

# 基于温度在线监测技术提高香醋固态发酵产酸率的研究

朱瑶迪<sup>1</sup>, 邹小波<sup>1</sup>, 林灏<sup>1</sup>, 石吉勇<sup>1</sup>, 夏蓉<sup>2</sup>

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013) (2. 镇江恒顺香醋有限公司, 江苏镇江 212004)

**摘要:** 镇江香醋传统翻醋工艺依赖工人的主观经验来确定翻醋时机和频率, 难以根据季节的交替变化进行科学调整, 直接导致不同季节醋醅的产酸率有很大差异, 尤其是在夏季, 醋醅产酸率偏低。本研究利用温度在线监测技术实时跟踪监测发酵过程中醋醅的温度, 以温度为依据客观地确定翻醋时间和频率去控制提热阶段的温度, 使其最高至 45~46℃, 以期能改善夏季产酸率低的问题。同时跟踪检测乙醇脱氢酶活性、pH 值、总酸含量以及卤水酸度等理化指标, 用于研究基于温度在线监测技术的翻醋新方式对醋醅发酵过程的影响。结果表明: 与传统的翻醋相比, 基于温度在线监测技术的翻醋新方式不仅将醋醅产酸率提高约 1%, 而且将醋酸菌的代谢活性提高了 10%, 新的翻醋方式有效的消除了醋醅产酸率随季节波动的现象。

**关键词:** 固态发酵; 产酸率; 温度控制

文章篇号: 1673-9078(2013)8-1926-1930

## Increasing the Acid Yield Rate of Solid-state Vinegar Fermentation Based on Temperature Online Monitoring Technology

ZHU Yao-di<sup>1</sup>, ZOU Xiao-bo<sup>1</sup>, LIN Hao<sup>1</sup>, SHI Ji-yong<sup>1</sup>, XIA Rong<sup>2</sup>

(1.School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

(2.Henshun of Zhenjiang aromatic vinegar co., LTD, Zhenjiang 212004, China)

**Abstract:** Zhenjiang aromatic vinegar is one of the most famous Chinese traditional vinegar, whose traditional process depends on the subjective experience of workers to determine the time and frequency of stirring culture. It is difficult to make scientific adjustment according to the season changes, resulting in large different of the acid production rate. Especially in summer, the acid production rate is very low. In order to overcome this problem, an intelligent acquisition module based on thermal resistance was build and applied to real-time monitor the temperature of vinegar culture in the fermentation process. The temperature of the heating stage was controlled by continual stirring the vinegar culture without changing traditional process to improve the acid production rate. At the same time, the pH value, total acid content and activity of ethanol dehydrogenase at different stages of fermentation were detected. The results showed that the activity of ethanol dehydrogenase in temperature-adjusted group was higher than that in control group, indicating that suitable fermentation temperature can enhance the metabolic activity of acetic bacteria. And the acid production rate was increased by 1% based on the temperature online monitoring technology. The new method of the stirring culture can eliminate effectively the phenomenon of changes in the acid production rate due to changes in season. This study showed that controlling the temperature of the heating stage was very effective to increase the acid production rate.

**Key words:** solid-state fermentation; acid yielded rate; controlled temperature

醋, 不仅是调味不可或缺的佳品, 更是一剂良药, 在我国拥有悠久的历史, 是我国古代文化重要组成部分

收稿日期: 2013-04-15

国家自然科学基金资助项目(60901079); 全国优秀博士基金资助项目

(200968); 江苏省农业自主创新计划资助项目(CX(11)2028); 江苏大学拔尖人才启动基金资助项目

作者简介: 朱瑶迪(1987-), 女, 博士生, 研究方向: 食品品质无损检测

通讯作者: 邹小波, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事农产品、食品品质无损检测研究

分。镇江香醋是中国四大名醋之一, 是国家非物质文化遗产, 它是固态分层发酵的典型代表, 酿得的成品香醋具有“酸而不涩、香而微甜、色浓味鲜、愈存愈香”等特点<sup>[1]</sup>。

