

多菌种混合发酵无醇饮料的研究*

王欣德 刘晓兰 吴耘红

(齐齐哈尔轻工学院 齐齐哈尔 161006)

摘要 以大麦芽、大麦和大米为主料, 优质红茶为辅料, 依据微生物生理代谢与生态的基本原理, 选择了三个菌种混合发酵, 开发了一种新型发酵无醇饮料。采用的三个菌种是: 酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*), 嗜酸乳酸菌 (*Lactobacillus acidophilus*), 弱氧化醋酸单胞菌 (*Acetomonas suboxydans*)。将上述菌种按一定比例 (1:1:2) 接种, 接种总量为发酵基质的 10%, 控制发酵温度 20—25℃, 发酵时间 5 天, 即可制成风格独特、口味纯正的新型发酵无醇饮料 (含醇量 < 1%)。

关键词 酵母菌, 嗜酸乳酸菌, 弱氧化醋酸单胞菌, 混合发酵, 无醇饮料

发酵产品除与工艺条件和原料有关外, 主要决定于菌种。本文使用的三个菌种, 是通过生长与发酵特性试验而优选出来的^[1]。这三个菌种具有相近的生长条件和特殊的互惠关系。在厌氧条件下, 酵母菌发酵产生乙醇, 同时产生甘油、脂类、杂醇油、羰基化合物等香味物质^[2], 对饮料的口味和风格具有很大的影响。

嗜酸乳酸菌发酵产生乳酸和挥发性风味物质, 如乙醛、丙酮、双乙酰等羰基化合物, 与酵母菌发酵产生的香味成分合为一体, 能形成较复杂的香气。乳酸与乙醇作用形成乳酸乙酯, 是构成醋酸饮料香气的主要成分^[3]。弱氧化醋酸单胞菌, 既能把葡萄糖氧化成葡萄糖酸和酒石酸, 又能把乙醇氧化成乙酸^[4,5]。选用三种菌混合发酵, 能赋予饮料柔和爽口的酸味和香气。但弱氧化醋酸单胞菌不具备三羧酸循环的酶类, 不能把乙酸继续氧化成二氧化碳和水^[5], 为发酵饮料中各种物质的协调和工艺条件的控制提供了方便。

麦芽汁中不仅含有大量的麦芽糖, 还含有葡萄糖和果糖、蔗糖^[6]。借助于弱氧化醋酸单胞菌控制氧化过程, 使葡萄糖的一部份变成葡萄糖酸, 因此就得到了葡萄糖、果糖及葡萄糖酸的混合物, 这是构成软饮料良好口味的基本成分^[4]。

1.1 材料

供试菌种: 酵母菌 (*Sauharomyces cerevisiae* Hansen), 弱氧化醋酸单胞菌 (*Acetomonas suboxydans*), 由中国科学院微生物研究所提供; 嗜酸乳酸菌 (*Lactobacillus acidophilus*), 由东北农学院提供。

麦芽汁: 齐齐哈尔啤酒厂提供。

红茶及化学试剂 (分析纯): 市售。

1.2 方法

1.2.1 麦茶汁的制备: 每升麦芽汁加 1.5g 红茶, 煮沸两小时后过滤。

1.2.2 单菌发酵试验: 每三个 250ml 三角瓶为一组, 各装入 100ml 麦茶汁, 1kg/cm² 灭菌 30 分钟, 冷却至 35℃ 以下接种, 酵母菌和嗜酸乳酸菌置培养箱中静止发酵。弱氧化醋酸单胞菌置摇床通气培养, 定时取样检测。各组试验条件如表 1。

1.2.3 混合发酵试验: 500ml 三角瓶三个为一组, 各装入 300ml 麦茶汁, 1kg/cm² 灭菌 30 分钟, 冷却至 35℃ 以下接种, 振荡培养, 定时取样检测。正交设计见表 2。

本成果为国家级重大科技成果, 国家登记号 891247
已申请国家专利, 申请号 92114478.4

1993-08-30 收稿

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

1 材料和方法

表1 试验条件综合表

条件 试验号	pH	温度 (°C)	底物浓度 (°Bx)	接种量 (%)
1	4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0	28	12	10
2	由1选出适宜pH	20, 25, 28, 30	12	10
3	由1选出适宜pH	由2选出适宜温度	4, 6, 8, 10, 12	10
4	由1选出适宜pH	由2选出适宜温度	由3选出适宜浓度	3, 6, 8, 10

