

荔枝果醋摇瓶和静止发酵 工艺条件的优化

屈利民^{1,2}, 吴继军², 徐玉娟², 唐道邦², 余元善², 肖更生^{2*}

(1. 江西农业大学 生物科学与工程学院 江西 南昌 330045; 2. 广东省农业科学院 蚕业与农产品加工研究所, 广东省农产品加工重点实验室 广东 广州 510610)

摘要: 以荔枝酒为原料, 研究初始酒度、接种量、温度、装液量对摇瓶发酵(Liquid Flask fermentation, Lfl)和静止发酵(Liquid Static fermentation, Lst) 2种液态醋酸发酵方式的影响。以总酸产量为优化指标, 首先根据单因素实验确定影响总酸产量的因素和水平, 然后通过正交试验分别获得了摇瓶和静止发酵生产荔枝果醋的较优工艺条件。荔枝果醋摇瓶发酵工艺条件为: 初始酒度7% (v/v)、接种量5%、温度27℃、装液量100 mL/500 mL, 在此条件下, 荔枝果醋总酸含量为69.72 g/L, 酒精转酸率为95.48%。静止醋酸发酵工艺条件为: 初始酒度9% (v/v)、接种量5%、温度27℃、装液量100 mL, 在此条件下, 荔枝果醋总酸含量为73.66 g/L, 酒精转酸率为78.46%。

关键词: 荔枝; 果醋; 摇瓶发酵; 静止发酵; 工艺优化

中图分类号: TS 264.2⁺2 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)02-0375-07

Optimization of Flask and Static Fermentation Technology for Litchi Vinegar

QU Li-min^{1,2}, WU Ji-jun², XU Yu-juan², TANG Dao-bang²,
YU Yuan-shan², XIAO Geng-sheng^{2*}

(1. College of Biological Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2. Guangdong Key Access Laboratory of Agricultural Produce Processing, Sericulture and Agro-Food Processing Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510610, China)

Abstract: Litchi wine was used as the raw material to study the effects of initial alcoholicity, inoculation amount, temperature and volume loading on Liquid Flask fermentation(Lfl) and Liquid Static fermentation(Lst). The research index was determined by the total acidity. The factors and levels which affecting total acidity were determined by single-factor experiment, then the optimum conditions for Lfl and Lst were obtained through the orthogonal test respectively. The Lfl parameters were as follows: initial alcoholicity, 7%, inoculation amount, 5%, temperature, 27℃ and the volume loading in 500 mL flask, 100 mL. Under these conditions, Litchi vinegar had 69.72 g/L acidity, the inversion rate was 95.48%. The Lst parameters were: initial alcoholicity, 9%, inoculation amount, 5%, temperature, 27℃ and the volume loading in 500 mL flask, 100 mL. Under these conditions, Litchi vinegar had 73.66 g/L acidity, the inversion rate was 78.46%.

Key words: litchi; fruit vinegar; liquid flask fermentation; liquid static fermentation; technology optimization

收稿日期: 2011-12-01 修回日期: 2012-02-08

基金项目: 广东省工业攻关项目(2010A010500006)和广东省自然科学基金项目(S2011020001226)

作者简介: 屈利民(1988—), 女, 硕士生, 主要从事果蔬深加工研究, E-mail: dawaxiu@126.com; * 通讯作者: 肖更生, 研究员, 主要从事农产品加工, E-mail: gdeys@yahoo.com.cn.

果醋作为一种酸性调味品,含有较高的糖分、醋酸^[1]、适量有机酸^[2]和多种氨基酸^[3],具营养、保健^[4]、抗氧化^[5-7]等功效,广受消费者喜爱。荔枝果实色泽鲜红,肉质洁白而晶莹,汁多味甜^[8]。果肉中含有丰富的糖类、有机酸、蛋白质、氨基酸、维生素、矿物质等,具有较高的营养价值^[9],滋补养颜效果^[10]好,被视为“果中珍品”,是华南地区栽培面积最大的特色果树,但采后荔枝极易褐变腐坏^[11-14],难以贮藏保鲜^[15-16],因此利用荔枝加工具有一定保健功能的荔枝果醋对推动荔枝加工产业健康发展,提高人们生活水平有重要意义。

