



镇江香醋核心酿造微生物醋酸杆菌和乳酸杆菌共培养对生长代谢的影响

孙红¹, 柴丽娟², 陆震鸣^{2,4}, 张晓娟^{2,4}, 吉晋波¹, 史劲松³, 许正宏^{1,2,5*}

¹江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

²江南大学粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122

³江南大学药学院, 江苏 无锡 214122

⁴江苏省生物活性制品加工工程技术研究中心, 江苏 无锡 214122

⁵国家固态酿造工程技术研究中心, 四川 泸州 646000

摘要:【目的】研究镇江香醋酿造过程核心功能微生物醋酸杆菌属与乳酸杆菌属菌株之间的相互作用关系。

【方法】本文以分离到的镇江香醋酿造中的核心微生物 2 株醋酸杆菌和 8 株乳酸杆菌为研究对象, 构建醋酸杆菌和乳酸杆菌共培养发酵体系, 比较异位与原位条件下, 纯培养及共培养中菌株的生长和代谢(包括还原糖、乙醇和总酸等含量)差异; 采用 GC-MS 检测原位共培养中挥发性物质的变化, 分析微生物间的交互作用对镇江香醋主要风味物质形成的潜在影响。【结果】醋酸杆菌和乳酸杆菌之间的交互作用具有种间特异性和环境特异性, *A. pasteurianus* G3-2 和 *L. helveticus* M3-1、*L. plantarum* M10-1、*L. pontis* M17-5 及 *L. reuteri* GE7-1 在异位及原位模拟共培养中整体的生长和代谢优于纯培养; *A. pomorum* G15-6 和 *L. paracasei* E1-1 在异位和原位共培养下还原糖利用率和总酸的产生率都低于纯培养, 和 *L. helveticus* M3-1、*L. reuteri* GE7-1、*L. plantarum* M10-1、*L. fermentum* M10-3、*L. casei* E10-1、*L. pontis* M17-5、*L. hilgardii* M3-4 共培养在异位和原位模拟中代谢不一致。根据 GC-MS 分析显示, *A. pasteurianus* G3-2 和 *L. helveticus* M3-1 及 *L. reuteri* GE7-1 原位模拟共培养时异戊酸、乙酸乙酯、甲酸辛酯等风味物质的含量明显优于纯培养, 其中一种重要风味物质 2,3-丁二酮只在共培养时被检出, 其含量分别达到了 9.87 mg/L 及 14.28 mg/L。【结论】镇江香醋醋醅中的醋酸杆菌和乳酸杆菌之间的交互作用能够影响菌株生长和主要代谢产物生成, 这一研究有助于深入剖析镇江香醋风味形成的酿造机理, 为理性调控酿造菌群以改善镇江香醋风味品质奠定了理论基础。

关键词: 镇江香醋, 微生物相互作用, 乳酸杆菌(*Lactobacillus*), 醋酸杆菌(*Acetobacter*), 挥发性风味物质

基金项目: 国家自然科学基金(31771967); 国家轻工技术与工程一流学科自主课题(LITE2018-11)

*通信作者。Tel/Fax: +86-510-85918206; E-mail: zhenghxu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2020-08-18; 修回日期: 2020-11-09; 网络出版日期: 2021-02-03

镇江香醋主要以大米、糯米和麦麸为原料,经糖化、酒精发酵和醋酸发酵三个阶段酿造而成^[1]。它的特征风味物质主要包括乙酸、乳酸、苯乙醇、苯乙酸 3-甲基丁醛、2,3-丁二酮、3-羟基-2-丁酮、乙酸乙酯和四甲基吡嗪等^[2]。其中,苯乙醇、乙酸乙酯、2,3-丁二酮和 3-羟基-2-丁酮等也是四川麸醋、山西老陈醋中的关键风味物质^[3-4]。醋酸发酵阶段作为酿醋的关键环节,对镇江香醋风味物质的形成和产品质量具有重要影响,这一阶段的优势微生物主要分布在乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*)和醋酸杆菌属 (*Acetobacter*)^[5]。中国的传统谷物醋依照酿醋原料及生产工艺的不同被划分为多个品类,包括山西老陈醋、四川麸醋和天津独流老醋等,研究表明,乳酸杆菌属和醋酸杆菌属在这些传统谷物醋醋酸发酵过程中均为高丰度微生物^[6-8]。醋酸杆菌属和乳酸杆菌属微生物不仅在数量上占据优势,也是参与乙酸、乳酸及多种风味物质形成的重要功能菌^[9]。

前期的研究表明,镇江香醋酿造过程在多种醋酸杆菌和乳酸杆菌的共同参与下完成。通过宏基因组和克隆文库分析镇江香醋酿造菌群发现巴斯德醋杆菌 *Acetobacter pasteurianus* 和乳酸杆菌是参与乙偶姻代谢的主要功能微生物^[10]。基于乳酸合成关键酶的扩增子测序分析发现罗伊氏乳杆菌 *Lactobacillus reuteri* 和瑞士乳杆菌 *L. helveticus* 分别是镇江香醋发酵过程中产 D-和 L-乳酸的关键功能菌^[11]。醋酸杆菌物种种类相对单一,基于变性梯度凝胶电泳及克隆文库分析发现在镇江香醋醋醅中主要检测到的是巴斯德醋杆菌、波莫醋杆菌 *A. pomorum* 和中间葡萄糖醋杆菌 *Gluconacetobacter intermedius* 等^[12]。前期的这些研究对镇江香醋发酵过程中参与重要风味物质形

