

粟米乳酸发酵饮料的研制

王禾 王金凤 黑龙江商学院食品工程系 哈尔滨 150076

刘海霞 黑龙江乳业集团总公司 哈尔滨 150086

摘要 通过一次回归正交实验确定了粟米乳酸发酵的最佳工艺条件为: 起始糖化醪浓度为 12%, 乳酸菌接种量为 2.5%, 37℃ 发酵 60h。并对糖化液发酵前后的营养成分进行了测试, 结果表明, 乳酸发酵可明显提高粟米的营养价值。

关键词 粟米 乳酸发酵 回归正交法

Abstract The optimum fermentation technological factors were studied on foxtail millet beverage by Orthogonal of Regression Design. The results were the starting sugar concentration 12%, fermented at 37℃ for 60h using 2.5% inoculum. We also compared the changes of nutritive compositions between fermented and nonfermented millet. The results showed that the nutritive value increased obviously by the lactic acid fermentation.

Key words Foxtail millet Lactic acid fermentation Orthogonal of regression design

植物性乳酸发酵饮料包括蛋白类乳酸发酵饮料、谷物及薯类乳酸发酵饮料、果蔬汁乳酸发酵饮料^[1]。谷物乳酸发酵饮料是近几年发展起来的新品种, 其酸甜可口、营养丰富, 除富含乳酸等有机酸外, 还含有糖类、十八种氨基酸、B 族维生素, 无机盐钙、磷、铁等营养成分, 提高了谷物的营养价值, 改善风味, 并可延长保存期。由于谷物自身丰富的营养加上乳酸发酵作用, 使其集营养与保健于一体, 具有广阔的开发、生产和推广前景, 是今后饮料工业的发展方向之一。

本文以粟米为原料, 采用一次回归正交实验设计方法^[2]建立数学模型。这种方法可以通过较少实验次数寻找出最佳工艺条件, 广泛适用于新产品的研究开发。为了更好地了解乳酸发酵饮料的营养价值, 本文还对发酵前后主要营养成分的变化进行了分析测试。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要原辅料

粟米: 市售, 无霉变。

高温液化酶: 酶活力 20000u/g, 无锡酶制剂厂。

糖化酶: 酶活力 50000u/g, 无锡酶制剂厂。

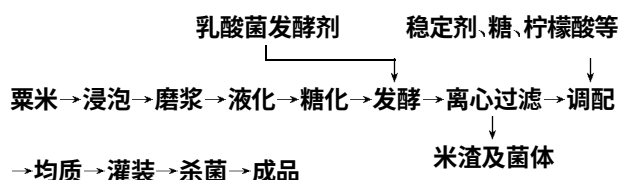
1.1.2 菌株

嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 两歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*)

乳明串珠菌 (*Leuconostoc lactics*)

1.2 实验方法

1.2.1 工艺流程



1.2.2 操作要点

1. 浸泡: 将粟米淘洗干净, 加水浸泡 4-8h, 至米粒松软。

2. 液化: 将粟米淀粉乳调整到 17 Be 按 10 u/g 淀粉加入高温液化酶, 100℃ 液化 30min, 冷却。

3. 糖化: 调整 pH 值至 4.5, 再按 10mg/g 淀粉加入糖化酶, 60℃ 保温 5h。

4. 发酵: 将糖化液调整到适宜的糖度, pH 值为 6.8。接种已经纯化、扩培好的乳酸菌发酵剂进行发酵。

5. 后发酵: 经过前发酵, 转入 4℃ 低温后发酵 6-8h。以促进发酵液的澄清, 并可改善饮料的风味。

6. 调配: 将发酵液经 3000r/min, 10min 离心。取上清液加入 14% 蔗糖提高甜度, 0.5% 柠檬酸改善酸味, 0.1% 耐酸性 CMC 及 0.05% 琼脂, 并加入原液两倍的无菌水。

