

王科杰, 许力山, 姬高升, 刘杨, 宋艳波, 闫志英. 环保酵素高效发酵菌株筛选及不同发酵方式比较[J]. 应用与环境生物学报, 2023, 29 (2): 252-258
Wang KJ, Xu LS, Ji GS, Liu Y, Song YB, Yan ZY. Plant Jiaosu for Environmental Protection: strains screening and comparison of different bioactive fermentation methods [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2023, 29 (2): 252-258

环保酵素高效发酵菌株筛选及不同发酵方式比较

王科杰¹ 许力山² 姬高升² 刘杨² 宋艳波¹✉ 闫志英²✉

¹山西农业大学生命科学院 太谷 030801

²中国科学院成都生物研究所 成都 610041

摘要 环保酵素是以水果、蔬菜、谷物等为原料经发酵后制得的用于环境治理及保护的产品, 含有多种生物活性成分, 可作为水果副产物资源化利用的新方式. 为缩短环保酵素发酵时间同时提升品质, 从自然发酵酵素和醋酸菌样品中分离筛选得到乳酸菌、酵母菌和醋酸菌各1株用于环保酵素的生物强化发酵, 通过测定发酵过程理化性质和微生物数量、群落变化, 比较生物强化发酵、灭菌-生物强化发酵及自然发酵的优劣. 结果表明: 生物强化发酵和灭菌-生物强化发酵都缩短了发酵时间, 生物强化组发酵完成后乳酸含量为 3.49 ± 0.23 g/L, 醋酸含量为 3.53 ± 0.11 g/L, 二者含量均高于灭菌-生物强化及自然发酵组; 生物强化组有效活菌数(CFU, 9.5×10^8 个/mL)显著高于自然发酵组($P < 0.05$); 生物强化组属水平优势菌群所占比例(醋酸杆菌+乳酸杆菌)最高为 $90.35\% + 3.29\%$, 灭菌-生物强化组次之($79.11\% + 6.11\%$), 自然发酵组最低为($9.21\% + 2.69\%$). 综上所述, 生物强化发酵相比自然发酵具有明显的优势, 结果可为环保酵素的推广应用提供理论支撑. (图8 参25)

关键词 环保酵素; 乳酸菌; 醋酸菌; 酵母菌; 生物强化; 高通量测序

Plant Jiaosu for Environmental Protection: strains screening and comparison of different bioactive fermentation methods

WANG Kejie¹, XU Lishan², JI Gaosheng², LIU Yang², SONG Yanbo¹✉ & YAN Zhiying²✉

¹College of Life Sciences, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China

²Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China

Abstract Jiaosu, which is made from fermented fruits, vegetables, and grains, can be used to purify and protect the environment. Jiaosu contains a variety of bioactive components and transforms fruit by-products into valuable resources. This study aimed to reduce the fermentation time using environmentally friendly enzymes and improve jiaosu quality. One strain each of *Lactobacillus*, *Acetobacter*, and yeast were isolated and screened from the samples of natural fermentation enzymes and *Acetobacter*, which were used for bioaugmentation of environmental protection enzymes. The advantages and disadvantages of bioaugmentation fermentation, sterilized bioaugmentation fermentation, and natural fermentation were compared by analyzing physicochemical properties and quantity and community changes of environmental protection enzymes during the fermentation process. The results showed that both bio-enhanced fermentation and sterilized bio-enhanced fermentation shortened the fermentation time. The lactic acid (3.49 ± 0.23 g/L) and acetic acid (3.53 ± 0.11 g/L) concentrations in the bio-enhanced group were higher than those in the sterilized bio-enhanced and natural fermentation groups. The number of viable bacteria (CFU) in the bio-enhanced fermentation group was 9.5×10^8 /mL, which was significantly ($P < 0.05$) higher than that in the natural fermentation group. Furthermore, the proportion of dominant bacteria (*Acetobacter* and *Lactobacillus*) was highest in the bioaugmentation group (90.35% and 3.29%, respectively), followed by the sterilized bioaugmentation group (79.11% and 6.11%, respectively), and was lowest in the natural fermentation group (9.21% and 2.69%, respectively). Compared to natural fermentation, bio-enhanced fermentation had clear advantages. This study provides theoretical support for further promotion and application of environmental protection enzymes.

Keywords Plant Jiaosu for Environmental Protection; *Lactobacillus*; *Acetobacter*; yeast; bioaugmentation; high-throughput sequencing

收稿日期 Received: 2022-02-27 接受日期 Accepted: 2022-04-29

国家重点研发计划项目(2022YFD1601100)、四川省科技计划项目(2021ZDZX0012, 2022YFS0498)和山西省重点研发计划项目(201903D211013)资助 Supported by the National Key R&D Program of China (2022YFD1601100), Sichuan Science and Technology Program (2021ZDZX0012, 2022YFS0498), and Key R&D Program of Shanxi Province (201903D211013)

✉通信作者 Corresponding authors (E-mail: lzysyb@126.com; yanzy@cib.ac.cn)

水果是人类生活必需品之一,随着社会经济和科学技术的发展,水果产业的体量迅速增大,国家统计局数据显示,2020年我国水果种植面积为126 462.8 km²,水果总产量为286 923 600 t,其中柑橘产量达440 661 000 t,苹果产量达51 218 700 t.我国已成为世界最大的水果生产国,水果产业更是多地区的农业经济支柱产业.然而,水果在种植、储运、加工、销售过程中会产生大量的落果、残次果、果核、果皮、果渣等副产物,随着人民生活消费水平的提高,消费者对水果类产品的品质要求也越来越高,随之而来的水果副产物的数量也在逐年升高.水果副产物营养物质丰富,抛弃、堆放会很快腐败变质^[1],不仅严重污染环境,还造成了大量资源的浪费.因此,如何科学地将水果副产物资源化利用,是当前水果产业亟须解决的问题.

