

多菌种混合制曲生产玫瑰醋的工艺及品质研究

张林祥¹, 周利南², 邢利民³, 冯 伟², 贺德贵³, 蒋予箭¹, 朱军莉^{1*}

¹浙江工商大学食品与生物工程学院 杭州 310018

²杭州市食品酿造有限公司 浙江湖州 313200

³湖州老恒和酿造有限公司 浙江湖州 313000)

摘要 为探究多菌种制曲生产对浙江玫瑰醋工艺和品质的影响,通过正交试验优化多菌种配比,将最佳两组混合菌种应用于玫瑰醋生产,并进行品质评价。结果表明,淀粉酶和蛋白酶活力最高的菌种配比分别为红曲霉:米曲霉:黑曲霉:根霉为 1:1:1:1 和 1:1:1:2,按此比例进行制曲混合,并用于酿造的发花工艺。整个发酵工艺跟踪分析显示,玫瑰醋的多边发酵过程能顺利完成,两组发酵成品的总酸度分别为 6.97 g/100 mL 和 6.63 g/100 mL,得率比传统方法提高 17.21% 和 11.29%。在两组玫瑰醋试验样品中检测到醋酸、乳酸、苹果酸、柠檬酸等 8 种呈味有机酸,非挥发性酸含量分别为 56.04 mg/L 和 57.85 mg/L 不逊色于传统玫瑰醋 41.053 mg/L。采用顶空固相微萃取-气相-质谱联用方法共鉴定出 44 种挥发性风味物质,两组的挥发性风味物质含量分别 6 348.14 mg/L 和 6 791.75 mg/L,略高于传统的 5 030.07 mg/L。感官评价表明,多菌种制曲生产的玫瑰醋在甜味、酯香气味上略有提高,特别是 1:1:1:2 多菌种制曲组感官评分值最高。本研究为传统玫瑰醋生产的制曲机械化改进提供了参考。

关键词 多菌种发酵; 玫瑰醋; 有机酸; 挥发性风味物质

文章编号 1009-7848(2024)09-0344-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.09.032

浙江玫瑰醋,又叫玫瑰浙醋、玫瑰米醋、大红浙醋,酿造历史悠久,是传统工艺特色保留完整的一种产品。玫瑰醋以优质籼米为原料,采用天然混合菌种(包括霉菌、酵母、醋酸菌),历经长达半年时间(5 月开酿-11 月榨醋)的自然发酵,产品具有浅玫瑰色,酸味柔和爽快,略带鲜甜的呈味特点^[1]。浙江现有玫瑰醋生产规模普遍较小,且主要利用自然菌种发酵,各缸米饭的菌落生长和糖化程度差别较大,使相当一部分米饭不能被很好地糖化,造成各缸成品之间的质量差异^[2-3]。此外,玫瑰醋生产过程劳动强度大,效率低,年产量不足 5 万 t,已不能满足日益增长的消费需求。因此,无论是产量还是质量,传统玫瑰醋生产的纯种化研究以及机械化设计与改进刻不容缓。

多菌种发酵技术指在微生物纯培养研究基础上优化的双菌或多菌混合培养方式,与单一菌种发酵和自发发酵过程相比,多菌种发酵具有扩大起始菌种数量,缩短发酵时间,降低腐败风险并提

高产品安全性,保证不同批次产品感官质量稳定性等优势^[4]。在中国传统调味品中,多菌种制曲混合发酵广泛应用于白酒、酱油、豆瓣酱和深层发酵醋等发酵生产中。张建良等^[5]将耐高温酵母菌、乳酸菌和细菌混合培养用于芝麻香白酒的生产,白酒酒体的绵柔度和丰满度大幅度提高,风味物质显著性提高。李保英等^[6]对酱油制曲的研究发现,将米曲霉与黑曲霉按 3:1 接种制曲,总蛋白酶活力基本不变,而酸性蛋白酶、糖化酶活力分别提高了 34.6% 和 9.3%。

目前,研究发现玫瑰醋发花过程主要由曲霉属、根霉、酵母和芽孢菌等主导,醋酸菌属和乳酸菌属是液态发酵过程主要菌种^[3]。玫瑰醋纯种发酵方式在近年来已有一些研究,尚未达到大规模商业化应用的水平^[7]。如何确定各菌种的添加比例,确保玫瑰醋发酵过程的多边发酵的协调性,仍是技术难题。鉴于此,本研究通过正交试验优化酶活力组合,筛选合适的菌种混合比例,比较多菌种制曲发酵和传统自然酿造的发酵曲线和醋醪理化指标变化,并结合发酵结束时玫瑰醋的得率及品质变化,获取多菌种混合制曲生产浙江玫瑰醋的理想工艺。

收稿日期: 2023-09-15

基金项目: 浙江省科技厅公益项目(LGG19C200001)

第一作者: 张林祥,女,硕士生

通信作者: 朱军莉 E-mail: junlizhu0305@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

粳米,红曲(As 3.972)、黑曲(沪酿 3.041)、米曲(As 3.042)、根霉(沪酿 3.866),上海迪发食品发酵有限公司;葡萄糖、氢氧化钠、酚酞、无水乙醇、硫酸铜、磷酸二氢铵,国药集团化学试剂有限公司;胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA)、孟加拉红培养基、乳酸菌 MRS 分离培养基(MRS Agar),青岛海博生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

超高效液相色谱仪 Vanquish, 美国 Thermo Fisher Scientific; 质谱仪 Q Exactive HFX, 美国 Thermo Fisher Scientific; 台式高速微量离心机 TGW16, 上海中科生物医学高科技开发有限公司; 可见分光光度计 721 型, 上海菁华科技仪器有限公司; 酒精计, 武强县华洋仪表厂; 酸度计 PHS-3C, 上海雷磁仪器有限公司。

