

# 固定化共生发酵无醇饮料的研究

刘晓兰 王欣德 刘长海 吴耘红 时成波

(齐齐哈尔轻工学院, 齐齐哈尔 161006)

吕春福

(齐齐哈尔北大仓酒厂, 齐齐哈尔 161000)

**摘要** 以大麦和大米为主料, 优质红茶为辅料, 采用海藻酸钠包埋法固定酵母菌、嗜酸乳杆菌、弱氧化醋酸菌, 混合装填固定化细胞反应柱, 连续发酵生产无醇饮料。试验表明: 麦茶汁  $12^\circ \text{Bx}$ ,  $\text{pH}6.5$ ,  $25^\circ \text{C}$ , 反应柱内固定化各菌种凝胶比例为酵母菌: 嗜酸乳杆菌: 弱氧化醋酸菌 =  $0.7:1:2$ , 停留时间  $9\sim 13\text{h}$ , 相当于游离细胞发酵  $10\text{d}$  的效果。流出液含 L-乳酸  $1.65\sim 1.98\text{g/L}$ , 总酸  $2.624\sim 3.032\text{g/L}$ , 酒精  $0.7\%\sim 1.32\%$ 。制成的新型发酵无醇饮料呈淡黄色, 泡沫洁白细腻, 含有多种人体必需氨基酸和维生素, 以及具有保健作用的乳酸、醋酸、葡萄糖酸等有机酸, 口味纯正, 风格独特。

**关键词** 混合发酵, 酵母菌, 嗜酸乳杆菌, 弱氧化醋酸菌, 无醇饮料

随着食品结构的改变, 人们对饮料的要求朝着原料天然化、营养保健型发展。现有的配制饮料或单菌种发酵饮料, 都无法满足这种需求。因此, 开发新型饮料已成为国内外研究的方向。

本课题组于 1989 年研究成功“多菌种发酵无醇饮料”<sup>[1~3]</sup>, 并进行了工业化生产实验。本文报道的是在以前工作的基础上, 采用固定化细胞技术共生发酵生产无醇饮料。

固定化共生发酵方法生产无醇饮料, 力图在保证原有“多菌种发酵无醇饮料”特色和质量的前提下改进原有工艺, 以便更有效地控制发酵过程中的各菌种比例关系, 简化发酵和分离的工艺和设备, 提高发酵效率。同时优选固定化多菌种连续发酵的最佳参数, 以利于推广应用。

## 1 材料与方方法

### 1.1 材料

供试菌种: 蜂蜜酵母 (*Saccharomyces mel-lis*) 和弱氧化醋杆菌 (*Acetobacter suboxy-dans*), 中国科学院微生物研究所提供; 嗜酸乳

杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*), 东北农学院提供。

麦芽汁: 齐齐哈尔啤酒厂提供。

红茶、海藻酸钠及化学试剂(分析纯): 市售。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 麦茶汁的制备:** 每 L 麦芽汁加红茶 1.5g, 煮沸 2h, 过滤除去残茶。

**1.2.2 固定化细胞的制备:** 取种子培养液, 在转速  $4000\text{r/min}$  下离心收集菌体, 加入定量的无菌生理盐水制成均匀菌悬液, 与灭过菌的一定浓度的海藻酸钠溶液混合, 使混合后的海藻酸钠浓度为  $2\%$ ; 搅匀后滴入到  $2\% \text{CaCl}_2$  溶液中, 制成直径为  $2.5\sim 3\text{mm}$  的固定化细胞颗粒小球。此固定化细胞颗粒放置冰箱过夜, 用无菌水清洗 3 次, 再经增殖培养即可用于发酵实验。

