

双酶水解酿制柑桔果醋的研究

周帼萍¹, 汪芳安², 王秀艳¹, 朱 薇¹

(1. 武汉工业学院生物与化学工程系 湖北 武汉 430023; 2. 武汉工业学院食品科学与工程系 湖北 武汉 430023)

摘要: 利用果胶酶、纤维素酶双酶水解桔汁、囊衣和桔络混合料, 并用大米糖浆进行补糖发酵。经过酒精发酵、醋酸发酵等主要工艺, 酿制的柑桔果醋具有柑桔的天然色泽, 酸味柔和, 具有怡人的果香, 无苦味。发酵周期大约 5d, 酸度达 4.32g/100ml。

关键词: 柑桔; 副产品; 双酶水解法; 果醋

Study on Fermented Citrus Fruit Vinegar

ZHOU Guo-ping¹, WANG Fang-an², WANG Xi-u-yan¹, ZHU Wei¹

(1. Department of Biological and Chemical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;

2. Department of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: In the studies, pectin enzyme and fibred enzyme were used to hydrolysis the mixture of orange pulp and dregs. Through alcohol and acetic acid fermentation with the supplement of rice syrup, citrus fruit vinegar of 4.32g/100ml acidity was made with natural colors, soft sourness, good aroma and none bitterness of citrus after 5 days' fermentation period.

Key words: orange; byproduct; hydrolysis by two enzymes; fruit vinegar

中图分类号: 0814.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)01-0215-04

我国柑桔产量占世界总产量比重的 11.79% (约占世界总产量的九分之一), 仅次于巴西和美国。近 20 年来, 我国柑桔年产量以 16% 的速度递增, 但是我国柑桔加工量却并未随之增长。目前国内生产的柑桔中 95% 作为鲜果食用, 加工比例仅占 5%, 远远低于 1/3 的世界总体

水平。2000 年我国柑桔加工产品中竟有 93.6% 仍然为简单加工品——糖水桔瓣罐头。加工转化能力之低, 造成了极大的资源浪费, 严重的阻碍了农村经济的发展, 给果农造成了很大的损失。柑桔一丰收就有卖桔难的问题产生, 大量果实被扔掉或烂在果园里, 给农民平添了

收稿日期: 2005-11-15

作者简介: 周帼萍 (1971-), 女, 讲师, 博士研究生, 研究方向为微生物发酵工程。

标初步认定该菌是芽孢杆菌属一种, 目前已报道产海藻糖合成酶的菌株有日本林原公司的节杆菌 Q36 (*Arthrobacter* Q36), Ni shimoto 等发现的脂肪杆菌 (*Pimelobacter* sp. R48), 国内报道过恶臭假单胞杆菌 H76 等, 本文筛选得到 SH-110 为芽孢杆菌属, 在国内尚未见正式文献报道。该菌株不但丰富了产海藻糖合酶的菌种, 而且产海藻糖合酶具有较高的转化率。另外, 芽孢杆菌本身因为有芽孢存在对热, 干燥等不良因子具有较高的抗性, 且培养条件要比其他产海藻糖合酶菌株温和, 容易培养和管理, 对其优化发酵条件后, 可以取代传统的利用嗜热菌产海藻糖合酶工艺流程, 所以该 SH-110 菌株具有较大的工业应用潜力。

参考文献:

- [1] 陈红漫, 祝令香, 董志扬. 酿酒酵母海藻糖-6-磷酸合成酶基因克隆及植物表达载体的构建[J]. 微生物学报, 2001, 41(1): 54-58.
- [2] 张红缨, 等. 海藻糖生物合成和相关的酶学特性[J]. 微生物学通报, 1998, 25(4): 236-238.
- [3] 马放, 任南琪. 污染控制微生物学实验[M]. 哈尔滨工业大学出版社, 2002.
- [4] 毛忠贵, 朱利丹, 等. 用薄层层析法分析海藻糖[J]. 无锡轻工业大学学报, 1997, 16(4): 42-44.
- [5] 王蕾, 等. DNS法定量测定海藻糖研究[J]. 食品科技, 2004, 16(2): 82-84.
- [6] 刘传斌, 等. 海藻糖的分析方法[J]. 食品与发酵工业, 1998, 24(5): 40-42.
- [7] 荣绍丰, 等. 一株转化淀粉或麦芽糖寡糖生成海藻糖的菌株 D-97 的鉴定[J]. 微生物学通报, 2003, 30(2): 57-60.
- [8] NISHIMOTO T, NAKANO M, NAKADA T, et al. Purification and properties of a novel enzyme, trehalose synthase from *Pimelobacter* sp. R48[J]. Biosci Biotech Biochem, 1996, 60(4): 640-644.