成的关键功能菌有了一定认识,但这些微生物之间的交互作用对镇江香醋风味品质的影响有待进一步研究。

本文围绕实验室前期从镇江香醋醋醅中筛选出的优势菌株 2 株醋酸杆菌和 8 株乳酸杆菌来研究醋醅主要微生物间的交互作用,探索了异位和原位模拟共培养状态下微生物的菌体形态、生长情况及主要代谢物的变化,分析了两两微生物的相互作用类型以及共培养对挥发性风味物质的影响,以期加深对酿醋功能微生物之间错综复杂交互作用机制的认识。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及培养基: 试验所用的 2 株醋酸杆菌(巴斯德醋杆菌 *A. pasteurianus* G3-2 和波莫醋杆菌 *A. pomorum* G15-6)和 8 株乳酸杆菌(副干酪乳杆菌 *L. paracasei* E1-1、瑞士乳杆菌 *L. helveticus* M3-1、罗伊氏乳杆菌 *L. reuteri* GE7-1、植物乳杆菌 *L. plantarum* M10-1、发酵乳杆菌 *L. fermentum* M10-3、干酪乳杆菌 *L. casei* E10-1、桥乳杆菌 *L. pontis* M17-5 和希氏乳杆菌 *L. hilgardii* M3-4)均分离筛选自镇江香醋醋醅。

(1) MRS 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 牛肉膏 10, 酵母提取物 5, 葡萄糖 20, 柠檬酸二铵 2, 乙酸钠 5, K_2HPO_4 2, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.19, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58, 吐温 80 1 mL, pH 6.2, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min, 配制固体 MRS 培养基时添加 2%琼脂。

(2) 肉汤培养基(g/L): 葡萄糖 25, 胰蛋白胨 10, 牛肉膏 10, 酵母提取物 5, NaCl 3, pH 7.0, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min, 配制固体肉汤

培养基时添加 2% 琼脂。

(3) 醋醅原位模拟培养基(wine-bran medium, WB 培养基): 在镇江香醋生产中, 醋酸发酵阶段麸皮和酒醅用量的比例为 1.9:4.5–5.2 左右, 因此, 按 1.9:5.2 的比例称取原料, 经混合、超声浸泡、过滤、灭菌后得到的浸出液为 WB 培养基。

1.1.2 主要试剂及仪器: (1) 主要试剂: MRS/肉汤培养基原料(国药集团化学试剂有限公司, 分析纯)、酒醅及麸皮等 WB 培养基原料(江苏恒顺醋业股份有限公司)、2-辛醇、乙酸及乳酸(Sigma-Aldrich 公司, 色谱级)、其他化学试剂(国药集团化学试剂有限公司, 分析纯)。

(2) 主要仪器: 酸碱滴定仪(太仓市实验设备厂)、紫外分光光度计 UV-2100 (上海尤尼克仪器有限公司)、日立 S-4800 场发射扫描电子显微镜(日本日立株式会社); Dionex Ultimate 3000 高效液相色谱仪(戴安中国有限公司)、Trace MS 气相色谱质谱仪(美国 FINNIGANMAT 公司)、Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Reader (BioTek Instruments)。

1.2 异位与原位共培养实验

将乳酸杆菌和醋酸杆菌进行平板菌落计数, 制备菌体密度为 10^7 CFU/mL 的种子液, 按照 1% 的接种量接种到含有 100 mL 培养基的 250 mL 三角瓶中。

1.2.1 异位共培养: 培养方式为乳酸杆菌使用 MRS 培养基静置培养; 醋酸杆菌使用肉汤培养基(添加 3% 乙醇)旋转式振荡培养, 转速为 220 r/min; 乳酸杆菌和醋酸杆菌按照 1:1 (接种的体积量都为 1%) 分别接种至 MRS 培养基(添加 3% 乙醇)静置共培养和肉汤培养基(添加 3% 乙醇)进行旋转式振荡共培养。培养温度为 37 °C, 培养时间为 72 h, 定时取样测定菌株生长和代谢情况, 设置 3 个平行实验。

1.2.2 模拟原位系统共培养: 乳酸杆菌和醋酸杆菌分别在 WB 培养基中进行模拟原位纯培养和共培养, 共培养接种比例为 1:1。为模拟镇江香醋翻醅工艺的供氧模式, 共培养过程采用间歇振荡方式培养, 间歇振荡的模式为 220 r/min (8 h), 再 0 r/min (8 h), 然后 220 r/min (8 h), 如此循环, 尽可能在接近原位环境状态下考察乳酸杆菌和醋酸杆菌的交互作用关系, 设置 3 个平行实验。

1.3 加性模型法对微生物相互作用类型的预测:

将指数生长末期的乳酸杆菌和醋酸杆菌纯培养液稀释至 $OD=0.04$, 按照 1:1 的接种比例进行两两组合共培养, 在多功能微孔板检测仪(synergy H1 hybrid multi-mode reader)上共培养 48 h 后, 用磷酸缓冲液(PBS)将生长至稳定期的培养物按照 1:30 的比例稀释, 再精确测量最终的 OD 值。按照加性模型计算相互作用分数^[13]。

$$\alpha = \frac{OD_{co} - (OD_A + OD_L)}{\sqrt{OD_A OD_L}}$$

式中 OD_{co} 、 OD_A 和 OD_L 分别代表乳酸杆菌和醋酸杆菌共培养、醋酸杆菌纯培养和乳酸杆菌纯培养 48 h 的菌液 OD 值, 使用这个公式计算, $\alpha > 0$ 表示协同作用, $\alpha < 0$ 表示拮抗作用。

1.4 微生物生长的检测

取发酵过程菌液 1 mL, 离心(12000 r/min, 5 min)后去上清液, 1 mL PBS 缓冲液重悬浮后用紫外分光光度计测量 OD_{600} 的变化情况。

1.5 还原糖、乙醇及总酸的检测

运用 DNS 比色法, 测量还原糖含量。利用重铬酸钾比色法测定乙醇含量。用滴定法测定总酸含量, 以 0.05 mol/L 标准氢氧化钠溶液进行滴定, 以 pH 8.2 为滴定终点。

1.6 有机酸的检测

使用色谱柱 Waters Atlantis T3 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)测定有机酸; 流动相: 20 mmol/L NaH₂PO₄, 调 pH 7.2; 进样体积: 10 μL; 流速: 0.7 mL/min; 柱温: 30 °C; 检测波长: UV210 nm^[9]。

1.7 动力学参数的计算

比生长速率: 使用 Origin 软件对 OD₆₀₀ 值进行 Logistic 非线性拟合得到拟合曲线, 再经 Origin 软件进一步处理数据得出比生长速率曲线; 底物的比消耗速率和产物的比合成速率与比生长速率的方法类似。

比生长速率 μ , 葡萄糖比消耗速率 Q_s 以及总酸、乙酸及乳酸的比生成速率 Q_p 参照公式(1-3)。

$$\mu = \frac{dY}{Ydt} \quad (1)$$

$$Q_s = \frac{dS}{Ydt} \quad (2)$$

$$Q_p = \frac{dP}{Ydt} \quad (3)$$

式中 Y 为 OD 值, S 代表底物浓度(g/L); P 代表产物浓度(g/L), t 代表时间, dY/dt 代表生长速率, dS/dt 代表底物的消耗速率, dP/dt 代表产物的生成速率。

1.8 醋醅原位模拟发酵中挥发性风味物质的检测

采用气相色谱-质谱(GC-MS)方法对挥发性产物进行检测^[14]。样品处理: 取 8 mL 发酵液, 在固相微萃取样品瓶中加入 2.5 g 固体氯化钠, 并加入 5 μL 2-辛醇溶液(2.62 g/L)为内标。萃取条件: 顶空固相微萃取。GC 条件: 进样口温度为 250 °C, 色谱柱规格为 TG-WAMS (60 m×250 μm×0.25 μm,

Thermo, USA), 以氦气为载气, 不分流进样; 升温程序为: 40 °C 恒温 2 min, 以 3 °C/min 速率升温至 130 °C, 以 6 °C/min 速率升温至 200 °C, 再以 8 °C/min 速率升温至 230 °C 维持 8 min。MS 条件: EI 电离源, 离子源温度为 260 °C, 界面温度为 200 °C, 离子源能量为 70 eV, 电子源扫描范围为 25–350 amu。将色谱峰质谱结果与 NIST08 谱库和 Willey 谱库中数据比对, 与谱库中某种化合物匹配度达到 800 或以上时, 认为该峰代表物质与库中化学物质相同, 实现定性。根据内标 2-辛醇的峰面积与浓度进行定量分析。

2 结果和分析

2.1 基于加性模型预测醋醅主要微生物交互作用类型

根据加性模型计算结果(表 1), *A. pasteurianus* G3-2 和 *L. hilgardii* M3-4、*L. pontis* M17-5、*L. casei* E10-1 的相互作用分数 α 小于 0, 推测它们之间为拮抗作用; 和 *L. paracasei* E1-1、*L. helveticus* M3-1、*L. reuteri* GE7-1、*L. plantarum* M10-1、*L. fermentum* M10-3 之间的相互作用分数 α 大于 0, 呈协同作用(表 1)。*A. pomorum* G15-6 和 *L. helveticus* M3-1 之间 α 为正值, 表现为协同作用; 和 *L. fermentum* M10-3、*L. hilgardii* M3-4 之间 α 为 0, 推测它们之间相互影响较小; 和 *L. paracasei* E1-1、*L. reuteri* GE7-1、*L. plantarum* M10-1、*L. casei* E10-1、*L. pontis* M17-5 之间 α 小于 0, 呈拮抗作用(表 1)。

