

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20240059

网络首发日期: 2024-07-15; 网络首发地址: <http://link.cnki.net/urlid/12.1355.n.20240711.1638.002>

导致食醋固态发酵异常的产芽孢微生物及其异味分析

张羽施¹, 张文庆¹, 王晓彬¹, 刘 静^{1,2}, 李朝春², 郑 宇^{1,2}

(1. 食品营养与安全国家重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457;

2. 北京龙门醋业有限公司, 北京 100076)

摘要: 本研究分析比较了正常醋醅与异常醋醅样品的挥发性化合物组成, 发现发酵异常样品中的酯类、酮类和醚类等挥发性化合物含量异常。从异常醋醅样品中分离纯化出 6 株产芽孢的微生物, 首次从食醋中分离出栗褐芽孢杆菌 (*Bacillus badius*)。固态发酵验证实验表明, 来源于异常醋醅样品的凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*) DL-1-2 会产生有霉味的 2-辛酮, 栗褐芽孢杆菌 (*Bacillus badius*) DL-3-10 会产生有土味和臭味的 2-异丁基-3-甲基吡嗪和 2-庚酮, 厚胞鲁梅尔芽孢杆菌 (*Rummeliibacillus pycnus*) DL-3-8、斯塔贝基斯鲁梅利杆菌 (*Rummeliibacillus stabekisii*) DL-3-9 会产生有霉味和臭味的 2-辛酮和 2-庚酮, 这些微生物是食醋发酵的污染微生物。这 4 种污染微生物均对乙酸敏感, 在日常食醋发酵管理中应关注醋醅乙醇和乙酸体积分数变化, 合理控制发酵初始乙醇体积分数和发酵中前期乙酸体积分数, 有助于抑制污染微生物的生长。

关键词: 食醋固态发酵; 污染微生物; 芽孢杆菌; 拉梅尔芽孢杆菌; 挥发性风味物质

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2025)04-0042-09

Identification and Odor Analysis of Spore-Producing Microorganisms Causing the Abnormal Solid-State Fermentation of Vinegar

ZHANG Yushi¹, ZHANG Wenqing¹, WANG Xiaobin¹, LIU Jing^{1,2},

LI Chaochun², ZHENG Yu^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, College of Biotechnology,
Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China;

2. Beijing Longmen Vinegar Co., Ltd., Beijing 100076, China)

Abstract: In this study, the volatile compounds composition of normal Cupei and abnormal Cupei samples were compared, and it was found that contents of volatile compounds such as esters, ketones and ethers in abnormal fermentation samples were abnormal. Six strains of spore-producing microorganisms were isolated from the abnormal Cupei, and *Bacillus badius* was isolated from Cupei for the first time. The solid-state fermentation was performed to verify the production of abnormal volatile compounds. The results showed that *Bacillus coagulans* DL-1-2 could produce 2-octanone, *Bacillus badius* DL-3-10 could produce 2-isobutyl-3-methylpyrazine, 2-heptanone, *Rummeliibacillus stabekisii* DL-3-9, and *Rummeliibacillus pycnus* DL-3-8 could produce 2-octanone, 2-heptanone. They were proved as the contaminating microorganisms for vinegar production. All the four strains were sensitive to acetic acid. Therefore, the contents of alcohol and acetic acid should be attended in the daily management of vinegar fermentation, and the reasonable control of the contents of initial ethanol and acetic acid in the early stage of fermentation will be helpful to inhibit the growth of contaminating microorganisms.

Key words: solid state fermentation of vinegar; contaminating microorganisms; *Bacillus*; *Rummeliibacillus*; volatile flavor compounds

收稿日期: 2024-03-21; 修回日期: 2024-04-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(32472321); 天津市科技计划项目(21ZYJJC00030); 泰山产业领军人才工程资助项目

作者简介: 张羽施(1999—), 女, 天津人, 硕士研究生; 通信作者: 郑 宇, 教授, yuzheng@tust.edu.cn

引文格式:

张羽施, 张文庆, 王晓彬, 等. 导致食醋固态发酵异常的产芽孢微生物及其异味分析[J]. 天津科技大学学报, 2025, 40(4): 42-50.

ZHANG Y S, ZHANG W Q, WANG X B, et al. Identification and odor analysis of spore-producing microorganisms causing the abnormal solid-state fermentation of vinegar[J]. Journal of Tianjin university of science and technology, 2025, 40(4): 42-50.

食醋是一种历史悠久的酸性发酵调味品, 食醋的酿造是微生物利用原料中的糖类底物发酵产生营养物质和风味物质的过程^[1]。在中国, 多以高粱、大米等谷物为原料, 采用固态发酵方式生产食醋。食醋的发酵离不开微生物的生长代谢, 传统食醋的发酵过程有多种微生物共同参与^[2], 这些微生物可能来源于原料、发酵剂、设备或环境^[3-4]。食醋发酵过程中微生物群落通常是稳定且固定的, 但当这些微生物的组成发生变化时往往会导致发酵异常和产品质量缺陷, 例如, 产生异味、成品醋浑浊^[5]、胀气^[6]、产膜^[7]等。微生物污染会导致食醋发酵出现异常, 导致企业的管理成本和生产成本增加。表 1 列举了从异常醋醅及食醋中分离得到的潜在污染微生物, 其中芽孢杆菌属(*Bacillus*)是较为常见的食醋污染微生物之一。包括芽孢杆菌属在内的产芽孢微生物是自然界分布最为广泛的微生物之一, 形成芽孢是其抗逆特征之一。在传统食醋生产中, 芽孢杆菌属是重要的功能微生物之一^[8], 其分泌的淀粉酶、蛋白酶可以将原料中的淀粉、蛋白质水解成糖类、氨基酸等小分子, 进一步被其他微生物利用转化为多种风味物质^[9]。在镇江香醋发酵过程中, 芽孢杆菌的含量与 34 种挥发性风味物质的含量呈显著正相关, 与乳酸、乙酸乙酯、苯乙醛和 3-甲基丁醛等镇江香醋特征性风味物质的含量密切相

