

①复盆子酮②果胶酯③乙酸乙酯④丙酸乙酯⑤丁酸乙酯⑥2-甲基丙酸乙酯⑦正丁醛⑧丁二酮

图3 加热(85°C 5min)原汁色谱图

参考文献

- 1 Hernandez, E. et al. AIChE National Meeting. 1984, San Francisco, CA.
- 2 Yu, Z. R. et al. J. Food sci. 1986, 51.
- 3 Ernesto, H. et al. J. Agric. Food chem. 1992, 40.
- 4 Nisperos, Carriedo, et al. J. Agric. Food chem. 1990, 38.
- 5 杨斌. 膜科学与技术. 1995, 2(24).
- 6 Ahmed, A. E. R.; Zabavitch, J. M. J. Food Biochem. 1977, 1.
- 7 Ting, S. V. et al. Trans. citrus Zng. conf. 1991, 37.
- 8 Chou, F. thesis, univ. OF Maryland. Couag purk. M. D. 1989.
- 9 Shaw, P. E. et al. J. Food sci. 1991, 56.
- 10 杨斌. 西北大学硕士论文, 1991.
- 11 亢茂德等. 化学工程. 1984, 3.
- 12 Vitali, A. Ai et al. J. Food sci. 1984, 49.

固定化多菌种发酵海带饮料的研究

王克明 王雪筠 烟台大学 生物化学系 264005

摘要 研究了以海带浸提汁液为主料,采用固定化葡萄酒酵母、嗜酸乳酸菌、弱氧化醋酸菌混合发酵海带饮料的制汁及发酵条件。研究结果表明:海带汁液的制取为以0.3%盐酸溶液为浸提介质于105℃下浸提8 h,发酵温度20℃,发酵周期为5~6天,3种固定化凝胶粒填装体积比例为葡萄酒酵母:嗜酸乳酸菌:弱氧化醋酸菌=0.5:0.8:2。成品淡黄色,风格独特,口味纯正,含有丰富的氨基酸、维生素、各种微量元素及乳酸、醋酸、葡萄糖酸等有机酸,是一种理想的新型保健饮料。

关键词 固定化多菌种 海带 发酵饮料

前言

海带是一种褐藻,其藻体中除含有大量碳水化合物,D-葡萄糖及海藻多糖外,藻酸和其它各种多糖类,以及各种维生素、蛋白质、氨基酸、各种微量元素的含量也很高,使得海带不仅具有独特的风味,而且营养、保健价值很高^[1]。在我国虽然海藻资源十分丰富但人们食用量仅

占其产量极少部分。所以研制新型海藻食品是开发海洋,延伸海产品价值的重要课题。

采用多菌种混合发酵海带生产饮料是利用微生物共生原理,代谢产物的协调而制成营养丰富、风味独特的发酵海藻饮料。

同游离细胞相比,固定化细胞可进行高密度增殖培养,提高单位反应器体积的生物转化速率,延长细胞寿命,增加稳定性,有利于连续

化生产而且便于产物的分离。由于上述的优越性固定化技术已广泛应用于酒精、果酒、啤酒生产方面的研究^[3],但应用固定化多菌种共发酵海带饮料,国内外尚未见报道。本文是有关以海带浸提汁液为主料,采用固定化葡萄酒酵母、嗜酸乳酸菌、弱氧化醋酸菌共发酵制作饮料的研究。

1 材料和方法

1.1 菌种

葡萄酒酵母(*Saccharomyces ellipsoideus*)、嗜酸乳酸菌(*Lactobacillus acidophilus*)、弱氧化醋酸菌(*Acetobacter suboxydans*)均由烟台大学微生物实验室提供。

1.2 材料

海藻酸钠:上海化学试剂采购站分装
海带:由烟台市水产研究所提供
盐酸:分析纯 氯化钙:分析纯
柠檬酸:食用级 酒石酸:分析纯

1.3 培养基(略)

- 1.3.1 酵母试管培养基
- 1.3.2 乳酸菌试管培养基
- 1.3.3 醋酸菌试管培养基
- 1.3.4 酵母菌增殖培养基
- 1.3.5 乳酸菌增殖培养基
- 1.3.6 醋酸菌增殖培养基

1.4 分析测定方法

- 1.4.1 乙醇的测定:快速比色法^[4]和蒸馏法测定^[5]。
- 1.4.2 总糖,还原糖测定:采用改进的 Lane-Eynone^[6]法测定。
- 1.4.3 总酸含量测定:采用酸碱中和法测定。
- 1.4.4 酵母浓度测定:采用血球计数板测定。^[7]
- 1.4.5 发酵液中固定化凝胶珠总体积(Vgel)测定:采用排液法。

1.5 固定化方法

将培养至对数期的酵母菌、乳酸菌、醋酸菌,经离心、洗涤后,用生理盐水调成乳状,与一定温度的海藻酸钠混匀,滴入不断搅拌的 5% 的 CaCl_2 溶液中。成型的凝胶珠继续固定一定

