

酸浆最适自然发酵条件优化

赵贵丽, 罗爱平*, 廖娅凡, 吴红满, 杨洁, 宋志敏
(贵州大学生命科学学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 以大豆黄浆水为培养基质, 产酸量、pH值为考察指标, 探讨不同发酵温度、发酵时间、种子液接种量、葡萄糖添加量对黄浆水自然发酵产酸的影响。在单因素试验的基础上, 采用均匀设计法对其发酵条件进行优化, 并对产酸量进行二次多项式逐步回归分析。结果表明: 黄浆水最适自然发酵条件为: 发酵温度37℃、种子液接种量3%、发酵时间46h、葡萄糖添加量2g/100mL、初始pH6.2, 此条件下产酸量达0.7815g/100mL。

关键词: 酸浆; 自然发酵; 产酸量; 均匀设计; 优化

Optimization of Natural Fermentation Conditions for Yellow Serofluid

ZHAO Gui-li, LUO Ai-ping*, LIAO Ya-fan, WU Hong-man, YANG Jie, SONG Zhi-min
(College of Life Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: Natural fermentation of soybean yellow serofluid for acid production was investigated. Fermentation conditions including temperature, time, inoculum amount and glucose addition were optimized by uniform design to obtain the optimum acid production and pH. Quadratic polynomial regression analysis showed that the optimum fermentation conditions were 37 °C, inoculum amount of 3%, 46 h, 2 g/100 mL glucose, initial pH 6.2. The maximum acid production under these conditions was 0.7815 g/100 mL.

Key words: Suanjiang (fermented soybean yellow serofluid); natural fermentation; acid production; uniform design; optimization

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)17-0201-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201317043

酸浆是以生产豆腐时压制产生的黄浆水为发酵原料, 经多种微生物混合自然发酵而成的天然凝固剂^[1-2]。酸浆制作的豆腐是我国民间的一种传统豆制品, 其感官品质与盐卤、石膏等化学凝固剂制作的豆腐相比, 具有保水性好、质地细腻、口味清淡、略带甘甜的优点, 深受广大消费者的青睐^[3-6]。

酸浆的凝固机理是酸凝, 故提高其产酸量显得尤为重要。黄浆水中含0.25%~0.4%蛋白质、0.1%还原糖和多糖类物质^[7]。作为微生物发酵基质所得生物量有限。据报道^[8], 黄浆水中C/N约为10:1~15:1, 而一般培养基的C/N为100:0.5~100:2.0, 故黄浆水中碳氮比过低, 仅需要补充一定量的碳源即可满足微生物的正常生长繁殖。

本研究在未经过任何处理的新鲜黄浆水中添加葡萄糖作为碳源自然发酵, 以产酸量为考察指标, 采用均匀设计法优化其葡萄糖添加量及自然发酵条件, 以期提高黄浆水的产酸量, 为以黄浆水为发酵基质制作天然凝固剂提供理论依据。同时, 有效减轻废水治理负荷, 为企业治污减轻负担。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

新鲜黄浆水: 生产豆腐的副产物, 由贵州中意食品有限责任公司提供。

葡萄糖 保龄宝生物股份有限公司; 氢氧化钠(分析纯) 重庆茂业化学试剂有限公司。

LRH系列生化培养箱 上海一恒科技有限公司; CS202B型电热保温干燥箱 重庆实验设备厂; SZ-96型自动纯水蒸馏器 上海亚荣生化仪器厂; PHS-3C型酸度计 上海佑科仪器仪表有限公司。

1.2 方法

1.2.1 种子液的制备

新鲜黄浆水中加入4g/100mL的葡萄糖, 调整初始pH值为6.2, 37℃自然发酵24h, 即为种子液, 备用。

1.2.2 单因素试验设计

1.2.2.1 发酵温度

收稿日期: 2013-04-09

基金项目: 贵阳市科技计划项目(筑科合同[2012102]3-26号); 贵阳市“星火计划”项目([2010]筑科农合同字第3-08号)

作者简介: 赵贵丽(1989—), 女, 硕士研究生, 主要从事食品加工与贮运保鲜技术研究。E-mail: zgl199013@126.com

*通信作者: 罗爱平(1958—), 女, 教授, 学士, 主要从事食品加工研究与开发。E-mail: luoaiping58@126.com

固定种子液接种量6%、葡萄糖添加量4g/100mL、发酵时间24h、初始pH6.2, 发酵温度分别为27、30、34、37、42℃, 以产酸量、pH值为指标, 考察发酵温度对黄浆水自然发酵的影响。

1.2.2.2 发酵时间

固定种子液接种量6%、葡萄糖添加量4g/100mL、发酵温度37℃、初始pH6.2, 改变发酵时间为24、48、72、96、120h, 以产酸量、pH值为指标, 考察发酵时间对黄浆水自然发酵的影响。