环保酵素是基于植物类原料,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产品,能够用于除臭治理^[2]、水体净化^[3]、土壤改良^[4]等多个环境保护行业,在国内外得到了广泛的推广及应用.使用水果副产物生产环保酵素为其资源化利用提供了一条新途径,近年来已有学者成功使用水果副产物进行环保酵素制备.例如:王洋等使用残次水果、废弃蔬菜自然发酵12月,制备环保酵素并应用于水产养殖,对革兰氏阴性病原微生物体外抑制和致死作用较强^[5];卜俊芝等使用橙子皮、苹果皮、黄瓜等原料,经3个月发酵制备环保酵素,经检测具有蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶活性,可以应用于家庭清洁^[6].但目前关于环保酵素发酵工艺的研究很少,绝大多数采用自然发酵的方式,利用原料表面附着的酵母菌^[7]、乳酸菌、米曲霉^[3]等微生物进行发酵,制备时间长(3个月以上),易受杂菌污染,成品质量参差不齐,工艺不成熟、无法规模化生产.通过接入菌种对发酵进行生物强化作用,能在一定程度上避免污染,提升酵素产品质量.在环保酵素的发酵中,乳酸菌、酵母菌和醋酸菌是最常用的3种生物强化发酵菌种^[2].微生物酵素发酵是个复杂的混菌发酵体系,同时发酵过程参数复杂,难以控制,因此,深入研究环保酵素的发酵过程,解析发酵机理,进而构建成熟的发酵工艺,对水果副产物生产环保酵素具有重要的促进意义.

本研究首先筛选具有环保功能的酵素发酵菌株,然后以除臭应用为生物强化目的,以市场残次果为主要原料,使用自然发酵、生物强化发酵、灭菌-强化发酵3种方式制备环保酵素,比较不同发酵方式过程理化性质和微生物数量、群落变化,综合评价不同方式的优劣,为利用水果副产物生产环保酵素的规模化生产提供参考.

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品及原料 菌株筛选样品:乳酸菌及酵母菌筛选样品取自市售食用水果酵素,醋酸菌筛选样品取自小家君牌醋酸菌(酿醋菌种),均于成都某超市购买;发酵所用残次果(柑橘、苹果、梨)、红糖均采购于成都某农贸市场.

1.1.2 培养基 MRS乳酸菌筛选培养基(g/L):蛋白胨10.00,牛肉膏10.00,酵母提取物5.00,葡萄糖20.00,乙酸钠5.00,柠檬酸二胺2.00,吐温80 1.00, K₂HPO₄ 2.00, MgSO₄·7H₂O 0.20, MnSO₄·H₂O 0.05, 碳酸钙20.00, pH 6.3-6.8, 121 °C灭菌20 min; YPED酵母蛋白胨浸出物葡萄糖培养基(g/L):酵母提取物10.00,蛋白胨20.00,葡萄糖20.00,孟加拉红0.03, pH 6.0, 115 °C灭菌30 min; GYC葡萄

糖酵母浸出物碳酸钙培养基(g/L):葡萄糖30.00,酵母提取物10.00,蛋白胨5.00,碳酸钙20.00, pH 7.0, 115 °C灭菌30 min. 固体培养基需另加1.8%琼脂.

1.2 试验方法

1.2.1 发酵菌株筛选及鉴定 乳酸菌和酵母菌的筛选:准确量取10 mL食用水果酵素样品,使用无菌水梯度稀释,各稀释度取100 μL涂布于MRS和YPED培养基,30 °C厌氧培养24 h以上,在MRS平板培养基上挑选透明圈直径/菌落直径比值较大的菌落,在YPED上挑选菌落较大、香味较浓的菌落,多次平板划线、纯化直至无其他杂菌;筛选的各菌株编号,暂存于4 °C冰箱.

醋酸菌的筛选:称量酿醋菌种样品20 g,加入180 mL无菌GYC液体培养基中,恒温摇床中30 °C、180 r/min富集24 h.准确量取10 mL富集培养液,使用无菌水梯度稀释,各稀释度取100 μL涂布于GYC固体培养基,30 °C培养24 h以上,选取透明圈直径/菌落直径比值较大的菌落,多次平板划线、纯化直至无其他杂菌;筛选的各菌株编号,暂存于4 °C冰箱.

使用TIANGEN[®]试剂盒分别提取乳酸菌、醋酸菌、酵母菌(经液氮研磨后菌体)总DNA,并以此为模板,乳酸菌和醋酸菌采用通用引物(27 F: 5'-AGAGTTTGATCCTGG-CTCAG-3'; 1492 R: 5'-GGTTACCTTGTTAC-GACTT-3')对16S rDNA序列进行PCR扩增,酵母菌采用通用引物(ITS 1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS 4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')对ITS区域序列进行PCR扩增,并将PCR产物进行凝胶电泳分离,委托擎科生物科技有限公司测序,结果与GenBank数据库中进行BLAST比对,选取同源性较高序列,采用MEGA 11软件绘制菌株系统发育树,对各菌株进行鉴定.

1.2.2 接种物培养 乳酸菌接入MRS液体培养基,酵母菌接入YPED液体培养基,醋酸菌接入GYC液体培养基,于摇床中30 °C、150 r/min下发酵培养,培养至OD₆₀₀ ≥ 1.00. 使用无菌水将各菌液均稀释至OD₆₀₀ = 1.00,将稀释后的3种菌液以1:1:1的比例(V/V)混合均匀,制备接种物.

1.2.3 发酵方式 发酵所用残次水果,切除发霉腐败部分,按照柑橘:苹果:梨 = 5:3:2的质量比准确称量各残次果,使用粉碎机破碎后混合均匀;按红糖:水果:水 = 1:3:10的质量比将各原料混合均匀,加入容积2 L的密闭发酵瓶,每瓶分装1.6 L.发酵瓶顶部盖子上开两个孔用于放气和取样,平时用止水夹密封.

实验共分为3组,每组设置3个平行.实验组1为生物强化发酵组,水果在粉碎前使用自来水清洗表面,在装料后以5%的接种量将接种物加入发酵瓶内;实验组2为灭菌-强化发酵组,在装料后115 °C灭菌30 min,冷却后在无菌条件下以5%的接种量将接种物加入发酵瓶内;对照组(CK)为自然发酵组,装料后加入等量的无菌水.各组物料混合均匀后盖盖子密封,使瓶内保持厌氧环境,放置于30 °C培养箱中培养30 d以上.每6 d取样一次,样品首先进行感官评价,而后在1 000 r/min的转速下离心10 min,取上清液用于理化指标的测定,沉淀冻存于-80 °C冰箱用于高通量测序.