表 1. 加性模型预测交互作用类型

Table 1. Interaction types predicted by additive model

Scores	M3-1	E1-1	M10-1	M10-3	M3-4	M17-5	E10-1	GE7-1
G3-2	0.16	0.07	0.33	0.28	-0.23	-0.05	-0.16	0.33
G15-6	0.27	-0.33	-0.26	0	0	-0.19	-0.07	-0.50

根据加性模型分析结果可初步断定醋酸杆菌和乳酸杆菌之间的相互作用类型具有种间特异性。

2.2 醋醅主要微生物的交互作用关系

在镇江香醋醋酸发酵阶段, 醋酸杆菌和乳酸杆菌是处于绝对主导地位的微生物, 醋酸杆菌和乳酸杆菌之间的交互作用在推动群落演替和保证镇江香醋品质的稳定性方面具有重要作用。

2.2.1 异位状态下醋醅主要微生物之间的交互作用:

通过分析醋酸杆菌和乳酸杆菌两两组合在纯培养和共培养中最大比生长和比代谢速率的变化, 发现大部分共培养体系的比生长速率和比代谢速率优于纯培养体系, 但有些组合在振荡或静置共培养中表现不一致(表 2)。整体来看, 醋酸菌 1 *A. pasteurianus* G3-2 与乳酸菌 *L. helveticus* M3-1、*L. plantarum* M10-1、*L. hilgardii* M3-4、*L. casei* E10-1、*L. reuteri* GE7-1 无论在静置共培养还是振

荡共培养状态中最大比生长速率和比代谢速率优于纯培养; 与乳酸菌 *L. paracasei* E1-1 在静置共培养时乙酸和乳酸的最大比生成速率都比纯培养低, 振荡共培养时总酸和乙酸的比生成速率也有一定程度的下降; 与乳酸菌 *L. fermentum* M10-3、*L. pontis* M17-5 共培养时整体的比代谢速率和纯培养相差不大, 与乳酸菌 *L. fermentum* M10-3 在振荡和静置共培养中最大比生长速率都有降低, 与乳酸菌 *L. pontis* M17-5 在静置共培养时最大比生长速率下降。醋酸菌 2 *A. pomorum* G15-6 与乳酸菌 *L. plantarum* M10-1、*L. fermentum* M10-3、*L. hilgardii* M3-4、*L. pontis* M17-5、*L. reuteri* GE7-1 在两种状态下共培养整体表现优于纯培养; 与乳酸菌 *L. helveticus* M3-1 和 *L. paracasei* E1-1 在振荡共培养中总酸和乙酸的最大比生成速率和纯培养相比有所下降, 静置共培养中乙酸的最大比生成速率也有下降, 但总酸和纯培养相差不大。

表 2. 异位状态醋酸杆菌与乳酸杆菌共培养最大生长和代谢比速率的变化

Table 2. Changes of specific growth and metabolic rate of *Acetobacter* and *Lactobacillus* in vitro co-culture

Co-culture groups		<i>A. pasteurianus</i> G3-2					<i>A. pomorum</i> G15-6				
		Δa	Δb	Δc	Δd	Δe	Δa	Δb	Δc	Δd	Δe
<i>L. helveticus</i> M3-1	S	0.02	0.12	5.6	0.65	-0.38	0.25	0.23	0.07	-0.23	0.95
	A	0.03	-0.01	4.5	1.9	0.1	0.12	0.51	-0.37	-0.19	0.45
<i>L. paracasei</i> E1-1	S	0.06	0.07	0.14	-0.53	-0.71	0.19	0.87	0.22	-0.16	-0.02
	A	0.51	0.04	-1.21	-0.76	0.20	0.07	0.70	-0.30	-0.34	0.84
<i>L. plantarum</i> M10-1	S	0.11	0.78	-0.09	-0.10	0.54	0.16	0.84	1.99	-0.12	1.38
	A	0.09	0.83	1.72	0.36	0.49	0.21	0.03	2.61	-0.04	0.90
<i>L. fermentum</i> M10-3	S	-0.01	0.05	-0.89	-0.57	0.08	-0.04	0.92	-0.14	0.57	0.19
	A	-0.30	0.28	0.02	0.14	-0.13	-0.02	0.32	0.86	0.83	0.67
<i>L. hilgardii</i> M3-4	S	0.26	0.75	2.18	1.24	0.67	0.27	0.25	1.19	0.27	0.35
	A	0.12	0.23	1.11	0.93	-0.31	0.20	0.83	0.96	0.21	0.32
<i>L. pontis</i> M17-5	S	-0.46	0.15	0.29	-0.52	0.22	-0.04	0.94	0.75	0.29	-0.18
	A	0.03	0.47	0.32	0.02	-0.21	0.20	0.20	0.78	0.16	0.99
<i>L. casei</i> E10-1	S	-0.19	0.13	1.14	0.62	0.48	-0.14	-0.37	0.03	0.24	0.37
	A	0	0.34	1.16	0.43	0.77	0	0.57	0.07	-0.01	0.44
<i>L. reuteri</i> GE7-1	S	-0.21	0	-0.19	3.25	0.14	0.20	0.84	3.19	0.36	0.03
	A	0.03	0.12	-0.30	2.24	0.02	0.10	0.45	2.10	0.30	0.27

A: shaking co-culture; S: static culture; Δa – Δe represent the differences of (Δa) maximum specific growth rate, (Δb) maximum specific consumption rate of glucose, (Δc) maximum specific production rate of total acid, (Δd) maximum specific production rate of acetic acid and (Δe) maximum specific production rate of lactic acid through minus the results of co-culture by mono-culture. Positive numbers: enhancement; negative numbers: reduction; 0: no differences.