1.2.2.3 葡萄糖添加量

固定种子液接种量6%、发酵温度37℃、发酵时间24h、初始pH6.2, 改变葡萄糖添加量为0、2、4、6、8、10g/100mL, 以产酸量、pH值为指标, 考察葡萄糖添加量对黄浆水自然发酵的影响。

1.2.2.4 接种量

固定葡萄糖添加量为4g/100mL、发酵温度37℃、发酵时间24h、初始pH6.2, 改变种子液接种量为3%、6%、9%、12%、15%, 以产酸量、pH值为指标, 考察接种量对黄浆水自然发酵的影响。

1.2.3 均匀设计

在单因素试验的基础上, 对黄浆水自然发酵条件进行优化。以发酵温度、种子液接种量、发酵时间3个因素为自变量, 以产酸量为响应值, 利用DPS软件设计三因素五水平10个试验处理的均匀试验^[9-11], 即 $U_{10}(5^3)$ 。

1.2.4 指标测定

1.2.4.1 产酸量的测定^[12]

取5mL发酵液至250mL的三角瓶中, 加入25mL蒸馏水, 再加2滴0.1%的酚酞, 摇匀, 用0.01mol/L的NaOH标准溶液滴定至微红色, 30s不褪色即为终点。

$$\text{产酸量}/(\text{g}/100\text{mL}, \text{以乳酸计}) = \frac{c \times (V - V_0) \times K \times 100}{V_1}$$

式中: c 为NaOH标准溶液的浓度/(mol/L); V 为滴定待测样消耗NaOH标准溶液的体积/mL; V_0 为滴定原样消耗NaOH标准溶液的体积/mL; V_1 为取样量/mL; K 为酸换算系数, 用乳酸表示, $K=0.090$ 。

1.2.4.2 pH值

采用PHS-3C酸度计测定。

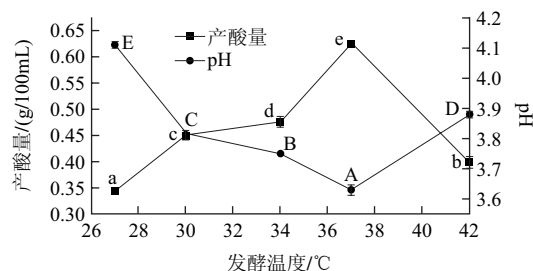
1.3 数据处理

采用统计分析软件IBM SPSS Statistics v19.0.0进行显著性分析。折线图采用Origin Pro 8.5绘图软件绘制。均匀试验数据采用DPS软件进行二次多项式逐步回归分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 发酵温度对黄浆水自然发酵的影响



小写字母不同表示产酸量各组之间呈差异显著($P<0.05$); 大写字母不同表示pH值各组之间呈差异显著($P<0.05$)。下同。

图1 不同发酵温度对发酵黄浆水的影响

Fig.1 Effect of fermentation temperature on fermented yellow serofluid

由图1可知, pH值随发酵温度的升高呈先下降后上升趋势; 当发酵温度为37℃时, pH值达最小值3.63, 即酸性最强。当发酵温度为27~37℃时, 产酸量随发酵温度的升高而升高; 37℃时, 产酸量达到最大值0.6262g/100mL, 比27℃组最小值0.3442g/100mL提高81.93%, 表明37℃适宜黄浆水自然发酵产酸, 产酸量显著高于其余各组($P<0.05$); 当温度由37℃升至42℃时, 产酸量显著降低, 这可能是由于温度过高, 抑制产酸菌的生长所致。故37℃是黄浆水自然发酵产酸的最佳培养温度。

2.1.2 发酵时间对黄浆水自然发酵的影响

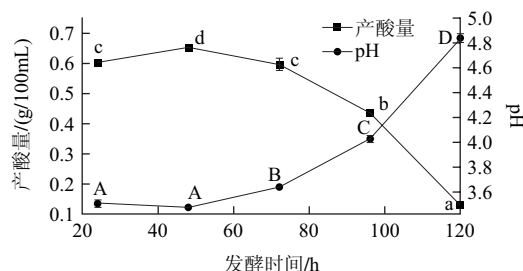


图2 不同发酵时间对发酵黄浆水的影响

Fig.2 Effect of fermentation time on fermented yellow serofluid

由图2可知, 当发酵时间由24h升至48h时, pH值缓慢下降; 当发酵时间为48h时, pH值达到最低; 当发酵时间为48~120h, pH值随发酵时间的延长而显著上升。当发酵时间由24h延长至48h时, 产酸量显著上升; 发酵时间为48h时, 产酸量达最大值0.6523g/100mL是120h组最小值0.1325g/100mL的4.92倍, 显著高于其余发酵时间组($P<0.05$); 随后产酸量随发酵时间的延长而显著降低。表明适宜发酵时间会促进菌株生长繁殖, 从而提高产酸量。结果表明, 黄浆水自然发酵时间以48h为宜。