1.3 分析方法

1.3.1 理化指标检测方法 环保酵素感官评价参考行业标准《QB/T 5323-2018》;pH测定方法参照《GB 10468-89》;总酸测定采用滴定法,参照《GB/T 12456-2008》;可溶性糖测定使用苯酚-硫酸法,参照《SN/T 4260-2015》;有效活菌

数测定使用稀释涂布平板法,参照《GB 4789.2-2016》;有机酸使用液相测定,参照《GB 5009.157-2016》。

1.3.2 高通量测序方法 取各组发酵初始0 d(接种后)、发酵中期12 d、发酵结束30 d三个时间点共9个样品进行Illumina高通量测序,分析发酵过程中细菌与真菌群落结构组成及变化。样本使用Illumina PE3000测序平台进行测序分析,使用引物(F: AACMGGATTAGATACCKG; R: ACGTCATCCCCACCTTCC)针对细菌V5、V7区进行测序。真菌使用引物(F: CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA; R: GCTGCGTTCTTCATCGATGC)针对ITS区进行扩增^[8]。测序服务委托上海派森诺生物科技有限公司完成。

1.4 数据处理

所有试验结果以平均值±标准差的形式呈现,采用Excel(2016)计算实验数据均值和标准差,采用Origin 2018软件进行绘图。

高通量测序结果使用DADA 2方法对原始测序序列进行质控、去噪、去嵌合体并拼接得到有效数据,不再以相似度聚类,只进行去重(dereplication)或者说相当于以100%相似度聚类,明确扩增子序列变异(amplicon sequence variants, ASVs)为最小分类单元;细菌比对参照Silva数据库,真菌比对参照Unite数据库,对ASVs进行注释,并计算物种的相对丰度。

2 结果与分析

2.1 发酵菌株筛选与鉴定

2.1.1 乳酸菌 乳酸菌可转化糖类等生产乳酸,是最常见的益生菌,能够抑制腐败微生物的生长^[3],在环境保护中可有

效去除恶臭气体^[7]。为获得产酸能力最强的菌株,从MRS固体平板上挑取透明圈直径/菌落直径比值最大的菌落进行纯化,结果如图1A:该菌株在MRS平板上生长24 h后可形成单菌落,菌落白色、较大、表面略凸起、边缘光滑,菌落周围能产生明显透明圈,命名为R1;革兰氏染色后光学显微镜观察(图1B)可见菌体呈短杆状、单生、被染成紫色,为革兰氏阳性菌。16S rDNA序列通过BLAST同源性比对后使用MEGA 11构建系统发育树(图1C),该菌株与植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum* MK 049958.1)最为接近,相似性最高为98%;结合形态学特征和分子生物学结果鉴定其为植物乳杆菌(*L. plantarum*),保藏于中国微生物菌种保藏委员会普通微生物中心(菌种保藏号为CGMCC NO.23388)。

2.1.2 醋酸菌 醋酸菌能够将糖类或乙醇氧化为乙酸等有机酸,也是环境保护菌剂中常用菌之一,所产有机酸可抑制有害微生物生长,还可与其他物质反应生成具有芳香气味和酯类等^[9]。为获得产酸能力最强的菌株,从GYC固体培养基上挑选透明圈直径/菌落直径比值最大的菌落,多次划线纯化后进行菌株鉴定,结果如图2A:该菌株在GYC平板上生长24 h后可形成单菌落,菌落乳白色、表面光滑、有明显的酸味,菌落周围能产生明显透明圈,命名为CSJ;革兰氏染色后光学显微镜观察(图2B)可见菌体呈短杆状、单生、被染成红色,为革兰氏阴性菌。分子生物学鉴定(图2C)显示该菌株与热带醋杆菌(*Acetobacter tropicalis* NR 036881.1)最为接近,相似性为99%;结合形态学特征和分子生物学结果鉴定其为热带醋杆菌(*A. tropicalis*),保藏于中国微生物菌种保藏委员会普通微生物中心(菌种保藏号为CGMCC NO.23389)。

2.1.3 酵母菌 酵母菌是典型的兼性厌氧型微生物,在缺

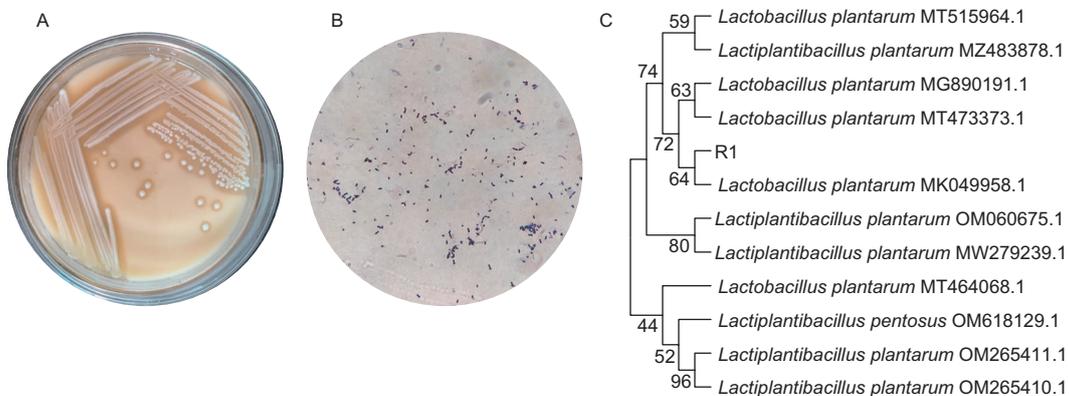


图1 菌株R1的菌落形态(A)、革兰氏染色(B)和系统发育树(C)。

Fig. 1 Colony morphology (A), Gram coloring (B), and phylogenetic tree (C) of strain R1.

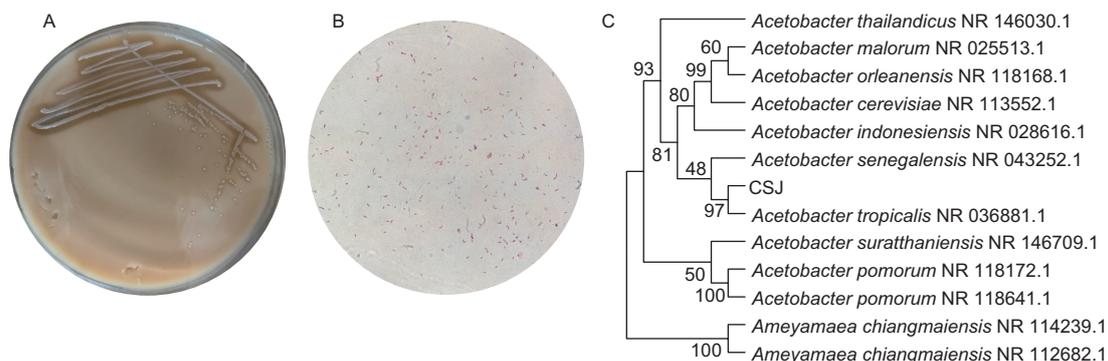


图2 菌株CSJ的菌落形态(A)、革兰氏染色(B)和系统发育树(C)。

Fig. 2 Colony morphology (A), Gram coloring (B), and phylogenetic tree (C) of strain CSJ.