时间,倾去多余的 CaCl_2 溶液,用生理盐水洗涤数次后转入增殖培养基中增殖培养。^[8]

1.6 海带汁液制取实验

将经挑选洗净的海带烘干,磨成粉泡发后,分别以清水和 0.3%、0.5%、0.7%、1.2% 的柠檬酸溶液、酒石酸溶液、盐酸溶液在 75℃、85℃、95℃、105℃ 的温度条件下加热浸提 2、4、6、8 h,从而研究浸提介质及其浓度、浸提处理温度及浸提时间对海带有效成分浸提率的影响^[8]。筛选出理想的海带汁液的制取方法。

1.7 发酵条件试验

1.7.1 3 种固定化菌株的凝胶粒体积比对发酵影响实验

分别以固定化酵母凝胶粒体积:固定化乳酸菌凝胶粒体积:固定化醋酸菌凝胶粒体积为 1:1:1;1:1:2;0.5:0.8:2 的比例进行发酵试验,从而考察各种固定化菌凝胶粒体积比对发酵的影响。

1.7.2 温度对发酵的影响

将 3 种固定化菌凝胶粒以 0.5:0.8:2 的比例混合,分别在 35℃、32℃、30℃、25℃、20℃ 条件下发酵海带汁液,研究发酵温度对发酵液中乙醇及成品风味的影响,从而确定适宜的发酵温度。

2 结果与讨论

2.1 海带汁液的浸提

采用正交试验法,选用 $2_{16}(4^5)$ 正交表安排实验,考察的因素、水平见表 1,实验设计方案见表 2。

表 1 海带有效成份浸提试验条件

水平	因 素			
	A (h)	B	C	D (℃)
		加热时间	浸提介质	浸提介质
1	2	清水	0.3	75
2	4	酒石酸溶液	0.6	85
3	6	柠檬酸溶液	0.9	95
4	8	盐酸溶液	1.2	105

在海带汁液制取过程中,将清洗干净的海带烘干后磨成粉,称取 5 g 加水泡发,泡发量约

为10倍。沥干后按表2安排的实验条件进行海带有效成分浸提。浸提物经2000r/min离心,收集上清液,海带渣研磨成浆加入2倍水进行第二次浸提,离心后收集上清液,合并两次浸提清液放入烘箱中恒温烘干,所得残留物减去所添加酸量后计算浸提率。

表2 海带有效成分浸提率正交试验结果与分析

试验序号	列 号				有效成分浸提率(%)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	9.9
2	1	2	2	2	23.6
3	3	3	3	3	22.7
4	4	4	4	4	41.6
5	2	1	2	3	12.4
6	2	2	1	4	33.6
7	2	3	4	1	18.6
8	2	4	3	2	29.0
9	3	1	3	4	11.7
10	3	2	4	3	25.0
11	3	3	1	2	32.1
12	3	4	2	1	26.0
13	4	1	4	2	18.7
14	4	2	3	1	18.7
15	4	3	2	4	31.5
16	4	4	1	3	40.3
K ₁	97.5	52.7	115.9	73.2	
K ₂	93.5	100.9	93.5	103.4	
K ₃	94.5	104.9	82.1	100.4	T = 395.5
K ₄	109.2	136.9	103.9	118.4	
K ₁	24.4	13.2	29	18.3	
K ₂	23.4	25.2	23.3	25.8	
K ₃	23.7	26.2	20.5	25.1	
K ₄	27.3	34.2	26	29.6	
R	3.9	21	8.5	11.3	

表3 3种固定化菌凝胶粒不同体积比例混合发酵结果

序号	3种菌凝胶粒体积比例	固定化凝胶粒与发酵液比例	残糖(%)	总酸(%)	酒精(%)	发酵天数	发酵温度(℃)
1	1:1:1	20%	4	0.43	1.85	5	20
2	0.8:1:2	20%	4.5	0.57	1.15	5	20
3	0.5:0.8:2	20%	5	0.61	0.96	5	20

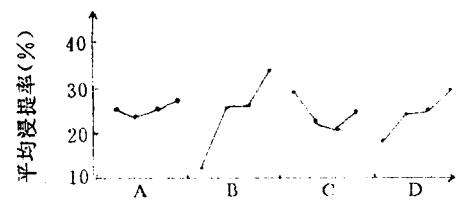


图1 海带有效成分提取率与四因素关系图

从表2及图1可以看出,影响海带有效成分浸提的主要因素次序是:B、D、C、A,采用清水直接浸提,浸取率较低,添加少量的酸性物质,可大幅度提高浸提率。在所使用的三种酸溶液中,以盐酸的效果最佳。另外,随着温度的升高,浸提率上升。由直观分析,得出浸提海带有效成分影响因素的最佳组合为B₄D₄C₁A₁。

