性成分(总酚、黄酮、原花青素、花色苷含量)、抗氧化能力($\cdot\text{OH}$ 清除率、总抗氧化能力)确定菌种比例之后,以pH值、蛋白质含量、还原糖含量、总酚含量、 $\cdot\text{OH}$ 清除率及总抗氧化能力为考察指标,进行单因素实验以确定发酵时间、接种量、发酵温度及初始糖度的优化范围,在此基础上以总酚含量和 $\cdot\text{OH}$ 清除率为响应值进行Box-Behnken中心组合实验,优化发酵工艺条件。实验结果表明,在酵母菌、植物乳杆菌、醋酸菌菌种比例1:2:1,发酵时间62 h,接种量6%,发酵温度38.5℃,初始糖度15.5°Bx的条件下,笃斯越橘发酵液的总酚质量浓度达 (53.27 ± 0.16) mg/(100 mL),稀释10倍笃斯越橘发酵液的 $\cdot\text{OH}$ 清除率达 $(83.88 \pm 0.19)\%$,与优化前相比分别提高了56.91%和34.34%,其 $\cdot\text{OH}$ 清除率显著高于阳性对照组($p < 0.01$),约为2 mg/mL维生素C溶液的5倍。实验结果可为笃斯越橘的深加工提供实验参考依据。

关键词: 笃斯越橘; 酵母菌; 植物乳杆菌; 醋酸菌; 发酵; 抗氧化; 响应面法

中图分类号: TS201.3; S663.9; O212.6

文献标志码: A

笃斯越橘(*Vaccinium uliginosum* L.)是我国重要的野生资源之一,主要分布在内蒙古、黑龙江、吉林、辽宁等地区^[1]。它是一种果肉细腻、种子极小的小浆果。果实不仅营养丰富,而且含有有机酸、氨基酸、花色苷等独特的功能性成分^[2],具有防治心血管疾病、抗癌、抗衰老等多种功效^[3-4]。

笃斯越橘极不耐贮藏,其深加工研究有利于缓解该产业发展的瓶颈。Sang等^[5]研究表明,发酵过程可显著提高原料本身的抗氧化能力。发酵引起复合物底物分解和生物转化成相容的组分,从而调节产物性质或改变某些生物活性化合物的量^[6]。用酵母控制发酵果汁,可长期保存其所有生物活性化合物(如抗氧化剂)和功能性好

质^[7]。乳酸菌在发酵过程中产生不同的代谢物,如有机酸、二氧化碳、乙醇、过氧化氢、二乙酰、细菌素、胞外多糖、风味成分、酶和营养物质^[8]。植物乳杆菌能够进行乳酸发酵,特别是在高pH值条件下与酵母共接种^[9]。醋酸菌可将乙醇氧化为醋酸,醋酸菌的加入将有效降低酒精发酵阶段所产生的乙醇含量。目前,同时接种酵母菌、植物乳杆菌和醋酸菌进行混合发酵笃斯越橘的研究鲜有报道。

本研究选用果酒酵母、植物乳杆菌和醋酸菌3种益生菌混合发酵笃斯越橘,采用Box-Behnken中心组合实验优化发酵工艺,旨在得到一种总酚含量和抗氧化能力较高的笃斯越橘低醇发酵产品。

收稿日期:2018-04-03

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(2572017CY02);哈尔滨市应用技术与开发项目(2017RAYXJ012)。

作者简介:隋双,女,硕士研究生,研究方向为食品发酵工程;

*王萍,女,教授,博士,主要从事植物活性物质分离及功能性研究,通信作者。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

笃斯越橘, 黑龙江省大兴安岭; MRS 培养基, 自制(用于植物乳杆菌的培养); GY 培养基, 自制(用于醋酸菌的培养); 脱氧核糖、2-硫代巴比妥酸、TPTZ, 上海源叶生物科技有限公司; 其他试剂均为分析纯或生物制剂。

1.2 实验菌种

葡萄酒·果酒专用酵母(*Saccharomyces cerevisiae*), 安琪酵母股份有限公司; 植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、巴氏醋酸杆菌沪酿 1.01 (*Acetobacter pasteurianus* HN 1.01), 东北林业大学食品微生物实验室保藏。

1.3 主要仪器

DH6000A 型电热恒温培养箱, 天津泰斯特仪器有限公司; 5030 - PVL 型高压灭菌锅, 长春百奥生物仪器有限公司; PB - 10 型酸度计, 德国 Sartorius 公司; WYT - 4 型手持糖度计, 泉州中友仪器有限公司。

1.4 实验方法

1.4.1 发酵基质的制备

取 m (笃斯越橘): m (无菌水) = 1:6 进行打浆, 加入白砂糖调整发酵基质的初始糖度至 15°Bx, 加入 1 mol/L 小苏打水溶液调整发酵基质的初始 pH 值至 4.80, 经巴氏杀菌后备用。

1.4.2 菌种比例的确定

设定酵母菌、植物乳杆菌和醋酸菌的菌种比例为 1:2:1、2:1:1、1:1:2、1:1:1, 分别以 6% 的接种量接入发酵基质中, 发酵 60 h 后测定发酵液的 pH 值、还原糖、蛋白质、总酚、黄酮、原花青素、花色苷含量, 以及·OH 清除率和总抗氧化能力。

1.4.3 单因素实验

1.4.3.1 发酵时间的确定

按菌种比例酵母菌: 植物乳杆菌: 醋酸菌 = 1:2:1 以 6% 的接种量接入发酵基质, 跟踪发酵液的 pH 值、还原糖、蛋白质、总酚含量, 以及·OH 清除率和总抗氧化能力的变化。

1.4.3.2 接种量的确定

以接种量 1.5%、3%、6%、9%、12% 接入发酵基质, 发酵 60 h 后测定发酵液的 pH 值、还原糖、蛋白质、总酚含量, 以及·OH 清除率和总抗氧化能力。

1.4.3.3 发酵温度的确定

分别在 28、33、38、43 °C 的培养箱恒温发酵, 发酵 60 h 后测定发酵液的 pH 值、还原糖、蛋白质、总酚含量, 以及·OH 清除率和总抗氧化能力。

1.4.3.4 初始糖度的确定

添加白砂糖将发酵基质初始糖度分别调至 9、12、15、18、21 °Bx, 发酵 60 h 后测定发酵液的 pH 值、还原糖、蛋白质、总酚含量, 以及·OH 清除率和总抗氧化能力。

1.4.4 测定方法

1.4.4.1 pH 值的测定

采用 pH 计测定。

1.4.4.2 蛋白质含量的测定

采用考马斯亮蓝 G - 250 法测定^[10]。取 1 mL 稀释后的样品加入 5 mL 考马斯亮蓝溶液染色, 室温静置 5 min 后, 以水代替样品组作为空白, 于波长 595 nm 处测定吸光值, 根据标准曲线计算样品中蛋白含量。每组样品平行测定 3 次取平均值。