氧的条件下可将糖类转化为乙醇,还能合成各种芳香气味的化合物,环境保护中常用其遮蔽恶臭气味^[10]。通过人工嗅辨的方式筛选产香最为浓郁的菌株,纯化后进行菌株鉴定,结果如图3A:在YPED平板上培养48 h后可形成单菌落,菌落较大、紫红色、半透明、表面湿润、边缘整齐,有明显的酒香味,命名为JM;光学显微镜下观察(图3B)可见菌体较大、有明显的出芽。分子生物学鉴定(图3C)显示该菌株与嗜酒假丝酵母(*Candida ethanolica* LT 854882.1)最为接近,相似性最高为98%;结合形态学特征和分子生物学结果鉴定其为嗜酒假丝酵母(*C. ethanolica*),保藏于中国微生物菌种保藏委员会普通微生物中心(菌种保藏号为CGMCC NO.23387)。

2.2 发酵理化指标

2.2.1 可溶性糖

酵素发酵中的可溶性糖来自外源添加的蔗糖和水果本身所含的糖类,是支持各类微生物生长、代谢的主要碳源,其消耗规律可以侧面反映发酵过程中微生物的生理状态。通过测定3种发酵方式过程中可溶性糖的变化,结果如图4A:发酵初始(0 d)3种发酵方式的可溶性糖含量相同,均在104.00 g/L左右。随着发酵进行,各组中可溶性糖迅速消耗,其中处理①和②的消耗速度要略快于对照组,至30 d发酵结束时,处理①和处理②为20.00 g/L左右,显著大于对照组(33.16 ± 1.78 g/L, $P < 0.05$)。处理组①和②中的糖在24-30 d浓度变化很小,这说明实验组中不再有大规模的糖类消耗,微生物生长趋于稳定、发酵基本结束;而对照组在整个发酵过程中持续下降,至30 d仍未见稳定趋势,说明微生物仍在生长。因此,与自然发酵相比,生物强化发酵到达发酵终点需要时间较短。

2.2.2 pH

酵素发酵过程中pH变化受微生物代谢的综合影响,同时pH也会影响微生物的细胞膜透性、代谢方向等生

理活动,是发酵过程十分重要的参数^[11]。对3种发酵方式进程中pH变化进行了记录,结果如图4B:0 d时对照组和处理①的初始pH分别为 5.18 ± 0.09 和 5.16 ± 0.02 ,处理②的初始pH略低为 4.86 ± 0.02 ,这可能是因为处理②组经过了灭菌处理,水果中所含有机酸释放到了发酵液中;发酵开始后3组酵素的pH迅速降低,第6天时,对照组和处理①组的pH降至3.50左右,处理②组下降更为迅速,降至 3.33 ± 0.01 ;此后3组发酵液pH差异不明显,均维持在3.40上下,直至发酵结束。

2.2.3 总酸

植物类原料在厌氧条件下发酵的主要产物是多种酸类物质,如乳酸、醋酸、丁酸、异丁酸、柠檬酸、苹果酸等,这也是酵素发酵中pH迅速降低的原因^[12]。对3种方式的发酵过程中总酸物质含量变化测定,结果如图4C:第0天,3组发酵总酸含量均较低,接近0;随着发酵进行,总酸含量迅速增加,至12 d时3组发酵的总酸含量均上升到10.00 g/L附近,此后均趋于稳定;然而0-12 d过程中总酸上升速率存在明显差异,处理②组总酸增加速率最快,处理①组次之,对照组最慢,这可能是由于生物强化发酵方式中的产酸菌相比自然发酵方式能更快成为体系中的优势菌,从而能更快发挥作用。因此,与自然发酵相比,生物强化的酵素发酵过程中总酸产生速率更快。

2.2.4 乳酸和醋酸

有机酸对环保酵素的性能有重要的影响,比如醋酸可与氨气发生反应,生成无气味的醋酸铵^[13];乳酸等有机酸其中的活性基团羧基可吸附氨及有机胺等分子,减少恶臭散逸^[14]。为此,本研究酵素发酵中接种了醋酸菌和乳酸菌,对3种方式发酵过程中乳酸和乙酸含量进行了测定,乳酸结果如图5A,发酵开始后乳酸含量迅速升高,其中处理①组乳酸含量最高达 3.49 ± 0.23 g/L,于30 d时获得,处理②组乳酸含量最高达 2.42 ± 0.01 g/L,于30 d时获得,对照组乳酸

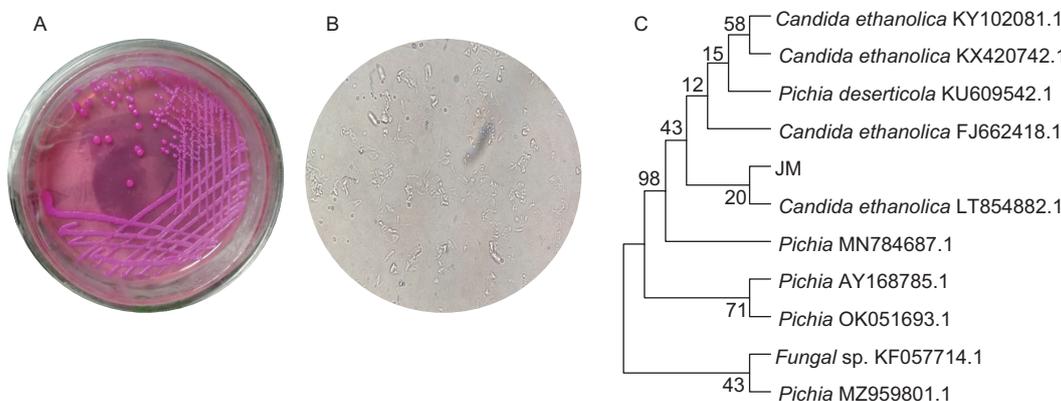


图3 菌株JM的菌落形态(A)、光学显微镜观察(B)和系统发育树(C)。

Fig. 3 Colony morphology (A), optical microscope observation (B), and phylogenetic tree (C) of strain JM.