表2 L₃ 3³ 因素水平表

因素 水平	A	B	C
	菌种比例	发酵温度 (°C)	发酵时间 (天)
1	1:1:1	20	3
2	1:1:2	25	5

三菌种接种总量为10%，麦茶汁浓度为12°Bx，pH 6.0。

1.2.4 混合发酵数据处理方法：多目标决策图论方法^[7]。

1.2.5 氨基酸检测方法：毛细管气相色谱法^[10]。

1.2.6 乳酸及其他理化指标检测按文献^[8, 9]方法。

2 结果和讨论

2.1 单菌发酵试验

在试验条件下，弱氧化醋酸单胞菌较为适宜的发酵条件是：pH7.0，温度28°C，麦茶汁浓度12°Bx，接种量10%，经100小时发酵总酸产量可达10.8g/L。

嗜酸乳酸菌，pH6.0，28°C，底物浓度12°Bx，接种量10%，产乳酸量较高，经100小时发酵可达6.8g/L。试验还表明，在其他条件相同的情况下，25°C和28°C发酵乳酸量经113小时仅差0.117g/L。

酵母菌发酵乙醇的适宜条件是：pH5.0，发酵温度30°C，底物浓度12°Bx，接种量6%，经96小时乙醇产量为37.3g/L。在其他条件相同的情况下，经96小时发酵，pH5.0和pH5.5时，乙醇产量几乎没有差异。28°C和30°C乙醇产量仅差0.6g/L。在各适宜条件下，代谢产物与时间的关系如图1。

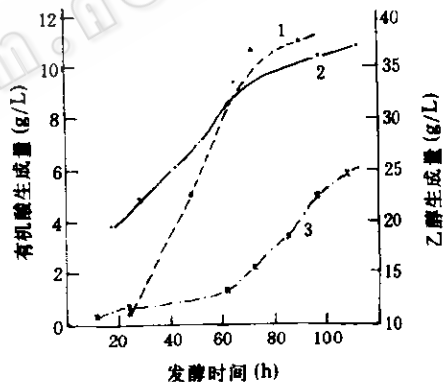


图1 适宜条件下产物与时间的关系

1. pH5.0，30°C，底物浓度12°Bx，接种量6%酵母菌发酵乙醇
2. pH7.0，28°C，底物浓度12°Bx，接种量10%弱氧化醋酸单胞菌发酵总酸
3. pH6.0，25°C，底物浓度12°Bx，接种量10%，嗜酸乳酸菌发酵乳酸

2.2 混合发酵试验

在单菌种试验的基础上，通过混合发酵优选适宜的工艺参数。在单菌种试验中，以各菌种代谢的主产物如酒精、乳酸、总酸（醋酸和葡萄糖酸等）为考核目标，但对发酵饮料而言，并非这些产物越多越好，而是要含量适当，互相协调。特别是各菌种发酵的副产物，在一定

意义上讲,甚至比主产物还重要。因为这些物质含量集中体现在口味上。如酒精含量在不影响副产物形成的情况下越低越好,发酵液经甜酸比例调制后(加适量过滤水)酒精含量不得超过1%。挥发酸含量过高则刺激性酸味过重,口感不佳。根据作者以往的研究,在28—30℃下发酵,则易出现这种情况。乳酸是饮料中不可缺少的保健成分,嗜酸乳酸菌在20℃

以下不发酵乳酸^[11],饮料的透明度随乳酸含量的增加而降低^[8]。总之,根据饮料的要求,依据单菌试验结果,在混合发酵中,选择发酵温度20℃和25℃,菌种比例(酵母菌:嗜酸乳酸菌:弱氧化醋酸单胞菌)为1:1:1和1:1:2,发酵时间3天和5天。试验检测数据及分析计算见表3。

表3 混合发酵分析计算表

因素 试验号	正文表			目标加权	目标实测数据							归一化后的目标值			
	A	B	C	$F=c_1 f_1+c_5 f_5+c_6 f_6+c_7 f_7$	酒精 (%) f_1	α -氨基氮 (mg/100ml) f_2	总糖 (%) f_3	还原糖 (g/100ml) f_4	总酸 (%) f_5	乳酸 (%) f_6	醋酸 (%) f_7	f_1 0.0679	f_5 0.4193	f_6 0.0677	f_7 0.4193
1	1	1	1	23.4739	1.840	3.97	2.39	0.28	0.71	0.077	0.50	38.67	21.0	74.44	16.67
2	2	1	2	71.9845	0.910	2.91	2.58	0.31	1.245	0.034	0.89	69.67	74.5	26.67	81.67
3	1	2	2	40.9551	1.285	3.24	0.79	0.18	1.075	0.054	0.54	57.17	57.2	48.89	23.33
4	2	2	1	31.2894	0.965	5.36	2.85	0.35	0.873	0.054	0.51	67.63	37.4	48.89	18.33
K1	64.429	95.46	54.773	CT=7032.74											
K2	103.29	72.255	112.95												
H	377.64	134.25	846.17												