2.2 发酵结果

2.2.1 三种固定化菌凝胶粒体积比对发酵的影响

固定化凝胶粒以20%(V/V)的比例接入发酵液中。固定化葡萄酒酵母凝胶粒与固定化乳酸菌凝胶粒及固定化醋酸菌凝胶粒三者以不同体积比例混合发酵对发酵液各成分影响结果见表3。

由表3可看出,3种固定化菌以不同比例的凝胶粒体积混合发酵,对发酵液中各种物质的协调有很大影响。降低固定化酵母凝胶粒的体积比例,引起总酸含量的上升,而酒精含量降低,由此制成的饮料口味更好。

在表3所列出的3组试验中,以第3组为最佳,即固定化葡萄酒酵母凝胶粒体积:固定化乳酸菌凝胶粒体积:固定化醋酸菌凝胶粒体积=0.5:0.8:2,固定化菌凝胶粒总填装体积比为20%,发酵温度为20℃,发酵时间为5~6天。

按此条件重复进行 6 批发酵试验，其结果如表 4 所示。

表 4 6 次重复发酵试验结果 (%)

试验序号	残糖	总酸	酒精
1	4.6	0.57	0.94
2	4.4	0.60	1.02
3	4.7	0.56	0.98
4	4.6	0.56	0.96
5	4.3	0.62	1.02
6	4.4	0.60	1.02

由表 4 可以看出，3 种菌的固定化凝胶粒按一定体积比例混合，经 6 次重复使用发酵试验，发酵液中残糖、总酸、酒精含量波动不大。说明采用固定化多菌种混合发酵技术可使各种微生物之间的比例关系基本保持初始状态，从而使发酵液中各种物质成分协调状态相对稳定，保证了连续生产中成品质量及风味口味的稳定。

2.2.2 温度对发酵的影响

不同温度条件下固定化多菌种混合发酵的结果见表 5。

表 5 不同温度条件下固定化多菌种混合发酵结果

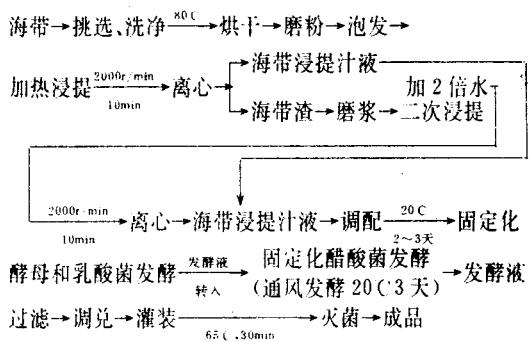
发酵温度(℃)	残糖(%)	总酸(%)	酒精(%)	发酵天数
35	2.8	0.68	2.21	3
32	2.9	0.64	2.15	3.5
30	3.5	0.62	1.91	4
25	4.5	0.57	1.87	5
20	5.5	0.61	0.92	6

由表 5 可知，高温条件下酒精含量、总酸含量上升快，但成品风味口味差。通过分析发酵温度、发酵时间与成品风味关系发现，温度低些而发酵时间长些，对提高风味有好处；高温发酵可缩短发酵时间，但成品风味差，如实验中 35℃ 条件下发酵的发酵液带有刺舌刺喉感，可能是发酵中形成的乙醇在较高温度下易被氧化成醛类物质所致。在 20℃ 下，发酵 5~6 天的成品风味很好。由此说明海带汁液的固

定化多菌种发酵应尽可能采用低温稍长时间。

4 结论

4.1 工艺流程



4.2 最大程度地浸提海带中的有效成分，是提高产品质量的重要环节。实验证明以 0.3% 的盐酸溶液在 105℃ 的温度下浸提 2h 效果最佳。

4.3 3 种菌的固定化凝胶粒体积比例为固定化葡萄酒酵母凝胶粒体积：固定化嗜酸乳酸菌凝胶粒体积：固定化醋酸菌凝胶粒体积 = 0.5 : 0.8 : 2，凝胶粒总填装体积为发酵液的 20% (V/V)，发酵温度为 20℃，发酵周期为 5~6 天，其成品成分协调，风味口味最佳。

4.4 固定化多菌种混合发酵海带饮料，发酵速率快，抗污染能力强，一次制作可重复多次使用，并且各混合菌配比在重复使用过程中基本维持不变使连续生产中成品风味口味稳定，采用固定化技术可以克服游离细胞多菌种混合发酵中频繁制备菌种及各混合菌种配比不易控制，失去平衡造成产品质量不稳定。

参考文献

- Seibin and Teruko Arasaki. Vegetables from the Sea. Japan publications Inc, Tokyo, 1983.
- 中国食品工业发展前景. 农业出版社, 1991.
- 庞宋文. 食品科学. 1987, (7): 6~15.
- 娄纯菊. 微生物学通报. 1980, 11(5): 217~218.
- 天津轻工学院等. 工业发酵分析. 轻工业出版社.
- 钱存柔等. 微生物学实验. 北京大学出版社, 1985.
- 李祥麟等. 生物工程学报. 1991, 7(3): 263~271.
- 黄平等. 酿酒科技. 1992, (2): 84~85.