

### 3 株功能菌在四川保宁醋强化发酵中的应用

李玉斌<sup>1,2</sup>, 邓 静<sup>2</sup>, 吴华昌<sup>3,\*</sup>, 乔明锋<sup>2</sup>, 易宇文<sup>2</sup>, 彭毅秦<sup>2</sup>, 刘 阳<sup>3</sup>, 严梦琴<sup>3</sup>, 唐红梅<sup>3</sup>  
(1.四川理工学院生物工程学院, 四川 自贡 643000; 2.四川旅游学院 烹饪科学四川省高等学校重点实验室,  
四川 成都 610000; 3.四川旅游学院食品学院, 四川 成都 610000)

**摘 要:**以产香酵母菌、高产醋酸菌以及产多糖乳酸菌为研究对象, 将3 株功能菌应用于四川保宁醋中进行接种强化发酵。单菌强化发酵结果表明: 与对照组相比, 强化组1(接种产香酵母菌)挥发性风味物质的种数及相对含量分别提高了17.39%、20.23%, 达到27 种、79.65%; 强化组2(接种高产醋酸菌)与强化组3(接种产多糖乳酸菌)酸度分别上升了82.75%、155.75%, 稳定在3.18%、4.45%, 其中有机酸含量增幅在23.46%~389.21%之间; 强化组3多糖质量浓度提高了68.43%, 高达1 143.78 mg/L。采用混菌设计确定强化发酵最佳接种比例, 其结果证明在总接种量1%, 接种比例为酵母菌40%、醋酸菌16%、乳酸菌44%条件下, 所得食醋的效果最佳, 其酸度为5.28%, 挥发性物质种数为30 种, 感官评分85.65。研究结果为改善保宁醋风味、提高出醋率提供了一定的理论支撑。

**关键词:**产香酵母菌; 高产醋酸菌; 产多糖乳酸菌; 保宁醋; 强化发酵; 混菌设计

#### Application of Three Functional Bacteria in the Enhanced Fermentation of Baoning Vinegar from Sichuan

LI Yubin<sup>1,2</sup>, DENG Jing<sup>2</sup>, WU Huachang<sup>3,\*</sup>, QIAO Mingfeng<sup>2</sup>, YI Yuwen<sup>2</sup>, PENG Yiqin<sup>2</sup>, LIU Yang<sup>3</sup>, YAN Mengqin<sup>3</sup>, TANG Hongmei<sup>3</sup>  
(1. College of Bioengineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China;  
2. Cuisine Science Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan Tourism University, Chengdu 610000, China;  
3. College of Food Science and Technology, Sichuan Tourism University, Chengdu 610000, China)

**Abstract:** In this study, three functional strains of aroma-producing yeast, highly efficient acid-producing acetobacter and polysaccharide-producing lactic acid bacteria were applied in the enhanced fermentation of Baoning vinegar. Results of enhanced fermentation with single starter cultures showed that compared with the control group, the number and relative contents of volatile compounds in vinegar fermented with aroma-producing yeast were improved by 17.39% and 20.23%, which were 27 and 79.65%, respectively, and the acidity of the samples fermented with acid-producing acetobacter and polysaccharide-producing lactic acid bacteria were increased by 82.75% and 155.75%, which were 3.18% and 4.45%, respectively, along with an increase in organic acid concentration of 23.46%~389.21%. Additionally, the polysaccharide concentration of the vinegar fermented by the third starter culture was up to 1 143.78 mg/L, which was 68.43% higher than that of the control group. Mixed culture fermentation containing 40% yeast, 16% acetic acid bacteria and 44% lactic acid bacteria at an inoculum size of 1% was demonstrated to be optimal for obtaining the best product, which had an acidity of 5.28%, contained 30 volatile compounds and scored 85.65 points in sensory evaluation. This research can provide a theoretical support for improving the flavor and yield of Baoning vinegar.

**Key words:** aroma-producing yeast; high acid-producing acetobacter; polysaccharide-producing lactic acid bacteria; Baoning vinegar; enhanced fermentation; mixture design

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201712012

中图分类号: TS264

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2017)12-0075-08

引文格式:

李玉斌, 邓静, 吴华昌, 等. 3 株功能菌在四川保宁醋强化发酵中的应用[J]. 食品科学, 2017, 38(12): 75-82. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201712012. <http://www.spkx.net.cn>

LI Yubin, DENG Jing, WU Huachang, et al. Application of three functional bacteria in the enhanced fermentation of Baoning vinegar from Sichuan[J]. Food Science, 2017, 38(12): 75-82. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201712012. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2016-09-05

基金项目: 四川省教育厅科技成果重大培育项目(15CZ0029); 四川省学术带头人后备人选基金项目(83-000001); 四川省科技支撑计划项目(2015NZ0037); 四川旅游学院大学生科研项目(2014XKZ12); 四川理工学院研究生创新基金项目(y2015012)