1.3 多菌种制曲发酵玫瑰醋方案

1.3.1 制曲方案 选择红曲 As 3.972、黑曲沪酿 3.041、米曲 As 3.042、根霉沪酿 3.866 纯种菌株作为发酵菌种, 各发酵菌种均以 1‰ 的比例接种于冷却后的相应的熟米(也称作饭)中, 熟米含水率控制在 90% 左右, 曲房空气相对湿度控制在 94%~96%, 黑曲在 30 °C 下培养 60 h, 红曲、米曲和根霉均在 32 °C 培养 72 h, 成曲水分控制在 65%~70%。

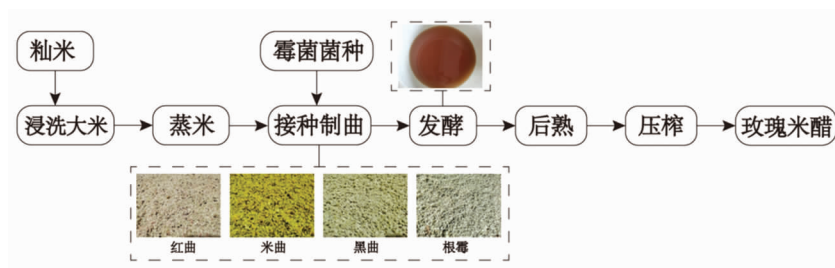


图1 多菌种制曲混合发酵玫瑰醋生产流程

Fig.1 Multi-strains cranking mixed fermented rosy vinegar production process

1.3.2 α -淀粉酶活力 参考班世栋等^[8]方法,取 5 mL 0.5% 可溶性淀粉溶液加 0.5 mL 粗酶液, 40 °C 准确反应 5 min, 加入 5 mL 0.1 mol/L 硫酸终止反应, 混合均匀。取 0.5 mL 反应液与 5 mL 稀碘液混合, 620 nm 测吸光度。0.5 mL 水代替 0.5 mL 反应液作为空白, 以等量的水作为对照。在 40 °C, 每 5

表1 正交试验设计多菌种制曲混合发酵玫瑰醋菌株添加比例

Table 1 Addition ratio of multi-strain cranking mixed fermented rosy vinegar strains

组别	红曲	米曲	黑曲	根霉
1	0	2	1	0
2	1	0	1	0
3	2	0	1	1
4	1	1	1	2
5	1	1	1	1
6	0	1	2	1
7	0	1	0	2
8	2	1	0	1
9	2	1	1	0

并采用正交法设计饭曲混合比例, 4 个菌株添加比例水平均为 3, 设计如表 1 所示。

选取最佳的两组多菌种饭曲混匀后添加到发酵缸中, 与冷却的米饭拌匀后发花, 每组做 3 缸, 以自然发花组为对照。经 5 d 发花后, 醋醅按 1:3 加水进行液态发酵。每隔 7 d 观察醋醅呈膜呈色情况, 并测定跟踪发酵液样品还原糖、酒精度、酸度的变化。酸度不再上升后添加 2% NaCl 终止反应, 覆盖薄膜进行 1 个月的后熟。取后熟结束玫瑰醋样品进行有机酸、挥发性风味物质和感官测定评价。

min 水解 1 mg 可溶性淀粉定义为 1 个 α -淀粉酶活力单位。

1.3.3 β -淀粉酶活力 参考李中正等^[9]方法, 取 25 mL 2% 可溶性淀粉溶液, 再加 5 mL 5% 曲浸出液, 摇匀, 置于 40 °C 恒温水浴中, 糖化 1 h, 加入 20% NaOH 溶液 1 mL 终止反应。吸取糖化液 5.0

mL于盛有费林溶液甲、乙液各5.0 mL的锥形瓶中,加水10 mL,用葡萄糖标准溶液滴定,记录其消耗体积。在40℃,每分钟水解可溶性淀粉生成1 mg麦芽糖定义为1个 β -淀粉酶活力单位。

1.3.4 酸性蛋白酶活力 参考李保英等^[6]的方法,取1 mL曲浸出液,在40℃预热4 min,加入1 mL酪蛋白,在40℃水浴10 min,加入2 mL三氯乙酸溶液终止反应,继续40℃水浴20 min,5 000 r/min离心10 min。取上清液1 mL,加入2.5 mL碳酸钠溶液,1 mL福林试剂,摇匀,在40℃水浴20 min,测定OD值。对照组测定时先加入2 mL三氯乙酸溶液,使酶失活,10 min后再加入酪蛋白。在40℃,每分钟水解酪蛋白产生1 μ g酪氨酸定义为1个酸性蛋白酶活力单位。

1.3.5 理化指标测定 还原糖:参照国家标准GB/T 50097-2003斐林试剂滴定法测定;酒精度:参照国家标准GB/T 13662-2008蒸馏法测定;总酸:参照国家标准GB/T 1256-2008酸碱滴定法测定。

1.3.6 有机酸测定 色谱柱:Spursil C18-EP(4.6 mm \times 250 mm,25 μ m);流动相:5%甲醇-95% 6 g/L磷酸二氢铵(用磷酸调至pH 2.60);流速:0.8 mL/min;进样体积:5 μ L;柱温:30℃;检测器:UV;检测波长:210 nm。

1.3.7 挥发性风味物质测定 参考Fang等^[1]的方法,吸取样品10 mL置于20 mL顶空瓶中,先将顶空瓶放入50℃恒温水浴锅平衡30 min,然后将萃取头插入顶空瓶中距离液面1 cm处,在50℃下吸附30 min。吸附结束后抽回纤维头,从顶空瓶中拔出萃取头,将萃取头量程调为4 cm,插入GC-MS进样口,推出纤维头,于240℃下解析15 min,进行GC-MS分析。

GC条件:色谱柱:DB-WAX,60 m \times 0.25 mm \times 0.5 μ m(柱长 \times 内径 \times 膜厚);进样口温度:240℃,不分流进样,载气为氦气,恒流模式,柱流速:1 mL/min;柱温:30℃保持6 min,以2℃/min升到140℃,然后以4℃/min升到220℃,保持10 min。

