紫甘薯醋酒精发酵阶段混菌发酵工艺条件优化

尹永祺，张书玉，韩永斌，顾振新*
(南京农业大学食品科技学院，江苏 南京 210095)

摘 要：优化以紫甘薯为主要原料酿制紫甘薯醋过程中酒精发酵阶段的工艺条件。采用酵母菌和乳酸菌混菌发酵，通过单因素试验和正交试验，以发酵液中酒精度和总酸含量为指标，研究酵母菌接种量、乳酸菌接种量和接种时间、糖化液体积比、发酵温度以及发酵时间对酒精发酵的影响并对其进行优化。结果表明：紫甘薯醋酒精发酵阶段最佳工艺条件为酵母菌接种量0.3%、乳酸菌接种量10%、乳酸菌接种时间0h(即与酵母菌同时接种)，紫甘薯糖化液与大米糖化液体积比5:5、发酵温度30℃、发酵84h，制得发酵液中酒精和总酸含量分别达7.15%和0.63g/100g。紫甘薯醋酒精发酵过程接种乳酸菌，可显著增加酒精发酵液中总酸含量，利于改善紫甘薯醋品质。

关键词：紫甘薯醋；酒精发酵；乳酸菌；液体发酵

Optimization of Mixed Starter Cultures Fermentation Conditions during Alcohol Fermentation Stage of Purple Sweet Potato Vinegar

YIN Yong-qi，ZHANG Shu-yu，HAN Yong-bin，GU Zhen-xin*
(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract：The production of purple sweet potato vinegar was explored based on alcohol fermentation by inocluation of mixed pure cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus acidophilus*. One-factor-at-a-time experiments and orthogonal array design were employed to optimize inoculum sizes of both starter cultures, inoculation time, volume ratio between saccharified solutions of purple sweet potato and rice, fermentation temperature and fermentation time on the contents of alcohol and total acid in fermentation broth. The optimal alcohol fermentation conditions for producing purple sweet potato vinegar were establsihed as follows: 0.3% *Saccharomyces cerevisiae* and 10% *Lactobacillus acidophilus* cultures were simultaneously inoculated to mixed saccharified solutions of purple sweet potato and rice at a ratio of 5:5 and then fermented at 30 ℃ for 84 h. The contents of alcohol and total acid of fermentation broth obtained under the optimized conditions were 7.15% and 0.63 g/100 g, respectively. In conclusion, total acid content in fermentation broth can be increased by inoculation of *Lactobacillus acidophilus*, resulting in improved quality of purple sweet potato vinegar.

Key words：purple sweet potato vinegar；alcohol fermentation；lactic bacteria；liquid fermentation
中图分类号：TS264.2 文献标志码：A 文章编号：1002-6630(2013)11-0188-05
doi:10.7506/spkx1002-6630-201311041

紫甘薯(*Ipomoes batatas* L.)是一类集营养、保健和色素于一体的新型甘薯品种[1]。紫甘薯除含有普通甘薯的营养成分外，还富含花色苷[2]、黄酮、绿原酸、果胶和膳食纤维[3]等功能性成分，因而具有抗氧化、抗突变、缓解高血压、改善肝功能和增强记忆力等多种保健功能[4-6]。目前国内外已针对紫甘薯开发出一系列产品，但多集中于紫甘薯泥[7]、紫甘薯汁[8]和紫甘薯酒[9]等方面，而以紫甘薯酿造食醋的研究鲜见报道。紫甘薯醋不仅营养丰富，且同时兼具紫甘薯和食醋的多种保健功能，符合当今保健醋生产消费的发展趋势，具有重要的开发价值和广阔的应用前景。

食醋的酸味柔和与否是评价其品质的重要指标之一，其中挥发酸的刺激性气味是制约食醋发展的关键因素。目前，采用纯种酵母菌发酵生产的食醋中不挥发酸含量少，刺激味重，缺乏传统食醋酸味的柔和性。乳酸菌可将酒精发酵过程中产生的的苹果酸分解为乳酸，从而提高醋产品中不挥发酸含量，降低醋酸的刺激味，改善食醋品质[10]。目前，国内对酵母菌联合乳酸菌发酵在食醋酒精发酵方面系统的研究报道较少。