镇江香醋虽然历史悠久, 风味独特, 但传统的发酵工艺依赖工人的主观经验进行翻醋, 使得不同季节的产酸率有很大差别, 尤其在夏季。本课题组跟踪检测镇江香醋近 2 年的醋醅产酸率, 经统计发现夏季产酸率最低(图 1)。产酸率是评价醋醅发酵质量的重要

指标之一。怎样提高夏季产酸率,是现今固态发酵方面非常棘手的问题。目前,国内外对于食醋酿造行业的研究主要集中于醋酸菌分离<sup>[2]</sup>,新品醋的开发<sup>[3]</sup>,固态发酵过程代谢产物的研究,如张丽娟<sup>[4]</sup>等人研究固态发酵过程有机酸的变化。但对于提高香醋夏季产酸率的研究较少,这方面还缺乏深入的了解。

醋醅发酵过程一般分为提热、分层翻醅、露底和封醅4个阶段,其中提热阶段是将代谢最旺盛的微生物作为种子进行套醅接种,然后进行扩大培养,在发酵过程中,它是一个非常关键的阶段。然而传统的操作工艺在该阶段不进行大幅度翻醅,还要在醋醅表层加盖稻糠用来提热,这在夏季会使发酵温度迅速升高。主要是因为发酵过程中物料呈半固态形式,不易散热,发酵时醋酸菌等微生物又放出大量的热,且它们繁殖和代谢对生长环境中的温度、酸度、含氧量等又有很高的要求,所以醋酸菌往往在生长环境适宜的局部繁殖,发酵活动活跃,易引起醋醅温度局部过高,这不仅影响微生物代谢,还易使酒精、水分等挥发,造成醋醅产酸率偏低,以至于出现异味甚至坏醅等现象,为了使醋醅整体发酵均匀,并保证温度和含氧量在适宜范围内,需要对醋醅进行翻醅处理。根据对醋酸菌群的研究<sup>[5]</sup>发现,其在38~45℃时代谢最为旺盛,超过其最适宜温度,将影响生长代谢。经研究发现,适时控制提热阶段的温度,能提高醋醅中醋酸菌等微生物的代谢活性。本试验在保持原有传统工艺的基础上,通过温度在线监测技术,利用温度传感器首次24h跟踪揭示了醋醅发酵过程中温度的变化,然后以温度为依据确定翻醅时间和频率通过翻醅工艺控制提热阶段的温度,同时跟踪检测了几个重要的发酵指标(pH值、酶活、总酸含量以及卤水酸度),与传统的工艺进行对比,以期能提高夏季醋醅产酸率。

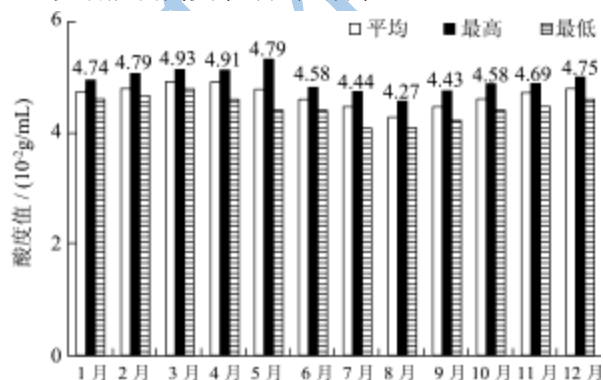


图1 镇江香醋一年中的产酸率统计图

Fig.1 The acid production rate of Zhenjiang aromatic vinegar in the fermentation process in a year

## 1 材料与方

### 1.1 试验材料

在镇江香醋厂发酵车间,以发酵醋醅为试验样品,同时检测4个规格相同且同时接种的发酵缸(1、2、3和4),其中1、2为试验组,3、4为对照组。试验组依据温度变化控制翻醅时间,即温度达到45℃就开始翻醅降温,使醋酸菌等微生物处在适宜的代谢条件下;对照组按照传统每天翻醅一次。

在翻醅前,两组在相同深度自上而下30、40、60cm取发酵醋醅并迅速混匀,装入冰盒,立即取回,作为测试相关理化指标的样品。本试验主要跟踪检测了醋醅发酵过程中的pH值、乙醇脱氢酶活性、总酸含量以及卤水总酸等重要理化指标,依据它们的结果,比较试验组和对照组的发酵情况,最后依据卤水的总酸含量评判两者的产酸率。