本实验以荔枝酒为原料,以恶臭醋酸杆菌 AS1.41 为菌种,采用摇床和静止发酵两种方式,设计单因素和正交试验,以总酸产量为指标,研究初始酒度、接种量、温度、装液量对醋酸发酵的影响,以此来探讨不同醋酸发酵方式的最佳工艺参数,为工业化生产提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 荔枝酒 自酿,常温陈酿1年,酒精度12.16%(v/v)。

1.1.2 菌种及培养基 恶臭醋酸杆菌 AS1.41, 购买于广东省微生物研究所菌种保藏中心。醋酸菌斜面保藏培养基: 质量分数为1%酵母膏、质量分数为1%葡萄糖、质量分数为2%琼脂,121℃灭菌20 min后加入2% CaCO₃和3%(V/V)无水乙醇。醋酸菌基础培养基: 质量分数为1%酵母膏、质量分数为1%葡萄糖,121℃灭菌20 min,使用前加入3%(V/V)无水乙醇。

1.1.3 仪器 SPX-250B-Z型生化培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); ZHWY 恒温振荡培养箱(上海智城); 雷磁 ZD-2 自动电位滴定仪(上海精科); SW-GJ-IF 垂直净化工作台(上海阳光实验仪器有限公司); YXQ-LS-50S II 立式压力蒸汽灭菌器(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); JJ 系列高精度电子天平(常熟市双杰测试仪器厂); Anton Paar DMA35(奥地利安东帕(中国)有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 醋酸发酵单因素试验 静止发酵在生化培养箱内进行,摇瓶发酵在恒温振荡培养箱内进行,转速设定为120 r/min,其余条件相同。

(1) 初始酒度对醋酸发酵的影响。本实验设计了5个酒精度水平:5%、6%、7%、8%、9%。在初始酒度为5%、6%、7%、8%、9%(v/v,%)的荔枝酒内,接入5%(v/v)二级醋酸菌种子,设定温度为30℃^[17]。测定不同酒度条件下总酸含量随时间变化的情况并记录。

(2) 接种量对醋酸发酵的影响。在初始酒度为6%的荔枝酒内,接入1%、3%、5%、7%、9%二级醋酸菌种子,温度为30℃进行醋酸发酵。测定不同接种量条件下总酸含量随时间变化的情况并记录。

(3) 温度对醋酸发酵的影响。在初始酒度为6%的荔枝酒内,接入3%二级醋酸菌种子,温度为27、30、33、36℃。测定不同发酵温度条件下总酸含量随时间变化的情况并记录。

(4) 装液量对醋酸发酵的影响。在500 mL三角瓶中分别加入为100 mL(1/5,v/v)、125 mL(1/4,v/v)、167 mL(1/3,v/v)、250 mL(1/2,v/v)初始酒度为6%的荔枝酒,接入3%二级醋酸菌种子,温度为30℃。测定不同发酵温度条件下总酸含量随时间变化的情况并记录。

1.2.2 醋酸发酵条件的优化筛选 在分别对初始酒度、接种量、温度、装液量与总酸产量之间的相互关系进行单因素实验后,选取初始酒度为7%、8%、9%、接种量为1%、3%、5%、温度为27、30、33℃、装液量100、125、167 mL 4个因素3个水平进行正交试验,摇瓶发酵与静止培养时间分别为7 d和13 d。正交试验设计见表1。

表1 醋酸发酵正交试验因素与水平

Tab.1 Factors and levels of orthogonal experiments for optimizing the acetic fermentation

水平 Level	因素 Factors			
	初始酒度(A) /%	接种量(B) /%	温度(C) /℃	装液量(D) /mL
	Initial alcoholicity	Inoculation amount	Temperature	Volume loading
1	7	1	27	100
2	8	3	30	125
3	9	5	33	167

1.2.3 分析测定方法 总酸(以醋酸计, g/L): GB/T12456 - 2008 酸碱滴定法; 酒度%(v/v, 20 ℃): 酒精蒸馏法。酒精转酸率(%) = 净醋酸含量(g/100mL) / 酒精含量(%) × 0.8 (g/mL) × 1.304。

2 结果与讨论

2.1 醋酸发酵单因素试验

2.1.1 初始酒度对醋酸发酵的影响

理论上 1 g 酒精产生 1.304 g 醋酸, 但由于各种原因, 如发酵期间酒精和醋酸的挥发、醋酸菌的繁殖消耗等, 实际转酸率往往低于理论值^[18]。根据国家卫生标准, 食醋醋酸含量不低于 3.4%, 因此醋酸发酵前酒精度(V/V, %) 至少应为 4.3%^[19]。