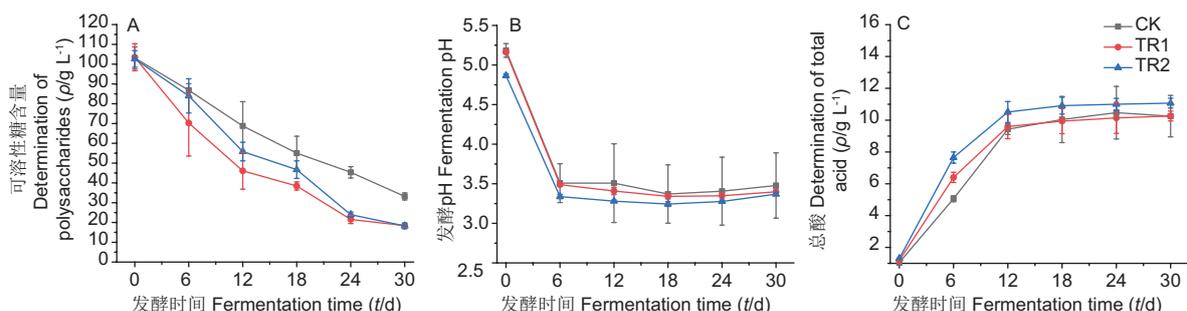


图4 发酵过程中可溶性糖含量(A)、pH(B)和总酸含量(C)变化。CK: 对照组; TR1: 处理①组; TR2: 处理②组。

Fig. 4 Concentration of polysaccharides (A), pH (B), and concentration of total acid (C) during fermentation. CK: Control check; TR1: Treatment ①; TR2: Treatment ②.

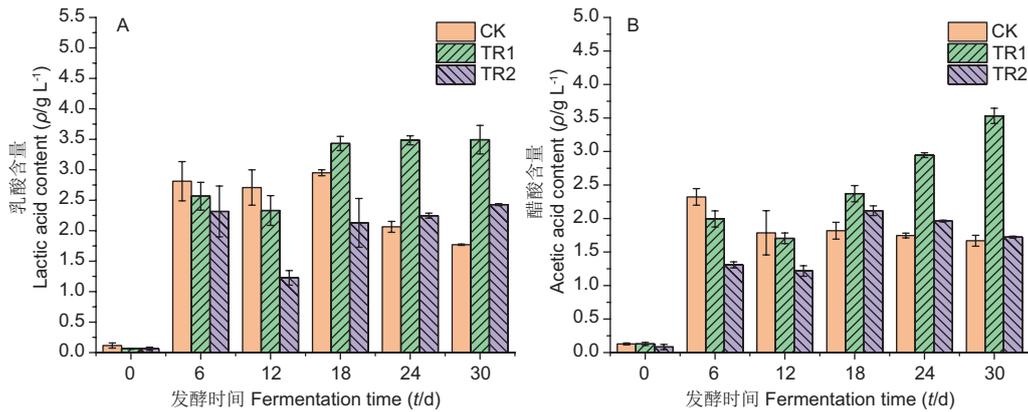


图5 发酵过程中乳酸(A)和醋酸(B)含量变化。CK: 对照组; TR1: 处理①组; TR2: 处理②组。

Fig. 5 The lactic acid (A) and acetic acid (B) contents during fermentation. CK: Control check; TR1: Treatment ①; TR2: Treatment ②.

含量最高达 2.95 ± 0.04 g/L, 于18 d时获得; 另外处理①和②组在18 d后乳酸含量趋于稳定, 而对照组在18 d后乳酸含量逐渐降低, 30 d时仅剩 1.77 ± 0.01 g/L. 醋酸结果如图5B, 其中处理①组醋酸含量最高达 3.53 ± 0.11 g/L, 于30 d时获得, 处理②组醋酸含量最高达 2.11 ± 0.07 g/L, 于18 d时获得, 对照组醋酸含量最高达 2.32 ± 0.12 g/L, 于6 d时获得; 另外处理②组和对照组在醋酸含量达到最高后均存在明显下降, 而处理①组的醋酸含量则持续增加至30 d. 因此, 与对照组和处理②组相比, 处理①组乳酸和醋酸的含量最高, 且全程持续增加, 后期不存在下降的现象。

2.3 发酵微生物指标

2.3.1 有效活菌数 有效活菌数是酵素发酵中微生物生长情况的直接反映, 决定环保酵素品质的另一重要指标. 对3种方式发酵的有效活菌数变化进行了测定, 结果如图6显示: 第0天, 对照组的初始活菌数为 3.37×10^9 个/mL, 处理①和②因为接菌的缘故初始活菌数较高, 均为 1.38×10^{11} 个/mL; 随着发酵的进行, 3组发酵中的有效活菌数均迅速降低, 对照组在第6天降低为 1.30×10^8 个/mL, 处理①和②组在第12天时均降至最低, 为 1.73×10^8 个/mL, 表明在此阶段发酵环境并不稳定, 体系中腐败菌和部分芽孢类细菌难以耐受酸性环境, 导致活菌总数降低; 此后, 对照组虽有略微升高, 但总体维持在较低水平, 至30 d时仅为 9.01×10^7 个/mL, 表明发酵并未完成;

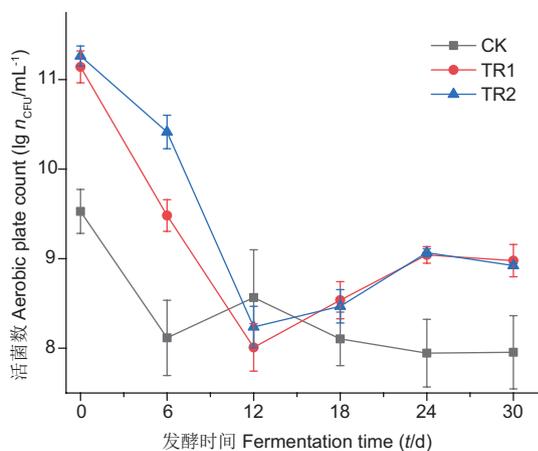


图6 发酵过程中有效活菌数变化。CK: 对照组; TR1: 处理①组; TR2: 处理②组。

Fig. 6 Aerobic plate count during fermentation CK: Control check; TR1: Treatment ①; TR2: Treatment ②.

