

多菌株协同发酵豆清饮料工艺优化

欧红艳^{1,2,3}, 赵良忠^{1,2,3*}, 王 容^{1,2,3}, 车丽娜^{1,2,3}, 刘 婷^{1,2,3}

(1. 邵阳学院食品与化学工程学院, 邵阳 422000; 2. 豆制品加工与安全控制湖南省重点实验室, 邵阳 422000; 3. 湖南省果蔬清洁加工工程技术研究中心, 邵阳 422000)

摘要: **目的** 优化豆清饮料的发酵工艺。**方法** 以豆清液为主要原料, 鼠李糖乳杆菌、肠膜明串珠菌、克鲁维酵母按 1:1:1(V:V:V)接种到豆清液中进行发酵, 通过单因素实验, 探究初始 pH、微生物接种量、发酵温度、发酵时间对豆清饮料品质的影响。并以感官评分为响应值对豆清饮料工艺进行响应面优化, 得到最适的发酵条件。**结果** 最佳工艺条件为: pH6.0、接种量 5%(V:V)、发酵温度 28 °C, 发酵时间 22 h, 此时感官评分是 93.9 分。**结论** 产品澄清透明, 有淡淡的酒香, 有刹口感, 回味酸甜。该研究可为豆清液的综合利用以及新型功能性饮料开发提供理论支撑。

关键词: 豆清液; 协同发酵; 响应面

Optimization of multi-strain co-fermentation process for Douqing beverage

OU Hong-Yan^{1,2,3}, ZHAO Liang-Zhong^{1,2,3*}, WANG Rong^{1,2,3}, CHE Li-Na^{1,2,3}, LIU Ting^{1,2,3}

(1. College of Food Science and Chemical Engineering, Shaoyang University, Shaoyang 422000, China; 2. Key Laboratory of Bean Products Processing and Safety Control, Shaoyang 422000, China; 3. Hunan Provincial Engineering Research Center for Fruits and Vegetables Cleaning Processing, Shaoyang 422000, China)

ABSTRACT: Objective To optimize the fermentation technology of soybean clear beverage. **Methods** With bean liquid as the main raw material, and *Lactobacillus rhamnosus* strain, *Lactobacillus rhamnosus* strain and *Kluyveromyces marxianus* strain were inoculated into the bean clear liquid at the ratio of 1:1:1 (V:V:V). The effects of initial pH, inoculum amount, fermentation temperature and fermentation time on the quality of the bean clear liquid were studied by single factor experiment. The sensory score was used as the response value to optimize the fermentation technology by response surface method and get the optimal fermentation conditions. **Results** The results showed that the optimum technological conditions were as follows: pH6.0, inoculation amount 5%(V:V), fermentation temperature 28 °C, fermentation time 22 h, and the sensory score was 93.9 points. **Conclusion** The product is clear and transparent, with light wine fragrance, brake taste and sour and sweet aftertaste. This research can provide theoretical support for the comprehensive utilization of bean clear liquid and the development of new functional drinks.

基金项目: 湖南省研究生科研创新项目(CX2019SY039)、湖南创新型省份建设专项创新平台(2019TP1028)、湖南创新型省份建设专项重点领域研发计划(2019SK2122)、湖南创新型省份建设专项创新平台与人才计划(2019NK4229)

Fund: Supported by Hunan Provincial Innovation Foundation For Postgraduate (CX2019SY039), and Key Research Development Program of Hunan Province (2019TP1028), and Key Research and Development Program of Hunan Province (2019SK2122), and Key Research and Development Program of Hunan Province(2019NK4229).

***通讯作者:** 赵良忠, 教授, 主要研究方向为食品科学技术。E-mail: sys169@163.com

***Corresponding author:** ZHAO Liang-Zhong, Professor, Department of Biological and Chemical Engineering, Shaoyang University, Key Laboratory of Bean Products Processing and Safety Control, Hunan Provincial Engineering Research Center for Fruits and Vegetables Cleaning Processing, Shaoyang 422000, China. E-mail: sys169@163.com

