桑椹醋自回淋发酵生产工艺及其 DPPH清除能力研究

张粉艳[1],赵炳鑫[1],李志西[2],杜双奎[2],于修烛[2],毋锐琴[2]
(1 西北大学 化工学院,陕西 西安 710069;2 西北农林科技大学食品科学与工程学院,陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 为了确定桑椹醋自回淋发酵工艺,并探讨桑椹醋对二苯代苦味酰基自由基(DPPH)的清除能力,以秦巴山区桑椹为原料,采用液态自回流发酵法生产桑椹醋,从原料菌群、酒精发酵主产物和醋酸发酵主产物的动态变化趋势等方面对其工艺进行了分析,并采用比色法对桑椹醋总黄酮含量及其对 DPPH 自由基的清除率进行了测定。结果表明,桑椹果实表面携带有大量的酵母菌而几乎不带其他杂菌,酒精发酵醪除含有大量的酵母菌之外未发现有其他杂菌,酒精度在发酵 48 h 时达到高峰;桑椹醋生产前的醋酸菌床培育需要 9～10 d,投入生产后醋酸发酵周期仅需要 24 h;桑椹醋总黄酮含量高达 6.68 mg/mL,对 DPPH 的清除作用远大于山西陈醋、镇江香醋和山楂果醋,具有良好的抗氧化作用;利用桑椹醋自身色素颜色变化可判断酸度测定时酸碱滴定终点。桑椹醋自回淋发酵工艺安全可靠、科学实用,生产效率高。

[关键词] 桑椹醋;自回淋发酵工艺;酵母菌;总黄酮,DPPH 清除能力
[中图分类号] TS275.4 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2007)09-0183-06

Study on the auto-circular fermentation and DPPH eliminating ability of mulberry vinegar

ZHANG Fen-yan[1], ZHAO Bing-xin[1], LI Zhi-xi[2], DU Shuang-kui[2], YU Xiu-zhu[2], WU Rui-qin[2]
(1 *College of Chemical Engineering, Northwest University, Xi'an, Shaanxi* 710069, *China;*
2 *College of Food Science and Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*)

Abstract: In order to ascertain auto-circular fermentation technology of mulberry vinegar and find out the vinegar's ability to eliminate DPPH ·, the liquid fermentation techniques of mulberry vinegar produced by using auto-circular fermentor were analyzed, the micro-organism on the mulberry fruit surface was observed with microscope, and the total flavones content as well as the free radical-DPPH eliminating ability in several kinds of vinegars were tested. The results showed that the mulberry fruit surface carried large numbers of yeast but little other mixed fungi; ethanol fermentation reached the peak value in 48h; the acetification bed breeding took 9～10 d before vinegar production, but the vinegar fermentation cycle was only about 24h during production. Total flavones content in the mulberry vinegar reached as high as 6.68 mg/mL. The mulberry vinegar had good capacity of anti-oxidation. The red colour change of mulberry vinegar could be taken as the end point for acid-base titration when the acidity analysis was performed.

Keywords: mulberry vinegar; auto-circular fermentation technology; yeast; total flavones; DPPH elimi-

*[收稿日期] 2006-09-08
[基金项目] 陕西省科技攻关项目(2005K03-G03);西北大学科学基金项目(03NW21)
[作者简介] 张粉艳(1961-),女,陕西三原人,高级工程师,主要从事食品与化学工程技术研究。
[通讯作者] 李志西(1958-),男,陕西临潼人,教授,博士生导师,主要从事谷物功能食品与发酵技术研究。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

