

蜂蜜乳酸发酵饮料的研制

山西大学生物系 杨晓兰

摘 要

本饮料是以蜂蜜、蔗糖、麦芽、酒花为原料,采用异型乳酸菌和酵母菌共生发酵而酿制的非酒精饮料(酒精含量 $<1\%$)。发酵工艺为一次发酵法,生产周期5~7天。本饮料中不添加任何化学添加剂,如香精、色素、糖精、防腐剂等。以微生物产香代替人为添加香精,以微生物产酸代替人为添加酸味剂—柠檬酸,以酒花和乳酸的天然防腐力代替人为添加化学防腐剂。

前 言

随着人们生活水平的提高,对饮料的要求越来越向着“天然、营养、保健”的方向发展。发酵软饮料的色、香、味、营养成分纯系发酵工艺产生,饮料中不需使用任何化学添加剂,因而产品质量,保健效果远比各种靠添加剂配制的饮料要好。

近年来,我国的养蜂业有了较大发展,有些地区蜂蜜出现盛产滞销状况。利用这些丰富的蜂蜜资源,采用对人体有益的微生物乳酸菌、酵母菌、经过发酵工艺、酿制出色、香、味独特的饮料产品。

材料与amp;方法

一、主要原料

1. 蜂蜜:未经加工的采集原蜜(荆条蜜);
2. 麦芽:酿造啤酒用粉碎麦芽;
3. 酒花:酿造啤酒用香型酒花。

二、微生物菌种

1. 供试菌种

实验中使用了五株乳酸菌、编号为B¹、B²、B³、B⁴、B⁵;五株酵母菌,编号为A¹、

A²、A³、A⁴、A⁵。

2. 培养基

- (1) 西红柿酵母膏乳酸菌增殖培养基;
- (2) 麦芽汁酵母增殖培养基;
- (3) 乳酸菌驯化培养基。

三、主要工艺流程

四、工艺(见流程图)

1. 糖化控制

① 麦芽加水比为1:5;

② 浸酶:物料在糖化锅中与30℃保持1小时;

③ 蛋白质分解:糖化锅升温至45~55℃,保温1小时;

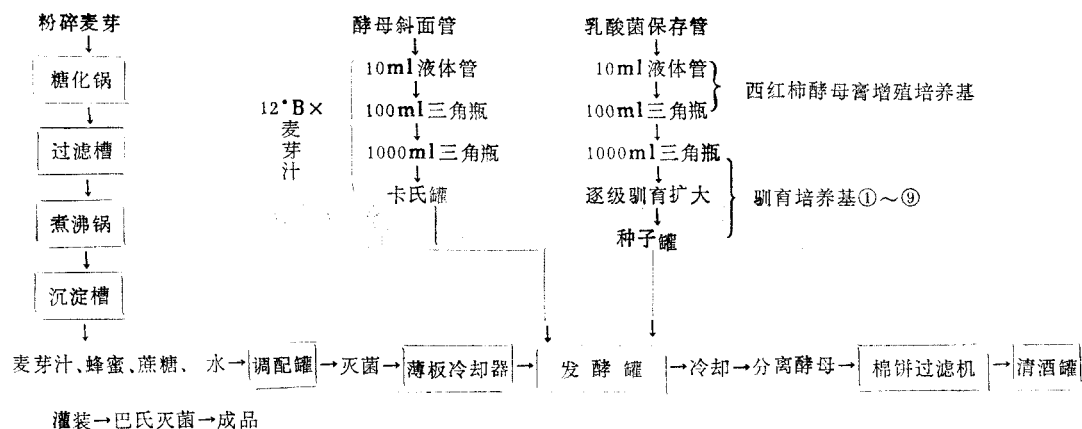
④ 糖化:糖化锅升温65~68℃,保温2-3小时,直至糖化完全无碘色反应为止;

⑤ 灭酶:糖化锅升温80~90℃,维持10分钟;

⑥ 糖化醪打入过滤槽进行过滤洗槽,洗水不能碱性;

⑦ 过滤麦汁打入煮沸锅煮酒花;

