

产香白地霉发酵无醇绿啤饮料研究

刘天明, 王 慧, 刘庆军, 陆佳伟

(山东轻工业学院 食品与生物工程学院, 山东 济南 250353)

摘 要: 以产香白地霉菌株发酵麦芽汁制得无醇绿啤饮料。确定了白地霉菌株 58A、45B 的最适发酵条件, 分别于最适生长温度 (28 和 27)、最适转速 (120 r/min 和 80 r/min) 和最佳接种量为 5% 的条件下, 摇瓶发酵 48 h, 发酵饮料感官指标较佳, 不含甲醇、乙醇和甲醛。食用安全性试验结果显示, 菌株 45B 的发酵液对小鼠无毒无害, 发酵饮料饮用安全。

关键词: 无醇饮料; 白地霉; 发酵

中图分类号: TS262.5; TS261.4 文献标识码: B 文章编号: 1001- 9286 (2007) 10- 0078- 03

Research on Non- Alcoholic Beverage with Aroma- producing Strains of *Geotrichum candidum*

LIU Tian-ming, WANG Hui, LIU Qing-jun and LU Jia-wei

(College of Food and Biologic Engineering, Shandong Institute of Light Industry, Jin'an, Shangdong 250353, China)

Abstract: The non-alcoholic beverage is produced by use of aroma-producing strains of *Geotrichum candidum*. The optimum fermentative conditions of strains 58A and 45B were determined, the optimum growth temperature, the optimum rotate speed and the inoculation were 28 and 27 , 120 r/min and 80 r/min and 5 %, respectively. Fermented liquid has abundant aroma, no methanol and ethanol cultured for 48 h under the optimum conditions. Edible safety experiments by mouses showed the fermented liquid of strain 45B was nontoxic, fermented beverage was safe for consumers to drink.

Key words: non-alcoholic beverage, *Geotrichum candidum*, fermentation

我国是啤酒生产和消费大国, 啤酒消费人数众多, 但酒中乙醇及微量甲醇、甲醛对消费者健康的危害引起社会的普遍关注^[1-2], 特别是过量嗜酒习惯对消费者危害极大, 易导致交通事故, 引发家庭矛盾等。为此, 寻找啤酒的替代品, 既满足消费者的需求, 也有利于人体健康, 又可扩大消费群体, 符合我国食品发展方向和世界饮料发展潮流。因而无醇啤酒应运而生。在保持普通啤酒风味品质的同时, 乙醇含量低于 0.5 %vol, 主要有两种生产方式: 脱醇法和路德类酵母控制发酵法^[3], 但随之带来工艺和成本的增加。

用产香白地霉发酵麦芽汁生产具有普通啤酒营养成分和口感品质而无乙醇、甲醇等有害成分的新型绿啤饮料, 与现行无醇啤酒相比, 不含有害成分, 工艺简化, 发酵期短, 成本降低, 相关研究至今未见报道^[4]。本文用两株分离自新疆的产香白地霉菌株进行摇瓶发酵, 探讨生产工艺条件和食用安全性。

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目 (Y2005D15)。

收稿日期: 2007- 08- 07

作者简介: 刘天明, 教授, 硕士研究生导师。研究方向: 工业微生物优良菌株的选育。

注: 此处的“绿啤饮料”是个人为方便对所做发酵产品的表达而命名, 目前并无文献特指出处。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

发酵液为自制麦芽汁 (10°Brix); 供试菌株白地霉 45B 和 58A 分离自新疆^[4]。

1.2 方法

筛选培养基为 YEPD 和麦芽汁培养基。对 20 株白地霉菌株分别接种于 100 mL YPD 液体培养基中, 在 28 , 200 r/min 摇床培养 48 h, 依香型分类, 保留浓香型菌株作后续实验。

1.3 绿啤饮料的制备

将白地霉菌株接于含 10°Brix 发酵液的试管中活化, 各取 1 mL 加入含 100 mL 麦芽汁 250 mL 三角瓶中培养 48 h。将其中 1 份于摇床上进行通气搅拌, 另 1 份静置对照。

工艺流程:

麦芽汁 杀菌 发酵 过滤 杀菌 成品 分析(或品评)

白地霉菌株 一级种子 试管斜面培养

分别对温度、通气量、菌种接种量、pH 4 个因子依次进行优化。温度处理 22、24、26、28、30；通气量处理包括静置、80 r/min、160 r/min、200 r/min 摇床振荡；菌株接种量分别以 1%、5%、10% 体积的对数期发酵液(浓度 2.1×10^7 细胞/mL)接种进行实验；发酵液 pH 为麦芽汁自然 pH。

1.4 食用安全性检测

毒性致死试验: 菌株新鲜发酵液离心取上清液灭菌处理, 分别定量喂养小鼠, 持续观察 30 d 试验小鼠的行为、体征及死亡率。对照组用麦芽汁饲喂。

毒理学试验: 分别用灭菌和未灭菌的带菌体发酵液定量喂养小鼠, 以麦芽汁为对照, 持续观察 30 d 内试验小鼠的死亡率; 观察 60 d 内试验小鼠的行为特征; 统计 120 d 内试验小鼠繁殖代数、增殖率 % 和胎儿畸形率 %; 解剖观察心、肝、肺器官的形态和肌肉细胞显微形态; 分析血液中转氨酶活性。