7. 均质: 采用二次均质, 压力为 20Mpa, 温度为 60-70℃。

8. 杀菌: 灌装后饮料经 80℃ 杀菌 30 min。

2 结果与讨论

2.1 发酵工艺条件的研究

2.1.1 一次回归正交实验设计实验结果

在发酵工艺条件中, 主要因素为乳酸菌发酵剂的接种量、起始糖化醪糖度、发酵温度及发酵时间。取发酵温度为37℃, 采用二水平一次回归正交设计讨论其他三个因素对发酵液酸度和乳酸菌总数的影响。因为发酵液的酸度为主要评定指标, 以酸度的回归系数为依据, 通过快速登高法寻找各变量变化的最优区域, 然后在这个最优区域中确定最优工艺条件。实验安排及结果见表1。

由实验结果我们计算出总酸度及活菌总数的回归系数, 得到如下回归方程:

$$\begin{aligned} \text{总酸度 } y_1 &= 0.598 + 0.113x_1 + 0.0033x_2 + 0.157x_3 - 0.00875x_1x_2 \\ &\quad + 0.0583x_1x_3 + 0.00625x_2x_3 - 0.009x_1x_2x_3 \\ \text{活菌总数 } y_2 &= 8.188 + 0.115x_1 - 0.232x_2 - 0.301x_3 - 0.0258x_1x_2 \\ &\quad - 0.0423x_1x_3 + 0.0675x_2x_3 - 0.0315x_1x_2x_3 \end{aligned}$$

对上述回归方程进行 F 检验 (证明过程略)

$$: F_1 = 24.88 > F_{0.01}(3, 4); F_2 = 26.31 > F_{0.01}(3, 4)$$

结果表明, 由实验所得的回归方程均是高度显著的, 用它们可较好地反映各因素对各指标的影响。根据F检验, 我们省略方程中对结果影响不显著的项, 得到如下简化方程:

$$\text{总酸度 } y_1 = 0.598 + 0.113x_1 + 0.0033x_2 + 0.157x_3 + 0.0583x_1x_3$$

$$\text{活菌总数 } y_2 = 8.188 + 0.115x_1 - 0.232x_2 - 0.301x_3$$

由实验结果得出的各组分对结果影响的回归系数可知, 对于总酸度这项指标, 发酵时间的影响作用最大, 初始糖度次之, 接种量的影响最小。随着初始糖度增加、加大接种量及发酵时间的延长, 发酵液的总酸度不断增加; 对于活菌总数这项指标, 发酵时间的影响作用最大, 接种量次之, 初始糖度影响最小。发酵液的活菌总数随着初始糖度增加而增加, 在较少的接种量及发酵时间的条件下, 活菌总数较高。可见两

表 1 第一次回归正交设计实验计划及结果

研究因子	$x_1(\%)$ 起始糖化醪糖度			$x_2(\%)$ 接种量		$x_3(\text{h})$ 发酵时间			实验结果	
零水平(Z_{0j}):	7			2		48				
变动区间 Δ_j :	5			1		24				
上水平(+1):	12			3		72				
下水平(-1):	2			1		24				
因子的 编码符号	x_0	x_1	x_2	x_3	x_1x_2	x_1x_3	x_2x_3	$x_1x_2x_3$	总酸度 %	菌数 lgcfu/ml
试验 1.	1	1	1	1	1	1	1	1	0.948	7.851
2.	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	0.532	8.034
3.	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	0.904	8.066
4.	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	0.470	8.951
5.	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	0.641	7.592
6.	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	0.413	8.038
7.	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	0.526	8.036
8.	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	0.361	8.626
步长 $\Delta_j b_j$			0.565		0.033		0.157			
试验号 步长变化 B:			1.978		0.116		3.756		总酸度	
整数化:			2		0.1		4		菌数	
9	$Z_{0j}-2B$		3	1.8		40		0.616		7.698
10	$Z_{0j}-B$		5	1.9		44		0.698		8.104
11	$Z_{0j}-0B$		7	2.0		48		0.723		8.426
12	$Z_{0j}+B$		9	2.1		52		0.781		8.252
13	$Z_{0j}+2B$		11	2.2		56		0.825		8.531
14	$Z_{0j}+3B$		13	2.3		60		0.914		8.220
15	$Z_{0j}+4B$		15	2.4		64		0.968		7.959
16	$Z_{0j}+5B$		17	2.5		68		1.009		8.112