初始酒度对醋酸发酵的影响见图 1 和图 2。由图 1 和图 2 可知, 5% ~ 8% 酒度内, 随着酒度的增大, 总酸产量逐渐增大, 当酒度处于较高水平时, 醋酸菌适应发酵环境所需要的时间越长, 产酸能力反而下降。且酒度越大, 酒精转酸率越低。对比摇瓶和静止发酵可知, 摇瓶发酵酒精转酸率要明显高于静止发酵且发酵周期明显缩短。

2.1.2 接种量对醋酸发酵的影响

不同接种量对醋酸发酵的影响见图 3。由图 3 可知, 摇瓶发酵条件下, 接种量在 1% ~ 3% 时, 总酸产量随接种量增大而增大, 增大接种量总酸反而减少, 以 3% 的接种量较合适。摇瓶发酵至 7 d 总酸达 55.52 g/L (图 3(a)); 静止发酵条件下接种量为 3% 较合适, 发酵至 11 d 总酸达 55.07 g/L (图 3(b))。

2.1.3 温度对醋酸发酵的影响 温度对醋酸发酵的影响见图 4。由图 4 可知, 温度在 27 ~ 36 ℃ 条件下分别对摇瓶和静止发酵均有一定的影响, 以 30 ℃ 较合适。在此温度下, 摇瓶发酵 6 d 总酸含量达 59.80 g/L, 而静止发酵延迟至 11 d 总酸含量为 55.30 g/L。

2.1.4 装液量对醋酸发酵的影响 不同装液量对醋酸发酵的影响见图 5。由图 5 可知, 在 500 mL 三角瓶中, 不同装液量分别对摇瓶和静止发酵总酸产量有极显著的影响。随装液量的增大, 发酵基质中的溶解氧逐渐减少, 醋酸菌严格好氧^[20], 因得不到充足的溶解氧而转化速度慢^[21], 同时, 装液量相同的摇瓶和静止发酵, 因摇瓶发酵能在单位时间内供给醋酸菌较多的溶解氧而使醋酸发酵周期缩短。故以 100 mL 装液量为最优, 此装液量条件下, 摇瓶发酵培养 7 d 总酸产量达 58.03 g/L, 而静止发酵延迟至 11 d 总酸产量达 41.27 g/L。

2.2 醋酸发酵条件的优化筛选

2.2.1 4 因素 3 水平正交试验结果 不同酒度、接种量、温度、装液量的 4 因素 3 水平进行正交试验结果见表 2。

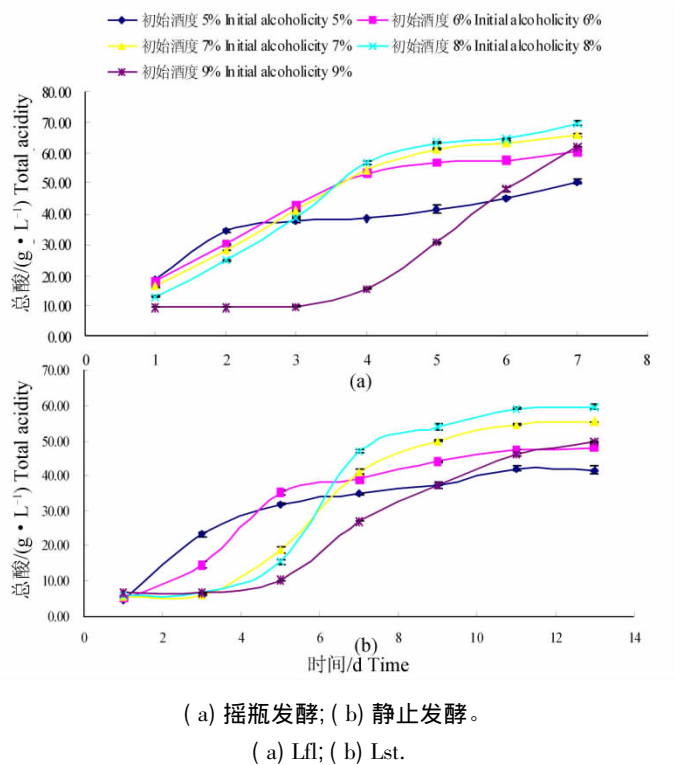


图 1 初始酒度对摇瓶和静止醋酸发酵的影响

Fig. 1 Effect of initial alcoholicity on acetic acid fermentation with Lfl and Lst

