

振荡通气快速培养红茶菌工艺

王 硕, 王 侃, 甘旭华, 唐欣昀

(安徽农业大学生命科学学院, 安徽 合肥, 230036)

摘 要 以质量浓度为 5% 的蔗糖、0.4% 的绿茶为原料制成的糖茶水为发酵基质, 经灭菌后接入纯种的酵母菌和木醋酸菌, 分别在 28℃ 恒温静止和 28℃、150 r/min 摇瓶 2 种条件下培养, 定时取样测定发酵液中木醋酸菌和酵母菌数量、pH 值、总糖和总酸的含量。在 2 种条件下, 木醋酸菌的生长总是要滞后于酵母菌、pH 值和总糖含量不断下降, 总酸含量不断上升。摇瓶振荡培养时 2 种菌的生长速度更快, 发酵液 pH 值快速降低。通气培养时酵母菌和木醋酸菌数量分别达到 6.6×10^7 /mL 和 8.7×10^7 /mL, 分别是静止培养时的 3 倍和 4 倍。静止条件下培养 10 d 后总酸为 6.5 g/L、总糖为 31.2 g/L, 产率(酸/糖耗)为 0.35; 摇瓶条件下培养 6 d 总酸为 10.1 g/L、总糖为 35.2 g/L, 产率为 0.69, 提高 1 倍。振荡通气培养更利于红茶菌的成熟。

关键词 红茶菌, 通气培养, 菌群变化, 总酸, 总糖

红茶菌是一种以糖茶水为原料, 经醋酸菌、酵母菌、乳酸菌等微生物共同发酵而成的功能性饮料, 含有多对人体有益的成分^[1,2], 具有多项保健作用^[3,6]。红茶菌中主要的菌种为木醋酸菌和酵母菌^[7~8], 乳酸菌虽然在某些红茶菌中存在, 但它不是培养红茶菌的必要菌种且含量很少。木醋酸菌的糖代谢途径已经清楚^[9], 它可在发酵液表面形成具有保护性作用的纤维素膜^[10], 但对于工业化生产来说这种膜不仅消耗碳源, 而且也带来生产、运输的不便。

传统培养方式是将从他处获得带有漂浮菌膜的红茶菌液转进糖茶液, 这样培养的红茶菌液是以木醋酸菌和酵母菌为主, 带有其他杂菌的混合物。传统的红茶菌培养方式存在容易污染杂菌、菌种不易保藏、产品品质不稳定等缺点。吴薇、王侃等采用纯菌培养红茶菌^[14], 尝试解决杂菌污染问题, 但是静止培养方式无法大规模快速发酵生产红茶菌, 为解决这些问题, 实验中采用振荡通气快速培养红茶菌饮料工艺, 为工业化生产红茶菌提供参考。

1 材料和方法

1.1 材 料

1.1.1 菌 种

安徽农业大学生命科学学院实验室纯化保藏的红茶菌中的木醋酸菌 (*Acetobacter xylinum*) C203 菌株和酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) SC03 菌株(已申请专利, 方法另发)。

1.1.2 培养基

红茶菌培养液(g/L): 绿茶(市购)4, 蔗糖 50, 121℃ 灭菌 15 min。

种子培养液(g/L): 酵母提取物 10, 葡萄糖 50, 蛋白胨 5, 121℃ 灭菌 15 min 后待培养液冷却到 50~60℃ 时, 加入体积分数为 2% 的无水乙醇。

GYP-Nys 培养基(g/L): 酵母提取物 10, 葡萄糖 50, CaCO₃ 10, 蛋白胨 5, 琼脂 20, 121℃ 灭菌 15 min, 待培养基冷却到 50~60℃ 时, 加入 100 μg/mL 的制霉菌素和体积分数为 2% 的无水乙醇。

1.2 方 法

1.2.1 红茶菌液的制备

分别将木醋酸菌和酵母菌各 1 环接入种子培养液中, 28℃、150 r/min 培养 2 d, 得到种子液 1 和种子液 2, 在 250 mL 锥形瓶中装入 114 mL 红茶菌液体培养基, 分别接入种子液 1 和 2 各 3 mL。一组恒温 28℃ 培养箱中静止培养, 另一组 28℃、150 r/min 振荡培养, 定时取出锥形瓶检测菌群数量和理化指标。所有测定取 3 次测定平均值。

1.2.2 菌群计数

分别用平板计数法和血球计数板计数法^[12]测定木醋酸菌、酵母菌数量。

1.2.3 pH 值的测定

pH 计直接测定。

1.2.4 总酸和总糖的测定

分别用酸碱滴定法和 3,5-二硝基水杨酸比色法测定总酸和总糖^[13]。

第一作者: 硕士研究生(唐欣昀教授为本文通讯作者)。

收稿日期: 2008-03-24, 改回日期: 2008-05-29

2 实验结果

2.1 菌群和 pH 值的变化

酵母菌个体较大,在 40 倍显微镜下可清晰观察到,用美蓝染色液先将酵母菌染色,通过显微镜直接计数可以得到酵母菌活体个数,而木醋酸菌因个体较小不能观察到。制霉菌素可抑制酵母菌生长,而对木醋酸菌的生长没有影响,因此 GYP-Nys 平板上所长菌落均为木醋酸菌菌落,通过菌落计数可得到木醋酸菌数。

