适合青梅醋酿造的醋酸菌选育

姬玉丹[1,2,3]，吴殿辉[1,2,3]，杨 帆[4]，宁鹏飞[4]，胡 燕[5]，陆 健[*1,2,3]
（1. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心，江苏 无锡 214122；3. 江南大学 江苏省生物活性制品加工工程技术研究中心，江苏 无锡 214122；4. 溜溜果园集团股份有限公司，安徽 芜湖 241000；5. 安徽溜溜梅研究院有限公司，安徽 芜湖 241000）

摘要：以腐烂的青梅为筛菌对象，采用平板分离、产酸定性和青梅果醋发酵实验筛选出一株产酸能力强的热带醋酸杆菌（*Acetobacter tropicalis*）J-27。进一步采用常压室温等离子体（atmosphericand room temperature plasma，ARTP）诱变技术和高通量筛选（high-throughput screening，HTS）相结合的方法，获得了1株具有高耐酸性且酿造后具有典型青梅醋风味的醋酸菌J-2736。用该菌株进行青梅醋发酵实验，发酵结束时总酸质量浓度为62.47 g/L，且菌株对乙醇、乙酸耐受性良好，可以耐受体积分数10%的乙醇和40 g/L的乙酸。对青梅醋中的风味物质进行分析，其中醇类物质、酯类物质和羧酸类物质质量分数较高，分别占挥发性风味物质的11.7%、36.0%和45.9%。因此选育的热带醋酸杆菌J-2736能够较好适应青梅的高酸特性，具有工业应用的可行性。

关键词：青梅醋；热带醋酸杆菌；常压室温等离子体诱变；乙酸耐受性；乙醇耐受性
中图分类号：TS 255.47　**文章编号：**1673-1689(2024)05-0081-10　**DOI：**10.12441/spyswjs.20220128001

Selection and Breeding of an Acetic Bacteria Strain for Greengage Vinegar Fermentation

JI Yudan[1,2,3]，*WU Dianhui*[1,2,3]，*YANG Fan*[4]，*NING Pengfei*[4]，*HU Yan*[5]，*LU Jian*[*1,2,3]
（1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. National Engineering Research Center of Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Jiangsu Provincial Research Center for Bioactive Product Processing Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;4. Liuliu Orchard Group Co. Ltd, Wuhu 241000, China; 5. Anhui Liuliu Plum Research Institute Co. Ltd., Wuhu 241000, China）

Abstract: In this study, a strain with strong acid production capacity, *Acetobacter tropicalis* J-27, was screened from decayed greengage fruits by plate separation, acid production test, and greengage vinegar fermentation experiments. Further, an *A. aceti* strain J-2736 with high acid tolerance and typical flavor of greengage vinegar was obtained by the screening method of atmospheric and room temperature plasma (ARTP) mutagenesis combined with high-throughput screening (HTS). The fermentation experiment of greengage vinegar using this strain showed a total acid content of 62.47

收稿日期：2022-01-28　**修回日期：**2022-05-09
基金项目：安徽省科技重大专项项目(201903a06020030)；高等学校学科创新引智计划项目(111-206)；江苏高校优势学科建设工程项目。
***通信作者：**陆 健(1968—)，男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事酿酒工程与食品生物技术研究。E-mail：jlu@jiangnan.edu.cn

g/L at the end of fermentation. The strain showed good tolerance to ethanol and acetic acid, which could tolerate 10% ethanol and 40 g/L acetic acid, respectively. The analysis of flavor compounds in greengage vinegar revealed higher contents of alcohols, esters, and carboxylic acids, accounting for 11.7%, 36.0%, and 45.9% of the volatile flavor compounds, respectively. The obtained *A. aceti* strain J-2736 can adapt to the high acid characteristics of greengage fruits, indicating its potential feasibility for industrial application.

Keywords: greengage vinegar, *Acetobacter tropicalis*, atmospheric and room temperature plasma, acetic acid tolerance, ethanol tolerance

果醋按照生产方式分为浸泡型果醋和发酵型果醋。浸泡型果醋是将鲜果浸泡在一定浓度的粮醋溶液中,经过一段时间,待鲜果的果香、果酸及部分营养成分进入粮醋内再加以调配即成果醋[1]。发酵型果醋是利用鲜果或果汁在酵母的作用下发酵成含有一定乙醇的果酒,然后在醋酸菌作用下进一步发酵而成[2]。由于生产方式不同,浸泡型果醋和发酵型果醋具有不同的特点[3]。

目前青梅醋主要采用浸泡和勾兑的方法生产[4],而发酵型青梅醋的研究较少。由于青梅具有典型的高酸低糖特性,导致青梅醋发酵时 pH 偏低(2.6~2.9)[5],常用的醋酸发酵菌株(沪酿 1.01 和 AS1.41)不能适应青梅的特点,影响其生长和各种酶的活性,进而导致发酵时间长、乙醇转化率低、缺乏典型性等问题[6-7]。因此,选育专用于青梅醋生产的醋酸菌对青梅醋行业的发展具有重要的应用价值[8-10]。

与其他育种方法相比,ARTP 诱变具有突变频率高、成本低、操作简单、安全、无污染等特点,在微生物育种领域广泛应用[11]。例如吴晓英等通过 ARTP 诱变成功选育出一株巴氏醋杆菌(*Acetobacter pasteurianus*)T3-06,该诱变株在乙醇体积分数为 11%的发酵培养基中醋酸产量为(33.38±2.73) g/L,比初始菌株提高了 380.98%[12]。潘红菊等以巴氏醋杆菌(*A. pasteurianus*)NF-171 为研究对象,采用 ARTP 诱变技术进行随机突变,筛选出高产菌株 YNF-171.24,其在 31 ℃、初始乙醇体积分数 10%时产酸量达 79.2 g/L,比对照菌株 NF-171.60 的醋酸产量 48.75 g/L 提高了约 62.46%[13]。

作者以青梅鲜果为筛选菌来源,通过 ARTP 诱变和高通量筛选相结合的方法,以菌株生长量和乙醇转化率为指标,筛选对醋酸耐受性较好的优良菌株并应用于青梅醋的酿造,可以有效平衡果醋的风味物质,进而提高青梅醋的品质,以期为青梅醋的产业化提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

沪酿 1.01(*A. pasteurianus*)和 AS1.41(*A. pasteurianus*):上海保藏生物技术中心(SHBCC);青梅酒:作者所在实验室自酿(pH 为 2.71±0.04)。

