

文章编号: 1004-4353(2014)03-0245-04

苹果梨醋发酵过程中醋酸发酵条件的优化

白龙律¹, 尹振浩², 尹成日^{2*}

(1. 延边州产品质量检验所, 吉林 延吉 133000; 2. 延边大学理学院 化学系, 吉林 延吉 133002)

摘要: 以甲酚紫培养基中加入乙醇作为分离培养基, 从 5 种水果样品中分离得到 20 种醋酸菌, 然后通过产酸量的测定, 筛选出了一株产醋酸度高的醋酸菌 AAB13. 探讨了乙醇浓度、菌株接种量、发酵液有效体积对醋酸发酵的影响, 并在优化的条件下制备了苹果梨醋.

关键词: 醋酸菌; 苹果梨; 醋酸发酵; 果醋

中图分类号: O255. 47 **文献标识码:** A

Optimization of acetic acid fermentation
condition of in apple-pear vinegar fermentation process

BAI Longlü¹, YIN Zhenhao², YIN Chengri^{2*}

(1. *Products Quality Supervision and Testing Institute, Yanbian Korean Autonomous Prefecture, Yanji 133000, China*; 2. *Department of Chemistry, College of Science, Yanbian University, Yanji 133002, China*)

Abstract: Twenty acetic acid bacteria were isolated from five kinds of fruit using bromocresol purple medium with ethanol as the separation medium. A strain AAB13 was screened through the determination of acetic acid production. The effects of ethanol concentration, inoculation amount, and effective volume of fermentation broth on acetic acid fermentation were investigated, and apple pear vinegar was obtained at optimized fermentation conditions.

Key words: acetic acid bacteria; apple-pear; acetic fermentation; fruit vinegar

延边苹果梨是我国优良梨品种之一,其果肉
细胞、汁多,营养丰富^[1]. 研究显示,苹果梨果肉中
含蛋白质、脂肪、碳水化合物、钙、磷、铁、胡萝卜
素、硫胺素、尼克酸、抗坏血酸等营养成分^[2],并且
具有燥湿健脾、软化血管、止呕止泻、消痰止咳等
保健功能^[3]. 延边苹果梨资源丰富,但由于目前加
工转化能力较低,苹果梨资源没能得以充分利用.
研究^[4]表明,果醋中含有丰富的有机酸、氨基酸、
维生素及矿物质,具有食疗保健、美白护肤、抗病、
抗衰老、抗疲劳等功能. 目前,果醋的制备主要采
用将果汁经过酒精发酵后,再进行乙酸发酵的微
生物发酵法^[5]. 醋酸菌是水果醋生产过程中最重
要的因素. 在 20 世纪以前,醋酸菌属分为两个属:
一是可以将乙醇转化为醋酸的 *Gluconobacter*^[6];
二是可以将醋酸进一步氧化成二氧化碳和水的
Acetobacter^[7]. 进入 20 世纪后,通过生物基因研
究和分子生物学分类法,醋酸菌被分为 *Amey-*
amaea, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Acidomonas*,
Gluconacetobacter, *Asaia*, *Kozakia*, *Swaminathania*,
Saccharibacter, *Neoasaia*, *Granulibacter*, *Tanticharo-*
enia 等 12 个属^[8-9],其中葡萄醋杆菌属(*Gluconace-*
tobacter)是醋酸菌科的一个重要菌属,一些葡萄醋
杆菌如 *Ga. europaeus* 和 *Ga. entanii* 在工业醋特别
是高酸度醋的发酵中具有重要作用^[10]. 本文从 5

种水果样品中分离得到葡萄醋杆菌,并探讨了乙醇浓度、菌株接种量、发酵液有效体积对醋酸发酵的影响.

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

苹果梨由吉林省延吉市华龙集团提供;乙醇为天津协和医学科技公司生产;溴甲酚紫为天津市大茂化学试剂厂生产;氢氧化钠为大连华中试剂厂生产,其他化学试剂均为分析纯.实验仪器有 HZQ-C 型全温振荡器(中国哈尔滨东联电子技术开发有限公司),LZDX-30 型蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂),SPX-250B-Z 型生化培养箱和 BSC-1300 II A/B₃ 型生物安全柜(上海博迅实业有限公司医疗设备厂).

1.2 实验方法

1.2.1 微生物的分离 取西瓜、红葡萄、柿子、苹果梨、草莓等 5 种样品,用粉碎机将各种水果样品粉碎制浆后,121 ℃灭菌 20 min,然后在阴凉通风处放置 7 d.待样品的 pH 值下降后,取 1 g 的样品溶于 9 mL 无菌蒸馏水中,将样品从 10⁻¹ 稀释到 10⁻⁶.选取 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 的稀释液,分别取 0.1 mL 用无菌三角棒将溶液均匀涂布在 R₂A、MRS、Nu、YM 等平板培养基上,30 ℃下培养 7 d.挑取单一菌落涂布于新鲜的培养基上培养 3 d 后,在 4 ℃保藏备用.