而处理①和②组在12 d后菌数略微升高, 至30 d发酵结束时活菌数为 9.5×10^8 个/mL, 显著大于对照组 ($P < 0.05$), 结合细菌群落数据分析, 在此阶段产酸菌成为体系中优势菌, 其数量在升高到一定程度后保持稳定. 因此, 酵素发酵中有效活菌数均存在先降低、后升高的现象, 与自然发酵相比, 生物强化发酵的有效活菌数更高, 且后期无明显下降。

2.3.2 细菌群落 为进一步研究不同方式酵素发酵过程中的微生物变化规律, 本研究使用高通量测序的方式对微生物群落进行了解析. 不同样品中细菌数量排前十的属分布结果如图7, 细菌群落结构比较丰富, 相对丰度超过1%的类别有醋酸杆菌属 (*Acetobacter*)、乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、梭菌属 (*Clostridium*) 等. 发酵前 (0 d), 对照组的细菌种属均不在数量前十的范围内 (Others), 表明水果表面土著菌株没有数量很多的绝对优势种属; 处理①组除了土著菌株外 (Others) 外还有3.29%芽孢菌、少量乳酸杆菌 (0.05%) 和醋酸杆菌 (0.40%); 处理②组优势菌群为乳酸杆菌属 (77.29%), 此外还有少量芽孢杆菌 (20.38%) 等, 应该为灭菌不彻底所致. 随着发酵进行, 细菌种属结构发生明显改变, 除了土著菌外, 3种发酵方式中醋酸杆菌和乳酸杆菌均是绝对的优势菌群; 3组中醋酸菌的相对丰度均持续增加, 乳酸杆菌呈现先增加而后减少的趋势, 芽孢杆菌等则持续减少; 这可能是发酵开始后氧气逐渐耗尽、酸类物质积累越来越多, 致使好氧类的芽孢被抑制, 耐酸的醋酸杆菌和乳酸杆菌得以

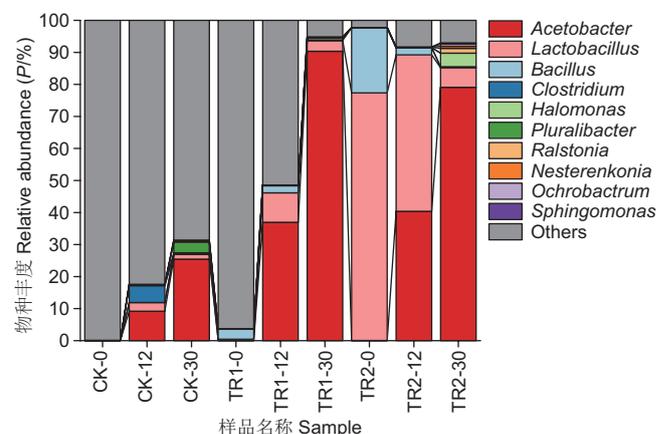


图7 不同发酵方式下属水平细菌群落组成动态。

Fig. 7 Dynamic changes in bacterial community composition at the genus level under different fermentation methods.

繁殖,而发酵中后期营养结构发生改变,乳酸杆菌逐渐减少、醋酸杆菌相对增多。3种发酵方式最大的不同在于优势菌群(醋酸杆菌和乳酸杆菌)所占的比例,其中处理①组所占比例最高(90.35%+3.29%)、处理②组次之(79.11%+6.11%),对照组最低(9.21%+2.69%)。因此,3种发酵方式的酵素中优势菌群均是乳酸菌和醋酸菌,与自然发酵相比,生物强化发酵可以提高优势菌群的比例。

2.3.3 真菌群落 不同样品中真菌数量排前十的种属分布结果如图8,其中相对丰度占比前五的真菌均为酵母菌属:毕赤酵母菌属(*Pichia*)、赛柏林德纳式酵母菌属(*Cyberlindnera*)、假丝酵母菌属(*Candida*)、德克酵母菌属(*Dekkera*)和柯达酵母菌属(*Kodamaea*)。3种发酵方式中毕赤酵母是绝对优势菌群,在各组的不同发酵时期相对丰度均是最多的。发酵前(0 d),对照组毕赤酵母比例为88.26%,赛柏林德纳式酵母菌属为2.98%,假丝酵母属为1.08%,此即为水果表面土著真菌群落组成;实验组①和②除了毕赤酵母外,还有部分赛柏林德纳式酵母菌属,应是清洗、灭菌等操作所致,还有少部分假丝酵母菌属,应是接种嗜酒假丝酵母所引入。随着发酵进行,真菌群落发生明显改变,3组发酵中毕赤酵母均呈现出先增多后减少的趋势。不同发酵方式最大的不同体现在发酵结束时不同酵母菌之间的比例:对照组酵母菌比例为85.06%,还有部分其他非酵母的土著菌群(Other)的存在;处理①组主要有毕赤酵母(73.63%)、德克酵母(12.89%)、假丝酵母(11.58%)和赛柏林德纳式酵母(1.57%)4种菌属构成,无其他真菌检出;处理②组则仅由毕赤酵母(66.37%)和赛柏林德纳式酵母(33.52%)两种菌属构成,接种的嗜酒假丝酵母也未检出,这可能是由于灭菌后对水果营养成分造成一定破坏,不适合接种的酵母和其他种类酵母的生长^[15]。因此,3种发酵方式的酵素中优势菌群都是毕赤酵母,与自然发酵相比,生物强化发酵可以提高酵母菌属的比例同时抑制杂菌的生长^[16],但是灭菌条件下的生物强化发酵酵母菌群过于单一、接种的产香酵母也不能顺利生长。

3 讨论与结论

在食用酵素的生产中已广泛使用人工接种的方式进行生物强化发酵,常用菌种为乳酸菌、酵母菌、醋酸菌、芽孢菌等^[17],菌种的接入可避免杂菌的污染和有害产物的生成,提高功效物质和风味物质的合成,改善口感等^[18]。然而,环保酵素多为自然发酵,尚未见生物强化发酵的相关报道。本研究通过筛选发酵专用菌株、比较不同发酵方式的理化性质和微生物指标,尝试构建环保酵素的生物强化发酵工艺。乳酸菌、醋酸菌和酵母菌不仅是酵素发酵菌株,还是环保菌剂中常用的组分^[19]。研究表明,乳酸菌具有去除硫化氢和氨气的作用,酵母菌可产香、抑制杂菌,醋酸菌是经典EM菌剂重要组成之一^[20]。为此本研究采用3种菌株混菌发酵,其中酵母菌可以产生酒精,醋酸菌将酒精转化为乙酸,乳酸菌利用糖类生产乳酸,直至氧气、营养物质完全耗尽,获得富含有机酸、生物酶、益生菌的酵素。与食品酵素不同的是,本研究以产酸能力、产香能力等环保作用的指标来进行环保酵素发酵的菌株筛选,更加有针对性地提升了产品性能。