基础培养基:葡萄糖 10 g/L,酵母提取物10 g/L,乙醇 30 mL/L,pH 自然。

分离培养基:葡萄糖 10 g/L,酵母提取物10 g/L,无水碳酸钙 20 g/L,琼脂粉 20 g/L,乙醇 30 mL/L。

产酸培养基:葡萄糖 10 g/L,酵母提取物10 g/L,乙酸 5 mL/L,乙醇 60 mL/L,pH 自然。

1.2 实验方法

1.2.1 醋酸菌的自然选育 取腐烂一周的青梅10 g 加到装有 100 mL 基础培养基的摇瓶中,30 ℃、220 r/min 摇床培养 3 d。获得的发酵液用无菌水梯度稀释至 10^{-7},选取 10^{-7}、10^{-6}、10^{-5} 共 3 个稀释梯度均匀涂布于含碳酸钙的分离培养基上,于 30 ℃培养箱倒置培养 72 h[14-15],观察筛选菌株在分离培养基上的菌落形态,通过革兰氏染色直观了解目的菌株的形态结构。将初筛后的菌株分别接种于基础培养基上,培养到对数期以体积分数 10%接种到乙醇体积分数 6%的青梅酒中,30 ℃、220 r/min 摇瓶发酵7 d,测定发酵液中总酸质量浓度,并计算乙醇转化率[16]。

1.2.2 醋酸菌的鉴定 按照赵会芳等的 16S rDNA 测序方法对菌株 J-27 进行同源性分析[17]。

1.2.3 筛选醋酸菌与商业醋酸菌青梅醋发酵性能比较 将培养到对数期的沪酿 1.01、AS1.41 和 J-27 种子液以体积分数 10%接入乙醇体积分数为 6%的青梅酒中,30 ℃、220 r/min 摇瓶发酵,每天测定总酸质量浓度,直至总酸质量浓度不再变化为止[18]。

1.2.4 常压室温等离子体(ARTP)诱变实验 热带醋酸杆菌 J-27 的 ARTP 诱变操作参照文献[11-13]，样品处理时间参考致死率曲线，计算公式为：

$$I=\frac{X-Y}{X},$$

式中：I 为致死率，%；X 为未经诱变处理的菌落数，个；Y 为诱变处理后的菌落数，个。

1.2.5 高通量筛选正突变菌株 利用自动挑菌仪挑选诱变后平板上长出的单菌落，接入装有 pH 3.0 醋酸菌基础培养基的 96 孔板内，在 220 r/min、30 ℃条件下培养 2 d，用酶标仪测定 OD_{600}。以未接种的培养基为对照，选取 OD_{600} 比出发菌株提高 20%以上的正向突变株，甘油管保藏，并进行复筛[5]。

为了验证突变菌株的发酵性能，将出发菌株和初筛的突变菌株进行发酵实验。将上述菌株分别接入产酸培养基中，在 220 r/min、30 ℃下发酵 7 d 后测定总酸质量浓度，筛选乙醇转化率高的醋酸菌。

1.2.6 突变菌株性能测定

1）乙醇耐受性测定 将热带醋酸杆菌 J-2736 培养到对数期后，按照体积分数 10%接种到乙醇体积分数为 6%、7%、8%、9%、10%、11%的基础培养基中，30 ℃、220 r/min 发酵，每隔 12 h 测定发酵液的 OD_{600} 值[19]。

2）乙酸耐受性测定 将热带醋酸杆菌 J-2736 培养到对数期，按照体积分数 10%将种子液分别接种到乙酸质量浓度为 0、10、20、30、40 g/L 的基础培养基中，30 ℃、220 r/min 发酵，每隔 12 h 测定发酵液的 OD_{600} 值。

1.2.7 突变菌与原始菌青梅醋发酵性能对比 将热带醋酸杆菌 J-2736 培养到对数期，按照体积分数 10%接入乙醇体积分数为 6%的青梅酒中，30 ℃、220 r/min 摇瓶发酵，每天测定总酸质量浓度，至总酸质量浓度不再变化为止[20]。总糖、乙醇的测定按照 GBT 15038—2006 葡萄酒、果酒通用分析方法。由 10 名经过专业培训的人员组成品评小组，参照杨颖等[21]制定的青梅醋感官评分标准。对青梅醋的色泽、澄清度、气味、口感进行评分，见表 1。

1.2.8 突变菌发酵青梅醋中主要风味成分分析 参照陈松蔚等甘蔗果醋中的风味物质分析方法进行分析[22]。

1.2.9 实验数据处理与统计分析 各组实验均做 3 次平行，采用均值±标准差表示实验结果，用 SPSS 26.0 对数据进行统计和差异性分析。

表 1 青梅醋感官评分标准

Table 1 Sensory evaluation standards of greenage vinegar

评分标准	色泽	澄清度	气味	口感
19~25 分	橙黄色，光亮透明	澄清，无浑浊，无沉淀	青梅果香与醋香协调统一，芳香怡人	酸味适宜，口感柔和，无辣喉感
9~18 分	黄色，偏暗	稍有浑浊，无沉淀	醋味或果香太过突出，气味不协调	酸味较适宜，略有辣喉感
0~8 分	褐色或其他，无光泽	浑浊严重，有沉淀	有酸败味或其他不愉快异味	酸味太弱或太突出，辣喉感明显

2 结果与分析

2.1 青梅醋酿造醋酸菌的筛选及鉴定

2.1.1 醋酸菌的分离及初筛 将富集培养之后的菌液分别稀释到 10^{-7}、10^{-6}、10^{-5}，涂布于碳酸钙分离培养基上，30 ℃培养 3 d，结果见图 1。菌落呈灰白色，表面光滑，触摸后有滑腻感，能氧化乙醇产生醋酸，产生的醋酸水解碳酸钙后在菌落周围形成明显的透明圈，革兰氏染色后在显微镜下的形态见图 2。菌株为革兰氏阴性菌，细胞为椭圆至杆状，单个、成对或成链存在。根据菌株溶解碳酸钙形成透明圈的大小，初步筛选出了 50 株菌，通过进一步产酸定性实验筛选出 10 株产醋酸的单菌落菌株，分别命名为J-3、J-9、J-11、J-12、J-19、J-23、J-27、J-30、J-35、J-41。