nating ability

早在 20 世纪 90 年代,果醋及果醋饮料就已风靡欧美、日本等发达国家。据有关资料报道,英国苹果醋年产量占食醋总产量的 10 %,美国苹果醋年产量占食醋总产量的 17 %[1]。我国是一个食醋大国,年产量为 220 万吨[2],大多是固态发酵生产的粮食醋,与发达国家相比果醋生产比较落后。近年来,随着社会的发展和人们生活水平的提高以及保健意识的增强,果醋及果醋饮料的需求量越来越大,但果醋发酵的工艺技术尚不完善。因此,对果醋生产新工艺的开发有着十分重要的现实意义。我国传统医学认为,桑椹能补益肝肾、黑发明目、养血生津[3]。现代研究发现,桑椹含有丰富的黄酮类物质,可调节和促进人体免疫功能,抗诱变作用明显而无毒性[4-5];以桑椹为原料生产的桑椹醋能有效地清除活性氧自由基,表现出良好的抗氧化活性[5-8]和减肥降脂作用[9-10],是极具营养和保健价值的食品,很受人们关注。但目前尚未见直接以桑椹果实为原料,生产原汁原味桑椹醋的快速发酵工艺报道。为此,本研究以秦巴山区桑椹为原料,采用自行设计的自回淋发酵罐和液态回流发酵工艺,进行了桑椹果醋快速发酵试验,以期为桑椹资源的开发和桑椹果醋的产业化发展提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜桑果采自陕西汉阴县桑果园(4 月下旬收获);沪酿 1.01 复壮安瓿瓶醋酸菌为上海中科伍佰豪生物工程公司产品;DPPH 购自 Sigma 公司。主要仪器有显微镜(Ni Kon- Ys100)、微型发酵罐(自行设计)、紫外可见分光光度计(751- GD 型)、电位滴定仪(ZD-2A 型)等。