质谱条件:离子源:EI,离子源温度:230℃,四级杆温度:150℃,质量数扫描范围:33~500 amu。数据分析:质谱库检索使用NIST14数据库。

将所得GC-MS检测结果通过计算机NIST14

谱库和人工检索处理,选出匹配度 \geq 80%的化合物并对其定性;同时用内标法对各组分进行半定量分析:以2-乙基丁酸为内标物,根据被测成分与内标物的峰面积之比,计算被测物质的相对于内标的质量浓度。

1.3.8 感官分析 由10名品评员组成评定小组。对食醋的色泽、透明度、酯香、醋香、焦香、酸味、甜味、涩味8个指标进行质量的综合评价。本试验采用5分数字标度为评分标尺,由低到高来表示感官特性由弱到强的变化,数值越高,表示较为偏爱。

1.3.9 统计学分析 每组发酵样品设3个重复,每组样品测定3组平行。采用Excel 2016和origin 2018版本进行数据处理和绘图,并使用SPSS 22.0进行显著性分析, $P<0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 多菌种制曲发酵玫瑰醋的制曲酶活力

由表2可得,制曲比例为红曲:米曲:黑曲:根霉=0:2:1:0以及0:1:0:2时具有较高的 α -淀粉酶活力,可达到9.55 U/g和8.34 U/g,但其它酶系酶活较低。 α -淀粉酶又称内切淀粉酶,能够水解 α -1,4-葡萄糖苷键,将底物中直链淀粉为短链糊精^[8]。 β -淀粉酶又称外切淀粉酶,可水解 β -1,4-糖苷键,产生麦芽糖^[9]。红曲:米曲:黑曲:根霉比例为1:1:1:2时,饭曲中 β -淀粉酶活力最高,达到49.90 U/g。另外,红曲:米曲:黑曲:根霉比例为1:1:1:1时,饭曲具有最高的酸性蛋白酶活力,为106.37 U/g。酸性蛋白酶分解原料中的蛋白质水解为寡肽和游离氨基酸,在微生物生长过程中,提高氨基酸的含量可促进微生物例如酵母的生长代谢,从而提高产量^[4]。综上,选择红曲:米曲:黑曲:根霉比例为1:1:1:1(4组)及1:1:1:2(5组)的菌种配比用于扩大培养,用于玫瑰醋发花阶段,跟踪菌种比例对玫瑰醋发酵和成品品质的影响。

2.2 玫瑰醋发酵过程的表面成膜情况

图2显示3组玫瑰醋发酵过程中醋醅的沉降以及菌膜生长变化。醋醅的沉降代表玫瑰醋酒精发酵结束,逐渐进入醋酸发酵阶段。结果表明,发酵第10天左右4、5组和传统对照组的醋醅均已下沉,出现分层现象,醋液较为清澈。若发酵液中

表 2 多菌种制曲酶活力

Table 2 Enzyme activity of multi-strain cranking

组别	红曲	米曲	黑曲	根霉	α -淀粉酶	β -淀粉酶	酸性蛋白酶
1	0	2	1	0	9.55 ± 0.18	28.07 ± 1.82	103.66 ± 3.00
2	1	0	1	0	4.93 ± 0.08	34.89 ± 1.29	89.80 ± 1.43
3	2	0	1	1	2.77 ± 0.05	28.78 ± 0.49	86.51 ± 2.14
4	1	1	1	2	7.09 ± 0.06	49.90 ± 0.58	105.37 ± 10.14
5	1	1	1	1	6.97 ± 0.08	44.69 ± 0.27	106.37 ± 2.29
6	0	1	2	1	4.33 ± 0.06	34.50 ± 0.35	89.94 ± 0.43
7	0	1	0	2	8.34 ± 0.14	41.71 ± 3.32	76.37 ± 1.71
8	2	1	0	1	3.58 ± 0.04	31.92 ± 0.18	82.51 ± 3.86
9	2	1	1	0	2.77 ± 0.01	32.63 ± 1.42	79.37 ± 2.71

醋醅一直处于浑浊状态,底物糊化不彻底,会导致醋酸菌难以大量生长繁殖,容易出现高糖低酸醋^[3]。而 30 d 左右是玫瑰醋发酵中期,醋酸菌快速生长繁殖,在发酵液表面形成醋酸菌膜。醋酸菌膜主要由胞外多糖组成,富集醋酸菌,提高菌体环境适应

能力,隔绝氧气防止杂菌污染的作用^[10]。3 组玫瑰醋发酵液发酵中期表面都能形成菌膜且无明显差异,醋酸化发酵进程正常。发酵 60 d 后属于发酵后期,4、5 组与传统对照组玫瑰醋都呈现玫瑰红的色泽。

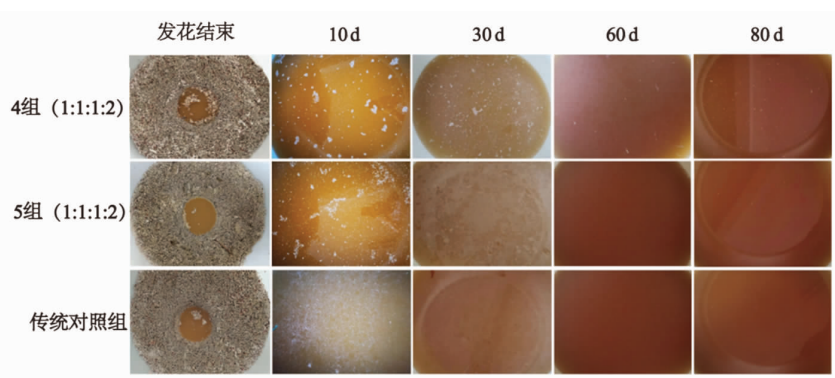


图 2 玫瑰醋发酵过程的成膜和呈色

Fig.2 Formation of bacterial membrane and color for rosy vinegar during fermentation