按参考文献[7]之方法,求得多目标赋权和权重系数向量($c=c_1, c_2, c_3, \dots, c_7$) $c=(0.0617, 0.0094, 0.0113, 0.053, 0.4193, 0.677, 0.4193)$ 。由于 c_2, c_3, c_4 都很小($<2\%$),因此将 f_2, f_3, f_4 略去,即这些目标可以忽略,而以酒精、乳酸、醋酸、总酸为主要考核指标。

结论: $A_2B_1C_2$ (试验号2),即最佳组合为菌种比例1:1:2,发酵温度25℃,发酵时间5天。这一组合条件,相对地减少了酵母菌的接种量,增加了嗜酸乳酸菌和弱氧化醋酸单胞菌的接种量,从而酒精生成量降低,酸度适当增加,这些都有利于发酵饮料品质的提高。发酵温度25℃为常温发酵,可以大大简化工艺条件和设备。

发酵液中含有适量的氨基酸和维生素,其含量见表4和表5。

酵母菌、嗜酸乳酸菌、弱氧化醋酸单胞菌,互相搭配,混合发酵无醇饮料(含醇量<

表4 发酵液中氨基酸含量

氨基酸名称	含量 (% $\times 10^{-2}$)	氨基酸名称	含量 (% $\times 10^{-2}$)
丙氨酸	3.20	赖氨酸	0.51
甘氨酸	7.13	酪氨酸	1.65
丝氨酸	5.70	精氨酸	1.35
脯氨酸	3.18	组氨酸	0.72
天冬氨酸	1.25	半胱氨酸	0.59

表5 发酵液中主要维生素含量*

序号	检验项目	检验结果($\mu\text{g}/100\text{ml}$)
1	维生素B ₁	62.0
2	维生素B ₂	52.0

* 国家乳制品质量监督检验中心,样品编号92WT0237

1%)^[12]是可行的。将发酵液适当调配甜酸比例和香味物质,即可制成色泽淡黄(不添加任何色素),泡沫洁白,营养丰富,口味纯正,风格独特,具有保健作用的发酵无醇饮料。

三个菌种的选择和搭配是科学的,符合微生物生理代谢和生态的基本原理。

参 考 文 献

- [1] 王欣德, 岳凤岚, 浑桂琴. 中国酿造, 1988, 6: 33—38.
- [2] 陈思云, 萧熙佩著. 酵母生物化学. 济南: 山东科学技术出版社, 1990, 276—313.
- [3] 蔡美珠. 中国酿造, 1987, 6: 25—27.
- [4] (德) H J Rehm 著. 徐浩译. 工业微生物学. 北京: 科学出版社. 1975, 10, 62, 64.
- [5] (澳) H W Doelle 著. 郭杰炎等译. 细菌的新陈代谢. 北京: 科学出版社, 1983, 239, 265, 283, 291.
- [6] 大连轻工业学院, 无锡轻工业学院, 天津轻工业学院编著. 酿造酒工艺学. 北京: 轻工业出版社, 1987, 75.

- [7] 宋国栋, 丁吉豫, 潘曾挺. 控制与决策, 1987, 3: 23—27.
- [8] 黑龙江省甜菜糖业科学研究所主编. 甜菜制糖化学管理统一分析方法. 北京: 轻工业出版社, 1975, 113—115.
- [9] 上海商品检验局主编. 食品化学分析. 上海: 上海科学技术出版社, 1979, 30—36, 60—62, 278, 293—294.
- [10] 史景江, 岳凤岚, 梦利. 分析测试通报, 1991, 10(4): 81—83.
- [11] 陈华癸主编. 微生物学. 北京: 农业出版社, 1962, 144.
- [12] 邵长富, 赵晋府主编. 软饮料工艺学. 北京: 轻工业出版社, 1987, 4.

THE STUDY OF MIXED CULTURE FERMENTATION TO PRODUCE NONALCOHOLIC BEVERAGE

Wang Xinde Liu Xiaolan Wu Yunhong

(Qiqihar Light Industry Institute, Qiqihar 161006)

Abstract According to basic principle of microbial metabolism and ecological relation, the new type nonalcoholic beverage is produced by use of malt, rice and black tea by *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus acidophilus* and *Acetobacter suboxydans*. The proportion of inoculum: *Saccharomyces cerevisiae*: *Lactobacillus acidophilus*: *Acetobacter suboxydans* is 1 : 1 : 2, and the inoculum size is 10%. The fermentation temperature is controlled at 20—25°C, and the fermentation time is 5 days.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus acidophilus*, *Acetobacter suboxydans*, mixed culture fermentation, nonalcoholic beverage