2.1.3 葡萄糖添加量对黄浆水自然发酵的影响

黄浆水自然发酵中主要产酸菌是乳酸菌^[13-16]。据郑

志^[17]报道,乳酸菌利用还原糖能够较好地发酵产酸。故本实验选择葡萄糖为碳源。由图3可知,未添加葡萄糖时,pH值达最大值;当葡萄糖添加量由0g/100mL升至2g/100mL时,pH值显著下降,表明添加葡萄糖能够促进黄浆水发酵产酸;当葡萄糖添加量为4g/100mL时,pH值达到最低;当葡萄糖添加量为4~10g/100mL时,pH值缓慢上升,趋于平稳。未添加葡萄糖时,产酸量达最小值;当葡萄糖添加量由0g/100mL升至2g/100mL时,产酸量显著上升,表明添加葡萄糖能够促进黄浆水发酵产酸,与pH值得出结果一致;葡萄糖添加量为4g/100mL时,产酸量达到最大为0.6433g/100mL,是未添加葡萄糖组最小值0.3221g/100mL的2.00倍;当葡萄糖添加量为2~10g/100mL时,产酸量差异不显著($P>0.05$)。结果表明:添加葡萄糖对黄浆水发酵产酸影响显著($P<0.05$);从提高产酸量和节约成本两方面考虑,确定葡萄糖添加量为2g/100mL。

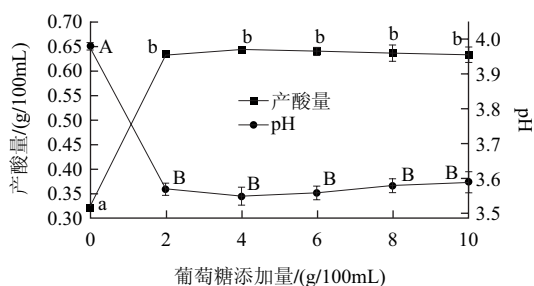


图3 不同葡萄糖添加量对发酵黄浆水的影响

Fig.3 Effect of glucose addition amount on fermented yellow serofluid

2.1.4 种子液接种量对黄浆水自然发酵的影响

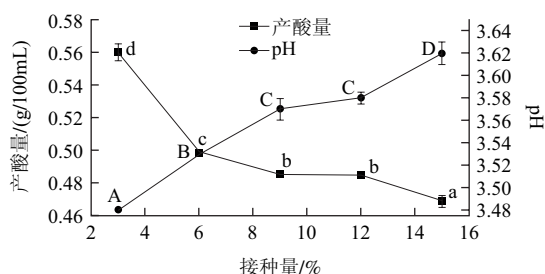


图4 种子液接种量对发酵黄浆水的影响

Fig.4 Effect of inoculum amount on fermented yellow serofluid

由图4可知,随着种子液接种量的不断增加,pH值不断上升;种子液接种量为3%时,pH值最低,酸度最高,产酸量达最大值,显著高于其余各种子液接种量组($P<0.05$),适宜黄浆水自然发酵产酸;当种子液接种量由3%升至6%时,产酸量显著下降;种子液接种量为6%~15%时,产酸量缓慢下降。表明种子液接种量以3%为宜。

2.2 均匀设计试验结果

表1 均匀设计试验结果
Table 1 Uniform design and results

试验号	X_1 发酵温度/℃	X_2 种子液接种量/%	X_3 发酵时间/h	Y 产酸量/(g/100mL)
1	2(30)	5(15)	1(24)	0.5364
2	5(42)	4(12)	2(48)	0.4216
3	2	3(9)	3(72)	0.7006
4	3(34)	2(6)	3	0.7156
5	5	2	4(96)	0.4007
6	1(27)	4	5(120)	0.5357
7	4(37)	1(3)	5	0.4195
8	3	5	1	0.5572
9	4	3	4	0.5174
10	1	1	2	0.5697

均匀设计试验方案及结果见表1。对表1试验结果经DPS软件数据处理系统进行二次多项式逐步回归分析,得回归方程:

$$Y = -3.3123 + 0.1944X_1 + 7.3952X_2 + 0.0186X_3 - 0.0023X_1^2 - 0.00007X_3^2 - 0.2652X_1X_2 - 0.0003X_1X_3 + 0.0071X_2X_3$$