2.3 玫瑰醋发酵过程的理化指标变化

如图 3 所示,3 组玫瑰醋的还原糖消耗和乙醇积累主要发生在液态发酵的前 10 d。4、5 组还原糖含量在发酵初期含量达到 19.06 g/100 mL 和 23.31 g/100 mL,显著高于对照组的 2.03 g/100 mL ($P < 0.05$)。发酵 10 d 后,多菌种制曲发酵组与传统对照组玫瑰醋发酵的还原糖含量下降,在发酵中期发酵液中还原糖含量始终低于 1 g/100 mL,此时处于“三边发酵”,即边糖化、边酒化、边醋化的发酵阶段。到发酵结束后,4、5 组还原糖浓度逐渐增加到 1.06 g/100 mL 和 1.34 g/100 mL。在酵母菌

的作用下,酒精含量在液态发酵前 10 d 得到积累,最高可达到 7%和 7.1%(V/V)。之后逐渐下降至未检出。玫瑰醋总酸度呈显著上升趋势,4、5 组的酸度在发酵结束时达到 6.97 g/100 mL 和 6.63 g/100 mL,显著高于对照组的 5.95 g/100 mL ($P < 0.05$)。这些理化变化也提示玫瑰醋发酵正常,微生物群落组成是潜在驱动因素^[11]。

在玫瑰醋发花阶段霉菌所分泌的淀粉酶、蛋白酶等各种酶类,将淀粉、蛋白质分解成米饭中大量的糖分及氨基酸。多菌种制曲试验组的还原糖含量在冲缸放水后显著高于传统发酵组,且不同

组别的还原糖含量存在差异 ($P < 0.05$), 表明发酵霉菌的组成及比例显著影响醋醪的理化变化。郑丹妮等^[12]应用不同复合菌种于纳豆的发酵, 也发

现在相同发酵条件下菌种的比例对纳豆酶活有显著影响, 且在合适的菌种比例下酶活比单独发酵提高 14.8%。

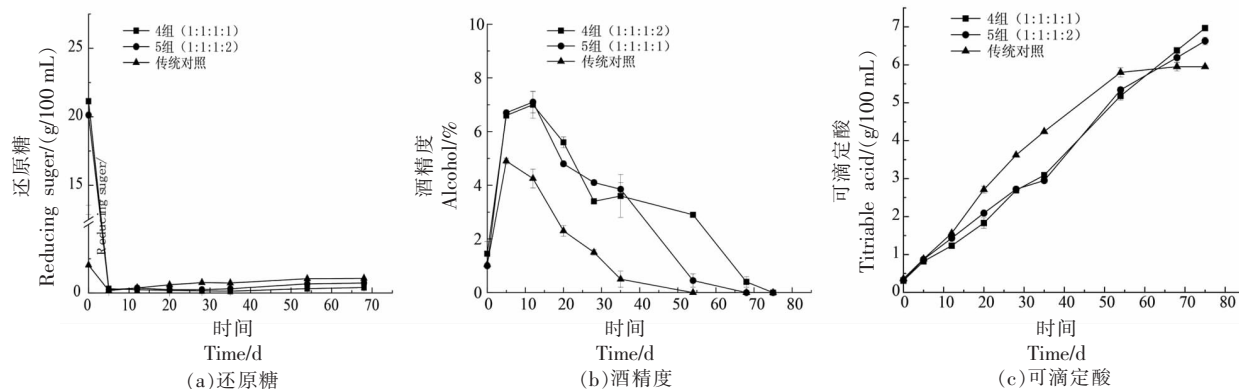


图3 多菌种制曲混合发酵玫瑰醋发酵过程理化指标变化

Fig.3 Changes of physicochemical indexes during the fermentation of multi-strain cranking fermented rosy vinegar

2.4 多菌种制曲发酵玫瑰醋的得率

按 4 g/100 mL 标准对发酵结束的玫瑰醋进行稀释换算, 计算玫瑰醋得率。由表 3 可以看出, 多菌种制曲 4 和 5 试验组玫瑰醋的得率高于传统玫瑰醋, 分别达到 5.83 和 5.55, 显著高于对照组的 4.98 ($P < 0.05$), 说明用该菌种组合及比例生产可以提高浙江玫瑰醋的得率。

2.5 多菌种制曲发酵玫瑰醋的有机酸含量

由表 4 可以看出, 在玫瑰醋样品中检测到 8 种有机酸, 乙酸、乳酸、丙酮酸、草酸、焦谷氨酸、酒石酸、柠檬酸、苹果酸和琥珀酸。在多菌种制曲发酵玫瑰醋中, 4 组和 5 组有机酸总量分别达到

表 3 多菌种制曲发酵玫瑰醋完成后得率

Table 3 Yield of rosy vinegar after multi-strains cranking fermentation

组别	组成	得率
4 组	红曲:黑曲:米曲:根霉=1:1:1:2	5.83 ± 0.03 ^a
5 组	红曲:黑曲:米曲:根霉=1:1:1:1	5.55 ± 0.01 ^b
对照组	—	4.98 ± 0.03 ^c

注: 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

63.33 mg/L 和 61.16 mg/L, 均显著高于传统对照组 ($P < 0.05$)。乙酸作为食醋酸味的主要来源, 是通过乙醇在乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶的共同作用下氧化生成^[13], 试验组乙酸含量有所提高。乳酸是玫瑰

表 4 多菌种制曲发酵结束后玫瑰醋中有机酸含量

Table 4 Organic acid content in rosy vinegar after multi-strains cranking fermentation

	1:1:1:2	1:1:1:1	传统对照组
乙酸	57.85 ± 0.01 ^a	56.04 ± 0.001 ^b	41.053 ± 0.052 ^c
乳酸	3.24 ± 0.001 ^a	3.07 ± 0.1 ^b	1.731 ± 0.011 ^c
酒石酸	0.508 ± 0.02 ^b	0.45 ± 0.002 ^c	0.863 ± 0.005 ^a
丙酮酸	0.131 ± 0.001 ^a	0.13 ± 0.004 ^a	0.108 ± 0.002 ^b
苹果酸	0.44 ± 0.002 ^a	0.41 ± 0.01 ^b	0.438 ± 0.007 ^a
草酸	0.286 ± 0.002 ^a	0.265 ± 0.001 ^b	0.218 ± 0.001 ^c
焦谷氨酸	0.229 ± 0.002 ^a	0.21 ± 0.003 ^b	0.175 ± 0.033 ^c
琥珀酸	0.715 ± 0.007 ^a	0.65 ± 0.01 ^b	0.360 ± 0.001 ^c
总量	63.33 ± 0.01 ^a	61.16 ± 0.01 ^b	44.894 ± 0.065 ^c