作者简介: 李玉斌(1991—), 男, 硕士研究生, 研究方向为微生物发酵代谢调控。E-mail: 995673099@qq.com

\*通信作者: 吴华昌(1970—), 男, 教授, 硕士, 研究方向为微生物发酵代谢调控。E-mail: 694549215@qq.com

食醋作为一种含有有机酸、糖类、氨基酸、维生素等营养物质的调味品<sup>[1-2]</sup>，在中国已有三千多年历史<sup>[3]</sup>，具有代表性的品牌有山西老陈醋、镇江香醋、四川保宁醋、福建红曲醋、天津独流老醋等<sup>[4]</sup>。其中，四川保宁醋通过添加多种中药材酿造而成，是中国四大名醋中唯一的药醋，微生物在其发酵过程中起着关键作用。许多研究已经证明食醋发酵中优势菌为乳酸杆菌属、醋酸杆菌属，主要提供酸类物质<sup>[5-8]</sup>，也有研究表明产香酵母对食醋风味有重要影响<sup>[9-11]</sup>。生物强化技术是指将具有特定功能的微生物添加到特定的环境中，强化微生物的作用效果。该项技术最初应用于工业废水处理<sup>[12-14]</sup>，之后在土壤修复<sup>[15]</sup>、地下水处理<sup>[16]</sup>、垃圾处理<sup>[17]</sup>等各种环境问题上也有应用，其在传统发酵食品生产领域还处于起步阶段<sup>[18]</sup>。目前，生物强化已在食醋酿造<sup>[19]</sup>及奶酪发酵<sup>[20]</sup>方面得到初步应用，其强化菌株主要源于自身微生物群落中的优势菌，避免了外源菌株带来的食品安全隐患，但食醋领域仅有镇江米醋的研究报道。由于不同食醋的酿造原料、发酵环境、工艺等方面差异，导致其微生物群落结构存在特异性，保宁醋作为药醋的典型代表，微生物群落结构有其自身特点，而关于功能微生物在其固态发酵的研究鲜有报道。

以保宁醋醋曲中分离鉴定的一株产香酵母菌、高产醋酸菌以及产多糖乳酸菌为研究对象，进行单菌固态强化模拟实验，分析强化过程中理化指标、挥发性成分、有机酸的变化，评价其强化效果。再以酸度、风味物质种数、感官评分为指标，采用混料（菌）设计确定3株菌混合发酵的最佳比例，为后期强化菌株在生产上应用奠定一定的理论基础，同时为改善保宁醋风味、提高出醋率提供一定的理论支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

从保宁醋醋曲中筛得，经形态学及分子生物学分别鉴定为异常威克汉姆酵母（*Wickerhamomyces anomalus*）、醋酸杆菌（*Acetobacter sicerae*）和发酵乳酸杆菌（*Lactobacillus fermentum*），其产香、高产酸、高产多糖特性在前期工作中均已验证。

### 1.2 培养基与试剂

酵母菌的活化及扩大培养基为麦芽汁培养基（麦芽汁质量分数为13%），计数培养基为YPD培养基（1%蛋白胨、1%酵母膏、2%葡萄糖、自然pH值、121℃灭菌30 min）。

醋酸菌的活化及扩大培养基为醋酸菌培养基（1%葡萄糖、1%酵母膏、pH 4.5、95%乙醇溶液），计数培养基为扩大培养基基础上添加2%琼脂、2%碳酸钙。

乳酸菌活化、扩大培养基均为MRS培养基，计数培养基另需添加15%琼脂及160 mg/L溴甲酚紫。

食醋发酵基质配比：麸皮2 640 g、醋曲660 g、活化酵母液4 mL（酵母粉9.6 g、水240 g、葡萄糖4.8 g，30℃条件下活化30 min）、糖化酶4 mL、水2 857 g（对照组加水量为2 922 g）。

硫酸锌、亚铁氰化钾 成都科龙化学试剂厂；草酸、乙酸、乳酸、苹果酸、琥珀酸、柠檬酸（色谱纯） 国药集团化学试剂有限公司；酵母粉 安琪酵母股份有限公司。

### 1.3 仪器与设备

顶空固相微萃取仪 美国Troemner公司；1200高效液相色谱仪、5975气相色谱-质谱（gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS）联用仪 美国Agilent公司；固相微萃头（50/30 μm） 美国Supelco公司；SW-CJ-IF超净工作台 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司；LDZX-50FBS立式压力蒸汽灭菌器 上海深谱医疗器械厂。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 强化菌株种子液制备

生长曲线测定：3株强化菌分别接种于相应的活化培养基中，醋酸菌和酵母菌于30℃、120 r/min条件下培养，乳酸菌于37℃静置培养，每隔2 h测定发酵液OD<sub>600 nm</sub>值，绘制3株菌生长曲线。

种子液制备：挑取4℃斜面保存的强化菌株，接入到30 mL相应的活化培养基中，酵母菌、醋酸菌于30℃、120 r/min条件下培养，乳酸菌于37℃静置培养，至对数末期，获得一级种子液。菌株于对数末期以4%接种量进行扩大培养，培养条件同上，即得二级种子液，平板计数法测定种子液活菌数。

#### 1.4.2 单菌强化发酵效果评价

食醋发酵基质按1.2节方法混合均匀，30℃保温发酵。强化组1、2、3分别于第1、7、1天添加相应强化菌株（分别添加酵母菌、醋酸菌、乳酸菌种子液），种子液添加量1%，对照组未添加强化菌株。第7天时进行首次翻醅（于翻醅前添加醋酸菌种子液），其后每隔1 d翻醅一次，每次翻醅前均进行理化指标（水分含量、pH值、酸度等）、挥发性物质及有机酸含量测定，发酵周期为31 d。

#### 1.4.3 混菌强化发酵最佳接种比例的确定

以酸度、挥发性物质种数及感官评分为指标，采用混料设计对混菌（酵母菌、醋酸菌和乳酸菌）接种比例进行优化。发酵基质为1.2节所述原辅料配比的30%，总接种量为发酵基质的1%，发酵周期为31 d。