1.5 测定方法

发酵前后 pH 用 pH 计测定; 总酸度用 NaOH 滴定法^[9]; 还原糖用斐林试剂法测定^[9]; 乙醇、甲醇和甲醛含量用气相色谱法^[6]。转氨酶测定由校医院化验室按人体肝功能化验标准检测, 每组采 3 只小鼠血液, 混合后取 1 mL 立即分析。

2 结果与分析

2.1 产香白地霉菌株的筛选

20 株白地霉发酵麦芽汁产香嗅觉评价分为: 豆腐乳味、浓郁的果香味、淡淡果香味、樟脑味和臭鸡蛋味 5 种类型, 表 1 列举了 5 株白地霉的感官评分, 其中 45B 和 58A 菌株具有浓郁果香味, 进一步做工艺优化和安全性评价。

表1 菌株发酵香味评价

菌株号	香味	感官评分
45B	浓郁果香	4.5
58A	浓郁果香	4.8
31A	樟脑味	3.0
28B	豆腐乳味	3.0
50A	淡果香	3.5

注: 满分为 5 分。

2.2 发酵工艺条件的确定

2.2.1 白地霉最适发酵温度的确定

将供试菌株种子液接入含麦芽汁的摇瓶中, 分别在不同设定温度下恒温培养 10 h, 于 660 nm 测定培养液 OD 值, 依 OD 大小确定其最适生长温度。由图 1 可知,

菌株 58A 的最适生长温度为 28, 菌株 45B 的最适生长温度为 27。

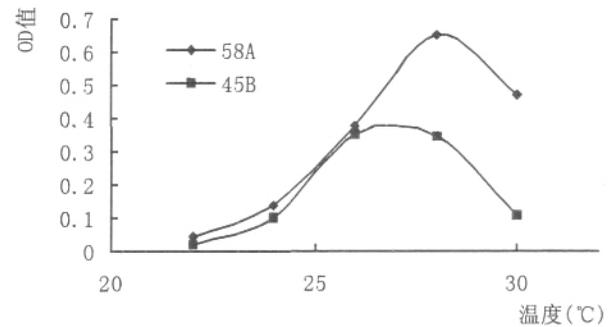


图1 白地霉 45B 和 58A 的生长温度曲线

2.2.2 白地霉最适转速的确定

将供试菌株种子液接入麦芽汁中, 分别在 0 r/min、80 r/min、160 r/min、200 r/min 下最适温度培养 10 h, 于 660 nm 测定培养液 OD 值, 依据数值大小确定其最适转速。由图 2 曲线可以看出, 菌株 58A 和 45B 的最适转速分别为 120 r/min 和 80 r/min。

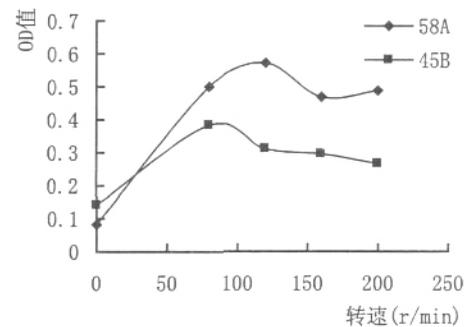


图2 白地霉 45B 和 58A 的生长转速曲线

2.2.3 最佳接种量的确定

将制得的白地霉种子液分别以 1%、5%、10% 的体积接种入麦芽汁摇瓶中, 在最适温度及最适转速下培养 10 h, 于 660 nm 测定培养液的 OD 值, 确定其最佳接种量。结果见表 2。

表2 不同接种量对两菌株生长的影响

菌株号	接种量 (% v/v)		
	1	5	10
45B	0.274	0.375	0.578
58A	0.189	0.294	0.407

从表 2 可知, 发酵 10 h 内接种量为 10% 时菌体生长最好。接种量 5% 时菌体生长速率最高。确定最适接种量为 5%。

2.2.4 发酵液的主要理化指标(表 3)

由表 3 可见, 两个发酵样的发酵液中总酸度均小于 2.2 mL/100 mL, 符合国标 GB4927-2001 要求。经酒度计和气相色谱法测定, 发现发酵液均不含乙醇, 也无甲醇、

表3 发酵液的主要理化指标

菌株号	酒精度 (%vol)	甲醇 (mg/L)	甲醛 (mg/L)	总酸 (mL/100mL)	发酵液 pH
45B	0	0	0	1.932	6.3
58A	0	0	0	1.518	6.3

注：“0”表示未检出。

甲醛等有害成分。发酵液口感纯正、爽口、柔和、无异味，具有本品特有的风格。

2.3 发酵液生物安全性检测 见表4)