⑧ 麦汁沉降滤除酒花:煮好的麦汁以切线方向进入沉降槽,静置40~60分钟,析出蛋白质单宁沉淀及酒花一起沉降于锥底,槽上部为



工艺流程图

制得的清亮麦汁。

2. 发酵及后加工

将糖化好的麦汁与一定比例的蜂蜜、蔗糖、软化无菌水在配料罐中混匀，加热灭菌处理；80~90℃，10~20分钟。立即通过薄板冷却器冷却至25~28℃送入发酵罐，接种已培养好的乳酸菌种子罐培养液及酵母菌卡氏罐培养液，然后进行密闭保压恒温发酵，发酵温度靠罐内盘管换热器维持恒定。在发酵开始前取样测定发酵液的糖度及酸度，发酵开始后定时测定糖度、酸度、酒度。当发酵罐压力达到2~2.5 kg/cm²，发酵液酸度达到消耗2~2.5 ml 1N氢氧化钠/100 ml 发酵液，酒精含量不超过0.8% (W/W)，二氧化碳含量大于0.35% (V/V) 时，立即结束发酵。盘管换热器中通入冷却水使发酵液很快降温至-2℃左右，并维持一定时间使发酵菌体凝聚沉降于发酵罐锥底，并通过酵母分离器将菌体排出罐外。罐内的上清液用棉饼过滤机过滤至清亮透明无杂质，进入清酒罐暂贮，然后送入啤酒灌装机装瓶后进行巴氏灭菌，即为成品饮料。

灭菌方式：水浸式。

灭菌温度 (℃): 45 65 45 35 25-10

停留时间 (分): 15 35 10 10 10-10

五、分析检测方法

1. 总酸测定：氢氧化钠中和法直接测定 [2]；

2. 还原糖测定：采用快速法 [3]；

3. 二氧化碳测定：EC—I型CO₂测定仪；

4. 酒精测定：重铬酸钾氧化法 [4]；

5. 干物质含量：WYT—5型手持糖量折光仪。

六、实验主要设备

1. 麦芽糖化设备一套：糖化锅，煮沸锅，过滤槽，沉淀槽，为啤酒生产定型设备；

2. 菌种扩大培养罐200 l，2个，夹套换热装置；

3. 立式锥底密闭发酵罐、自制、总容积3吨，盘管换热装置；

4. 制冷机一台；

5. 棉饼过滤机一台；

6. 灌装机一台；

7. 调配罐、清酒罐各一个，自制。

以上设备均由山西省侯马市新田啤酒厂提供。

结果与分析

一、乳酸菌的选育

乳酸菌在发酵饮料中除积累乳酸外，还能改善饮料的风味，生成一些对人体有益的营养成分 [5]。选育性能优良的乳酸菌是本课题的关键。本实验收集了5株用于食品工业上的乳酸菌，进行驯化与筛选试验。乳酸菌有自己适宜的培养基，为了适应发酵蜂蜜麦汁，必须经过递增蜂蜜麦汁浓度的培养基逐代扩大培养，才能成为能发酵蜂蜜麦汁、并产生良好风味的生产菌种。驯育方法如下 [6]：将乳酸菌种殖培养基与

蜂蜜麦汁分别按如下比例混合:①5:1; ②4:1、③3:1、④2:1、⑤1:1、⑥1:2、⑦1:3、⑧1:4、⑨1:5, 8磅30分钟灭菌, 即为驯化培养基。将5株乳酸菌先在各自适宜的种植培养基中培养48小时, 30~35℃, 以达到活化状态, 然后分别接入①号驯化培养基中培养成熟, 再以此为表1。

项目 菌种	培养基主要成分	总酸 (ml)	乳酸 (ml)	醋酸 (ml)	乳酸/总酸	风味、口感
B ¹	蜂蜜、麦汁	9.9	9.3	0.6	94%	风味好、酸感柔和, 无不良味道。
B ²	蜂蜜、麦汁	13.1	12.7	0.4	97%	馊味明显, 尖酸涩。
B ³	蜂蜜、麦汁	0.5	—	—	—	无不良异味, 但几乎不发酵。
B ⁴	蜂蜜、麦汁	13.3	—	—	—	馊味大、微尖酸涩。
B ⁵	蜂蜜、麦汁	16.9	—	—	—	馊味大、尖酸涩。

注: 总酸定量: 10ml发酵液消耗0.096N氢氧化钠毫升数;

再换算成同总酸相同单位数值。

从产酸量比较: B⁵>B⁴>B²>B¹>B³,

从风味口感比较: B¹>B³>B⁴>B²>B⁵。

结论: B³号乳酸菌不适宜在非乳糖培养液中生长和发酵; B²、B⁴、B⁵号乳酸菌产酸虽高但风味较差、馊味太大, 口感不柔和, 所以, B²、B³、B⁴、B⁵号乳酸菌全部淘汰; B¹号乳酸菌风味好产酸适中, 酸感柔和协调, 能满足发酵饮料的要求, 确定B¹号乳酸菌为生产

种母接入②号驯化培养基中, 如此重复, 最后以⑨号的成熟醪为驯化好的使用菌种。

经上述驯育的乳酸菌B¹、B²、B³、B⁴、B⁵分别接入蜂蜜麦汁发酵液中, 30—35℃, 发酵四天, 风味及产酸结果见表1。

乳酸醋酸定量: 为气相色谱仪分析结果,

使用菌株。

二、酵母菌的筛选

酵母菌在发酵过程中能产生许多付产物, 给发酵液带来独特的香味和充足的CO₂气体, 本试验对酵母菌的要求是: 发酵速度快、凝聚性强、发酵风味好。将5株选定的酵母菌用12°Bx麦汁活化培养, 温度28~30℃, 时间24~28小时, 然后, 分别接入麦汁蜂蜜液中, 在同样条件下发酵, 结果如表2。