#### 1.4.4 指标测定

##### 1.4.4.1 理化指标测定

水分含量：恒重法<sup>[21]</sup>；pH值：称取翻醅后醋醅

10 g, 以3倍质量蒸馏水浸泡3 h, 双层滤纸过滤后, 测定pH值; 酸度: 称取醋醅10 g于30 mL、80℃蒸馏水中, 搅拌2 h后, 以蒸馏水定容至50 mL, 双层滤纸过滤, 后续步骤按GB/T 5009.41—2003《食醋卫生标准的分析方法》进行; 多糖质量浓度: 称取翻醅后醋醅10 g, 于3倍质量蒸馏水中浸泡3 h, 双层滤纸过滤, 按苯酚-硫酸法<sup>[22]</sup>测定。

#### 1.4.4.2 挥发性风味物质相对含量测定

挥发性风味物质相对含量参考文献[23]测定。分别称取醋醅1 g、NaCl 2 g、蒸馏水6 mL于15 mL样品瓶中混匀, 将老化后的50/30 μm DVB/CAR/PDMS萃取头插入样品瓶顶空部分, 在60℃、600 r/min条件下恒温平衡10 min、吸附30 min后, 将萃取头取出并插入GC进样口, 同时启动仪器采集数据, 解吸3 min。

GC-MS分析条件: HP 5890/5975 GC-MS联用仪; 色谱柱: HP-5MS型(30 m×0.25 mm, 0.25 μm); 载气: 氦气; 进样温度: 230℃; 进样量: 1 μL; 升温程序: 初温45℃保持2 min, 5℃/min上升至180℃, 保持1 min, 25℃/min升到230℃, 保持5.5 min。

数据处理: 由计算机质谱系统NIST与RTLPEST检索未知化合物, 匹配度大于800(最大1 000)的结果将予以报告, 面积归一法计算各成分含量。

#### 1.4.4.3 有机酸含量测定

样品前处理<sup>[24-26]</sup>: 称取30 g醋醅于90 mL蒸馏水中搅拌浸泡2 h, 双层滤纸过滤。依次量取5.0 mL滤液、2 mL 30%硫酸锌溶液、2 mL 10.6%亚铁氰化钾溶液混匀, 以ddH<sub>2</sub>O定容至50 mL, 室温静置20 min后, 8 000 r/min离心5 min, 取上清液用0.22 μm微孔滤膜过滤。

液相色谱条件: Gemini C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-甲醇(95:5, V/V), pH 2.7; 进样量20 μL; 流速0.4 mL/min; 柱温20℃; 紫外检测器波长210 nm。

表1 有机酸标准溶液的含量

Table 1 Concentrations of standard solutions of organic acids

有机酸	含量/(mg/25 mL)	有机酸	含量/(mg/25 mL)
草酸	117.3	苹果酸	250.3
琥珀酸	256.0	柠檬酸	259.2
乳酸	249.2	乙酸	248.6

标准溶液的配制: 按表1准确配制8种有机酸标准溶液, 再分别量取1.0、3.0、4.0、5.0、6.0、8.0、10.0 mL有机酸标准溶液, 以ddH<sub>2</sub>O定容至10 mL, 配制不同质量浓度的标准溶液。

有机酸的定性定量分析: 将不同质量浓度有机酸标准溶液在相同条件下进样, 以质量浓度为横坐标、峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 采用峰面积外标法定量, 得到不同有机酸的线性范围、回归方程及相关系数(表2)。

表2 有机酸的回归曲线及相关系数

Table 2 Regression curves and correlation coefficients for organic acids

有机酸	保留时间/min	回归曲线	R <sup>2</sup>
草酸	7.713	$y=16\,773.0x+1\,064.2$	0.996 9
L-苹果酸	9.675	$y=2\,434.60x-261.49$	0.992 1
乳酸	10.853	$y=1\,199.10x+265.88$	0.995 5
乙酸	11.372	$y=1\,632.80x-48.18$	0.996 5
柠檬酸	14.301	$y=2\,767.3x-49.0$	0.996 0
琥珀酸	15.211	$y=1\,526.40x+168.52$	0.997 4

有机酸含量的计算: 取适量样品, 按上述相同条件进样, 再按下式计算醋醅中有机酸含量。

$$\text{有机酸含量}/(\text{g}/100\text{ g干醅}) = \frac{\rho \times N \times 100}{m \times (1 - \omega) \times 1\,000}$$

式中:  $\rho$ 为有机酸标准曲线所得有机酸质量浓度/(mg/mL);  $N$ 为样品稀释倍数;  $m$ 为醋醅质量/g;  $\omega$ 为醋醅水分质量分数/%。

#### 1.4.5 感官评价

参考GB 18187—2000《酿造食醋》相关评价标准, 确定相应的评价体系, 如表3所示。

表3 食醋感官评价评分标准

Table 3 Criteria for sensory evaluation of vinegar

类别	项目	评价标准	得分
外观 (15分)	色泽	棕色或深红棕色	10
	澄清度	澄清透明, 无明显悬浮物	5
风味 (30分)	香气强度	香气突出	10
	持续时间	持续时间达到20 s以上	5
	品格特点	具有麸醋香味, 无异味	5
	香气	乙酸香气浓郁, 无刺激性	10
口感 (40分)	强度	味道强烈, 有鲜味	10
	发展变化	进口缓和, 稍后酸味凸显	5
	持续时间	持续时间达到20 s以上	5
	酸度	较强, 酸味主导	10
	酸甜平衡度	酸味爽口, 无刺激性酸味	10
整体印象 (15分)	是否可接受	整体感觉愉悦	5
	是否具有典型性	具有麸醋特征味道或香气	5
	是否印象深刻	难忘程度, 是否留下记忆	5