收稿日期：2012-02-24
基金项目：江苏高校优势学科建设工程资助项目
作者简介：尹永祺(1988—)，男，博士研究生，研究方向为食品中功能成分的富集技术。E-mail：2011208009@njau.edu.cn
*通信作者：顾振新(1956—)，男，教授，博士，研究方向为生物技术与功能食品。E-mail：guzx@njau.edu.cn

本研究以紫甘薯为主要原料，采用酵母菌和乳酸菌混菌发酵，以发酵液的酒精度和总酸含量为指标，对发酵工艺条件进行优化，为紫甘薯醋工业化生产提供技术参考和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料、菌种与试剂

紫甘薯、大米 市售。

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) 广东省东莞市丹宝利酵母厂；嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)分离自泡菜本实验室保藏。

α-淀粉酶、果胶酶、糖化酶 江阴市爱顿生物工程有限公司。

1.2 仪器与设备

UV-2802型紫外-可见分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司；LDZX-40AI型自动压力蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂；AUY-120型电子天平 日本岛津公司。

1.3 方法

1.3.1 原料预处理

选用新鲜、无病虫害、无腐烂的紫甘薯，洗净、晾干后切成3～5mm薄片，于50℃热风干燥后粉碎，过60目筛，装于塑料袋中4℃密封贮藏。

大米除杂后粉碎，过60目筛，装于塑料袋中4℃密封贮藏。

1.3.2 菌种活化

酵母菌活化：按料液比1:100(*m*/*V*)将活性干酵母置于30℃水浴复水20min，加入0.4g/L白砂糖，搅拌均匀，于30℃条件下活化2h备用。

乳酸菌活化：接种乳酸菌于MRS液体培养基，置于30℃静置培养16h，活化两次备用。

1.3.3 糖化液制备

将紫甘薯粉按料液比1:5(*m*/*V*)添加蒸馏水，70U/g添加*α*-淀粉酶，于90℃酶解30min；90U/g添加果胶酶，于35℃酶解120min；添加500U/g糖化酶，于60℃酶解60min，制得紫甘薯糖化液。大米糖化液制备除不经果胶酶酶解外，方法同上。

1.3.4 混菌发酵条件优化

1.3.4.1 发酵温度的选择

按体积分数接种0.2%酵母菌、10%乳酸菌于初始发酵液，分别置于20、25、30、35℃发酵5d，测定发酵液酒精度和总酸含量。

1.3.4.2 糖化液体积比的选择

按体积分数接种0.2%酵母菌，10%乳酸菌于发酵液，发酵液中紫甘薯糖化液和大米糖化液体积比分别为3:7、4:6、5:5、6:4和7:3，置于30℃发酵5d，测定发酵液酒精度和总酸含量。

1.3.4.3 酵母菌接种量的选择

按体积分数分别接种0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%酵母菌，10%乳酸菌于初始发酵液，置于30℃发酵5d，测定发酵液酒精度和总酸含量。

1.3.4.4 乳酸菌接种量的选择

按体积分数分别接种5%、10%、15%、20%、25%乳酸菌(以不接种乳酸菌作对照)，0.2%酵母菌于初始发酵液，置于30℃发酵5d，测定发酵液酒精度和总酸含量。

1.3.4.5 乳酸菌接种时间的选择

接种0.2%酵母菌于初始发酵液，分别在发酵的0、12、24、36h接种10%乳酸菌，置于30℃发酵5d，测定发酵液酒精度和总酸含量。

1.3.4.6 发酵时间的选择

接种0.2%酵母菌、10%乳酸菌于初始发酵液，置于30℃发酵，每隔12h测定发酵液酒精度和总酸含量。

1.3.4.7 正交试验优化

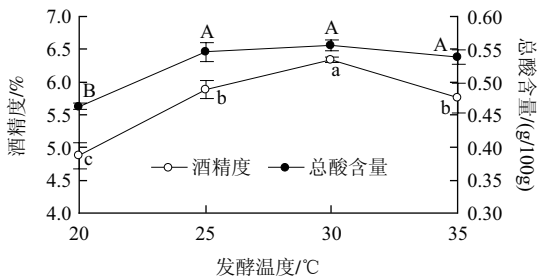
采用三因素三水平正交试验，考察酵母菌接种量、糖化液体积比和乳酸菌接种量3种因素对酒精发酵阶段酒精度和总酸含量的影响。