**1.2.3 固定化单菌种发酵实验:** 250ml 三角瓶内装麦茶汁 150ml, 接种量  $10\text{ml gel}/100\text{ml}$ , 按规定之条件如 pH、温度和底物浓度进行发

酵。定时取样检测乙醇、乳酸、总酸及挥发酸生成量。

**1.2.4 固定化细胞混合发酵最佳条件的选择:** 采用  $L_9(3^3)$  正交实验。

**1.2.5 固定化细胞连续发酵实验:** 固定化细胞反应器总容积 2.5L, 由超级恒温水浴恒定温度。无菌空气由无油空气压缩机经无菌空气过滤器从反应器的下部通入, 用蠕动泵连续供料。连续发酵装置如图 1 所示。

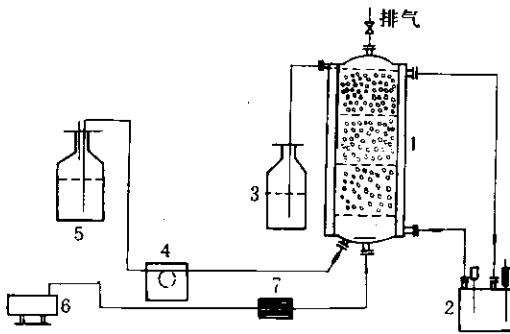


图 1 填充床固定化细胞反应器装置简图

1. 填充床固定化细胞反应器, 2. 超级恒温水浴, 3. 流出液贮瓶, 4. 蠕动泵, 5. 供料瓶, 6. 空压机, 7. 无菌空气过滤器

### 1.3 分析方法

糖的测定: 3, 5-二硝基水杨酸比色法<sup>[4]</sup>。

总酸和挥发酸的测定: 滴定法和挥发酸法<sup>[5]</sup>。

乳酸的测定:  $FeCl_3$  比色法<sup>[6]</sup>。

乙醇的测定: 比重法<sup>[5]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 固定化单菌种发酵实验

**2.1.1 固定化嗜酸乳杆菌发酵特性:** 试验了固定化乳杆菌在不同温度、pH 和底物浓度的发酵情况。

从表 1 可见: 发酵 48h 内, 产乳酸速率几乎相等。随发酵时间的增加, 产酸速率随温度的升高而加快。乳酸具有柔和爽口的酸味, 成品无醇饮料中期望乳酸含量相对高一些为好。所以 40℃ 是固定化嗜酸乳杆菌发酵的最适温度, 略高于游离细胞的最适温度 (35~38℃)<sup>[7]</sup>。

在底物浓度 13°Bx, 初乳酸 0.64g/L,

40℃ 的条件下, 试验了 pH 为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 时的产乳酸情况。结果表明: 最适产乳酸的 pH 为 7.0, 高于游离细胞最适 pH6.0<sup>[8]</sup>。

当温度为 40℃、pH7.0 时, 试验了底物浓度分别为 6、9、11、12、14 和 15°Bx 的发酵情况。底物浓度为 12°Bx 产酸最高, 发酵 26h 乳酸含量达 4.03g/L, 底物浓度继续升高, 产酸下降。

综合上述试验, 固定化嗜酸乳杆菌产酸的最适条件是: 温度 40℃, pH7.0, 底物浓度 12°Bx。

表 1 温度对固定化嗜酸乳杆菌发酵特性的影响

乳酸 (g/L)	温度 (°C)					
	20	25	30	35	40	45
11	1.30	1.09	1.36	1.32	1.16	1.03
24	1.71	1.45	1.68	1.70	1.38	1.07
48	1.97	1.62	1.96	1.99	1.78	1.95
72	2.04	1.68	1.92	1.97	2.39	2.21
96	2.14	1.72	1.99	2.27	3.21	2.59
122	2.00	1.69	2.23	2.57	3.47	2.85

注: 底物浓度 12°Bx, 初乳酸 0.52g/L, pH6.5

**2.1.2 固定化弱氧化醋酸菌发酵特性:** 当底物浓度为 12°Bx, 接种量 10ml gel/100ml, pH 为 6.0 时, 测定了该菌在不同温度下 (20、25、30、35℃) 的产酸情况。结果表明, 发酵结束时 (120h), 酸度相差不大。从发酵进程看, 30℃ 的产酸期较早, 为最适温度, 与游离细胞最适生长温度和发酵葡萄糖酸的最适温度相同<sup>[8]</sup>。