2.2.2 模拟原位状态下醋醅主要微生物之间的交互作用: 我们进一步参考镇江香醋生产中醋醅环境条件进行原位模拟培养, 结果表明醋酸杆菌与乳酸杆菌在原位模拟培养状态下也表现出多样的相互作用关系(表 3)。其中, 醋酸菌 *A. pasteurianus* G3-2 和乳酸菌 *L. helveticus* M3-1、*L. paracasei* E1-1、*L. plantarum* M10-1、*L. fermentum* M10-3、*L. reuteri* GE7-1 共培养能够提高还原糖和乙醇的消耗速率; 与乳酸菌 *L. hilgardii* M3-4、*L. pontis* M17-5 共培养还原糖的最大消耗速率比纯培养要高, 总酸的最大生成速率比纯培养低; 与乳酸菌 *L. casei* E10-1 共培养代谢产物的速率和共培养相差不多。第二株醋酸菌 *A. pomorum* G15-6 与乳酸菌 *L. helveticus* M3-1 共培养时乙醇的最大消耗速率优于纯培养; 与乳酸菌 *L. casei* E10-1、*L. reuteri* GE7-1 共培养时还原糖最大消耗速率及总酸的最大生成速率优于纯培养; 与乳酸菌 *L. paracasei* E1-1、*L. plantarum* M10-1、*L. pontis* M17-5 共培养时整体的代谢速率比纯培养低; 与乳酸菌 *L. fermentum* M10-3、*L. hilgardii* M3-4 共培养时底物的消耗速率及总酸的生成速率和纯培养相

差不多。

2.3 *A. pasteurianus* G3-2 及 *L. helveticus* M3-1 的交互作用

2.3.1 异位状态下 *A. pasteurianus* G3-2 及 *L. helveticus* M3-1 的交互作用: 我们进一步针对醋醅菌群中的高丰度微生物 *A. pasteurianus* 和 *L. helveticus* 进行了互作关系的研究^[15]。两株菌的振荡共培养和静置共培养的最大比生长速率都略高于 *A. pasteurianus* G3-2 和 *L. helveticus* M3-1 纯培养体系(图 1-A, B)。*A. pasteurianus* G3-2 纯培养和振荡共培养体系中残糖最大比消耗速率相差不多, 但最终振荡共培养体系中残糖量比纯培养低。*L. helveticus* M3-1 纯培养和静置共培养体系均在前 24 h 内快速消耗葡萄糖, 比消耗速率达到最大, 其中静置共培养体系中残糖的最大比消耗速率高于纯培养体系(图 1-C, D)。总酸的变化趋势基本呈现先快速上升再逐渐下降或者趋于稳定的趋势, 静置和振荡共培养体系中最大比生成速率都优于纯培养体系(图 1-E, F)。共培养中乙酸的最大比生成速率都优于纯培养体系, 其中振荡共培养体系醋酸产量提高了 86.6%左右(图 1-G, H)。静

表 3. 原位模拟状态醋酸杆菌与乳酸杆菌共培养最大生长和代谢速率的变化

Table 3. Changes of growth and metabolic rate of *Acetobacter* and *Lactobacillus* in situ co-cultured

Co-culture groups	<i>A. pasteurianus</i> G3-2			<i>A. pomorum</i> G15-6		
	Δa	Δb	Δc	Δa	Δb	Δc
<i>L. helveticus</i> M3-1	0.41	0.17	0	-0.23	0.17	-0.03
<i>L. paracasei</i> E1-1	0.01	0.19	0.02	-0.14	-0.29	-0.02
<i>L. plantarum</i> M10-1	0.38	0.20	0.04	-0.22	0	-0.30
<i>L. fermentum</i> M10-3	0.24	0.01	0.15	0.03	-0.05	0
<i>L. hilgardii</i> M3-4	0.31	-0.27	-0.19	0.09	0.08	0
<i>L. pontis</i> M17-5	0.32	0.01	0.07	0.06	0.02	-0.32
<i>L. casei</i> E10-1	0.27	0	0.03	0.29	0	0.11
<i>L. reuteri</i> GE7-1	0.17	0.26	0.03	0.19	0.02	0.14

S/A: intermittent shaking co-culture; Δa - Δc represent the differences of (Δa) maximum consumption rate of glucose, (Δb) maximum consumption rate of ethanol, (Δc) maximum production rate of total acid through minus the results of co-culture by mono-culture. Positive numbers: enhancement; negative numbers: reduction; 0: no difference.