1.3.5 指标测定

酒精含量测定：参照王洪臣等[11]方法测定；总酸含量测定：采用酸碱滴定法测定。

2 结果与分析

2.1 发酵温度的影响



大写字母和小写字母不同分别表示处理间总酸含量和酒精度差异达显著水平($P<0.05$)。下同。

图1 发酵温度对酒精度和总酸含量的影响

Fig.1 Effect of fermentation temperature on the contents of alcohol and total acid

由图1可知，在20～35℃范围内，随着发酵温度增高，发酵液中酒精度和总酸含量变化趋势一致，均呈先增加后减少趋势。当发酵温度为30℃时，酒精度和总酸含量均达到峰值，分别为6.3%和0.56g/100g，显著高于20℃时酒精度和总酸含量。随着发酵温度的进一步增高，酒精度显著下降，且总酸含量也呈下降趋势。因此，选择30℃作为酒精发酵的发酵温度。

2.2 糖化液体积比的影响

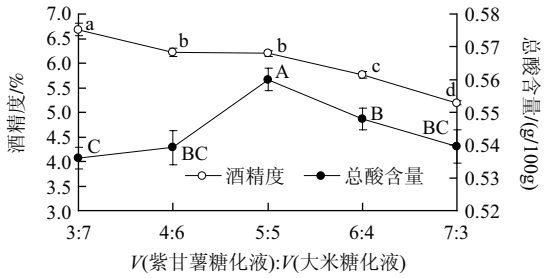


图2 糖化液对酒精度和总酸含量的影响

Fig.2 Effect of volume ratio between saccharified solutions of purple sweet potato and rice on the contents of alcohol and total acid

由图2可知，随着糖化液中紫甘薯含量的增加，发酵液中酒精度呈持续下降趋势，而总酸含量呈先增加后减少趋势。初始发酵液中紫甘薯和大米糖化液体积相等时，总酸含量最高达0.56g/100g，显著高于其他体积比发酵液中总酸。综合考虑发酵液中酒精度和总酸含量，选择糖化液体积比4:6、5:5和6:4做进一步研究。

2.3 酵母菌接种量的影响

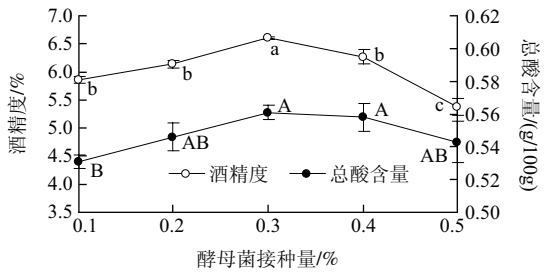


图3 酵母菌接种量对酒精度和总酸含量的影响

Fig.3 Effect of inoculum amount of yeast on the contents of alcohol and total acid

由图3可知，酵母菌接种量在0.1%～0.5%范围内，发酵液中酒精度和总酸含量均随接种量的增加呈先增加后减少趋势。酵母菌接种量为0.3%时，发酵液中酒精度和总酸含量达最高分别为6.6%和0.56g/100g，随后酒精度显著下降。由此可见，酵母菌接种量为0.2%～0.4%为宜。

2.4 乳酸菌接种量的影响

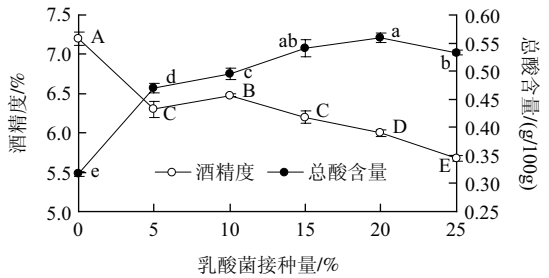


图4 乳酸菌接种量对酒精度和总酸含量的影响

Fig.4 Effect of inoculum amount of lactic acid bacteria on the contents of alcohol and total acid