该菌在培养基不同 pH 条件下的发酵情况表明, 培养基初始 pH5.0~7.5 固定化弱氧化醋酸菌发酵的影响不大。

当底物浓度从 6°Bx 提高到 16°Bx, 该菌的总酸和挥发酸产量也无明显提高。

**2.1.3 固定化酵母菌发酵特性:** 在 pH5.0、底物浓度 12°Bx 条件下试验了该菌在 20、25、28 和 35℃ 时的发酵情况, 结果表明, 该菌发酵乙醇的最适温度是 28℃。发酵 60h, 乙醇产量为 1.05%。在 28℃、底物浓度 12°Bx 条件下试验了培养基不同 pH 对该菌发酵的影响。结果表

明:固定化酵母菌发酵乙醇的最适 pH 为 4.5。发酵 4.2h,乙醇产量为 1.07%。

表 2 底物浓度对固定化酵母菌发酵特性的影响

乙醇(%) t/h	浓度(°Bx)				
	8	10	12	14	16
0	0	0.11	0	0	0
12	0.11	0.22	0.22	0.27	0.165
24	0.11	0.38	0.22	0.27	0.27
36	0.22	0.59	0.485	0.345	0.485
48	0.485	1.07	0.805	0.54	0.75
60	0.700	1.325	0.965	0.700	0.700
72	1.070	1.070	0.965	0.700	0.54

注: 温度 28℃, pH4.5

从表 2 可看出,固定化酵母菌发酵乙醇的

最适底物浓度为 8~12 °Bx。

蜂蜜酵母由麦芽糖发酵生成乙醇能力较低,这一点正符合无醇饮料的要求。

## 2.2 固定化酵母菌、嗜酸乳杆菌、弱氧化醋酸菌混合发酵试验

根据固定化单菌种试验,多菌种发酵无醇饮料各代谢产物的期望结果为:酒精产量低些(约为 1%左右),酸度产量高些。为了确定三个菌种混合发酵的最佳条件,进行了正交实验。然后将正交实验各条件的发酵液调制成品饮料,品尝评分,优选最佳发酵参数。

由正交实验结果(表 3)可知:25℃,pH6.5,菌种比例:酵母菌:乳酸菌:醋酸菌为 0.7:1:2 是试验范围内固定化三菌种混合发酵的最佳条件。主要的影响因素是菌种比例,其次是发酵温度,pH 影响不大。

表 3 L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>)正交实验结果

试号	温度(℃)	pH	菌种比例	乙醇(%)	总酸(g/L)	乳酸(g/L)	挥发酸(g/L)	总糖(g/L)	口感评分
1	22	5.5	1:1:2	0.270	4.927	2.21	1.858	117.32	6.36
2	25	5.5	0.5:1:2	0.380	4.185	2.63	1.059	116.92	6.09
3	28	5.5	0.7:1:2	0.380	4.752	2.62	1.922	114.78	6.73
4	22	6.5	0.7:1:2	0.540	4.608	2.79	1.600	114.25	6.46
5	25	6.5	1:1:2	0.270	5.030	2.42	2.613	115.91	7.06
6	28	6.5	0.5:1:2	0.380	4.432	2.56	1.185	116.01	6.66
7	22	7.5	0.5:1:2	0.325	5.659	3.17	1.180	113.72	5.70
8	25	7.5	0.7:1:2	0.435	4.113	2.62	1.907	116.03	6.89
9	28	7.5	1:1:2	0.110	4.072	2.50	1.845	117.83	6.59
K <sub>1</sub>	6.17	6.39	6.15						
K <sub>2</sub>	6.68	6.73	6.69						
K <sub>3</sub>	6.66	6.39	6.67						
R	0.51	0.34	0.52						