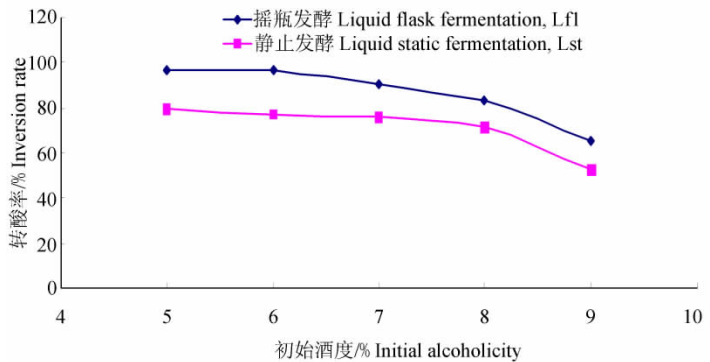
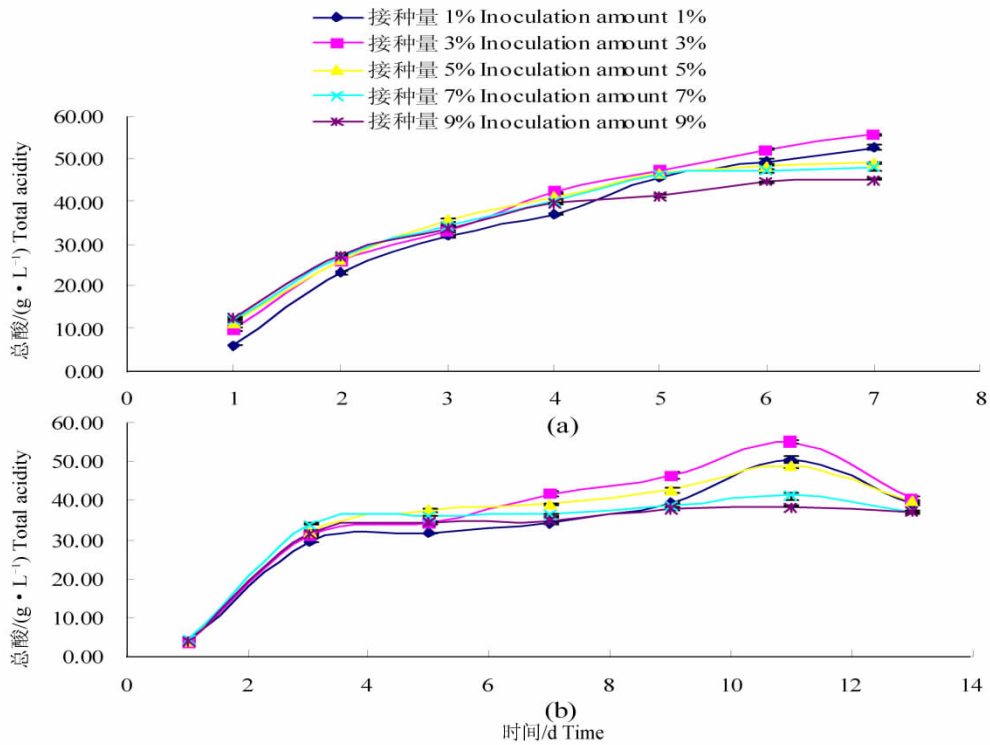


图 2 摇瓶、静止发酵酒精转酸率曲线

Fig. 2 Curve of inversion rate from alcohol with Lfl and Lst



(a) 摇瓶发酵; (b) 静止发酵。 (a) Lfl; (b) Lst.