关^[10]。但是, 如果芽孢杆菌属微生物异常也会对食醋发酵产生不良影响, 如导致食醋风味改变, 甚至腐败。李伟丽等^[11]从腐败食醋中分离出 84 株微生物, 其中 70 株属于芽孢杆菌属。郑宇等^[12]从胀气食醋中分离出 *Bacillus* spp.、*Clostridium aciditolerans*, 发现其具有耐热、耐防腐剂等特性, 能够导致食醋胀桶。王俊等^[13]从成品食醋中分离出一株芽孢杆菌属微生物, 实验发现该菌株会引起食醋返浑, 破坏成品醋的风味。拉梅尔芽孢杆菌属(*Rummeliibacillus*)主要包括 3 个种, 即斯塔贝基斯鲁梅利杆菌(*Rummeliibacillus stabekisii*)、厚胞鲁梅尔芽孢杆菌(*Rummeliibacillus pycnus*)和水原拉梅尔芽孢杆菌(*Rummeliibacillus suwonensis*)。将 *R. suwonensis* 应用于浓香型白酒发酵中, 能够提高己酸、己酸乙酯的含量, 从而提高浓香型白酒的品质^[14]。也有研究者从腐败醋中分离出耐温(55℃)、耐乙醇(体积分数 8%)和耐高盐(质量分数 13%)的 *Rummeliibacillus* sp.^[15]。

为进一步提高食醋生产管理规范, 保障产品质量安全, 本研究分析比较正常醋醅和异常醋醅样品的风味物质组成差异, 重点分析异常醋醅样品中分离到的 4 株产芽孢的潜在污染微生物对食醋发酵的影响, 并分析其对发酵条件的耐受性, 旨在为食醋生产企业的过程管理和产品质量控制提供参考。

表 1 食醋中分离得到的潜在污染微生物

Tab. 1 Potential contaminating microorganisms isolated from vinegar samples

现象	微生物	参考文献
胀气	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Bacillus</i> spp., <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus tequilensis</i> , <i>Bacillus velezensis</i> , <i>Brevibacillus</i> spp., <i>Clostridium aciditolerans</i> , <i>Clostridium</i> spp., <i>Delftia</i> spp., <i>Lactobacillus acetotolerans</i> , <i>Rummeliibacillus</i> sp., <i>Proverdenia alcalifaciens</i> , <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Serratia nematodiphila</i> , <i>Staphylococcus capitis</i> , <i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>Capitis</i> , <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Stenotrophomonas</i> spp.	[6, 12, 16-21]
产膜	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	
黏稠	<i>Lactobacillus vaccinnostercus</i> , <i>Sphingobacterium</i> spp.	
返浑	<i>Gluconacetobacter oboediens</i>	

1 材料与方法

1.1 材料

醋醅采集自河北省某食醋生产企业, 包括外观正常但气味异常的醋醅样品(编号为 DL-1、DL-2、DL-3

和 DL-4)和相同发酵阶段的正常醋醅样品(编号为 DL-5); 麸皮、稻壳, 山西紫林醋业股份有限公司。

细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; MRS 培养基、酵母膏, 生化试剂, 北京奥博星生物技术有限责任公司; 无水葡萄糖, 分析纯, 天津博美科生物技术有限公司; 无水乙醇, 分

析纯,天津市北方天医化学试剂厂;2-辛醇,分析纯,梯希爱(上海)化成工业发展有限公司;甲醇,色谱纯,江苏汉邦科技股份有限公司。

PCR 基因扩增仪,德国 Eppendorf 公司;Gel Doc XR+型凝胶成像仪,美国 Bio-Rad 公司;GB204 型电子分析天平,南京安铎贸易有限责任公司;GCMS-TQ8050NX 型气相色谱-质谱联用分析仪,日本岛津公司。

1.2 实验方法

1.2.1 醋醅中挥发性物质的检测

采用顶空固相微萃取联合气相色谱-质谱(HS-SPME-GC-MS)的方法进行醋醅中挥发性物质的检测。将萃取纤维头(Supelco 57382-U 型)在 250 °C 老化 20 min,向固相微萃取采样瓶中加入 2 g 醋醅、6 mL 去离子水、2 g NaCl 和搅拌子,加入溶于甲醇的 1 μ L 2-辛醇(在甲醇中质量浓度为 0.55 mg/mL)作为内标,密封后 60 °C 水浴 20 min。将萃取头插入瓶中,推出纤维头使之与液面保持 2 cm 的距离,萃取时间为 40 min,搅拌速度为 400 r/min,然后抽出纤维头,再将萃取头插入气相色谱进样口,同时启动仪器,采集数据,待纤维头在 230 °C 解吸 5 min 后抽出纤维头。

色谱条件:进样口温度 220 °C,流量 1 mL/min,分流比为 5,起始温度 40 °C,以 4 °C/min 升到 150 °C,然后以 8 °C/min 升到 250 °C,保持 6 min。

质谱条件:接口温度 220 °C,离子源温度 230 °C,数据采集模式为全扫描,电子能量 70 eV,扫描范围 m/z 35 ~ 500。

定性和定量方法:根据质谱、保留指数,将检测出的物质通过 NIST 谱库和人工解谱的方法进行定性(匹配度大于 80%),通过与 2-辛醇质量浓度之比计算得出样品中各种挥发性物质的含量^[22]。

1.2.2 产芽孢微生物的分离纯化

取 5 g 醋醅置于无菌三角瓶中,加入 45 mL 无菌生理盐水,200 r/min 摇床孵育 30 min,80 °C 水浴加热 10 min,取上清液,制成 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 的样品稀释液。吸取 100 μ L 稀释液涂布至 YPG 固体培养基上,30 °C 培养,挑取单菌落纯化至菌落形态完全一致。用 YPG 液体培养基培养,甘油管冷冻保藏菌株。

1.2.3 微生物的鉴定

将分离纯化的菌株接入 YPG 液体培养基中,30 °C 培养 24 h,使用细菌基因组提取试剂盒提取菌体基因组,以基因组为模板,使用 27 F 和 1492 R 通用引物 PCR 扩增 16S rDNA 片段,PCR 反应体系、反应条

