

液态深层发酵型木瓜果醋的发酵生产研究

周 杨¹, 陈 伟², 龚加顺^{1,*}, 董文明¹, 肖 茜¹, 胡小静¹

(1. 云南农业大学食品科技学院, 云南 昆明 650201; 2. 宁蒗女儿珍生物工程有限公司, 云南 宁蒗 674307)

摘 要: 本研究以云南药木瓜为原料, 沪酿 1.41 醋酸菌为菌种, 液态深层发酵酿制木瓜果醋。研究分析了温度、醋酸菌接种量、初始酒度、初始酸度、通风量对产酸发酵的影响, 确定了木瓜果醋酿制的最佳工艺参数为温度 35℃、接种量 11%(V/V)、初始酒度 4.7%(V/V)、初始酸度 1.8g/100ml(以醋酸计)、通风量 200r/min(以摇床转速计), 最终酸度达到 4.96g/100ml, 发酵率为 67.23%。在最佳工艺条件下发酵, 醋酸菌在发酵第 6d 达到对数生长期。酿制出来的木瓜果醋颜色金黄、澄清透亮, 醋味浓郁, 同时具有木瓜的特殊清香味。

关键词: 药木瓜; 果酒; 醋酸菌; 澄清化处理

Study on Liquid State Deep Fermentation Production of *Chaenomeles lagenaria* Koidz Fruit Vinegar

ZHOU Yang¹, CHEN Wei², GONG Jia-shun^{1,*}, DONG Wen-ming¹, XIAO Qian¹, HU Xiao-jing¹

(1. Faculty of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

2. Ninglang Nuerzhen Biotechnology Co. Ltd., Ninglang 674307, China)

Abstract: *Chaenomeles lagenaria* Koidz fruit vinegar was produced in this study using *Chaenomeles lagenaria* Koidz as raw material and AS 1.41 acetobacter as strain, and factors affecting on acetic acid fermentation processing such as fermentation temperature, inoculums amount, initial alcohol degree, initial total acidity and dissolved oxygen were studied. Results showed that optimum parameters are as follows 35 °C, 11% inoculums amount, 4.7% alcohol degree, 1.8 g/100 ml initial total acidity (calculated as acetic acid) and 220 r/min. On these conditions the fermentation rate reaches 67.23%. Acetobacteria attains a logarithm growth in the processing of fermentation after 6 days. Product has a golden color, lucidus, and *Chaenomeles lagenaria* Koidz original faint scent quality.

Key words *Chaenomeles lagenaria* Koidz; fruit wine; acetobacter; clarification

中图分类号: TS255.47

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)02-0176-04

药木瓜, *Chaenomeles lagenaria* Koidz, 别名皱皮木瓜, 又名万寿果, 亦称贴梗海棠, 蔷薇科, 落叶灌木, 单叶互生, 叶片椭圆状卵形或椭圆状长圆形, 花单生叶腋, 后叶开放, 花瓣粉红色, 状似垂丝海棠。木瓜果皮薄、肉厚、籽少、肉滑、质嫩、味甘酸、有桂花香味, 其营养价值可与猕猴桃媲美, 以“百益之果”著称, 是卫生部首批公布的药食兼用食品^[1]。目前国内木瓜常被制作成果脯、蜜饯类, 如果将木瓜加工成果酒、果醋, 就能充分利用木瓜的营养药用价值和提升木瓜原料的利用空间。

但是由于木瓜本身含有丰富的有机酸达 1.83%~3.58%, 其中含有较高的低碳二酸, 如苹果酸(12.05%)、柠檬酸(20.74%)和较多的芳香酸, 如苯甲酸(16.51%)、对甲氧基苯甲酸(5.82%)等, 并且还含有不常见的 C9 的烷、烯、炔酸^[2], 发酵成果醋, 技术处理比较困难,

国内尚未有大规模工业化生产。一方面果醋及其饮料在世界范围内流行, 另一方面木瓜果醋的研究急需获得技术性突破, 走向大规模生产道路, 进而形成一种新兴产业, 拉动食品工业保健品市场的发展, 从而获得更高的经济效益和社会效益。本实验利用 AS 1.41 醋酸菌液态深层发酵获得木瓜果醋酿制的最佳发酵参数, 期为木瓜果醋的工业化生产奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

药用皱皮木瓜收购于云南省丽江市宁蒗县红桥乡。

1.2 试剂

安琪葡萄酒用高活性干酵母 湖北宜昌酵母有限公司; AS 1.41 醋酸菌 中科院菌种保藏中心; 纤维素酶(250μ/ml)、半纤维素酶(300μ/mg)、果胶酶(24.7μ/mg)

