

基于山西老陈醋传统工艺固态发酵体系时空异质性分析解析主要风味物质形成规律

申 瑾^{1,2}, 周景丽^{1,2}, 郎繁繁^{1,2}, 闫裕峰^{1,2}, 王 利^{1,2}, 夏瑶瑶^{1,2}, 李 杰^{1,2}, 张 峰^{1,2}, 王晨苑^{1,2}, 郑 宇^{1,2,3,4,*}

(1.食醋发酵科学与工程山西省重点实验室, 山西 太原 030400; 2.山西紫林醋业股份有限公司, 山西 太原 030040;

3.天津市微生物代谢与发酵过程控制技术工程中心, 天津 300457; 4.天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘 要:以山西老陈醋固态发酵过程为研究对象,采用宏基因组学和顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用技术,分别对不同空间发酵过程的醋醅理化特征、风味物质和微生物群落组成进行分析。结果表明:不同空间位置醋醅的水分、温度均具有显著性差异,发酵过程共检测到93种挥发性风味物质,总挥发性物质含量依次为上层>中层>下层。上、中、下层总酸均与*Proteus*、*Salinicoccus*、*Staphylococcus*、*Klebsiella*显著负相关($P<0.05$),从而影响微生物生长代谢,下层水分显著影响*Proteus*、*Salinicoccus*、*Saccharomyces*、*Staphylococcus*、*Klebsiella*生长代谢($P<0.05$)。*Proteus*、*Saccharomyces*、*Staphylococcus*、*Klebsiella*与发酵过程理化指标密切相关,上层醋醅中*Proteus*、*Salinicoccus*、*Saccharomyces*、*Staphylococcus*、*Klebsiella*微生物生长代谢促进了亚油酸乙酯、油酸乙酯等酯类化合物的生成,中、下层的发酵条件则抑制了部分酯类物质的生成。本研究从时空异质的角度解析了山西老陈醋发酵特性,阐明了风味物质形成规律,有助于全面阐明山西老陈醋酿造机理。

关键词:醋醅;宏基因组学;微生物;理化因子;挥发性风味;相关性分析

Formation Patterns of Major Flavor Substances Based on the Analysis of Spatiotemporal Heterogeneity in the Traditional Solid-State Fermentation System of Shanxi Aged Vinegar

SHEN Jin^{1,2}, ZHOU Jingli^{1,2}, LANG Fanfan^{1,2}, YAN Yufeng^{1,2}, WANG Li^{1,2}, XIA Yaoyao^{1,2}, LI Jie^{1,2},

ZHANG Feng^{1,2}, WANG Chenyuan^{1,2}, ZHENG Yu^{1,2,3,4,*}

(1. Shanxi Provincial Key Laboratory of Vinegar Fermentation Science and Engineering, Taiyuan 030400, China;

2. Shanxi Zilin Vinegar Industry Co. Ltd., Taiyuan 030040, China; 3. Tianjin Engineering Research Center of

Microbial Metabolism and Fermentation Process Control, Tianjin 300457, China; 4. School of Biotechnology,

Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: In this study, the solid-state fermentation process of Shanxi aged vinegar was investigated. Samples of fermented grains (*Cupei*) taken at different spatial locations and at different fermentation times were analyzed for physicochemical characteristics, flavor substances and microbial community composition by metagenomics and headspace-solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS). The results showed that the moisture and temperature of *Cupei* significantly varied among spatial locations. A total of 93 volatile flavor compounds were detected during the fermentation process, and the total content of volatile compounds decreased in the order of upper layer > middle layer > lower layer. The total acid contents in the upper, middle, and lower layers were significantly negatively correlated with *Proteus*, *Salicicoccus*, *Staphylococcus*, and *Klebsiella* ($P < 0.05$), affecting microbial growth and metabolism. The water content of the lower layer significantly affected the growth and metabolism of *Proteus*, *Salicicoccus*, *Saccharomyces*, *Staphylococcus*, and *Klebsiella* ($P < 0.05$). *Proteus*, *Saccharomyces*, *Staphylococcus*, and *Klebsiella* were closely related

收稿日期: 2024-06-06

基金项目: 山西省重点研发计划项目(202102130501008; 202202140601018; 202202130501011);

山西科技厅山西省重点实验室建设项目(202204010931002); 国家自然科学基金面上项目(32072203);

天津市科学计划项目(21ZYJJC00030)

第一作者简介: 申瑾(1992—)(ORCID: 0000-0002-6541-0719),女,工程师,硕士研究生,研究方向为食品发酵。

E-mail: 992953710@qq.com

*通信作者简介: 郑宇(1980—)(ORCID: 0000-0002-4554-9908),男,教授,博士,研究方向为发酵食品酿造机理解析与工艺优化。E-mail: yf.zy@zley.com

to physicochemical indicators during the fermentation process. The growth and metabolism of *Proteus*, *Salicicoccus*, *Saccharomyces*, *Staphylococcus*, and *Klebsiella* in the upper layer of *Cupei* promoted the production of esters such as ethyl linoleate and ethyl oleate, while the fermentation conditions in the middle and lower layers inhibited the production of some esters. This study helps us to comprehensively understand the brewing mechanism of Shanxi aged vinegar.