KEY WORDS: bean clear liquid; co-fermentation; response surface

1 引言

大豆是一种营养价值丰富的加工原料,被加工成各种豆制品。豆清液是指点浆工艺中蛋白质变性沉淀时或豆腐倒脑时产生的上清液^[1]。豆清液中含有丰富的营养物质^[2]。目前,企业一般经过简单处理之后当作废液直接排放,对环境污染严重^[3],所以目前豆清液实现零排放并转化为营养价值更高的产品成为发展趋势。Jian^[4]研究不同酵母接种到豆清液中发酵成酒精饮料的发酵特性,并测定其中的风味物质和抗氧化能力。Silvia^[5]运用纳滤工艺浓缩豆清液,并按照比例添加到牛奶中发酵成饮料,并评价其在贮藏时间内的微生物、物理、化学、流变和功能特性。Yong^[6]筛选出一株微生物制备发酵豆清液,并对抗生素敏感性、毒性代谢物进行研究。李丽梅等^[7]运用黄浆水与红枣复配成饮料。豆清液发酵成饮料,国内外已有研究,但是运用乳酸菌与酵母菌协同发酵鲜有报道。

本研究以豆清液为主要原料,通过添加鼠李糖乳杆菌、肠膜明串珠菌、克鲁维酵母进行纯种发酵,得到豆清饮料,并对豆清饮料发酵工艺进行优化,为豆清液的综合利用以及新型饮料开发提供理论支撑。

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

2.1.1 材料与试剂

豆清液、克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus* strain)、明串珠菌(*Leuconostoc marxianus* strain)、鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus* strain)(湖南省果蔬清洁加工重点实验室);大麦芽、麦芽糖、低聚果糖、酒花均为市售;

2.1.2 主要仪器设备

S-3C 型 pH 计(上海理达仪器厂);SW-CJ-2FD 型单人单面垂直净化工作台(江苏通净净化设备有限公司);IS-RDD3 型台式恒温振荡器(上海洪纪仪器设备有限公司);WYT 手持式糖度仪(上海右一时代仪器公司);LA10M 冷冻离心机(湖南赫西仪器装备有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 豆清饮料生产工艺流程

豆清液过滤(200 目)→添加麦芽汁(4.5%)、酒花(0.04%)、低聚果糖(3%)、麦芽糖(6%)→调节 pH(6.0)→灭菌(105 °C、8 min)→接种(鼠李糖乳杆菌、肠膜明串珠菌、克鲁维酵母按体积比 1:1:1,初始菌液浓度为 10⁸ CFU/mL,接种总体积 5%)→发酵(28 °C、60 r/min、22 h)→离心(3000 r/min、20 min)→灭菌(70 °C、20 min)→包装→豆清饮料。

2.2.2 单因素实验

以初始 pH6.0、接种菌株体积比 5%、发酵温度 28 °C、发酵时间 22 h 为基质,以糖酸比以及感官评价为评价指标,采用单因素实验,依次对初始 pH、接种微生物体积、发酵温度、发酵时间进行考察,实验水平分别选择初始 pH 分别为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0;接种微生物体积为 3%、4%、5%、6%、7%;发酵温度为 20、24、28、32、36 °C,发酵时间 18、20、22、24、26 h。

2.3 检测方法

2.3.1 糖酸比

总酸(total acid, TA):参照 GB/T 12456-2008《食品中总酸的测定》^[8]方法,酸碱滴定法进行测定,以乳酸计;糖度(total soluble solid, TSS):手持式糖度仪直接测定^[9]。

2.3.2 感官评价

选择 10~15 名同学作为受试者,要求受试者身体健康,不抽烟酗酒。受试者首先需要在专业人员的指导下品尝指定的一些样品,储备专业知识。经过一番训练之后,从受试者中挑选感官敏锐、表述水平较好的 10 人作为品评人员。具体评分如下图感官评价表 1,最终结果取均值。

表 1 感官评价表
Table 1 Sensory evaluation form

评价项目	评价标准	分值
外观 (20%)	颜色澄清透明,呈现黄绿色,无沉淀与悬浮物	15~20
	澄清透明,色泽呈现绿色,有悬浮物	10~15
	颜色暗淡,呈现黄褐色,有沉淀且浑浊	0~10
香气 (30%)	香气纯正,清爽柔和,淡淡果香味、豆香味、酒香味	20~30
	无明显的果香味、酒香、豆香、有明显枣香气	10~20
	酒香、豆香不足、有很明显的枣香	0~10
口感 (30%)	有汽水刹口感、口感柔和、酸甜适中、协调	20~30
	刹口感不足、口味偏酸、有苦涩味、味道不协调	10~20
	无刹口感、酸涩、令人不悦	0~10
典型性 (20%)	有典型性、风格良好、回味无穷	15~20
	有典型香味、有有点苦涩味	10~15
	无明显典型风格、苦涩味留存时间太久	0~10