#### 1.5 数据处理与分析

实验均设3组平行, 取平均值, 数据处理及分析采用SPSS 22软件, 相关图形的绘制采用Origin 9.0软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 强化菌株生长曲线及种子液制备

由图1可知, 醋酸菌、酵母菌、乳酸菌对数末期分别为12、14、12 h, 于对数末期获得一级种子液。再将一级种子液按1.4.1节步骤进行扩大培养, 所得二级种子液活菌浓度分别为 $1.5 \times 10^7$ 、 $2.3 \times 10^8$ 、 $8.5 \times 10^8$  CFU/mL。

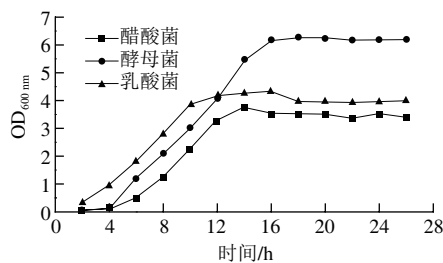


图1 强化菌株的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of three strains used

## 2.2 单菌强化发酵性能评价

### 2.2.1 理化指标变化

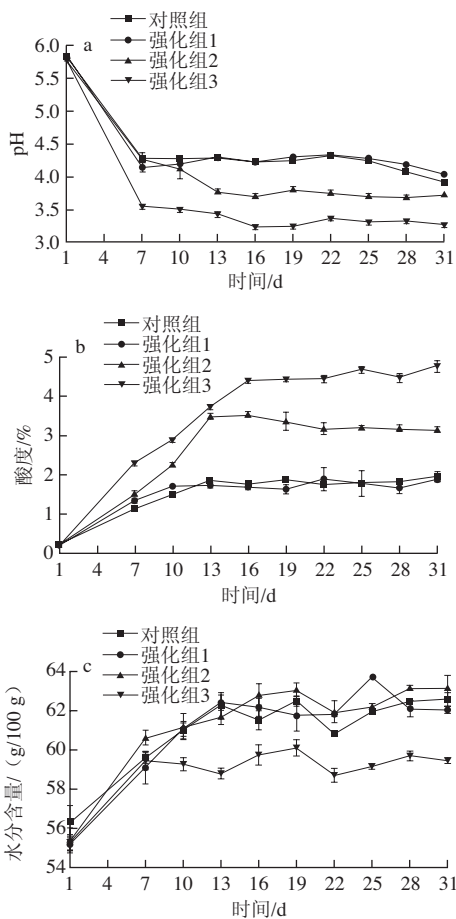
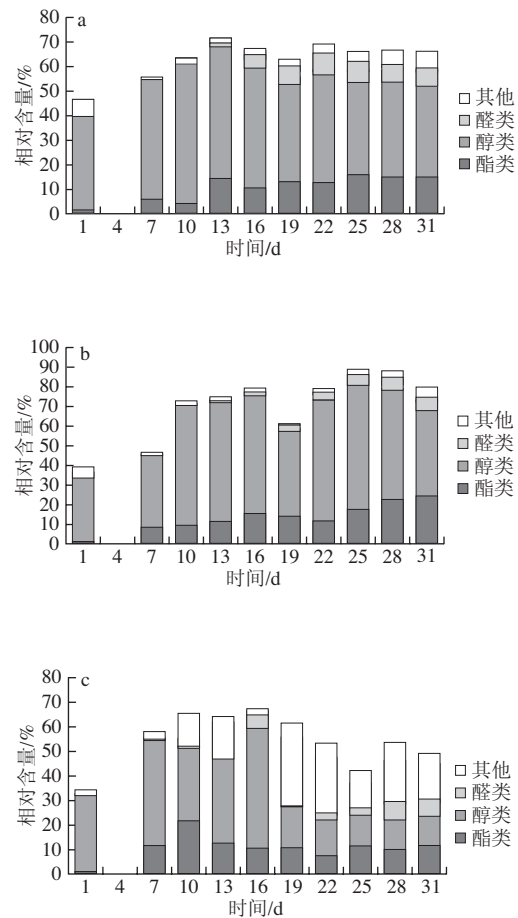


图2 强化发酵过程中醋酸pH值(a)、酸度(b)、水分含量(c)的变化

Fig. 2 Changes in pH, moisture and acidity during fermentation

由图2可知, 强化组的pH值、酸度及水分含量均逐渐增大, 最后趋于稳定, 但3个指标各自的稳定值却存在差异。与对照组相比, 强化组1、2、3的pH值分别下降了0%、12.47%、22.63%, 稳定在4.33、3.79、3.35; 酸度分别上升了8.62%、82.75%、155.75%, 稳定在1.89%、3.18%、4.45%; 水分含量差别不大, 稳定在60.00 g/100 g左右。因此, 强化发酵对醋酸水分含量影响不明显, 但强化组2、3会明显提高醋酸产酸量。

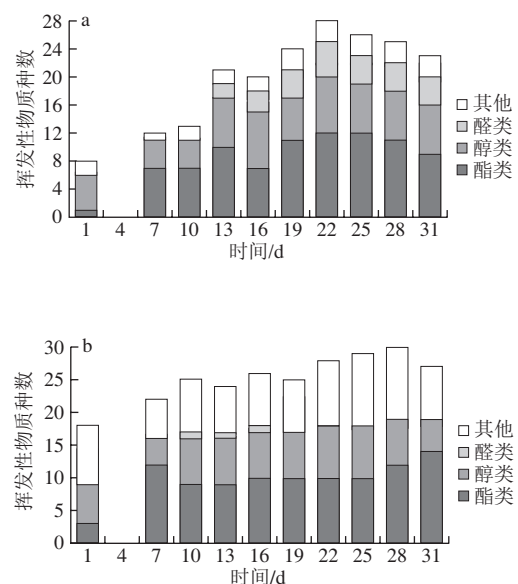
### 2.2.2 挥发性风味物质变化



a~c.分别为对照组、强化组1、强化组3。图4同。

图3 强化发酵过程中挥发性物质相对含量的变化

Fig. 3 Changes in relative contents of volatile flavor compounds during fermentation





