

# 蜂蜜醋发酵及其智舌辨识的研究

袁鹰, 常雅宁\*, 丁庆豹, 聂嘉睿

(华东理工大学, 上海 200237)

**摘要:**以蜂蜜为原料,经过固定化酵母和醋酸杆菌两步发酵得到蜂蜜醋。固定化酵母发酵生产酒精时,发酵批次最多可达15次。调整酒精度为4.0%时,向原料中添加0.25%酵母膏(YE+),接种量为2%时,经醋酸杆菌发酵72 h 乙酸量可达1.9 g/dL,相同条件下酵母膏未添加组(YE-)增加接种量至40%时,乙酸量增加至2.2 g/dL。利用智舌对发酵的蜂蜜醋进行辨识,发现蜂蜜醋与进口果醋在滋味等多个方面具有很高的相似性,因此本实验发酵所得蜂蜜醋总体口味可归于进口果醋一类。

**关键词:**蜂蜜; 蜂蜜酒; 蜂蜜醋; 电子舌

中图分类号: TS201.5

文献标志码: A

doi:10.3969/j.issn.1000-9973.2015.04.013

文章编号: 1000-9973(2015)04-0061-04

## Research on the Fermentation of Honey Vinegar and Its Detection with Electronic Tongue

YUAN Ying, CHANG Ya-ning\*, DING Qing-bao, NIE Jia-ru

(East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract:** Honey vinegar is produced through a two-step fermentation process, alcohol fermentation with immobilized yeast and acetic acid fermentation with acetobacter. The immobilized yeast is very stable and could be used for 15 times. After 72 hours' fermentation, the yield of acetic acid reaches 1.9 g/dL when the original alcohol concentration is 4% and 2% inoculation amount of acetobacter and 0.25% yeast extract are added. The yield of acetic acid increases to 2.2 g/dL when 40% inoculation amount of acetobacter but no yeast extract are added. Due to many similarities, honey vinegar fermented above is distinguished and identified with electronic tongue to the class of fruit vinegar.

**Key words:** honey; mead; honey vinegar; electronic tongue

蜂蜜中含有大量的葡萄糖、果糖<sup>[1]</sup>,并不适合肥胖、糖尿病等特殊人群食用。为保留蜂蜜的功能<sup>[2-4]</sup>、成分<sup>[5]</sup>和特殊风味,国内外对蜂蜜进行了进一步开发,如酿制成蜂蜜酒或蜂蜜醋<sup>[6]</sup>。因为蜂蜜醋作用独特,其研制与检测引起人们极大的兴趣。

蜂蜜醋的酿制分为两步:首先蜂蜜经酿酒酵母转化为酒精,然后在醋杆菌作用下氧化为醋酸。酿造的蜂蜜醋风味独特,但是与勾兑的蜂蜜醋难以区分。传统的风味识别以人的味觉和嗅觉为主,因人而异。而电子舌采用传感器阵列对液体样品作出响应并输出信号,信号经计算机系统进行处理后得到反映样品

味觉特征的结果。电子舌技术<sup>[7]</sup>能够给出样品总体属性指标,具有性能稳定、重现性好、检测效率高等优点,近年来在各种食品辨别<sup>[8-11]</sup>方面广为应用。

本研究采用固定化酵母发酵蜂蜜为原料,在醋杆菌作用下转化成醋酸。并以电子舌辨识发酵的蜂蜜醋和其它果醋产品,建立一种快速、稳定、有效的鉴别方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

安琪耐高温酿酒高活性干酵母购自安琪酵母股份有限公司,巴氏醋酸杆菌(*Acetobacter pasteurianus*,

收稿日期:2014-12-01

\* 通讯作者

作者简介:袁鹰(1989-),男,硕士,研究方向:天然产物和食品添加剂;

常雅宁(1969-),女,辽宁沈阳人,副教授,硕士,研究方向:天然产物和食品添加剂。

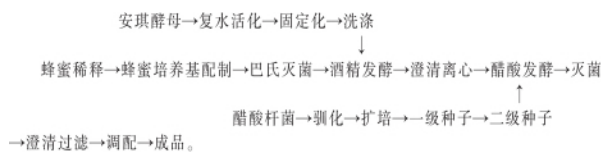
菌种编号 1.0041) 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC)。蜂蜜原料购自森蜂园,实验所用试剂购自国药集团,纯度为分析纯 AR。