许多烦恼。同样是发展中国家的巴西,柑桔产量大于我国,但有三大柑桔加工企业,并控制着70%的国际市场,从来不发愁卖果难。仔细分析一下不难看出,目前我国卖桔难,主要是结构性问题:即初级产品、低档次产品市场供应偏多;而加工产品、高档次产品、高科技含量产品偏少。所以水果加工已成为目前国内急需解决的一个大问题。将柑桔制成果醋,在果品产业化生产、提高经济效益上具有积极的意义^[1-4]。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

永春芦柑 市售;大米 市售;硅藻土 市售。

远天34果胶酶 广州天河酶制剂厂;PC+3复合果胶酶 上海思米酵素酶制剂厂;纤维素酶 上海华事达实业有限公司;夏盛牌植物精提酶 宁夏夏盛实业集团有限公司。

乙醇、冰醋酸、氢氧化钠、硫酸铜、甲醛、酵母膏、葡萄糖、碳酸钙、酒石酸钾钠、亚铁氰化钾、氯化镁等,以上试剂均为化学纯。

安琪耐高温活性干酵母 湖北安琪酵母股份有限公司;醋酸菌 沪酿101;黑曲霉 *Asp. niger-1* 室藏。

1.2 仪器设备

电热恒温培养箱;空气恒温摇床;单人单面净化工作台;电热手提压力蒸汽消毒器;生化培养箱;电热恒温鼓风干燥箱;循环水式真空泵;普通光学显微镜,恒温水浴锅,电子分析天平,普通家用榨汁机等。

1.3 培养基

醋酸菌的保藏、扩大培养基^[5]。

1.4 测定方法

1.4.1 总酸

按GB/T12456-90食品中总酸的测定方法(以醋酸计)。

1.4.2 还原糖

菲林试剂滴定法(以葡萄糖计)。

1.4.3 总糖

酸水解法(以蔗糖计)。

1.4.4 酒精度

蒸馏法。

1.4.5 氨基态氮

按GB/T12143.2-89甲醛滴定法。

1.4.6 原料水解率

原料水解率=(水解前干物料质量-水解后干物料质量)/水解前干物料质量×100%

1.5 方法^[6-7]

1.5.1 柑桔果醋制作工艺流程

大米 浸泡 粉碎 液化 糖化 大米糖浆

柑桔 清洗 去皮 榨汁 调浆 水解糖化 调整糖度 巴氏灭菌
冷却 酒精发酵 醋酸发酵 过滤 调配 灭菌 成品

干酵母 酵母活化 三角瓶扩大培养 斜面活化 试管保存菌种

1.5.2 大米糖浆的制备

方法同参考文献[5]。

1.5.3 原料选择与处理

选择成熟没有腐烂变质的桔子,用清水冲洗数次,热烫,剥皮去籽(由于柑桔类果实的果皮、囊衣、果核中含有苦味物质,但果瓢及桔络具有较高的营养与药用价值,且可以提高原料利用率,因此选择只去果皮及果核),榨汁,并用4层纱布过滤,沥干未搅碎的桔渣,将果汁与果渣及水按1:1:1的比例混合,制成水解液。

1.5.4 水解酶的选择方法

取部分柑桔果渣做水解用酶制剂选择的实验。将果渣用清水冲洗数次,过滤后,部分测其干重,部分按其干重加6倍的水,并加入1‰(V/V)各种水解酶,于最适温度下保温水解8h,水解后过滤,反复冲洗残渣,于105℃烘干,称其质量,测定水解率,选择水解率最高者为本次实验水解条件。由于黑曲霉是以麸曲干粉的形式加入到水解原料中,其本身也要进行水解,故需做空白实验以测定其本身水解前后的减少量。