1.2 桑椹醋生产工艺流程及操作要点

1.2.1 工艺流程 桑椹醋生产工艺流程见图 1。

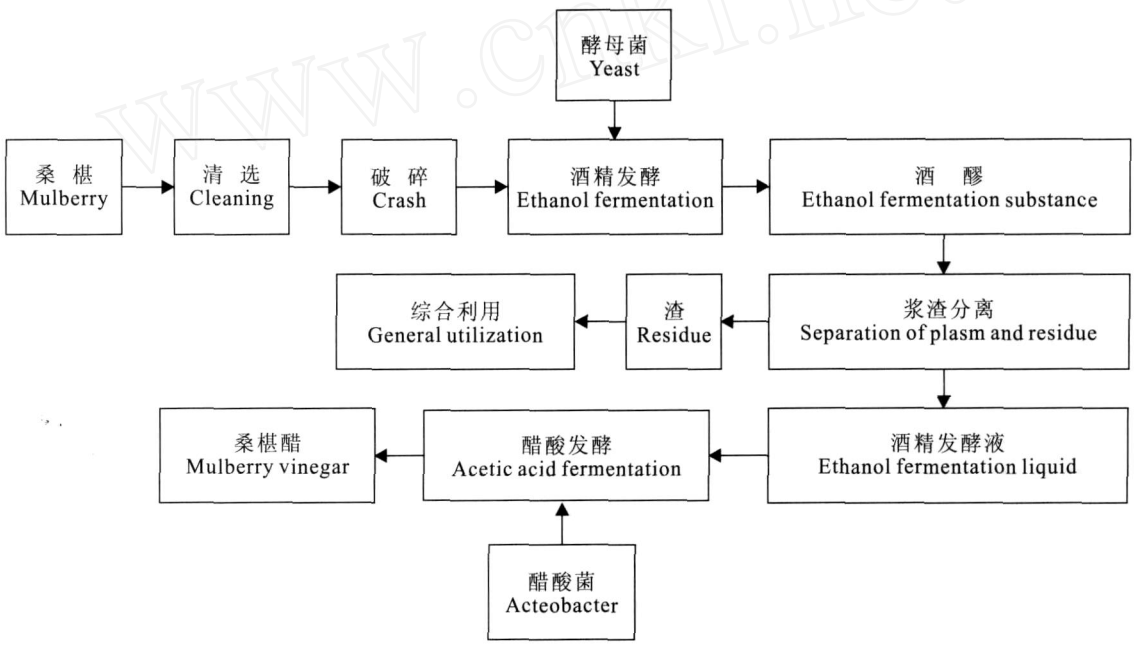

图 1 桑椹醋生产工艺流程

Fig. 1 Technology flowing map of mulberry vinegar

1.2.2 操作要点 (1) 原料处理:将清选后的新鲜桑椹果实用破碎机轻度破碎后,置于密闭容器内密封,利用天然酵母于 20～25 ℃自然厌氧发酵(酒精发酵) 72 h,然后 4000 r/ min 离心 10 min 即得发酵液(酒醪),随后进行醋酸发酵。

(2) 菌床培育:醋酸发酵采用自行设计的微型自回淋醋酸发酵罐(图 2) 进行。新安装的发酵罐在启用时,首先要培育好醋酸化菌床。本研究选用玉米芯为菌床材料,玉米芯经反复水洗后灭菌,再用灭菌的桑椹醋浸渍 24 h 后取出,安置在发酵罐的中部,接入醋酸菌种子培养液。开启液体循环系统使预先放置在发酵罐中的酒化醪穿过菌床循环流动,醋酸菌在菌床上的活化、生长和繁殖约需 9～10 d。当发酵液酸度达到 50 g/ L 时,菌床培育完毕,培育好的

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

菌床可长期重复使用。

(3)醋酸发酵:采用自行设计的微型发酵罐,其工作原理见图 2。在正常运行情况下,菌床上附着有大量的醋酸菌,当菌床上附着有发酵液时,菌床上的醋酸菌能够使发酵液中的酒精氧化产生醋酸,同时释放出热量使菌床温度升高。当温度升高到 40 ℃时,通过自动控制装置使循环泵开启,这时发酵罐底部的发酵醪通过循环泵从顶部喷淋到菌床的上部。当发酵液由上部穿过菌床向下部流动时,通过淋洗作用将菌床上的醋酸带到发酵罐底部,使菌床温度下降,同时含有酒精的发酵液附着在菌床上。当菌床温度下降至 36 ℃时,通过自动控制装置使循环泵关闭,停止喷淋。循环泵关闭后,菌床上附着的酒精在醋酸菌作用下转化为醋酸,同时释放热量,使菌床温度再次上升至 40 ℃,这时通过自动控制装置使循环泵又重新开启,发酵液再次由顶部喷淋。重复上述过程,发酵液酸度不断升高,酒度逐渐下降,当酒精接近完全氧化时,酸度不再增加,发酵完成。这时取出 1/2 发酵产物(桑椹醋),补充新的酒醪后,重复上述过程进行下一轮发酵(分批留种发酵)。

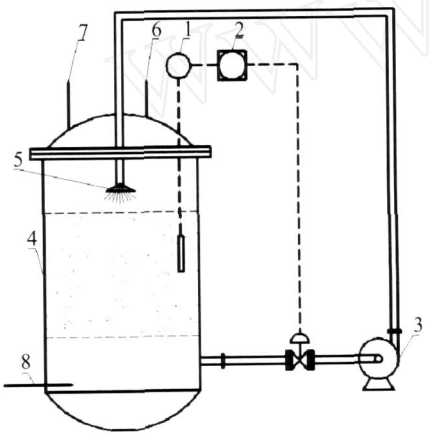

图 2　桑椹醋发酵罐示意图

1. 温度传感器;2. 自控系统;3. 泵;4. 醋酸化菌床;
5. 喷淋装置;6. 通气口;7. 加液口;8. 出液口

Fig. 2　Hinting map of mulberry vinegar fermentor

1. Temperature sensor;2. Auto-control system;3. Pump;
4. Acetification bed;5. Pouring installation;6. Aerating mouth liquid;
7. Entering mouth;8. Liquid exiting mouth.