注: 初糖 130.24g/L; 菌种比例(各菌种凝胶比例): 酵母菌:乳酸菌:醋酸菌

口感评分值为发酵时间 111h 的发酵液经调配后饮用者给出的平均分

表中其它数据均为发酵 111h 的测得数据

## 2.3 填充床固定化细胞反应器连续发酵试验

根据上述共生发酵的结果,在图 1 所示

的反应装置中进行连续发酵。表 4 为发酵结果。

## 参 考 文 献

表4 填充床固定化细胞反应器发酵结果

停留时间 <i>t</i> / h	5	7	9	13	15	20	24
乙醇(%)	0.550	0.550	0.700	1.320	1.40	1.675	1.620
总酸(g/L)	0.695	1.441	2.624	3.032	2.679	4.016	4.023
挥发酸(g/L)	0.534	0.534	0.663	0.534	0.432	0.654	0.654
乳酸(g/L)	0.66	1.13	1.65	1.98	1.49	1.93	2.17
总糖(g/L)	118.1	115.0	113.2	112.0	112.1	100.0	100.2

由连续发酵的结果可知,物料停留时间以9~13h为佳。此时乙醇含量0.700~1.32%,总酸2.624~3.032g/L,挥发酸0.663~0.534g/L, L-乳酸1.65~1.98g/L。流出液口感爽口,颜色淡黄,品质良好,相当于游离细胞发酵10d的效果,效率提高了18倍。

- [ 1 ] 王欣德,刘晓兰,吴耘红. 微生物学通报, 1994, 21(2): 79~82.
- [ 2 ] 王欣德,姜亦茂,敖雪梅. 食品与发酵工业, 1994, 1: 24~27.
- [ 3 ] 王欣德,姜亦茂,刘晓兰. 工业微生物, 1994, 24(1): 7~12.
- [ 4 ] 北京大学生物系生物化学教研室编著. 生物化学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 1979.
- [ 5 ] 天津轻工业学院, 大连轻工学院, 无锡轻工业学院, 等. 工业发酵分析. 北京: 轻工业出版社, 1984.
- [ 6 ] 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.
- [ 7 ] 许本发, 李宏建, 柴全贞. 酸奶和乳酸菌饮料加工. 北京: 轻工业出版社, 1994.
- [ 8 ] 金其荣, 张继民, 徐勤. 有机酸发酵工艺学. 北京: 轻工业出版社, 1988, 460~470.

## THE STUDY ON MIXED CULTURE FERMENTATION OF IMMOBILIZED CELLS TO PRODUCE NONALCOHOLIC BEVERAGE

Liu Xiaolan Wang Xinde Liu Changhai Wu Yunhong Si Chengbo

(Qiqihar Light Industry Institute, Qiqihar 161006)

Lu Chunfu

(Qiqihar Beidachang Brewery, Qiqihar 161000)

**Abstract** A nonalcoholic beverage was produced in packed bed bioreactor by continually mixed culture fermentation of immobilized *Saccharomyces mellis*, *Acetobacter suboxydans* and *Lactobacillus acidophilus* in Ca-alginate. The key materials were malt, rice and black tea. The best run of continuous processes was substrate 12 °Bx, pH 6.5, 25°C and dilution rate 0.08~0.11 l/h. The optimised proportion of gels of immobilized *Saccharomyces mellis*, *Acetobacter suboxydans* and *Lactobacillus acidophilus* in the bioreactor was 0.7 : 1 : 2. The liquid from the bioreactor contained lactic acid 1.65~1.98g/l, total acid 2.624~3.032g/l and alcohol 0.700~1.320%. The end product by the mixed fermentation was a new type of nonalcoholic beverage with natural light yellow colour, pure white foam and special taste. It not only contained many essential amino acid and vitamins, but also healthy lactic acid, acetic acid and gluconate

**Key words** Immobilization, Mixed culture fermentation, *Saccharomyces mellis*, *Acetobacter suboxydans*, *Lactobacillus acidophilus*, Nonalcoholic beverage