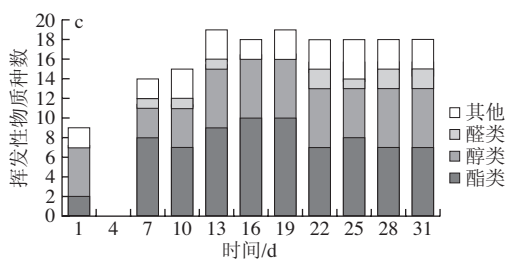


图4 强化发酵过程中挥发性物质种数的变化

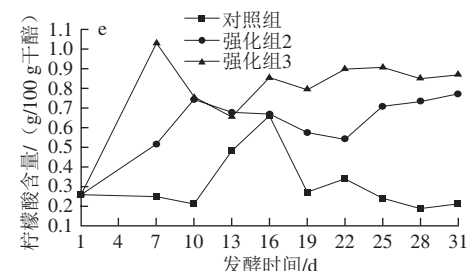
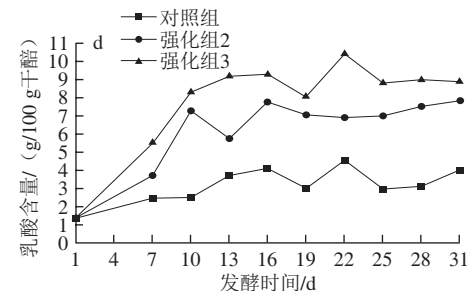
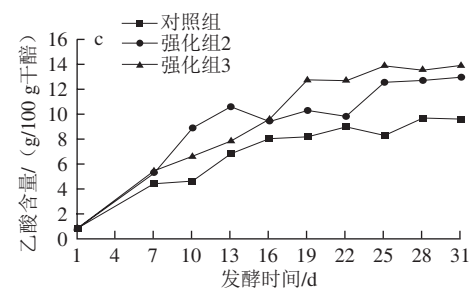
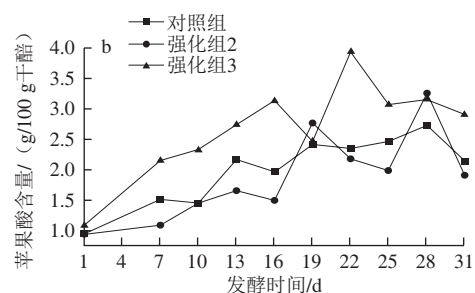
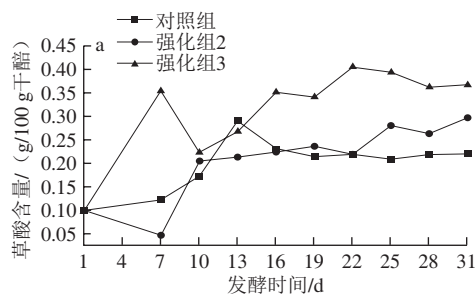
Fig. 4 Changes in the number of volatile flavor compounds during fermentation

在食醋发酵中，醋酸菌主要产有机酸，而产香酵母与乳酸菌对食醋风味贡献较大<sup>[27-30]</sup>，故仅对强化组1、3进行挥发性风味物质测定。实验采用固相微萃取-GC-MS法测定强化发酵中醋酯挥发性风味物质种数与相对含量变化（图3、4）。随着发酵时间延长，挥发性风味物质种数先增加后减少（或稳定），发酵结束时，对照组、强化组1、3风味物质种数分别达到23、27、18种，主要是酯类和醇类物质。挥发性风味物质相对含量逐渐增大，发酵结束时（31 d），对照组、强化组1、3风味物质相对含量分别为66.25%、79.65%、49.08%，以醇类及酯类物质为主。因此，强化组1可显著增加食醋挥发性风味物质的种数及相对含量，与对照组相比分别提高了17.39%、20.23%，但强化组3不利于风味物质种数及相对含量增加。

### 2.2.3 有机酸含量变化

由于产香酵母仅产生微量的酸类物质，而醋酸菌与乳酸菌分别是食醋中第一、二大有机酸的主要来源<sup>[31]</sup>，故仅对强化组2与强化组3进行有机酸测定（图5）。由图5a可知，随着发酵时间延长，草酸含量先上升后稳定，与对照组、强化组2相比，强化组3草酸含量提高了23.46%以上，稳定在0.3~0.4 g/100 g干醋。由图5b可知，苹果酸含量变化呈缓慢上升趋势，但对照组发酵后期变化较为平缓，而强化组2、3出现较为明显的波动，发酵结束时强化组3的苹果酸含量与对照组相比提高了36.06%，为2.91 g/100 g干醋，强化组2的苹果酸含量下降了10.85%，为1.91 g/100 g干醋。乙酸与乳酸变化如图5c、d，乙酸含量呈先快速后缓慢上升，发酵结束时强化组2、3乙酸含量与对照组相比分别提高了37.78%、44.61%，稳定在12.924、13.868 g/100 g干醋；乳酸含量先上升后趋于平稳，发酵结束时强化组2、3的乳酸含量与对照组相比分别提高了95.54%、120.11%，稳定在7.841、8.875 g/100 g干醋。柠檬酸与琥珀酸含量变化如图5e、f所示，两种酸含量均先增加后趋于平缓，发酵结束时强化组2、3的柠檬酸含量与对照组相比分别提高了265.88%、321.80%，稳定在0.772、0.870 g/100 g干醋，