1.4.4.3 还原糖含量的测定

采用 DNS 法测定^[11]。将样品进行适当稀释, 取 2 mL 稀释后样品加入 DNS 显色液 1.5 mL, 混匀后放入沸水浴 5 min, 取出后迅速冷却至室温。用蒸馏水定容到 25 mL, 摇匀。在 520 nm 波长下测定吸光值。结果用葡萄糖当量表示。每组样品平行测定 3 次取平均值。

1.4.4.4 总酚含量的测定

采用福林酚法测定^[12]。100 μL 适当稀释后的样品加入试管中, 加水 7 mL, 摇匀, 再加 0.5 mL 福林试剂, 充分摇匀, 1 min 之后, 加入质量分数 20% 的 Na₂CO₃ 溶液 1.5 mL, 混匀, 最后加入 0.9 mL 蒸馏水, 于 25 °C 水浴条件下避光反应 1 h。在 765 nm 波长下测定吸光值, 结果用没食子酸当量表示。每份样品平行测定 3 次取平均值。

1.4.4.5 黄酮含量的测定

根据文献[13]的方法, 略有改动。0.5 mL 的样品加入体积分数 30% 的乙醇至 5 mL, 加入质量分数 5% 的亚硝酸钠 0.3 mL, 摇匀。6 min 后加入质量分数 10% 的硝酸铝 0.3 mL, 摇匀静置 6 min 后加入 1.0 mol/L 的氢氧化钠 4 mL, 反应 15 min 后于 510 nm 波长下测定吸光值, 结果用芦丁当量值表示。每组样品平行测定 3 次取平均值。

1.4.4.6 原花青素含量的测定

采用香草醛—硫酸法^[14]测定。精确移取 0.5

mL 样品于试管中,依次加入 2.5 mL 质量分数 4% 香草醛-甲醇溶液和 2.5 mL 浓硫酸-甲醇溶液,摇匀,于 30 °C 水浴条件下避光反应 20 min。用甲醇代替样品作为空白对照,在 500 nm 波长下测定反应体系的吸光值,结果用儿茶素当量值表示。每组样品平行测定 3 次取平均值。

1.4.4.7 花色苷含量的测定

采用 pH 示差法^[15]测定。分别移取 1 mL 样品于试管中,用 pH 值 1.0、4.5 的缓冲溶液定容到 10 mL,置于暗处反应达平衡后(pH 值 1.0 为 50 min, pH 值 4.5 为 80 min)分别在 510、700 nm 波长下测定吸光值,根据公式(1)计算花色苷质量浓度。每组样品平行测定 3 次取平均值。

$$\rho(\text{花色苷}) = \frac{AM}{\varepsilon L} DF \times 1000。 \quad (1)$$

式(1)中: ρ , mg/L; A , 吸光度, $A = (A_{510 \text{ nm}, \text{pH } 1.0} - A_{700 \text{ nm}, \text{pH } 1.0}) - (A_{510 \text{ nm}, \text{pH } 4.5} - A_{700 \text{ nm}, \text{pH } 4.5})$; ε , 矢车菊色素-3-葡萄糖苷的消光系数, 26 900; DF , 稀释因子; M , 矢车菊-3-葡萄糖苷的分子量, 449.2。

1.4.4.8 ·OH 清除率的测定

采用硫代巴比妥酸法(TBARS)测定,实验方法参照文献[15]并作适当修改。取 0.25 mL 稀释 10 倍的样品,以 0.25 mL 蒸馏水作为空白对照,向样品中加入 0.5 mL PBS 缓冲溶液(pH 值 7.4, 100 mmol/L)、0.2 mL 2-脱氧-D-核糖(28 mmol/L)、0.4 mL Fe^{3+} -EDTA (100 $\mu\text{mol/L}$ FeCl_3 , 104 $\mu\text{mol/L}$ Na_2EDTA , 体积比 1:1)混匀,再加入 0.2 mL H_2O_2 (1 mmol/L) 和 0.2 mL 抗坏血酸溶液(1 mmol/L),在 37 °C 条件下反应 1 h。立即加入 2 mL 28 g/L 的三氯乙酸和 2 mL 10 g/L 的 2-硫代巴比妥酸混匀,沸水浴 20 min,然后放入冰水浴中终止反应。在室温下静置 10 min,于 532 nm 波长下测定各样品吸光值,并根据式(2)计算·OH 清除率。

$$\cdot\text{OH} \text{ 清除率} = [1 - (A_1 - A_2)/A_3] \times 100\%。 \quad (2)$$

式(2)中: A_1 , 加测定溶液后的吸光度; A_2 , 加测定溶液,不加脱氧核糖溶液反应后的吸光值; A_3 , 未加测定溶液时的吸光度。

1.4.4.9 总抗氧化能力的测定

采用铁离子还原/抗氧化力测定法(FRAP)^[16]。取 2.5 mL TPTZ 溶液(用 40 mmol/L HCl 配置成 10 mmol/L 的 TPTZ-HCl 溶液),25 mL 醋酸(100 mmol/L, pH 值 3.6),2.5 mL FeCl_3 (20 mmol/L),充分混匀后配置 FRAP 工作液。取 0.1 mL 样品加入试管中,以

100 μL 蒸馏水作为空白对照,向各试管中加入 4.9 mL FRAP 工作液(现用现配),混匀,在 37 °C 水浴反应 30 min,593 nm 波长下测定吸光值。根据标准曲线计算出样品的总抗氧化能力。

1.5 Box-Behnken 中心组合实验设计

根据单因素实验结果,以总酚含量和·OH 清除率为响应值,利用 Box-Behnken 设计进行响应面分析。Box-Behnken 中心组合实验设计见表 1。

表 1 Box-Behnken 中心组合实验设计因素水平
Tab.1 Factors and levels in Box-Behnken design

| 因素 | 代码 | 水平 | | |
|----------|----|----|----|----|
| | | -1 | 0 | 1 |
| 发酵时间/h | A | 48 | 60 | 72 |
| 接种量/% | B | 3 | 6 | 9 |
| 发酵温度/°C | C | 33 | 38 | 43 |
| 初始糖度/°Bx | D | 12 | 15 | 18 |

1.6 数据分析

所有实验数据以 $\bar{x} \pm sd$ 表示,采用 SPSS 20.0 进行数据处理,Design-Expert 8.0.6 进行实验设计及分析,以 $p < 0.05$ 或 $p < 0.01$ 为统计学差异。