蜂蜜酒发酵培养基<sup>[12]</sup> (g/L): 蜂蜜 230 g(还原糖 161 g), 酵母膏 0.1 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0.25 g,  $\text{MgCl}_2$  0.1 g, pH 5, 28 °C, 120 r/min; 蜂蜜醋发酵一级种子培养基: 1% 酵母膏, 10% 葡萄糖; 蜂蜜醋发酵二级种子培养基: 1% 酵母膏, 4% 乙醇。

气相色谱仪 GC 2014 SHIMADZU, 20% FFAP 填充柱 3 m × 3 mm × 2 mm; 高压液相色谱仪 Prominence 模块 HPLC SHIMADZU, TSKgel SCX 7.8 × 300; ISENTO 电子舌(味觉指纹分析) 上海瑞玢国际贸易有限公司; 紫外分光光度计 UV-5200 METASH; 超净工作台 SW-CJ-1BU AIRTECH; 摇床 TS-100B TENSUC; 高压灭菌锅 SYQ-DSX-280B SHENAN。

## 1.2 实验流程与检测方法

### 1.2.1 蜂蜜醋酿制工艺流程



### 1.2.2 固定化酵母发酵稳定性

酵母固定化条件<sup>[13]</sup>: 1 g 酵母与 20 mL 2% 蔗糖混匀, 于 30 °C 振荡活化 30 min; 50 mL 去离子水加入海藻酸钠(最终浓度 1.5%) 后 121 °C 灭菌 20 min, 冷却后与活化酵母混合均匀, 并用注射器吸取混合溶液缓慢滴入 2%  $\text{CaCl}_2$  溶液中固定化 1 h, 最后用灭菌去离子水洗涤 3 次备用。固定化酵母发酵稳定性实验, 单批次发酵周期为 2 天, 然后用灭菌去离子水洗涤固定化酵母颗粒 3 次后投入新的培养基中进行下一批次实验。检测每批次结束时的 OD-600、酒精度(V/V)、残糖(mg/mL)。

### 1.2.3 酵母膏对醋酸发酵的影响

实验对比添加酵母膏与不添加酵母膏两种条件下, 巴氏酸杆菌发酵状态。发酵条件: 接种量为 2%, 初始酒精度为 4.0%, pH 5.5 [ $\text{Ca}(\text{OH})_2$  调节], 装液量为 50 mL/250 mL, 温度为 30 °C, 转速为 200 r/min。一级种子发酵 1 天后接入二级种子发酵培养基中(接种量 2%), 二级种子培养 2 天后取 1, 5, 10, 20 mL 种子液离心(4500 r/min) 10 min, 得到菌体接入蜂蜜醋

发酵培养基, 每隔 12 h 取样检测 OD-600、酒精度(V/V)、乙酸含量(mg/mL)。

### 1.2.4 蜂蜜醋智舌辨识

将蜂蜜醋、市售果醋和勾兑蜂蜜醋分别稀释至 0.2 g/dL, 每组设置 6 个平行, 样品小烧杯装液量为 20 mL, 使用电子舌对样品进行检测辨别。

### 1.2.5 乙醇检测

采用气相色谱法进行乙醇的检测, 具体检测条件: 20% FFAP 填充柱(3 m × 3 mm × 2 mm); 进样器 200 °C, 柱温箱 100 °C, 检测器 200 °C; 氢气 50 MPa, 空气 50 MPa, 载气( $\text{N}_2$ ) 流速 30 mL/min; 进样量 0.5  $\mu\text{L}$ 。以酒精度为横坐标, 乙醇峰面积为纵坐标建立标准曲线。

### 1.2.6 乙酸检测

采用液相色谱法进行乙酸的检测, 具体检测条件: TSKgel SCX 7.8 × 300; 流动相: 0.1% (g/mL) 磷酸, 流速 1 mL/min; 柱温 25 °C; SDP-20A 紫外检测器, 波长 210 nm; 进样量 20  $\mu\text{L}$ 。以乙酸浓度(g/dL)为横坐标, 乙酸峰面积为纵坐标建立标准曲线。

### 1.2.7 还原糖、菌体浓度检测

还原糖检测使用 3,5-二硝基水杨酸比色法<sup>[14]</sup>, 菌体浓度检测使用比浊法(OD-600)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 应用固定化酵母酿制蜂蜜酒

