

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

研究題目：應用分離之醋酸菌於果醋發酵生產之研究

計畫編號：CN9628

執行期限：96 年 01 月 01 日至 96 年 12 月 31 日



主持人：食品科技系 王淑珍

中華民國 97 年 2 月 18 日

一、摘要：

經 ADH III L187 / ADH III R500 增幅後，可產生 314 bp PCR 產物有 41 株，進一步將分離株進行產酸能力篩選，產酸能力強且生長快速之分離株共有 29 株。以這 29 株分離株進行 16S rDNA 序列分析。結果顯示所分析之 29 株 AAB 分離株皆為 *Acetobacter* spp.。再將這 29 株分離株進行酒精耐受性試驗，進一步馴養成具高度耐酒精能力之菌株。於 29 株分離株中 AAB305 其耐酒精能力達 7%，本研究擬將 AAB305 進行醋的發酵生產製造。

二、前言：

醋酸菌能氧化不同種類的酒精和糖類產生商業上重要的食物及化學產物。醋酸菌在工業上的應用範圍很廣，可用於生產醋、Glucose、Sorbitol、Isobutyric acid、Dihydroxyacetone、Acetylmechylcarbinol 及 Extracellular polysaccharide Cellulose（細胞外多醣纖維素）等。

近年來，醋酸菌的功用漸漸的被大量發展，進而運用於商業上的生產，醋是中國傳統的食物，它的自然組成成分是由維他命、胺基酸、礦物質及極有機酸等等所組成的，現今醋的生產為最主要之商業運用。目前大多數廠商為了考量成本的降低，常使用化學混合方法快速生產化學合成醋及使用一般米酒釀造醋加入果汁與香料調味，這種速成醋讓醋應有的美味盡失，且對於身體可能會造成負面的影響或失去原有之功效（例如：降血壓、降低心血管疾病、抗氧化...等）。醋的生產可以藉由自然發酵而完成。必須經由酵母菌生產乙醇，藉由醋酸菌利用乙醇生長，生產高濃度的醋酸。故本研究將利用所篩選出之菌株，將水果酒進行醋化作用，並探討具高效能之生產條件，進而生產對人體具有效益之釀造醋。

三、材料與方法：

（一）醋酸菌之酒精耐受性試驗

在 100 ml 的 YGM/Mg²⁺ Medium 中加入 4%、5% 的 Alcohol 及 10% AAB 菌液（540 nm 吸光值約為 0.6 的菌液濃度），於 30℃ 130rpm 下震盪培養，10 天後測其酸度。

（二）醋酸菌之酸耐受性試驗

在 100 ml 的 YGM/Mg²⁺ Medium 中加入 4%、5% 的 Acetic acid 及 10% AAB 菌液（540 nm 吸光值約為 0.6 的菌液濃度），於 30℃ 130rpm 下震盪培養，10 天後測其吸光值。

（三）發酵條件之探討

利用本實驗室之 10 L 發酵槽進行發酵條件之探討，首先將 yeast 接

種於含有 25%蔗糖之蔓越莓果汁之發酵槽中，控制溫度在 28~30℃ 靜置厭氣培養，進行蔓越莓酒之製造，之後，將此槽中蔓越莓酒打入另一槽內，並調整酒精度及加入 10% AAB 菌液，以 30℃ 130 rpm 攪拌通氣培養。

(四) 蔓越莓醋之酸度調整及調味

目前於市售食用醋之酸度約為 3%，並稀釋 3~5 倍飲用，故先將本實驗之蔓越莓醋進行酸度調整為 3%，再適量的加入蔓越莓汁及果糖進行調味。

四、結果與討論：

(一) 篩選醋酸產量高之疑似醋酸菌分離株：

將 PCR 反應為正反應之 41 株疑似 AAB 分離株接種到含 5%酒精之 YGM/Mg²⁺ Medium 中進行發酵試驗，得到 29 株 AAB 分離株之產酸酸度達到 2.0% 以上，結果如 Table 1。在 41 株 AAB 分離株中，AAB113 在發酵第六天時，其酸度就已到達 2.53%；AAB603 在發酵第七天時，其酸度就已到達 2.09%。而 AAB 標準菌株 BCRC12324、BCRC11568、BCRC11688、BCRC12950、BCRC12957 在發酵第十天後，其酸度才分別達到 2.47%、2.56%、2.58%、2.39% 及 2.45%。