收稿日期: 2006-11-30

作者简介: 周杨(1980-), 男, 硕士研究生, 主要从事食品生物技术和动植物活性成分提取分离的研究。

E-mail: gemini20008@163.com

* 通讯作者: 龚加顺(1971-), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品科学。E-mail: gong199@163.com

Sigma 公司; 考马斯亮兰 (coomassie blue G250)、牛血清蛋白 (albumin) 昆明杰辉生物技术有限公司; 葡萄糖、琼脂、酵母提取物、碳酸钙、3, 5-二硝基水杨酸、重铬酸钾、茚三酮、硫酸、萘酚均为国产。

1.3 方法^[3-5]

1.3.1 木瓜果醋的酿制流程

木瓜→清洗→带皮切块→压榨→调整糖度(葡萄糖)→接种酵母→酒清发酵→巴氏杀菌→接种醋酸菌→醋酸发酵
二级培养←一级培养←醋酸菌种
→澄清化处理→过滤→调配→木瓜果醋

1.3.2 指标方法测定

水分测量: SH10A 水分快速测定仪; 可溶性固形物测量: WYT-32 型手持糖度仪 (°Brix); 总糖测定: 硫酸萘酚比色法^[6]; 氨基酸测定: 茚三酮比色法^[6]; 蛋白质测定: 考马斯亮兰染色法^[7]; 还原糖测定: 3, 5-二硝基水杨酸比色法 (DNS 法)^[8]; 酒精度: % (V/V, 20℃) 重铬酸钾氧化法^[9]; 总酸: 酸碱滴定法 (以醋酸计)^[10]; 醋酸菌细胞数测定: 血球计数法^[11]、浊度度计算^[12]、生物量计数法^[13], 重复三次; 醋酸发酵率计算: 参考文献^[14]。

1.3.3 醋酸发酵过程的研究

1.3.3.1 果酒制备

取原料木瓜, 除残果去核, 加水, 胶体磨榨汁, 接种 0.3g/100ml 安琪葡萄酒用高活性干酵母, 28℃ 静置发酵, 备用, 计算榨汁率, 木瓜果酒可溶性固形物含量、初始酸度、酒度。

1.3.3.2 醋酸菌的驯化

斜面→液体摇床培养 24h (30℃, 220r/min, 加入 5% 木瓜原汁)→平皿涂布培养 (稀释 10^{-7} 倍, 取 0.2cm, 培养基加入 5% 木瓜原汁, 72h)→液体摇床培养 24h (30℃, 220r/min, 加入 5% 木瓜原汁)→划线培养 (32℃, 48h)→挑选透明圈大, 菌落丰厚, 占生长优势的单菌落进行纯化、斜面保藏。

1.3.3.3 醋酸菌的扩大培养

斜面保藏→一级培养, 液体摇床培养 24h (500ml, 30℃, 220r/min)→二级培养, 液体摇床培养 24h (1000ml, 30℃, 220r/min)。

1.3.3.4 温度对醋酸发酵的影响

取 100ml 木瓜果酒, 酒度 > 4%, 接种 13% (V/V) 醋酸菌二级培养液, 分别在 24、26、28、30、32、35、38℃ 下摇床发酵 (220r/min), 每 24h 测定其总酸, 至总酸不变, 发酵完毕。

1.3.3.5 接种量对醋酸发酵的影响

取 100ml 木瓜果酒, 酒度 > 4%, 分别接种醋酸菌二级培养液 5%、9%、13%、17%、21% (V/V), 在 1.3.3.4

中所示温度下摇床发酵 (220r/min), 每 24h 测定其总酸, 至总酸不变, 发酵完毕。

1.3.3.6 初始酒度对醋酸发酵的影响

取 100ml 木瓜果酒, 分别调整初始酒度为 2.3%、3.3%、3.8%、4.4%、4.7% 的, 在前面实验确定的最佳温度、接种量下, 摇床发酵 (220r/min), 每 24h 测定其总酸, 至总酸不变, 发酵完毕。

1.3.3.7 初始酸度对醋酸发酵的影响

调整木瓜果酒酸度分别为 1.5、1.7、1.9、2.1、2.3g/100ml, 在前面实验确定的最佳初始酒度、温度、接种量下, 摇床发酵 (220r/min), 每 24h 测定其总酸, 至总酸不变, 发酵完毕。

