

食醋酿造过程中条件致腐微生物的分离鉴定及强产气菌群 TYF-LIM-L09 的生长特征

李 敏¹, 李 瑶¹, 赵 魁², 王 鹤², 何永吉³, 范晓军^{*1}

(1. 太原理工大学 化学化工学院, 山西 太原 030024; 2. 太原市宁化府益源庆醋业有限公司, 山西 太原 030000; 3. 山西省农业科学院 农产品加工研究所, 山西 太原 030006)

摘要: 近年来, 夏季高温条件下我国北方食醋酿造企业时常出现微生物污染情况, 严重地影响了食醋的营养成分和品质。为了深入研究高温条件致腐微生物, 课题组选取了 5 个不同批次的腐败醋样进行分离鉴定, 且应用微生物宏基因组分类测序方法分析了强产气菌群 TYF-LIM-L09 的组成结构, 并研究了该菌群的生长特征、温度与乙醇耐受、产气能力及糖代谢关键酶活性。结果表明, 从腐败醋样中共分离获得了 4 个稳定菌群及 46 株细菌, 其中 44 株菌分别属于 *Rummeliibacillus*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Brevundimonas*, *Paenibacillus*, 另有 2 株分离菌尚无已知定义属。强产气菌群 TYF-LIM-L09 由 6 个以上菌属组成, 其在 50 ℃ 生长良好, 能耐受体积分数高达 8% 的乙醇, 产生 CO₂ 体积分数可高达 71.43%, 且该菌群的丙酮酸激酶和丙酮酸脱羧酶具有较高活力, 推测其为引起食醋腐败胀气的关键微生物。

关键词: 食醋; 腐败; 高温时节; 强产气菌群 TYF-LIM-L09; 生长特征

中图分类号: Q 939.97 文章编号: 1673-1689(2020)05-0095-09 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.05.014

Isolation and Identification of High-Temperature Tolerant Spoilage Microbes during Vinegar Brewing and Growth Characterization of the Bacterial Consortium TYF-LIM-L09 with A Strong Gas-Producing Ability

LI Min¹, LI Yao¹, ZHAO Kui², WANG He², HE Yongji³, FAN Xiaojun^{*1}

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, China; 2. Taiyuan Ninghuafu Yiyuanqing Vinegar Industry Co. Ltd., Taiyuan 030000, China; 3. Institute of Agricultural Products Processing, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030006, China)

Abstract: Vinegar makers in China have suffered from brewing spoilage during high temperature seasons that seriously affects the nutritional composition and quality of vinegar. In order to thoroughly study the high temperature tolerant spoilage microbes, our research team selected five batches of spoilage vinegar samples for microbe isolation and identification and the composition of the gas producing bacterial consortium TYF-LIM-L09 was analyzed by microbial metagenomic

收稿日期: 2018-08-24

基金项目: 山西省重点研发计划项目(201703D121044); 中国山西留学人员创业园入园项目(20180008); 山西省 2019 年度留学人员科技活动择优资助项目(201946)。

* 通信作者: 范晓军(1980—), 男, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事微生物工程方面的研究。E-mail: fxjbio@163.com

sequencing. The TYF-LIM-L09 was then characterized for pH and ethanol tolerance, gas production capacity and activities of core enzymes in glucose metabolism. The results showed that 4 stable bacterial consortium and 46 strains were separated from spoilage vinegar samples, 44 strains of them belonged to the genera *Rummeliibacillus*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Brevundimonas*, *Paenibacillus*, and the other two isolated strains came from unknown genera. The bacterial consortium TYF-LIM-L09, which had a strong gas-producing ability, could grow well at 50 °C and had a high ethanol tolerance of 8% (v/v), was composed of more than 6 genera. The produced gas was CO₂ and the highest concentration could reach 71.43% (v/v). The pyruvate kinase and pyruvate decarboxylase of TYF-LIM-L09 had relatively high activities. In summary, TYF-LIM-L09 was presumed to be the key microbial contaminant causing vinegar to swell.

Keywords: vinegar, brewing spoilage, high temperature seasons, gas producing bacterial consortium TYF-LIM-L09, growth characteristic

食醋是使用含有淀粉、糖的物料或酒精,经微生物发酵酿造或用食用醋酸调制而成的酸味调味品或食品。在亚洲国家,人们偏好使用温和、有甜味的谷物醋来作为面条和寿司的主要调味料,而在欧洲和美洲人们喜爱食用以水果为原料生产的果醋^[1-2]。食醋的主要成分除了醋酸外,还含有氨基酸、有机酸、糖类、维生素、矿物质、醇类、酯类等营养成分和风味成分^[3-5]。食醋的营养成分和品质与发酵过程中的微生物代谢密切相关^[6-7]。近年来,我国食醋生产企业在夏季高温气候条件下时常出现微生物污染情况,且通常伴随着成品醋返浑、发粘、胀气等腐败现象^[8-11],严重地影响着食醋的营养成分和品质。