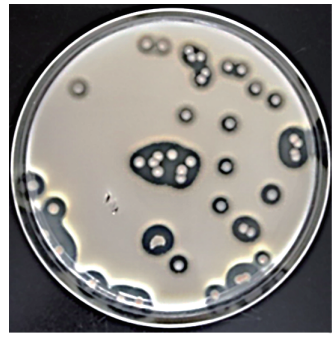


图 1 醋酸菌菌落形态

Fig. 1 Morphology of acetic bacteria

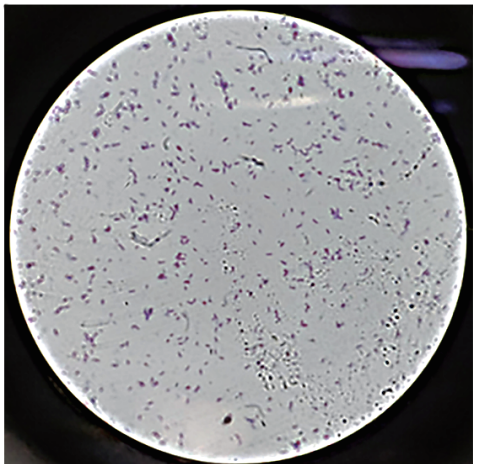


图 2　醋酸菌的菌体形态(×1 000)

Fig. 2　Colony morphology of acetic bacteria (×1 000)

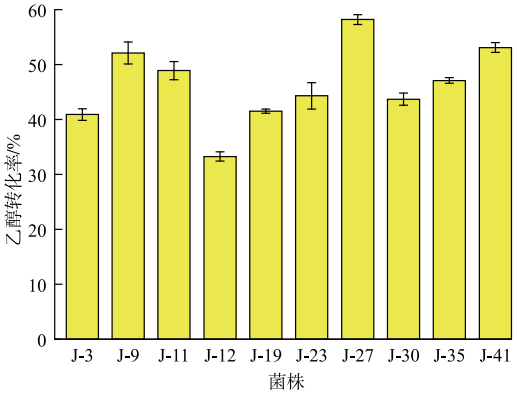


图 3　不同醋酸菌乙醇转化率

Fig. 3　Alcohol conversion rate of different *Acetobacter aceti*

2.1.2　醋酸菌的复筛　将初步筛选得到的 10 株醋酸菌培养至对数期后,按照体积分数 10%接种到乙醇体积分数为 6%的青梅酒中,30 ℃、220 r/min 摇瓶培养 7 d,结果见图 3。在摇瓶复筛的 10 株菌中,菌株 J-27 发酵结束时总酸质量浓度最高,达 45.51 g/L,乙醇转化率为 58.2%。

2.1.3　醋酸菌的 16S rDNA 鉴定　根据公司提供的菌株基因组测序结果,在 NCBI 数据库中找到与醋酸菌 J-27 同源性最高的菌株,利用 MEGA6 软件对获得的基因组序列进行同源性比对,并构建菌株J-27 的系统发育进化树。如图 4 所示,J-27 与热带醋酸杆菌 4070 同源性最高,说明 J-27 为热带醋酸杆菌(*Acetobacter tropicalis*)。

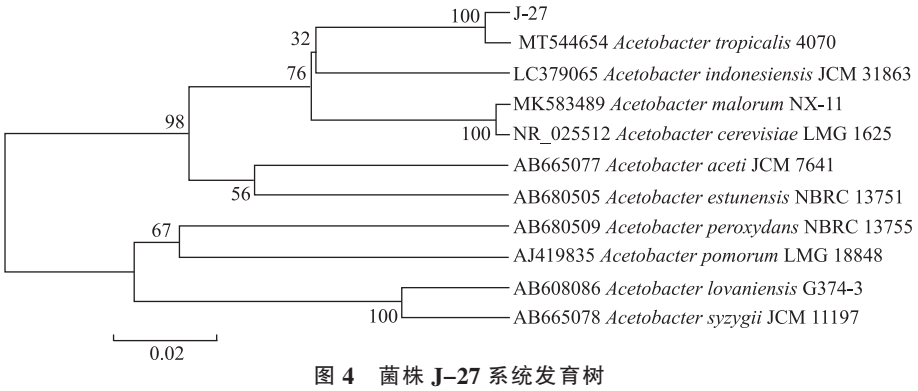


图 4　菌株 J-27 系统发育树

Fig. 4　Phylogenetic tree constructed of strain J-27

2.2　筛选菌与商业菌青梅醋发酵性能比较

如图 5 所示，沪酿 1.01 和 AS1.41 发酵结束时青梅醋发酵液中总酸质量浓度分别为 18.26 g/L 和 22.13 g/L，乙醇转化为乙酸效率极低，而沪酿 1.01 和 AS1.41 应用于粮食醋发酵时,发酵液总酸质量浓度一般可以达到 50 g/L 左右[10,23],原因可能是这两株菌的最适发酵 pH 通常为 3.5~6.5,但青梅醋发酵时青梅酒 pH 仅为 2.71±0.04，抑制了其生长活性,从而使产酸能力下降。菌株 J-27 发酵结束时总酸质量浓度为 45.51 g/L，比沪酿 1.01 和 AS1.41 菌株分别高 149.2% 和 105.7%，乙醇转化率高达 58.17%。这些说明在高酸度的青梅醋发酵过程中,菌株 J-27 发酵性能优于沪酿 1.01 和 AS1.41。

2.3　常压室温等离子体(ARTP)诱变选育醋酸高产菌

图 6 为热带醋酸杆菌 J-27 的等离子体诱变致死率曲线。在 0~45 s 菌体细胞的致死率迅速增加,出现这种情况可能是等离子体的注入引起基因损伤,从而造成菌体致死率大幅升高。随着等离子体的继续注入,等离子体中带电粒子的运动引起正电荷或负电荷局部集中,产生中性分子电场,阻碍了后续等离子体的注入,进而导致醋酸菌致死率增速下降[12]。当诱变处理时间为 90 s 时,致死率为 95.3%;当诱变时间延长至 120 s 时,致死率几乎达