Keywords: *Cupei*; metagenomics; microorganism; physicochemical factors; volatile flavor; correlation analysis

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240606-029

中图分类号: TS264.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2025) 02-0164-07

引文格式:

申瑾, 周景丽, 郎繁繁, 等. 基于山西老陈醋传统工艺固态发酵体系时空异质性分析解析主要风味物质形成规律[J]. 食品科学, 2025, 46(2): 164-170. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240606-029. <http://www.spkx.net.cn>

SHEN Jin, ZHOU Jingli, LANG Fanfan, et al. Formation patterns of major flavor substances based on the analysis of spatiotemporal heterogeneity in the traditional solid-state fermentation system of Shanxi aged vinegar[J]. Food Science, 2025, 46(2): 164-170. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240606-029. <http://www.spkx.net.cn>

食醋是一种历史悠久、被广泛应用于食品工业和日常生活中的重要酸性调味品, 欧美等国家食醋的生产多以水果为主要原料经液态发酵酿造而成, 如意大利的香脂醋和西班牙的雪莉醋等^[1]。在中国, 食醋的生产主要以高粱和糯米等谷物为原料, 如山西老陈醋、镇江香醋、天津独流老醋等^[2]。山西老陈醋主要以高粱为原料, 以大曲为发酵剂, 经过乙醇发酵后采用固态醋酸发酵酿造而成, 从而完成大分子糖质原料的糖化、酒化和醋化等过程, 代谢产生了丰富的风味物质^[3]。发酵过程微生物的代谢活动与风味物质的生成密切相关^[4-5]。谷物醋发酵过程微生物群落组成主要以耐酸乳杆菌、巴氏醋杆菌和瑞士乳杆菌为主^[6]。Wang Zongmin等^[7]通过Illumina MiSeq宏基因组学技术对镇江香醋醋酸发酵过程中微生物的组成与演替进行了探索, 经分析发现, 醋醅中共有151个细菌属和202个真菌属, 主要包括醋酸菌、乳酸菌, 且细菌对风味形成的影响大于真菌, 其细菌的多样性和丰度, 均高于之前的研究。牟俊^[8]研究了山西老陈醋中主要优势菌——醋酸菌与乳酸菌的相互关系。Nie Zhiqiang等^[9]研究山西老陈醋大曲及乙醇、醋酸发酵阶段微生物群落的多样性。传统食醋的发酵是一个微生物自然富集的过程^[10-11], 微生物群落生长代谢受温度、酸度和溶氧等发酵条件的影响, 但目前对其具体机制的认识仍不够深入。

固态醋酸发酵阶段是山西老陈醋风味积累的关键时期。微生物是食醋风味物质的主要来源之一。大量研究表明, 在醋酸发酵阶段乳酸杆菌和醋酸杆菌为主要优势菌, 也是有机酸以及多种风味物质的重要生物来源, 乳酸杆菌和醋酸杆菌代谢产生的乳酸、乙酸、柠檬酸等有机酸积累的副产物参与乙偶姻的代谢通路, 提高了体系中双乙酰和乙偶姻的含量^[12-13]。山西老陈醋等传统食醋采用固态发酵工艺, 发酵体系含水量低, 导致不同位置的醋醅温度、酸度等发酵条件不同, 如上层醋醅与空气接触更为密切, 含氧量较高, 而下层醋醅则趋于无氧环

境, 并且由于重力作用, 下层醋醅的含水量也高于上层醋醅。有研究表明, 温度和溶氧量是影响微生物多样性和代谢活性差异的关键因素, 醋酸菌和乳酸菌的丰度和代谢活性是产生不同发酵曲线的主要原因^[14]。目前已有研究大多针对传统食醋固态发酵过程某一取样点的风味物质生成规律及其与微生物的相关性, 但缺乏对传统食醋固态发酵体系全面的解析, 特别是针对传统食醋固态发酵的时空异质特性系统解析其微生物群落演替和风味物质生成的研究不足。

本实验以山西老陈醋传统工艺固态发酵体系为研究对象, 对其发酵不同阶段不同位置的理化指标和微生物群落进行分析, 阐明其空间异质特性, 进一步解析在此条件下主要风味物质的生成规律, 有助于全面阐明传统食醋固态发酵机理, 也为提升山西老陈醋酿造技术水平提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

醋醅样品取自山西紫林醋业股份有限公司, 每个时间段(0、3、5、7、9 d)随机取醋醅3个作为平行样。除0 d的外, 每个发酵时间段分别从陶瓷缸的上层、中层和下层进行无菌取样。上层、下层、中层分别从离缸口12、24、36 cm处采用五点取样法取样混合, 根据发酵时间上层分别标记为S3、S5、S7、S9, 中层分别标记为Z3、Z5、Z7、Z9, 下层分别标记为X3、X5、X7、X9; 发酵0 d的醋醅为刚开始拌匀之后的醋醅, 即上、中、下层即为同一个样, 标记为S0。样品用无菌袋密封后, 放置于-80℃贮存, 待用。

硫酸铜、亚甲基蓝(均为分析纯) 天津欧博凯化工有限公司; 亚铁氰化钾、酒石酸钾钠、氢氧化钠、亚硝酸钠、甲醛(均为分析纯) 天津市科密欧化学

试剂有限公司；正构烷烃标准品（ $C_8 \sim C_{40}$ ）、二辛醇（均为色谱纯） Sigma-Aldrich（上海）有限公司；Soil DNA Kit 美国Bio-Tek公司；超纯水由Milli-Q系统制备，电阻率 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 。

1.2 仪器与设备

TARTER 3100实验室pH计、AR124CN电子天平 上海奥豪斯仪器有限公司；202型电热恒温干燥箱 天津泰斯特仪器有限公司；HH-4型水浴锅 常州荣华仪器制造有限公司；T3202双光束紫外-可见分光光度计 上海科佑仪器仪表有限公司；SLI Plus离心机 美国Thermo Fisher Scientific公司；Alkomat酒精检测仪 福林斯（徐州）贸易有限公司；7000D型气相色谱-质谱（gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS）联用仪 美国安捷伦公司。

1.3 方法

1.3.1 理化特性分析

总酸、还原糖、氨基酸态氮参照GB/T 19777—2013《地理标志产品 山西老陈醋》中的方法进行测定^[15]。乙醇体积分数的测定采用Alkomat酒精检测仪；准确称取10 g醋醅样品于专门样品盘中，烘干至恒质量进行测定。

1.3.2 顶空固相微萃取（headspace-solid phase microextraction, HS-SPME）-GC-MS测定挥发性化合物

1.3.2.1 样品预处理

准确称取醋醅样品2.00 g至20 mL GC-MS顶空瓶中，加入1.5 g NaCl及质量浓度为0.819 g/L的2-辛醇内标液1 μL ，100 Hz超声处理5 min。