2 结果与分析

2.1 菌种比例对不同指标的影响

菌种比例的确定结果见表 2。

从表 2 的结果比较发现,第 1 组的总酚、黄酮、原花青素、花色苷含量均稍高于其他 3 组。第 1 组·OH 清除率和总抗氧化能力均显著高于其他 3 组($p < 0.05$)。由于实验目的是通过发酵使发酵液中总酚含量较高,同时抗氧化能力较强,故综合考虑选择第 1 组菌种比例(酵母菌:植物乳杆菌:醋酸菌 = 1:2:1)进行发酵。在混合发酵中,发酵前期酒精发酵占主导,后期乳酸发酵占主导,醋酸发酵在酒精发酵之后,乳酸发酵是活性成分增加的主要原因,第 1 组中乳酸菌为优势菌,这是第 1 组活性物质含量高于其他 3 组的主要原因^[17-18]。酵母菌、乳酸菌及醋酸菌本身具有抗氧化能力,果蔬中的抗氧化成分主要有多酚类、类胡萝卜素、花色苷和生育酚等,酚类化合物大多可以作为还原剂、金属螯合剂、单线态氧猝灭剂和氢供体在体系中来发挥抗氧化功能^[19],活性物质含量的增加也是抗氧化能力提高的原因之一,因此第 1 组的抗氧化能力显著高于其他 3 组

表2 菌种比例对发酵的影响

Tab.2 Effect of proportion of bacteria on fermentation

| | 第1组 | 第2组 | 第3组 | 第4组 |
|---|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 发酵液 pH | 3.93 ± 0.01 ^a | 3.90 ± 0.03 ^a | 3.95 ± 0.04 ^a | 3.92 ± 0.01 ^a |
| ρ (剩余还原糖)/(mg·mL ⁻¹) | 92.71 ± 1.17 ^{bc} | 90.24 ± 0.76 ^c | 118.32 ± 3.20 ^a | 94.16 ± 1.16 ^b |
| ρ (蛋白质)/(mg·mL ⁻¹) | 0.28 ± 0.02 ^b | 0.33 ± 0.03 ^{ab} | 0.35 ± 0.04 ^a | 0.32 ± 0.03 ^{ab} |
| ρ (总酚)/(mg·mL ⁻¹) | 0.45 ± 0.02 ^a | 0.39 ± 0.03 ^a | 0.41 ± 0.01 ^a | 0.40 ± 0.04 ^a |
| ρ (黄酮)/(mg·mL ⁻¹) | 0.37 ± 0.02 ^a | 0.34 ± 0.03 ^a | 0.36 ± 0.04 ^a | 0.35 ± 0.01 ^a |
| ρ (原花青素)/(mg·mL ⁻¹) | 0.33 ± 0.01 ^a | 0.29 ± 0.01 ^b | 0.30 ± 0.02 ^{ab} | 0.30 ± 0.03 ^{ab} |
| ρ (花色苷)/(mg·mL ⁻¹) | 0.09 ± 0.01 ^a | 0.06 ± 0.01 ^b | 0.07 ± 0.01 ^b | 0.07 ± 0.01 ^b |
| ·OH 清除率/% | 77.10 ± 0.1 ^a | 72.17 ± 0.17 ^c | 74.59 ± 0.59 ^b | 74.12 ± 1.12 ^b |
| ρ (总抗氧化能力)/(FeSO ₄ ·7H ₂ O mg·mL ⁻¹) | 4.73 ± 0.06 ^a | 2.66 ± 0.05 ^c | 2.72 ± 0.04 ^c | 2.85 ± 0.02 ^b |

第1组菌种比例为1:2:1,第2组菌种比例为2:1:1,第3组菌种比例为1:1:2,第4组菌种比例为1:1:1;同行中不同字母表示数值间差异性达到显著水平($p < 0.05$)。

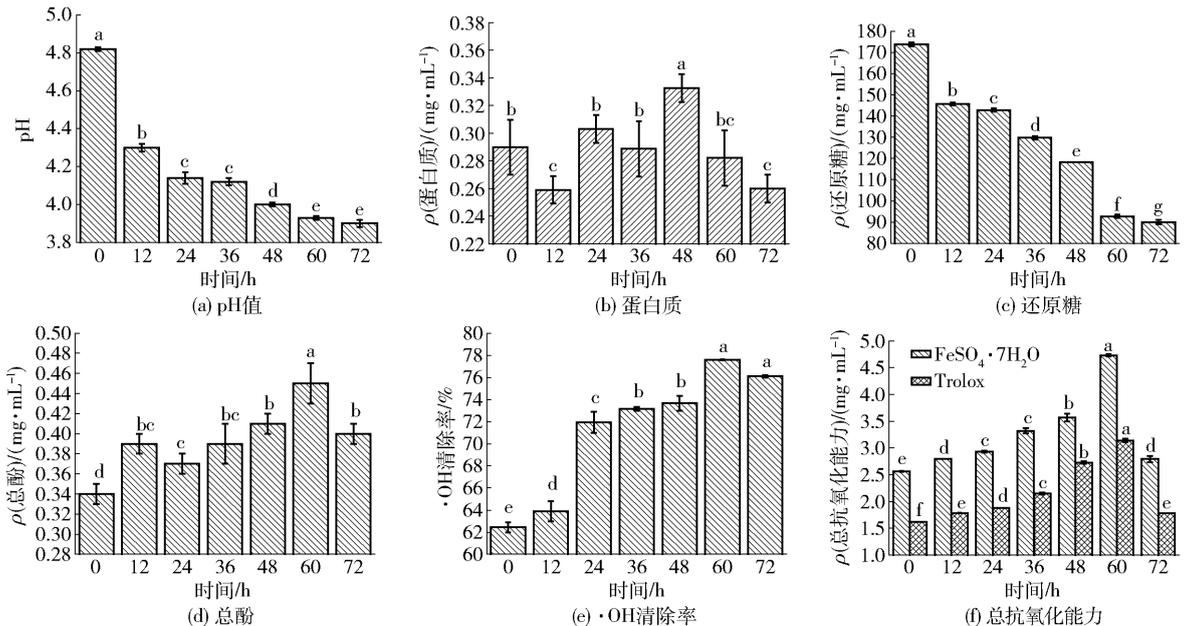
($p < 0.05$)。酒精发酵占主导时会大量利用还原糖,第3组酵母菌所占比例小,优势菌为醋酸菌,因此第3组剩余还原糖含量显著高于其他3组($p < 0.05$)。

2.2 单因素实验结果

2.2.1 发酵时间对不同指标的影响

发酵过程中 pH 值、蛋白质含量、还原糖含量、总酚含量、·OH 清除率和总抗氧化能力随发酵时间的变化如图1。

如图1所示,总酚含量、·OH 清除率、总抗氧化能力随发酵时间呈先升高后降低变化,并在 60 h 达到最高点;pH 值与还原糖含量随发酵时间呈下降趋势;蛋白质含量呈波动升高后下降的变化趋势。由于实验的目的是通过发酵使发酵液中总酚含量较高,同时抗氧化能力较强,发酵至 60 h 时发酵液的总酚含量及抗氧化能力均最高,故综合考虑选择 60 h 作为发酵时间。发酵至 72 h 时总酚含量及抗氧化能力有所下降的主要原因可能是此时活菌数下降,



图中不同字母表示数值间差异性达到显著水平($p < 0.05$),下同。

图1 发酵时间对发酵的影响

Fig.1 Effect of fermentation time on components and antioxidant activities of *Vaccinium uliginosum* L.