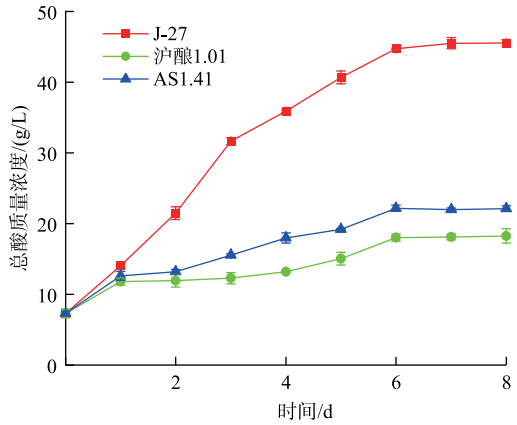


图 5　青梅醋发酵实验

Fig. 5　Fermentation experiment of greengage vinegar

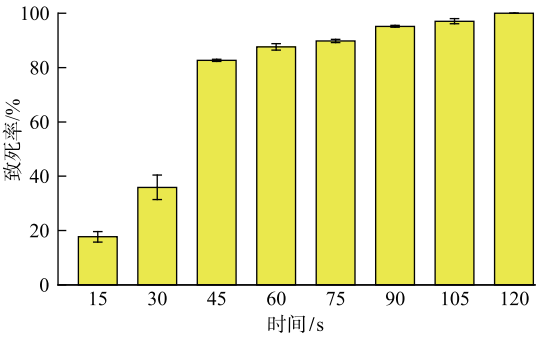


图 6　菌株 J–27 致死率曲线

Fig. 6　Fatality curve of strain J–27

到 100%。现代育种理论表明,诱变致死率等于或大于 95%时可获得最佳的突变体,因此确定 90 s 和 105 s 为 ARTP 诱变的最佳处理时间。

将处理 90、105 s 获得的所有诱变菌株接入 96 孔板,30 ℃、220 r/min 发酵 72 h,测定OD_{600},筛选出 10 株 OD_{600} 较 J–27 提高 20%以上的诱变菌株,进一步接入乙醇体积分数为 6%的发酵培养基中进行发酵。如图 7 所示,J–2736 菌株醋酸转化率可达到 79.8%,较 J–27 提高了 37.3%,说明通过 ARTP 诱变提高了菌株的产酸性能和乙醇转化率。

2.4　突变菌性能检测结果

2.4.1　*耐乙醇能力*　醋酸发酵时较高的初始乙醇体积分数抑制醋酸菌的生长,从而导致其产酸速率和乙醇转化率的降低。因此,筛选具有高乙醇耐受性的醋酸菌可以提高乙醇转化率,从而缩短果醋酿造周期。在不同初始乙醇体积分数下,通过菌体的生长量(OD 值)可以判断菌株的乙醇耐受性。因此将热带醋酸杆菌 J–2736 在不同体积分数的乙醇中摇瓶培养,检测发酵液在 600 nm 处的吸光度,从而确定菌株的耐受能力。结果如图 8 所示,菌株 J–2736 的 OD 值在乙醇体积分数为 7%时达到最大。随着培养基中乙醇体积分数的增加,醋酸菌的生长量与乙醇体积分数呈负相关。当乙醇体积分数为 11%时,发酵液的 OD 值降至 0.2 以下,醋酸菌基本停止生长,说明高体积分数乙醇对热带醋酸杆菌 J–2736 的生长起到明显抑制作用,其最高可耐受体积分数 10%的乙醇。

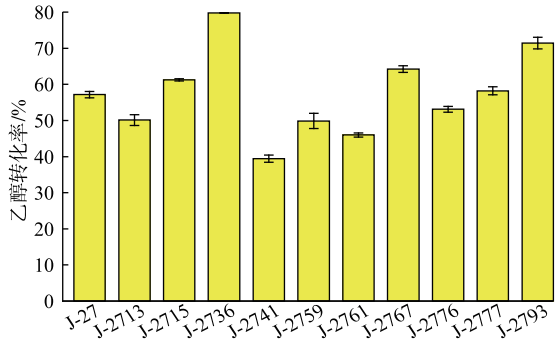


图 7　不同正突变菌株乙醇转化率

Fig. 7　Alcohol conversion rate of different positive mutant strains

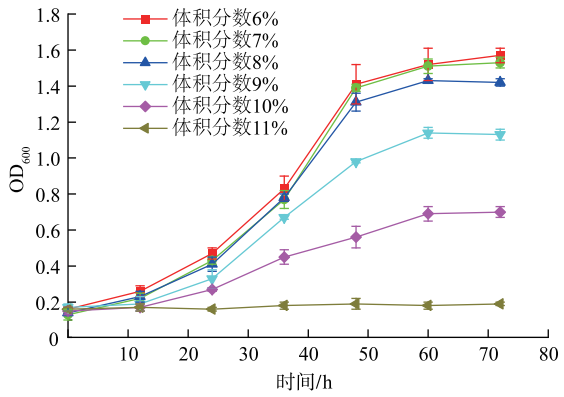


图 8　菌株 J–2736 乙醇耐受性

Fig. 8　Alcohol tolerance of strain J–2736

2.4.2　*耐乙酸能力*　醋酸发酵不仅要求醋酸菌能够耐受高体积分数的乙醇,且需要对高质量浓度的醋酸环境具有良好的耐受性。在发酵产酸培养基中添加不同质量浓度的醋酸,考察菌体的生长能力,结果见图 9。在初始醋酸质量浓度为 10 g/L 的培养基中菌株的 OD 值最高,这与 Wang 等研究报道一致[24]。低质量浓度的初始乙酸对醋酸菌的生长具有促进作用,随着乙酸质量浓度的继续增加,醋酸菌的生长量逐渐降低。当乙酸质量浓度为 50 g/L 时,发酵液的 OD 值小于 0.2,醋酸菌基本停止生长。这可能是因为高质量浓度的乙酸导致醋酸菌胞内代

谢通量的变化,其中 TCA 循环同化乙酸通路受到胞内乙酸胁迫响应上调,从而抑制醋酸菌的生长[25]。因此,热带醋酸杆菌 J-2736 最高可耐受 40 g/L 的乙酸。