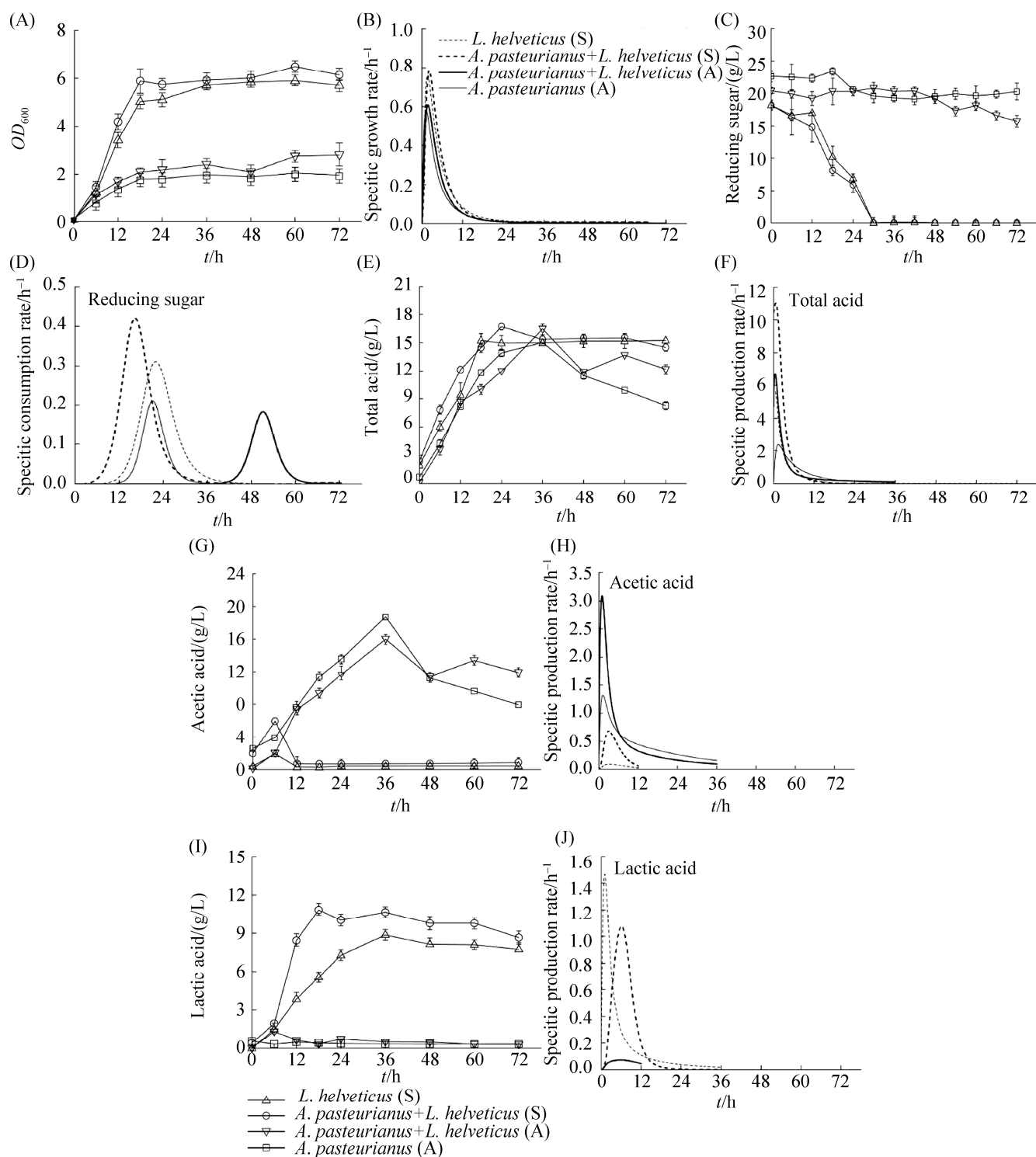


图 1. *A. pasteurianus* G3-2 和 *L. helveticus* M3-1 异位共培养时生长和代谢的变化

Figure 1. The changes of growth and metabolism of *A. pasteurianus* G3-2 and *L. helveticus* M3-1 in vitro co-culture. A–J represent the quantity changes and specific rate of growth (A, B), glucose (C, D), total acid (E, F), acetic acid (G, H) and lactic acid (I, J). A: shaking co-culture; S: static culture.

置共培养体系相较于纯培养体系乳酸的最大比生成速率有一定降低, 可能是 *L. helveticus* M3-1 产生的部分乳酸被 *A. pasteurianus* G3-2 利用(图 1-I, J)。结合以上代谢特征发现, *A. pasteurianus* G3-2 及 *L. helveticus* M3-1 共培养能够加快它们对底物的利用, 使得代谢产物的生成速率有不同程度的提高。

2.3.2 模拟原位状态下 *A. pasteurianus* G3-2 及 *L. helveticus* M3-1 的交互作用: 镇江香醋醋醅的主要原料有种醅、麸皮及酒醪等, 复杂的营养基底可能会影响微生物之间的交互作用类型。乙醇是 WB 培养基中的重要碳源, 在原位共培养中的乙醇的消耗速率低于纯培养(图 2-A), 总酸的最大生成速率略优于纯培养体系。因此原位共培养中 *A. pasteurianus* G3-2 及 *L. helveticus* M3-1 能够利用多种营养物质, 在一定程度上促进酸的积累(图 2-B)。