1.3.3.8 通风量对醋酸发酵的影响

在前面实验确定的最佳初始酒度、初始酸度、温度、接种量下, 分别取 100ml 木瓜果酒以 160、180、200、220、240r/min 摇床发酵, 每 24h 测定其总酸, 至总酸不变, 发酵完毕。

1.3.3.9 正交试验

在前面单因素试验的基础上, 进行正交试验 $L_{16}(4^5)$, 研究温度、接种量、初始酒度、初始酸度、通风量对木瓜果醋发酵的影响, 每个试验号取木瓜汁 100ml。

1.3.3.10 发酵参数变化

在最优发酵条件下, 测定酸度、醋酸菌生物量的动态变化。

1.3.4 澄清化处理

使用纤维素、半纤维素和果胶酶复合酶处理。

2 结果与分析

2.1 木瓜原汁与木瓜果酒指标测定值

木瓜原汁水分含量 85.3%, 榨汁率 80.07%; 木瓜果酒, 酸度 1.8g/100ml, 可溶性固形物含量 5.9°Brix, 酒度 > 4.8%。

2.2 温度对醋酸发酵的影响

沪酿 AS1.41 醋酸菌为高温型微生物如图 1 所示。

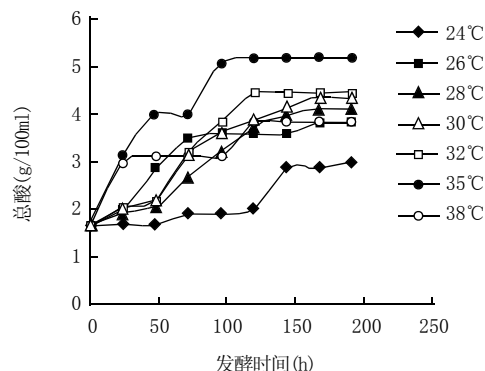


图1 温度对醋酸发酵的影响

Fig.1 Effects of temperature on acetic acid fermentation

35℃是醋酸发酵的最佳温度, 醋酸发酵率71.11%, 其次是32℃, 醋酸发酵率43.21%。但温度过高能使醋酸氧化为二氧化碳和水^[15], 38℃醋酸发酵率仅为30.25%。

2.3 接种量对醋酸发酵的影响

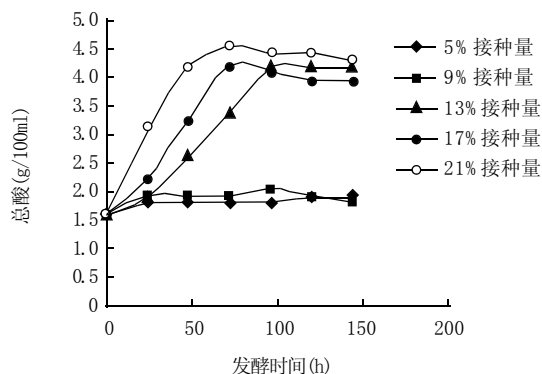


图2 接种量对醋酸发酵的影响

Fig.2 Effects of inoculums amount on acetic acid fermentation

如图2所示, 接种量低于10%, 酸度基本无变化。接种量21%, 前3d产酸较快, 但后来趋于平缓, 而且接种量过高对风味不好, 13%接种量最佳, 产酸比17%的还要高, 仅次于21%, 达到4.2g/100ml, 醋酸发酵率68.75%。

2.4 初始酒度对醋酸发酵的影响

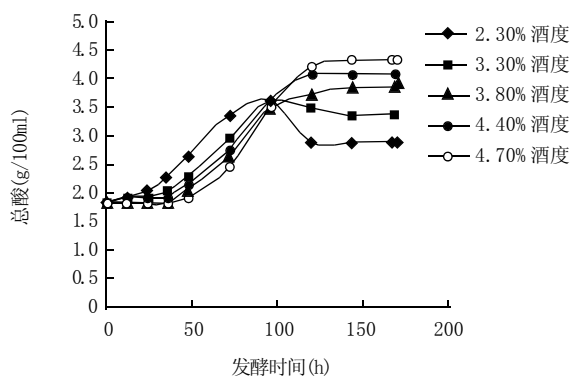


图3 初始酒度对醋酸发酵的影响

Fig.3 Effects of initial alcohol degree on acetic acid fermentation

如图3所示, 随着初始酒度的提高, 醋酸发酵率无明显差异, 初始酒度最低2.3%的醋酸发酵率为55.44%, 最高4.7%为56.88%。初始酒度低, 产酸较快, 但最终酸度不高, 初始酒度高的开始酸度下降慢, 说明代谢底物对醋酸菌的发酵有一定抑制作用, 但最终酸度会随着时间的延长而增加。