件以及 PCR 产物验证方法参照文献[12]。将 PCR 产物送至苏州安升达生物科技有限公司测序,测序结果在 NCBI 网站(<http://www.NCBI.nlm.gov/blast>)中进行 BLAST 分析。将比对结果同源性 >99% 的物种名称、基因登录号和序列号保存,利用软件 MEGA 7 中的邻接法(neighbor-joining method)构建系统发育树,通过自展法(Bootstrap)检验,重复次数为 1 000 次。

1.2.4 污染微生物发酵验证实验

将分离纯化后的菌株在 YPG 液体培养基中培养至 600 nm 处吸光度(A_{600})为 0.8,按照质量分数 2% 的比例接入食醋固态发酵培养基^[23](SSF_M;麸皮 30 g,稻壳 10 g,MRS 培养基 60 mL,乙醇 3.5 mL,置于 500 mL 锥形瓶中)中,37 °C 培养 5 d,每天用无菌玻璃棒充分搅拌混匀一次。按照 1.2.1 节的方法,利用 HS-SPME-GC-MS 方法分析挥发性物质组成。

1.2.5 发酵产物感官评价

选择 10 名经过培训的专业人员,从霉味、臭味、土味、酸味、花果香和可可味等方面对发酵产物香气进行评估(0 表示未感觉到,1 表示强度最低,5 表示强度中等,9 表示强度最高)。

1.2.6 污染微生物耐受性测定

将分离纯化到的污染微生物接种于 YPG 液体培养基中,培养至 $A_{600} = 0.8$ 。按质量分数 2% 的接种量转接至 YPG 培养基中。根据食醋酿造过程中乙酸和乙醇的含量变化,在 YPG 培养基中分别添加体积分数 4%、7%、10% 的乙醇或利用乙酸调节培养基 pH 至 3.4、4.5、5.5,37 °C 培养 24 h,测定 A_{600} 。在耐温特性方面,将活化后的菌株接种至 YPG 中,分别在 30、37、45 °C 条件下摇床培养 24 h,测定 A_{600} 。

1.3 数据处理与统计分析

所有实验结果均用 3 个平行发酵样品的平均值表示,误差为标准偏差。实验数据以“平均值 $\pm$ 标准差”表示,采用 Excel、Origin、SPSS 软件进行处理。

2 结果与分析

2.1 发酵异常醋醅挥发性化合物组成分析

首先采用嗅闻方法分析比较醋醅样品的气味,4 个发酵异常醋醅样品外观正常,与正常发酵样品无明显区别,但异常醋醅样品 DL-1 和 DL-2 的指甲油味突出,DL-3 具有化学刺激性气味,DL-4 腐败气味突出。采用 HS-SPME-GC-MS 方法分析比较异常醋醅

和正常醋醅样品的挥发性化合物组成。5 个醋醅样品中共检测到 102 种挥发性化合物, 其中包括 11 种酮类、41 种酯类、9 种酸类、18 种醇类、3 种醛类、3 种醚类、10 种吡嗪类, 以及 7 种其他含有苯环、杂环或者烷烃类化合物。

比较发现, 异常醋醅样品与正常醋醅挥发性化合物组成差异主要体现在酯类、酮类等化合物上(图 1)。异常样品 DL-1 中戊酸乙酯、乙酸戊酯、苯甲酸乙酯、苯丙酸乙酯等的相对含量显著高于正常样品。乙酸乙酯是食醋中最常见、最普遍的一种酯类, 呈现水果香味, 但当其浓度较高时, 会有令人不愉快的刺激性气味^[24]。异常醋醅样品 DL-1 和 DL-2 的乙酸乙酯含量分别是正常醋醅样品的 7 倍和 15 倍, 是导致其呈现指甲油味的主要化合物之一。酮类化合物通常具有刺激性气味, 例如丙酮具有辛辣的气味, 2-丁酮具有刺激性气味^[25], 2-庚酮具有腐臭味^[26], 2-辛酮具有霉味^[27]。DL-2 和 DL-3 样品中均检测到较高的丙酮含量, 100 g 醋醅中分别有 526.57 μg 和 487.57 μg , DL-3 样品中检测到了 2-丁酮、2-庚酮、2-辛酮, 而正常样品中并未检测到, 所以丙酮、2-丁酮、2-庚酮、2-辛酮可能是导致其刺激性气味的主要化合物。DL-4 样品中吡嗪类化合物的含量远高于正常醋醅, 其中四甲基吡嗪的含量是正常醋醅中的 22 倍。此外, DL-4 样品中酮类化合物占比明显增加, 而酸类、醇类明显降低, 且检测到较高浓度的二甲基二硫醚和二甲基三硫醚等醚类化合物。二甲基硫醚、二甲基三硫醚、二甲基二硫醚是赋予果蔬汁(包括荔枝汁、柑橘汁和西蓝花汁)令人不愉快的感官特性的物质^[28], 这些可