表2。

项目 菌种	培养基成分	始糖 Bx	残糖 Bx	耗糖 Bx	发酵率 %	CO ₂ 量 g	凝聚性	风 味
A ¹	蜂蜜、麦汁	12	8.8	3.2	26.6	2.7	+++	啤酒与蜂蜜的复合香味, 厚实协调
A ²	蜂蜜、麦汁	12	10.1	1.9	15.8	1.5	+	蜂蜜味突出, 淡薄
A ³	蜂蜜、麦汁	12	8.5	3.5	29.2	3.0	+	果香味, 有似硫黄味
A ⁴	蜂蜜、麦汁	12	8.3	3.7	30.8	3.1	++	酵母香味、馊味大
A ⁵	蜂蜜、麦汁	12	11.5	0.5	4.2	0	+	酯香, 不协调

注: 凝聚性是以发酵结束液置于4℃冰箱24小时, 观察酵母沉降情况;

CO₂量为三角瓶带发酵栓称量法测定。

从发酵速度比较: A⁴>A³>A¹>A²>A⁵,

从凝聚性比较: A¹>A⁴>A²≈A³≈A⁵;

从风味比较: A¹>A²>A⁴>A³>A⁵。

结论: A⁵为酯香酵母、发酵速度低, 风味也不协调, A³和A⁴虽发酵速度快, 但风味及凝聚性都不好, A²风味好, 但发酵较慢, 并且凝聚性不好, 不利于饮料澄清, 故A²、A³、A⁴、A⁵号酵母菌全部淘汰。A¹号酵母

发酵速度, 风味、凝聚性都较好, 确定A¹号酵母菌为生产使用菌株。

A¹号酵母形态特征:

在麦芽汁中生长培养24小时后, 细胞椭圆形, 细胞分散, 芽殖, 细胞大小: 3~5×7~10μm, 生成沉淀, 无环。培养二个月后生成薄皮膜。在麦芽汁琼脂斜面培养基上, 菌落浅黄色奶油状, 质软, 具光泽, 生微细绉纹, 边缘生细的锯齿状, 难形成孢子。

生理生化特征:

能发酵葡萄糖、半乳糖、蔗糖、麦芽糖及全部棉子糖, 不同化硝酸盐。

最适生长温度: 25~28℃, 最适pH3~4.5, 该菌经逐级转接活化培养, 能对蜂蜜麦芽汁发酵产生良好的风味, 并且起发速度快, 发酵力可达1000~1400。

注: 发酵力测定: 采用Nage li 改良法, 以10g压榨酵母在30℃发酵3小时排出CO₂的毫升数[7]。

三、不同配方的发酵试验

试验中, 我们发现, 发酵液的配方有变化时, 对酵母菌的发酵力影响不太大, 但对乳酸菌B¹却有很大影响。将经过驯育的乳酸菌B¹号同时接入不同配方的发酵液中, 30~35℃发酵7天, 其结果如表3。

表3.

菌 种	发酵液配方	产 酸 (ml)					风 味
		0天	1天	3天	5天	7天	
B ¹	蜂蜜麦 糖汁	1.2	2.8	6.0	7.3	8.4	良好, 无异味
	蜜糖麦 酒花汁	1.2	1.4	1.6	1.7	1.7	近于不发酵
	蜂蜜麦 酒花汁 酵母膏	1.2	2.6	5.4	8.0	8.2	有明显酵母膏味, 不愉快。

结果分析: 由表3可以看出, 乳酸菌B¹号在有酒花的发酵液中产酸极微量, 近乎于不发酵说明酒花能抑制乳酸菌的生长发酵(具体机理待研究)。但是添加适量酵母膏做营养素则能抵消酒花对乳酸菌的抑制作用, 使之较好地生长发酵。但作为饮料在风味上不佳, 有明显的酵母膏的不愉快味道。

四、共生

生物学上, 两种以上微生物共存, 互相影

响, 会产生共生或拮抗现象, 发酵时多利用共生现象, 以提高生成风味物质和生成酸的能力, 可得到含酸量高和风味物质多的发酵饮料[8]。为此, 我们进行了单菌种发酵和混合菌种共生发酵对比试验: 将乳酸菌B¹和酵母菌A¹分别按①B¹; ②A¹; ③A¹+B¹的组合形式接入蜂蜜麦汁中同样条件下进行发酵, 发酵结束后的检测结果如表4。

由表4看出, 在有酒花的发酵液中乳酸菌

表4.