项指标都要求较高的起始糖化醪。较高的起始糖化醪糖度提高设备利用率、缩短生产周期。但从工艺角度出发,糖度高时,因固形物含量增大,乳酸菌生长旺盛,醪液升温快,使发酵醪液的残糖含量高,酸的得率相对降低。接种量和发酵时间对这两项指标的影响相反。乳酸菌的生长经过迟滞期、对数生长期、稳定期和衰亡期,加大接种量会加快菌体生长进入衰亡期。发酵时间越长,发酵液酸度越高,但乳酸菌总数减少。随机品尝认为滴定酸度在0.7%-0.8%左右时,发酵液风味柔和;大于0.9%时则过于刺激,为饮料调配增加了困难,适口性降低;低于0.5%时,原料利用率低。从第一次快速登高法的实验结果可以看出,13号实验的各项指标均较好,以此为依据进行第二次回归正交设计实验。

2.1.2 最佳工艺条件的确定

在第一次实验和快速登高法实验中,原料配比的划分还不够精细,实验结果还不够理想,为进一步在优化区域里寻找最佳配方,根据第一次快速登高法实验结果确定因子水平、变动区间,进行第二次实验。回归实验结果及快速登高法实验结果见表2。

由实验结果可以得出第二次回归正交实验的回归方程如下:

总酸度 $y_1=0.805+0.0835x_1+0.043x_2+0.103x_3-0.013x_1x_2+0.005x_1x_3+0.0025x_2x_3-0.004x_1x_2x_3$
活菌总数 $y_2=8.065+0.127x_1-0.27x_2-0.187x_3-0.0198x_1x_2-0.034x_1x_3+0.0115x_2x_3-0.0141x_1x_2x_3$

对上述回归方程进行 F 检验 (证明过程略):

$F_1=59.80 > F_{0.01}(3,4)$; $F_2=85.76 > F_{0.01}(3,4)$

表 2 第二次回归正交设计实验结果

研究因子		$x_1(\%)$		$x_2(\%)$		$x_3(h)$				实验结果	
		起始糖化醪糖度		接种量		发酵时间					
零水平(Z_{0j}):		11		2.2		56					
变动区间 Δ_j :		3		0.8		12					
上水平(+1):		14		3.0		68					
下水平(-1):		8		1.4		44					
因子的编码符号		x_0	x_1	x_2	x_3	x_1x_2	x_1x_3	x_2x_3	$x_1x_2x_3$	总酸度 %	菌数 lgcfu/ml
试验	1.	1	1	1	1	1	1	1	1	1.051	7.723
	2.	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	0.822	8.161
	3.	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	0.958	8.219
	4.	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	0.759	8.667
	5.	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	0.892	7.480
	6.	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	0.663	7.816
	7.	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	0.767	8.091
	8.	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	0.564	8.364
步长 $\Delta_j b_j$				0.251		0.034		0.236			
试验号 步长变化 B:				0.501		0.103		1.978		总酸度 %	菌数 lgcfu/ml
整数化:				0.5		0.1		2			
9	$Z_{0j}-4B$			9.0		1.8		48		0.662	8.003
10	$Z_{0j}-3B$			9.5		1.9		50		0.705	8.205
11	$Z_{0j}-2B$			10.0		2.0		52		0.724	8.142
12	$Z_{0j}-B$			10.5		2.1		54		0.763	8.320
13	$Z_{0j}-0B$			11.0		2.2		56		0.817	8.514
14	$Z_{0j}+B$			11.5		2.3		58		0.826	8.383
15	$Z_{0j}+2B$			12.0		2.4		60		0.842	8.825
16	$Z_{0j}+3B$			12.5		2.5		62		0.880	8.419
17	$Z_{0j}+4B$			13.0		2.6		64		0.912	7.948
18	$Z_{0j}+5B$			13.5		2.7		66		0.956	8.075