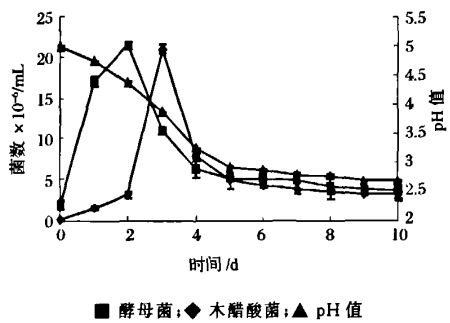


图1 静止培养时发酵液中菌群和 pH 值的变化

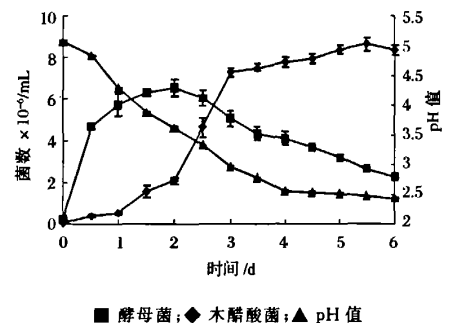


图2 摇瓶培养时发酵液中菌群和 pH 值的变化

从图1可以看出,静止培养时,酵母菌数在第1天急剧上升,第2天即达到最大值,最大值为 2.2×10^7 /mL,从第3天开始下降,并趋于稳定。木醋酸菌的生长明显滞后,在前2天生长缓慢,从第2天开始生长速度明显加快,到第3天时达到最大值,最大值为 2.1×10^7 /mL,第4天时数量出现骤减,而此时发酵液表面开始出现菌膜。连续培养5d后,酵母菌和木醋酸菌的数量趋于稳定,不再有很大的变化。从图2可以看出,摇瓶振荡培养时,酵母菌生长速度同样在开始阶段要快于木醋酸菌,酵母菌数在第2天达到最大值后开始缓慢下降,而木醋酸菌的生长一直保持上升的趋势,在2~3天时这种趋势最为明显。比较2图可知,摇瓶培养下酵母菌数量可以达到 6.6×10^7 /mL,约是静止培养时的3倍,木醋酸菌的数量达到

8.7×10^7 /mL,约是静止培养时的4倍。

2种培养条件下的pH值变化类似,从发酵开始到结束一直呈下降的趋势。但是振荡培养时pH值下降得更快,第3天pH已降至约3,而静止培养pH约为4。

2.2 总酸和总糖的变化

从图3可以看出,2种培养条件下总糖都在不断下降,总酸都在不断上升。发酵终止时,静止培养下的发酵液中残糖量为31.2 g/L,总酸量为6.6 g/L,产率(酸/糖耗)为0.35;而摇瓶培养下的发酵液中残糖量为35.3 g/L,总酸量则上升到10.1 g/L,产率0.69,比静止培养提高约1倍。可见振荡通气培养可以消耗较少的糖耗来获得较多的总酸。

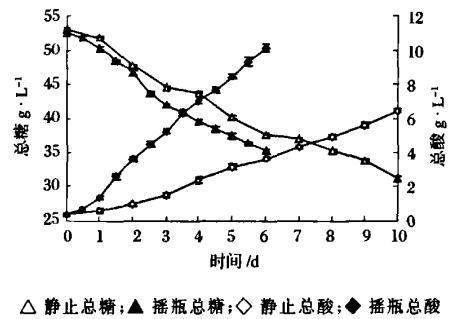


图3 静止和摇瓶培养时发酵液中总酸和总糖的变化

摇瓶振荡培养获得的发酵液经品尝,具有典型的红茶菌风味。

3 讨论

在静止培养和摇瓶培养时,红茶菌中木醋酸菌的生长总是要滞后于酵母菌,这是因为木醋酸菌利用蔗糖的速度很慢,发酵初始先由酵母菌将蔗糖降解为葡萄糖和果糖,并进一步发酵产生乙醇后^[11],木醋酸菌把葡萄糖、果糖氧化成葡萄糖酸、乙酸等产物,把乙醇氧化成乙酸,使得发酵液中的总酸含量不断上升,而酵母菌和木醋酸菌还可以合成酯,内酯等产物,赋予了红茶菌醇、香、酸、甜的特征性风味。