表4表明，用灭菌和未灭菌发酵液喂养小白鼠30d内，没有出现急性中毒死亡现象；以麦芽汁喂养小白鼠为对照，灭菌和未灭菌发酵液喂养的小白鼠行为体征、细胞显微形态和生殖能力无显著差异；反映肝细胞功能的转氨酶表现为：用45B发酵液饲喂组血样酶活4(u/L)低于对照的10(u/L)，而58A发酵液饲喂组酶活42(u/L)显著高于对照组。这表明白地霉45B食用是安全的，菌株58A对肝功的影响有待再研究。

3 讨论

白地霉的无性繁殖为裂殖，单细胞和菌丝体两种形态俱存，好氧，早期用于饲料添加剂^[7]和奶酪生产^[8-9]，有关糖代谢途径和可利用的糖种类尚不完全清楚，是否产乙醇未见报道。以往报道认为，绝大多数白地霉菌株对人无毒，仅个别有害。从老鼠毒理实验可以看出，供试菌株发酵液对小鼠无毒无害，在生理和生殖方面没有产生

表4 小白鼠的食用安全性试验结果

项目	菌株 45B	菌株 58A	对照(麦芽汁)
死亡率(%)	0	0	0
繁殖代数	2	2	2
增殖率(%)	230	190	210
胎儿畸形率(%)	0	0	0
转氨酶活性(u/L)	4	42	10
行为特征	行为活跃	行为活跃	行为活跃
	毛色发亮	毛色发亮	毛色发亮
	食欲正常	食欲正常	食欲正常
	体型变大	体型变大	体型变大
心、肝、肺的形态	正常，无病变	正常，无病变	正常，无病变
	第2,3代正常	第2,3代正常	第2,3代正常
肌肉细胞显微形态	正常，无畸形	正常，无畸形	正常，无畸形

注：人体的转氨酶指标正常值为0~40 u/L。

明显的负面影响，发酵饮料对消费者饮用安全，进一步进行安全性评价对两菌株工业化应用极为必要。

供试菌株45B和58A的香味成分已完成GC/MS分析^[4]，两菌株产酯能力较强，分别含有15种和16种，主要产香成分为酯类和-苯乙醇。碳源同化试验表明，均可利用D-葡萄糖、D-半乳糖、D-木糖、D-山梨糖、D-甘露醇和纤维二糖，而不能利用麦芽汁中存在的大量D-麦芽糖，故发酵周期仅为48h。

绝大多数市售无醇啤酒是以普通啤酒脱醇方式生产的，少数用Saccharomyces ludwigi酵母发酵而成，酿造工艺复杂，成本大幅度增加，即使这样也只能控制酒度在0.5%以下，而并非绝对无醇^[3]。采用白地霉对麦芽汁发酵可增加香味，无酒精、甲醛等有害物的生成，尽可能保持了麦芽汁中有机营养，避免有机能源和工业能源的浪费而引发新一轮能源危机和环境污染，可实现消费者健康和企业效益的双赢。

参考文献：

- [1] 王健,崔艳梅,杨明敏,等.酒类中微量甲醛的快速测定新方法[J].分析科学学报,2007,1(23): 88-90.
- [2] 陈华磊,闫鹏,李梅.顶空气相色谱法测定啤酒中的甲醇[J].啤酒科技,2005,(5): 45-48.
- [3] 徐朝晖.低醇啤酒与无醇啤酒工艺概述[J].酿酒,2003,6(30): 59-61.
- [4] 王庆国,刘天明,于艳萍.两株产果香菌株的初步鉴定及香味成分分析[J].食品研究与开发,2007,(6): 16-19.
- [5] 金娟娟.啤酒的总酸及其测定[J].酿酒科技,2000,3(3): 56-57.
- [6] 王福荣.酿酒分析与检测[M].北京:中国轻工业出版社,2005.
- [7] 莫美华,林创华,洗毅和,等.利用食品厂的废料发酵生产饲用微生物添加剂[J].食品研究与开发,2002,12(5): 255-257.
- [8] D.R.Benson.Diversity of Geotrichum candidum strains isolated from traditional cheese making fabrications in France[J].Microbio,2001,1(1): 4752-4759.
- [9] P. Daigle, P. Gelin, D. Leblanc et al.Production of aroma compounds by Geotrichum candidum on waste bread crumb[J].Food Microbiology,1999,16: 517-522.

山东十大白酒穿上“纯粮”新装

本刊讯：据悉，2007年9月17日，山东十大白酒企业负责人从中食协负责人手中接过了中国首批“纯粮固态发酵酒”标志。这意味着该省十大白酒企业可以正式贴上“纯粮”新标签，为鲁酒走向全国奠定了基础。

经过中食协专家的现场调研，最终在全国范围内确定了32家首批“纯粮固态发酵酒”企业，山东省的扳倒井、泰山生力源、景芝、兰陵、琅琊台、大禹龙神、古贝春、云门酒业、黄河龙、尧王酒业10个企业的11个规格的白酒，被授予“纯粮”新标签。(江砂)