2.4 数据处理

实验结果每组重复 3 次,数据采用 Excel 2017 和 IBM SPSS Statistics 22.0 进行图像绘制及处理。

3 结果与分析

3.1 单因素实验结果

单因素实验结果如图 1 所示。乳酸菌最适生长 pH 范围为 5.5~6.0。随着 pH 的增加, 乳酸菌产酸量先增加后减少, 碳源的利用呈现增加后减少的趋势。糖酸比先递减后增长。根据 SPSS 显著性进行分析, pH 为 5.5、6.5、7 时, 感官评分差异不显著。综述选择最适初始 pH 为 5.5。

随着接种量的增加, 豆清饮料的总酸不断上升。总的接种量的增加, 乳酸菌初始活菌数增加, 发酵产酸量递增。如果乳酸菌初始接种量过低, 则产酸不稳定, 造成乳酸菌的生长环境不利, 接种量太大, 酸度上升太快, 不利于口感。综述选择最适接种量 4%(V/V)。

随着发酵温度的增加, 豆清饮料的感官评分先递增后下降, 在 28 °C 时达到最大。温度过低, 乳酸菌产酸能力不足, 由于菌株协调发酵, 酵母菌的生长受到抑制, 则产酯香不足, 感官评分值下降。温度太高, 乳酸菌产酸增强, 酸度过高, 酵母菌的生长受到抑制, 产醇速度下降, 酯生成量也相应的减少, 感官评定值下降^[10]。综述选择最适发酵温度 28 °C。

随着发酵时间的增加, 产酸量不断累积, 酵母菌的生长受到抑制, 从而抑制酵母菌对糖的利用, 可溶性固形物不断上升。所以糖酸比呈现递减, 随着时间的增加, 递减幅度减小。感官评分随发酵时间的增长先不断上升, 到达最高点 20 h 后开始下降。发酵时间过短, 酸度不够, 对酵母菌的抑制不明显, 醇的产生量也上升; 酯类物质的生成量不足, 感官评分下降。发酵时间过长时, 酸度很大, 对酵母菌的抑制作用很大, 醇的产生量也会下降, 酯生成量也不足, 感官评定值下降。综述选择最适发酵时间 20 h。