由图4可知，酒精发酵过程中接种乳酸菌，发酵液中总酸含量显著增加，随着乳酸菌接种量的增加，发酵液中酒精度和总酸含量变化趋势相反，酒精度逐步下降，而总酸含量呈上升趋势。乳酸菌接种量为5%、10%、15%、20%和25%的酒精发酵液中总酸含量分别为对照的1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍和1.7倍。综合考虑发酵液中酒精度和总酸含量，乳酸菌接种量为5%～15%。

2.5 乳酸菌接种时间的影响

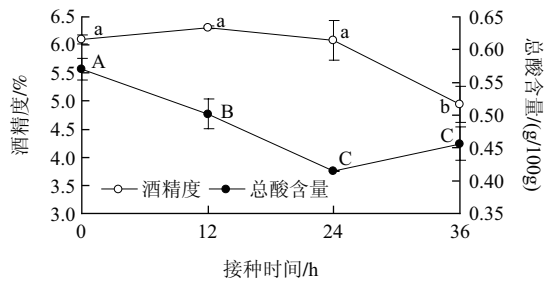


图5 乳酸菌接种时间对酒精度和总酸含量的影响

Fig.5 Effect of inoculation time of lactic bacteria on the contents of alcohol and total acid

由图5可知，乳酸菌在24h内接种对发酵液中酒精度无显著影响，发酵36h时接种酒精度显著下降；在0～36h接种乳酸菌，总酸含量随接种时间的延迟呈先快速下降后缓慢回升的趋势。确定发酵0h接种乳酸菌，即与酵母菌同时接种，此时发酵液中总酸含量最高且酒精度较高。

2.6 发酵时间的影响

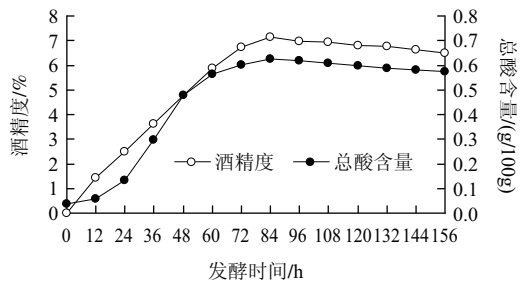


图6 发酵时间对酒精度和总酸含量的影响

Fig.6 Effect of fermentation time on the contents of alcohol and total acid

由图6可知，酒精发酵阶段发酵液中酒精度和总酸含量变化趋势一致，84h内酒精度和总酸含量均随发酵时间的延长而持续增加，发酵84h酒精度和总酸含量达最大值，分别为7.2%和0.63g/100g，随后其含量均保持相对稳定。因此，紫甘薯醋酒精发酵周期为84h时有利于发酵液中酒精和总酸的积累。

2.7 发酵条件正交试验优化

由表1可知，影响酒精发酵阶段酒精生成的因素依次是$A>C>B$，有利于酒精生成的最佳组合是$A_3B_2C_2$，

即酵母菌接种量0.4%，*V*(紫甘薯糖化液):*V*(大米糖化液)5:5，乳酸菌接种量10%；影响总酸生成的因素从主到次为*C*>*A*>*B*，其利于总酸生成的最佳组合是$A_1B_2C_3$，即酵母菌接种量0.2%、糖化液体积比5:5、乳酸菌接种量15%，此时发酵液总酸含量最高。由于两指标单独分析出来最优条件并不一致，因此，采取综合平衡法[12]，综合考虑各因素对指标的影响从而确定出最优工艺条件。对于因素*A*，其为A_1时，总酸含量最高，但酒精度过低，而为A_3时，酒精度最高，但总酸含量过低，为平衡发酵液中酒精度和总酸含量，因此，因素*A*选取A_2；对于因素*B*，酒精度和总酸含量的最优条件均为B_2，故因素*B*选取B_2；对于因素*C*，其为C_3时，发酵液中酒精度过低，而为C_2时，其总酸含量适宜，亦有利于酒精度提高，故因素*C*选取C_2。综上所述，酒精发酵的最佳组合为$A_2B_2C_2$，即酵母接种量0.3%、糖化液体积比5:5、乳酸菌接种量10%，由于此优化组合不在9次试验中，需追加实验加以验证。