图 3 接种量对摇瓶和静止醋酸发酵的影响

Fig. 3 Effect of inoculation amount on acetic acid fermentation with Lfl and Lst

表 2 醋酸发酵的正交试验结果及分析

Tab. 2 Results and analysis of orthogonal test of acetic fermentation

序号 No.	因素 Factors				总酸 / (g · L ⁻¹) Total acidity	
	初始酒度 (A) / % Initial alcoholicity	接种量 (B) / % Inoculation amount	温度 (C) / °C Temperature	装液量 (D) / mL Volume loading	Lfl	Lst
1	1 (7)	1 (1)	1 (27)	1 (100)	63.98 ± 0.21	46.36 ± 0.29
2	1	2 (3)	2 (30)	2 (125)	58.75 ± 0.42	58.24 ± 0.15
3	1	3 (5)	3 (33)	3 (167)	47.12 ± 0.15	52.30 ± 0.16
4	2 (8)	1	3	2	35.58 ± 0.18	53.49 ± 0.47
5	2	2	1	3	51.66 ± 0.45	71.20 ± 0.33
6	2	3	2	1	69.03 ± 0.29	57.00 ± 0.36
7	3 (9)	1	2	3	28.45 ± 0.38	54.86 ± 0.16
8	3	2	3	1	41.98 ± 0.53	72.44 ± 0.21
9	3	3	1	2	60.88 ± 0.35	61.04 ± 0.21
Lfl	K1	56.62	42.67	58.84	58.33	实验较优组合 A ₂ B ₃ C ₂ D ₁ ,
	K2	52.09	50.79	52.07	51.73	即第 6 号处理;
	K3	43.77	59.01	41.56	42.41	理论较优组合 A ₁ B ₃ C ₁ D ₁ ;
	R	12.85	16.34	17.28	15.92	影响总酸产量主次因素为: C > B > D > A
Lst	K1	52.30	57.59	62.56	61.44	实验较优组合 A ₃ B ₂ C ₃ D ₁ ,
	K2	60.56	54.72	61.52	59.41	即第 6 号处理;
	K3	62.78	63.34	51.57	54.80	理论较优组合 A ₃ B ₃ C ₁ D ₁ ;
	R	10.48	8.61	10.99	6.64	影响总酸产量主次因素为: C > A > B > D