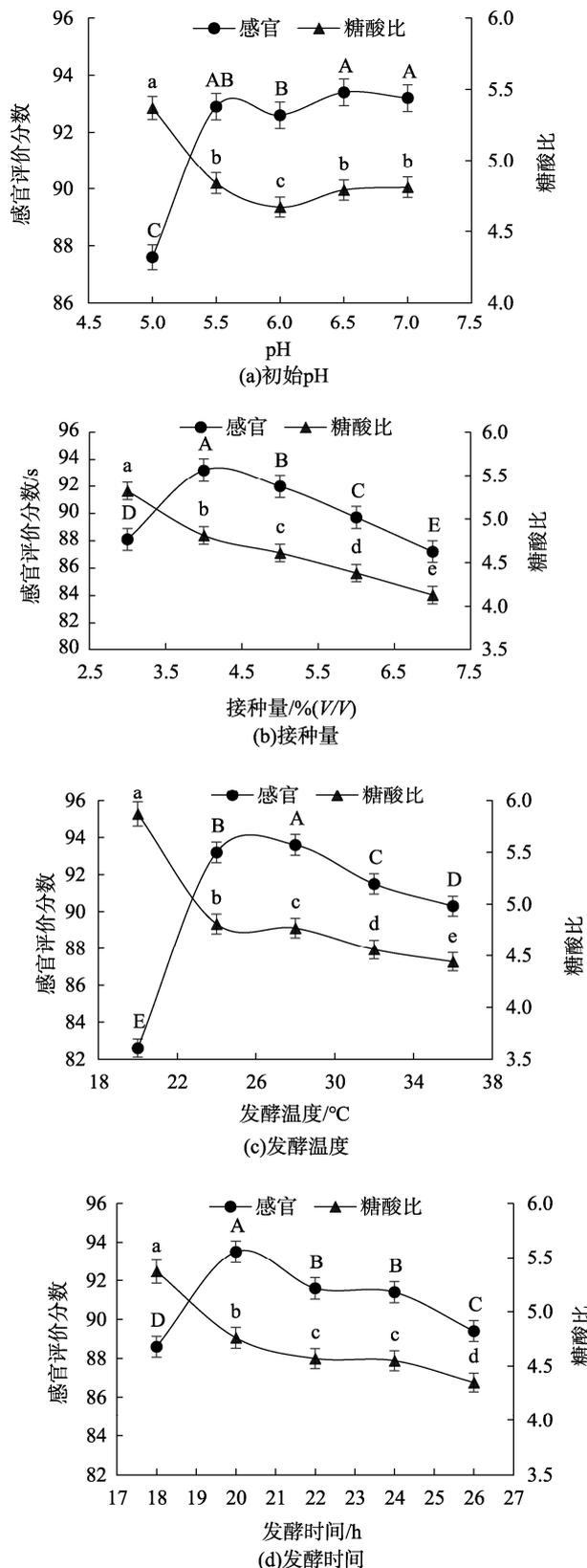
3.2 响应面实验

3.2.1 响应面设计

根据以上 4 组单因素实验结果, 得到最佳的实验条件数据。进行 SPSS 的组间显著性分析, 选择显著性高的 3 组单因素, 以豆清饮料的感官评分为响应值进行响应面优化。实验设计如表 2 所示。

表 2 响应面试验设计表
Table 2 Parameters used in responses surface analysis

水平	A(接种量)/% (V/V)	B(发酵温度)/ °C	C(发酵时间)/h
-1	3	24	18
0	4	28	20
+1	5	32	22



注: 不同字母代表不同水平之间有显著性差异($P < 0.05$)。

图 1 单因素实验结果

Fig.1 Single factor experimental results

3.2.2 响应面分析与结果

根据单因素实验结果,进行 SPSS 组间分析,通过分析得到初始 pH 与接种量、发酵时间呈不显著相关性($P < 0.05$)(r^2 分别为 0.349、0.621)。因此选取接种量(A)、发酵温度(B)、发酵时间(C)进行三因素三水平响应面优化。响应面分析方案与结果见表 3。

表 3 响应面实验因素分析

试验组	A	B	C	Y 感官评分/分
1	3	28	18	87.2
2	4	28	20	91.3
3	4	32	22	88.1
4	3	24	20	85.1
5	4	32	18	86.6
6	5	24	20	89.9
7	5	28	22	93.8
8	3	32	20	84.2
9	5	28	18	92.1
10	4	28	20	91.2
11	4	24	18	87.7
12	4	28	20	91.6
13	4	24	22	88.5
14	4	28	20	90.9
15	3	28	22	88.6
16	5	32	20	88.9
17	4	28	20	90.5

3.2.3 响应面回归模型建立与方差分析

利用 Design-Expert V8.0.6 响应面设计软件对各因素进行回归分析,得到感官评分与各个因素的回归方程的预测模型:

$$Y = +91.10 + 2.45A - 0.42B + 0.67C - 0.025AB + 0.075AC + 0.18BC - 0.69A^2 - 3.39B^2 + 0.013C^2$$

以感官评价为响应值进行方差分析,结果见表 4。显著性检验结果显示,感官评分回归模型差异极显著 $P < 0.0001$,失拟值不显著 $P = 0.8406 > 0.05$,则表明感官评分与各因素之间的线性关系极显著。相关系数 $r^2 = 0.9920$,因变量和自变量之间的线性关系显著,回归方程拟合度较高。模型的校正决定系数 $R_{Adj} = 0.9817$,表明有 1.83% 的情况不能对该模型进行解释。综合得到感官评分(Y)与接种量(A)、发酵温度(B)、发酵时间(C)之间有良好的线性关系,该模型可以很好的对工艺参数进行预测。

在对感官评分的影响上,一次项 A 、 C 和二次项 B^2 均达到极显著水平($P < 0.0001$),一次项 C 和二次项 A^2 达到显著水平($P < 0.05$),其中 AB 、 AC 、 BC 和 C^2 均为不显著因素($P > 0.05$)。根据各因素的 F 值可以得到,各因素对实验结果的影响大小为接种量(A) > 发酵时间(C) > 发酵温度(B)。