2.4 模拟醋醅系统原位共培养中挥发性风味物质的变化

醋酸杆菌及乳酸杆菌在原位模拟培养时, 部分共培养组合表现出令人愉悦的香味。因此, 对

A. pasteurianus G3-2、*L. helveticus* M3-1 及 *L. reuteri* GE7-1 纯培养及共培养 60 h 的样品进行 GC-MS 分析, 分析共培养对挥发性风味物质的影响(表 4)。*A. pasteurianus* G3-2 与 *L. helveticus* M3-1 及 *L. reuteri* GE7-1 共培养中 2,3-丁二酮、异戊酸、乙酸乙酯和甲酸辛酯等风味物质的含量明显高于纯培养, 且 2,3-丁二酮只在共培养时被检出。*A. pasteurianus* G3-2 与 *L. helveticus* M3-1 及 *L. reuteri* GE7-1 共培养时 2,3-丁二酮的含量分别达到了 9.87 mg/L 及 14.28 mg/L。

3 讨论

3.1 醋醅主要微生物在异位和原位状态下的生长和代谢

L. helveticus M3-1 纯培养和静置共培养体系均在前 24 h 内快速消耗葡萄糖, 比消耗速率达到最大, 其中静置共培养体系中还还原糖的最大比消耗速率优于纯培养体系(图 1-C, D), 葡萄糖和乙醇是镇江香醋固态酿造过程中可利用的主要碳源^[16], 实验室此前的研究表明乳酸杆菌在包含乙醇和葡

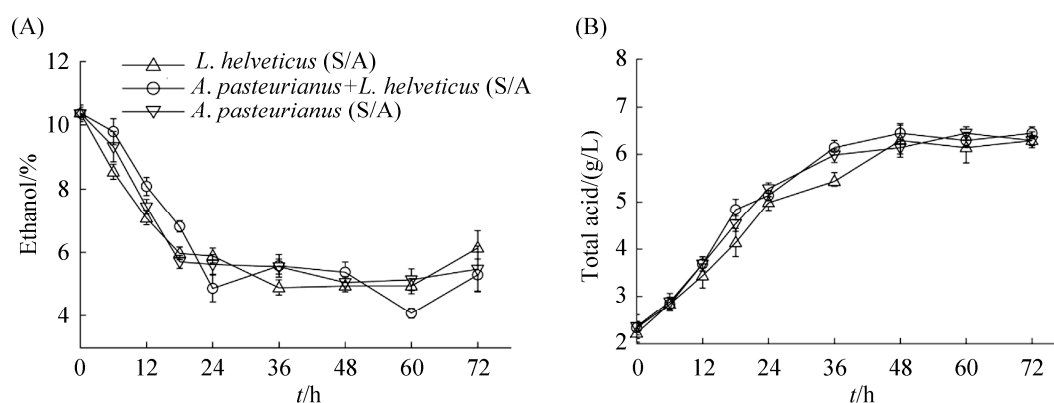


图 2. *A. pasteurianus* G3-2 与 *L. helveticus* M3-1 在原位共培养中代谢指标的变化

Figure 2. The changes of metabolism of *A. pasteurianus* G3-2 and *L. helveticus* M3-1 in situ co-culture. A and B represent the content changes of ethanol (A) and total acid (B). A: shaking co-culture; S: static culture; S/A: intermittent shaking co-culture.

表 4. 原位培养体系中关键挥发性物质含量
Table 4. Contents of key volatile compounds of *in situ* culture system

Content/(mg/L)	A	B	C	A+B	A+C	D
3-Methyl-1-butanol	724.82	726.68	879.48	725.02	792.01	793.42
Phenylethyl alcohol	792.46	767.51	995.01	790.19	887.91	860.88
Total alcohols	5314.23	5311.13	6518.77	5414.65	6181.32	5828.80
2-Furaldehyde	Nd	30.52	32.54	Nd	22.76	53.19
Benzaldehyde	81.56	108.01	120.52	55.84	80.36	117.39
Total aldehydes	145.85	198.68	267.08	123.51	167.41	183.31
Diacetyl	Nd	Nd	Nd	9.87	14.28	Nd
Total ketones	5.76	5.59	5.39	15.10	19.97	3.63
Isovaleric acid	7.89	3.30	4.49	8.75	4.50	3.11
Total acids	149.68	100.92	39.67	255.06	155.37	86.54
Ethyl acetate	243.02	172.73	169.37	247.63	300.84	174.80
Isoamyl acetate	18.24	9.42	8.88	14.63	13.50	Nd
Octyl formate	Nd	Nd	Nd	1.80	2.13	Nd
Ethyl phenylacetate	31.75	33.85	37.63	28.87	33.06	44.48
Ethyl 3-phenylpropionate	13.04	Nd	Nd	11.79	6.56	Nd
γ -Nonanolactone	Nd	4.37	Nd	Nd	Nd	Nd
Ethyl Stearate	Nd	Nd	Nd	Nd	3.40	Nd
Total esters	1900.63	1546.26	1861.59	1826.58	1919.56	1221.44
Total heterocycles	74.31	32.09	39.05	77.16	33.18	45.10

Nd: undetected; A: *A. pasteurianus*; B: *L. helveticus*; C: *L. reuteri*; D: control group.