1.5.5 发酵液的制备

添加水解液总量的1‰果胶酶及1‰纤维素酶,pH自然,于45℃水浴锅中将1.5.3所制得的水解液保温水解8~10h,中间每隔15min搅拌一次,以便水解完全,其间每隔一定时间测定还原糖一次,直至糖度不再上升为止。待水解完全后以1:1比例加入大米糖浆(9.4°Bx),调整糖度^[3],并分装于500ml三角瓶中于80℃巴氏灭菌10min后制成酒精发酵的发酵液。

1.5.6 酒精发酵

10%柑桔原料发酵液,2%蔗糖,37℃加入1%的安琪活性干酵母复水20min后于32℃活化1~2h,其间每隔15min搅拌一次,镜检活菌数达10⁸个/ml以上。将已经活化好的酒母按10%的量^[3]加入发酵醪液中,30℃,pH自然,敞口发酵1h,并经常搅拌,待有大量气泡产生后进行厌氧发酵。

1.5.7 醋酸发酵

将斜面菌种转入菌种扩大培养基上扩大培养24h后,按发酵液总量的10%加入到酒醪中。装液量50ml/250ml,四层纱布封口,32℃220r/min振荡培养,直至酸度不再上升或略有下降即停止。

1.5.8 过滤与灭菌^[8]

用硅藻土做过滤介质对醋醅进行过滤澄清。将硅藻土加入果醋中，搅拌后静置 1~2 h，真空过滤，待硅藻土形成 0.5~1cm 厚的滤层，而且滤液无明显浑浊后，收集滤液。过滤后的醋液进行巴氏灭菌。

2 结果与分析

2.1 水解用酶制剂选择结果

按 1.5.4 的方法测定水解酶的水解率，从而选择最佳水解用酶制剂。由表 1 可看出，用夏盛植物提取酶与远天 34 复合果胶酶双酶水解，水解率可达 65.71%，是最佳水解条件。

表 1 不同水解酶水解率结果表
Table 1 Hydrolysis rate of different enzymes

| | 水解前质量(g) | 水解后质量(g) | 水解率(%) |
|---------------------|----------|----------|--------|
| 华事达纤维素酶 | 3.5 | 2.95 | 14.29 |
| 夏盛植物提取酶 | 3.5 | 2.09 | 38.86 |
| PC-3 复合果胶酶 | 3.5 | 1.66 | 51.14 |
| 远天 34 复合果胶酶 | 3.5 | 1.47 | 56.57 |
| 黑曲霉 | 3.5 | 2.56 | 26.86 |
| 夏盛植物提取酶+远天 34 复合果胶酶 | 3.5 | 1.2 | 65.71 |
| 夏盛植物提取酶+黑曲霉 | 3.5 | 1.84 | 46 |
| 远天 34 复合果胶酶+黑曲霉 | 3.5 | 1.39 | 58.86 |

注：凡是有黑曲霉的均要扣除空白。

2.2 水解曲线图的绘制

用果胶酶与纤维素酶水解按 1.5.5 的方法制备的水解液，得到还原糖度随时间上升的曲线见图 1。水解在 10h 前完成，还原糖度可达 4.8g/100ml，与大米糖浆混合调整糖度后，可将其还原糖度调整到 8.7g/100ml。

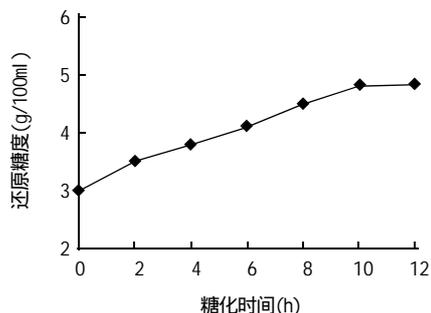


图 1 水解还原糖随时间变化曲线图
Fig.1 Curve of reducing sugar during hydrolysis

2.3 酒精发酵曲线图的绘制

酒精发酵历经 30h，酒精度达 6.2°(V/V)，发酵伊始即开始剧烈发酵，产生大量气泡，24 h 后酒味浓郁，CO₂ 产生减少，瓶底有大量酵母沉淀，上液澄清。30 h 后酒精度不再上升，发酵完成，残余还原糖