结果表明,第二次实验所得回归方程的显著性比第一次实验高得多,可以更好地接近实际情况。经过F检验,省略方程中对结果影响不显著的项,可得到如下简化方程:

$$\text{总酸度 } y_1 = 0.805 + 0.0835x_1 + 0.043x_2 + 0.103x_3$$

$$\text{活菌总数 } y_2 = 8.065 + 0.127x_1 - 0.27x_2 - 0.187x_3$$

各因素对酸度及活菌总数的影响与第一次实验结果相近。第二次登高法中的15号实验结果的各指标值均较高,这个实验点已经达到二次回归的最优区域,可作为最佳工艺条件。由于接种量采用2.5%时较易添加,对结果的影响也不大,因此采用一次回归所得最佳工艺条件为:起始发酵醪糖度为12%,接种量为2.5%,37℃发酵60h。

2.2 粟米糖化液乳酸发酵前后营养成分的变化

利用乳酸菌对粟米糖化液进行发酵,粟米糖化液和发酵原汁的营养成分对比见表3。

由表3中可见,粟米糖化液经过乳酸菌的发酵作用,总酸增加,而还原糖减少。这是由于乳酸菌利用糖化液中的还原糖作为碳源,并在体内转化为乳酸,从而降低了发酵液的pH值。

发酵后一些矿物元素及维生素都有不同程度的增加。由于乳酸菌的分解作用,使部分结合状态的Ca、Fe游离出来,同时大量乳酸所提供的酸性环境也促进了Ca、Fe的溶出。乳酸菌在代谢过程中也可合成部分维生素。据资料报道,双歧杆菌可合成VB₁、VB₂、VB₆、VB₁₂等^[3]。

乳酸发酵前后总氮量基本没有变化,必需氨基酸

的含量都有显著提高。乳酸菌所分泌的少量蛋白酶可分解糖化液中的蛋白质、多肽等物质,生成游离氨基酸,也可利用糖类中间代谢产物如α-酮戊二酸、延胡索酸等,经生化反应转变为相应的氨基酸^[4]。

2.3 粟米乳酸发酵饮料产品质量标准

2.3.1 感官指标

色泽为淡黄色,外观均匀一致,澄清透明,无沉淀,无杂质,色泽协调,口感甜酸爽口,具有清淡的米香味,无异味。

2.3.2 理化指标

总干物质: 16.65%; 总酸: 0.26%; 总糖: 15.13%

蛋白质 0.21 g/100ml 脂肪 0.0034 g/100ml

2.3.3 微生物指标

菌落总数 <10cfu/ml 大肠菌群 <3/100ml 致病菌未检出。

3 结论

3.1 以粟米为原料,采用二水平一次回归正交实验设计,确定粟米乳酸发酵的最佳工艺条件为:起始糖化醪糖度为12%,乳酸菌接种量为2.5%,37℃发酵60h。

3.2 经乳酸菌发酵后可提高原料的营养价值,Ca、Fe及VB₁、VB₂的含量明显增加,同时八种必需氨基酸的含量也显著增加。

3.3 发酵上清液经调配后,可制成风味独特、酸甜可口、营养丰富的粟米乳酸发酵饮料。

表3 糖化液和发酵原汁的营养成分分析

项目	糖化液	发酵原汁	项目 (mg/100ml)	糖化液	发酵原汁
PH值	6.8	3.8	亮氨酸	10.30	74.16
总酸 (%)	—	0.86	异亮氨酸	2.20	35.20
还原糖 (%)	7.26	2.85	苯丙氨酸	5.03	42.76
总氮量 (g/100ml)	1.76	1.82	缬氨酸	3.81	13.49
钙 (mg/l)	38.30	81.20	蛋氨酸	1.65	32.67
铁 (mg/l)	9.15	16.38	赖氨酸	1.35	43.20
VB ₁ (mg/l)	0.44	1.26	苏氨酸	2.92	15.24
VB ₂ (mg/l)	0.17	1.09	色氨酸	1.26	27.72

参考文献

- 1 杨洁彬等. 乳酸菌—生物学基础及应用. 北京 中国轻工业出版社, 1996, 246-292.
- 2 [美]Douglas C.M. 著. 汪仁官等译. 实验设计与分析. 中国

统计出版社, 1998, 163-208.

- 3 Mitsuoka, T. The Lactic Acid Bacteria. London and New York, Elsevier Applied Science Press Inc., 1992, 84-115.
- 4 天津轻工学院、无锡轻工学院合编. 食品生物化学, 1998, 236-280.