能是导致 DL-4 样品具有腐败气味的主要化合物。

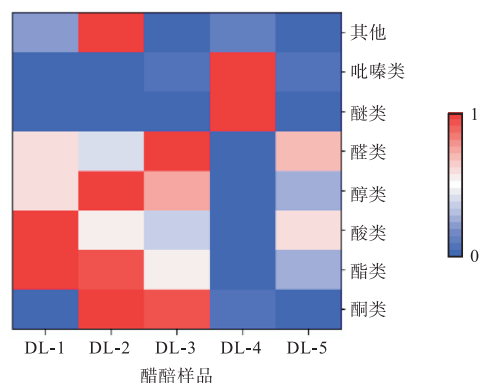


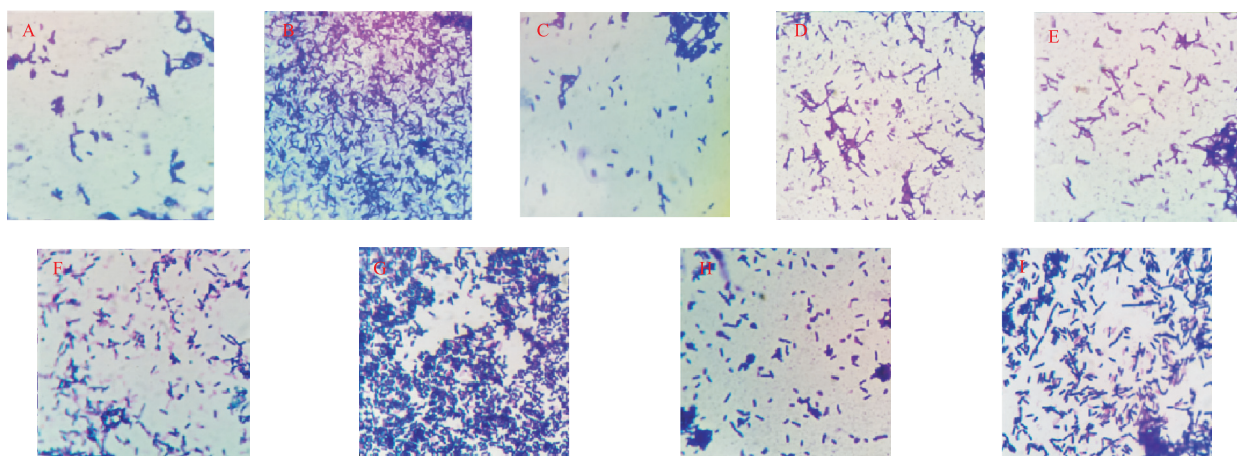
图 1 醋醅样品中挥发性化合物热图

Fig. 1 Heatmap of volatile compounds in Cupei samples

2.2 异常醋醅中产芽孢微生物的分离培养与鉴定

由于产芽孢微生物是环境和谷物原料中常见的微生物, 而且通常会产生酯类、酮类等代谢产物^[29], 因此本研究重点对污染醋醅样品中的产芽孢微生物进行分离纯化。根据分离培养基上的菌落形态和培养基的气味, 随机挑选了 9 株细菌进行革兰氏染色, 结果显示 9 株产芽孢微生物均为革兰氏阳性菌, 在细胞形态上均呈杆状。9 株产芽孢微生物的菌落特征和细胞形态见图 2 和表 2。

以各菌株基因组为模板, 利用细菌通用引物扩增 16S rDNA 片段并测序, 将序列在 NCBI 数据库中进行比对, 选择与测序基因序列相似度最高(>99%)的细菌作为该菌株在分子生物学上的归类, 并记录其基因登录号。通过邻接法构建系统发育树, 如图 3 所示。



注: A—C 分别为 DL-3-10、DL-2-5、DL-1-7; D—F 分别为 DL-3-1、DL-3-8、DL-1-8; G—I 分别为 DL-3-9、DL-3-11、DL-1-2。

图 2 产芽孢微生物细胞形态

Fig. 2 Cell morphology of spore-producing microorganisms

比对结果表明, 分离得到的 9 株细菌分别属于 2 个属 6 个种, 包括凝结芽孢杆菌(*B. coagulans*)、沙福

芽孢杆菌 (*B. safensis*)、斯塔贝基斯鲁梅利杆菌 (*R. stabekisii*)、地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*)、厚胞鲁梅尔芽孢杆菌 (*R. pycnus*) 和栗褐芽孢杆菌 (*B. badius*)。栗褐芽孢杆菌 (*B. badius*) 是首次从食醋相关样品中分离得到, 正常醋醅样品中很少检测到这种微生物。*B. badius* 具有溶藻、高产青霉素 G 酰化酶的特性, 但在发酵方面应用较少。*Rummeliibacillus* 属可以

形成芽孢^[30], 李敏^[19]在腐败的成品醋中分离出了能导致食醋胀气的 *Rummeliibacillus* sp.。根据相关研究报告和所分离纯化菌株的特性^[31], 初步认为 *B. badius*、*B. coagulans*、*B. safensis*、*B. licheniformis*、*R. stabekisii* 和 *R. pycnus* 是造成醋醅发酵异常的潜在污染微生物, 进一步对这些微生物进行固态发酵实验, 分析这些潜在污染微生物对醋醅风味的影响。