菌系活力降低,而总酚含量的降低也是抗氧化能力下降的原因之一。

2.2.2 接种量对不同指标的影响

接种量单因素实验结果如图2。

如图2所示,pH值、蛋白质含量、还原糖的含量随接种量的增加基本呈递减的趋势,发酵液中的微生物在不断的产酸,分解与利用还原糖和蛋白质,随

着接种量的加大,程度在加深;与其他接种量比较,总酚含量、·OH清除率、总抗氧化能力均在6%接种量时,表现出较高的活性。当接种量低于6%时发酵不充分,当接种量高于6%时发酵液中微生物数量过多导致底物浓度不足以满足其生长需求,同时激烈的竞争会导致底物利用不合理,因此总酚含量及抗氧化能力均在接种量为6%时出现最大值。

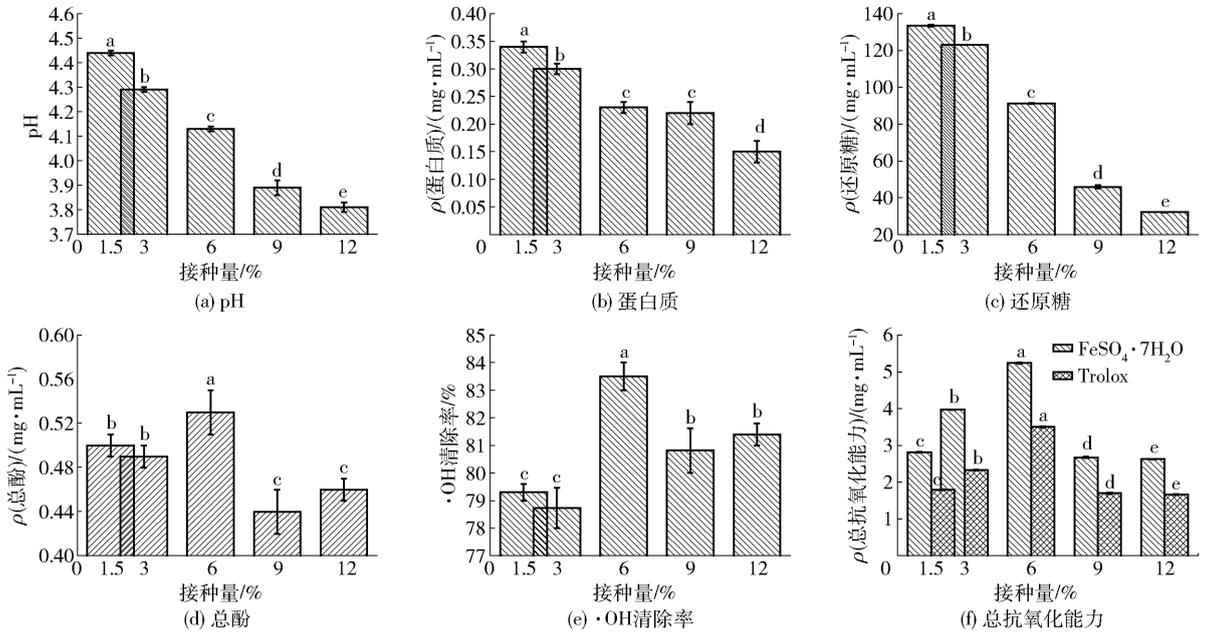


图2 接种量对发酵的影响

Fig. 2 Effect of inoculation volume on components and antioxidant activities of *Vaccinium uliginosum* L.

2.2.3 发酵温度对不同指标的影响

发酵温度单因素实验结果如图3。

如图3所示,pH值、还原糖含量在38℃时最低,与其他温度相比,发酵程度较深;蛋白质含量并无明显差异。与其他发酵温度比较,总酚含量、·OH清除率、总抗氧化能力均在发酵温度38℃时,表现出较高的活性。当发酵温度低于38℃时,对于植物乳杆菌而言,并未达到其发酵最佳温度,发酵不充分,当发酵温度高于38℃时,过高的发酵温度对酵母菌及醋酸菌有一定的抑制作用,因此总酚含量及抗氧化能力均在发酵温度为38℃时出现最大值。

2.2.4 初始糖度对不同指标的影响

初始糖度单因素实验结果如图4。

如图4所示,pH值在15°Bx时最低,剩余还原糖含量随初始糖度的增加呈递增趋势,蛋白质含量并无明显差异;与其他初始糖度比较,总酚含量、·OH清除率、总抗氧化能力均在初始糖度15°Bx时,表现出较高的活性。当初始糖度低于15°

Bx时,碳源不充足,发酵不充分;当初始糖度高于15°Bx时,过高的碳源浓度导致发酵液渗透压升高抑制微生物生长,导致微生物代谢不充分,因此总酚含量及抗氧化能力均在初始糖度为15°Bx时出现最大值。

2.3 Box-Behnken 中心组合实验结果

Box-Behnken 中心组合实验设计及结果、方差分析分别见表3、表4。

将实验数据进行拟合,分别得到总酚含量和·OH清除率的模拟方程,见式(3)、式(4):

$$Y_1 = 53.26 - 0.35A - 0.55B + 0.54C - 0.092D - 0.12AB + 0.17AC + 0.29AD + 0.18BC - 0.69BD - 0.065CD - 1.95A^2 - 0.43B^2 - 2.48C^2 - 1.69D^2; \quad (3)$$

$$Y_2 = 83.64 + 1.79A + 0.98B + 0.069C + 1.52D - 1.15AB + 0.16AC - 0.93AD - 0.76BC - 0.63BD + 0.025CD - 2.41A^2 - 2.01B^2 - 1.45C^2 - 2.33D^2. \quad (4)$$