发酵液配方	菌 种	发酵前 酸度 (ml)	发 酵 后 酸度 (ml)	酒精 %	CO ₂ %	备 注
蜂蜜麦 糖汁 酒花	B ¹	0.3	0.6	—	—	近于不发酵
	A ¹	0.3	0.8	0.4	0.35	酸味不足, 发酵速度较慢
	B ¹ +A ¹	0.3	2.02	0.63	0.6	产酸高, 发酵速度快, 风味好于单菌种

几乎不发酵,如果添加酵母菌与乳酸混合发酵,则能恢复乳酸菌的产酸力并且也能提高酵母的发酵速度(CO_2 生成量提高了),同时也改善了发酵液的风味。原因:①、由表3可知,酵母膏能抵消酒花对乳酸菌的抑制作用,当 B_1 与酵母菌混合发酵时,某些酵母菌体的自溶起到了酵母膏提供氮源的增殖作用;②、 A^1 号酵母菌生长环境偏酸性,在混合菌种发酵时,乳酸菌产酸积累到一定程度,使发酵液pH值下降呈酸性,为 A^1 创造了适宜pH的环境,提高了发酵速度;③、据资料报导[9]:乳酸菌和酵母菌是异属菌,二者混合发酵会生成较多的酸、乙醛、双乙酰、酯酚乙酯、乳酸乙酯等香味成分,改善饮料的风味。例如:将乳酸菌和酵母菌按1:1比例混合培养五小时生成22ppm乙醛,而单独培养乳酸菌生成乙醛只有4~10ppm。因此。在发酵饮料中采用乳酸菌与酵母菌共生发酵效果好于单菌种发酵。

五、产品质量检测及品尝结果

1. 理化指标

总酸(以乳酸计) 1.7g/l

干物质含量 81.9g/l

CO_2 含量(W/W) 0.35%

酒精含量(V/V) 0.55%

2. 卫生指标

细菌总数(个/ml) 3

大肠菌群(个/100ml) <3

致病菌 未检出

铅(mg/kg) <1

铜(mg/kg) <10

砷(mg/kg) <0.5

黄曲霉毒素 B_1 ($\mu\text{g/kg}$) <5

检测结果,卫生指标符合国家发酵酒啤酒卫生标准GB-2758-81;符合国家软饮料卫生标准GB2759-81。

3. 品尝结果

经省级啤酒评酒委员们品评:色泽淡黄,清亮透明,泡沫洁白细腻,持久挂杯,有明显的蜂蜜香气,饮后酸甜适中,清快爽口,饮后心情舒

畅,是一种具有清凉、滋补、开胃健身之饮品。

讨 论

1. 生产蜂蜜发酵饮料所用的菌种为异型乳酸菌 B^1 号和酵母菌 A^1 号。这两株菌较泼辣,适应性强,发酵速度快,产酸适中,产酒精低发酵产物风味良好,是生产发酵饮料的合适菌种。

2. 酒花对乳酸菌 B^1 号有抑制发酵的作用,但添加适量酵母膏做营养剂则可抵消酒花的抑制作用,机理待进一步探究。

3. 实验过程得出:乳酸菌 B^1 号和酵母菌 A^1 号混合发酵能提高产酸力、加快发酵速度,改善发酵的风味,并抵消酒花对乳酸菌的抑制作用。

4. 该饮料除保持蜂蜜本身的营养及药用特点外,用乳酸菌、酵母菌发酵还会产生新的营养成分(氨基酸、维生素,有机酸等)及某些生理活性物质,对人体有一定的保健作用,如调节人体肠胃功能,帮助消化。抑制肠道细菌等[9]。该饮料不需添加任何化学添加剂,同时,其酒精含量极低(不超过1%V/V),既有啤酒的风格,有丰富的泡沫,又有蜂蜜与乳酸的甜酸口感,因此,比啤酒更易为广大妇女儿童所接受,也非常适合那些对饮酒有限制但又嗜好啤酒的人员如司机、运动员所饮用。

参 考 文 献

- [1] 张柏青:蜂蜜及其发酵饮料,食品科学,(3),42-47,1984。
- [2] 上海酿造研究所主编:发酵调味品生产技术,轻工业出版社,北京,1976。
- [3] 无锡轻院、天津轻院等:工业发酵分析,轻工业出版社,北京,1980。
- [4] 山西食品工业研究所:白酒分析检验,山西食品发酵,(2):18-20,1976。
- [5] (日)特许公报,昭55-3781,153~155。
- [6] 喻致祥等:混种发酵生产乳酸豆乳饮料的研究,工业微生物,(2):3~6,1988。
- [7] 大连轻院,无锡轻院等:酿造酒工艺学,轻工业出版社,北京,1980。
- [8] 张柏青译:格瓦斯饮料新工艺,中国食品出版社,北京,1987。
- [9] 李霁:蛋白乳酸发酵饮料的研制,软饮料工业,(1),1991。