1.3　测定指标及方法

酵母菌数:在无菌操作状态下,随机采摘 30 颗新鲜桑椹,经过处理后立即在显微镜下观察其表面带菌情况,采用显微镜直接计数法对酵母菌进行计数分析[11]。总糖含量:用手持糖量计对随机采摘的 50 颗新鲜桑椹的含糖量进行测定。还原糖采用斐林试剂法测定。酒精度采用酒精计法测定。总酸采用酸碱滴定法测定。

总黄酮采用比色法测定。适当稀释醋样,取0.2 mL 样品溶液于 10 mL 比色管中,加体积分数 30 % 乙醇至 2.5 mL,加入 140 μL 50 g/L 的 $NaNO_2$ 摇匀放置 5 min,再加入 140 μL 100 g/L 的$Al(NO_3)_3$,放置 6 min 后加入 1 mL 50g/L 的 NaOH 溶液充分混匀,用体积分数 30 %乙醇定容至 5 mL,10 min 后于 500 nm 处测定吸光度(以不加样品为空白)。以芦丁标准曲线计算样品总黄酮含量,样品总黄酮含量以芦丁等价物计[12-13]。

对二苯代苦味酰基自由基(DPPH)的清除率:将桑椹醋醋样适当稀释,取 1 mL 样品与 1 mL 0.2 mmol/L DPPH 溶液混合,置暗处反应 30 min,于 517 nm 处测定吸光度 A_i。同时测定 0.2 mmol/L DPPH 溶液与等体积无水乙醇混合液的吸光度 A_c,以及待测液与等体积无水乙醇混合液的吸光度 A_j。根据下式计算 DPPH 清除率:DPPH 清除率/ % = $[1-(A_i-A_j)/A_c]\times 100\ \%$。

2　结果与分析

2.1　桑椹含糖量的测定及表面带菌情况的分析

结果发现,桑椹带有较多的酵母菌,而很少有其他杂菌,其平均酵母菌数为$(1.83\pm 0.23)\times 10^7$/颗。

在酒精发酵过程中,可直接利用桑椹自身所带的野生酵母菌进行酒精发酵。由于桑椹表面带有大量的酵母菌,在厌氧条件下,酵母菌很快活跃起来,从而抑制了其他好氧菌的活动。前期大量试验表明,直接利用天然野生酵母进行酒精发酵是安全可靠的。

总糖测定结果表明,成熟果实中总糖含量为 136 ±12 g/kg,变幅 125～150 g/kg。可以看出,桑椹含糖量较高,完全可以满足果醋酿制对原料含糖量的要求。

2.2　桑椹醋酒精发酵过程的分析

2.2.1　酵母菌数量变化　新鲜桑椹按照 1.2.2(1)所述及的方法在密闭容器内自然厌氧发酵,发酵过程中酵母菌数量变化趋势如图 3 所示。由图 3 可以看出,在前 24 h 的发酵过程中,酵母菌数量增加缓慢,处于适应期;发酵 24～40 h,酵母菌数量增长速度加快,40 h 时达 2.21×10^7 mL^{-1};至 48 h 左右达最大值,为 3.20×10^7 mL^{-1};此后,由于含糖量下降,加之酒精含量处于较高水平(对酵母菌有一定抑制作用),酵母菌数量又缓慢下降,发酵 56 h 后酵母菌数量急剧下降,大约 64 h 后酵母菌数量仅有 1.76

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

$\times 10^7$ mL^{-1},此后一直处于较低水平。

2.2.2 糖度和酒度的变化 由图4可以看出,随着发酵时间的延长,发酵液酒度上升糖度下降;在发酵前期(24 h以前),糖度缓慢下降,酒度缓慢上升,发酵液表面比较平静,这是由于在发酵初期,酵母菌以生长繁殖为主;在主发酵期(24～48 h),酵母菌在无氧条件下进行酒精发酵,酒度迅速上升,糖度迅速下降,发酵液表面产生大量气泡,酒味明显加重;至发酵后期(48 h以后),发酵趋于平缓,酒度、糖度变化缓慢,发酵液酒味浓郁;56 h后发酵基本结束,发酵液表面恢复平静,酒液分层,酒化达到发酵终点,酒液酒度为7.8°,残糖含量约6 g/L。