由表4的方差分析结果可知,将总酚含量作为

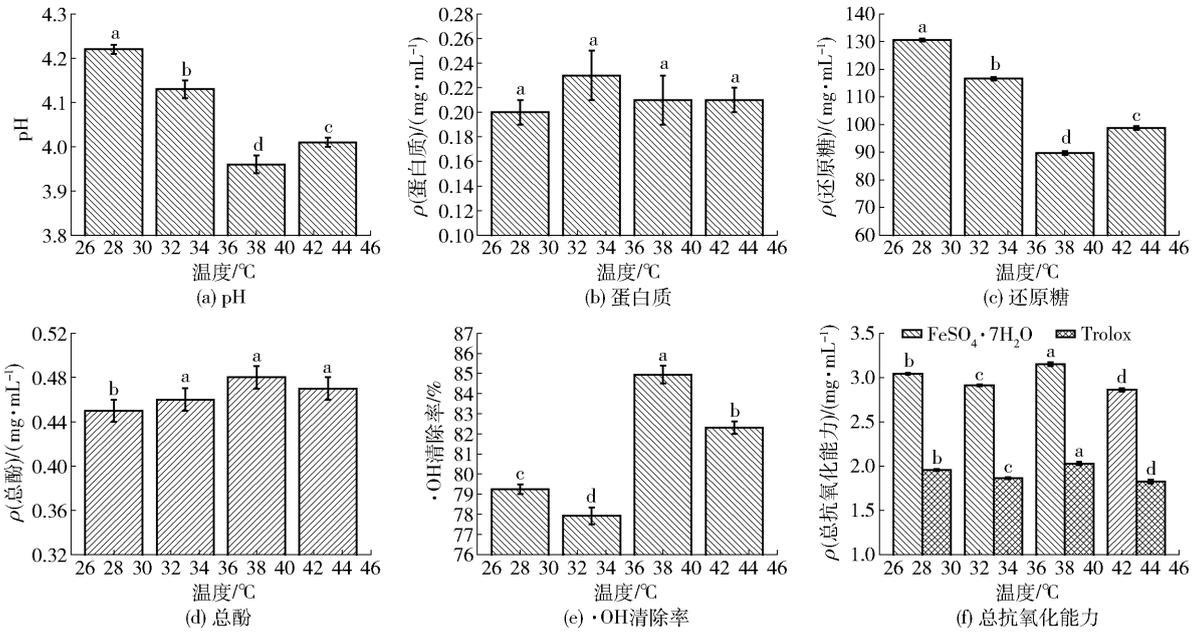


图3 发酵温度对发酵的影响

Fig. 3 Effect offermentation temperature on components and antioxidant activities of *Vaccinium uliginosum* L.

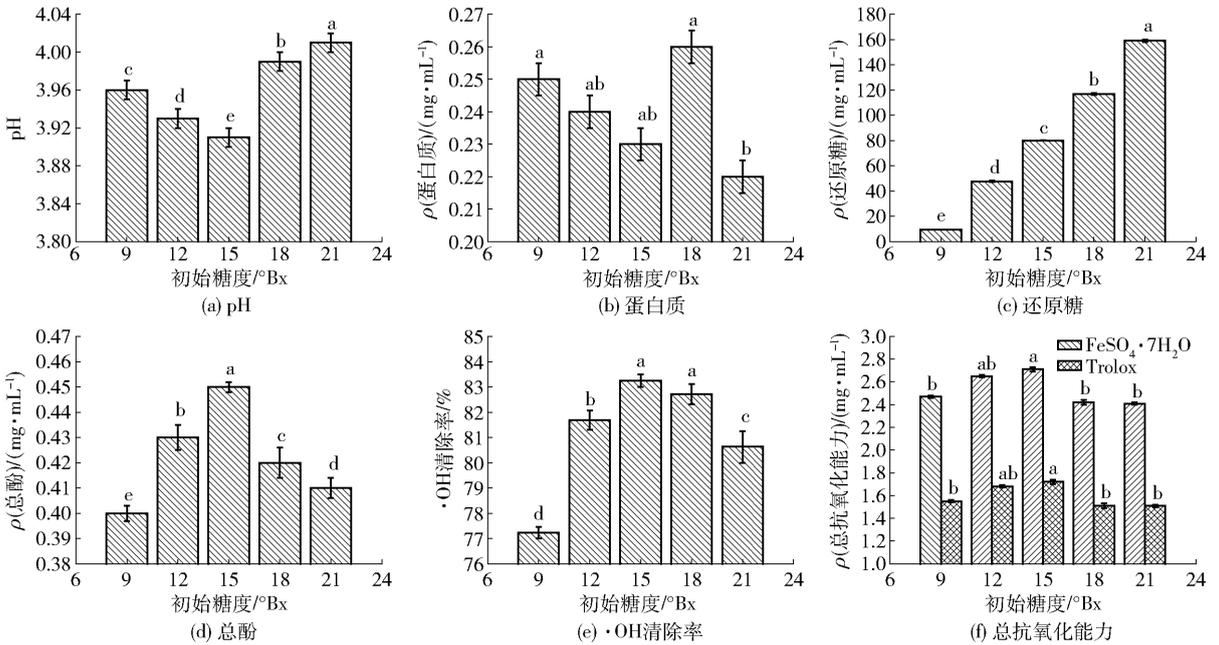


图4 初始糖度对发酵的影响

Fig. 4 Effect of initial sugar content on components and antioxidant activities of *Vaccinium uliginosum* L.

响应值,该模型 $p < 0.01$,说明该模型极显著;失拟误差 $p > 0.05$,说明没有产生失拟现象。 R^2 为 0.9598,说明拟合度良好,方程的显著性及可靠性极高。方程一次项系数 B 、 C 和二次项系数 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 具有极显著性,方程一次项系数 A 和交互性 BD 具有显著性。各因素对总酚含量影响的大小顺序依次为接种量、发酵温度、发酵时间。接种量和初始糖度交互作用对总酚含量的影响具有显著性。发酵时

间、接种量、发酵温度和初始糖度交互作用对总酚含量影响的响应面分析见图5。将·OH清除率作为响应值,该模型 $p < 0.01$,说明该模型极显著;失拟误差 $p > 0.05$,说明没有产生失拟现象。 R^2 为 0.9280,说明拟合度良好,方程的显著性及可靠性极高。方程一次项系数 A 、 B 、 D 和二次项系数 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 具有极显著性,交互项 AB 具有显著性。各因素对·OH清除率影响的大小顺序依次为发酵时间、初始

表3 Box-Behnken 中心组合实验设计及结果
Tab.3 Design and results of Box-Behnken center combination test

| 实验号 | A | B | C | D | Y_1 | Y_2 |
|-----|----|----|----|----|--|------------------------|
| | | | | | $\rho(\text{总酚})/(\text{mg}\cdot 100\text{mL}^{-1})$ | $\cdot\text{OH}$ 清除率/% |
| 1 | -1 | -1 | 0 | 0 | 49.85 | 75.03 |
| 2 | 1 | -1 | 0 | 0 | 49.39 | 80.78 |
| 3 | -1 | 1 | 0 | 0 | 48.89 | 80.23 |
| 4 | 1 | 1 | 0 | 0 | 47.97 | 81.37 |
| 5 | 0 | 0 | -1 | -1 | 48.70 | 78.15 |
| 6 | 0 | 0 | 1 | -1 | 49.66 | 77.73 |
| 7 | 0 | 0 | -1 | 1 | 48.93 | 82.21 |
| 8 | 0 | 0 | 1 | 1 | 49.63 | 81.89 |
| 9 | -1 | 0 | 0 | -1 | 50.70 | 75.34 |
| 10 | 1 | 0 | 0 | -1 | 49.08 | 81.67 |
| 11 | -1 | 0 | 0 | 1 | 49.85 | 78.25 |
| 12 | 1 | 0 | 0 | 1 | 49.39 | 80.85 |
| 13 | 0 | -1 | -1 | 0 | 48.97 | 78.77 |
| 14 | 0 | 1 | -1 | 0 | 47.05 | 81.89 |
| 15 | 0 | -1 | 1 | 0 | 49.55 | 80.23 |
| 16 | 0 | 1 | 1 | 0 | 48.35 | 80.33 |
| 17 | -1 | 0 | -1 | 0 | 48.20 | 77.84 |
| 18 | 1 | 0 | -1 | 0 | 47.47 | 80.33 |
| 19 | -1 | 0 | 1 | 0 | 49.35 | 78.36 |
| 20 | 1 | 0 | 1 | 0 | 49.28 | 81.48 |
| 21 | 0 | -1 | 0 | -1 | 48.66 | 75.75 |
| 22 | 0 | 1 | 0 | -1 | 49.51 | 78.36 |
| 23 | 0 | -1 | 0 | 1 | 49.66 | 80.96 |
| 24 | 0 | 1 | 0 | 1 | 47.74 | 81.06 |
| 25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 54.43 | 84.20 |
| 26 | 0 | 0 | 0 | 0 | 53.28 | 84.70 |
| 27 | 0 | 0 | 0 | 0 | 52.97 | 83.06 |
| 28 | 0 | 0 | 0 | 0 | 52.89 | 83.31 |
| 29 | 0 | 0 | 0 | 0 | 52.74 | 82.93 |