(二) 醋酸菌分離株之酒精耐受性試驗：

將 29 株經 16S rDNA 序列定序之 AAB 分離株於 YGM/Mg²⁺ Medium (含 6% 酒精) 中培養，選擇產酸度高於 4% 之菌株 AAB102、AAB113、AAB272、AAB275、AAB305、AAB306、AAB964 共 7 株 AAB 分離株與源自發酵醋中所篩選出來之標準菌株 BCRC11688，進行 6% 酒精耐受性試驗，結果顯示產酸度高於 4.8% 之 AAB 分離株有 AAB102、AAB272、AAB305、AAB306 共 4 株，其餘菌株之產酸度皆低於 1%。最後將這 4 株 AAB 分離株與標準菌株 BCRC11688 於 YGM/Mg²⁺ Medium (含 7% 酒精) 中培養，結果 AAB305 其產酸為 5.56% 能力最佳，也比標準菌株 BCRC11688 的 5.35% 佳 (Table 2)。

(三) 發酵液之氣相層析

本實驗再進一步的以氣相層析儀分析 AAB305 之發酵液，其結果如圖 10，由計算結果得到醋酸濃度為 5.58%，並取同一樣品測定總酸度，所得之酸度為 6.66%。

(四) 發酵條件之探討

將 yeast 接種於含有 25%蔗糖之蔓越莓果汁之發酵槽中，控制溫度在

28~30℃靜置厭氣培養，進行蔓越莓酒之製造，之後，將此槽中蔓越莓酒打入另一槽內，進行蔓越莓醋生產。結果顯示，調整酒精濃度為7%，所生產之醋酸含量為5.38%。

(五) 蔓越莓醋之酸度調整及調味

目前於市售食用醋之酸度約為3%，並稀釋3~5倍飲用，故先將本實驗之蔓越莓醋進行酸度調整為3%，再適量的加入蔓越莓汁及果糖進行調味。經品評結果顯示，所生產之蔓越莓醋在口感及香味皆比市售蔓越莓醋好，可能原因為市售蔓越莓醋大都以蔓越莓果汁與醋酸調和，故風味上較差。



Table 1. Acidity produced during fermentation by acetic acid bacteria isolates was carried out

Strain	Days	Acidity (%)	Strain	Days	Acidity (%)
BCRC12324	11	2.47	AAB148	10	2.28
BCRC11568	11	2.56	AAB203	10	2.24
BCRC11688	10	2.58	AAB272	10	2.34
BCRC12950	12	2.39	AAB275	9	2.28
BCRC12957	11	2.45	AAB303	8	2.34
AAB101	11	2.34	AAB305	11	2.31
AAB102	12	2.50	AAB306	10	2.34
AAB103	9	2.32	AAB330	10	2.17
AAB113	6	2.53	AAB331	9	2.39
AAB114	10	2.30	AAB333	12	2.35
AAB140	10	2.37	AAB368	8	2.24
AAB141	11	2.49	AAB603	7	2.09
AAB142	10	2.31	AAB607	8	2.07
AAB143	8	2.38	AAB704	11	2.28
AAB144	11	2.25	AAB902	11	2.30
AAB146	11	2.50	AAB921	11	2.37
AAB147	10	2.46	AAB964	10	2.41

Table 2. Acidity produced after 10 days fermentation by acetic acid bacteria isolates was obtained

Strains	6% ethanol	7% ethanol
AAB102	4.81	0.09
AAB113	0.11	0.12
AAB272	4.52	0.14
AAB275	0.15	0.10
AAB305	4.86	5.56
AAB306	5.03	0.15
AAB964	0.15	0.10
BCRC11688	4.45	5.35

Note:

6% alcohol : Yeast extract 10 g, Glucose 20 g, Mannitol 20 g, MgSO₄ 0.1 g, Distilled water 1 L. After sterilization, pure ethanol (6%) were added aseptically.

7% alcohol : Yeast extract 10 g, Glucose 20 g, Mannitol 20 g, MgSO₄ 0.1 g, Distilled water 1 L. After sterilization, pure ethanol (7%) were added aseptically.