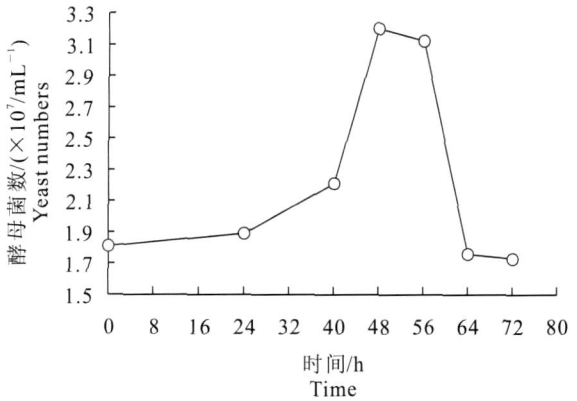

图3 桑椹醋生产过程中发酵时间对酵母菌数量变化的影响

Fig.3 Influence of fermenting time on the number of yeast

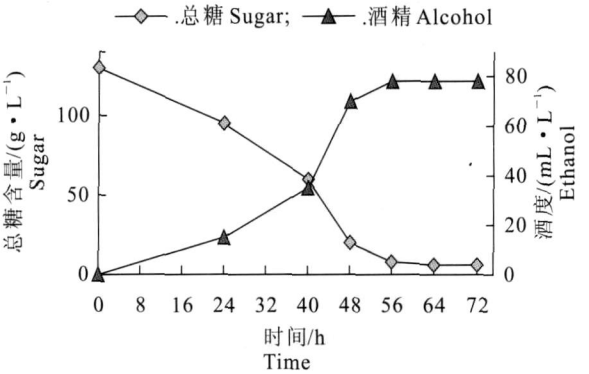

图4 桑椹醋生产过程中发酵时间对糖度和酒度变化的影响

Fig.4 Influence of time on the sugar and ethanol content during fermentation

2.3 桑椹醋醋酸发酵的分析

2.3.1 总酸的测定 桑椹发酵液自身为深红色,无法用酚酞作为酸碱滴定的指示剂来测定其酸度。作者在试验过程中发现,桑椹红色素在酸性条件下呈鲜红色,在碱性条件下呈墨绿色。因此,可利用桑椹发酵液自身色素颜色的变化作为酸碱滴定终点的判断依据,直接进行酸碱滴定。以电位滴定法为对照,验证不加指示剂的酸碱滴定法的准确性,其结果见图5。由图5可以看出,两种滴定法的相关系数 $R=0.999\ 2$,接近1,其回归方程为:$\hat{Y}=0.994\ 1X+0.044$,即 X 每增加1个单位,Y 大约也增加1个单位。食醋总酸测定值一般只要求精确到0.1,方程的回归截距仅为0.044。可见,忽略回归截距所带来的误差,并未超出测定精度所规定的误差范围。试验结果表明,可利用桑椹发酵液自身色素颜色变化,作为酸碱滴定终点的判断依据,直接进行酸碱滴定测其酸度。