### 1.2 仪器及方法

#### 1.2.1 香醋发酵过程温度实时采集模块的研制

针对镇江香醋固态分层发酵的复杂性,本研究采用自制的多通道温度采集模块,实时采集香醋发酵过程中温度中的变化,如图2所示。该装置共有24个测量通道,每个通道连接一个经抗酸化处理的PT100热电阻(测量范围是-200~850℃,分辨率0.1℃,精度 $\pm 0.3$ ℃)传感器;热电阻信号经采集模块线性处理后转换成数值,经RS-232总线传送到电脑,采样速率6次/s。整个温度采集模块的线性范围为-20~85℃,可在湿度<90%的条件下运行。最后通过采集程序,利用参数设置软件将温度存储周期设置为1min,这样可以实现24h每1min记录一次温度数据。现场同时检测4个发酵缸,每个发酵缸6个传感器,共24个温度传感器,分层监测发酵过程中的温度变化。本试验传感器按照一定梯度进行放置,即自上而下30、40、60cm处各放置2个传感器,以期能全面监测发酵缸的温度变化情况。



图2 实时监测发酵温度示意图

Fig.2 Real-time monitoring fermentative temperature

#### 1.2.2 醋醅发酵过程中pH值测定

取醋醅10g,加入50mL蒸馏水浸泡30min,充分搅拌,然后用3层纱布过滤,取滤液,利用酸度计

(pHs-3B 酸度计, 上海机密科学仪器有限公司) 直接插入滤液中检测 pH 值。

### 1.2.3 醋醅发酵过程中乙醇脱氢酶活性的测定

本试验取发酵 1 d、5 d、11 d 和 18 d 的醋醅进行乙醇脱氢酶活性的检测。取 10 g 醋醅样品, 用 50 mL 蒸馏水浸泡, 加入玻璃珠, 用涡旋振荡器 (BS14-TM-1F 涡旋振荡仪, 德国) 充分震荡; 离心 (GL21M 高速冷冻离心机, 长沙湘智离心机仪器有限公司), 收集上清液 (含菌体), 弃去沉淀; 用蒸馏水洗涤 3 次; 高速离心 5 min, 弃上清, 收集洗净的菌体悬浮在蒸馏水中, 再在 4 °C 下离心 5 min, 收集湿菌体, 按体积比加入细菌裂解液 (pH 8.0 的 Tri-HCL 缓冲液, EDTA 缓冲液, NaCL 溶液, 0.1 mol/L 的 PMSF 和 0.25 mol/L 的溶菌酶) 在 37 °C 温育 1 h 后, 放置冰箱中冷冻后再溶解, 最后在 4 °C 下高速离心 20 min, 收集上清液, 即为 ADH 粗提液。

方法步骤: 用移液管向试管里移入焦磷酸钠缓冲液 (pH8.8)、底物溶液和辅酶溶液 (氧化型辅酶 I), 并于 37 °C 恒温水浴 (HH-8 数显恒温水浴锅, 上海跃进医疗器械厂) 20 min。加入同条件浴热的酶溶液 0.1 mL, 并利用秒表, 连续 5 min 内, 每隔 1 min 读取 340 nm 处的吸光度 (CARY50 紫外分光光度仪, 美国瓦里安公司)。计算公式如 (1-1) 所示:

$$U = E_{340} \times 3.1 / (0.1 \times \Delta X) \quad (1-1)$$

注:  $E_{340}$ -340 nm 处 5 min 内吸光度增大值;  $\Delta X$ -吸光度增大的单位 (0.001); 3.1-试液的体积, mL; 0.1-样品酶液的体积, mL。

表 1 测定 ADH 活性加入试剂体积参数表

Table 1 Reaction solution to determine ADH activity

试剂	焦磷酸钠 缓冲液/mL	底物溶 液/mL	辅酶溶 液/mL	酶液 /ADH mL
测定管	1.5	0.5	1.0	0.1
对照管	1.5	0.5	1.0	0.1 (裂解液)