表中数据为3组平行实验结果平均值。

糖度、接种量。发酵时间和接种量交互作用对 $\cdot\text{OH}$ 清除率的影响具有显著性。发酵时间、接种量、发酵温度和初始糖度交互作用对 $\cdot\text{OH}$ 清除率影响的响应面分析见图6。

2.4 优化发酵工艺条件的确定及验证

利用 Design-Expert. V 8.0.6 软件的 optimization 功能,得到笃斯越橘混合菌发酵的优化工艺条件:发酵时间 61.45 h,接种量 5.93%,发酵温度 38.44 $^{\circ}\text{C}$,初始糖度 15.43 $^{\circ}\text{Bx}$;此发酵条件下发酵后的笃斯越橘总酚质量浓度达 53.19 mg/100 mL, $\cdot\text{OH}$ 清除率达83.95%。为了验证模型预测理论值的准确性和真实性,同时为了方便实际操作,将优化发酵工艺的条件调整为发酵时间 62 h,接种量 6%,发酵温度

38.5 $^{\circ}\text{C}$,初始糖度 15.5 $^{\circ}\text{Bx}$ 。在此优化条件下进行3次平行实验,得到发酵液中总酚质量浓度达(53.27 \pm 0.16) mg/100 mL, $\cdot\text{OH}$ 清除率达(83.88 \pm 0.19)%。结果与预测值相差甚小,因此,采用响应面法优化的笃斯越橘混合菌发酵工艺条件准确合理,有实际指导意义。

2.5 阳性对照结果

优化后的笃斯越橘发酵液的 $\cdot\text{OH}$ 清除率阳性对照结果见表5。

由表5可以看出,优化后的稀释10倍的笃斯越橘发酵液的 $\cdot\text{OH}$ 清除率显著高于作为阳性对照的2 mg/mL 维生素C溶液($p < 0.01$),其抗氧化活性约为2 mg/mL 维生素C溶液的5倍。

表4 Box-Behnken 中心组合实验方差分析

Tab.4 Variance analysis of Box-Behnken center combination test

| 响应值 | 来源 | 自由度 | 平方和 | 均方 | F 值 | P 值 | 显著性 |
|----------------|----------------|--------|------------------------|------------------------|------------------------|----------|-----|
| Y ₁ | 模型 | 14 | 90.25 | 6.45 | 23.86 | <0.000 1 | * * |
| | A | 1 | 1.51 | 1.51 | 5.60 | 0.032 9 | * |
| | B | 1 | 3.60 | 3.60 | 13.32 | 0.002 6 | * * |
| | C | 1 | 3.52 | 3.52 | 13.03 | 0.002 8 | * * |
| | D | 1 | 0.10 | 0.10 | 0.38 | 0.547 4 | |
| | AB | 1 | 0.053 | 0.053 | 0.20 | 0.664 9 | |
| | AC | 1 | 0.11 | 0.11 | 0.40 | 0.535 7 | |
| | AD | 1 | 0.34 | 0.34 | 1.25 | 0.283 2 | |
| | BC | 1 | 0.13 | 0.13 | 0.48 | 0.499 9 | |
| | BD | 1 | 1.92 | 1.92 | 7.10 | 0.018 5 | * |
| | CD | 1 | 0.017 | 0.017 | 0.063 | 0.806 1 | |
| | A ² | 1 | 24.57 | 24.57 | 90.97 | <0.000 1 | * * |
| | B ² | 1 | 38.15 | 38.15 | 141.23 | <0.000 1 | * * |
| | C ² | 1 | 39.94 | 39.94 | 147.85 | <0.000 1 | * * |
| | D ² | 1 | 18.42 | 18.42 | 68.19 | <0.000 1 | * * |
| | 残差 | 14 | 3.78 | 0.27 | | | |
| | 失拟误差 | 10 | 1.92 | 0.19 | 0.41 | 0.882 9 | |
| 纯误差 | 4 | 1.86 | 0.47 | | | | |
| 合计 | 28 | 94.03 | | | | | |
| Y ₂ | 模型 | 14 | 164.42 | 11.74 | 12.89 | <0.000 1 | * * |
| | A | 1 | 38.27 | 38.27 | 42.00 | <0.000 1 | * * |
| | B | 1 | 11.45 | 11.45 | 12.56 | 0.003 2 | * * |
| | C | 1 | 0.057 | 0.057 | 0.063 | 0.805 5 | |
| | D | 1 | 27.66 | 27.66 | 30.36 | <0.000 1 | * * |
| | AB | 1 | 5.31 | 5.31 | 5.83 | 0.030 0 | * |
| | AC | 1 | 0.099 | 0.099 | 0.11 | 0.746 3 | |
| | AD | 1 | 3.48 | 3.48 | 3.82 | 0.071 0 | |
| | BC | 1 | 2.28 | 2.28 | 2.50 | 0.136 0 | |
| | BD | 1 | 1.58 | 1.58 | 1.73 | 0.209 7 | |
| | CD | 1 | 2.500×10^{-3} | 2.500×10^{-3} | 2.744×10^{-3} | 0.959 0 | |
| | A ² | 1 | 37.82 | 37.82 | 41.50 | <0.000 1 | * * |
| | B ² | 1 | 26.23 | 26.23 | 28.78 | <0.000 1 | * * |
| | C ² | 1 | 13.72 | 13.72 | 15.06 | 0.001 7 | * * |
| | D ² | 1 | 35.16 | 35.16 | 38.59 | <0.000 1 | * * |
| | 残差 | 14 | 12.76 | 0.91 | | | |
| | 失拟误差 | 10 | 10.37 | 1.04 | 1.74 | 0.312 9 | |
| 纯误差 | 4 | 2.39 | 0.60 | | | | |
| 合计 | 28 | 177.17 | | | | | |