1.3.2.2 GC-MS条件

根据文献[16]的方法并进行修改。升温程序：40 $^{\circ}\text{C}$ 保持2 min，以3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至170 $^{\circ}\text{C}$ 保持2 min，再以5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至230 $^{\circ}\text{C}$ ，保持3 min；载气（He）流速1.0 mL/min，分流比为10:1，扫描质量范围 m/z 50~450，其他一致。

1.3.2.3 定性定量

通过NIST 20.0谱库进行定性分析，采用内标峰面积归一化法计算各种成分的含量。

1.3.3 微生物多样性分析

根据文献[6]的方法进行，采用Soil DNA Kit提取各样本的总DNA，并对提取的DNA进行检测和定量，调整DNA溶液浓度，并用1%的琼脂糖凝胶电泳检测DNA的质量。依据Illumina TruSeq DNA文库制备流程构建测序文库。鸟枪法宏基因组测序由上海派森诺生物科技股份有限公司完成，测序平台为Illumina NovaSeq，测序策略为双端150 bp。

1.4 数据处理

微生物群落结构分析采用上海派森诺生信云平台进行物种丰富度和差异性分析；所有实验均进行3次，结果

以 $\bar{x} \pm s$ 表示。挥发性风味物质利用Origin 2021作图，利用SPSS Statistics 27对数据进行方差分析；相关性分析分别选取相对丰度排名前13的微生物和含量排名前20的风味物质，采用Origin 2021软件绘制图。

2 结果与分析

2.1 醋酸发酵过程中不同位置醋醅相关指标差异性分析

理化指标在一定程度上能较好反映醋醅的质量及醋酸发酵的进程，乙醇体积分数和酸度的变化目前是评价醋醅发酵结束的关键指标^[17]。如表1所示，同一发酵阶段不同空间位置水分含量随着醋醅空间位置从上到下逐步升高，而温度与其变化相反，且均具有显著差异（ $P < 0.05$ ），同时总酸在整个发酵过程中具有显著差异（ $P < 0.05$ ），而乙醇体积分数在整个发酵过程中均无显著变化。氨基酸态氮含量随着发酵时间的延长而升高，微生物的发酵作用产生了大量的含氮类风味物质，氨基酸态氮对醋醅微生物环境的维持及醋品质的提升有非常重要的作用。由此可见，不同位置醋醅中理化指标存在较大差异。对于同一位置不同发酵阶段的醋醅，随着发酵时间的延长，由于重力原因上层和中层水分呈下降趋势，而下层水分呈先下降后上升趋势，这是由于醋醅含水量一定程度上会影响该体系微生物生长代谢。乙醇体积分数与总酸的变化趋势相反，随着发酵时间的延长，总酸呈先增加后趋于平缓的趋势，乙醇体积分数呈先增加后降低的趋势。

表1 醋酸发酵过程中不同位置醋醅理化特性

Table 1 Physicochemical characteristics of *Cupei* at different spatial positions during the fermentation process

样品	水分 质量分数/%	醋温/ $^{\circ}\text{C}$	总酸质量浓度/ (g/100 mL)	乙醇体积 分数/%	还原糖质量浓度/ (g/100 mL)	氨基酸态氮质量 浓度/(g/100 mL)
S0	66.12 \pm 0.89	27.25 \pm 0.55	1.32 \pm 0.12	3.80 \pm 0.05	1.9 \pm 0.02	0.12 \pm 0.01
S3	68.23 \pm 0.49 ^a	45.53 \pm 0.61 ^a	2.34 \pm 0.07 ^a	1.06 \pm 0.05 ^a	1.57 \pm 0.04 ^a	0.21 \pm 0.01 ^a
Z3	70.63 \pm 1.41 ^b	42.23 \pm 0.35 ^b	2.53 \pm 0.11 ^b	1.03 \pm 0.02 ^a	2.31 \pm 0.04 ^a	0.22 \pm 0.03 ^a
X3	73.0 \pm 1.32 ^c	40.47 \pm 0.90 ^c	2.7 \pm 0.05 ^c	1.16 \pm 0.02 ^a	1.69 \pm 0.06 ^a	0.24 \pm 0.01 ^a
S5	66.4 \pm 1.44 ^a	47.2 \pm 0.7 ^a	3.18 \pm 0.44 ^a	1.60 \pm 0.14 ^a	1.13 \pm 0.20 ^a	0.26 \pm 0.02 ^a
Z5	70.14 \pm 1.36 ^b	42.33 \pm 1.2 ^b	3.54 \pm 0.39 ^b	1.73 \pm 0.07 ^a	0.97 \pm 0.08 ^a	0.31 \pm 0.01 ^a
X5	71.03 \pm 1.10 ^a	39 \pm 0.5 ^a	3.73 \pm 0.18 ^a	1.73 \pm 0.07 ^a	0.97 \pm 0.12 ^a	0.28 \pm 0.03 ^{ab}
S7	65.53 \pm 0.45 ^c	46.97 \pm 0.47 ^a	3.68 \pm 0.14 ^a	0.72 \pm 0.15 ^a	0.76 \pm 0.01 ^a	0.25 \pm 0.01 ^b
Z7	69.5 \pm 0.95 ^b	42.27 \pm 0.55 ^b	3.85 \pm 0.10 ^b	0.88 \pm 0.22 ^a	0.89 \pm 0.03 ^a	0.26 \pm 0.006 ^b
X7	73.03 \pm 1.59 ^a	39.7 \pm 0.26 ^c	4.05 \pm 0.37 ^a	0.94 \pm 0.16 ^a	0.89 \pm 0.02 ^a	0.27 \pm 0.006 ^a
S9	64.4 \pm 1.56 ^c	46.00 \pm 1.00 ^a	4.49 \pm 0.04 ^a	0.38 \pm 0.13 ^a	0.79 \pm 0.02 ^a	0.27 \pm 0.005 ^a
Z9	68.6 \pm 1.66 ^b	41.6 \pm 0.17 ^b	4.63 \pm 0.11 ^b	0.46 \pm 0.19 ^a	0.78 \pm 0.03 ^a	0.29 \pm 0.03 ^a
X9	73.63 \pm 0.93 ^a	37.9 \pm 0.21 ^c	4.76 \pm 0.10 ^a	0.50 \pm 0.22 ^a	0.73 \pm 0.02 ^a	0.30 \pm 0.02 ^a