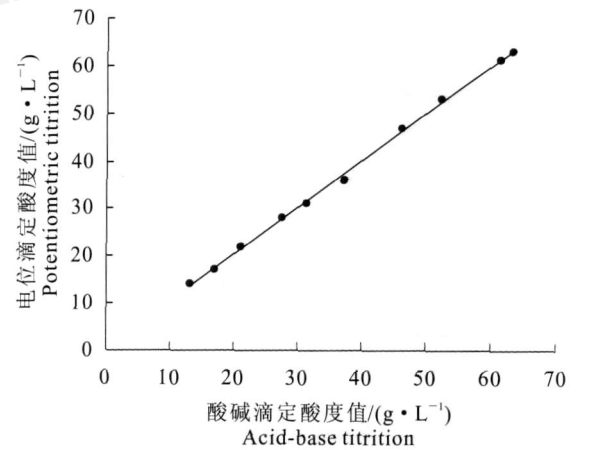

图5 电位滴定法与酸碱滴定法的酸度值回归曲线

Fig.5 Acidity value regression curve of potentiometric titration and acid-base titration

2.3.2 醋酸发酵过程的分析 (1)菌床培育过程的酸度变化。由图6可以看出,在菌床开始培育的前48 h,发酵液酸度仅有微小变化,醋酸菌处于适应期;48 h后,发酵液酸度上升速度加快,醋酸菌进入活化期;直到192 h(8 d)之后,发酵速度变慢;220 h(≈9 d)之后,酸度不再升高,菌床培育全过程完成。(2)醋酸发酵过程中酸度的变化。菌床培育刚刚结束后,所产生的发酵液(醋)中含有大量的醋酸菌,其活性很高,可作为醋酸发酵的种子液。醋酸发酵时,在发酵罐底部将适量的种子液和酒精发酵醪按1∶1(体积比)比例混合,混合液的起始酸度为32 g/L。由图7可以看出,在醋酸发酵全过程中,酸度呈持续升高趋势。在整个发酵过程中,酸度随时间的变化可用二次多项式来表征,即 $Y=3.196\ 7+$

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

$0.152\,6X - 0.002\,8X^2$, $R^2 = 0.997\,8$ ($P < 0.01$)。最终酸度为 53 g/L 。发酵初期酸度上升的速度较快,随发酵时间的延长,酸度上升速度逐渐减慢,至 24 h 时达到最大,其后不再升高。在指定时间的理论发酵速度($Y_{理论}$)可用以下方程表示:

$$Y_{理论} = -0.005\,6X + 0.152\,6。$$

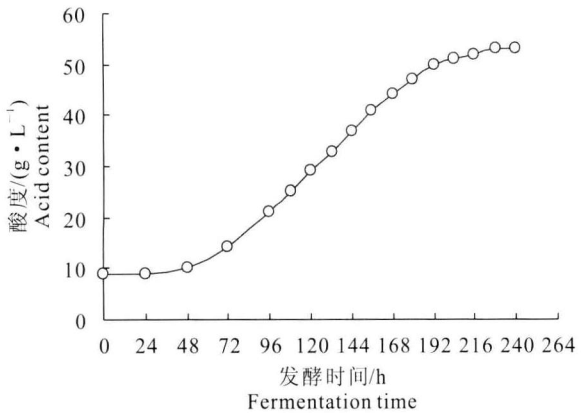

图 6　桑椹醋生产过程中菌床培育期酸度随时间的变化

Fig. 6　Acid content curve developing as fermentation time going during bed cultivatuon

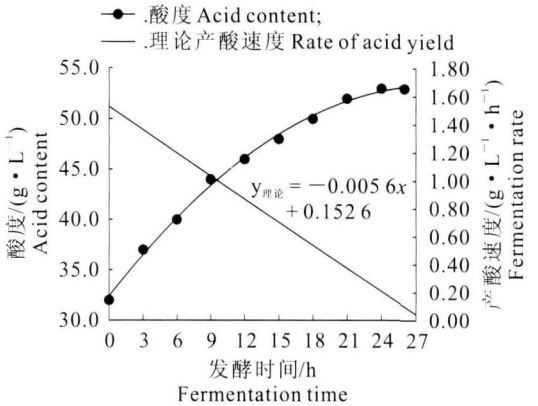

图 7　桑椹果醋醋酸发酵过程中酸度的变化

Fig. 7　Developing curve of vinegar content during fermentation

2.4　桑椹醋总黄酮含量及对 DPPH 的清除率

2.4.1　总黄酮含量　由表 1 可以看出,粮食醋(大食醋,山西陈醋,镇江香醋)总黄酮含量为 1.1～2.0 mg/mL,山楂醋可达 5.02 mg/mL,而桑椹果醋高达 6.68 mg/mL。表明,桑椹醋是有保健功能的发酵产品。