固定化酵母由于其高细胞密度, 所以具有更大体积生产力, 更高浓度基质和产品, 相对轻松的下游处理过程<sup>[15,16]</sup>。也有文献报道细胞固定化同时也可以激活细胞生物活性<sup>[17,18]</sup>。但是, 缺点是活细胞空间不足, 以及固定化机械强度不够, 这些都将导致细胞破裂, 泄漏到培养基中, 实验所得固定化酵母发酵稳定性结果见图 1。

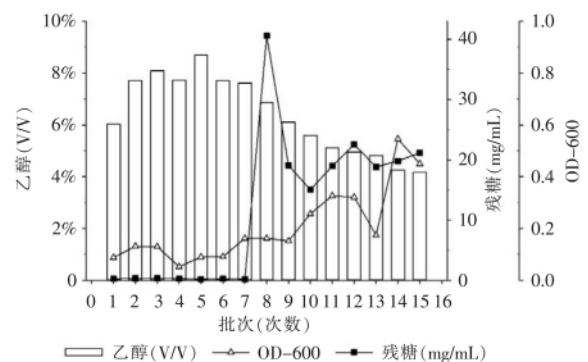


图1 固定化酵母发酵稳定性

Fig. 1 Immobilized yeast fermentation stability

随着批次实验的进行,固定化酵母发酵活性有所下降,第15批次达到半衰期,满足工业化需求。残糖结果显示:第7批次开始培养基大量积累残糖(20~40 mg/mL),酒精度开始出现下降,OD-600显示固定化酵母开始泄漏。导致稳定性下降的可能原因是一定量酵母细胞泄漏,更主要原因是批次反应的进行,酵母细胞活性降低,糖代谢变缓。

### 2.2 酵母膏有无对蜂蜜醋生产的影响

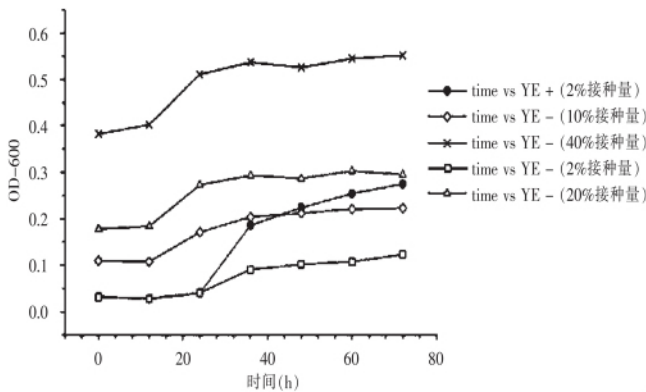


图2 蜂蜜醋发酵过程中巴氏醋酸杆菌生长曲线

Fig.2 Biomass concentration curve in honey vinegar fermentation

由图2可知,蜂蜜醋发酵中添加少量的酵母膏对菌体繁殖具有明显的促进作用,不添加酵母膏巴氏醋酸杆菌菌体几乎没有增长。蜂蜜醋发酵培养基的原料为前期酿制的蜂蜜酒,由于其中氮源含量极少,无法支持巴氏醋酸杆菌生长繁殖的需要。

酵母膏添加使得发酵液中菌体浓度增加,乙醇转化速率较同等接种量组有所增加,60 h即消耗殆尽,而由于菌体量制约,乙醇在不同接种量条件下转化效率有所差别,但是乙醇消耗趋势基本保持一致,见图3。

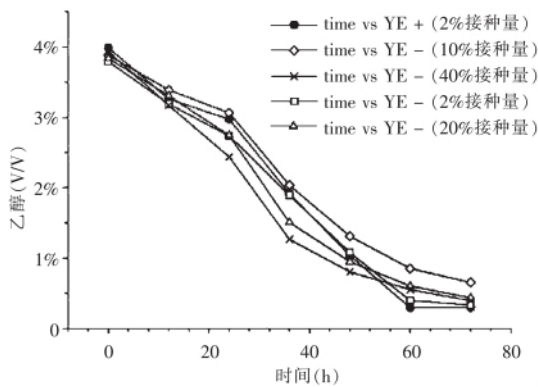


图3 蜂蜜醋发酵乙醇消耗曲线

Fig.3 Ethanol consumption curve in honey vinegar fermentation

添加酵母膏在同等接种量条件下可明显增加发酵液中乙酸的量,最大值可达1.9 g/dL,接种量的增加同样可以明显增加乙醇转化乙酸的量,见图4,最大值可达2.2 g/dL。