### 1.2.4 醋醅总酸含量的测定

利用中和法测定醋醅中的总酸含量。具体操作步骤: 取 10 g 醋醅样品, 用 30 mL 蒸馏水浸泡, 用纱布过滤, 取其滤液, 用移液管移取 0.5 mL 与烧杯中, 加入 50 mL 蒸馏水和 2~3 滴酚酞指示剂, 用 NaOH 标准溶液进行滴定, 利用 NaOH 的消耗量计算醋醅总酸含量。

计算公式如 (1-2):

$$X = \frac{CVK}{m} \times \frac{V_0}{V_1} \times 100 \quad (1-2)$$

注: X-总酸度,  $10^2$ g/g; C-NaOH 标准溶液的浓度, mol/L; V-滴定消耗 NaOH 标准溶液的体积, mL; m-样品质量, g;

$V_0$ -样品稀释液的总体积, mL;  $V_1$ -滴定时吸取的样液体积, mL; k-换算为主要酸的系数, (醋酸为 0.060g/mmol)。

### 1.2.5 卤水总酸含量的测定

利用中和法测定醋醅中的卤水含量。具体操作步骤: 用移液管取发酵缸底部的卤水 0.5 mL 与三角瓶中, 加入 50 mL 蒸馏水和 2~3 滴酚酞指示剂, 摇匀, 然后用 NaOH 标准溶液进行滴定, 利用 NaOH 的消耗量计算卤水的总酸含量。每个发酵缸测 3 个平行样, 将其平均值作为该缸卤水的总酸度。计算公式如 1-2 所示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 醋醅发酵过程中提热阶段的温度分析

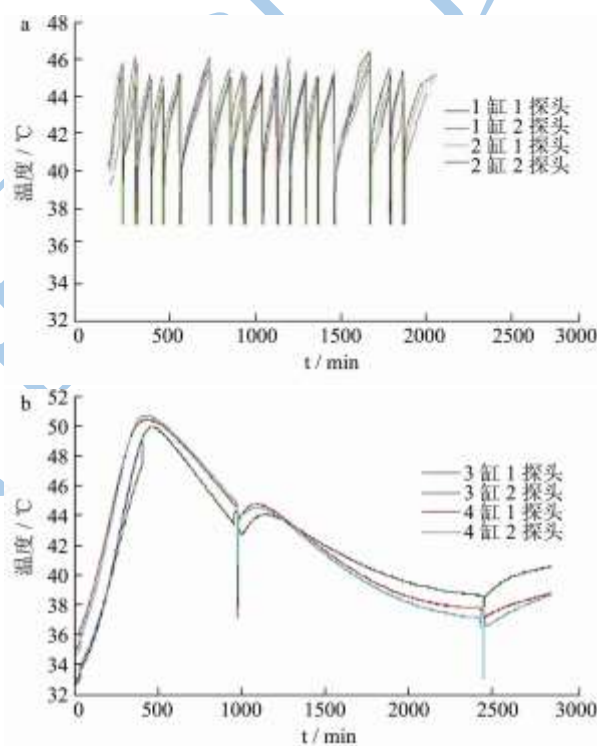


图 3 醋酸发酵过程中对对照组和试验组提热阶段的温度变化曲线图

Fig.3 The temperature change at the heat stage of acetic acid fermentative process

通过温度监测的情况发现, 接种 12~20 h 以后, 醋醅温度会达到 50 °C 甚至以上的高温 (如图 3 b), 这超出了醋酸菌等微生物适宜的代谢条件, 甚至杀死醋酸菌等主要微生物, 还容易使醋醅中的酒精、水分挥发, 出现烧醅等情况, 严重影响发酵质量。所以本试验控制提热阶段的温度, 使其维持在最高 45~46 °C, 以至于主要微生物在适宜的温度下进行生长代谢 (如图 3 a)。在分层翻醅阶段试验组的温度高于对照组的, 究其原因, 可能是因为醋酸菌等微生物在提热阶段一