根据相关系数 $R=0.9974$,剩余标准差 $s=0.0233$,表明该模型与实际试验拟合程度很高,能很好地拟合黄浆水自然发酵条件。

经DPS软件二次多项式逐步回归,得出最高指标时各个因素组合为: $X_1=37.02$, $X_2=0.03$, $X_3=46.30$,即发酵温度37.02℃、种子液接种量3%、发酵时间46.30h,此时产酸量最高为0.7949g/100mL。为便于生产应用,调整黄浆水自然发酵条件为发酵温度37℃、种子液接种量3%、发酵时间46h。按照上述条件进行3次验证实验,得产酸量为0.7815g/100mL,达到回归预测理论值(0.7949g/100mL)的98.31%,表明最佳发酵条件可靠,较于海峰等^[18]报道最佳条件下产酸量0.5514g/100mL提高41.73%。

3 讨论与结论

由于制作豆腐时加工条件不同、使用凝固剂不同等原因,导致产生的黄浆水pH值及C/N等不尽相同。酸浆中主要是乳酸菌产酸,适宜乳酸菌生长的MRS培养基初始pH值为 6.2 ± 0.2 ,故将黄浆水初始pH值统一调整为6.2。黄浆水中含少量蛋白质、还原糖等物质,其C/N比约为10:1~15:1,而与一般培养基的C/N为100:0.5~100:2.0相比,影响甚微,可忽略不计。

固定种子液接种量6%、37℃培养24h,初始pH6.2的条件下,添加2g/100mL葡萄糖的黄浆水自然发酵产酸量为0.6346g/100mL,较不添加葡萄糖组0.3221g/100mL提高97.02%,表明添加葡萄糖后,提高黄浆水中C/N,有利于产酸菌发酵产酸,从而提高产酸量。

均匀试验优化黄浆水自然发酵产酸的最佳发酵条件为：发酵温度37℃、种子液接种量3%、发酵时间46h、葡萄糖添加量2g/100mL、初始pH6.2，产酸量达0.7815g/100mL。明显提高了黄浆水自然发酵的产酸量，减少天然凝固剂的使用量，节约生产凝固剂的成本。

参考文献：

- [1] 管立军, 程永强, 穆慧玲, 等. 乳酸菌发酵豆浆制作豆腐得率的研究[J]. 食品科技, 2009(3): 36-41.
- [2] 李里特. 大豆加工与应用[M]. 北京: 化学出版社, 2003.
- [3] 王国良. 酸浆野生菌发酵黄浆水生产天然凝固剂的研究[D]. 济南: 山东轻工业学院, 2005.
- [4] 王荣荣, 王家东, 周丽萍, 等. 豆腐凝固剂的研究进展[J]. 畜牧兽医科技信息, 2006(1): 78-79.
- [5] VIDEROLA C G, MOCCHIUTTI P, REINHEMIER J A. Interactions among lactic acid starter probiotic bacteria used for fermented dairy products[J]. J Dairy Sci, 2002, 85: 721-729.
- [6] WANG A, SUN B, LIU Y, et al. Fermentation of *Candida macedoniensis* in wastewater of Suanjiang Tofu[J]. China Brewing, 2009, 28(10): 44-46.
- [7] 刘平, 李晓峰, 谭新敏. 利用大豆黄浆水发酵生产维生素B₁₂的工艺探索[J]. 陕西科技大学学报, 2003(4): 83-85.
- [8] 岑沛霖, 蔡谨. 工业微生物学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- [9] 郝继伟. 均匀设计法优化超声波辅助提取枸杞多糖的工艺[J]. 光谱实验室, 2011(5): 2493-2497.
- [10] 罗耀辉, 王昭晶. 均匀设计法优化微波辅助提取牛蒡菊糖工艺[J]. 福建农业大学学报, 2006(3): 329-332.
- [11] 吴兰芳, 景永帅, 张振东, 等. 土党参多糖不同提取方法的比较研究[J]. 食品科学, 2012, 33(18): 45-48.
- [12] 王福荣. 工业发酵分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1980.
- [13] 孟克毕力格, 陈平, 王锂韬, 等. 一种豆腐凝固剂酸汤中乳酸菌的分离及其生物学特性的研究[J]. 内蒙古农业大学学报, 2000, 21(3): 89-93.
- [14] NIJU N, ROYCHOUDHURY P K, SRIVASTAVE A. L-(+)-lactic acid fermentation and its product polymerization[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2004, 8: 167-179.
- [15] DATTA R. Technological and economical potential of polylactic acid and lactic acid derivatives[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1995, 16: 221-231.
- [16] WRIGHT B E, LONGACREA R J. Models of metabolism in *Rhizopus oryzae*[J]. J Theor Biol, 1996, 182: 453-457.
- [17] 郑志. 米根霉发酵产L-乳酸的代谢调控研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2007.
- [18] 于海峰, 徐国华, 郭英熙. 酸浆中嗜酸乳杆菌发酵豆腐废水发酵条件的研究[J]. 饲料工业, 2010(7): 22-24.