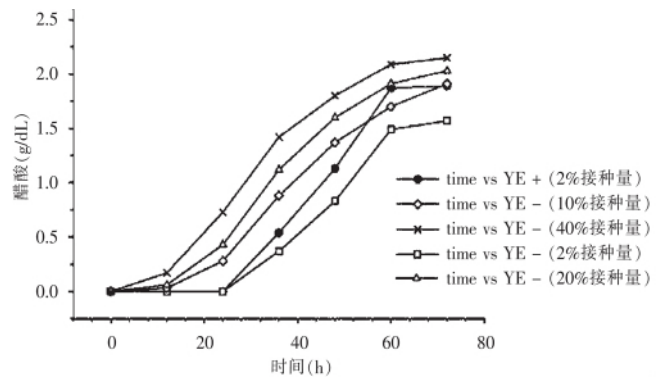


图4 蜂蜜醋发酵乙酸生成曲线

Fig.4 Acetic acid generating curve in honey vinegar fermentation

### 2.3 蜂蜜醋电子舌辨别对比

#### 2.3.1 主成分分析法(PCA)

实验对比辨别发酵蜂蜜醋(1,2)、复配发酵蜂蜜醋(3,4,5)、进口果醋(6,7)、国产果醋(8,9)、勾兑蜂蜜醋(10,11,12,13)以及进口蜂蜜醋(14,15),结果见图5。

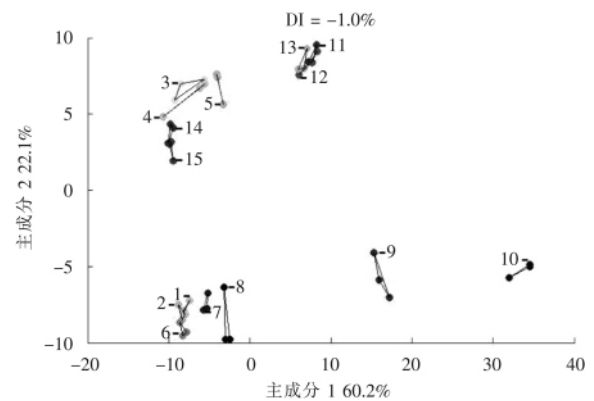


图5 主成分分析

Fig.5 Principal component analysis

由图5可知,横坐标代表的主成分1以及纵坐标代表的主成分2对原始数据信息量的保留量超过了75%,说明采用主成分分析的数据处理方法可以在较好的保留原始变量主要信息的前提下,将多维指标问题转换成主成分1和主成分2这两个指标组成的二维坐标问题。进口果醋与YE+,YE-较为接近或有重叠,复配发酵蜂蜜醋与进口蜂蜜醋较为接近,说明进口果醋与YE+,YE-和复配发酵蜂蜜醋与进口蜂蜜

醋,在滋味的多个方面具有很高的相似性<sup>[19]</sup>。

### 2.3.2 判别因子分析法(DFA)

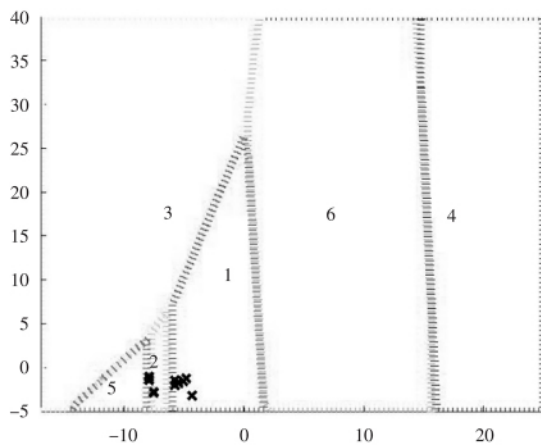


图6 判别因子分析

Fig. 6 Discriminant function analysis

使用判别函数分析方法处理样品时,通常根据已知组别接近程度的描述即判别函数,借以判定新样品的归属<sup>[20]</sup>。不同产地以及品种的果醋 DFA 分析结果见图6,DFA 分析根据1种进口复配蜂蜜醋(区域3)、2种进口果醋(区域2,5)、2种国产果醋(区域1,6)、1种勾兑醋(区域4)6种不同醋的PCA数据得到不同类别间的边界函数模型,这一边界函数将主成分图划分为6块区域,图中带“×”的位置数据落在哪块区域就代表其总体口味属于哪个区域。