注：S0样品不进行差异性分析；相同发酵时间条件下同列字母不同表示差异显著（ $P < 0.05$ ）。

综上分析说明醋酸发酵不同阶段和空间位置均对醋醅的品质有显著影响，进一步指导日常翻醋工作的频率及时间，维持醋醅发酵过程中微生物的动态平衡。

2.2 基于属水平不同空间层次微生物群落结构分析

2.2.1 基于属水平不同空间层次微生物群落丰富度分析

由图1可知, 0、3、5、7、9 d不同阶段及空间位置的醋醅样品中选取相对丰度排名前20的微生物进行分析。整个醋酸发酵阶段及不同位置醋酸发杆菌属(*Acetobacter*)、乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)均为优势微生物。同一阶段不同空间位置乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)的丰度上层>中层>下层, 而醋酸菌的丰度呈不规则变化, 5、7 d时上、中、下层乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)均占绝对优势, 随着发酵时间的延长其相对丰度降低, 分别为S5 (75.62%)、Z5 (74.23%)、X5 (73.26%)、S7 (62.62%)、Z7 (58.23%)、X7 (55.26%), 与胡小龙等^[18]报道的结果相同。发酵结束时醋酸杆菌属(*Acetobacter*)占绝对优势, 分别为S9 (50.13%)、Z9 (64.12%)、X9 (55.24%)。克雷伯菌属(*Klebsiella*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、泛菌属(*Pantoea*)等菌属与醋醅发酵密切相关, 其中, 克雷伯菌属(*Klebsiella*)对总酸的贡献最大^[19-20], 对醋醅的风味贡献较大。肠杆菌属能够利用糖酵解和戊糖磷酸途径对糖进行降解, 代谢产生短链脂肪酸和风味物质^[21], 同时利用糖酵解和戊糖磷酸途径对糖进行降解, 随着发酵进行肠杆菌呈先上升后下降的趋势。葡萄球菌属(*Staphylococcus*)能将碳水化合物代谢为有机酸^[22], 发酵第3天时相对丰度达到最大 (S3: 38.86%)。

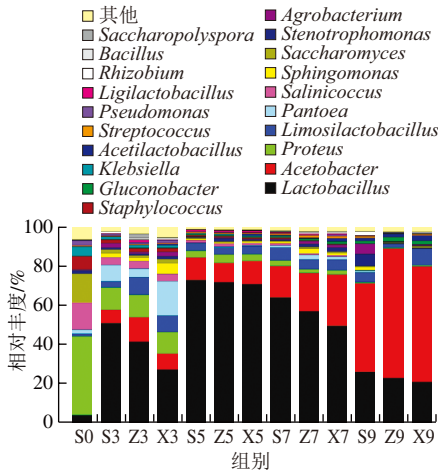


图1 不同空间位置醋酸发酵过程中微生物属水平相对丰度
Fig. 1 Relative abundance of microbial genera at different spatial positions during the fermentation process

从整个发酵周期来看, 醋酸发酵第3天菌群微生物种类最多, 高于其他时期, 说明食醋固态酿造过程中微生物的处在动态演替, 这也导致了传统食醋复杂的风味物质的形成。本研究发现, 山西老陈醋发酵过程醋醅微生物组成存在显著的时空异质性, 从而对发酵过程和产品风味产生不同程度的影响。

2.2.2 不同空间位置醋酸发酵过程中差异微生物分析

为进一步分析不同空间位置醋醅微生物的差异, 采用线性判别分析效应量 (linear discriminant analysis effect size, LEfSe) 并输出线性判别分析 (linear discriminant analysis, LDA) 柱状图分析不同位置醋醅的组间差异微生物。如图2所示, 在属水平全部组别共检测出21种 (LDA>2) 差异微生物, 其中S中的差异物种为*Proteus_mirabilis*; Z中的差异物种为*Lactobacillus_acetotolerans*, 而X中未发现差异物质, 但在属平面发现X中有多种差异属, 由此可见, 不同空间的醋醅存在代谢差异性物种, 在醋酸发酵过程中产生代谢物也有差异, 从而影响发酵进程以及产品的风味品质。

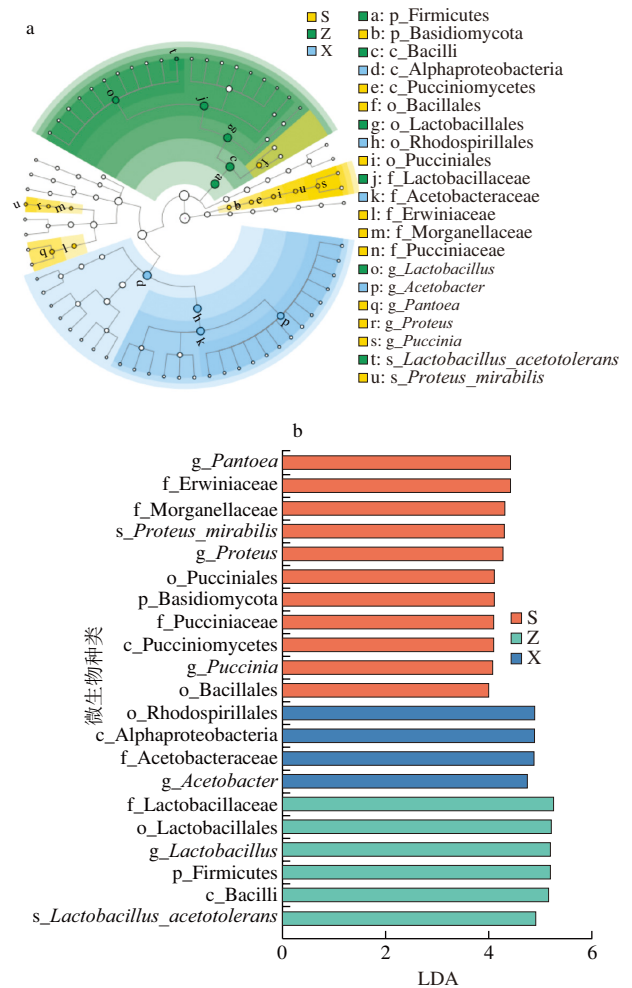


图2 微生物LEfSe多级物种层级树图 (a) 和LDA柱状图 (b)
Fig. 2 LEfSe multi-level species hierarchical tree (a) and LDA bar chart (b) of bacterial communities in Cupei at different spatial positions