琥珀酸含量与对照组相比分别提高412.19%、389.2%，稳定在1.264、1.203 g/100 g干醋。综上所述，强化组2、3明显提高了食醋中有机酸含量。



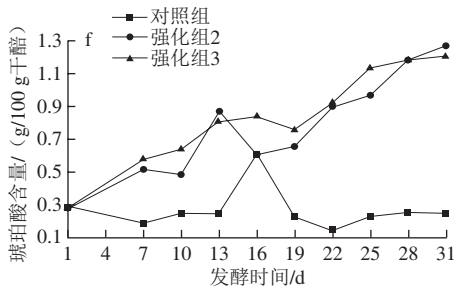


图5 发酵过程中草酸(a)、苹果酸(b)、乙酸(c)、乳酸(d)、柠檬酸(e)、琥珀酸(f)含量变化

Fig. 5 Changes in the contents of oxalic acid (a), malic acid (b), acetic acid (c), lactic acid (d), citric acid (e) and succinic acid (f) during fermentation

2.2.4 强化发酵多糖质量浓度的测定结果

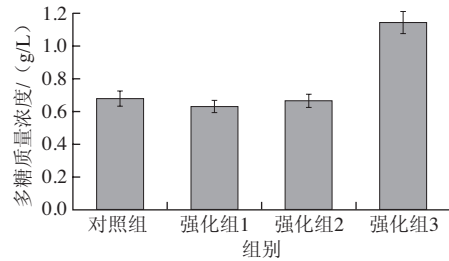


图6 液态醋的多糖质量浓度

Fig. 6 Polysaccharide contents of vinegar samples

由图6可知,发酵结束时对照组、强化组1、2的多糖质量浓度并没有明显差异,均处于600~700 mg/L,而强化组3多糖质量浓度明显高于其他3组,达到1 143.78 mg/L,与对照组对比提高了68.43%,表明强化组3在固态发酵过程中可提高液态醋的多糖质量浓度。

2.3 混菌强化发酵最佳接种比例的确定

表4 3株菌强化发酵的混菌设计及结果分析

Table 4 Mixture design in terms of experimental values with response variables

试验号	A酵母菌 接种比例/%	B醋酸菌 接种比例/%	C乳酸菌 接种比例/%	酸度/%	挥发性 物质种数	感官 评分
1	16.7	16.7	66.7	5.110	24	79.85
2	33.3	33.3	33.3	5.100	29	83.45
3	0.0	100.0	0.0	3.377	23	70.65
4	50.0	50.0	0.0	3.228	28	74.70
5	0.0	100.0	0.0	3.594	22	73.45
6	50.0	0.0	50.0	5.015	29	84.45
7	16.7	66.7	16.7	5.209	26	85.65
8	50.0	50.0	0.0	3.415	26	76.65
9	0.0	0.0	100.0	4.999	21	80.10
10	100.0	0.0	0.0	1.356	29	65.05
11	0.0	0.0	100.0	5.132	18	76.34
12	0.0	50.0	50.0	5.228	27	80.50
13	66.7	16.7	16.7	5.373	30	82.05
14	100.0	0.0	0.0	1.465	30	63.85

由单菌强化发酵可知,强化组1有利于增加食醋中挥发性风味物质的种数及相对含量,而强化组2、3有助于增加有机酸及多糖质量浓度。以酸度、挥发性物质种数以及感官评分为指标,采用混菌设计确定3株菌最佳添加比例(表4)。

2.3.1 混菌模型的建立与分析

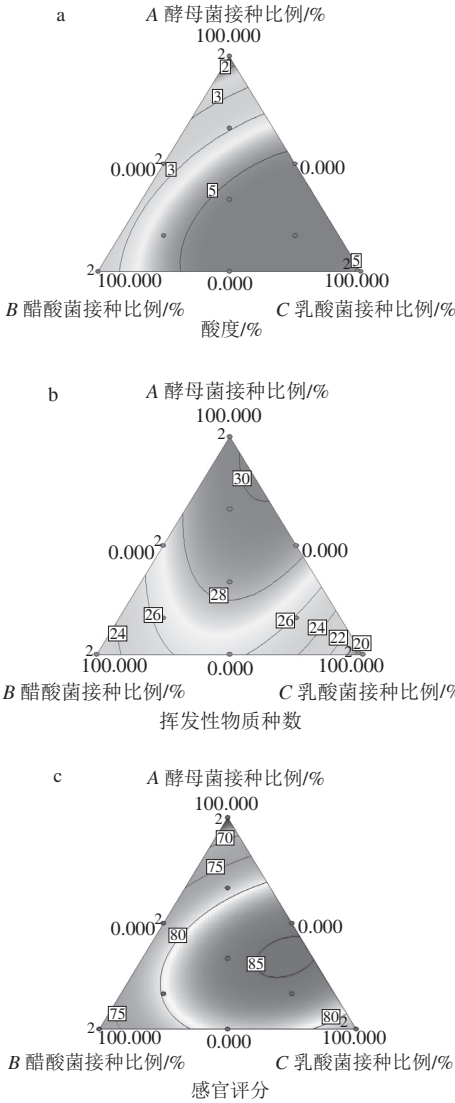


图7 接种量对混菌发酵醋酸的酸度(a)、挥发性物质种数(b)、感官评分(c)的影响

Fig. 7 Effects of inoculation proportions of mixed starter cultures on acidity and the number of volatile flavor compounds and sensory evaluation