注: 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

醋中除乙酸外含量最高的有机酸, 试验组乳酸含量为 3.24 mg/L 和 3.07 mg/L。玫瑰醋发酵前的浸米过程中, 乳杆菌通过 *D*-乳酸脱氢酶催化的丙酮酸途径形成产生大量乳酸, 同时“发花”培养的根霉、红曲霉等霉菌也会生成乳酸^[14]。其它 6 种有机酸大部分作为三羧酸循环的中间代谢产物和底物, 在合成的同时也被作为底物而被消耗^[15], 使其在玫瑰醋中含量较低。然而, 苹果酸酸味圆润持久, 琥珀酸有鲜味, 苹果酸、柠檬酸、琥珀酸能缓冲乙酸的刺激性, 可以提高食醋的酸味平和性^[16], 因此非挥发性酸含量提高对丰富醋的风味有重要意义。

2.6 多菌种制曲发酵玫瑰醋挥发性成分

香气是一种非常重要的食品特征, 食醋产品中的香气由数百种不同挥发性化合物形成, 包括醇类、醛类、酯类、酸类和其它次要化合物。微生物多样性会导致食醋发酵中的化合物和营养成分差异, 并影响醋的最终挥发性风味成分^[11]。通过 HS-SPME-GC-MS 技术分离鉴定发酵结束的玫瑰醋样品挥发性成分, 在 3 组玫瑰醋样品中共分离得到 44 种挥发性成分, 其中醇类 (6 种)、醛类 (5 种)、酸类 (8 种)、酯类 (14)、酮类 (4 种)、酚类 (1 种) 以及杂环类 (1 种)。与传统对照组挥发性含量为 5 030.07 mg/L 相比, 使用多菌种制曲生产的 4 和 5 组玫瑰醋挥发性物质含量总量上升显著 ($P < 0.05$), 其含量分别达到 6 348.14 和 6 791.75 mg/L。

在 3 组玫瑰醋产品中含量较高的醇类物质包括有乙醇、苯乙醇、异戊醇和异辛醇。乙醇主要是在发酵前期由酵母代谢产生, 也是乙酸以及乙酸乙酯等的前提物质。多菌种制曲发酵组玫瑰醋的乙醇含量达到 383.83 和 477.31 mg/L, 高于传统对照组。苯乙醇是玫瑰醋中重要的芳香族化合物, 4、5 组中苯乙醇含量分别达到 149.03 和 175.44 mg/L, 主要由原料中的苯丙氨酸在酵母作用下降解成相应的醛类, 再还原产生^[17]。异戊醇是一些支链氨基酸例如亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸等在生物合成过程中分解代谢合成, 为玫瑰醋提供水果和焦糖香气^[18]。

醛类是醋中发生的化学转化过程中的关键中间体, 会导致颜色和风味发生变化^[19]。玫瑰醋中主

要的醛类物质包括糠醛和苯甲醛, 其中糠醛主要通过美拉德反应, 或由于 2-呋喃甲醇缓慢氧化产生^[19]。与传统发酵玫瑰醋相比, 多菌种制曲发酵玫瑰醋中苯甲醛含量上升显著 ($P < 0.05$), 分别达到 220.17 mg/L 和 204.43 mg/L, 该物质主要由糖及相应的醇类氧化产生, 对玫瑰醋香气具有调和作用^[20]。试验组醛类物质含量相对较高, 可能与发酵过程较高水平的酵母数量相关^[21]。

酸类含量较高, 是玫瑰醋的重要成分, 能与其它成分形成芳香化合物, 有助于改善玫瑰醋的香气^[22]。4 组、5 组玫瑰醋中乙酸含量分别达到 3 851.20 mg/L 和 4 081.13 mg/L, 显著高于对照组 ($P < 0.05$)。除乙酸外, 玫瑰醋中含量较高酸类物质还包括丙酸、异丁酸和异戊酸, 其中丙酸是由酵母蛋白代谢形成的, 而异戊酸是以 *L*-亮氨酸为前体, 通过微生物降解形成。

酯类主要来自发酵过程中酸与醇的反应, 且大多有果香和花香。不同类型的酯通常具有协同作用, 并且在浓度低于气味阈值时也会对风味产生重要影响^[23]。与传统发酵醋相比, 4 组、5 组玫瑰醋的酯类含量显著增加, 特别是乙酯类, 如乙酸乙酯、异丁酸乙酯、乙酸异戊酯和乙酸苯乙酯, 其中, 乙酸乙酯的含量增加显著 ($P < 0.05$), 分别为 392.59 mg/L 和 216.72 mg/L。这可能给玫瑰醋提供更丰富的花香和果香味, 提升玫瑰醋香气。

玫瑰醋中酮类物质以 3-羟基-2-丁酮 (又叫乙偶姻) 为主, 其主要通过醇类氧化, 或由丙酮酸转化和经过糖酵解生成, 具有水果和奶油香气。3-羟基-2-丁酮同时也是镇江香醋和四川保宁醋等其它中国传统食醋中主要的酮类挥发性成分^[24-25]。2, 3-丁二酮是 2, 3, 5, 6-四甲基吡嗪 (TTP) 的前体, 据报道, TTP 是醋中的主要生物活性成分, 为玫瑰醋提供坚果和烘烤香气^[26]。其余的酮类物质还包括有 2-壬酮、2, 3-丁二酮、3-乙酰基-2-丁酮, 这些化合物的气味活性值相对较低, 但它们可以对发酵产品的香气成分产生积极影响。另外, 酚类物质和杂环类物质在玫瑰醋中含量较少, 形成过程较复杂, 主要由酿造原料带入, 但较低的阈值对玫瑰醋特殊香气的形成仍起着重要贡献^[27]。