2.3 醋酸发酵过程中不同位置醋醅挥发性化合物组成

采用HS-SPME-GC-MS法对整个发酵过程中不同位置醋醅挥发性风味成分进行测定, 共检出93种挥发性风味化合物, 包括酯类43种、醇类16种、酸类10种、醛类7种、酮类5种、酚类5种和其他化合物7种。如图3所示, 从空间层次上看, 同一时间不同空间检测到的挥发

性风味物质含量之和表现为上层>中层>下层,这可能由于上层醋醅密度低且与空气接触面积较多,微生物以有氧代谢为主;中层醋醅由于重力作用含有更高的水分,微生物间相互作用更加紧密,从而影响发酵^[23];下层有大量醋汁浸润,氧气含量低,更适合微生物厌氧发酵。上述差异使各空间层次微生物组成不同,从而导致发酵过程存在差异。对于同一位置不同发酵阶段而言,挥发性物质的总含量随着发酵时间的延长呈先上升后下降的趋势,第3天挥发性物质均达到最大值,上层、中层、下层含量分别为236.79、232.36、223.39 $\mu\text{g}/\text{kg}$,这是因为在酿造工艺中发酵前期微生物代谢发酵底物充足,各种微生物快速生长、繁殖、代谢,产生大量的风味物质^[24]。

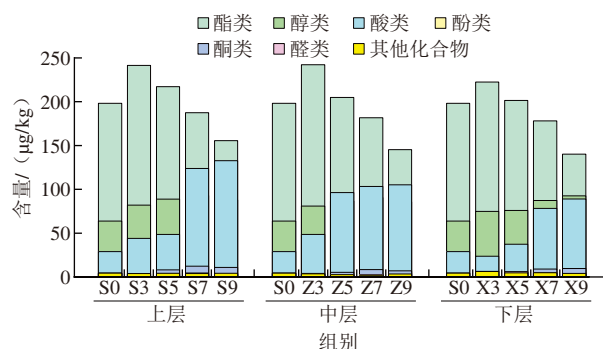
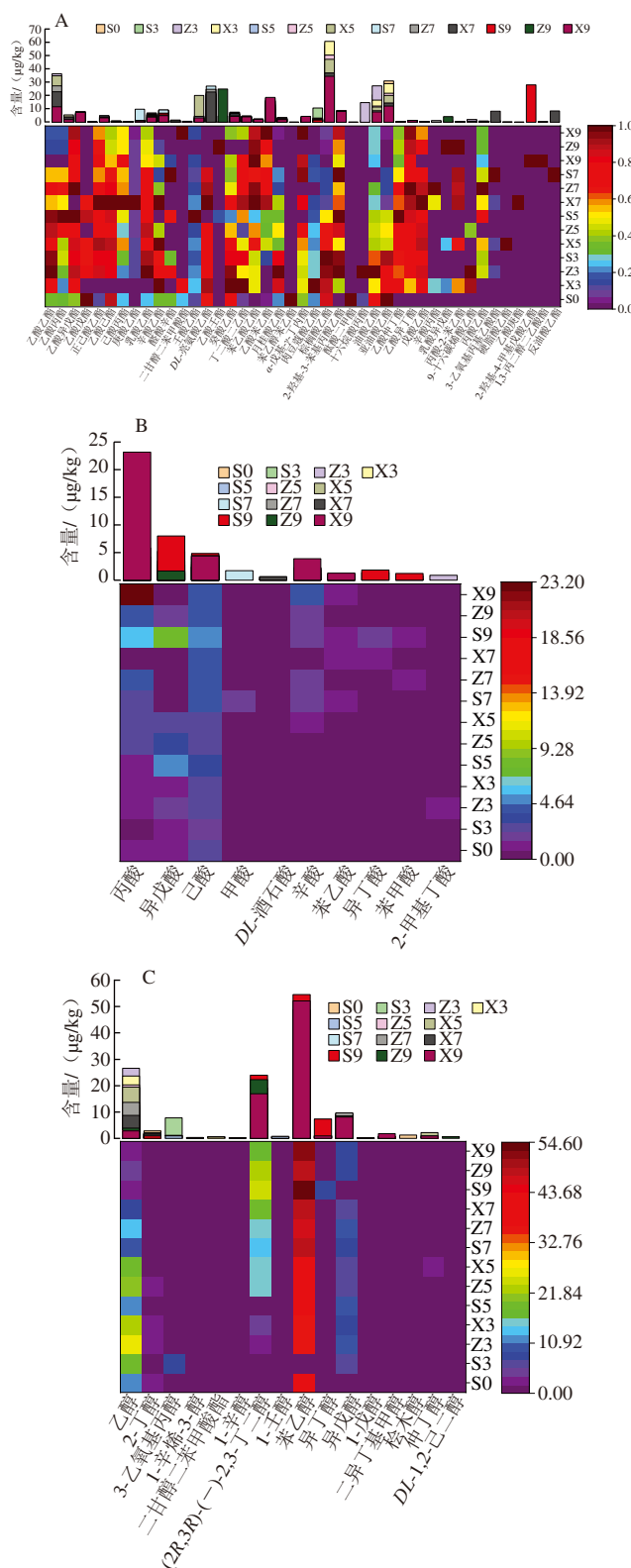