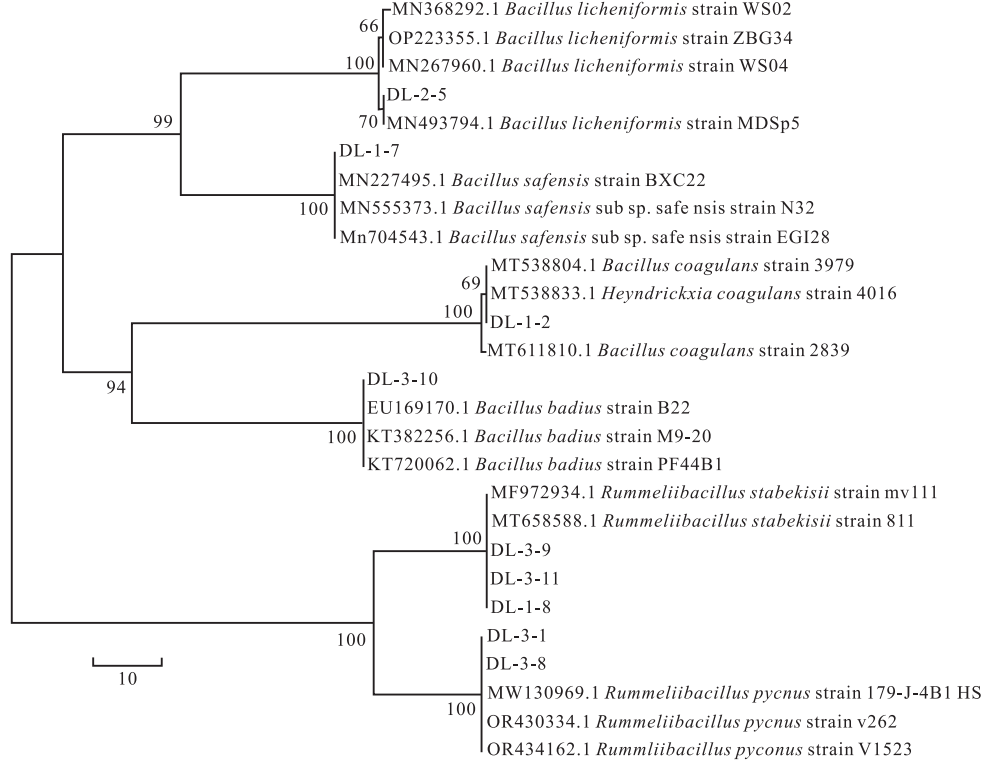


图3 产芽孢微生物的系统发育树
Fig. 3 Phologenic tree of spore-producing microorganism

表2 产芽孢微生物菌落形态

Tab. 2 Morphology of spore-producing microbial colony

菌种编号	菌落形态
DL-3-10	菌落呈淡黄色, 圆形, 表面光滑, 边缘整齐, 不透明
DL-2-5	菌落呈淡黄色, 形状不规则, 表面粗糙有褶皱, 边缘不整齐, 不透明
DL-1-7	菌落呈白色, 形状不规则, 表面有褶皱, 边缘不整齐, 不透明
DL-3-1	菌落呈黄色, 圆形, 表面光滑, 边缘不整齐, 不透明
DL-3-8	菌落呈黄色, 圆形, 表面光滑, 边缘不整齐, 不透明
DL-1-8	菌落呈黄色, 圆形, 表面光滑, 边缘整齐, 不透明
DL-3-9	菌落呈黄色, 圆形, 表面光滑, 边缘整齐, 不透明
DL-3-11	菌落呈黄色, 圆形, 表面光滑, 边缘整齐, 不透明
DL-1-2	菌落呈黄色, 圆形, 表面光滑, 边缘整齐, 不透明

2.3 潜在污染微生物对食醋发酵挥发性化合物的影响
采用模拟食醋固态发酵培养基对 *B. coagulans* DL-1-2、*B. safensis* DL-1-7、*B. licheniformis* DL-2-5、*R. stabekisii* DL-3-9、*R. pycnus* DL-3-8 和 *B. badius*

DL-3-10 进行固态发酵, 37 °C 培养 5 d, 对 6 株微生物发酵产物的风味进行感官评价, 结果如图 4 所示。

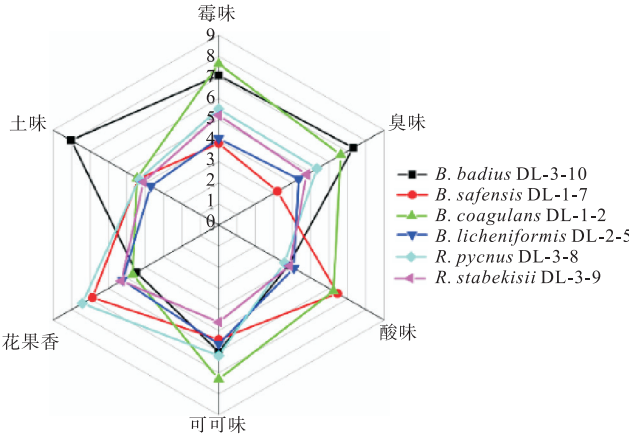


图4 潜在污染微生物发酵样品感官评价
Fig. 4 Sensory evaluation of fermentation products by potential contaminating strains