直处于适宜的温度条件下, 生长比较迅速, 代谢较旺盛, 产生大量的热量造成的。

## 2.2 pH 值的结果分析

醋醅的 pH 值在发酵过程中不断发生变化, 它所反映的  $H^+$  浓度决定着醋醅的酸性强弱<sup>[6]</sup>, 引起它变化的原因是细胞或基质消耗会产酸, 通过影响基质分解以及基质和产物通过细胞壁运输, 其对细胞生长及产物的形成具有重要的影响, 因此 pH 值是发酵过程中一个非常重要的因素, 是微生物在一定环境下代谢活动的综合指标, 其高低会影响某些化合物分子进入细胞的状况, 从而促进或抑制微生物的生长, 进而影响整个发酵过程中目标产物的积累。然而温度的变化对 pH 值有很大的影响, 则依据温度的控制情况, 检测发酵过程中 pH 值的变化, 对醋醅的发酵有很好的监督作用。

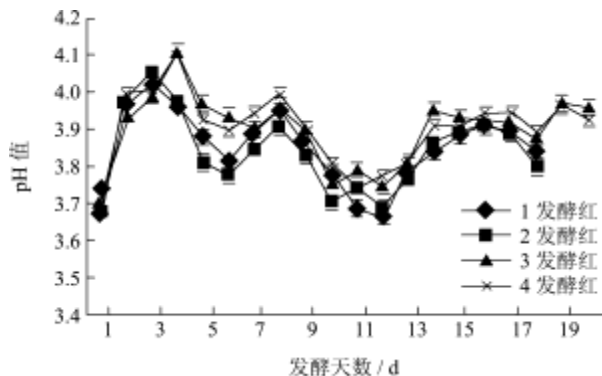


图 4 醋醅发酵过程中 pH 值的变化

Fig.4 Changes of the pH of the vinegar culture in the fermentative process

由图 4 知, 试验组和对照组种子 pH 均约是 3.65; 发酵初期, 醋酸菌等微生物进入新的环境, 经调整期后, 有机酸等产物积累较少, 试验组 pH 值从 3.65 逐渐升高至 4.13, 对照组升至 4.02; 在提热阶段, 试验组 pH 值变化较快, 迅速降低; 分层翻醅阶段, 微生物代谢旺盛, 酒精逐渐被氧化成醋酸, 且有大量游离  $H^+$  生成, pH 值呈下降趋势, 基本维持在 3.65~3.99 之间; 在发酵后期, 醋醅的 pH 值基本稳定, 试验组提前 2d 发酵成熟进行封醅。综上所述, 温度的变化能影响 pH 值, 缩短发酵时间, 提高醋醅的发酵效率。

## 2.3 乙醇脱氢酶活性的结果分析

醋酸菌的酶类主要存在细胞膜中, 并与膜中的磷脂相结合。其中主要是乙醇氧化为乙醛的乙醇脱氢酶 (ADH) 和将乙醛再氧化成醋酸的乙醛脱氢酶 (ALDH) 实现食醋酿造<sup>[7-8]</sup>。醋酸菌的发酵能力与这两种酶的活性有很大关系<sup>[9-12]</sup>, 尤其是前者。在发酵

的不同阶段, 醋酸菌的酶活性与很多因素有很大相关性, 其中温度是影响酶活性的关键因素。

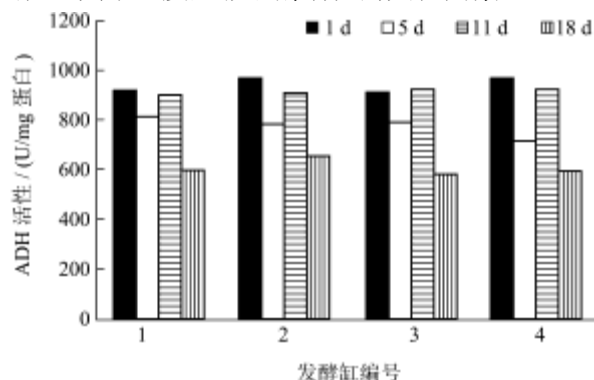


图 5 醋醅发酵过程中乙醇脱氢酶活性变化

Fig.5 Change of alcohol dehydrogenase activity in the vinegar culture fermentative process