图3 醋酸发酵过程不同空间各类挥发性物质的变化

Fig. 3 Changes of volatile substances in *Cupei* at different spatial positions during the fermentation process

由图4可知,醋酸发酵过程中主要挥发性物质均为酯类,其次为酸类、醇类、醛类、酮类(图4B中的酸类除去乙酸)。其中,发酵前期酯类占比最高,发酵后期酸类物质占比最高,其次为酯类和醇类。酯类主要起呈香作用,是醋酸发酵过程中重要的风味指标,是山西老陈醋果香、花香和甜味等风味的主要来源^[25-26],是形成醋醅香气浓郁的主要因素^[27],一般以乙酸酯、乳酸酯类较多,主要在醋酸菌、酵母菌作用下,通过酯化反应将醋醅中的醇类物质和酸类物质转化为种类多样的酯类物质。山西老陈醋发酵过程主要酯类物质为乙酸乙酯、棕榈酸乙酯、DL-亮氨酸乙酯、油酸乙酯、亚油酸乙酯等,这些酯类物质随着发酵的进行逐渐降低,且含量表现为上层<中层<下层。酸味是食醋主要的风味特征,乙酸是食醋中含量最高的酸,构成食醋愉快酸香气味的主体骨架。其他酸类物质含量较低,如微量的己酸有甜酪味和果香味。酸类物质与丰富各异的组分相互作用、相互调节,构成食醋独特的风味^[28]。至发酵结束时,不同空间的挥发性酸类物质含量表现为上层>中层>下层,主要以乙酸、己酸、异戊酸为主体酸。发酵过程中特征醇类主要为乙醇、苯乙醇、丁二醇异戊醇,其中乙醇随着发酵时间降低,而苯乙醇、丁二醇、异戊醇含量升高,其中苯乙醇具有玫瑰花香^[29],乙醇主要来源于上一阶段的乙醇发酵,醋酸发酵过程被醋酸菌氧化为乙酸,同时乙

醇能与乙酸生成乙酸乙酯;异戊醇碳链相对较短的醇类物质在发酵后期产生。酮类、醛类物质在醋醅发酵过程中较其他风味成分低,但对醋醅的香气成分有烘托作用,醇、酮、酸、酯等多样化的代谢物构成了食醋丰富、多层次的风味和口感,可使醋醅风味更协调^[27]。



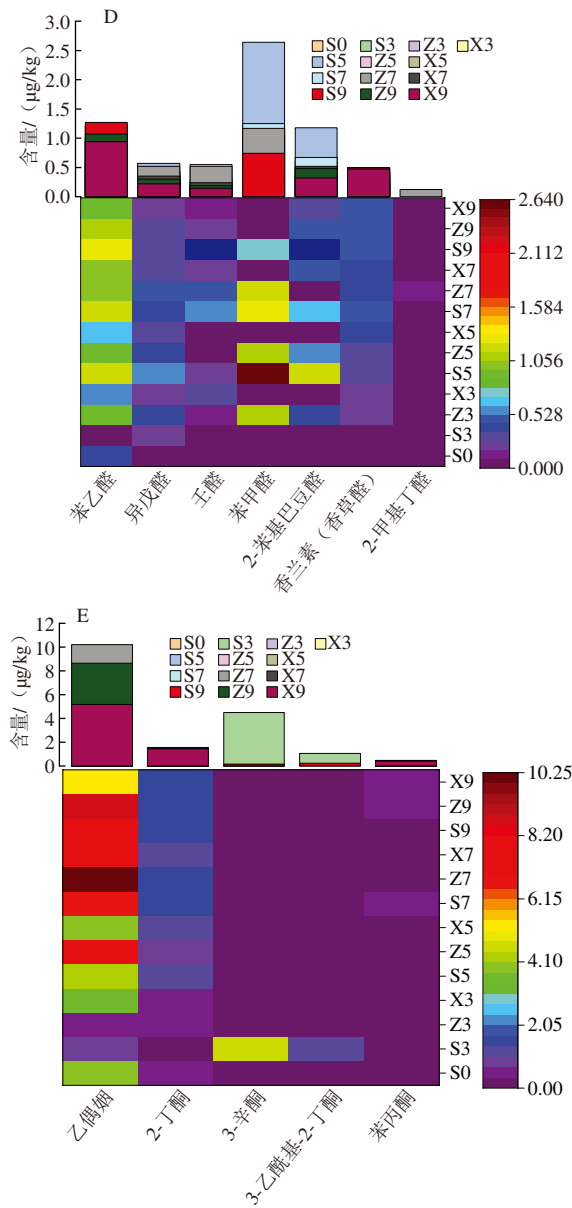


图4 不同空间醋醅中酯类(A)、酸类(B)、醇类(C)、醛类(D)、酮类(E)挥发性物质含量分析

Fig. 4 Contents of esters (A), acids (B), alcohols (C), aldehydes (D), and ketones (E) in Cupei at different spatial positions

综上所述,通过对比可以发现山西老陈醋醋酸发酵过程挥发性物质的含量存在时空异质性,为山西老陈特征风味的形成提供了物质基础。

2.4 微生物组成与理化因子及风味物质化合物相关性

为探究醋醅微生物对其理化指标及风味物质的关系,本研究对醋醅中优势菌属与理化特性及挥发性风味进行解析。图5展示了醋醅不同空间微生物属水平中相对丰度前13的微生物与醋醅理化指标、挥发性风味物质之间的关系,优势菌属与其各品质之间存在复杂的相关关系。结果表明下层水分与*Proteus*、*Salinicoccus*、*Saccharomyces*、*Staphylococcus*、*Klebsiella*显著负相关