$p < 0.05$ 为显著,用“*”表示; $p < 0.01$ 为极显著,用“**”表示。

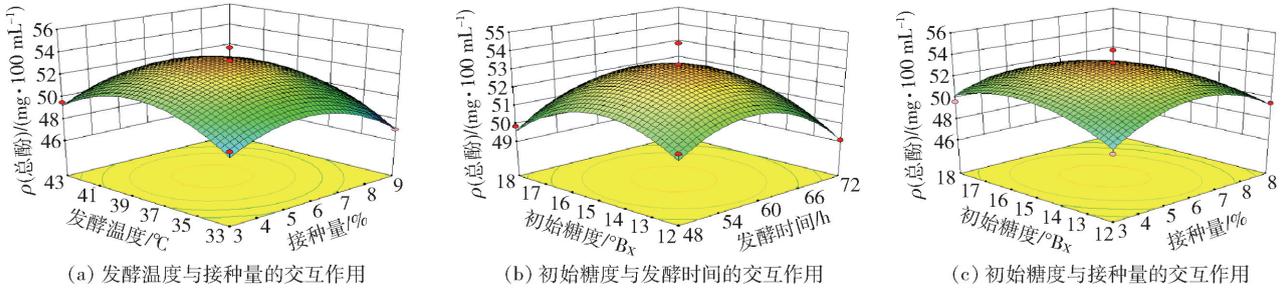


图5 发酵时间、接种量、发酵温度和初始糖度交互作用对总酚含量的影响

Fig. 5 Response surface plot of interaction among fermentation time, inoculation volume, fermentation temperature, and initial sugar content on total phenol content

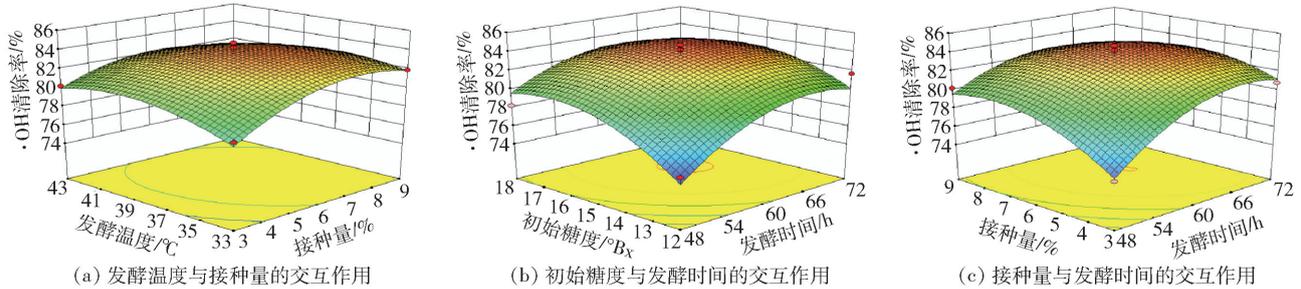


图6 发酵时间、接种量、发酵温度和初始糖度交互作用对·OH清除率的影响

Fig. 6 Response surface plot of interaction among fermentation time, inoculation volume, fermentation temperature, and initial sugar content on hydroxyl radical scavenging rate

表5 阳性对照结果

Tab.5 Positive control results

| | 0.25 mL 的 10% 发酵液 | 0.25 mL 的 2 mg/mL 维生素 C |
|-----------|---------------------------|----------------------------|
| ·OH 清除率/% | 83.88 ± 0.19 ^a | 16.16 ± 0.14 ^b |

同行中不同字母表示数值间差异性达到显著水平($p < 0.01$)。

3 结论与讨论

本实验以笃斯越橘为原料,选择果酒酵母、植物乳杆菌和醋酸菌为发酵菌种对发酵工艺进行优化。得到的优化发酵工艺条件为:酵母菌、植物乳杆菌、醋酸菌菌种比例 1:2:1,发酵时间 62 h,接种量 6%,发酵温度 38.5 °C,初始糖度 15.5 °Bx。优化后笃斯越橘发酵液的总酚质量浓度达 (53.27 ± 0.16) mg/100 mL,稀释 10 倍的笃斯越橘发酵液对·OH 清除率达 $(83.88 \pm 0.19)\%$,与发酵前对比分别提高了 56.91% 和 34.34%,其·OH 清除率显著高于阳性对照组($p < 0.01$)。实验结果表明,发酵前后总酚含量与·OH 清除率均显著提高($p < 0.01$),这与其他研究人员研究结果相一致^[20-21]。Kwaw 等^[20]研究结果表明乳酸发酵显著影响了饮料中总酚、花青素和类黄酮的含量,乳酸菌在发酵过程中将复合多

酚水解成更简单、更具生物活性的化合物,这是总酚含量增加的主要原因。浆果含有高含量的维生素 C 和多酚,已知维生素 C 和多酚在浆果中以糖苷的形式存在,当用糖苷水解酶从浆果中除去葡萄糖时,浆果的抗氧化活性得到改善,且天然化合物的抗氧化活性在真菌、酵母菌或乳酸菌发酵后增加^[21],这是抗氧化能力显著提高的主要原因。对比蓝莓酵素及树莓酵素,本实验所得笃斯越橘混合菌发酵产品的·OH 清除率显著高于管章瑞等^[22]、程勇杰等^[23]的研究结果($p < 0.01$)。

参考文献:

- [1] 宗长玲,邓萌,宗成文,等. 笃斯越橘研究进展[J]. 北方园艺,2011,12:173-176.
ZONG C L, DENG M, ZONG C W, et al. Research progress on *Vaccinium uliginosum* Linn [J]. Northern Gardening, 2011, 12:173-176.
- [2] 陈亮,杨志勇,辛秀兰,等. 蓝莓果酒发酵期间抗氧化成分及活性研究[J]. 中国酿造,2013,12:17-20.
CHEN L, YANG Z Y, XIN X L, et al. Antioxidant compositions and activity of blueberry wine during fermentation [J]. Chinese Brewing, 2013, 12:17-20.
- [3] 郑红岩,高梦,刘建兰,等. 不同品种蓝莓果实品质分