B. coagulans DL-1-2 发酵产物的霉味、臭味、可
可味和酸味较为突出。*B. badius* DL-3-10 发酵产物的
土味、霉味、臭味较强。

用 HS-SPME-GC-MS 对其挥发性化合物组成进
行分析, 重点选择相对含量>1%的化合物进行分析,
结果如图 5 所示。

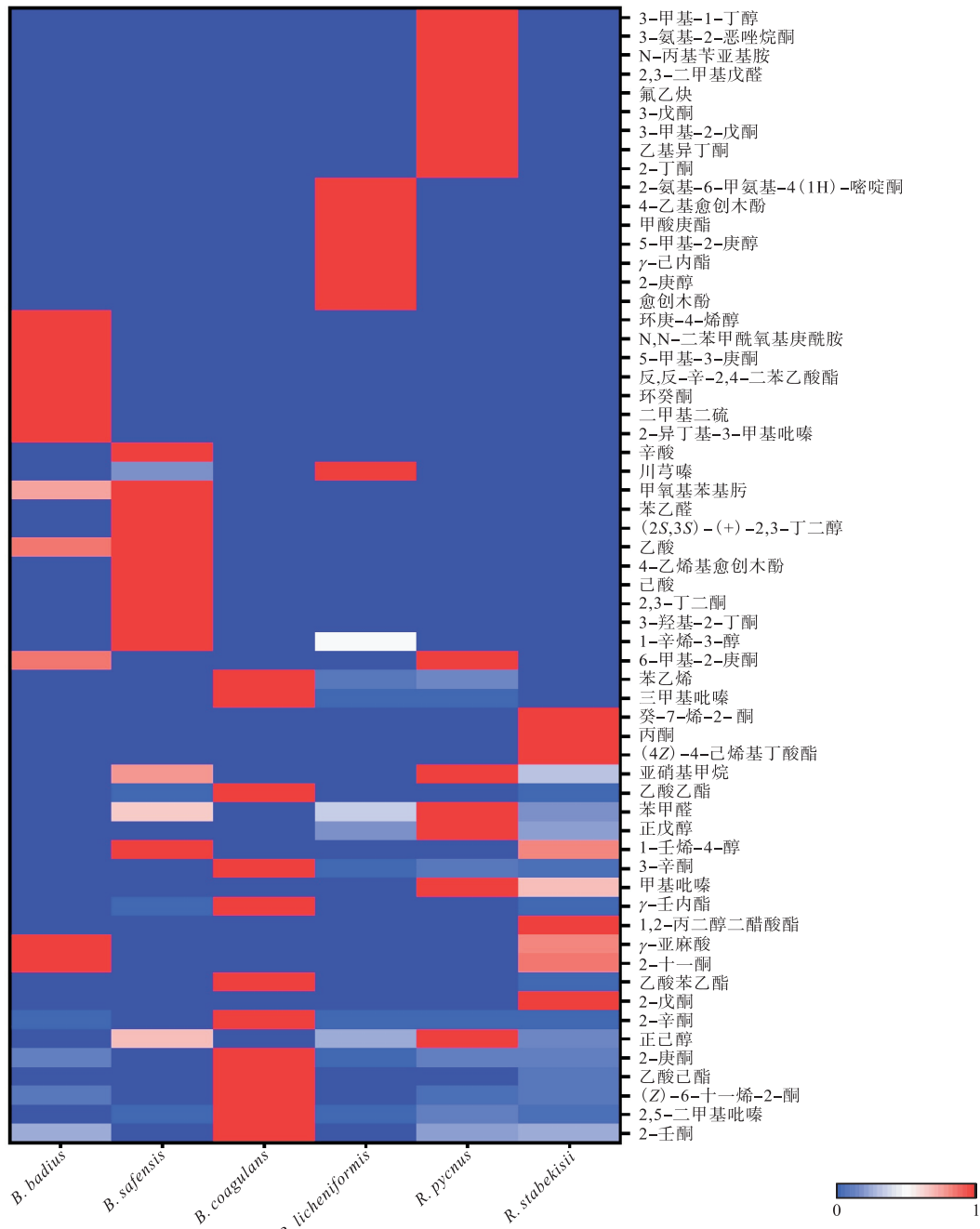


图 5 潜在污染微生物模拟发酵的挥发性化合物分析
Fig. 5 Analysis of volatile compounds produced by potential contaminating microorganisms

由图 5 可知, *B. coagulans* DL-1-2 挥发性成分主
要为酮类、酯类、醛类和吡嗪类化合物, 其中具有霉
味的 2-辛酮相对比例达到 48.26%, 说明 *B. coagu-*
lans 含量异常会导致醋醋异味。*B. badius* DL-3-10 的
发酵产物呈现土味和腐败气味, 其产生的挥发性化
合物中有较多的吡嗪类和酮类化合物, 还有少部分的有

机酸和二甲基二硫醚, 其中含量最高的 2-异丁基-3-
甲基吡嗪呈现土味, 2-辛酮具有霉味, 2-庚酮具有腐
臭味, 二甲基二硫醚具有恶臭味, 与本研究检测到的
异常醋醋样品中的主要异味化合物相符, 说明 *B.*
badius 的丰度增加会导致食醋发酵异常, 出现霉味和
腐败气味。*R. pycnus* DL-3-8、*R. stabekisii* DL-3-9 的

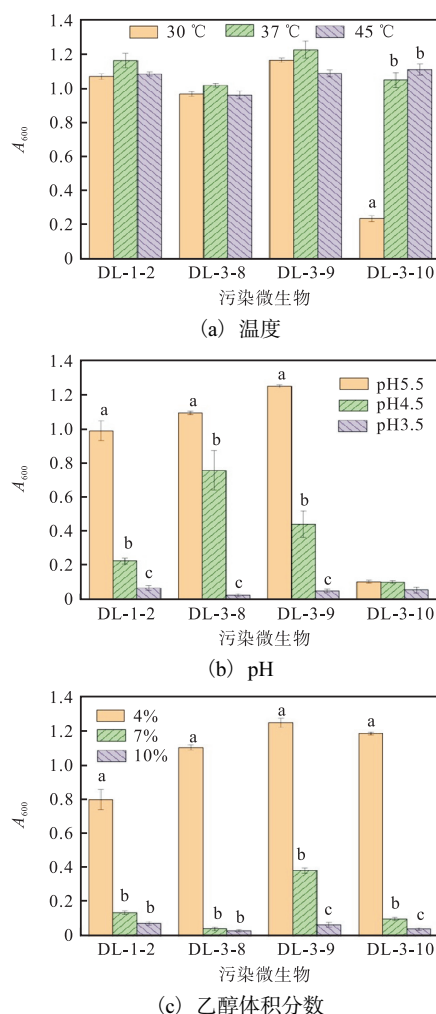
发酵产物主要为酮类、醛类、醇类化合物以及少部分的有机酸,其中检测到具有霉味和臭味的 2-辛酮、2-庚酮。目前暂时没有文献报道 *B. coagulans*、*B. badius*、*R. pycnus*、*R. stabekisii* 会产生 2-辛酮、2-异丁基-3-甲基吡嗪、二甲基二硫醚等风味物质,可能是由于 *B. coagulans*、*B. badius*、*R. pycnus*、*R. stabekisii* 利用了食醋固态发酵培养基中的麸皮、稻壳等底物所产生。对 *B. safensis* DL-1-7、*R. pycnus* DL-3-8 进行模拟固态发酵发现,其代谢产生的挥发性化合物主要有酮类、醇类、酸类、酚类、醛类等。*B. licheniformis* DL-2-5 发酵产生的主要挥发性化合物有酚类、醇类、醛类、酮类和吡嗪类等。经风味物质组成分析和感官嗅闻分析发现,两者的代谢产物中没有大量具有不良气味的化合物。*B. safensis* DL-1-7 能够发酵产生相对比例达到 37.88% 的 3-羟基-2-丁酮(乙偶姻),乙偶姻被认为是合成四甲基吡嗪的前体物质,而四甲基吡嗪具有焙烤和坚果香气,并且还具有改善冠脉循环^[32]、防治血栓^[29]等功效。*B. licheniformis* DL-2-5 在此发酵条件下能够生产相对比例达到 15.11% 的四甲基吡嗪。以上结果说明,醋醅中 *B. licheniformis* 和 *B. safensis* 的生长代谢与样品 DL-4 中较高含量的四甲基吡嗪有关。*B. safensis* DL-1-7 和 *B. licheniformis* DL-2-5 对食醋发酵没有明显的负面影响,并且有助于发酵过程四甲基吡嗪的生成,因此其不是食醋发酵的潜在污染微生物。