通过发酵参数的比较,可以得出,摇瓶振荡培养时酵母菌和木醋酸菌的生长速度要明显快于静止培养。摇瓶发酵下的酵母菌和木醋酸菌细胞浓度分别可以达到 6.6×10^7 /mL 和 8.7×10^7 /mL,分别是静止发酵时的3倍和4倍。木醋酸菌是严格好气性细菌,而酵母菌是兼性厌氧菌,在有氧时进行有氧呼吸,获得能源物质,进行大量生长繁殖。摇瓶发酵时发酵液中的通气量明显增加,有利于两种菌的生长,缩短

发酵周期。在实验中发现,静止培养的红茶菌液表面形成菌膜后木醋酸菌数量在发酵液中开始骤减,这可能是因为木醋酸菌体与菌膜交织在一起,导致发酵液中的木醋酸菌数量明显减少;而摇瓶培养时由于发酵液始终处于振荡状态,细菌无法形成菌膜,因此发酵液中的木醋酸菌数量持续上升。菌膜的生成需要消耗糖类碳源物质^[14],而摇瓶培养会避免产生菌膜,因此摇瓶培养时的总酸量上升,糖耗值反而下降,同时发酵液仍具有红茶菌的特征风味。很显然,振荡通气培养强烈抑制了木醋酸菌形成菌膜,其机理有待设计新的实验深入探讨。

传统红茶菌都是以静止方式培养,本文数据显示合适的摇瓶培养条件不但可以促进菌群的生长,缩短培养周期,而且可以避免菌膜的生成,减少营养物质的损耗,提高产率,增加发酵液中功能性成分的含量,同时不会改变红茶菌特有的风味。因此在大规模工业化生产红茶菌中可以采用振荡通气工艺,节约成本,稳定产品质量,获得较好的经济效益。

参 考 文 献

- Michael R Roussin. Analyses of Kombucha Ferments; Report on Growers <http://persweb.direct.ca/chaugen/kombucha-research-mroussin2toc.html>
- Günther W Frank. The Fascination of Kombucha. <http://www.kombu.de/fasz-eng.htm>
- 食品科技杂志社. 红茶菌与健康长寿[M]. 北京: 工商出版社, 1981
- Blanc P J. Characterization of the Tea Fungus Metabolites [J]. Biotechnology Letters, 1996, 18(2): 139~142
- Kombucha Tea: What's All the Hoopla. <http://www.kombu.de/hoopla.htm>
- 段葆兰. 健康之友红茶菌[M]. 北京: 科学普及出版社, 1982
- 方心芳. 海宝是什么[J]. 黄海, 1951, 12[5]: 113~115
- de Silva R L, Saravanpavan T V. Tea Cider-A potential winner[J]. Tea Quarterly, 1968, 39(3): 37~41
- P Ross, R Mayer, M Benziman, et al. Cellulose Biosynthesis and Function in Bacteria[J]. Microbiological Reviews, 1991, Mar 55(1): 35~58
- Liu C H, Hsu W H. The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation[J]. Food Microbiology, 1996, 13: 407~415
- 陈思云, 萧熙佩. 酵母菌的生物化学[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1990. 78~81
- 范秀容, 李广武, 沈 萍, 等. 微生物学实验(第二版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1989. 90~95
- 华南理工大学等编. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994. 118~121; 154~177
- P Ross, R Mayer, M Benziman, et al. The cyclic diguanylic acid regulatory system of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. [J]. J Biol Chem, 1990, 265(31): 18933~18943
- 王 侃, 甘旭华, 唐欣昀, 等. 营养成分对红茶菌液中 D-葡萄糖二酸-1,4-内酯和总酸含量的影响[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(6): 24~27

The Ventilation and Rapid Process for Kombucha

Wang Shuo, Wang Kan, Gan Xuhua, Tang Xinyun

(College of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

ABSTRACT *Acetobacter xylinum* C203 and *Saccharomyces cerevisiae* SC03 strains were inoculated in sterilized tea broth with 5% sucrose (w/v) and 0.4% green tea (w/v), and cultured in static incubator at 28°C or in shaker at 28°C and 150r/min, respectively. The cell numbers of C203 and SC03 strains, pH, concentration of sugar and acid were analyzed. Under both conditions growth of strain C203 was slower than SC03, pH and concentration of sugar dropped continuously, and total acid increased continuously. The numbers of SC03 and C203 reached 6.6×10^7 /mL and 8.7×10^7 /mL respectively in ventilation cultivation, and were 3 times and 4 times of those in static condition, respectively. When cultured in static incubator for 10d, total acid was 6.5g/L, total sugar remained was 31.2g/L, and yield rate (acid/glucose consumption) was 0.35; when cultured in shaker for 6 d, total acid was 10.1g/L, total sugar remained was 35.2g/L, and yield rate was 0.69, nearly as twice as that of static culture. The method of oscillation and ventilation could be used in industrial scale Kombucha production.

Key words Kombucha, ventilation cultivation, cell number, total acid, total sugar