根据混菌设计结果(表4),利用Design-Expect软件对响应值进行二次多项式回归拟合,分别建立酸度( $Y_1$ )、挥发性物质种数( $Y_2$ )、感官评分( $Y_3$ )3个指标的回归模型。其中,A、B、C分别代表酵母菌、醋酸菌、乳酸菌接种比例,结果如下:

$$Y_1 = 1.53A + 3.53B + 4.92C + 4.33AB + 8.00AC + 4.80BC; R^2 = 0.9175, P = 0.0004 < 0.01;$$

$Y_2 = 29.64A + 22.50B + 19.26C + 3.79AB + 16.44AC + 24.58BC$ ;  $R^2 = 0.9316$ ,  $P = 0.0002 < 0.01$ ;

$Y_3 = 64.80A + 72.74B + 77.29C + 34.06AB + 53.54AC + 24.58BC$ ;  $R^2 = 0.8636$ ,  $P = 0.0026 < 0.01$ 。

通过对模型方程进行方差分析可知, 3个模型达到极显著水平 ( $P < 0.01$ ), 回归模型良好, 表明模型方程很好地拟合指标与配方比例关系。

由图7可知, 接种比例对于酸度的影响大小为乳酸菌 > 醋酸菌 > 酵母菌, 对挥发性物质种数的影响大小是酵母菌 > 醋酸菌 > 乳酸菌, 对感官评分影响大小为乳酸菌 > 醋酸菌 > 酵母菌。

### 2.3.2 混菌发酵最佳接种比例

根据表4结果, 利用混菌设计中Optimization功能, 确定混菌强化发酵的最佳接种比例为酵母菌40%、醋酸菌16%、乳酸菌44%, 相应预测值为酸度5.37%、挥发性物质种数28种、感官评分84.92。验证值为: 酸度5.28%、挥发性物质30种、感官评分85.65, 验证值与预测值基本一致。

## 3 结 论

与对照组相比, 强化组1、2、3的pH值分别下降0%、12.47%、22.63%, 稳定在4.33、3.79、3.35; 酸度分别上升了8.62%、82.75%、155.75%, 稳定在1.89%、3.18%、4.45%; 水分含量差别不大, 稳定在60.00 g/100 g左右。强化组1挥发性风味物质的种数及相对含量分别提高了17.39%、20.23%, 为27种、79.65%; 强化组3多糖质量浓度提高了68.43%, 高达1 143.78 mg/L。与对照组相比, 强化组3醋酸中草酸与苹果酸含量分别提高了23.46%、36.06%, 为0.36、2.91 g/100 g干醋; 强化组2、3乙酸含量分别提高了37.78%、44.61%, 稳定在12.924、13.868 g/100 g干醋; 乳酸含量提高了95.54%、120.11%, 稳定在7.841、8.875 g/100 g干醋; 柠檬酸含量提高了265.88%、321.80%, 稳定在0.772、0.870 g/100 g干醋; 琥珀酸含量提高412.19%、389.2%, 稳定在1.264、1.203 g/100 g干醋。综上所述, 强化组1增加食醋风味物质的种数及含量, 改善了食醋风味, 强化组2、3增加总酸及有机酸含量, 提高了出醋率。

以酸度、挥发性物质种数和感官评分为指标, 采用混菌设计确定3株功能菌最佳接种比例为产香酵母40%、醋酸菌16%、乳酸菌44%, 所得食醋的酸度为5.28%, 挥发性物质为30种, 感官评分为85.65。本研究结果为改善保宁醋风味、提高出醋率提供了一定的理论依据。