表5 多菌种制曲发酵结束玫瑰醋中挥发性风味物质含量

Table 5 Content of volatile flavor substances in rosy vinegar after multi-strains cranking fermentation

编号	物质成分	4组(1:1:1:2)	5组(1:1:1:1)	传统对照组
A1	乙醇	386.83 ± 60.66 ^b	477.31 ± 13.52 ^a	350.33 ± 5.99 ^c
A2	异丁醇	24.28 ± 0.49 ^a	22.31 ± 0.51 ^b	12.23 ± 0.34 ^c
A3	异戊醇	133.55 ± 0.22 ^a	135.53 ± 0.76 ^a	95.52 ± 2.64 ^b
A4	异辛醇	231.67 ± 0.91 ^b	416.18 ± 3.16 ^a	217.46 ± 7.73 ^c
A5	苯乙醇	149.03 ± 0.12 ^b	175.44 ± 5.19 ^a	179.62 ± 6.75 ^a
A6	1,2-丁二醇	ND	18.62 ± 0.71 ^b	76.90 ± 3.36 ^a
B1	糠醛	42.56 ± 0.02 ^b	48.38 ± 0.67 ^a	32.31 ± 2.85 ^c
B2	苯甲醛	220.17 ± 1.51 ^a	204.43 ± 6.11 ^b	77.82 ± 2.31 ^c
B3	丙醛	5.32 ± 0.04 ^a	4.17 ± 0.15 ^c	ND
B4	苯乙醛	ND	2.68 ± 0.05 ^a	ND
B5	异戊醛	2.79 ± 0.04 ^a	ND	ND
C1	乙酸	3 851.20 ± 93.47 ^b	4 081.13 ± 258.37 ^a	3 218.81 ± 94.32 ^c
C2	丙酸	8.17 ± 0.19 ^b	8.84 ± 0.12 ^a	4.89 ± 0.47 ^c
C3	异丁酸	49.39 ± 0.25 ^b	52.44 ± 0.50 ^a	30.43 ± 1.73 ^c
C4	丁酸	ND	3.16 ± 0.10 ^a	ND
C5	异戊酸	44.63 ± 0.11 ^b	44.14 ± 0.53 ^b	50.11 ± 5.06 ^a
C6	2-乙基己酸	ND	3.72 ± 0.03 ^a	1.29 ± 0.07 ^b
C7	己酸	6.51 ± 0.07 ^c	9.48 ± 0.11 ^b	10.13 ± 2.03 ^a
C8	辛酸	5.96 ± 0.09 ^b	5.11 ± 1.74 ^b	33.55 ± 2.94 ^a
D1	甲酸乙酯	8.59 ± 0.41 ^a	8.91 ± 0.24 ^a	ND
D2	乙酸乙酯	392.59 ± 55.90 ^a	216.72 ± 6.44 ^b	158.89 ± 7.35 ^c
D3	异丁酸乙酯	3.52 ± 0.10 ^a	ND	ND
D4	乙酸异丁酯	33.22 ± 0.11 ^a	26.01 ± 0.08 ^b	15.30 ± 1.08 ^c
D5	丁二酸一甲酯	5.86 ± 0.10 ^a	ND	ND
D6	乙酸异戊酯	124.09 ± 0.43 ^a	106.57 ± 0.79 ^b	60.86 ± 4.40 ^c
D7	丙酸乙酯	76.96 ± 0.29 ^a	75.54 ± 0.16 ^a	ND
D8	乳酸乙酯	7.61 ± 0.60 ^b	14.55 ± 1.56 ^a	7.22 ± 1.12 ^b
D9	2-羟基癸酸乙酯	13.61 ± 1.77 ^a	ND	ND
D10	2,3-丁二醇,二乙酸酯	ND	30.92 ± 2.61 ^a	ND
D11	丁二酸二乙酯	4.46 ± 0.08 ^a	4.51 ± 0.02 ^a	2.47 ± 0.19 ^b
D12	苯乙酸乙酯	40.29 ± 0.54 ^b	42.36 ± 0.57 ^b	68.65 ± 3.38 ^a
D13	乙酸苯乙酯	2.77 ± 0.34 ^a	2.37 ± 0.18 ^a	ND
D14	棕榈酸乙酯	7.63 ± 0.09 ^a	3.24 ± 1.53 ^b	9.32 ± 0.74 ^a
E1	2,4-二叔丁基苯酚	17.32 ± 0.52 ^a	ND	ND
F1	1,3-二氧戊环,2,4,5-三甲基	86.63 ± 27.52 ^b	97.49 ± 7.92 ^a	60.28 ± 2.10 ^c
G1	3-羟基-2-丁酮	273.76 ± 8.64 ^b	340.43 ± 20.03 ^a	256.55 ± 8.79 ^c
G2	2-壬酮	3.91 ± 0.38 ^b	4.61 ± 0.06 ^a	3.76 ± 0.57 ^c
G3	2,3-丁二酮	61.41 ± 0.42 ^b	73.49 ± 0.06 ^a	37.68 ± 4.41 ^c
G4	3-乙酰基-2-丁酮	22.07 ± 0.11 ^b	30.94 ± 2.58 ^a	28.16 ± 2.10 ^a