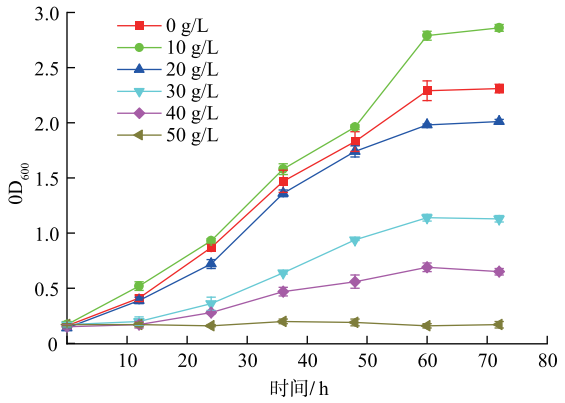


图 9　诱变前后菌株乙酸耐受性

Fig. 9　Acetic acid tolerance of strain before and after mutagenesis

2.5　突变菌与原始菌青梅醋发酵特性分析

2.5.1　青梅醋发酵液指标测定　青梅醋发酵液指标见表 2。菌株 J-2736 发酵液中乙醇体积分数仅为 0.42%,明显低于诱变前菌株 J-27 发酵液中乙醇的体积分数(1.06%)。而 J-2736 青梅醋发酵液中总酸质量浓度高达 62.47 g/L,较诱变前菌株 J-27 提高了 37.3%,且 J-2736 的发酵时间较 J-27 缩短了 1 d。与吴晓英等报道的 ARTP 诱变可显著提高醋酸菌的乙醇利用率和产酸能力,缩短醋酸发酵时间一致[12]。

2.5.2　感官评价　发酵菌株对果醋的品质有重要影响。以自然发酵青梅醋的 J-27、J-2736 为发酵菌种酿造青梅醋,评价青梅醋的色泽、气味、口感等主要感官指标,评分结果见表 3。由表 3 可知,两株菌发酵所得青梅醋在色泽和澄清度方面没有明显差别,在气味与口感方面有一定差异。菌株 J-27 所得产品的色泽、澄清度、风味均较好,气味和口感略差;而菌株 J-2736 发酵所得青梅醋在澄清度、气味、口感等方面明显优于菌株 J-27,所得产品特色突出。

表 2　不同菌株青梅醋发酵液指标

Table 2　Determination of fermentation parameters of greengage vinegar fermented by different strains

菌株	pH	总酸质量浓度/(g/L)	乙醇体积分数/%	总糖质量浓度/(g/L)	发酵时间/d
J-27	2.33±0.02^{a}	45.51±0.42^{a}	1.06±0.31^{a}	18.11±0.76^{a}	7
J-2736	2.31±0.03^{a}	62.47±0.69^{a}	0.42±0.22^{b}	16.37±0.77^{a}	6

注:不同字母表示差异显著。

表 3　不同菌株青梅醋发酵液感官评分

Table 3　Sensory score results of different greengage vinegar fermented by different strains

菌株	分数				总分
	色泽	澄清度	气味	口感	
J-27	23	21	20	21	84
J-2736	23	21	24	23	91

2.6　突变菌发酵青梅醋中主要风味成分分析

青梅醋不同发酵阶段风味物质的质量浓度见表 4。在青梅汁中检测到的主要风味物质有酯类物质13 种(33.9%),醇类物质 15 种(34.8%),醛酮类物质 9 种(19.5%),芳香类 7 种(9.1%)。占比较高的风味物质分别是酯类物质中的乙酸乙酯(3.4%,果香)、乙酸丁酯(3.7%,果香)、甲酸辛酯(9.7%,清甜水果香)、辛酸乙酯(1.1%,白兰地酒香)、辛酸异戊酯(10.2%,果香)、丙位癸内酯(2.1%,椰子和桃子样果香)、乙酸异戊酯(1.3%,水果香气);醇类物质中的正己醇(1.3%,果香)、芳樟醇(6.9%,铃兰香)、正辛醇(14.4%,油脂香和柑橘香)、2-乙基己醇(3.4%,果香)、α-松油醇(1.5%,紫丁香香气)、月桂醇(3.3%,紫罗兰香);芳香类有苯甲酸异丁酯(5.4%,花香和香脂香气)、苯甲酸丁酯(1.4%,水果香味);醛酮类有正己醛(1.4%,生的油脂和青草气及苹果香味)、苯甲醛(1.8%,杏仁香)、壬醛(2.61%,玫瑰、柑橘香)、丙酮(1.2%,薄荷香)、5-壬酮(9.2%,果香)、甲基庚烯酮(1.4%,柠檬草香)。

在青梅酒中检测到主要的风味物质有酯类 20 种(27.2%),醇类 14 种(68.6%),羧酸类 4 种(2.0%)。占比较高的风味物质主要是酯类中的乙酸乙酯(12.3%,果香)、辛酸乙酯(14.9%,白兰地酒香)、丁二酸二乙酯(4.9%,微弱果香)、己酸乙酯(4.2%,果香和酒香)、癸酸乙酯(2.6%,椰子香型香气);醇类中的乙醇(21.5%,醇香)、苯乙醇(27.7%,

栀子和紫丁香样香气）、异戊醇（49.5%，苹果白兰地香气）；羧酸类中的正己酸（1.7%，葡萄酒香）、辛酸（1.0%，青草香）；醛酮类的乙醛（1.3%，青苹果香气）。在青梅酒的发酵过程中，酯类物质含量增加了23.1倍，其中丁二酸二乙酯、月桂酸乙酯、癸酸乙酯、2-甲基丙酸乙酯、乳酸乙酯等酯类物质均是在酿酒酵母的乙醇发酵过程中生成的；醇类物质增加了58.2倍，异戊醇、乙醇和苯乙醇是青梅酒中的主要醇类物质，异戊醇从青梅汁中的0.7%上升到49.5%，它的大量产生给青梅酒增加了浓郁的青草香、玫瑰香和香蕉香气，使得青梅酒具有白兰地的香型。青梅酒中苯乙醇的占比为27.7%，赋予了青梅酒浓郁的玫瑰香气。青梅酒中羧酸类风味物质的占比从青梅汁中的0%增加到青梅酒中的2.0%，正己酸和辛酸是主要的羧酸物质，正己酸具有令人愉快的葡萄酒香，而辛酸则赋予青梅酒浓郁的菠萝味、桃子味、焦糖味等多种风味。