- 析[J]. 食品与发酵工业, 2013, 11: 245 - 249.
- ZHENG H Y, GAO M, LIU J L, et al. Product evaluation and analysis of different varieties of blueberries[J]. Food and Fermentation Industries, 2013, 11: 245 - 249.
- [4] 姬茹娟, 杨庆丽, 刘宇峰, 等. 黑蒜蓝莓酒抗氧化能力及活性成分研究[J]. 食品科学技术学报, 2017, 35(2): 65 - 69, 88.
- JI Y R, YANG Q L, LIU Y F, et al. Study on antioxidant activity and active ingredients of black garlic blueberry wine[J]. Journal of Food Science and Technology, 2017, 35(2): 65 - 69, 88.
- [5] SANG S K, KYUNG J P, HYUN J A, et al. Phytochemical, antioxidant, and antibacterial activities of fermented citrus unshiu byproduct[J]. Food Science and Biotechnology, 2017, 26(2): 461 - 466.
- [6] AHTESHAM H, SHAMBHUNATH B, WANG J H, et al. Fermentation, a feasible strategy for enhancing bioactivity of herbal medicines[J]. Food Research International, 2016(81): 1 - 16.
- [7] PATRA J K, SAHOO S K, SWAIN M R. Nutritional and antioxidant potential of *Aegle marmelos* fermented fruit juice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 2015, 87(3): 769 - 775.
- [8] LEROY F, DE VUYST L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry[J]. Trends in Food Science & Technology, 2004, 15(2): 67 - 78.
- [9] BERBEGAL C, PENA N, RUSSO P, et al. Technological properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from grape must fermentation[J]. Food Microbiol, 2016, 57: 187 - 194.
- [10] 李娟. 应用考马斯亮蓝法测定总蛋白含量[J]. 中国生物制品学杂志, 2000, 13(2): 118 - 120.
- LI J. Total protein content was determined using the Coomassie brilliant blue method[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2000, 13(2): 118 - 120.
- [11] 王俊丽, 聂国兴, 李素贞, 等. DNS法测定还原糖含量时最适波长的确定[J]. 河南农业科学, 2010, 4: 115 - 118.
- WANG J L, NIE G X, LI S Z, et al. Optimal wavelength for determining the content of reducing sugar by DNS method[J]. Journal of Hebei Agricultural Sciences, 2010, 4: 115 - 118.
- [12] LI H, WANG X Y, LI Y, et al. Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines[J]. Food Chemistry, 2009, 112(2): 454 - 460.
- [13] DEWANTO V, WU X, ADOM K K, et al. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(10): 3004 - 3010.
- [14] 郑洪亮. 红皮云杉球果原花青素分离纯化、配合物及体外抗氧化研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2014.
- [15] 杨玲. 蓝靛果提取物抗氧化及抗癌作用的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2009.
- [16] HASSANPOUR H, ALIZADEH S. Evaluation of phenolic compound, antioxidant activities and antioxidant enzymes of barberry genotypes in Iran [J]. Scientia Horticulturae, 2016, 200: 125 - 130.
- [17] FILANNINO P, BAI Y, CAGNO R D, et al. Metabolism of phenolic compounds by *Lactobacillus* spp. during fermentation of cherry juice and broccoli puree[J]. Food Microbiology, 2015, 46: 272 - 279.
- [18] EKINCI F Y, BASER G M, ÖZCAN E, et al. Characterization of chemical, biological, and antiproliferative properties of fermented black carrot juice, shalgam[J]. European Food Research and Technology, 2016, 242(8): 1355 - 1368.
- [19] MATHEW S, ABRAHAM T E. Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various *in vitro* models [J]. Food Chemistry, 2006, 94(4): 520 - 528.
- [20] KWAU E, MA Y, TCHABO W, et al. Effect of fermentation parameters and their optimization on the phytochemical properties of lactic-acid-fermented mulberry juice[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2017, 11(3): 1462 - 1473.
- [21] KANG O J. Production of fermented tea with *Rhodotorula* yeast and comparison of its antioxidant effects to those of unfermented tea[J]. Korean Journal of Food and Cooking Science, 2010, 26: 422 - 427.
- [22] 管章瑞, 田裕, 赵娜, 等. 蓝莓酵素发酵过程中的抗氧化活性变化研究[J]. 现代食品科技, 2016, 32(12): 74 - 80.
- GUAN Z R, TIAN Y, ZHAO N, et al. Changes in antioxidant activity of blueberry Jiaosu during fermentation [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(12): 74 - 80.
- [23] 程勇杰, 陈小伟, 王珍珍, 等. 树莓酵素与蓝莓酵素有机酸分析及其体外抗氧化性能[J]. 食品工业科技, 2017, 38(20): 141 - 145, 165.
- CHENG Y J, CHEN X W, WANG Z Z, et al. Analysis of organic acids and *in vitro* antioxidant activity of raspberry-ferment and blueberry-ferment [J]. Food Industry Technology, 2017, 38(20): 141 - 145, 165.

Parameter Optimization of Methanogenesis of Soybean Wastewater

TANG Renshi, ZHANG Yanping*, CAI Xiaoyang, WANG Xin

(School of Food and Chemical Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

Abstract: In order to improve the methane production in the process of soybean wastewater degradation, effects of the trace elements, fermentation temperature, organic loading rate, and sludge concentration on the amount of methane produced by anaerobic fermentation of soybean wastewater were studied by the orthogonal experiment. Meanwhile, the effecting order of the factors and optimal technological conditions were confirmed. The results showed that the factors which had the greatest influence on the methane production were organic loading rate, followed by the addition of trace elements and sludge concentration, and the fermentation temperature had the least effect. The optimized combination of technological conditions was as follows: 1 mg/L Co, fermentation temperature 45 °C, organic loading rate 1.52 kg COD/(m³·d), and the sludge concentration was 30.00 g VSS/L. Under this condition, the cumulative methane production was up to 970 mL, which was increased about 15.10%. While the cumulative methane yield, the methane content in the biogas, and the removal rate of soluble chemical oxygen demand (SCOD) were 344.49 mL/(g SCOD), 84.12%, and 84.00%, respectively.

Keywords: soybean wastewater; anaerobic fermentation; methane production; organic degradation; process optimization

(责任编辑:叶红波)

(上接第91页)

Response Surface Methodology to Optimize Fermentation Process of *Vaccinium uliginosum* L. by Mixed Bacteria

SUI Shuang, WANG Ping*

(School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum* and *Acetobacter pasteurianus* HN 1.01 was mixed to ferment *Vaccinium uliginosum* L. After determining the pH value, protein content, reducing sugar content, total phenols, flavonoids, procyanidins and anthocyanins content, antioxidant capacity including hydroxyl radical scavenging rate, and total antioxidant capacity to obtain the proportion of bacteria. The single factor test was conducted with pH value, protein content, reducing sugar content, total phenolic content, hydroxyl radical scavenging rate and total antioxidant capacity in order to determine the optimum range of fermentation time, inoculation volume, fermentation temperature and initial sugar content. The Box-Benhken center combination test was conducted based on the total phenolic content and hydroxyl radical scavenging rate to optimize the fermentation process. The results showed that under the conditions of fermentation time of 62 h, inoculation volume of 6%, fermentation temperature of 38.5 °C, and initial sugar content of 15.5°Bx, the total phenolic content reached (53.27 ± 0.16) mg/100 mL and hydroxyl radical scavenging rate reached (83.88 ± 0.19)% in ten-fold diluted *Vaccinium uliginosum* L. fermentation liquid, which respectively increased by 56.91% and 34.34% after optimized. The hydroxyl radical scavenging rate was significantly higher than that of the positive control group ($p < 0.01$) and it was about 5 folds higher than that of the 2 mg/mL vitamin C solution. The test was expected to provide guidance for the deep processing of *Vaccinium uliginosum* L.

Keywords: *Vaccinium uliginosum* L.; *Saccharomyces cerevisiae*; *Lactobacillus plantarum*; *Acetobacter pasteurianus* HN 1.01; fermentation; antioxidant activity; response surface methodology

(责任编辑:张逸群)