生物强化发酵可以明显提升环保酵素的品质、缩短发酵时间。与饶毅萍等自然发酵的水果环保酵素^[21]相比,本研究生

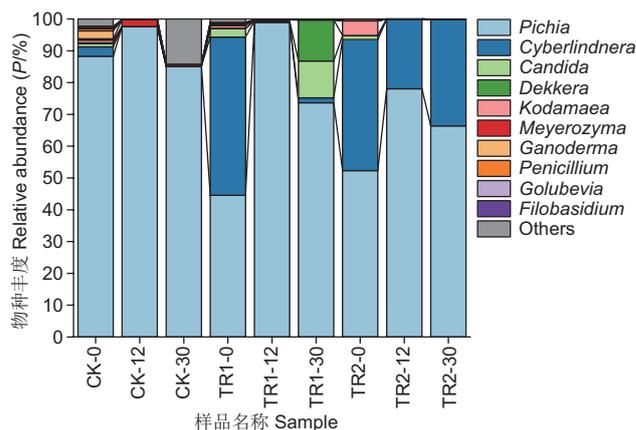


图8 不同发酵方式下属水平真菌群落组成动态。

Fig. 8 Dynamic changes in fungal community composition at the genus level under different fermentation methods.

物强化组有机酸(乳酸)含量更高,有效活菌数均要高很多,均能符合由工业和信息化部发布的QB/T5323-2018《植物酵素》标准要求。本研究中生物强化发酵经24-30 d的发酵, pH、可溶性糖、有机酸、有效活菌数等均趋于稳定,接近发酵终点,而环保酵素自然发酵则需要3个月^[21]甚至更久^[5],极大地提高了发酵效率。

本研究中自然发酵和生物强化发酵的优势菌属均为醋酸杆菌属、乳酸杆菌属和毕赤酵母菌属,与此不同的是,康晓乐等使用的苹果自然发酵酵素中乳杆菌和葡萄糖酸杆菌属为优势细菌,结合酵母属和汉逊酵母属为优势真菌^[22],这说明酵素中的优势菌属与发酵方式关系不大,而与原料的营养成分、自身所携带的土著菌群等有很大关系^[23]。值得注意的是,发酵方式可以明显改变微生物群落中各菌属的相对比例,与自然发酵相比生物强化发酵具有明显的优势,本研究中生物强化组的优势菌群增加速度大大加快,而且发酵终点时优势菌群占比也更高,几乎完全抑制了其他土著菌群的生长,这不仅是因为菌种本身的生长繁殖,其代谢对环境的改变也是重要原因^[24-25]。另外,虽然灭菌-强化发酵在前期可以加快有机酸的产生、优势菌的生长,但发酵中后期与各项指标与生物强化组差异不大,后期灭菌-强化发酵的酵母菌群过于单一、接种的产香酵母也不能顺利成为优势菌群。在大规模工业化生产中,灭菌会造成大量的能量投入,增加生产成本,违背了廉价发酵的初衷,因此选择避免灭菌的生物强化发酵方式能进一步节约环保酵素生产时的能源、成本投入,同时为环保酵素的生

产提供新思路。

综上所述,本研究成功筛选了环保酵素专用的发酵菌株,以此为菌种进行生物强化发酵。以提高环保酵素总酸含量和有效活菌数为指标,将环保酵素向除臭应用方面进行人为定向改造,通过优化发酵方式提升产品质量,得到以下结论:与自然发酵相比,生物强化发酵方式可以减少发酵时间,提高环保酵素有效活菌数,增加有机酸产量;与灭菌-强化发酵相比,发酵成品理化性质差异不大,而且发酵后期生物强化发酵方式的菌群组成更优。因此,本研究的菌株和生物强化发酵工艺具有一定优势,后续需进一步放大试验规模;同时环保酵素的價值不仅在于其品质的好坏,更重要的是在实际应用中的效果,因此本研究后续将对其实际除臭效果进行验证,将更有利于环保酵素的推广和应用。

参考文献 [References]