2.5 初始酸度对醋酸发酵的影响

如图4所示, 醋酸菌发酵的最适初始酸度为1.8g/100ml, 醋酸发酵率58.85%。初始酸度>1.8g/100ml, 产酸力明显下降, 初始酸度1.92g/100ml时, 醋酸发酵率仅为47.35%。

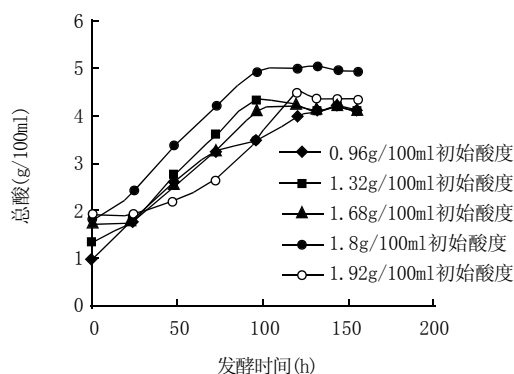


图4 初始酸度对醋酸发酵的影响

Fig.4 Effects of initial total acidity on acetic acid fermentation

2.6 通风量对醋酸发酵的影响

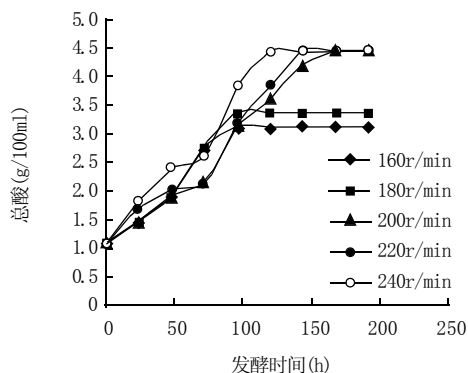


图5 通风量对醋酸发酵的影响

Fig.5 Effects of dissolved oxygen on acetic acid fermentation

如图5所示, 在一定酒度范围内, 220r/min的通风量最佳, 但总体来说随着酒度提高, 醋酸菌将其转化为醋酸所需要的氧气量与酒度呈正比关系。

2.7 正交试验

如表1所示, 由极差分析得出影响醋酸发酵的最大因素为初始酒度(R=0.8), 其次为温度(R=0.54), 接种量(R=0.27), 初始酸度(R=0.23), 通风量(R=0.21)。最佳工艺参数为温度35℃, 接种量11%, 初始酸度1.8g/100ml, 初始酒度4.7%, 通风量200r/min。最终发酵酸度达到4.96g/100ml, 发酵率为67.23%。

2.8 醋酸发酵过程的研究结果

如图6、7所示, 在最佳工艺参数下发酵, 醋酸菌在发酵第6d达到对数生长期, 酒度的消耗速率最大值出现时间与醋酸菌对数生长期、醋酸菌生物量最大值以及浊度最大值出现时间大致相同, 说明醋酸菌的生长呈生长关联型。

2.9 技术指标

2.9.1 感官指标

发酵完的木瓜果醋, 澄清透亮, 色泽金黄, 醋味浓郁, 酸味柔和, 具有木瓜的特殊清香味。

2.9.2 理化指标

总糖1.2~2.4g/L; 总酸(以醋酸计) 4.96g/100ml; 还

表1 正交试验结果 $L_{16}(4^5)$
Table 1 Results of orthogonal test $L_{16}(4^5)$

试验号	温度(℃)	接种量(% V/V)	初始酸度(g/100ml)	初始酒度(% V/V)	通风量(r/min)	最终酸度(g/100ml)	发酵率(%)
1	30	11	1.32	3.3	180	3.68	71.51
2	30	13	1.68	3.8	200	4.2	66.31
3	30	15	1.8	4.4	220	4.56	62.72
4	30	17	1.92	4.7	240	4.08	45.95
5	32	11	1.68	4.4	240	4.32	60
6	32	13	1.32	4.7	220	4.08	58.72
7	32	15	1.92	3.3	200	3.8	56.96
8	32	17	1.8	3.8	180	3.96	56.84
9	35	11	1.8	4.7	200	4.96	67.23
10	35	13	1.92	4.4	180	4.44	57.27
11	35	15	1.32	3.8	240	4.08	72.63
12	35	17	1.68	3.3	220	3.68	60.6
13	38	11	1.92	3.8	220	3.68	46.31
14	38	13	1.8	3.3	240	3.12	40
15	38	15	1.68	4.7	200	4.36	57.02
16	38	17	1.32	4.4	180	3.84	57.27
k_1	4.13	4.16	3.92	3.57	4.11		
k_2	4.04	3.96	4.14	3.98			
k_3	4.29	4.2	4.15	4.29	4		
k_4	3.75	3.89	4	4.37	3.9		
R	0.54	0.27	0.23	0.8	0.21		