为了深入了解食醋酿造过程中发生的高温条件致腐机制,国内一些高校、科研院所和企业对腐败醋样中污染微生物及营养成分进行了初步研究。中国食品发酵工业研究院程池等通过使用 PCR-DGGE 技术比较了正常醋样和污染醋样的微生物群落结构,并在此基础上对两种醋样的微生物进行了分离纯化和鉴定,得出了污染菌为耐酸乳杆菌的结论^[12]。此外,武汉轻工大学周幅萍等通过显微形态观察与 16S rRNA 序列分析从变质醋样中鉴定出了头状葡萄球菌和少量解淀粉芽孢杆菌,该课题组通过电子舌测试得出变质醋中酸度和咸度略有下降,苦味和鲜回味大幅降低,苦回味和涩回味减少等结论^[13]。2017 年曹晋宜等科研工作者对比分析了发粘食醋和正常食醋的感官指标、理化指标、香气成分,结

果显示发粘食醋中总酸、乳酸、乙醇含量明显上升,而还原糖、总酯、糠醛含量明显下降。该研究小组通过传统培养与 16S rDNA 序列同源性分析方法,并结合微生物宏基因组分类测序方法得出了引起食醋发粘的微生物主要是牛痘乳杆菌的结论^[14]。以上各研究结论并不一致,也未深入分析分离菌株的耐热特性及原因,研究结论仍不能准确地解释食醋发酵生产中仅在高温时节出现腐败现象,食醋酿造行业内研究者亦难以从中获得一致性指导建议。究其原因,腐败变质醋样本数量、分离条件及可靠的分析测试平台的选择都会影响相关研究结果。

乳酸杆菌是一类能使糖类发酵产生乳酸的益生菌,在人体内起着调节免疫功能的作用。乳酸杆菌存在广泛,其最适生长 pH 为 5.5~6.0,但在 pH 3.0~4.5 的强酸性环境中仍能生存^[15-19],这与食醋酿造过程中醋酸发酵阶段的酸性环境 pH 3.5~4.5 相一致^[20],但是乳酸杆菌对高温耐受能力相对较弱,能够耐受 43 °C 以上高温条件的乳酸杆菌更鲜有报道^[21-22]。夏季高温时节醋酸酿造过程中醋醅中心最高温度可达 48~50 °C^[23],通常状况下乳酸杆菌并不能耐受这样的高温条件^[24],因此对条件致腐分离株的耐高温特性研究十分必要。此外,食醋酿造腐败现象不仅发生在醋酸发酵阶段,高温条件下酒精发酵阶段也偶有发生,对筛选菌株的酒精耐受研究亦不容忽视。

在本研究中,课题组从 5 个不同批次的腐败醋

样中分离获得了 46 株细菌及 4 个稳定菌群,其中编号为 TYF-LIM-L09 的菌群在多种培养条件下均表现出明显的产气现象,因此对其进行了微生物宏基因组分类测序,并分析了该菌群的生长特征、温度和乙醇耐受、产气能力及关键酶活性特征,以期对食醋酿造高温条件致腐微生物有更全面、深入的认识。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验菌株 5 个不同批次的腐败醋样中分离获得 46 株细菌及 4 个菌群;大肠杆菌 BL21、地衣芽孢杆菌 PWD-1 为作者所在实验室保存菌株。

1.1.2 MRS 培养基(g/L) 蛋白胨 10,牛肉粉 8,酵母粉 4,葡萄糖 20,磷酸二氢钾 2,柠檬酸氢二铵 2,无水乙酸钠 5,硫酸镁 0.58,硫酸锰 0.19,琼脂 14;吐温-80 1 mL,115 ℃灭菌 20 min。

1.1.3 试剂 蛋白胨、酵母粉:英国 OXOID 公司;牛肉粉、柠檬酸氢二铵、葡萄糖、吐温-80:北京博奥拓达科技有限公司;乙酸钠、硫酸镁、磷酸氢二钾、硫酸锰、无水乙醇、糠醛:均为分析纯,天津科密欧化学试剂有限公司;琼脂粉、氨苄青霉素、溴化乙锭、27F、1492R 通用引物、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(Nicotinamide adenine dinucleotide,NADH)、 β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(Diphosphopyridine nucleotide,NAD⁺):生工生物工程(上海)股份有限公司;Taq DNA 聚合酶、10 × Taq 缓冲液、dNTP、细菌基因组 DNA 提取试剂盒:北京天根生化科技有限公司;琼脂糖:美国 invitrogen 公司;DNA Marker:北京全式金公司;PCR 产物纯化试剂盒:BIOBASIC 公司;丙酮酸激酶(pyruvate kinase,PK)测定试剂盒:上海索莱宝生物科技有限公司;CO₂ 气体检测管:北京北科绿洲安全环境科技有限公司。

1.2 仪器与设备

Alphamager HP 型凝胶成像分析仪:美国 proteinsimple 公司;Multiskan GO 型全波长酶标仪:美国赛默飞世尔公司;Mastercycler pro S 型 PCR 仪:艾本德中国有限公司;BT 124S 型电子天平:德国赛多利斯股份公司;PB-10 型 pH 计:德国赛多利斯股份公司;YXQ-LS-30S2 型立式压力蒸汽灭菌锅:上海博讯实业有限公司;DYCZ-24DN 型迷你水平电泳:北京市六一仪器厂;JY 92-IIN 型超声波细