2.4 污染微生物菌株耐受性分析

在食醋发酵过程中,微生物的生长代谢与醋醅理化性质紧密相关。在醋醅发酵前期,100 g 醋醅中乙醇含量在 4 g 左右,部分不耐醇的微生物受到抑制,而醋酸菌、乳酸菌等代谢产生醋酸、乳酸等有机酸,抑制污染微生物的生长,为食醋发酵创造酸性环境^[33]。在发酵中后期,由于微生物代谢产热,醋醅温度达到 45 ℃,会影响微生物的生长代谢。在醋酸发酵后期,100 g 醋醅中具有抑菌效果的乙酸含量达到 5 g 左右,使不耐酸的微生物丰度降低。为了分析发酵条件对食醋发酵污染微生物的抑制作用,为生产管理提供参考,本研究分析比较了醋醅发酵过程对微生物生长代谢具有重要影响的理化因子乙醇、乙酸和温度对 4 株食醋发酵污染微生物的影响,结果如图 6 所示。

从图 6(a)可以看出,在 30~45 ℃ 范围内,温度对 *B. coagulans* DL-1-2、*R. pycnus* DL-3-8、*R. stabekisii* DL-3-9 的生长没有显著影响,其中 *B. badius* DL-3-10 在 30 ℃ 生长速度较慢。由图 6(b)可知,乙

酸对 *B. badius* DL-3-10 具有明显的抑制效果,少量乙酸(0.1 g/100 mL, pH 5.5)对 *B. coagulans* DL-1-2、*R. pycnus* DL-3-8、*R. stabekisii* DL-3-9 的生长没有抑制作用,当 pH 低于 3.5(乙酸含量 1.6 g/100 mL),所有污染微生物的生长均受到显著抑制。与乙酸类似,低体积分数乙醇(4%)对这 4 株污染微生物的生长均没有抑制作用〔图 6(c)〕,当乙醇体积分数大于 7%,4 株污染微生物的生长受到抑制,其中 *R. stabekisii* DL-3-9 具有更好的乙醇耐受性。以上结果表明,4 株污染微生物对 4% 乙醇具有较好的耐受性,但均对 1.6 g/100 mL 的乙酸敏感,在生产过程中应关注发酵前期乙醇和乙酸的体积分数,控制每 100 g 醋醅中初始乙醇含量不低于 5 g,且当每 100 g 醋醅中乙酸含量达到 1.6 g 后,有助于降低此类微生物污染。



注: DL-1-2 为 *B. coagulans* DL-1-2; DL-3-8 为 *R. pycnus* DL-3-8; DL-3-9 为 *R. stabekisii* DL-3-9; DL-3-10 为 *B. badius* DL-3-10。

图 6 温度、pH 和乙醇体积分数对 4 株污染微生物生长的影响

Fig. 6 Effects of temperature, pH and ethanol content on the growth of four pollution strains

3 结 语

醋醅发酵异常主要由微生物污染引起,其中产芽孢类微生物在环境和原料中广泛存在,是预防微生物污染的主要对象。本研究从醋醅中分离并鉴定出4株污染微生物,其中*B. coagulans*的浓度异常会产生具有霉味的2-辛酮,*B. badius*会产生具有土味和臭味的2-异丁基-3-甲基吡嗪、2-庚酮、二甲基二硫醚等异常挥发性化合物,*R. stabekisii*、*R. pycnus*产生具有霉味和臭味的2-辛酮、2-庚酮。*B. licheniformis*和*B. safensis*有助于四甲基吡嗪的生成,对食醋风味没有明显负面影响。在食醋发酵生产过程中,应注意发酵初始乙醇体积分数的控制,并监测发酵前期乙酸体积分数的变化,有助于及时发现并预防污染微生物的生长。

参考文献:

- [1] ZTÜRK M, YALIN O, TEKGÜNDÜZ C, et al. Origin of the effects of optical spectrum and flow behaviour in determining the quality of dry fig, jujube, pomegranate, date palm and concentrated grape vinegars[J]. Spectrochimica acta part A: molecular and biomolecular spectroscopy, 2022, 270: 120792.
- [2] MARCO M L S M, GÄNZLE M, ARRIETA M C, et al. The international scientific association for probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods[J]. Nature review gastroenterology hepatology, 2021, 18(3): 196–208.
- [3] HU Y, ZHANG L, WEN R, et al. Role of lactic acid bacteria in flavor development in traditional Chinese fermented foods: a review[J]. Critical reviews in food science and nutrition, 2020, 62(10): 2741–2755.
- [4] SANMARCO L M, WHEELER M A, GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ C, et al. Anti-inflammatory astrocytes[J]. Nature, 2021, 590(7846): 473–479.
- [5] 林秀敏, 陈楷, 蒋佳希, 等. 食醋浑浊现象的微生物因素分析与探讨[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(4): 1293–1297.
- [6] 李盈颖, 高雯, 周帼萍. 山西老陈醋样品的污染微生物分析[J]. 食品科学, 2016, 37(12): 226–231.
- [7] 赵爽, 朱亚琴, 刘书亮, 等. 袋装变质食醋产膜菌的分离鉴定及其控制[J]. 食品工业科技, 2014, 35(23): 118–122.
- [8] TIE Y, ZHU W, ZHANG C, et al. Effect of temperature on chemical compounds of Cupei (precursor of bran vinegar) during in-situ aging and revelation of functional microorganisms in the process[J]. LWT-Food science and technology, 2023, 182: 114912.
- [9] CHUNG N, JO Y, JOE M H, et al. Rice vinegars of different origins: discriminative characteristics based on solid-phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometry, an electronic nose, electronic tongue and sensory evaluation[J]. Journal of the institute of brewing, 2017, 123(1): 159–166.
- [10] LIU J, YU Y, YE X, et al. Exploring the ecological interactions of *Bacillus* and their contribution to characteristic aroma components in Zhenjiang aromatic vinegar[J]. Food bioscience, 2023, 54: 102900.
- [11] 李伟丽, 赵超, 车建途, 等. 腐败醋中微生物的分离鉴定及乳酸链球菌素对其抑制作用[J]. 食品科学, 2015, 36(1): 174–178.
- [12] 郑宇, 牛纪伟, 张祥龙, 等. 传统食醋中潜在污染微生物的分离鉴定[J]. 现代食品科技, 2016, 32(11): 334–339.
- [13] 王俊, 卢红梅, 崔云. 杂菌污染对固态发酵食醋返混的影响[J]. 食品科学, 2013, 34(5): 172–176.
- [14] GUAN T, WU X, HOU R, et al. Application of *Clostridium butyricum*, *Rummeliibacillus suwonensis*, and *Is-satchenikia orientalis* for Nongxiangxing Baijiu fermentation: improves the microbial communities and flavor of upper fermented grain[J]. Food research international, 2023, 169: 112885.
- [15] LI M, LI Y, FAN X, et al. Draft genome sequence of *Rummeliibacillus* sp. strain TYF005, a physiologically recalcitrant bacterium with high ethanol and salt tolerance isolated from spoilage vinegar[J]. Microbiology resource announcements, 2019, 8(31): e00244–19.
- [16] 曹晋宜, 赵红年, 赵凌雁, 等. 食醋中有害微生物的分离与鉴定[J]. 中国酿造, 2017, 36(2): 115–118.
- [17] 翟磊, 程宵宵, 苏姣姣, 等. 一株食醋污染菌 CICC10774 的鉴定及其生长代谢特性[J]. 微生物学通报, 2016, 43(7): 1524–1531.
- [18] 何银, 唐杰, 张惟广. 赤水晒醋中腐败微生物的生长特性研究[J]. 中国调味品, 2018, 43(2): 17–22.
- [19] 李敏. 夏冬两季食醋微生物群落演替特征及其特征微生物研究[D]. 太原: 太原理工大学, 2019.
- [20] 孙文丽, 孙玲, 邢政, 等. 胀气食醋中污染微生物的分离鉴定及其生理生化特性[J]. 食品工业科技, 2018, 39(17): 99–105.