1.2.2 醋酸菌的筛选 取纯化培养的微生物转移到 YEGA 培养基中.由于每 100 g YEGA 培养基中含有 30 mg 的溴甲酚紫(指示剂的变色范围为 pH6.8 紫色—pH5.2 黄色),醋酸菌将培养基中的乙醇转化为醋酸时,醋酸菌周围的 pH 下降,导致菌落周围会生成黄色条带.因此,分离菌落周围出现黄色条带的菌株,用于下一步实验.

1.2.3 高效醋酸菌的筛选 用接种环挑取 2 环醋酸菌菌体,接入 100 mL 液体培养基中,培养 7 d 后得到菌悬液,在 4 ℃条件下冷藏备用.为了筛选出高产醋酸的高效菌株,将分离得到的醋酸菌在不同乙醇浓度、不同接种量、不同发酵液有效体积等 3 个条件下进行正交试验.通过正交试验筛选出的高效菌株,用于下一步苹果梨汁的发酵实验.具体条件参见表 1.

表 1 正交试验因素水平

因素水平	乙醇浓度/%	菌株接种量/%	发酵液有效体积/%
1	6	10	40
2	8	20	50
3	10	30	60

1.2.4 苹果梨醋的发酵 挑选发育成熟、果皮红润的苹果梨,去皮、去核后放入榨汁机制备苹果梨汁.将得到的苹果梨汁利用孔径为 4 μm 的滤膜过滤后,在紫外灯下照射 15 min,然后在 121 ℃条件下灭菌 15 min.经灭菌后的粗果汁再利用孔径为 0.6 μm 滤膜过滤,得到苹果梨汁.

首先,利用实验室保藏的酵母菌对苹果梨汁进行酒精发酵.当苹果梨酒的酒精度达到正交试验的最佳酒精浓度时,取 25 mL 的菌悬液与 100 mL 苹果梨酒混合后放入 250 mL 锥形瓶中,在 80 ℃灭菌 15 min.然后,在灭菌的苹果梨酒中接种预先培养好的醋酸菌菌悬液,在 30 ℃、120 r/min 的恒温摇床中发酵得到苹果梨醋.最后,利用 0.1 mol/L NaOH 测定总酸的浓度.

1.2.5 形态学鉴定 采用三点接种法,将菌株分别接种于 YEGA 培养基上,在 30 ℃培养 3 d 后,肉眼观察菌落特征,并在显微镜下观察菌株的形态特征.

2 结果与讨论

2.1 微生物的分离筛选

在平板培养基中加入溴甲酚紫为指示剂,从上述 5 种水果样品中分离得到 20 种醋酸菌,其编号为 AAB1-AAB20.

2.2 高效醋酸菌的筛选

从分离得到的 20 种醋酸菌中,筛选出一种高产醋酸菌.在菌株的初筛工作中,利用正交分析法在不同的乙醇浓度、菌株接种量、发酵液有效体积等条件下测定每个菌株的产酸能力,并筛选出高效醋酸菌 AAB13.

图 1 为接种量为 20%、发酵液有效体积为 50% 时不同浓度的乙醇对产酸量的影响.结果表明,乙醇浓度越高,产酸量达到最高值所需的时间越短.从图 1 中可以看出,当乙醇浓度为 8% 时发酵液中的产酸量达到最高值.因此,在苹果梨醋的发酵过程中将发酵液的乙醇浓度定为 8%.

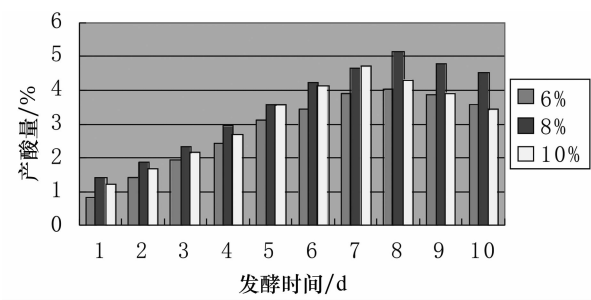


图 1 初始乙醇浓度对醋酸发酵的影响

图 2 为乙醇体积浓度为 8%、发酵液有效体积为 50% 时不同接种量对产酸量的影响. 结果表明, 接种量对发酵速度和产酸量的影响较大. 当接种量为 10% 时, 最高产酸量不及接种量 20% 和 30% 的产量; 当接种量为 30% 时, 虽然发酵周期短, 但最终产酸量比接种量 20% 时低, 这可能是由于过多的接种量使微生物大量繁殖, 造成营养物质和溶解氧短缺, 不利于发酵后期的代谢作用, 从而影响了产物的生成量. 因此, 在苹果梨醋的发酵过程中醋酸菌的接种量定为 20%.