胞粉碎机:宁波新芝生物科技股份有限公司;DHA-CA 型大容量振荡器:太仓市实验设备厂;HC-3018 型高速冷冻离心机:安徽中科中桂科学仪器有限公司;DYY-10C 型电泳仪:北京市六一仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 腐败微生物的分离与鉴定 取 10 mL 腐败成品醋离心浓缩至 200 μ L,涂布至 MRS 培养基上,37 ℃培养 24~48 h 至出现肉眼可见的菌落后,挑取单菌落扩大培养并使用基因组提取试剂盒分别提取各分离菌的基因组。用通用引物 27F、533R 和 1492R 对单菌落进行 16S rDNA 扩增,扩增产物进行 Sanger 测序,将测序结果在 NCBI 数据库中 Blast 同源比对检索,查找与被测菌种在 16S rDNA 序列相似性最高的物种。

1.3.2 菌群 TYF-LIM-L09 的宏基因组分类测序分析 取 1 mL TYF-LIM-L09 培养菌液,12 000 r/min 离心 1 min 后,用细菌基因组抽提试剂盒提取沉淀中的细菌总 DNA。用通用引物 338F 和 806R 扩增细菌基因组 16S 的 V3+V4 区,扩增引物序列参见表 1。扩增产物建库质检合格后,在 Miseq 高通量测序仪进行 PE 300 bp 双端测序。对高通量测序数据进行过滤、拼接后,进行 OUT 聚类分析,挑选相似度大于 90% 的序列归为一类 OTU,进而对被测样品中分属不同 OTUs 的序列数进行统计,分析样品中对应的菌群组成。

表 1 细菌 16S rDNA PCR 扩增引物

Table 1 16S rDNA PCR amplification primers of bacteria

测序类型	引物名称	引物序列(5'→3')
细菌 16S rDNA	27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
	533R	TTACCGCGGCTGCTGGCAC
	1492R	GGTTACCTTGTACGACTT
	338F	ACTCCTACGGGAGGCAGCA
	806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT

1.3.3 菌群 TYF-LIM-L09 的温度、乙醇及 pH 耐受特征 将 TYF-LIM-L09 菌液以 2% 的接种体积分数接种到 50 mL 的 MRS 液体培养基中,分别放置于设定温度为 30、37、40、45、50 ℃,转速为 200 r/min 的振荡培养箱中培养,监测各培养物的 OD₆₀₀ 数值与培养时间的关系。按照以上接种体积分数,温度为 37 ℃,转速为 200 r/min 的条件下,分别在初始 pH 值为 6.2±0.2,乙醇体积分数为 0%、2%、4%、6%、8%、10% 的 MRS 液体培养基以及在不含乙醇,初始

pH 值为 5.0、5.5、6.5、7.0、7.5 的 MRS 液体培养基中培养 TYF-LIM-L09, 分别监测各培养物的 OD₆₀₀ 数值与培养时间的关系。

1.3.4 菌群 TYF-LIM-L09 的产气检测分析 将菌液以 10% 的接种体积分数接种到 50 mL 的 MRS 液体培养基中, 封口放置于 37 ℃、200 r/min 的振荡培养箱中培养 24 h, 次日使用 CO₂ 气体检测管检测产气量, 大肠杆菌和地衣芽孢杆菌为对照菌。

按同样的接种体积分数分别在乙醇体积分数为 0%、2%、4%、6%、8%、10% 的 MRS 液体培养基中培养 TYF-LIM-L09; 另外分 8 个梯度在 pH 4.0~7.5 的 MRS 液体培养基中培养强产气菌 TYF-LIM-L09, 封口放置于 37 ℃、200 r/min 的振荡培养箱中培养 24 h, 次日使用 CO₂ 气体检测管检测产气量, 分析乙醇、pH 值对 TYF-LIM-L09 产气量的影响。

1.3.5 TYF-LIM-L09 的关键酶活性测定 粗酶液的处理: 待 OD₆₀₀ 值达到 1.2 时收集 TYF-LIM-L09 培养菌液, 加入 pH 7.4 的 PBS 缓冲液后破碎菌体, 离心取上清液获得粗酶液。

1) 丙酮酸激酶酶活测定 用试剂盒测定丙酮酸激酶活力, 具体操作方法根据试剂盒的说明书进行。

2) 丙酮酸脱羧酶酶活测定 在 200 μL 体系中加入 pH 6.0、100 mmol/L 磷酸缓冲液, 1 mol/L 丙酮酸钠溶液, 6.4 mmol/L NADH, 3.5 μL 粗酶液, 在波长 340 nm 处检测反应液 5 min 内每分钟吸光度值的变化。

3) 醇脱氢酶酶活测定 在 200 μL 体系中加入 pH 9.0、0.05 mol/L 甘氨酸-氢氧化钾缓冲液, 0.1 mol/L 糠醛溶液, 0.1 mol/L NADH, 10 μL 粗酶液, 在波长 340 nm 处检测反应液 5 min 内每分钟吸光度值的变化。