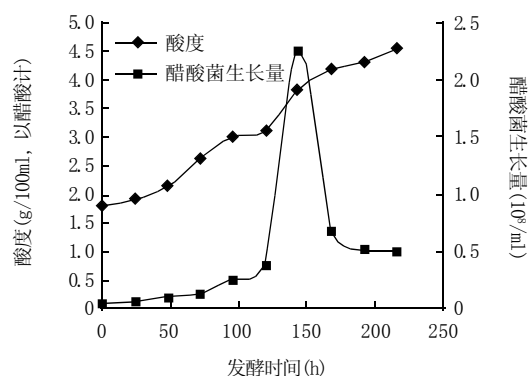


图6 醋酸发酵过程中酸度变化曲线和醋酸菌生长曲线
Fig.6 Curves of acetic acid changes and acetobacter growth

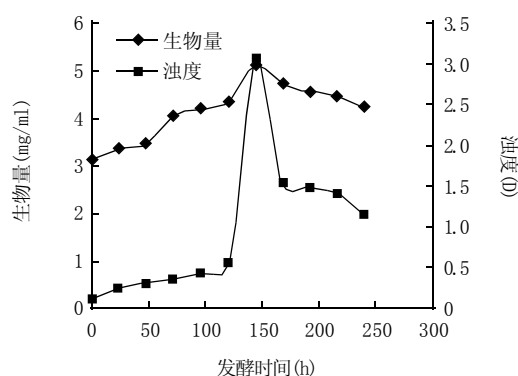


图7 醋酸发酵过程中醋酸菌生物量和浊度变化
Fig.7 Changes of acetobacter biological mass and turbidity

原糖(以葡萄糖计) 1.2~5.0g/L; 蛋白质 0.12%; 氨基酸 0.016%。

3 结论

3.1 木瓜果醋最佳发酵参数为: 温度 35℃, 接种量 11%, 初始酸度 1.8g/100ml, 初始酒度 4.7%, 通风量 200r/min。最终酸度达到 4.96g/100ml, 发酵率为 67.23%。
3.2 最佳工艺条件下发酵, 酵母菌在发酵第 6d 达到对数生长期, 有关醋酸菌生长机理有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 项昭保, 任绍光. 木瓜资源的开发和利用[J]. 中国野生植物资源, 2002, 21(5): 26-27.
- [2] 高诚伟, 雷泽模. 皱皮木瓜中有机酸的研究[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2003, 24(2): 110-114.
- [3] 万红贵, 洪厚胜. 云南酸木瓜酒研究工艺[J]. 江苏食品与发酵, 2003(1): 33-36.
- [4] 夏杏洲, 彭球生. 番木瓜酒的酿制工艺[J]. 食品科技, 2001(3): 48-49.
- [5] 王文平, 周文美. 木瓜果酒加工工艺[J]. 酿酒工艺, 2005(7): 100-102.
- [6] 黄意欢. 茶学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 135-136.
- [7] 李建武, 余瑞元, 陈丽蓉, 等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 2001: 174-177.
- [8] STENESH J. Experimental biochemistry[M]. Boston: Allyn & Bacon, Inc, 1984: 237-245.
- [9] 楼纯菊. 简易的酒精定量测定法[J]. 微生物学通报, 1984(5): 235-237.
- [10] 饶国华, 赵谋明. 果醋研究开发与工业进展[J]. 食品工业, 2004(5): 29-30.
- [11] 程丽娟, 薛泉宏. 微生物学实验技术[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2000: 35-37.
- [12] 吴八斤, 刘延林. 葡萄酒(汁)中酵母菌检测方法研究[J]. 酿酒科技, 2001(4): 76-78.
- [13] MTR D E. 微生物学[M]. 北京: 科学出版社, 1981.
- [14] 郑宝东, 曾绍校, 王登飞. 柑桔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.
- [15] 顾立众, 瞿玮玮. 发酵食品工艺学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 31-33.