## 参考文献:

- [1] HASHIMOTO M, OBARA K, OZONO M, et al. Separation and characterization of the immunostimulatory components in unpolished rice black vinegar (kurozu)[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2013, 116(6): 688-696. DOI:10.1016/j.jbiosc.2013.05.029.
- [2] CHOU C H, LIU C W, YANG D J, et al. Amino acid, mineral, and polyphenolic profiles of black vinegar, and its lipid lowering and antioxidant effects *in vivo*[J]. *Food Chemistry*, 2015, 168: 63-69. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.07.035.
- [3] XU Y, WANG D, FAN W L, et al. Traditional Chinese biotechnology[J]. *Biotechnology in China II: Chemicals, Energy and Environment*, 2010, 122: 189-233.
- [4] LIU D R, ZHU Y, BEEFTINK R, et al. Chinese vinegar and its solid-state fermentation process[J]. *Food Reviews International*, 2004, 20(4): 407-424. DOI:10.1081/FRI-200033460.
- [5] 聂志强, 韩玥, 郑宇, 等. 宏基因组学技术分析传统食醋发酵过程微生物多样性[J]. *食品科学*, 2013, 34(15): 198-203. DOI:10.3969/j.issn.0254-5071.2012.07.001.
- [6] WANG Z M, LU Z M, YU Y J, et al. Batch-to-batch uniformity of bacterial community succession and flavor formation in the fermentation of Zhenjiang aromatic vinegar[J]. *Food Microbiology*, 2015, 50: 64-69. DOI:10.1016/j.fm.2015.03.012.
- [7] SHI J Y, LIU Y, FENG W, et al. Investigation of bacterial diversity in traditional meigui rice vinegar by PCR-DGGE method[J]. *Lecture Notes in Electrical Engineering*, 2014, 249: 417-425. DOI:10.1007/978-3-642-37916-1.43.
- [8] LI S, LI P, LIU X, et al. Bacterial dynamics and metabolite changes in solid-state acetic acid fermentation of Shanxi aged vinegar[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100: 4395-4411. DOI:10.1007/s00253-016-7284-3.
- [9] 钟正丹, 吴华昌, 邓静, 等. 保宁醋醋曲中产香酵母的鉴定及挥发性成分研究[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(24): 206-210. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2015.24.036.
- [10] 李志辉, 任蓓蕾, 朱健辉, 等. 一株产乙酸乙酯酵母C42的分离与鉴定[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(8): 188-191. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2015.24.036.
- [11] 梁丽绒. 山西老陈醋酿酒功能菌选育与有效成分分析[D]. 太原: 山西大学, 2006: 21-32.
- [12] YU Z T, MOHN W W. Bioaugmentation with the resin acid-degrading bacterium *Zoogloea resiniphila* DhA-35 to counteract pH stress in an aerated lagoon treating pulp and paper mill effluent[J]. *Water Research*, 2002, 36(11): 2793-2801. DOI:10.1016/S0043-1354(01)00496-1.
- [13] YU Z T, MOHN W W. Bioaugmentation with resin-acid-degrading bacteria enhances resin acid removal in sequencing batch reactors treating pulp mill effluents[J]. *Water Research*, 2001, 35(4): 883-890. DOI:10.1016/S0043-1354(00)00335-3.
- [14] NICOLELLA C, ZOLEZZI M, RABINO M, et al. Development of particle-based biofilms for degradation of xenobiotic organic compounds[J]. *Water Research*, 2005, 39(12): 2495-2504. DOI:10.1016/j.waters.2005.04.016.
- [15] DONG H L, ONSTOTT T C, DEFLAUM M F, et al. Relative dominance of physical versus chemical effects on the transport of adhesion-deficient bacteria in intact cores from South Oyster, Virginia[J]. *Environmental Science & Technology*, 2002, 36(5): 891-900. DOI:10.1021/es010144t.

- [16] STREGER S H, VAINBERG S, DONG H L, et al. Enhancing transport of *Hydrogenophaga flava* ENV735 for bioaugmentation of aquifers contaminated with methyl tert-butyl ether[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2002, 68(11): 5571-5579. DOI:10.1128/AEM.68.11.5571-5579.2002.
- [17] 周辉宇, 陆文静, 王洪涛, 等. 高效纤维素分解菌生物强化技术在工厂化好氧堆肥中的应用初探[J]. 农业环境科学学报, 2005, 24(1): 182-186. DOI:10.3321/j.issn:1672-2043.2005.01.040.
- [18] 许伟. 镇江香醋醋酸发酵过程微生物群落及其功能分析[D]. 无锡: 江南大学, 2011: 21-25.
- [19] 倪峥飞. 镇江香醋固态发酵过程中酿造微生物强化及醋醅总DNA提取方法的初步研究[D]. 无锡: 江南大学, 2009: 16-19.
- [20] MORALES P, GAYA P, NUNEZ M. Effect of the addition of *Micrococcus* sp. INIA 528 milk cultures and curds on cheese proteolysis and lipolysis[J]. Milchwissenschaft-Milk Science International, 2005, 60(4): 410-414.
- [21] 张意静. 食品分析(修订版)[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001: 111-123.
- [22] 白雪娟, 苏建宇, 赵树欣, 等. 发菜细胞培养液中多糖含量测定方法的比较研究[J]. 食品工业科技, 2004, 25(11): 146-149. DOI:10.3969/j.issn.1002-0306.2004.11.049.
- [23] 龚加路, 吴华昌, 邓静, 等. 泡菜生香酵母的分离鉴定与挥发性香气成分分析[J]. 生物技术, 2015, 25(1): 75-78. DOI:10.16519/j.cnki.1004-311x.2015.01.015.
- [24] NICOLELLA C, ZOLEZZI M, RABINO M, et al. Development of particle-based biofilms for degradation of xenobiotic organic compounds[J]. Water Reseach, 2005, 39(12): 2495-2504. DOI:10.1016/j.waters.2005.04.016.
- [25] 荆春海, 郭兆阳. 白酒中有机酸测定方法综述[J]. 山东轻工业学院学报(自然科学版), 2011, 25(3): 30-33. DOI:10.3969/j.issn.1004-4280.2011.03.010.
- [26] 高年发, 任雪. HPLC测定独流老醋陈酿过程中有机酸变化[J]. 中国酿造, 2010, 29(3): 143-147. DOI:10.3969/j.issn.0254-5071.2010.03.004.
- [27] 余永建. 镇江香醋有机酸组成及乳酸合成的生物强化[D]. 无锡: 江南大学, 2014: 40-45.
- [28] 聂志强, 汪越男, 郑宇. 传统食醋酿造过程中微生物群落的多样性及功能研究进展[J]. 中国酿造, 2012, 31(7): 1-6. DOI:10.3969/j.issn.0254-5071.2012.07.001.
- [29] JIANG Y J, GUO J N, LI Y D, et al. Optimisation of lactic acid fermentation for improved vinegar flavour during rosy vinegar brewing[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2010, 90(8): 1334-1339. DOI:10.1002/jsfa.3986.
- [30] 赵国忠, 孙峰宇, 姚云平, 等. 老陈醋酿造过程中乳酸菌筛选及对风味的影响[J]. 食品工业科技, 2014, 35(24): 159-163. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2014.24.025.