注:同一行字母不同表示差异显著($P < 0.05$);ND为未检出。

2.7 多菌种制曲发酵玫瑰醋感官评价

如图4所示,对玫瑰醋成品的色泽、透明度、酯香、醋香、焦香、酸味、甜味以及涩味感官角度进

行了评价。相较于传统对照组,试验组玫瑰醋在甜味、酯香上略有提高,整体来看玫瑰醋传统风味基本保留。由于各感官指标在达到最佳时,得分最

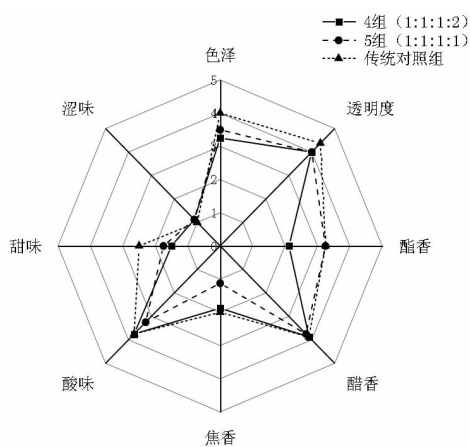


图4 多菌种制曲发酵玫瑰醋感官评价

Fig.4 Sensory evaluation of multi-strain cranking fermented rosy vinegar

高,因此3组玫瑰醋在雷达图上围成的面积可以定量评价醋样的感官。多菌种制曲发酵的4组、5组和对照组醋样的得分为20.31、19.68和20.05。感官评价表明,使用红曲:米曲:黑曲:根霉为1:1:1:2的菌种配比生产的玫瑰醋风味更佳。

3 结论

本研究以正交试验法优化获得两组高淀粉酶和蛋白酶活力的配比,经多菌种混合制曲应用于玫瑰醋酿造生产。两组混合制曲的发酵醪在液态发酵10d均能出现分层,发酵过程能正常生长醋酸菌膜,且正常完成发酵过程,酸度上升略快比传统发酵,得率比传统方法提高17.21%和11.29%。多菌种制曲发酵玫瑰醋样品中检测到8种主要呈味有机酸,总量达到61.16~63.33 mg/L,并鉴定出44种挥发性风味物质,含量达到6348.14~6791.75 mg/L,且呈味有机酸和风味物质均高于传统发酵醋。并且,两组醋样中酯类、酮类和吡嗪类物质含量显著提高,表明多菌种制曲发酵玫瑰醋不仅提高产量,而且能丰富玫瑰醋风味。感官评价风味也显示,使用红曲:米曲:黑曲:根霉为1:1:1:2菌种比例生产的玫瑰醋风味更佳。此研究为玫瑰醋后续机械化生产提供了良好的理论基础。

参 考 文 献

[1] FANG G Y, CHAI L J, ZHONG X Z, et al. De-

ciphering the succession patterns of bacterial community and their correlations with environmental factors and flavor compounds during the fermentation of Zhejiang rosy vinegar [J]. International Journal of Food Microbiology, 2021, 38(341): 109070-109070.

[2] 汪洪, 张林祥, 黄炳文, 等. 多次分割-补料法对玫瑰醋发酵过程与产品品质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(1): 101-108.

WANG H, ZHANG L X, HUANG B W, et al. Effect of multiple splitting-replenishment method on the fermentation process and product quality of rosy vinegar[J]. Food and Fermentation Industry, 2023, 49(1): 101-108.

[3] 蒋予箭, 虞森, 蒋跃明, 等. 浙江玫瑰醋生产工艺现状及改进[J]. 中国调味品, 2008, 33(1): 68-71.

JIANG Y J, YU M, JIANG Y M, et al. Current status of production process of Zhejiang rosy vinegar and its improvement[J]. China Seasoning, 2008, 33(1): 68-71.

[4] 张志刚, 吴生文, 陈飞. 大曲酶系在白酒生产中的研究现状及发展方向[J]. 中国酿造, 2011, 30(1): 13-16.

ZHANG Z G, WU S W, CHEN F. Research status and development direction of macrolide enzyme system in liquor production[J]. China Brewing, 2011, 30(1): 13-16.

[5] 张建良, 于飞跃, 杨海波, 等. 多菌种纯种微生物在绵柔型芝麻香白酒中的应用[J]. 酿酒科技, 2019, 304(10): 124-129.

ZHANG J L, YU F Y, YANG H B, et al. Application of multi-strain pure strains of microorganisms in silky sesame-flavored white wine[J]. Brewing Science and Technology, 2019, 304(10): 124-129.

[6] 李保英, 姜佳丽, 蒋予箭. 酱油生产中应用米曲霉和黑曲霉混合制曲的探索[J]. 中国酿造, 2011, 30(12): 70-74.

LI B Y, JIANG J L, JIANG Y J. Exploration on the application of *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger* in the production of soy sauce[J]. China Brewing, 2011, 30(12): 70-74.

[7] 蒋予箭, 沈忱, 林森, 等. 玫瑰醋纯种“发花”工艺的研究[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(9): 149-152.

JIANG Y J, SHEN C, LIN S, et al. Study on the process of pure ‘fahua’ of rosy vinegar[J]. Chinese Journal of Cereals and Oils, 2009, 24(9): 149-152.