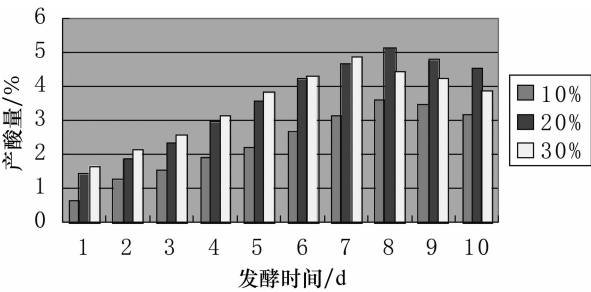


图 2 菌株接种量对醋酸发酵的影响

发酵液的有效体积直接影响发酵过程中溶解氧的浓度. 溶解氧是微生物发酵过程中一个至关重要的参数, 好氧微生物在进行深层培养时, 需要适量的溶解氧以维持呼吸代谢和代谢产物的合成, 氧的不足会造成代谢异常, 降低产量, 但是过多的溶解氧会给微生物的生长带来不利影响.

图 3 为乙醇体积浓度为 8%、接种量为 20% 时发酵液有效体积对产酸量的影响. 结果表明, 发酵液有效体积为 50% 时产酸效果最佳. 利用正交分析法在不同乙醇浓度、菌株接种量、发酵液有效体积等条件下, 测定每个菌株的产酸能力. 在 20 种醋酸菌中, AAB13 的产酸能力最为突出, 并且在乙醇体积浓度为 8%、菌株接种量为 20%、发酵液有效体积为 50% 时其产酸量达到最高值.

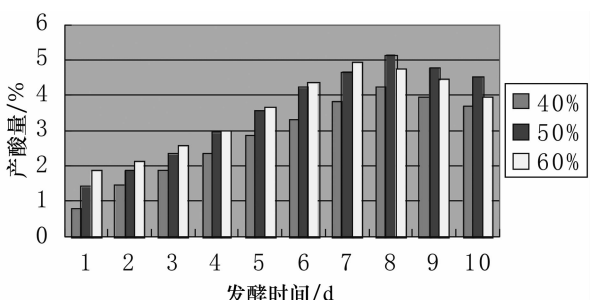


图 3 发酵液有效体积对醋酸发酵的影响

2.3 苹果梨醋的制备

乙醇的发酵利用本实验室保藏的酵母菌进行. 酒精发酵结束后, 以乙醇体积浓度为 8% 的苹果梨酒作为苹果梨醋发酵原料, 利用高效菌株 AAB13 在 30 ℃、120 r/min 的恒温摇床中进行发酵.

经过正交试验表明, 在分离得到的 20 种醋酸菌中, 菌株 AAB13 在乙醇体积浓度为 8%、接种量为 20%、容器中发酵液体积为 50% 的条件下其产酸量最高, 酸度达到 5.3%. 对发酵产物的主要理化指标进行测定, 其结果如表 2 所示.

表 2 理化指标测定结果

理化指标	含量/%	理化指标	含量/(mg/L)
糖度	2.3	钾(K)	87.24
酒精度	0.4	镁(Mg)	73.63
酸度	5.3	钙(Ca)	32.09
		钠(Na)	3.63

2.4 AAB13 菌株的鉴定

AAB13 菌株的形态学特征: AAB13 菌株在 YEGA 培养基上培养 3 d, 菌落平均直径为 22 mm, 菌落中心为浅黄色, 边缘为白色, 细胞呈杆状(图 4).