实验分析发酵蜂蜜醋归属,未知样品所落区域多为进口果醋(2,5),部分落在国产果醋(1)区域,未落在进口蜂蜜醋区域的可能是蜂蜜品种、产地、发酵菌种以及水源不同导致的。实验发酵所得蜂蜜醋与进口果醋在总体口味上相似,因此将其分子于进口果醋一类,可为后期质量控制、掺假辨别提供一种快速、稳定的鉴别方法。

## 3 结论

采用本文的方法,以固定化酵母首先将蜂蜜转化为酒精,实验所得固定化酵母稳定性较好,可重复批次达到15次(总发酵时间达到30天)。以巴氏醋酸杆菌将蜂蜜酒发酵为蜂蜜醋,其中添加少量酵母膏有利于巴氏醋酸杆菌菌体的生长及后期乙酸的产量,可以通过加大接种量缩短由于缺乏酵母膏而延长的发酵周期以生产感官更佳的蜂蜜醋饮品。上述制备的蜂蜜醋经电子舌主成分分析(PCA)识别,与市售的进口果醋在滋味方面较为接近,判别因子分析(DFA)在产品总体口味上可将蜂蜜酿制的醋归为进口果醋一类。电子舌

辨别结果还表明,以食用乙酸和蜂蜜勾兑的蜂蜜醋与直接发酵的醋有较大的区别,这也为快速鉴别发酵与勾兑蜂蜜醋提供理论指导。

### 参考文献:

- [1] Fuente E, Ruiz-Matute A I, Valencia-Barrera R M, et al. Carbohydrate composition of Spanish unifloral honeys[J]. Food Chemistry, 2011, 129(4): 1483-1489.
- [2] Taormina P J, Niemira B A, Beuchat L R. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power[J]. Int J Food Microbiol, 2001, 69(3): 217-225.
- [3] Gheldof N, Engeseth N J. Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples[J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(10): 3050-3055.
- [4] Facino R M. Honey in tumor surgery[J]. Arch Surg, 2004, 139(7): 802.
- [5] Eacute P, Rez R A, Aacute S, et al. Analysis of volatiles from Spanish honeys by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry[J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(9): 2633-2637.
- [6] 张丽珍. 山乌柏蜂蜜酒及蜂蜜醋的酿造工艺研究[D]. 南昌: 江西农业大学, 2011.
- [7] Lvova L, Martinelli E, Mazzone E, et al. Electronic tongue based on an array of metallic potentiometric sensors[J]. Talanta, 2006, 70(4): 833-839.
- [8] 王茹, 田师一, 邓少平. 智舌在白酒区分辨识中的应用研究[J]. 酿酒科技, 2008(11): 54-56.
- [9] Hong X, Wang J. Detection of adulteration in cherry tomato juices based on electronic nose and tongue: comparison of different data fusion approaches[J]. Journal of Food Engineering, 2014, 126: 89-97.
- [10] Gil-Sánchez L, Soto J, Martínez-Máñez R, et al. A novel humid electronic nose combined with an electronic tongue for assessing deterioration of wine [J]. Sensors and Actuators A: Physical, 2011, 171(2): 152-158.
- [11] Liu M, Wang M, Wang J, et al. Comparison of random forest, support vector machine and back propagation neural network for electronic tongue data classification: application to the recognition of orange beverage and Chinese vinegar[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2013, 177: 970-980.