- 李俊英, 高喜源. 水果腐败关键病原微生物检测研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7 (9): 3510-3515 [Li JY, Gao XY. Research progress on the detection of key pathogenic microorganisms of fruit spoilage [J]. *J Food Saf Qual*, 2016, 7 (9): 3510-3515]
- 王婷, 李素玉, 赵仕沛. 环保酵素处理农村黑臭水体的试验研究[J]. 石河子科技, 2021 (3): 50-51+58 [Wang T, Li SY, Zhao SP. Experimental study on treatment of black and odorous water in rural areas with environmental protection enzymes [J]. *Shihezi Sci Technol*, 2021 (3): 50-51+58]
- Ma X, Gao M, Wang N, Liu S, Wang Q, Sun X. Lactic acid production from co-fermentation of food waste and spent mushroom substance with *Aspergillus niger* cellulase [J]. *Bioresour Technol*, 2021, 337: 125365
- Bulai IS, Adamu H, Umar YA, Sabo A. Biocatalytic remediation of used motor oil-contaminated soil by fruit garbage enzymes [J]. *J Environ Chem Eng*, 2021, 9 (4): 105465
- 王洋, 赵井, 王竞儒, 罗云龙, 刘颖, 白东清, 邵蓬, 李语涵. 自制环保酵素对水产病原菌的抑制效果及其发酵菌株的分离鉴定[J]. 南方水产科学, 2020, 16 (6): 97-104 [Wang Y, Zhao J, Wang JR, Luo YL, Liu Y, Bai DQ, Shao P, Li YH. Inhibitory activity of home-made garbage enzyme against aquatic pathogens and isolation and identification of its fermentation strains [J]. *S China Fish Sci*, 2020, 16 (6): 97-104]
- 卜俊芝. 混合果蔬酵素中生物活性成分及其应用研究[J]. 东莞理工学院学报, 2020, 27 (5): 90-94 [Bu JZ. Biological components and application of mixed fruit and vegetable enzyme [J]. *J DongGuan Univ Technol*, 2020, 27 (5): 90-94]
- Bao Y, Zhang M, Chen W, Chen H, Chen W, Zhong Q. Screening and evaluation of suitable non-*Saccharomyces* yeast for aroma improvement of fermented mango juice [J]. *Food Biosci*, 2021, 44: 101414
- 曹刚刚, 颀孙皖皖, 冀利峰, 颜萍萍, 曾化伟. 基于高通量测序技术分析酵素微生物多样性[J]. 湖北民族大学学报(自然科学版), 2021, 39 (4): 378-383 [Cao GG, ZhuanSun WW, Ji LF, Yan PP, Zeng HW. Analysis of microbial diversity of enzymes based on high-throughput sequencing technologies [J]. *J Hubei Minzu Univ (Nat Sci Ed)*, 2021, 39 (4): 378-383]
- Tang R, Yu H, Qi M, Yuan X, Ruan Z, Hu C, Xiao M, Xue Y, Yao Y, Liu Q. Biotransformation of citrus fruits phenolic profiles by mixed probiotics *in vitro* anaerobic fermentation [J]. *Lwt-Food Sci Technol*, 2022, 160: doi 10.1016/j.lwt.2022.113087
- Zhang H, Wu D, Huang Q, Liu Z, Luo X, Xiong S, Yin T. Adsorption kinetics and thermodynamics of yeast beta-glucan for off-odor compounds in silver carp mince [J]. *Food Chem*, 2020, 319: 126232
- 洪厚胜, 朱曼利, 李伟, 郭会明. 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 [Hou HS, Zhu ML, Li W, Guo HM. Optimization of fermentation process and physicochemical properties of probiotic fermented grape pomace [J]. *Food Sci*, 2019, 40 (8): 63-72]
- 姜照, 杜金华, 孙文涛, 祝敏. 发酵温度对发酵玉米糵中总酸及主要微生物的影响[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37 (6): 87-91 [Jiang Z, Du JH, Sun WT, Zhu M. Effects of fermentation temperature on total acidity and dominant microorganisms of fermented maize mash [J]. *Food and Ferment Ind*, 2011, 37 (6): 87-91]
- 夏源杰, 努尔波拉提·努尔苏力坦. 鸡粪中除臭真菌的筛选与除臭效果研究[J]. 新疆畜牧业, 2014 (S1): 24-28 [Xia YJ, Nuerbolati NRSLT. Screening and deodorizing effect of deodorizing fungi in chicken manure [J]. *Anim Husb Xinjiang*, 2014 (S1): 24-28]
- 马石霞, 摆倩文, 周魏, 马咸莹, 田攀, 蔡新东, 范思思, 王晓航, 马忠仁, 陈士恩, 孙娜, 丁功涛. 微生物除臭剂应用于畜禽养殖场研究现状[J]. 浙江农业学报, 2021, 33 (8): 1552-1564 [Ma SX, Bai QW, Zhou W, Ma XY, Tian P, Cai XD, Fan SS, Wang XH, Ma ZR, Chen SE, Sun N, Ding GT. Application of microbial deodorant in livestock and poultry farms [J]. *Acta Agric Zhejiangensis*, 2021, 33 (8): 1552-1564]
- Chanprasartsuk OO, Prakitchaiwattana C, Sanguandeekul R, Fleet GH. Autochthonous yeasts associated with mature pineapple fruits, freshly crushed juice and their ferments; and the chemical changes during natural fermentation [J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101 (19): 7500-7509
- 高庆超, 常应九, 马蓉, 曹效海, 王树林. 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, 45 (13): 126-133 [Gao QC, Chang YJ, Ma R, Cao XH, Wang SL. Dynamic changes in microbial community during natural fermentation of *Lycium Ruthenicum* Murr. enzymes [J]. *Bioresour Technol*, 2019, 45 (13): 126-133]
- Saguir FM, Sajur SA, Pérez MB, Savino MJ, Maturano C. Enzymatic Activities and Fermentation Products of Lactic Acid Bacteria From Fruits and Fermented Beverages [M]//Saguir FM. Quality Control in the Beverage Industry. United Kingdom: Alexandru Mihai Grumezescu, 2019: 491-528
- 杨培青, 李斌, 颜廷才, 孟宪军, 智洪涛, 黎盛, 殷秀岩, 王维生, 高凝轩, 丑述睿, 李恩惠. 蓝莓果渣酵素发酵工艺优化[J]. 食品科学, 2016, 37 (23): 205-210 [Yang PQ, Li B, Yan YC, Meng XJ, Zhi HT, Li S, Yin XY, Wang WS, Gao NX, Chou SR, Li EH. Fermentation of blueberry pomace for the production of biomass and protease activity [J]. *Food Sci*, 2016, 37 (23): 205-210]
- 周美君, 杨绍斌. 家禽粪便除臭复合菌剂的应用研究[J]. 湖北农业科学, 2016, 55 (22): 5789-5793+5820 [Zhou MJ, Yang SB. Application of complex microbial deodorization of poultry manure [J]. *Hubei Agric Sci*, 2016, 55 (22): 5789-5793+5820]
- Xu YX, Jiang ZD, Du XP, Zheng MJ, Fan-Yang Y, Ni H, Chen F. The identification of biotransformation pathways for removing fishy malodor from *Bangia fusco-purpurea* using fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Food Chem*, 2022, 380: doi 10.1016/j.foodchem.2022.132103
- 饶毅萍, 魏建华, 陈冬娥, 张彩云, 张淑怡. 环保酵素的微生物检测和生化成分分析[J]. 农业与技术, 2021, 41 (1): 30-32 [Rao YP, Wei JH, Chen DE, Zhang CY, Zhang SY. Microbial detection and biochemical component analysis of environmental protection enzymes [J]. *Agric Technol*, 2021, 41 (1): 30-32]
- 康晓乐, 李东霓, 李晨, 康红艳, 王妙姝, 田洪涛. 苹果自然发酵酵素微生物多样性分析[J]. 中国食品学报, 2021, 21 (1): 283-290 [Kang XL, Li DN, Li C, Kang HY, Wang MZ, Tian HT. Analysis of microbial diversity of naturally fermented apple Jiaosu [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2021, 21 (1): 283-290]
- 邱鹏月, 彭宇, 李晨, 卢海强, 谷新晰, 田洪涛. 基于宏基因组分析桑葚酵素的微生物多样性[J]. 中国食品学报, 2020, 20 (5): 251-257 [Di PY, Peng Y, Li C, Lu HQ, Gu XX, Tian HT. Diversity analysis of microorganisms of mulberry jiaosu based on metagenomics [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2020, 20 (5): 251-257]
- Nyanga LK, Nout MJ, Gadaga TH, Theelen B, Boekhout T, Zwietering MH. Yeasts and lactic acid bacteria microbiota from masau (*Ziziphus mauritiana*) fruits and their fermented fruit pulp in Zimbabwe [J]. *Int J Food Microbiol*, 2007, 120 (1-2): 159-166
- Zhang Y, Gao Y, Zheng Z, Meng X, Cai Y, Liu J, Hu Y, Yan S, Wang X. A microbial ecosystem: agricultural Jiaosu achieves effective and lasting antifungal activity against *Botrytis cinerea* [J]. *AMB Express*, 2020, 10 (1): 216