0.5g/100ml。酒精发酵过程中还原糖及酒精度随时间的变化曲线见图 2。

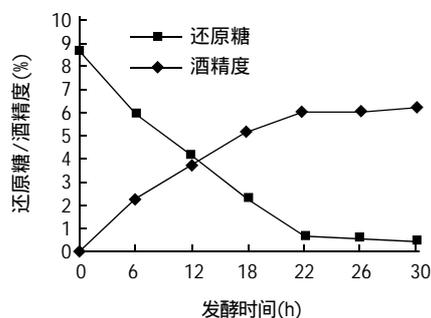


图 2 酒精发酵曲线图
Fig.2 Curve of alcohol fermentation

2.4 醋酸发酵工艺曲线图的绘制

将酒精发酵后的酒醪接入醋酸菌进行醋酸发酵，发酵时间 85h 左右，酸度达 4.32g/100ml，最终酒精度 0.2°(V/V)，醋酸转化率：61.45%。醋酸发酵就曲线图见图 3。

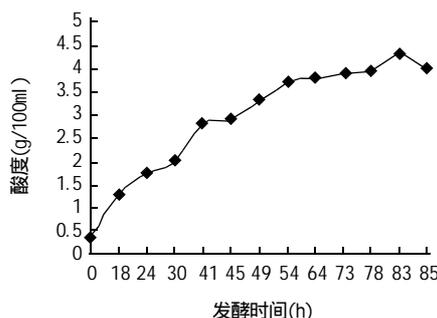


图 3 醋酸发酵曲线图
Fig.3 Curve of acetic acid fermentation

2.5 产品的性能指标

2.5.1 感官指标

色泽呈淡黄色，澄清透明，具有柑桔特有的清香，酸味浓郁，醇香不涩。

2.5.2 理化指标

总酸(以醋酸计)4.32g/100ml，酒精 0.2°(V/V)，还原糖(以葡萄糖计)0.45g/100ml，氨基态氮 15mg/100ml。

3 讨论

3.1 原料水解条件

用夏盛植物提取酶与远天 34 复合果胶酶双酶水解，成本偏高，但由于分解了水果中的果胶、纤维素等大分子物质，所以有利于果醋成品的澄清及果渣的综合利用，提高了果醋的营养与药用价值。在以后的研究中可重点研究寻找一种成本低廉且水解率较高的其它水解方法。

3.2 对如何抑制杂菌污染的讨论

柑桔等水果表面含有大量的膜醭酵母,这种酵母为好氧菌,会在发酵液表面形成一层白膜,消耗糖分和酒精且会影响醋的风味。调整 $S O_2$ 也得不到很好的控制,为防止这种菌的污染,去皮前柑桔表面要经过清洗、热烫,糖化后要进行巴氏灭菌,发酵过程中要注意卫生,尽量避免发酵液与桔皮的接触,发酵灌尽量装满,发酵一经结束立即转入醋酸发酵阶段,这样便能很好的进行控制了。又由于柑桔果醋酒精发酵阶段速度很快,也能很好的抑制膜醭酵母的生长。

3.3 有效利用柑桔渣料

桔子汁中营养丰富,药用价值较高,桔瓢和桔络中也含有一定量的柠檬苦素和VP。柠檬苦素是柑桔中的苦味成分,近年发现柠檬苦素具有抑制肿瘤的功能,VP有通络、化痰、消滞等功效。本实验将柑桔榨汁后桔汁和桔渣按1:1的比例混合进行实验,目的在于食品工业上可将不易利用的桔渣用来作为发酵原料,变废为宝,有利于提高原料利用率,节约成本,并可增强果醋的营养与药用价值。

3.4 酒精发酵温度选择

发酵温度高,则速度快,高级醇、醛类等副产物增加而使果醋失去特有的果味和醇厚味。而温度太低,则速度慢,影响效益。柑桔果醋研制过程中酒精发酵速度过快,影响风味物质的产生。一方面可适当降低酒母的接种量,减少酒母增殖时间;另一方面可调整酒精发酵温度。本实验选取发酵温度为25。