(下转第68页)

将制作好的面包进行呈味感官分析,见表6。

表6 呈味感知分析表

样品名称	关键点	开始有味点	风味最大点	时间中间点	风味无明显变化点
鸡味牛角面包	呈味时间(s)	0	2	8	14
	综合感受值	0	7.64	5.32	3.36

根据呈味感官分析表绘制图线,结果更加直观明了,见图1。

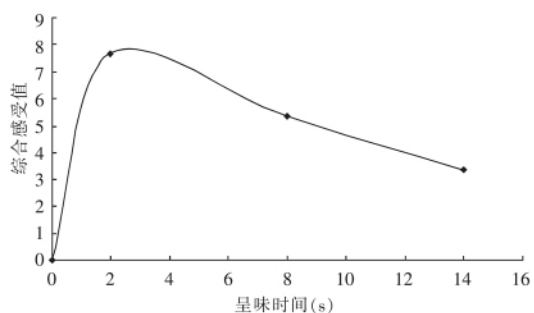


图1 呈味感知分布图

由图线结果可知,天然纯鸡肉粉能够很好地赋予牛角面包鸡肉风味。入口2s,就可以明显感觉到鸡肉的风味;而且在时间中间点,风味综合感受值并没有降到风味最大点的一半,这说明随着时间的推进,风味虽然衰减,但是还是能够明显感觉到;风味不明显变化点在14s,证明鸡肉风味持续效果比较明显;这些特性描述了鸡肉风味的明显、饱满、持久。

### 3 结论

综上所述,天然纯鸡肉粉适合于牛角面包的制作,

赋予了面包天然、和谐、无化学味道的鸡肉风味,而且并没有对人们所熟悉的牛角面包外形产生影响。通过科学合理的试验,用天然纯鸡肉粉针对传统面包外形和风味进行深入研究,在安全、天然的前提下,提高面包产品品质,增强面包竞争力,具有十分重要的引领作用和市场推广作用。

参考文献:

- [1]江新业,宋焕禄. 鸡肉香味成分研究新进展[J]. 中国调味品,2005(3):40-46.
- [2]卢宏科,李耀,徐义斌. 纯鸡肉粉在鸡精、鸡味鲜汤料等食品中的应用[J]. 中国调味品,2012,37(1):39-41.
- [3]沈华. 面包物语[J]. 食品与生活,2014(3):12-15.
- [4]苏扬,黄益前. 戚风豆浆蛋糕生产工艺研究及配方研制[J]. 食品科技,2013,38(10):132-136.
- [5]纪建海,陈素敏. 丹麦面包制作技术[J]. 农村新技术,2002(5):38.
- [6]邢瑞雪. 面包制作工艺的探讨[J]. 食品工程,2007(1):49-50.
- [7]魏福华. 丹麦红豆面包的研制[J]. 农产品加工,2007(12):41-42.
- [8]蔺毅峰,杨萍芳,晁文. 焙烤食品加工工艺与配方[M]. 北京:化学工业出版社,2007:132-156.
- [9]刘磊,齐学文,周裔彬,等. 新麦26不同粉路小麦粉及其面包品质的分析[J]. 粮油食品科技,2014(2):12-15.
- [10]张水华. 食品感官鉴评[M]. 广州:华南理工大学出版社,2001:91-92.

(上接第64页)

- [12]陶树兴,苏蕊,薛静,等. 蜂蜜酒生香酵母产酯性能比较和产酯条件研究[J]. 食品工业科技,2011(10):234-238.
- [13]赵凯,许鹏举,谷广焯. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究[J]. 食品科学,2008(8):534-536.
- [14]Pereira A P, Mendes-Ferreira A, Oliveira J M, et al. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilisation on mead production[J]. LWT-Food Science and Technology, 2014,56(1):21-30.
- [15]Yao W, Wu X, Zhu J, et al. Bacterial cellulose membrane-a new support carrier for yeast immobilization for ethanol fermentation[J]. Process Biochemistry, 2011, 46(10):2054-2058.
- [16]Sembiring K C, Mulyani H, A I F, et al. Rice flour and

white glutinous rice flour for use on immobilization of yeast cell in ethanol production[J]. Energy Procedia, 2013, 32: 99-104.

- [17]Rapoport A, Borovikova D, Kokina A, et al. Immobilisation of yeast cells on the surface of hydroxyapatite ceramics[J]. Process Biochemistry, 2011,46(3):665-670.
- [18]Yildiz H B, Kamaci M, Azak H, et al. A comparative study: immobilization of yeast cells and invertase in poly(ethyleneoxide) electrodes [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2013, 91:52-58.
- [19]张璟琳,黄明泉,孙宝国,等. 电子舌技术在食醋口感评价中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2013(11):222-225.
- [20]周牡艳,郑云峰,张韬,等. 智能电子舌对地理标志产品绍兴黄酒的区分判别研究[J]. 酿酒科技, 2012(12):14-17.