在青梅醋中检测到的主要风味物质有醇类物质6种（11.7%），酯类物质6种（36.0%），羧酸类物质4种（45.9%），醛酮类物质10种（3.0%），芳香类3种（2.5%）。占比较高的风味物质分别是醇类物质中的异戊醇（10.9%，苹果白兰地香气）；酯类物质中的乙酸乙酯（19.5%，果香）、乙酸异戊酯（15.6%，水果香气）、乙酸异丁酯（1.1%，水果香气）；羧酸类物质中的乙酸（39.9%，刺激性气味）、异戊酸（5.7%，酸味）；芳香类的乙酸苯乙酯（1.6%，玫瑰花香）。在青

表4　青梅醋不同发酵阶段香气物质质量浓度

Table 4　Content of aroma components in different fermentation stages of greengage vinegar

名称		CAS号	香气物质质量浓度/(μg/L)		
			青梅汁	青梅酒	青梅醋
酯类	乙酸乙酯	141-78-6	3.38±0.32^{a}	246.16±3.67^{b}	592.23±11.45^{c}
	丁酸乙酯	105-54-4	0.84±0.11^{b}	2.82±0.23^{c}	—^{a}
	乙酸丁酯	123-86-4	3.70±0.56^{b}	—^{a}	—^{a}
	2-壬炔酸-顺-3-己烯酯	68480-29-5	0.15±0.01^{b}	—^{a}	—^{a}
	乙酸己酯	142-92-7	0.089±0.01^{b}	—^{a}	—^{a}
	辛酸甲酯	111-11-5	0.27±0.11^{b}	—^{a}	—^{a}
	甲酸辛酯	112-32-3	9.69±0.76^{c}	1.60±0.33^{a}	6.59±0.59^{b}
	辛酸乙酯	106-32-1	1.05±0.06^{b}	298.29±5.71^{b}	0.78±0.21^{a}
	辛酸异戊酯	2035-99-6	10.16±0.57^{b}	0.98±0.11^{a}	—^{a}
	丙位癸内酯	706-14-9	2.14±0.17^{b}	2.69±0.77^{c}	—^{a}
	丙酸乙酯	105-37-3	0.22±0.07^{b}	1.89±0.19^{c}	—^{a}
	2-甲基丙酸乙酯	97-62-1	—^{a}	1.55±0.26^{b}	—^{a}
	2-甲基丁酸乙酯	7452-79-1	—^{a}	0.89±0.16^{b}	—^{a}
	3-甲基丁酸乙酯	108-64-5	—^{a}	0.63±0.09^{b}	3.41±0.43^{c}
	乙酸异戊酯	123-92-2	1.25±0.12^{a}	6.35±0.87^{b}	458.61±6.72^{c}
	己酸乙酯	123-66-0	0.95±0.21^{a}	83.42±2.22^{c}	1.29±0.12^{b}
	3-己烯酸乙酯	2396-83-0	—^{a}	0.85±0.17^{b}	—^{a}
	庚酸乙酯	106-30-9	—^{a}	0.79±0.22^{b}	—^{a}
	乳酸乙酯	97-64-3	—^{a}	4.98±0.43^{b}	—^{a}
	7-辛酸乙酯	35194-38-8	—^{a}	2.68±0.31^{b}	—^{a}
	癸酸乙酯	110-38-3	—^{a}	51.30±1.11^{b}	—^{a}
	丁二酸二乙酯	123-25-1	—^{a}	97.39±3.17^{b}	—^{a}
	月桂酸乙酯	106-33-2	—^{a}	6.28±0.67^{b}	—^{a}
	肉桂酸乙酯	103-36-6	—^{a}	4.89±0.21^{b}	—^{a}
	乙酸异丁酯	110-19-0	—^{a}	—^{a}	34.61±2.14^{b}
总量			33.89±3.07^{a}	816.43±20.9^{b}	1 097.52±21.66^{c}

续表 4

名称		CAS 号	香气物质质量浓度/(μg/L)		
			青梅汁	青梅酒	青梅醋
醇类	异丙醇	67-63-0	0.76±0.11^{b}	—^{a}	—^{a}
	2-甲基-1-戊烯-3-醇	2088-07-5	0.096±0.01^{b}	—^{a}	—^{a}
	异戊醇	123-51-3	0.66±0.12^{a}	991.60±8.64^{c}	332.66±6.72^{b}
	正戊醇	71-41-0	0.17±0.03^{b}	—^{a}	—^{a}
	正己醇	111-27-3	1.32±0.21^{b}	—^{a}	—^{a}
	1-辛烯-3-醇	3391-86-4	0.17±0.03^{b}	—^{a}	—^{a}
	芳樟醇	78-70-6	6.85±0.67^{b}	12.25±1.37^{c}	4.11±0.76^{a}
	正辛醇	111-87-5	14.39±0.98^{b}	—^{a}	—^{a}
	L-薄荷醇	2216-51-5	0.61±0.23^{b}	—^{a}	1.85±0.39^{c}
	2-乙基己醇	104-76-7	3.41±0.41^{a}	3.54±.026a	4.71±0.78^{b}
	α-松油醇	98-55-5	1.48±0.12^{a}	9.01±0.79^{b}	—^{a}
	月桂醇	112-53-8	3.26±0.38^{b}	—^{a}	—^{a}
	乙醇	64-17-5	—^{a}	430.25±3.99^{c}	1.23±0.11^{b}
	丙醇	71-23-8	—^{a}	2.40±0.34^{b}	—^{a}
	异丁醇	78-83-1	—^{a}	42.87±1.78^{c}	12.94±0.95^{b}
	正丁醇	71-36-3	1.12±0.08^{b}	2.03±0.06^{c}	—^{a}
	苯乙醇	60-12-8	0.71±0.09^{a}	554.36±6.33^{b}	—^{a}
	4-甲基-1-戊醇	626-89-1	—^{a}	0.47±0.07^{b}	—^{a}
	正庚醇	111-70-6	—^{a}	1.65±0.28^{b}	—^{a}
	4-萜烯醇	562-74-3	—^{a}	2.98±0.36^{b}	—^{a}
	反式-橙花叔醇	40716-66-3	—^{a}	7.70±1.20^{b}	—^{a}
	总量		34.84±3.60^{a}	2 062.02±25.56^{c}	357.50±9.71^{b}
酸类	正己酸	142-62-1	—^{a}	33.07±1.39^{b}	—^{a}
	辛酸	124-07-2	—^{a}	19.85±1.11^{c}	0.18±0.03^{b}
	乙酸	64-19-7	—^{a}	4.40±0.51^{b}	1 215.27±33.58^{c}
	异丁酸	79-31-2	—^{a}	2.12±0.14^{b}	8.61±0.63^{c}
	异戊酸	503-74-2	—^{a}	—^{a}	173.87±8.93^{b}
	总量		0^{a}	59.44±3.15^{b}	1 397.93±43.17^{c}
萜烯类	月桂烯	123-35-3	0.09±0.01^{b}	—^{a}	—^{a}
	苯乙烯	100-42-5	0.76±0.05^{b}	—^{a}	—^{a}
	γ-松油烯	99-85-4	—^{a}	0.21±0.02^{b}	—^{a}
	1,5,5-三甲基 1-3-亚甲基-1-环己烯	16609-28-2	0.078±0.01^{b}	0.17±0.01^{c}	—^{a}
	总量		0.93±0.07^{c}	0.38±0.03^{b}	0^{a}
芳香类	甲苯	108-88-3	0.40±0.03^{b}	—^{a}	—^{a}
	乙苯	100-41-4	0.053±0.01^{b}	—^{a}	—^{a}
	苯甲酸异丁酯	120-50-3	5.39±0.06^{b}	—^{a}	—^{a}
	苯甲酸丁酯	136-60-7	1.40±0.01^{b}	—^{a}	—^{a}
	苯乙酸乙酯	101-97-3	—^{a}	3.77±0.12^{b}	—^{a}
	乙酸苯乙酯	103-45-7	—^{a}	14.86±2.37^{b}	48.91±3.64^{c}
	邻苯二甲酸二异丁酯	84-69-5	0.68±0.11^{a}	0.38±0.07^{a}	12.73±1.19^{b}
	6-叔丁基间甲酚	88-60-8	0.35±0.07^{b}	—^{a}	—^{a}
	2,4-二叔丁基苯酚	96-76-4	0.81±0.12^{a}	7.68±0.59^{b}	15.51±2.38^{c}
	总量		9.08±0.41^{a}	26.69±3.15^{b}	77.15±7.21^{c}