本试验取发酵过程中的醋醅进行乙醇脱氢酶活性的检测, 其结果如图 5 所示。在第 1 d, 试验组和对照组均以发酵 9~11 d 的醋醅进行接种, 两组的酶活性值非常相近。在第 5 d, 提热阶段结束, 发酵进入分层翻醅阶段, 经检测, 乙醇脱氢酶活性试验组比对照组强, 究其原因, 可能是由于控制了提热阶段的温度, 使醋酸菌等微生物处在适宜的生长条件下, 代谢活跃; 在第 11 d, 醋醅中的微生物代谢最为旺盛, 两者相比较, 试验组比对照组酶活性强 5% 左右; 正常发酵需要 20 d, 然而在第 18 d 时, 试验组发酵基本结束, 醋酸菌的代谢处于衰亡期, 代谢活性降低, 所以试验组乙醇脱氢酶活性, 在 18 d 时明显比对照缸的要低 10%, 提前进入封醅阶段, 缩短了发酵时间。则依据酶活性的结果分析知, 温度的变化, 对醋酸菌的代谢有很大影响, 如果适时的控制温度, 则能增加产酸率, 提高发酵效率。

## 2.4 醋醅总酸含量的结果分析

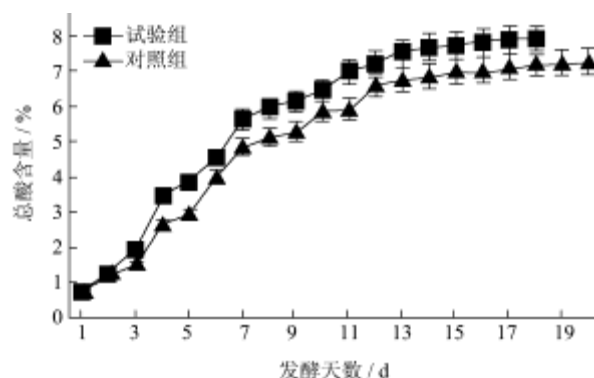


图 6 醋醅发酵过程中总酸的变化

Fig.6 Change of the total acidity in the fermentative process for the vinegar culture

镇江香醋醋醅的发酵过程是以醋酸菌为主的

微生物将酒精逐渐转化成醋酸,并伴有乳酸、琥珀酸等多种产物生成的过程<sup>[13]</sup>。随着发酵的进行,醋醅的总酸含量在不断上升。由图6知,醋醅总酸度在发酵前10 d会迅速增加,试验组微生物在适宜的温度条件下代谢比较活跃,明显比对照组的增加迅速,酸性产物积累较多(对照组0.89%上升至5.76%,试验组0.87%升至7.15%);在发酵10~15 d时,总酸含量仍是逐渐上升的,但其增长率减小,试验组和对照组的总酸含量分别是7.24%、6.12%;15~19 d总酸含量变化基本平稳,结果显示,试验组明显比对照组提高了产酸率。

## 2.5 卤水总酸度的结果分析

卤水是醋醅发酵后期,从醋醅渗透到发酵缸底部的液体,是判断醋醅产酸情况以及发酵质量的重要指标之一。因为醋酸以及多种有机酸等代谢产物易溶于水,并且比较均匀的分布在卤水里,检测卤水的总酸度最终可以用来评价试验组和对照组醋醅发酵的质量和产酸率。由检测结果知,试验组卤水总酸度明显比对照组高约 $0.9 \times 10^2$  g/mL,这对夏季醋醅发酵来说,产速率得到了明显提高。

表2 醋醅中卤水的总酸含量

Table 2 Total acid content of brine of vinegar culture

发酵组	总酸/( $10^2$ g/mL)				平均值
	1	2	3	4	
试验组	6.96	6.93	/	/	6.95
对照组	/	/	6.12	6.10	6.11

注:1、2为试验组,3、4为对照组。

## 3 结论

本研究提出了一种可用来提高夏季产酸率、缩短发酵时间的翻醅方式,摆脱了工人的主观经验,与传统的翻醅工艺相比,基于温度在线监测技术的翻醅新方式不仅将醋醅产酸率提高约1%,而且将醋酸菌的代谢活性提高了10%,醋醅总酸含量分别是7.24%、6.12%,明显有很大提高。新的翻醅方式有效的消除了醋醅产酸率随季节波动的现象。依据以上结果分析,不仅改善了醋醅夏季产酸率低的问题,还提前2d进行封醅,提高了发酵效率。这为进一步研究醋酸固态发酵过程找到了突破口。