- [21] 王兴洁,刘爱平,敖晓琳,等. 中国传统食醋微生物污染及控制措施研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(10):260–265.
- [22] HONG S W, KWON S W, KIM S J, et al. *Bacillus oryzaecorticis* sp nov., a moderately halophilic bacterium isolated from rice husks[J]. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2014, 64(8):2786–2791.
- [23] 赵翠梅. 食醋固态发酵人工菌群构建与发酵工艺优化[D]. 天津:天津科技大学, 2021.
- [24] CHEN L, MARDIANSYAH S T, KUULIALA L, et al. Selected-ion flow-tube mass spectrometry for the identification of volatile spoilage markers for fresh pork packaged under modified atmospheres[J]. Food chemistry, 2023, 423:136318.
- [25] ZHANG B, LIU X, LI S, et al. Effects of dietary lipids and *Clostridium butyricum* on chicken volatile flavour compounds[J]. Indian journal of animal research, 2017, 52(8):1167–1173.
- [26] DENG S, LIU R, LI C, et al. Meat quality and flavor compounds of soft-boiled chickens: effect of Chinese yellow-feathered chicken breed and slaughter age[J]. Poultry science, 2022, 101(12):102168.
- [27] QI J, LIU D Y, ZHOU G H, et al. Characteristic flavor of traditional soup made by stewing Chinese yellow-feather chickens[J]. Journal of food science, 2017, 82(9):2031–2040.
- [28] PANG X, ZHANG Y, QIU J, et al. Coupled multidimensional GC and odor activity value calculation to identify off-odors in thermally processed muskmelon juice[J]. Food chemistry, 2019, 301:125307.
- [29] JIANG Y, LÜ X, ZHANG C, et al. Microbial dynamics and flavor formation during the traditional brewing of *Monascus* vinegar[J]. Food research international, 2019, 125:108531.
- [30] HER J, KIM J. *Rummeliibacillus suwonensis* sp. nov., isolated from soil collected in a mountain area of South Korea[J]. Journal of microbiology, 2013, 51(2):268–722.
- [31] NIE Z Q, ZHENG Y, WANG M, et al. Exploring microbial succession and diversity during solid-state fermentation of Tianjin Duliu mature vinegar[J]. Bioresource technology, 2013, 148:325–333.
- [32] 李雨佳, 罗丽蓉, 尚常花. 微生物发酵生产四甲基吡嗪方法综述[J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 2024, 42(4):32–40.
- [33] ZHANG Q, FU C, ZHAO C, et al. Monitoring microbial succession and metabolic activity during manual and mechanical solid-state fermentation of Chinese cereal vinegar[J]. LWT-Food science and technology, 2020, 133(1):109868.

责任编辑: 郎婧

(上接第 11 页)

- nalizing[J]. Cell reports, 2016, 16(1):28–36.
- [48] LIU C, ZHANG Q, GAO M, et al. Enhancement of radiation sensitivity in lung cancer cells by a novel small molecule inhibitor that targets the β -catenin/TCF4 interaction[J]. PLOS ONE, 2016, 11(3):e0152407.
- [49] WARRIER V P, VENKATACHALAM S, SAKTHIVEL R, et al. Combinatorial effects of 5-fluorouracil and menadione on Wnt/beta-catenin pathway in human colorectal cancer cells[J]. Applied biochemistry and biotechnology, 2025, 197(2):1280–1300.
- [50] KIM J Y, LEE H Y, PARK K K, et al. CWP232228 targets liver cancer stem cells through Wnt/ β -catenin signaling: a novel therapeutic approach for liver cancer treatment[J]. Oncotarget, 2016, 7(15):20395–20409.
- [51] TROSSET J Y, DALVIT C, KNAPP S, et al. Inhibition of protein-protein interactions: the discovery of druglike β -catenin inhibitors by combining virtual and biophysical screening[J]. Proteins, 2006, 64(1):60–67.
- [52] TIAN W, HAN X, YAN M, et al. Structure-based discovery of a novel inhibitor targeting the β -catenin/TCF4 interaction[J]. Biochemistry, 2012, 51(2):724–731.
- [53] WAALER J, MYGLAND L, TVEITA A, et al. Tankyrase inhibition sensitizes melanoma to PD-1 immune checkpoint blockade in syngeneic mouse models[J]. Communications biology, 2020, 3(1):196.

责任编辑: 郎婧