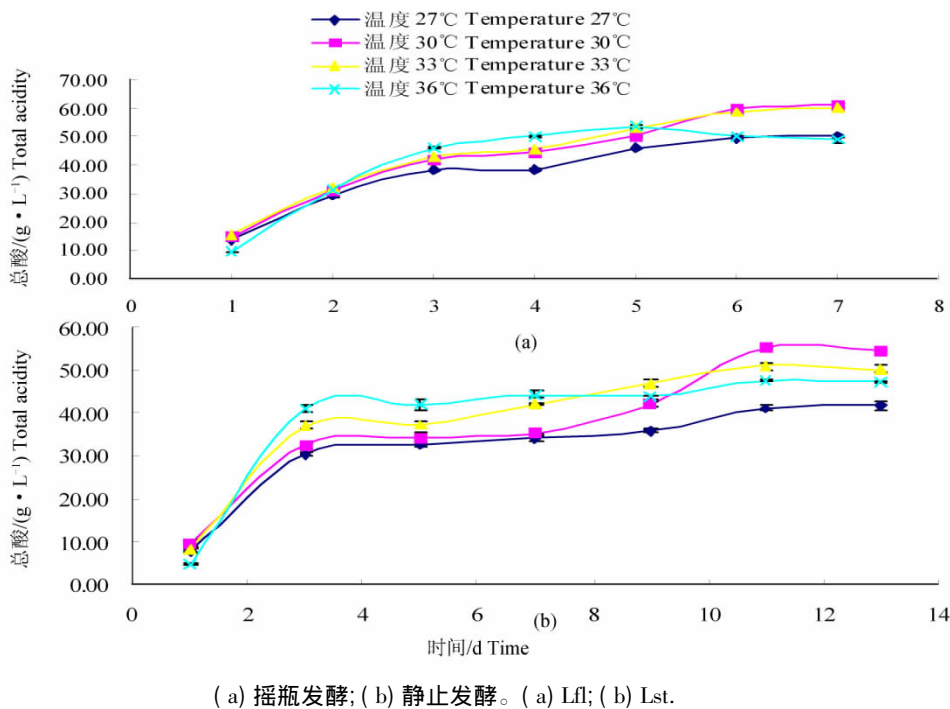


图 4 温度对摇瓶和静止醋酸发酵的影响

Fig.4 Effect of temperature on acetic acid fermentation with Lfl and Lst

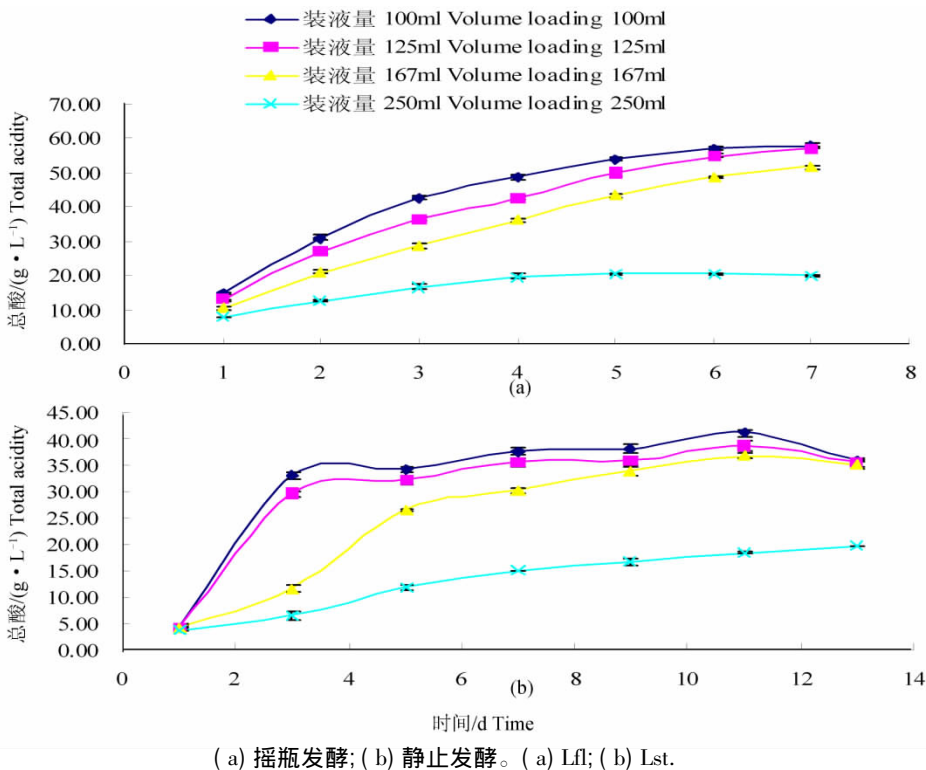
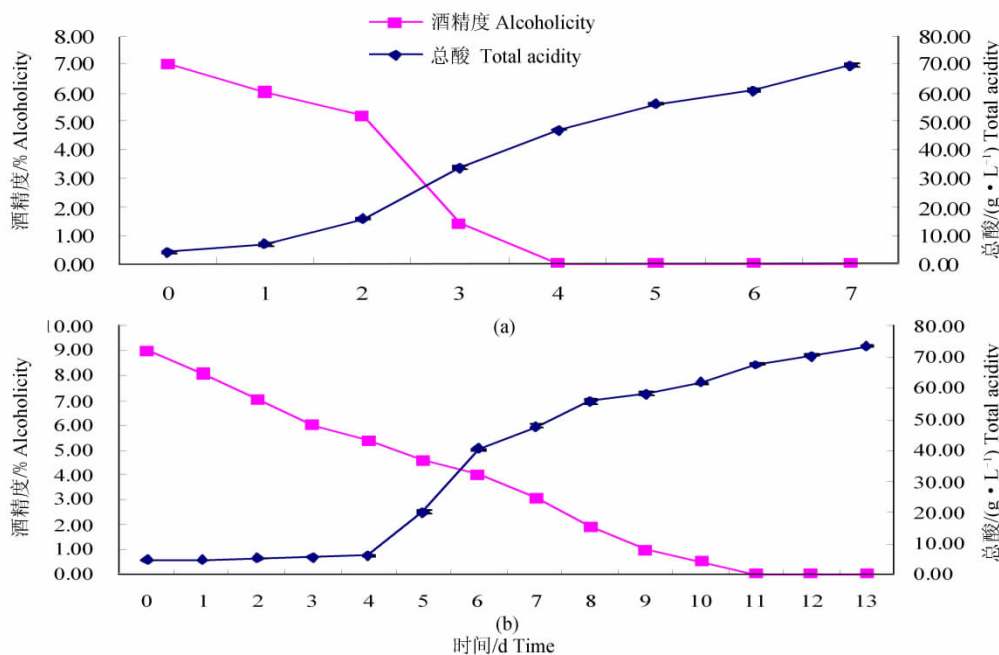