## 参考文献

[1] Yu Yong-Jian, Lu Zhen-Ming, Yu Ning-Hua, et al. HS-SPME/GC-MS and chemometrics for volatile composition of Chinese traditional aromatic vinegar in the

Zhenjiang region [J]. Journal of the institute of brewing, 2012, 118: 133

[2] 胡会萍,郝林.山西老陈醋优势醋酸菌的分离鉴定[J].山西农业大学学报,2004,3:283-285

Hu H P, Hao L. Separation and Identification of Superior Acetobacter Acetic from Shangxi Super-Mature Vinegar [J]. Journal of Shangxi Agricultural University, 2004, 3: 283-285

[3] 王谦,卢婕,杨丽,等.发酵型灵芝醋饮料的工艺研究[J].食品科学,2007,28(5):379-381

Wang Q, Lu J, Yang L, et al. Study on Fermented Vinegar Beverage of Ganoderma Lucidum [J]. Food Science, 2007, 5:379-381

[4] 张丽娟,许伟,许正宏,等.恒顺香醋固态发酵过程有机酸的变化分析[J].中国调味品,2009,2:106-107

Zhang L J, Xu W, Xu Z H, et al. Analysis of organic acids in aerobic solid-fermentation culture of hengshun vinegar [J]. China Condiment, 2009, 2: 106-107

[5] 张卫华,汪超,罗俊杰,等.响应面优化醋酸菌发酵条件研究[J].中国酿造,2012,4:48-50

Zhang W H, Wang C, Luo J J, et al. Optimization of fermentation condition of acetic acid bacteria by response surface analysis [J]. China Condiment, 2012, 4: 48-50

[6] 许正宏,张丽娟.恒顺香醋醋酸发酵过程中风味物质变化的分析[D].无锡:江南大学,2008

XU Z H, Zhang L J. The Variation of the Flavor Substance in Aerobic Solid-fermentation Culture of Hengshun Vinegar [D]. Wuxi: Jiangnan university, 2008

[7] Wei LJ, Zhou JL, Zhu DN, et al. Functions of Membrane-bound alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase in the Bio-oxidation of Alcohols in gluconobacter oxydans DSM 2003 [J]. Biotechnology and bioprocess engineering. 2012, 12(17): 6-7

[8] Chavez-Pacheco JL, Contreras-zentella M, et al The quinohaemo protein alcohol dehydrogenase from Glucon acetobacter xylinus: molecular and catalytic properties [J]. Archives of microbiology, 2012, 9(192): 9-10

[9] 周秉辰.食醋发酵过程中醋酸菌乙醇脱氢酶的活性与产酸速率关系的研究[J].中国酿造,2009,11:58-59

Zhou B C. Correlation between the alcohol dehydrogenase activity of acetic acid bacteria and acid-producing rate in vinegar production [J]. China Brewing, 2009, 11: 58-59

[10] Joyeux A, Lafon-Lafourcade S, Ribéreau-Gayon P. Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine [J]. Appl. Environ. Microbiol, 1984, 48(1): 153-156

- [11] Liu X, Ohta T, Kawabata T, et al. Catalytic Mechanism of Short ethoxy chain nonylphenol dehydrogenase Belonging to a polyethylene glycol dehydrogenase group in the GMC oxidoreductase Family [J]. International journal of molecular sciences, 2013 6(14): 128-131
- [12] Timpson LM, Liliensek AK, et al. A comparison of two novel alcohol dehydrogenase enzymes (ADH1 and ADH2) from the extreme halophile *Haloferax volcanii* [J]. Applied microbiology and biotechnology, 2013, 97:195-203
- [13] 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, 6: 18-23
- Xu W. Analysis of the Microbial Diversity and Function during Acetic Acid Fermentation Process of Zhenjiang Aromatic vinegar [D]. Jiangnan university, 2011, 6: 18-23

现代食品科技