3.2.4 交互作用分析

通过 Design-Expert V8.0.6 软件回归模型进行分析,利用三维响应面图直观描述各因素之间的交互作用对感官评分的影响。如图 2 所示,豆清饮料感官评分(Y)随着接种量(A)和发酵时间(B)的增加呈现先升高后下降的趋势,且两者的三维响应面图坡度较陡,显示这 2 个因素对感官评分(Y)的影响较大^[11]。

3.2.5 验证实验结果

由响应面软件可以得到最佳的预测组合是接种量 5%(V/V),初始 pH6.0,发酵温度 27.87 °C,发酵时间 22 h,此时的感官评价分数最高 93.63 分。为验证响应面所得到的实验参数的可靠性,综合实际情况进行调整接种量 5%(V/V),初始 pH6.0,发酵温度 28 °C,发酵时间 22 h,此时感官评分(93.9±0.045)分。

表 4 回归模拟及方程系数的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均值	F 值	P 值	显著性
模型	104.93	9	11.66	96.58	< 0.0001	**
A -接种量	48.02	1	48.02	397.8	< 0.0001	**
B -发酵温度	1.44	1	1.44	11.97	0.0106	*
C -发酵时间	3.64	1	3.64	30.2	0.0009	**
AB	2.50E-03	1	2.50E-03	0.021	0.8896	
AC	0.023	1	0.023	0.19	0.6789	
BC	0.12	1	0.12	1.01	0.3473	
A^2	1.99	1	1.99	16.49	0.0048	*

表 4 回归模拟及方程系数的方差分析
Table 4 Regression Simulation and Variance Analysis of equation coefficients

方差来源	平方和	自由度	均值	F 值	P 值	显著性
B^2	48.32	1	48.32	400.25	< 0.0001	**
C^2	6.58E-04	1	6.58E-04	5.45E-03	0.9432	
残差	0.84	7	0.12			
失拟值	0.14	3	0.048	0.28	0.8406	
纯误差	0.7	4	0.17			
总离差	105.78	16				

注: **差异极显著($P < 0.001$); *差异显著($P < 0.05$)。

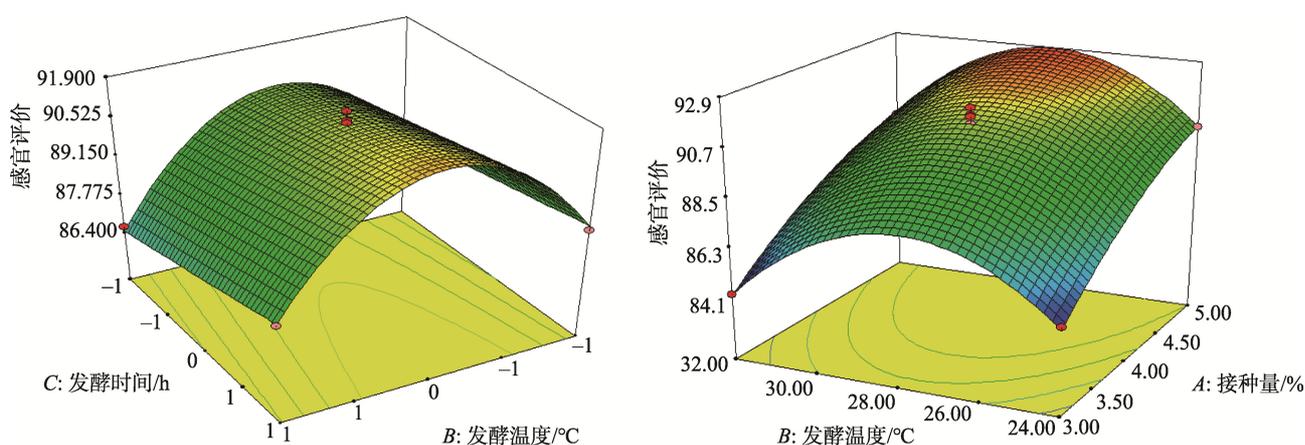


图 2 两两因素交互作用对感官评分的响应曲面

Fig.2 Response surface of factors interaction to sensory evaluation

4 结 论

本研究以单因素优化为基础,进行了响应面实验,建立了豆清饮料工艺优化的数学模型。豆清饮料发酵的最佳工艺条件为: pH6.0、接种量 5%(V/V)、发酵温度 28 °C,发酵时间 22 h,此时感官评分(93.9±0.045)分。多菌株协同发酵技术生产的豆清饮料,属于酵素饮品,产品中含有丰富的有机酸^[12]、酶和次生代谢产物等营养成分^[13]。目前,豆制品企业的豆清液资源化利用,实现污水零排放,这对建设生态文明,推动绿色发展具有实际意义^[14-16]。