- [8] 班世栋, 王晓丹, 胡宝东, 等. 酱香型大曲中水解酶系研究[J]. 酿酒科技, 2015, 36(4): 13-19.
BAN S D, WANG X D, HU B D, et al. Study on hydrolytic enzyme system in soybean paste type of macrophytes [J]. *Brewing Science and Technology*, 2015, 36(4): 13-19.
- [9] 李中正, 曹彦军, 吕玉柱, 等. 山河陈醋大曲淀粉酶系分析[J]. 中国调味品, 2018, 43(4): 45-48.
LI Z Z, CAO Y J, LÜ Y Z, et al. Analysis of amylase system of Shanhe aged vinegar maceration [J]. *China Seasoning*, 2018, 43(4): 45-48.
- [10] 魏冉, 张宝善, 李亚武, 等. 醋酸菌产膜机理及膜对食醋发酵品质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(3): 182-186, 200.
WEI R, ZHANG B S, LI Y W, et al. Mechanism of membrane production by *Acetobacter* and the effect of membrane on fermentation quality of vinegar [J]. *Food and Fermentation Industry*, 2014, 40(3): 182-186, 200.
- [11] XU W, HUANG Z, ZHANG X, et al. Monitoring the microbial community during solid-state acetic acid fermentation of Zhenjiang aromatic vinegar [J]. *Food Microbiology*, 2011, 28(6): 1175-1181.
- [12] 郑丹妮, 王梦颖, 胡艺涵, 等. 双菌混合发酵纳豆工艺优化[J]. 食品与机械, 2020, 36(12): 183-188.
ZHENG D N, WANG M Y, HU Y H, et al. Optimization of dual bacteria mixed fermentation process of natto [J]. *Food and Machinery*, 2020, 36(12): 183-188.
- [13] ZHANG L, QIN Z, ZHANG L, et al. Dynamic changes of quality and flavor characterization of Zhejiang rosy vinegar during fermentation and aging based on untargeted metabolomics [J]. *Food Chemistry*, 2023, 48(404): 134702.
- [14] 裘纪莹, 梁新乐, 蒋予箭, 等. 浙江玫瑰醋发花阶段醋醅微生物消长规律研究[J]. 中国调味品, 2008(3): 41-44.
QIU J Y, LIANG X L, JIANG Y J, et al. Study on microbial growth and decline of vinegar spirits in the saccharification stage of Zhejiang rosy vinegar [J]. *China Seasoning*, 2008(3): 41-44.
- [15] XU S Z, MA Z W, CHEN Y, et al. Characterization of the flavor and nutritional value of coconut water vinegar based on metabolomics [J]. *Food Chemistry*, 2022, 47(369): 130872.
- [16] WU L H, LU Z M, ZHANG X J, et al. Metagenomics reveals flavour metabolic network of cereal vinegar microbiota [J]. *Food Microbiology*, 2017, 34(62): 23-31.
- [17] ALDALALI S. Comparison of aroma profiles of traditional and modern Zhenjiang aromatic vinegars and their changes during the vinegar aging by SPME-GC-MS and GC-O [J]. *Food Analytical Methods*, 2019, 12(2): 544-557.
- [18] AI M, QIU X, HUANG J, et al. Characterizing the microbial diversity and major metabolites of Sichuan bran vinegar augmented by *Monascus purpureus* [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2019, 36(292): 83-90.
- [19] AL-DALALI S, ZHENG F, SUN B, et al. Tracking volatile flavor changes during two years of aging of Chinese vinegar by HS-SPME-GC-MS and GC-O [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2022, 36(106): 104295.
- [20] 郑宇, 程程, 刘静, 等. 中国传统固态发酵食醋主要特征风味物质组成分析[J]. 中国食品学报, 2020, 20(8): 237-247.
ZHENG Y, CHENG C, LIU J, et al. Analysis of the main characteristic flavor substances of traditional Chinese solid fermented vinegars [J]. *Chinese Journal of Food Science*, 2020, 20(8): 237-247.
- [21] FAN S S, TANG K, XU Y, et al. Characterization of the potent odorants in Tibetan Qingke Jiu by sensory analysis, aroma extract dilution analysis, quantitative analysis and odor activity values [J]. *Food Research International*, 2020, 28(137): 109349.
- [22] AL-DALALI S, ZHENG F, LI H, et al. Characterization of volatile compounds in three commercial Chinese vinegars by SPME-GC-MS and GC-O [J]. *LWT*, 2019, 15(112): 108264.
- [23] SUMBY K M, GRBIN P R, JIRANEK V. Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects [J]. *Food Chemistry*, 2010, 121(1): 1-16.
- [24] LIU L C, HU H Y, YU Y P, et al. Characterization and identification of different Chinese fermented vinegars based on their volatile components [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2021, 45(3): e13670.
- [25] ZHOU Z, LIU S, KONG X, et al. Elucidation of the aroma compositions of Zhenjiang aromatic vinegar using comprehensive two dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry

- etry and gas chromatography-olfactometry[J]. Journal of Chromatography A, 2017, 25(1487): 218-226.
- [26] LI S, LI P, FENG F, et al. Microbial diversity and their roles in the vinegar fermentation process[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(12): 4997-5024.
- [27] NIE J H, LI Y, XING J, et al. Comparison of two types of vinegar with different aging times by NMR-based metabolomic approach[J]. Journal of Food Biochemistry, 2019, 43(5): e12835.

Research on the Process and Quality of Rosy Vinegar Production by Multi-strain Mixed Cranking

Zhang Linxiang¹, Zhou Linan², Xing Limin³, Feng Wei², He Degui³, Jiang Yujian¹, Zhu Junli^{1*}

(¹School of Food Science & Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018

²Hangzhou Food Brewing Co., Ltd., Huzhou 313200, Zhejiang

³Huzhou Lao Heng He Brewing Co., Ltd., Huzhou 313000, Zhejiang)

Abstract To investigate the impact of multi-strain koji production on the process and quality of Zhejiang Rose Vinegar, a study was conducted to optimize the multi-strain ratio using an orthogonal experiment. The two best-performing mixed strains were applied to the production of rose vinegar, and a quality evaluation was performed. The results indicated that two ratios with the highest amylase and protease activities were 1:1:1:1 and 1:1:1:2 of *Monascus purpureus*:*Aspergillus oryzae*:*A. niger*:*Rhizopus*, which were prepared and subsequently applied to the vinegar brewing process. Fermentation tracking showed that the multi-strain fermentation process for rose vinegar was successfully completed, with the total acidity of the final products reaching 6.97 g/100 mL and 6.63 g/100 mL, respectively, representing a yield increase of 17.21% and 11.29% compared to the traditional method. Eight flavor-contributing organic acids, including acetic acid, lactic acid, malic acid, and citric acid, were detected in the two rose vinegar samples, with non-volatile acid contents of 56.04 mg/L and 57.85 mg/L, respectively, which were comparable to the 41.053 mg/L of traditional rose vinegar. A total of 44 volatile flavor compounds were identified using headspace solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS), with volatile flavor compound contents of 6 348.14 mg/L and 6 791.75 mg/L in the two groups, slightly higher than the 5 030.07 mg/L in traditional vinegar. Sensory evaluation revealed that rose vinegar brewed with multi-strain koji showed slight improvements in sweetness and ester aroma, with the 1:1:1:2 multi-strain group achieving the highest sensory scores. This study provides a reference for the mechanized improvement of koji production in traditional rose vinegar manufacturing.

Keywords multi-strain fermentation; rosy vinegar; organic acid; volatile flavor substances