表 1　桑椹醋与其他食醋中总黄酮质量浓度的比较

Table 1　Comparison of total flavone content in different vinegars

样品 Sample	总黄酮含量/(mg·mL⁻¹) Total flavone	样品 Sample	总黄酮含量/(mg·mL⁻¹) Total flavone
大食醋 Dashi vinegar	1.996	梨醋 Pear vinegar	2.038
山西陈醋 Shanxi vinegar	1.101	山楂醋 Hawthorn vinegar	5.020
镇江香醋 Zhenjiang vinegar	1.172	桑椹醋 Mulberry vinegar	6.680

2.4.2　对 DPPH 自由基的清除率

食醋含有黄酮等抗氧化物质,能够清除活性氧自由基[12]。由图 8 可以看出,果醋(山楂醋,桑椹醋)对 DPPH 的清除作用大于粮食醋(大食醋,山西陈醋,镇江香醋),其中以桑椹醋的清除作用最强。

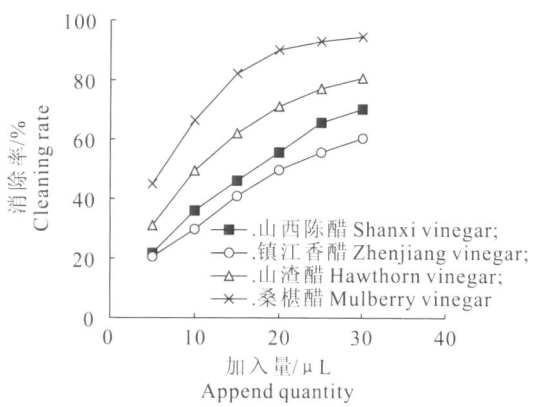

图 8　不同食醋对 DPPH 的清除作用

Fig. 8　DPPH eliminating ability of different vinegars

3　结论与讨论

大量的试验表明,直接利用天然野生酵母进行酒精发酵是安全可靠的。本试验发现,刚刚采收的桑椹果实表面带有较多的酵母菌,而很少有其他杂菌,在酒精发酵过程中,可直接利用桑椹自身携带的野生酵母菌进行发酵。在厌氧发酵的条件下,酵母菌会很快活跃起来,从而抑制了其他好氧菌的活动。发酵 48 h 左右酵母菌数达最大值,为 3.20×10^7 mL⁻¹。在酒精发酵过程中,前期酵母菌数量增加缓慢,24 h 后酵母菌数量增加较快,发酵液糖度迅速下降,酒度迅速上升。在 20～25 ℃室温下自然发酵时,物料温度(28～30 ℃)高于室温,是酵母菌发酵的适宜温度。

本研究发现,桑椹红色素在酸性条件下呈鲜红色,在碱性条件下呈墨绿色,在总酸测定时,可在不加酚酞指示剂的条件下,利用其自身色素颜色变化

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

作为酸碱滴定终点判断的依据直接进行酸碱滴定。但在实际操作时,要注意积累经验,准确把握到达滴定终点时的颜色变化程度。

采用自回淋醋酸发酵罐进行果醋的液态发酵时,菌床的培育是关键环节。用作菌床的材料应是无色无味无毒副作用的天然疏松物料,玉米芯是经济实惠的常用材料,一般选用白色玉米芯较好,在使用前需要对其进行严格的加工处理和杀菌。本研究结果表明,在菌床培养过程中,前48 h之内发酵液酸度只有微小变化,这是由于此时的醋酸菌处于适应期;培养48 h后,发酵液酸度上升速度加快,表明醋酸菌已处于活化状态,进入对数生长期;大约到8 d之后,发酵速度变慢,醋酸菌逐渐进入成熟期。菌床培育一般需要9～10 d左右。