参考文献

- [1] 孔彦卓,尹乐斌,雷志明,等. 豆清液综合利用研究进展[J]. 现代农业科技, 2017, (1): 247-249.
Kong YZ, Yin LB, Lei ZM, *et al.* Research progress on comprehensive utilization of Douqing liquid [J]. Mod Agric Sci Technol, 2017, (1): 247-249.
- [2] 杨凤吾. 黄浆水发酵生产细菌纤维素的研究及应用[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2009.

Yang FW. Study and application of bacterial cellulose production by fermentation of yellow pulp water [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2009.

- [3] 陈跃文,王怡然,陈铮,等. 豆腐加工废水发酵物的抑菌作用[J]. 中国食品学报, 2019, 19(3): 184-188.
Chen YW, Wang YR, Chen Z, *et al.* Bacteriostasis of fermented bean curd processing wastewater [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2019, 19(3): 184-188.
- [4] Jian YC. Evaluation of five commercial non-saccharomyces yeasts in fermentation of soy (tofu) whey into an alcoholic beverage [J]. Food Microbiol, 2018, 76(12): 533-542.
- [5] Silvia B. Utilization of tofu whey concentrate by nanofiltration process aimed at obtaining a functional fermented lactic beverage [J]. J Food Eng, 2016, 171(2): 222-229.
- [6] Yong TF. Investigation on the safety of *Lactobacillus amyolyticus* L6 and its fermentation properties of tofu whey [J]. LWT Food Sci Technol, 2017, (84): 313-322.
- [7] 李丽梅,刘霞,李喜宏,等. 黄浆水红枣复合饮料的研制及其稳定性研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(2): 74-77.
Li LM, Liu X, Li XH, *et al.* Study on preparation and stability of compound beverage of yellow pulp and red jujube [J]. Food Res Dev,

- 2017, 38(2):74-77.
- [8] GB/T 12456-2008 食品中总酸的测定[S].
GB/T 12456-2008 Determination of total acid in foods [S].
- [9] 石磊, 田祖光. 不同提取方法对苦菜浸提液可溶性固形物含量的影响[J]. 食品工业, 2018, 39(5): 66-70.
Shi L, Tian ZG. Effects of different extraction methods on soluble solids content in kucai extract [J]. Food Ind, 2018, 39(5): 66-70.
- [10] 葛磊. 燕麦发酵饮料的研制[D]. 无锡: 江南大学, 2012.
Ge L. Preparation of oat fermented beverage [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2012.
- [11] 刘小杰, 何国庆, 陈启和, 等. 黑曲霉 β -葡萄糖苷酶发酵培养基的优化[J]. 中国食品学报, 2006, 6(2): 6-10.
Liu XJ, He GQ, Chen QH, et al. Optimization of fermentation medium for *Aspergillus niger* β -glucosidase [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2006, 6(2): 6-10.
- [12] 王欣欣. 利用黄浆水制备富含苷元型大豆异黄酮发酵乳的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
Wang XX. Preparation of aglycone-rich soybean isoflavone fermented milk from yellow serofluid [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014.
- [13] Chuan HT. Use of kombucha consortium to transform soy whey into a novel functional beverage [J]. J Funct Food, 2019, (52): 81-89.
- [14] 褚绍霞. 大豆黄浆水的资源化利用[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2010.
Chu SX. Resource utilization of soybean yellow pulp water [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2010.
- [15] Jian YC, Shao QL. Soy whey: More than just wastewater from tofu and soy protein isolate industry [J]. Trend Food Sci Technol, 2019, (91): 24-32.
- [16] 王秋霜, 应铁进. 大豆制品生产废水综合开发研究进展[J]. 食品科学, 2007, (9): 594-599.
Wang QS, Ying TJ. Research progress on comprehensive development of wastewater from soybean production [J]. Food Sci, 2007, (9): 594-599.

(责任编辑: 李磅礴)

作者简介



欧红艳, 硕士, 主要研究方向为果蔬清洁加工。
E-mail: 1727070335@qq.com



赵良忠, 教授, 主要研究方向为食品科学技术。
E-mail: sys169@163.com