表1 酒精发酵正交试验结果

Table 1 Orthogonal array design and results for the optimization of alcohol fermentation

试验号		*A*酵母菌接种量/%	*B* *V*(紫甘薯糖化液):*V*(大米糖化液)	*C*乳酸菌接种量/%	酒精度/%	总酸含量/(g/100g)
1		1(0.2)	1(4:6)	1(5)	5.37	0.442
2		1	2(5:5)	2(10)	5.64	0.602
3		1	3(6:4)	3(15)	5.17	0.541
4		2(0.3)	1	2	6.46	0.554
5		2	2	3	6.27	0.56
6		2	3	1	6.34	0.377
7		3(0.4)	1	3	6.02	0.510
8		3	2	1	6.85	0.385
9		3	3	2	6.56	0.420
酒精度	K_{11}	16.18	17.85	18.56		
	K_{12}	19.07	18.76	18.66		
	K_{13}	19.43	18.07	17.46		
	R_1	1.08	0.30	0.40		
总酸	K_{21}	1.585	1.506	1.204		
	K_{22}	1.491	1.547	1.576		
	K_{23}	1.315	1.338	1.611		
	R_2	0.090	0.070	0.136		

2.8 验证实验

表2 验证性实验结果

Table 2 Validation of the optimized fermentation conditions

处理	酵母菌接种量/%	*V*(紫甘薯糖化液):*V*(大米糖化液)	乳酸菌接种量/%	酒精度/%	总酸含量/(g/100g)
正交优化	0.3	5:5	10	7.15±0.23	0.63±0.13
随机组合	0.4	4:6	15	6.08±0.29	0.51±0.11

按正交试验优化的发酵最优条件进行验证实验，以确保实验的准确性。表2表明，当酵母接种量为0.3%、*V*(紫甘薯糖化液):*V*(大米糖化液)为5:5、乳酸菌接种量10%时，酒精发酵液酒精度达7.15%，总酸含量达0.63%，均高于正交试验结果中最高含量，故本研究确定的酒精发酵工艺合理可信。

3 讨 论

食醋酿造的酒精发酵过程中，糖酒转化率直接影响食醋的最终产量，同时其发酵过程中除产生酒精外，还会积累少量乳酸、柠檬酸及酯类等代谢产物，对食醋风味的形成有很大影响[13]。对于液态酒精发酵而言，最重要的影响因素包括发酵温度、接种量、发酵时间和营养水平等。单因素试验中，紫甘薯醋酒精发酵过程中发酵液的酒精度和总酸含量随发酵温度、发酵时间和酵母菌接种量的变化趋势一致且同时达到最高值。而在糖化液、乳酸菌接种量和接种时间的影响下，酒精度和总酸含量的变化趋势有所差别，其达到峰值条件也不同。优化黄瓜醋[14]、红枣醋[15]、柠檬醋[16]和苹果醋[17]等醋酸发酵条件均发现初始酒精度为6%时醋酸菌发酵旺盛，醋酸产量最高。而食醋中有机酸的含量对食醋的风味质量有直接影响，同时，紫甘薯中富含的功能性色素花色苷在酸化环境中稳定性好[18]。因此，酒精发酵液中酒精度达6%后，即以总酸含量作为考察酒精发酵条件的主要指标，从而确定糖化液体积比和乳酸菌接种量范围，通过进一步正交试验优化并确定酒精发酵最优条件。

本研究结果表明，酒精发酵过程中接种乳酸菌可显著增加酒精发酵液中总酸含量，这与以往报道一致。国建娜[19]发现在玫瑰醋酒精发酵阶段，添加乳酸菌与酵母菌共同发酵，可使不挥发酸的含量提高2.5～3.0倍，认为适量的乳酸菌与酒精酵母混合进行酒精发酵，对产酒精无影响，且乳酸在0.9%以下对酵母还有一定的促进作用。这是由于乳酸菌可将酒精发酵过程中的苹果酸分解为乳酸，从而增加不挥发酸含量[10]。因此，在紫甘薯醋酒精发酵阶段接种适量的乳酸菌不仅可以提高紫甘薯醋中乳酸等不挥发酸含量，降低挥发酸带来的刺激味，从而改善紫甘薯醋风味；同时，总酸含量的增加能有效降低酒精发酵液的pH值，有利于紫甘薯醋酿造后续实验中以酒精发酵液作为提取液提取紫甘薯花色苷，减少对花色苷的破坏[20]。