酶活单位定义: 1 酶活单位(1U)等于每分钟氧化 1 μmol NADH 生成 1 μmol NAD⁺ 的酶量。

2 结果与讨论

2.1 腐败微生物的分离与鉴定

课题组选取了 5 个不同批次的腐败醋样, 编号为 TYF、TYH、TYJ、TYK 和 TYM, 相关理化指标见图 1。将从以上腐败醋样中分离获得的 50 株细菌的 16S rDNA 测序结果与 NCBI 数据库中 GENBANK 做同源比对检索, 得出鉴定结果, 具体见表 2。分离获得的菌株中 44 株菌来自 8 个已知属, 分别为鲁梅利杆菌属、肠球菌属、漫游球菌属、乳酸杆菌属、芽孢杆菌属、葡萄球菌属、短波单胞菌属和类芽孢杆菌属, 另外 2 株分离菌株尚无已知定义属。此外, 在对分离到的单菌落进行 16S rDNA 测序分析时发现, 有 4 个的结果显示为套峰, 说明这 4 个单菌落在组成上可能形成了固定群落, 因此根据其主峰仅对其进行了属归类。

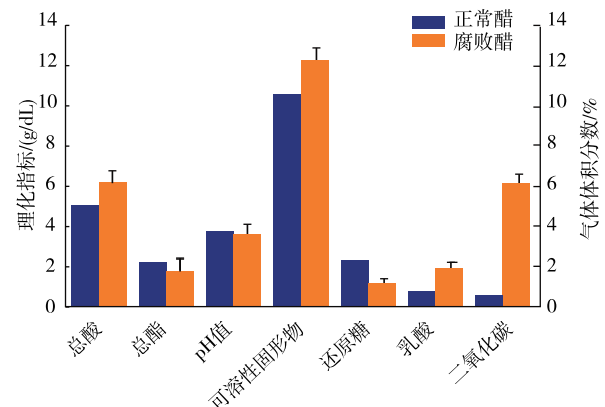


图 1 正常醋样与腐败醋样的理化指标

Fig. 1 Physicochemical indicators of normal and spoiled vinegar samples

表 2 腐败样醋中分离菌株的 16S rDNA BLAST 序列分析结果

Table 2 BLAST results of 16S rDNA sequences of selected bacteria from spoiled vinegar

编号	拉丁属名	中文属名	是否套峰	拉丁种名	16S 序列相似性
TYF-01	<i>Rummeliibacillus</i>	鲁梅利杆菌	否	<i>suwonensis</i>	99%
TYF-02	<i>Enterococcus</i>	肠球菌	否	<i>casseliflavus</i>	99%
TYF-03	<i>Bacillus</i>	芽孢杆菌	否	<i>ginsengihumi</i>	100%
TYF-04	<i>Vagococcus</i>	漫游球菌	否	<i>fluvialis</i>	98%
TYF-05	<i>Lactobacillus</i>	乳酸杆菌	否	uncultured	—
TYF-06	<i>Lactobacillus</i>	乳酸杆菌	否	uncultured	—