图 5 装液量对摇瓶和静止醋酸发酵的影响

Fig.5 Effect of volume loading on acetic acid fermentation with Lfl and Lst

从表 2 可知,供试的初始酒度、接种量、温度、装液量 4 因素和 3 种供试水平对摇瓶和静态发酵总酸产量均有极显著的影响。在摇瓶发酵条件下获得产酸的实验较优组合: $A_2B_3C_2D_1$, 即第 6 号试验处理; 理论较优组合: $A_1B_3C_1D_1$; 影响总酸产量主次因素为: $C > B > D > A$ 。在静态发酵条件下获得产酸的实验较优组合: $A_3B_2C_3D_1$, 即第 8 号试验处理; 理论较优组合: $A_3B_3C_1D_1$; 影响总酸产量主次因素为: $C > A > B > D$ 。



(a) 摇瓶发酵; (b) 静止发酵。(a) Lfl; (b) Lst.

图 6 醋酸发酵酒精度、总酸随时间变化

Fig. 6 Changes of alcoholicity and total acidity with Lfl and Lst

2.2.2 醋酸发酵验证试验 由于获得的实验较优组合与理论组合不一致,而理论组合是在本正交试验中未参与实验,因此分别采用理论组合 $A_1B_3C_1D_1$ 和 $A_3B_3C_1D_1$ 分别进行摇瓶和静止发酵验证试验,其试验结果见图 6。图 6 最优组合结果表明,摇瓶发酵 7 d 的总酸产量为 69.72 g/L,与正交试验所得的最高值 69.03 g/L 相接近;静止发酵 13 d 的总酸产量为 73.66 g/L,与正交试验所得的最高值 71.20 g/L 也相接近。

3 小结与讨论

本文采用荔枝酒为试验材料,通过单因素和正交试验分别探索在摇瓶和静止培养条件下发酵荔枝果醋的工艺条件。摇瓶发酵生产荔枝果醋的较优组合为 $A_1B_3C_1D_1$,即初始酒度 7%、接种量 5%、温度 27 °C、装液量 100 mL,发酵 7 d 总酸产量达到 69.72 g/L,其酒精转酸率为 95.48%。静止发酵生产荔枝果醋的较优组合为 $A_3B_3C_1D_1$,即初始酒度 9%、接种量 5%、温度 27 °C、装液量 100 mL,发酵 13 d 总酸产量达到 73.66 g/L,其酒精转酸率为 78.46%。

通过本实验可知,摇瓶和静止醋酸发酵相比较,具有发酵周期短、总酸产量及酒精转酸率高的优点,将本试验分别获得的在摇瓶发酵和静止培养发酵生产荔枝果醋的工艺条件有待于进一步放大试验。

参考文献:

[1]张瑞珠.影响凤梨醋品质因子之探讨[D].台中:国立中兴大学,2007.
 [2]董书阁,管斌,熊三玉,等.利用响应面分析法优化醋酸菌 AD1 的发酵条件[J].食品与发酵工业,2007,33(3):78-81.
 [3]Eva Valero, Teresa M Berlanga, Pedro M Roldán, et al. Free amino acids and volatile compounds in vinegars obtained from different types of substrate[J]. J Sci Food Agric, 2005(85):603-608.
 [4]Laura L. Esophageal injury by apple cider vinegar tablets and subsequent evaluation of products[J]. Journal of the American Dietetic Association, 2005(1):1141.
 [5]Ju Q, Chang Z R, Jun F F, et al. Antioxidant activities of aged oat vinegar in vitro and in mouse serum and liver[J]. J Sci Food Agric, 2010(90):1951-1958.
 [6]Qing P X, Wen Y T, Zong H A. Antioxidant activity of vinegar melanoidins[J]. Food Chemistry, 2007(102):841-849.
 [7]Senji Sakanaka, Yuuya Ishihara. Comparison of antioxidant properties of persimmon vinegar and some other commercial vinegars in radical-scavenging assays and on lipid oxidation in tuna homogenates[J]. Food Chemistry, 2008(107):739-744.