通过单因素试验和正交试验确定紫甘薯醋酒精发酵阶段混菌发酵最佳工艺条件为酵母菌接种量0.3%、乳酸菌接种量10%、乳酸菌接种时间0h(即与酵母菌同时接种)，*V*(紫甘薯糖化液):*V*(大米糖化液)为5:5、发酵温度30℃、发酵84h，发酵液中酒精度和总酸含量分别为7.15%和0.63g/100g。

参考文献：

[1] BOVELL-BENJAMIN A C. Sweet potato: a review of its past,

present, and future role in human nutrition[J]. Advances in Food and Nutrition Research, 2007, 52: 1-59.

[2] 彭强, 高彦祥, 袁芳. 紫甘薯及其花色苷的研究与开发进展[J]. 食品科学, 2010, 31(23): 401-404.

[3] SUDA I, OKI T, MASUDA M, et al. Physiological functionality of purple-fleshed sweet potatoes containing anthocyanins and their utilization in foods[J]. Japan Agricultural Research Quarterly, 2003, 37(3): 167-173.

[4] TEOW C C, TRUONG V D, MCFEETERS R F, et al. Antioxidant activities, phenolic and β-carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours[J]. Food Chemistry, 2007, 103(3): 829-838.

[5] KOBAYASHI M, OKI T, MASUDA M, et al. Hypotensive effect of anthocyanin-rich extract from purple-fleshed sweet potato cultivar Ayamurasaki in spontaneously hypertensive rats[J]. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 2005, 52(1): 41-44.

[6] CHO J, JONG S K, PHAM H L, et al. Antioxidant and memory enhancing effects of purple sweet potato anthocyanin and cordyceps mush-room extract[J]. Archives of Pharmacal Research, 2003, 26(10): 821-825.

[7] 李博, 雷激, 汤富蓉, 等. 紫甘薯泥制作工艺的研究[J]. 食品科技, 2011, 36(4): 81-86.

[8] 廖望, 陆珠华, 许金红, 等. 紫甘薯汁加工的酶处理技术研究[J]. 食品工业, 2011(11): 47-49.

[9] 张明, 王燕. 紫甘薯酒发酵工艺研究[J]. 酿酒科技, 2011(8): 53-56.

[10] 李大锦, 王汝珍. 提高液态深层发酵食醋风味的实用技术[J]. 中国酿造, 2005(1): 4-9.

[11] 王洪臣, 李建姝, 刘洪祥, 等. 马丁仪微量测定醋酸发酵液的酒精度[J]. 化学与生物工程, 2008, 25(2): 73-75.

[12] 李志西, 杜双奎. 试验优化设计与统计分析[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 156-160.

[13] 陆正清. 浅析食醋酿造酒精发酵工艺的管理[J]. 中国调味品, 2003(10): 6-8.

[14] 周红丽, 胡耀华. 黄瓜醋醋酸发酵工艺的研究[J]. 食品与机械, 2007, 23(3): 140-142.

[15] 傅力, 胡丽红, 古丽娜孜, 等. 红枣醋生产中醋酸发酵阶段最佳工艺条件的研究[J]. 中国调味品, 2009, 34(8): 72-75.

[16] 王毅, 刘学文, 伍学明. 柠檬果醋醋酸发酵工艺的研究[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(1): 75-78.

[17] 原德树. 液态深层发酵苹果醋及苹果醋饮料的研制[J]. 现代食品科技, 2010, 26(5): 523-526.

[18] CEVALLOS-CASALS B A, CISNEROS-ZEVALLOS L. Stability of anthocyanin-based aqueous extracts of Andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants[J]. Food Chemistry, 2004, 86(1): 69-77.

[19] 国建娜. 玫瑰醋糖化与酒精发酵过程工艺参数优化的研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2009.

[20] 王琴, 赖金莲, 王丽娟. 紫甘薯花色苷色素提取方法的研究[J]. 食品工业, 2009(4): 24-26.