续表 4

名称		CAS 号	香气物质质量浓度/(μg/L)		
			青梅汁	青梅酒	青梅醋
醛酮类	正己醛	66-25-1	1.43±0.86^{b}	—^{a}	—^{a}
	正辛醛	124-13-0	0.59±0.11^{b}	—^{a}	1.19±0.27^{c}
	癸醛	112-31-2	0.92±0.07^{b}	—^{a}	—^{a}
	苯甲醛	100-52-7	1.78±0.27^{b}	—^{a}	21.27±3.55^{c}
	乙醛	75-07-0	—^{a}	25.65±3.46^{c}	14.08±0.95^{b}
	异丁醛	78-84-2	—^{a}	0.35±0.11^{b}	1.89±0.49^{c}
	2-甲基丁醛	96-17-3	—^{a}	0.21±0.05^{b}	—^{a}
	异戊醛	590-86-3	—^{a}	2.11±0.19^{b}	14.99±3.24^{c}
	三聚乙醛	123-63-7	—^{a}	—^{a}	1.25±0.07^{b}
	壬醛	124-19-6	2.61±0.24^{b}	1.88±0.27^{a}	5.89±0.76^{c}
	3-羟基-2-丁酮	513-86-0	—^{a}	1.56±0.09^{b}	9.41±0.84^{c}
	2,6-二(叔丁基)-4-羟基-4-甲基-2,5-环己二烯-1-酮	10396-80-2	—^{a}	10.69±2.19^{b}	19.59±3.79^{c}
	丙酮	67-64-1	1.24±0.02^{b}	—^{a}	—^{a}
	仲辛酮	111-13-7	0.33±0.01^{b}	—^{a}	—^{a}
	5-壬酮	502-56-7	9.17±1.08^{c}	—^{a}	1.66±0.36^{b}
	甲基庚烯酮	110-93-0	1.42±0.29^{b}	—^{a}	—^{a}
	总量		19.49±2.95^{a}	40.34±6.36^{b}	91.22±14.32^{c}
杂环类	3,6-二氢-4-甲基-2-(2-甲基-1-丙烯基)-2H-吡喃	1786-08-9	1.16±0.09^{b}	—^{a}	15.22±3.62^{c}
	2-乙烯基-2,6,6-三甲基四氢-2H-吡喃	7392-19-0	0.53±0.06b	0.50±0.02^{b}	—^{a}
	顺-α,α-5-三甲基-5-乙烯基四氢化呋喃-2-甲醇	5989-33-3	0.087±0.01^{a}	—^{a}	8.08±1.34^{b}
	总量		1.78±0.16^{b}	0.50±0.02^{a}	23.30±4.96^{c}

注：“—”表示未检出；不同字母表示差异显著。

梅醋中，乙酸异戊酯和乙酸乙酯分别占总酯类物质的 41.8%和 54.0%，对风味的影响起着关键作用。在青梅醋发酵初期，发酵液中含有大量的醇类物质，它们和醋酸发酵阶段产生的羧酸类物质发生酯化反应生成高级酯类，所以乙酸乙酯和乙酸异戊酯在发酵结束分别提高了 1.41 倍和 71.22 倍。乙酸乙酯和乙酸异戊酯是青梅醋中的特征性酯类物质，赋予青梅醋水果香味。与青梅酒相比，醇类物质减少了 82.6%，原因可能是青梅酒到青梅醋的转化过程中，果酒中的一些风味物质共同转化为酯类等其他物质，从而导致风味物质数量的减少。在青梅醋发酵过程中，乙酸是主要酸味物质，大多通过乙醇氧化而来。

3 结 语

果醋酿造行业大多使用沪酿 1.01 和 AS1.41 作为醋酸发酵阶段菌株，但其特异性弱，不能突出青梅特色。作者通过菌株在分离培养基上透明圈大小和产酸定性实验从青梅发酵液中筛选出 10 株醋酸菌，以乙醇转化率为判断依据，筛选出乙醇转化率较高的热带醋酸杆菌 J-27，在乙醇体积分数为 6%的青梅酒中发酵结束时总酸质量浓度为 45.51 g/L，乙醇转化率达到 58.2%，比沪酿 1.01 和 AS1.41 分别提高了 149.2%和 105.7%。说明在高酸、高醇的青梅醋发酵过程中，菌株 J-27 发酵性能优于沪酿 1.01 和 AS1.41。通过进一步对菌株 J-27 进行 ARTP 诱变，获得一株产酸性能良好的正突变菌株 J-2736，其在乙醇体积分数为 6%的青梅中乙醇转化率达到 79.8%，比 J-27 提高了 37.3%，且能够耐受体积分数 10%的乙醇和 40 g/L 的乙酸。对发酵结束后的青梅醋进行风味物质分析，其中醇类物质、酯类物质和羧酸类物质占比较高，分别占挥发性风味物质的 11.7%、36.0%和45.9%。该醋酸菌能够较好适应青梅的高酸环境，具有工业应用前景。