($P<0.05$),上、中层醋温均与*Proteus*、*Salinicoccus*、*Staphylococcus*显著正相关($P<0.05$),下层醋温与其负相关($P<0.05$),而上、中、下层乙醇均与其显著负相关($P<0.05$)。上、中、下层总酸均与*Proteus*、*Salinicoccus*、*Staphylococcus*、*Klebsiella*显著负相关($P<0.05$),上、下层的还原糖与*Klebsiella*显著正相关($P<0.05$);上、中、下层氨基酸态氮均与*Proteus*、*Salinicoccus*、*Saccharomyces*、*Staphylococcus*、*Klebsiella*显著负相关($P<0.05$)。这一结果说明*Proteus*、*Salinicoccus*、*Saccharomyces*、*Staphylococcus*、*Klebsiella*与醋醅发酵过程的品质密切相关,从而对产品风味产生影响。对醋酸发酵过程中相对丰度排名前13的微生物属和相对含量排名前20的主要挥发性风味化合物进行相关性分析。如图5b所示,结合上述不同位置理化指标及微生物的相关性结果分析,发现上层中*Proteus*、*Salinicoccus*、*Staphylococcus*、*Klebsiella*均与亚油酸乙酯、油酸乙酯等酯类物质呈显著正相关($P<0.05$),在中、下层醋醅与己酸乙酯、乙酸异戊酯等酯类物质显著负相关($P<0.05$)。可见,微生物对醋醅品质及风味物质形成有重要作用。

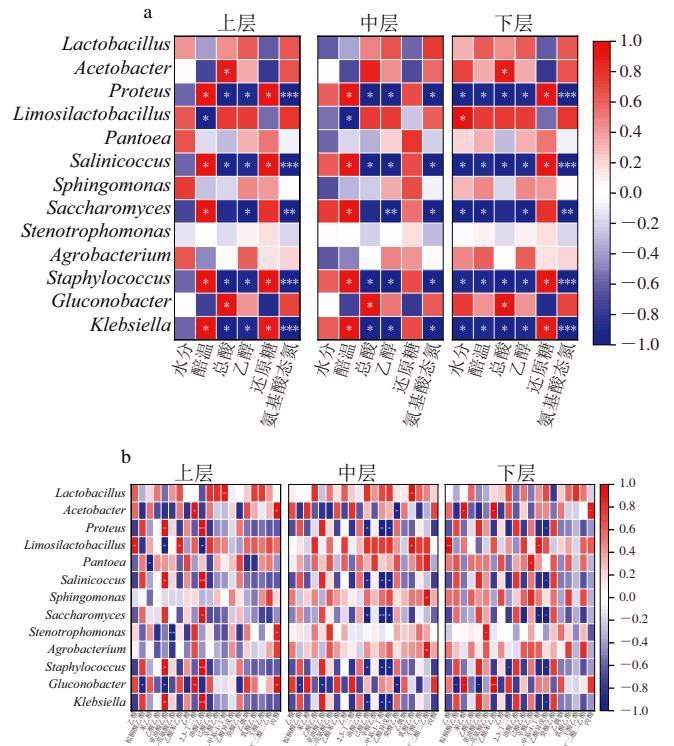


图5 不同空间微生物属与理化指标(a)和挥发性化合物(b)之间相关性分析

Fig. 5 Correlation analysis of dominant bacterial genera and physicochemical indicators (a) and volatile flavor compounds (b) in Cupei at different spatial positions

3 结 论

本研究分别对山西老陈醋传统工艺固态发酵过程不同时空理化特征和微生物群落组成进行了分析,并进一步分析了其对风味物质形成的影响。结果表明:1)山西老陈醋传统工艺固态发酵体系的水分、温度均具有显著的时空异质性,其中总酸是主要的差异性理化指标。2)从空间层次上看,同一发酵时间不同空间检测到的挥发性风味物质含量之和为上层>中层>下层;对于同一空间层次而言,挥发性物质的总含量随着发酵时间的延长呈先上升后下降的趋势,第3天挥发性物质均达到最大值;3)醋酸发酵过程中乳酸杆菌属、醋酸杆菌属、葡萄球菌属为优势发酵菌属;4)相关性结果表明,从空间理化指标分析,下层水分与*Proteus*、*Salinicoccus*、*Saccharomyces*、*Staphylococcus*、*Klebsiella*显著负相关($P<0.05$),上、中、层醋温均与*Proteus*、*Salinicoccus*、*Staphylococcus*显著正相关($P<0.05$),下层与其负相关($P<0.05$),上、中、下层乙醇均与其显著负相关($P<0.05$),上、中、下层总酸均与*Proteus*、*Salinicoccus*、*Staphylococcus*、*Klebsiella*显著负相关($P<0.05$);5)从空间风味分析,上层中*Proteus*、*Salinicoccus*、*Saccharomyces*、*Staphylococcus*、*Klebsiella*均与亚油酸乙酯等酯类物质呈显著正相关($P<0.05$),中层、下层醋醅与己酸乙酯、乙酸异戊酯等酯类物质显著负相关($P<0.05$)。

本研究丰富了山西老陈醋固态发酵过程不同维度微生物组成及其对发酵过程的影响,为发酵过程的质量监控提供了一定的理论依据,有助于全面阐明山西老陈醋酿造机理。

参考文献:

- [1] HO C W, LAZIMA M, FAZRY S, et al. Varieties, production, composition and health benefits of vinegars: a review[J]. Food Chemistry, 2017, 221: 1621-1630. DOI:10.1016/j.foodchem.2016.10.128.
- [2] NIE Z Q, ZHENG Y, XIE S K, et al. Unraveling the correlation between microbiota succession and metabolite changes in traditional Shanxi aged vinegar[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 9240. DOI:10.1038/s41598-017-09850-6.
- [3] HOU Z X, ZHANG J H, DANG L, et al. Correlation analysis of microbial community changes and physicochemical characteristics in aged vinegar brewing[J]. Foods, 2023, 12(18): 3430. DOI:10.3390/foods12183430.
- [4] LU Z M, WANG Z M, ZHANG X J, et al. Microbial ecology of cereal vinegar fermentation: insights for driving the ecosystem function[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2018, 49: 88-93. DOI:10.1016/j.copbio.2017.07.006.
- [5] ZHENG Y, MOU J, NIU J W, et al. Succession sequence of lactic acid bacteria driven by environmental factors and substrates throughout the brewing process of Shanxi aged vinegar[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(6): 2645-2658. DOI:10.1007/s00253-017-8733-3.
- [6] 吴艳芳. 山西老陈醋发酵过程微生物相互作用及有机酸代谢调控机制解析[D]. 天津: 天津科技大学, 2021. DOI:10.27359/d.cnki.gtqgu.2021.000011.
- [7] WANG Z M, LU Z M, SHI J S, et al. Exploring flavour-producing core microbiota in multispecies solid-state fermentation of traditional Chinese vinegar[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 26818. DOI:10.1038/srep26818.
- [8] 牟俊. 山西老陈醋醋酸发酵阶段乳酸菌和醋酸菌相互作用研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2018: 26-33.
- [9] NIE Z Q, ZHENG Y, DU H F, et al. Dynamics and diversity of microbial community succession in traditional fermentation of Shanxi aged vinegar[J]. Food Microbiology, 2015, 47: 62-68. DOI:10.1016/j.fm.2014.11.006.
- [10] ZHU Y P, ZHANG F F, ZHANG C N, et al. Dynamic microbial succession of Shanxi aged vinegar and its correlation with flavor metabolites during different stages of acetic acid fermentation[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 8612. DOI:10.1038/s41598-018-26787-6.
- [11] ZHANG Y D, XU J G, JIANG Y L, et al. Microbial characteristics and metabolite profiles of high-temperature *Daqu* in different maturation stages[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2022, 38(12): 234. DOI:10.1007/s11274-022-03428-9.
- [12] WU L H, LU Z M, ZHANG X J, et al. Metagenomics reveals flavour metabolic network of cereal vinegar microbiota[J]. Food Microbiology, 2017, 62: 23-31. DOI:10.1016/j.fm.2016.09.010.
- [13] PEYER L C, ZANNINI E, ARENDT E K. Lactic acid bacteria as sensory biomodulators for fermented cereal-based beverages[J]. Trends in Food Science & Technology, 2016, 54: 17-25. DOI:10.1016/j.tifs.2016.05.009.
- [14] ZHANG Q, FU C X, ZHAO C M, 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: 109868. DOI:10.1016/j.lwt.2020.109868.
- [15] 国家质量监督检验检疫总局, 国家标准化管理委员会. 地理标志产品山西老陈醋: GB/T 19777—2013[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.
- [16] ZHANG X J, MENG L J, LU Z M, et al. Identification of age-markers based on profiling of Baijiu volatiles over a two-year maturation period: case study of Lu-flavor Baijiu[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 141: 110913. DOI:10.1016/j.lwt.2021.110913.
- [17] 申瑾, 夏瑶瑶, 梁楷, 等. 老陈醋醋酸发酵不同翻醅方式醋醅特性的动态变化分析[J]. 中国酿造, 2023, 42(11): 134-139. DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2023.11.021.
- [18] 胡晓龙, 王康丽, 余苗, 等. 基于高通量测序的浓香型窖泥原核微生物群落的窖池空间分布[J]. 中国酿造, 2020, 39(6): 167-172. DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2020.06.032.
- [19] 于松峰, 郑宇, 杨帅, 等. 传统豆瓣辣酱发酵过程细菌群落演替与发酵过程的对应关系[J]. 中国调味品, 2017, 42(4): 53-58. DOI:10.3969/j.issn.1000-9973.2017.04.012.
- [20] XU S S, ZHANG M Z, XU B Y, et al. Microbial communities and flavor formation in the fermentation of Chinese strong-flavor Baijiu produced from old and new Zaopei[J]. Food Research International, 2022, 156: 111162. DOI:10.1016/j.foodres.2022.111162.
- [21] CHEN M J, QIN Y Y, DENG F M, et al. Illumina MiSeq sequencing reveals microbial community succession in salted peppers with different salinity during preservation[J]. Food Research International, 2021, 143: 110234. DOI:10.1016/j.foodres.2021.110234.
- [22] 冯美琴, 张杰, 孙健. 模仿葡萄球菌接种对发酵香肠品质及氧化稳定性的影响[J]. 食品科学, 2022, 43(4): 105-112. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20210805-062.
- [23] 周袁璐, 师苑, 陆跃乐, 等. 传统发酵过程微生物互作研究进展[J]. 中国食品学报, 2021, 21(11): 349-358. DOI:10.16429/j.1009-7848.2021.11.038.
- [24] 王宗敏. 镇江香醋醋酸发酵阶段菌群结构变化与风味物质组成之间的相关性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2016.
- [25] LI Y, WANG A X, DANG B, et al. Deeply analyzing dynamic fermentation of highland barley vinegar: main physicochemical factors, key flavors, and dominate microorganisms[J]. Food Research International, 2024, 177: 113919. DOI:10.1016/j.foodres.2023.113919.
- [26] LEE K E, LEE S M, CHOI Y H, et al. Comparative volatile profiles in soy sauce according to inoculated microorganisms[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2013, 77(11): 2192-2200. DOI:10.1271/bbb.130362.
- [27] XU Y Q, ZHAO J R, LIU X, et al. Flavor mystery of Chinese traditional fermented Baijiu: the great contribution of ester compounds[J]. Food Chemistry, 2022, 369: 130920. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.130920.
- [28] ZHOU Z L, JIAN D Z, GONG M, et al. Characterization of the key aroma compounds in aged Zhenjiang aromatic vinegar by gas chromatography-olfactometry-mass spectrometry, quantitative measurements, aroma recombination and omission experiments[J]. Food Research International, 2020, 136: 109434. DOI:10.1016/j.foodres.2020.109434.
- [29] DU J Y, LI Y M, XU J C, et al. Characterization of key odorants in Langyatai Baijiu with Jian flavour by sensory-directed analysis[J]. Food Chemistry, 2021, 352: 129363. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.129363.