续表 2

编号	拉丁属名	中文属名	是否套峰	拉丁种名	16S 序列相似性
TYF-07	<i>Staphylococcus</i>	葡萄球菌	否	<i>hominis</i>	100%
TYF-08	<i>Rummeliibacillus</i>	鲁梅利杆菌	否	<i>stabekisii</i>	99%
TYF-LIM-L09	<i>Lactobacillus</i>	乳酸杆菌	是	—	—
TYF-10	<i>Rummeliibacillus</i>	鲁梅利杆菌	否	<i>stabekisii</i>	100%
TYF-11	<i>Bacillus</i>	芽孢杆菌	否	<i>ginsengihumi</i>	100%
TYH-01	<i>Staphylococcus</i>	葡萄球菌	否	<i>hominis</i>	100%
TYH-02	<i>Rummeliibacillus</i>	鲁梅利杆菌	否	<i>stabekisii</i>	99%
TYH-03	<i>Brevundimonas</i>	短波单胞菌	否	uncultured	—
TYH-04	<i>Rummeliibacillus</i>	鲁梅利杆菌	否	<i>stabekisii</i>	99%
TYH-05	<i>Lactobacillus</i>	乳酸杆菌	否	uncultured	—
TYH-06	<i>Vagococcus</i>	漫游球菌	否	<i>fluvialis</i>	99%
TYH-07	<i>Bacillus</i>	芽孢杆菌	是	—	—
TYH-08	<i>Rummeliibacillus</i>	鲁梅利杆菌	否	<i>stabekisii</i>	99%
TYH-09	<i>Bacillus</i>	芽孢杆菌	否	<i>coagulans</i>	94%
TYH-10	<i>Rummeliibacillus</i>	鲁梅利杆菌	否	<i>stabekisii</i>	99%
TYJ-01	<i>Bacillus</i>	芽孢杆菌	否	<i>ginsengihumi</i>	99%
TYJ-02	<i>Lactobacillus</i>	乳酸杆菌	否	uncultured	—
TYJ-03	<i>Bacillus</i>	芽孢杆菌	否	<i>shackletonii</i>	100%
TYJ-04	<i>Rummeliibacillus</i>	鲁梅利杆菌	否	<i>stabekisii</i>	99%
TYJ-05	<i>Bacillus</i>	芽孢杆菌	否	<i>ginsengihumi</i>	99%
TYJ-06	<i>Bacillus</i>	芽孢杆菌	否	<i>ginsengihumi</i>	100%
TYJ-07	Uncultured	未知属	否	uncultured	—
TYJ-08	Uncultured	未知属	否	uncultured	—
TYJ-09	<i>Bacillus</i>	芽孢杆菌	否	<i>ginsengihumi</i>	99%
TYJ-10	<i>Paenibacillus</i>	类芽孢杆菌	否	<i>relictisesami</i>	95%
TYJ-11	<i>Bacillus</i>	芽孢杆菌	是	—	—
TYJ-12	<i>Lactobacillus</i>	乳酸杆菌	否	uncultured	—
TYK-01	<i>Bacillus</i>	芽孢杆菌	否	<i>coagulans</i>	97%
TYK-02	<i>Rummeliibacillus</i>	鲁梅利杆菌	否	<i>stabekisii</i>	100%
TYK-03	<i>Bacillus</i>	芽孢杆菌	否	<i>coagulans</i>	95%
TYK-04	<i>Bacillus</i>	芽孢杆菌	否	<i>coagulans</i>	94%
TYK-05	<i>Lactobacillus</i>	乳酸杆菌	否	uncultured	—
TYK-06	<i>Bacillus</i>	芽孢杆菌	否	<i>coagulans</i>	97%
TYK-07	<i>Bacillus</i>	芽孢杆菌	否	<i>licheniformis</i>	99%
TYK-08	<i>Lactobacillus</i>	乳酸杆菌	否	uncultured	—
TYK-09	<i>Bacillus</i>	芽孢杆菌	否	<i>licheniformis</i>	97%
TYM-01	<i>Bacillus</i>	芽孢杆菌	否	<i>licheniformis</i>	95%
TYM-02	<i>Staphylococcus</i>	葡萄球菌	否	uncultured	—
TYM-03	<i>Bacillus</i>	芽孢杆菌	否	<i>licheniformis</i>	98%
TYM-04	<i>Rummeliibacillus</i>	鲁梅利杆菌	否	<i>stabekisii</i>	99%
TYM-05	<i>Bacillus</i>	芽孢杆菌	是	—	—
TYM-06	<i>Lactobacillus</i>	乳酸杆菌	否	uncultured	—
TYM-07	<i>Bacillus</i>	芽孢杆菌	否	<i>cereus</i>	99%
TYM-08	<i>Bacillus</i>	芽孢杆菌	否	<i>cereus</i>	99%

RESEARCH ARTICLE

2.2 菌群 TYF-LIM-L09 的强产气现象与宏基因组分类测序分析结果

在培养 TYF-LIM-L09 的过程中观察到了明显的产气现象,见图 2,据此推断该菌为夏季高温条件致腐关键微生物。但经数次划线分离培养后其 16S rDNA PCR 产物测序结果依旧显示为套峰,推测其为稳定的微生物群落,鉴于此,采用微生物宏基因组分类测序方法对其进行了分析。分析结果显示, TYF-LIM-L09 确实为共生菌群,其中优势菌集中于厚壁菌门(50.4%)和变形菌门(17.57%),其中乳酸杆菌属微生物最高达 45.77%,见表 3。



图 2 TYF-LIM-L09 培养过程中的产气现象

Fig. 2 Gas production of TYF-LIM-L09 during the cultivation process

表 3 菌群 TYF-LIM-L09 宏基因组分类测序分析

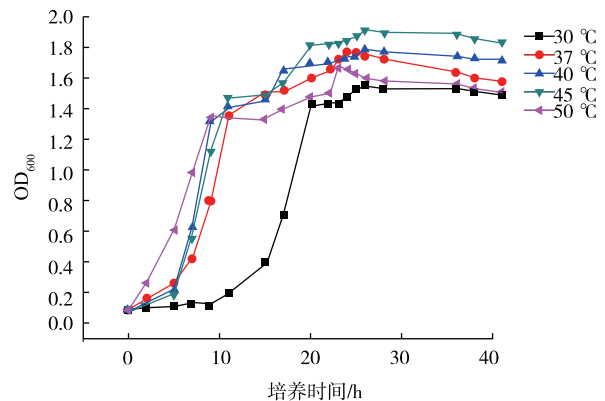
Table 3 Metagenomic analysis of bacterial consortium TYF-LIM-L09

编号	拉丁名称	中文名称	所占百分比/%
TYF-LIM-L09	<i>Lactobacillus</i>	乳酸杆菌属	45.77
	<i>Brevundimonas</i>	短波单胞菌属	10.46
	<i>Pseudomonas</i>	假单胞菌属	4.13
	<i>Sphingomonas</i>	鞘氨醇单胞菌属	2.98
	<i>Bacillus</i>	芽孢杆菌属	2.59
	<i>Staphylococcus</i>	金黄色葡萄球菌属	2.04
	其它		32.03