参考文献:

[1] 雷玛莎. 果醋的产生和研制[J]. 中国调味品,2001,26(5):6-8.
LEI M S. Research of fruits-vinegar and produce[J]. **Chinese Condiment**,2001,26(5):6-8. (in Chinese)
[2] CEJUDO-BASTANTE M J,DURá N E,CASTRO R,et al. Study of the volatile composition and sensory characteristics of new Sherry vinegar-derived products by maceration with fruits[J]. **LWT - Food Science and Technology**,2013,50(2):469-479.
[3] 王雪涵,郑一凡. 浸泡型果醋与发酵型果醋抗氧化能力及抑菌性比较研究[J]. 中国调味品,2017,42(3):59-63.
WANG X H,ZHENG Y F. Comparison of antioxidant capacity and antibacterial activity of soaked fruit vinegar and fermented fruit vinegar[J]. **China Condiment**,2017,42(3):59-63. (in Chinese)
[4] 石嘉怿,吴晓琴,张英. 青梅资源的研究与应用[J]. 食品与发酵工业,2008,34(6):106-111.
SHI J Y,WU X Q,ZHANG Y. A review of the research on utilization and development of *Prunus mume*[J]. **Food and Fermentation Industries**,2008,34(6):106-111. (in Chinese)
[5] 田甜甜. 青梅酒酿酒酵母的选育及耐酸机制解析[D]. 无锡:江南大学,2020.
[6] 魏长庆,王海庆,张凌,等. 葡萄果醋发酵用醋酸菌的分离及鉴定[J]. 中国酿造,2010,29(4):42-45.
WEI C Q,WANG H Q,ZHANG L,et al. Screen and identification of acetic acid bacteria for grape vinegar production[J]. **China Brewing**,2010,29(4):42-45. (in Chinese)
[7] 杨颖,刘欠欠,陆胜民,等. 青梅果醋醋酸发酵菌种的筛选与鉴定[J]. 中国食品学报,2010,10(3):64-68.
YANG Y,LIU Q Q,LU S M,et al. Screening and identification of *Acetobacter* spp. for green mume fruit vinegar fermentation[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**,2010,10(3):64-68. (in Chinese)
[8] 赵玲燕. 青梅果酒高效性能酵母筛选及其复合酵母发酵工艺研究[D]. 贵阳:贵州大学,2020.
[9] 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,2006,41(1):83-86.
ZHANG Z M. Selection and biochemical characteristics of high-yield *Acetobacter*[J]. **Journal of Gansu Agricultural University**,2006,41(1):83-86. (in Chinese)
[10] 姚洪礼. 醋酸高产菌株选育及其代谢调控研究[D]. 合肥:合肥工业大学,2018.
[11] TIAN T T,WU D H,NG C T,et al. A multiple-step strategy for screening *Saccharomyces cerevisiae* strains with improved acid tolerance and aroma profiles[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2020,104(7):3097-3107.
[12] 吴晓英. 耐乙醇巴氏醋杆菌选育及其耐受机制[D]. 天津:天津科技大学,2015.
[13] 潘红菊. 果醋酿造用优良醋酸菌的选育及其特性研究[D]. 南昌:江西科技师范大学,2020.
[14] 苏龙,庄明川,梁广波,等. 醋酸高产菌株的筛选及百香果果醋发酵条件的优化[J]. 食品科技,2017,42(4):33-37.
SU L,ZHUANG M C,LIANG G B,et al. Screening of acetic acid producing strain and optimization on fermentation conditions of passion fruit vinegar[J]. **Food Science and Technology**,2017,42(4):33-37. (in Chinese)
[15] SENGUN I Y,KILIC G,OZTURK B. Screening physicochemical,microbiological and bioactive properties of fruit vinegars produced from various raw materials[J]. **Food Science and Biotechnology**,2020,29(3):401-408.
[16] ALONSO Á M,CASTRO R,RODRÍGUEZ M C,et al. Study of the antioxidant power of brandies and vinegars derived from Sherry wines and correlation with their content in polyphenols[J]. **Food Research International**,2004,37(7):715-721.
[17] 赵会芳. 耐酸醋酸菌的选育及高酸度发酵果醋的研究[D]. 西安:陕西科技大学,2012.
[18] 亓正良. 酸激复合紫外诱变提高醋杆菌产酸能力及耐酸机理的研究[D]. 无锡:江南大学,2013.
[19] 夏凯. 巴氏醋杆菌耐酸性分子机制的研究[D]. 杭州:浙江工商大学,2020.
[20] 蒋益虹. 青梅果醋醋酸发酵工艺的优化[J]. 农业机械学报,2005,36(7):85-88.
JIANG Y H. Technology optimization of acetic acid fermentation of greengage vinegar[J]. **Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery**,2005,36(7):85-88. (in Chinese)
[21] 杨颖,夏其乐,郑美瑜,等. 青梅果醋的发酵工艺研究[J]. 中国食品学报,2010,10(4):130-135.
YANG Y,XIA Q L,ZHENG M Y,et al. Study on fermentation technology of green plum vinegar[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**,2010,10(4):130-135. (in Chinese)
[22] 陈松蔚. 甘蔗汁果醋酿造工艺优化及发酵过程中挥发性物质分析[D]. 南宁:广西大学,2019.
[23] 周滟晴. 高产酸醋酸菌的耐受性研究及其在李子醋的应用[D]. 上海:上海海洋大学,2021.
[24] WANG B,SHAO Y C,CHEN T,et al. Global insights into acetic acid resistance mechanisms and genetic stability of *Acetobacter pasteurianus* strains by comparative genomics[J]. **Scientific Reports**,2015,5:18330.
[25] 武晓丹. 巴氏醋酸杆菌代谢调控提高乙酸生产效率研究[D]. 无锡:江南大学,2021.

(责任编辑:李春丽)