- [8]王慧娟. 液态发酵荔枝果醋的研究[D]. 福州:福建农林大学 2008.
- [9]王贞强,马波,迟建,等. 荔枝酒香气成分的 GC/MS 分析[J]. 中国农学通报, 2006, 22(8): 135-138.
- [10]唐小俊,迟建伟,张名位,等. 荔枝多糖的提取条件及含量测定[J]. 华南师范大学学报:自然科学版, 2005(2): 27-31.
- [11]Jiang Y M, Duan X W, Daryl Joyce, et al. Advances in understanding of enzymatic browning in harvested [J]. Food Chemistry, 2004(88): 443-446.
- [12]Dong H Q, Cheng L Y, Tan J H, et al. Effects of chitosan coating on quality and shelf life of peeled litchi fruit [J]. Journal of Food Engineering, 2004(64): 355-358.
- [13]Jacques Joas, Yanis Caro, Marie Noelle Ducamp, et al. Postharvest control of pericarp browning of litchi fruit (*Litchi chinensis* Sonn cv Kwa' Mi) by treatment with chitosan and organic acids I. Effect of pH and pericarp dehydration [J]. Postharvest Biology and Technology, 2005 (38): 128-136.
- [14]Zhang Z Q, Pang X Q, Duan X W, et al. Role of peroxidase in anthocyanin degradation in litchi fruit pericarp [J]. Food Chemistry, 2005(90): 47-52.
- [15]乔小瑞,吴辉,吴国宏,等. 荔枝酒发酵工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(12): 92-95.
- [16]Jiang Y M, Li Y B, Li J R. Browning control, shelf life extension and quality maintenance of frozen litchi fruit by hydrochloric acid [J]. Journal of Food Engineering, 2004(63): 147151.
- [17]Bassirou Ndoye, Stephane Lebecque, Jacqueline Destain, et al. A new pilot plant scale acetifier designed for vinegar production in Sub-Saharan Africa [J]. Process Biochemistry, 2007 (42): 1561-1565.
- [18]张庆华,孔令保,朱向东,等. 苹果醋发酵条件的优化研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(32): 15974-15976, 15983.
- [19]赵新宇. 金红苹果果醋及果醋饮料加工工艺的研究[D]. 长春:吉林农业大学, 2008: 5.
- [20]Fregapane G, Rubio - Fernández H, Nieto J, et al. Wine vinegar production using a noncommercial 100 - Litre bubble column reactor equipped with a novel type of dynamic sparger [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1999, 63(2): 141-146.
- [21]José - María González - Sáiz, Diego Garrido - Vidal, Consuelo Pizarro. Modelling the industrial production of vinegar in aerated - stirred fermentors in terms of process variables [J]. Journal of Food Engineering, 2009(91): 183-196.

(上接第 362 页)

- [9]Ishiguro K, Oku H, Suitani A, et al. Effects of conjugated linoleic acid on anaphylaxis and allergicpruritus [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2002, 25(12): 1655-1657.
- [10]Oku H, Ishiguro K. Antipruritic and antidermatitic effect of extract and compounds of *Impatiens balsamina* L. in atopic dermatitis model NC mice [J]. Phytother Research, 2001, 15(6): 506-510.
- [11]Lim Y H, Kim I H, Seo J J. In vitro activity of kaempferol isolated from the *Impatiens balsamina* alone and in combination with erythromycin or clindamycin against *Propionibacterium acnes* [J]. Journal of Microbiol, 2007, 45(5): 473-477.
- [12]Ding Z S, Jiang F S, Chen N P, et al. Isolation and identification of an anti - tumor component from leaves of *Impatiens balsamina* [J]. Molecules, 2008, 13(2): 220-229.
- [13]曾荣,陈金印,张阿珊,等. 凤仙透骨草中抑菌活性物质提取工艺研究[J]. 江西农业大学学报, 2011, 33(1): 141-146.
- [14]曾荣,陈金印,张阿珊. 植物提取液对柑桔采后青霉、绿霉抑菌活性的研究[J]. 江西农业大学学报, 2010, 32(6): 1142-1145.
- [15]周德庆. 微生物学实验教程[M]. 2版. 北京:高等教育出版社, 2005: 199-204; 372.
- [16]钱存柔,黄仪秀. 微生物学实验教程[M]. 2版. 北京:北京大学出版社, 2008: 133-134.
- [17]徐扬,杨保伟,柴博华. 超声波-酶法提取海带多糖及其抑菌活性[J]. 农业工程学报, 2010, 26(13): 356-362.
- [18]白秀君,蒋益虹,杨海燕. 荷叶提取液的抑菌特性研究[J]. 中国食品学报, 2007, 7(3): 90-93.
- [19]张传军,刘超,姜晓坤. 薤白乙醇提取物的抑菌特性[J]. 食品科学, 2011, 32(5): 119-122.
- [20]孟晓,马力. 苦瓜提取液的抑菌谱及其稳定性研究[J]. 食品工业, 2010(2): 46-48.