3.5 如何增进果醋风味

为了增强果醋酸味的柔和感,建议可在酒精厌氧发酵的同时进行乳酸发酵,这样可较好提高果醋中不挥发酸的含量,增进果醋的风味。

3.6 如何提高醋酸转化率

醋酸发酵其发酵时间偏长,转化率偏低,主要由于醋酸菌没有经过进一步的驯化,可从已发酵好的醋醅中筛选优良菌株,并多次进行驯化,以提高醋酸菌的性能,提高醋酸转化率。

3.7 发酵对柑桔苦味物质的影响

柑桔中有一定的苦味物质存在,主要为种子、桔瓢、桔络等中的柠檬苦素类似物以及柚皮苷。柠檬苦素在柑桔成熟过程中,一部分转化为不苦的柠檬酸而减轻了苦味,但一经榨汁,在酸性环境下,柠檬酸又重新转

化为柠檬苦素,造成苦味增强。在发酵果汁中含有较高柠檬苦素,必须降低其值,才能够让人们接受。柚皮苷是三羟基黄酮类化合物,也是柑桔中的主要致苦因子,通过降解可形成略有涩味但无苦味的普鲁宁。微生物产生的酶可以脱除柠檬苦素,醋酸菌对柑桔柠檬苦的脱苦效果就较为显著,据报道,AS1.41的脱苦率可达41.5%,完全可将柑桔柠檬苦素降低到人们可接受的范围之内^[9-11]。鉴于醋酸菌具有较好的脱苦效果,并且酿成的成品醋也基本上无苦味存在,故无需另外进行脱苦处理。

4 结 论

用夏盛植物提取酶与远天34复合果胶酶,双酶水解原料其水解率最高,可达65.71%。原料经过水解,还原糖可达4.8g/100ml,用大米糖化液调整糖度达8.7g/100ml,酒精发酵后酒精度达6.2%,残糖0.5g/100ml;经过醋酸发酵酸度可上升到4.32g/100ml,醋酸转化率61.45%,酒精发酵时间30h,醋酸发酵时间83h。

酿造出的柑桔果醋具有柑桔的天然色泽,酸味柔和,具有怡人果香,无柑桔特有苦感。酿制的柑桔果醋可做调味醋食用,也可直接饮用或配以纯净水、果汁等饮用。若经过调配可直接作为饮料饮用。

参考文献:

- [1] 褚维元. 柑桔保健果醋的研制[J]. 食品工业科技, 2002(8): 53-54.
- [2] 方婷, 陈尾云, 等. 芦柑新型产品的加工[J]. 杭州食品科技, 2004(3): 14-17.
- [3] 李新社. 桔子果醋的研制[J]. 广州食品工业科技, 2003(3): 52-54.
- [4] 颜文凤. 芦柑果醋饮料的研制[J]. 江苏调味副食品, 2003, 20(5): 14-16.
- [5] 周幅萍, 汪芳安, 等. 醋酸菌筛选培养基的优化和优良醋酸菌分离的研究[J]. 中国酿造, 2004(6): 18-19.
- [6] 周幅萍, 汪芳安, 等. 木瓜醋的研制[J]. 中国酿造, 2005(3): 56-58.
- [7] 周幅萍, 汪芳安, 张佑红. 木瓜复合果醋的酿制[J]. 食品科学, 2005, 26(10): 274-276.
- [8] 郑宝东, 曾绍校, 等. 果醋过滤除菌工艺的研究及橙醋饮料的研制[J]. 食品与机械, 2003(4): 9-10.
- [9] 汪钊, 何晋浙, 等. 柑桔果醋加工中柠檬苦素的微生物酶降解研究[J]. 中国酿造, 2004(4): 21-23.
- [10] 刘虎成, 黄春健, 等. 柑桔汁微生物脱苦的研究[J]. 饮料工业, 2000(3): 17-20.
- [11] 罗自生, 张惟广, 等. 醋酸菌脱除柑桔柠檬苦素的研究[J]. 食品与机械, 2001(1): 18-21.