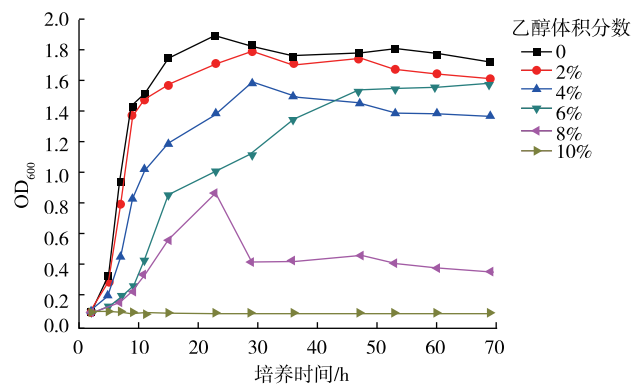
2.3 菌群 TYF-LIM-L09 的温度、乙醇及 pH 耐受实验结果

在研究温度与 TYF-LIM-L09 生长特征关系时发现,对数生长期 50 °C 时菌体生长最快,而 30 °C 时培养 10 h 后菌体才开始快速生长;培养 20 h 后 45 °C 生长的菌体 OD 值最大,说明该温度条件下生物量积累最高,见图 3。TYF-LIM-L09 对乙醇的耐受

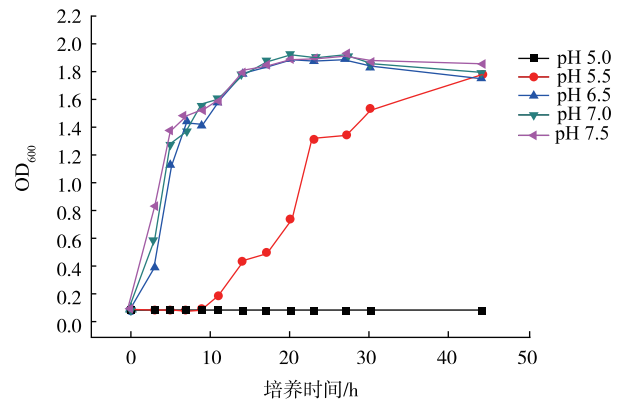
实验结果显示,随着培养基中乙醇体积分数的增高,菌体的生长受到更大程度的抑制。当乙醇体积分数为 2% 时,菌体生长与对照组相比无明显变化;4 % 和 6 % 时菌体生长速率明显降低,体积分数达 8% 时菌体的最大 OD 值为 0.868,是对照组的



(a)不同温度对TYF-LIM-L09生长的影响



(b)不同初始乙醇体积分数对TYF-LIM-L09的生长影响



(c)不同初始pH对TYF-LIM-L09的生长影响

图 3 在不同温度、乙醇体积分数以及 pH 培养条件下 TYF-LIM-L09 的生长特征

Fig. 3 Growth characteristics of TYF-LIM-L09 under different temperatures, alcohol concentrations and pH values

46.1%, 乙醇体积分数 10 % 时 TYF-LIM-L09 无生长现象。综合该菌对乙醇的耐受特征, 其能耐受的乙醇体积分数可高达 8%, 具有很好的酒精耐受能力^[25]。随着培养基 pH 值降低, 菌体的生长受到不同程度的影响, 其中在 pH 5.5 的培养基中, 菌体在培养 8 h 后才开始生长, 生长速率与 pH ≥ 6.0 的培养基相比生长缓慢。在 pH 5.0 的培养基中未检测到菌体生长, 说明该菌能耐受的 pH 值为 5.5。

2.4 TYF-LIM-L09 的产气检测分析

在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 6.2 ± 0.2 、200 r/min 的条件下使用 MRS 液体培养基培养 TYF-LIM-L09、大肠杆菌 BL21、地衣芽孢杆菌 PWD-1, 24 h 后检测产气量。TYF-LIM-L09 产气现象十分突出, 经检测产生的气体为 CO_2 , 体积分数高达 71.43 %; 而大肠杆菌 BL21、地衣芽孢杆菌 PWD-1 产生的 CO_2 体积分数分别为 0.41 % 和 0.50 %。

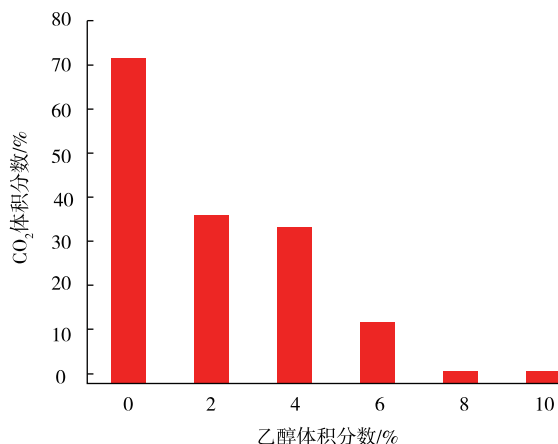
在 pH 6.2 ± 0.2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 的条件下检测培养基中乙醇体积分数对产生 CO_2 的影响, 见图 4 (a)。结果显示, 随着培养基中乙醇体积分数的增加, TYF-LIM-L09 的 CO_2 产出量逐渐降低, 当乙醇体积分数为 8% 或更高时, 几乎没有 CO_2 产生。图 4 (b) 显示了在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 条件下, 培养基初始 pH 值对 TYF-LIM-L09 产生 CO_2 的影响。结果显示, 在 pH 4.0~5.0 条件下, 培养物几乎没有 CO_2 产生; pH 5.5~7.5 时均有 CO_2 产生并且 pH 6.0 时的产气量最大。