在桑椹醋生产的醋酸发酵过程中,酸度呈持续升高趋势,酸度随时间的变化可用二次多项式来表征,即 $\hat{Y} = 3.1967 + 0.1526X - 0.0028X^2$, $R^2 = 0.9978$, $(P < 0.01)$。发酵初期酸度上升速度快,随着发酵时间的延长,酸度上升速度逐渐减慢,24 h时达到最大值,其后不再升高。在指定时间的理论发酵速度可用方程 $Y_{理论} = -0.0056X + 0.1526$ 来表述。在生产过程中,酸度的变化趋势与菌床培育过程中的变化趋势有很大差别,这是由于菌床培育初期整个发酵系统仅有少量的醋酸菌,这些醋酸菌需要经过适应和繁殖期,才能充分活化而达到足够的数量。而在生产过程中采用分批留种的方法,保证了系统中留有大量充分活化的醋酸菌,提高了产酸速度。随着发酵时间的延长,产酸速度由高变低,其原因主要是酒精不断消耗和产物不断累积所致。

本研究表明,果醋的总黄酮含量明显高于粮食醋,桑椹醋的黄酮含量高达6.68 mg/mL,对DPPH自由基有很高的清除效率。

与固态发酵相比,采用自回淋发酵罐进行醋酸液态发酵,具有发酵周期短、生产效率高、干净卫生、便于实现机械化和规模化生产等优点。由于在生产中不添加其他副料,可以保证产品的原有风味,进而为果醋的调配奠定了良好的基础。

致谢:本研究承蒙杨凌圣桑公司和汉阴县人民政府的大力支持,深表谢意!

[参考文献]

[1] 王春霞,王 敏,鲁梅芳,等.新一代健康饮品——果醋[J].食品工业科技,2002,23(4):78-79.

[2] 黄仲华.我国食醋工业的现状和发展前景[J].江苏调味副食品,1999(1):3-7.

[3] 李时珍.本草纲目[M].北京:人民卫生出版社,1982:2066-2067.

[4] Yang X L, Anti-senescence activity of mulberry fruit[C]// Harold Corke. Proceedings of the First International Conference on Asian Food Product Development. New York: Science Press, 1998:388-392.

[5] 郭 伟,钟承民.新疆黑白桑椹及喀什小壁抗诱变研究[J].环境与健康,1998,15:18-20.

[6] 杨小兰,杜青平,高 应.黑桑椹对大鼠细胞膜脂质过氧化作用的影响[J].营养学报,2002,24(4):428-430.

[7] Jia Z S, Tang M C, Wu J M. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radical[J]. Food chemistry, 1999, 64:555-564.

[8] 金 杰,李志西,张 锋,等.桑椹醋提取物抗氧化性的研究[J].中国酿造,2005(10):20-22.

[9] 金 杰,李志西,张 锋,等.桑椹醋提取物对二苯代苦味酰基自由基(DPPH)的清除作用[J].西北农林科技大学学报自然科学版,2006,34(3):135-137.

[10] 魏宗萍,李志西,于修烛,等.桑椹醋减肥作用的动物试验研究[J].中国酿造,2005(12):5-7.

[11] 程丽娟,薛泉宏.微生物学实验指导[M].西安:世界图书出版公司,2000.

[12] 徐 晶,邓 勇.山渣果醋发酵工艺的试验研究[J].中国农业大学学报,2002,7(2):81-84.

[13] 徐清萍,陶文沂,敖宗华,等.镇江香醋抗氧化活性成分来源分析[J].食品与发酵工业,2005,31(3):33-36.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net