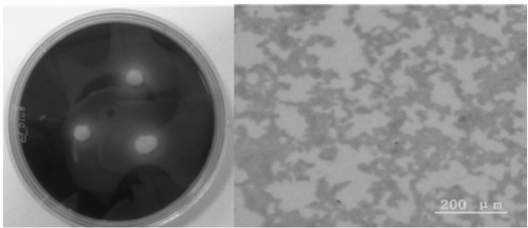


图 4 菌株 AAB13 的形态特征

菌株 AAB13 的 16S rDNA 测序结果如下:
CGCAGTGCCAGCTTGCATGCCTGCAG
GTCGACGATTTACGGTTACCTTGTTACGA
CTTCACCCAGTCGCTGACCCGACCGTGGTC

GGCTGCGCCCCTTGCGGGTTCGCTCACCGG
CTTAAGGTCAAACCAACTCCCATGGTGTG
ATCACCCAGTCGCTGACCCGACCGTGGTC
GGCTGCGCCCCTTGCGGGTTCGCTCACCGG
CTTAAGGTCAAACCAACTCCCATGGTGTG
ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG
TATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATT
ACTAGCGATTCCACCTTCATGCACTCGAG
TTGCAGAGTGCAATCCGAACTGAGACGGC
TTTTAGAGATCAGCACGATGTCACCATCT
AGCTTCCCCTGTCACCGCCATTGTAGCA
CGTGTGTAGCCCAGGACATAAGGGCCATG
AGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCG
GCTTGTACCGGCAGTCTCTCTAGAGTGC
CCACCCAAACATGCTGGCAACTAAAGATA
GGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCC
AACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGC
CATGCAGCACCTGTGTTAGAGGTCCCTTG
CGGGAAATATCCATCTCTGAATACAGCCT
CTACATTCAAGCCCTGGTAAGGTTCTGCG
CGCTGCTTTCGAATTAAACCACATGCTCCA
CCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCTTT
GAGTTTCAACCTTGCGGCCG.

利用菌株 AAB13 的 16S rDNA 序列绘制系
统发育树(图 5),从图中可以看出,菌株 AAB13
归属于葡糖醋杆菌属.

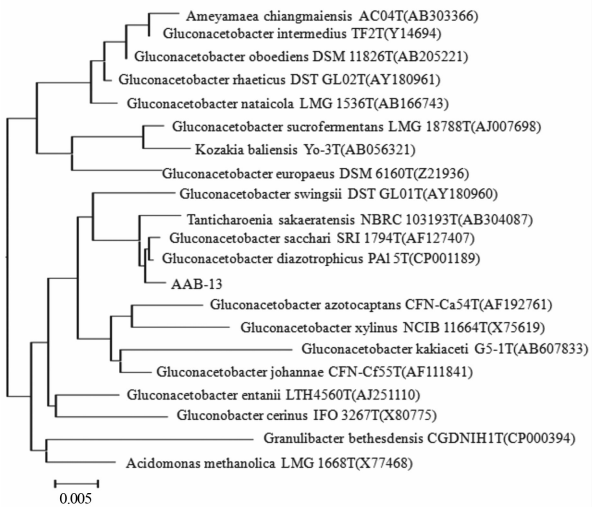


图 5 菌株 AAB13 的系统发育树

3 结论

本实验从西瓜、葡萄、柿子、苹果梨、草莓等 5
种水果中分离出 20 种醋酸菌株 AAB1-AAB20,
其中菌株 AAB13 在起始乙醇体积浓度为 8%、菌
株加入量为 20%、发酵液有效体积为 50%的条
件下,产酸量最高,酸度达到 5.3%.通过分子生物
学鉴定得知,菌株 AAB13 归属于葡糖醋杆菌属.

参考文献:

[1] 李正英. 苹果梨汁醋酸发酵过程中物质变化及其醋
酸发酵饮料的研制[J]. 研究与探讨, 2003, 24(1):
13-15.

[2] 陈艳秋, 曲柏宏, 牛广才, 等. 苹果梨果实矿质元素
含量及其品质效应的研究[J]. 吉林农业科学, 2000,
25(6): 44-48.

[3] 王治同, 林柯, 王立芳. 苹果梨果醋饮料的研制[J].
饮料工业, 2010, 13(2): 9-12.

[4] 蒋丽, 周俊良, 张兴无. 果醋的研究现状及发展前景
[J]. 中国调味品, 2012, 37(4): 1-4.

[5] Vegas C, Mateo E, González Á, et al. Population
dynamics of acetic acid bacteria during traditional
wine vinegar production[J]. International Journal of
Food Microbiology, 2010, 138(1-2): 130-136.

[6] Yamada Y, Yukphan P. Genera and species in ace-
tic acid bacteria[J]. International Journal of Food
Microbiology, 2008, 125(1): 15-24.

[7] 张忠明. 高产醋酸菌的筛选及其形态生化特征研究
[J]. 甘肃农业大学学报, 2006, 2(6): 83-86.

[8] Junichi, Horiuchi, Tohrukanno. New vinegar pro-
duction from onions[J]. Journal of Bioscience and
Bioengineering, 1999, 8(1): 107-109.

[9] Sengun I Y, Karabiyikli S. Importance of acetic
acid bacteria in food industry[J]. Food Control,
2011, 22(5): 647-656.

[10] Slapšak N, Cleenwerck I, De Vos P, et al. *Glu-
conacetobacter maltaceti* sp. nov., a novel vinegar
producing acetic acid bacterium [J]. Systematic
and Applied Microbiology, 2013, 36(1): 17-21.