2.5 TYF-LIM-L09 的糖代谢关键酶活性

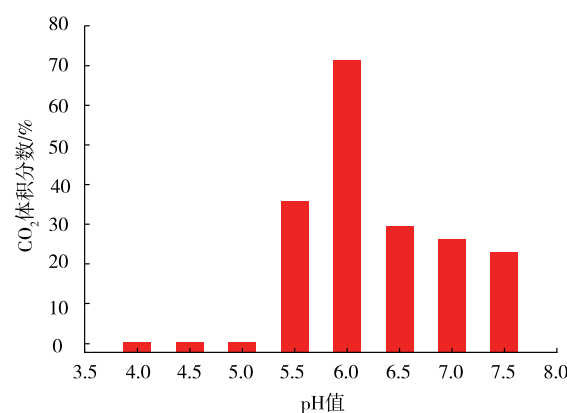
丙酮酸激酶、丙酮酸脱羧酶和醇脱氢酶是葡萄糖代谢途径中的关键酶, 与丙酮酸、 CO_2 、乙酸、乙醇的生成密切相关^[26]。由于在培养过程中 TYF-LIM-L09 表现出了较强的生产 CO_2 的特性, 因此使用粗酶液测定了 TYF-LIM-L09 的糖代谢关键酶活性, 表 4 中数据从酶学方面验证了该菌群的糖代谢能力。

3 结 语

课题组从 5 个不同批次的腐败醋样中分离获得了来源于 8 个已知属的 44 株细菌, 2 株未知属的菌株及 4 个稳定菌群。其中, 乳酸杆菌属、芽孢杆菌属和葡萄球菌属在相关研究中已经报道过, 而鲁梅利杆菌属、短波单胞菌属、肠球菌属、漫游球菌属和类芽孢杆菌属均是在本研究中首次分离获得, 说明腐败醋样本数量以及样本的酿造工艺来源对条件



(a) 不同乙醇体积分数对 TYF-LIM-L09 产气的影响



(b) 不同 pH 值对 TYF-LIM-L09 产气的影响

图 4 TYF-LIM-L09 在不同乙醇体积分数以及不同 pH 的培养条件下产气量的变化情况

Fig. 4 Gas production by TYF-LIM-L09 under different alcohol concentrations and pH values

表 4 TYF-LIM-L09 粗酶液的丙酮酸激酶、丙酮酸脱羧酶和醇脱氢酶活性

Table 4 Activities of pyruvate kinase, pyruvate decarboxylase, alcohol dehydrogenase in the cell-free supernatant of TYF-LIM-L09

酶名称	比酶活/(U/mg)
丙酮酸激酶	0.148 $\pm$ 0.006
丙酮酸脱羧酶	0.044 $\pm$ 0.004
醇脱氢酶	0.022 $\pm$ 0.003

致腐微生物的分离和筛选有着重要的影响。

本研究就强产气菌群 TYF-LIM-L09 的组成结构和生长特征进行了深入研究, 首次发现了导致胀气的关键微生物以稳定的群落形式存在, 这也从另一方面解释了前期相关研究中对食醋酿造条件致腐微生物鉴定结果不一致的问题。课题组在 TYF-

LIM-L09 的分离过程中使用了不同的选择性培养基,进行了多轮次划线分离,但单菌落的 16S rDNA 扩增结果始终为套峰,所以判断其为共生菌群,并对 TYF-LIM-L09 进行了宏基因组分类测序分析,分析结果也验证了之前的判断。TYF-LIM-L09 的宏基因组分类测序分析结果显示,其由乳酸杆菌属、假单胞菌属、短波单胞菌属、鞘氨醇单胞菌属、芽孢杆菌属、金黄色葡萄球菌属等不同种属的微生物组成,这当中就含有前期研究中报道较多的乳酸杆菌属和芽孢杆菌属^[27]。分析结果表明,条件致腐微生物的耐高温性质可能与其组成结构有关,同时也很好地解释了前期研究中分离获得的乳酸杆菌与致腐微生物耐高温特性之间的矛盾。

食醋酿造高温腐败现象虽然多发生在醋酸发

酵阶段,但在低浓度酒精发酵阶段也偶有发生,且腐败的成品醋多伴随着拉丝、胀气等变质现象。结合食醋高温腐败现象特征,作者对 TYF-LIM-L09 的温度、乙醇、pH 耐受及产气特征做了系统的研究,该菌群表现出了很好的乙醇耐受和产气能力,研究结果很好地支持了 TYF-LIM-L09 为引起食醋腐败的关键微生物。

随着研究的不断深入,发现引起食醋酿造高温腐败现象的微生物组成较为复杂,这些不同种群来源的微生物在营养代谢方面相互依赖、互为补充,形成了稳定的共生体系。探索研究核心致腐微生物菌群营养代谢特征的有效方法有利于揭示食醋酿造高温条件致腐现象的本质,对解决食醋酿造高温腐败问题也有着重要意义。

参考文献:

- [1] SOLIERI L, GIUDICI P. Vinegars of the World[M]. Italia: Springer Milan, 2009.
- [2] 马学曾. 食醋酿造技术发展趋势刍议[J]. 中国调味品, 2002, 27(12): 3-6.
- [3] NIE Z, ZHENG Y, XIE S, et al. Unraveling the correlation between microbiota succession and metabolite changes in traditional shanxi aged vinegar[J]. **Scientific Reports**, 2017, 7(1): 9240.
- [4] 杜宏福, 董爱静, 聂志强, 等. 电子舌分析山西老陈醋固态发酵过程及主要有机酸的预测[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(1): 196-201.
- [5] 余宁华, 陆震鸣, 许伟, 等. 基于主成分分析的中国发酵食醋有机酸含量差异性分析[J]. 食品与发酵工业, 2010(10): 144-148.
- [6] CHEN T, GUI Q, SHI J J, et al. Analysis of variation of main components during aging process of Shanxi Aged Vinegar[J]. **Acetic Acid Bacteria**, 2013, 2(1s): 6.
- [7] LIU D, ZHU Y, BEEFTINK R, et al. Chinese vinegar and its solid-state fermentation process[J]. **Food Reviews International**, 2004, 20(4): 407-424.
- [8] 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(11): 334-339.
- [9] 张怀敏, 段国锋, 李江涌, 等. 导致老陈醋产气微生物的分离和鉴定[J]. 山西农业大学学报: 自然科学版, 2016, 36(8): 594-598.
- [10] 王玉美, 卢红梅. 防止微生物引起食醋返浑的初步研究[J]. 中国调味品, 2016, 41(9): 15-19.
- [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] 翟磊, 苏姣姣, 刘洋, 等. 食醋中污染菌的分离与鉴定[J]. 生物技术通报, 2016, 32(3): 198-202.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 章文明, 汪海峰, 刘建新. 乳酸杆菌益生作用机制的研究进展[J]. 动物营养学报, 2012, 24(3): 389-396.
- [16] 刘墨, 王长文, 周海柱, 等. 乳酸杆菌的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2010, 31(4): 236-238.
- [17] GIRAFFA G, CHANISHVILI N, WIDYASTUTI Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology[J]. **Research in Microbiology**, 2010, 161(6): 480-487.
- [18] LIU S N, HAN Y, ZHOU Z J. Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods[J]. **Food Research International**, 2011, 44(3): 643-651.
- [19] 尹胜利, 杜鉴, 徐晨. 乳酸菌的研究现状及其应用[J]. 食品科技, 2012(9): 25-29.
- [20] NIE Z, ZHENG Y, DU H, et al. Dynamics and diversity of microbial community succession in traditional fermentation of Shanxi

- aged vinegar[J]. **Food Microbiology**, 2015, 47: 62-68.
- [21] 崔国艳. 耐高温乳酸菌的选育及应用研究[D]. 西安: 西北大学, 2007.
- [22] TAKAGI A, MATSUZAKI T, SATO M, et al. Enhancement of natural killer cytotoxicity delayed murine carcinogenesis by a probiotic microorganism[J]. **Carcinogenesis**, 2001, 22(4): 599-605.
- [23] WANG Z M, LU Z M, YU Y J, et al. Batch-to-batch uniformity of bacterial community succession and flavor formation in the fermentation of Zhenjiang aromatic vinegar[J]. **Food Microbiology**, 2015, 50: 64-69.
- [24] 刘超齐, 王平, 常娟, 等. 益生菌对温度、pH 及抗生素耐受性的研究[J]. 饲料研究, 2016(12): 19-25.
- [25] BISWAS R, PRABHU S, Lynd L R, et al. Increase in ethanol yield via elimination of lactate production in an ethanol tolerant mutant of clostridium thermocellum[J]. **Plos One**, 2014, 9(2): e86389.
- [26] RASTOGI M, SHRIVASTAVA S. Recent advances in second generation bioethanol production: an insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes[J]. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, 2017, 80: 330-340.
- [27] VEGAS C, MATEO E, GONZÁLEZ A, et al. Population dynamics of acetic acid bacteria during traditional wine vinegar production[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2010, 138(1): 130-136.

会 议 消 息

会议名称: 第六届化工、材料、食品工程国际学术会议(ICCMFE2020)

会议官网: <https://ais.cn/u/RJBjm2>

大会时间: 2020 年 7 月 3—5 日

大会地点: 中国—兰州

会议简介: 第六届化工、材料、食品工程国际学术会议(ICCMFE 2020) 将于 2020 年 7 月 3 日至 5 日在中国兰州隆重举行。会议主要围绕化工、材料以及食品工程等研究领域展开讨论。会议旨在为从事相关领域的专家学者、工程技术人员、技术研发人员提供一个共享科研成果和前沿技术, 了解学术发展趋势, 拓宽研究思路, 加强学术研究和探讨, 促进学术成果产业化合作的平台。大会诚邀国内外高校、科研机构专家、学者、企业界人士及其他相关人员参会交流。

收录检索: EI、SCOPUS 检索

大会秘书处: 姚老师

咨询邮箱: contact@iccmfe.org

手机/微信: 13922159104