葡萄糖的培养基中优先利用葡萄糖, 几乎不利用乙醇; 醋酸杆菌更倾向以乙醇作为碳源, 因此 *A. pasteurianus* G3-2 和 *L. helveticus* M3-1 在底物的利用方面不存在竞争关系。静置共培养前期乳酸含量迅速上升, 18 h 之后保持稳定, 最大比消耗速率也低于 *L. helveticus* M3-1 纯培养体系(图 1-I, J), 推测是总酸(主要是乙酸)含量逐渐上升, 开始抑制乳酸杆菌的生长。由于分子量低和脂溶性强, 乙酸能够很容易地穿透细菌细胞膜抑制乳酸杆菌的生长^[17]。已有研究表明, 在谷物醋的酿造中, 随着总酸的增加, 乳酸杆菌数量逐渐降低, 醋酸杆菌在后期占据优势^[5]。

采用原位模拟共培养来对 *A. pasteurianus* G3-2 和 *L. helveticus* M3-1 的交互作用进行进一步的研究。乙醇是 WB 培养基中的重要碳源, 在原位共培

养中的乙醇的消耗速率低于纯培养(图 2-A), 总酸的最大生成速率略优于纯培养体系(图 2-B)。WB 培养基中营养物质丰富, *A. pasteurianus* G3-2 除了利用培养基中的乙醇, 也会利用 *L. helveticus* M3-1 产生的乳酸和其他碳源, 因此乙醇的消耗速率可能比纯培养低。原位培养基对于研究群落中的微生物交互作用具有重要作用, 但其存在营养成分复杂、体系不稳定、制作工艺复杂等问题, 因此, 构建一种重复性好的原位模拟培养基来辅助解读群落交互作用具有重要意义。

3.2 醋醋主要微生物在不同培养状态下的交互作用类型

对比原位和异位下相互作用以及不同乳酸杆菌和醋酸杆菌的交互作用, 可以发现醋酸杆菌和乳酸杆菌之间的交互作用具有种间特异性和环境

特异性。*A. pasteurianus* G3-2 和 *L. helveticus* M3-1、*L. plantarum* M10-1、*L. pontis* M17-5 及 *L. reuteri* GE7-1 在振荡、静置状态下相互作用一致，*A. pomorum* G15-6 和 *L. paracasei* E1-1 之间的代谢特征在原位和异位下一致，和其他乳酸杆菌在 3 种共培养状态下都不一致。原位模拟状态下采用醋醅浸出液做培养基，营养成分的改变会影响相互作用类型。Megee 等^[18-19]研究发现核黄素营养缺陷 *L. casei* 和 *S. cerevisiae* 共培养体系中添加核黄素时，两者之间相互作用类型为竞争；不添加核黄素时，两者的相互作用关系为共生。相互作用类型随着营养条件的改变而改变。乳酸杆菌是兼性厌氧菌，醋酸杆菌是好氧菌，静置培养时供氧量低对乳酸杆菌的生长有利，振荡培养时供氧量高对醋酸杆菌的生长更有利，也会导致相互作用发生改变。

3.3 醋醅主要微生物共培养下风味物质的代谢差异

为了研究共培养对挥发性风味物质的代谢影响,我们选取原位模拟状态下 *A. pasteurianus* G3-2 与 *L. helveticus* M3-1 和 *L. reuteri* GE7-1 共培养和纯培养发酵液,分析挥发性风味物质的差异,重点关注了余永健等^[2]基于多元统计学方法筛选的特征性风味物质,检测结果列于表 4 中。从表中可以看出共培养中异戊酸、乙酸乙酯和甲酸辛酯等风味物质的含量明显优于纯培养,其中重要风味物质 2,3-丁二酮只在共培养中生成。*A. pasteurianus* G3-2 与 *L. helveticus* M3-1 或 *L. reuteri* GE7-1 共培养时,2,3-丁二酮的含量分别达到了 9.87 mg/L 及 14.28 mg/L。2,3-丁二酮经还原反应可以生成乙偶姻,它们是食醋中的重要香味贡献化合物,且是川芎嗪生成的重要底物^[20-21]。有研究表明,丙酮

酸是 2,3-丁二酮的重要前体物质,提高丙酮酸的胞内浓度可以有效促进双乙酰的生成^[22]。在共培养体系中,乙酸、乳酸及柠檬酸等有机酸的积累量增多,可能会促进丙酮酸到 2,3-丁二酮这一代谢支路中编码乙酰乳酸合成酶、柠檬酸裂解酶及草酰乙酸脱羧酶等基因的表达,促进 2,3-丁二酮的积累,具体的代谢机理有待于进一步研究。Comasio 等也发现外源添加柠檬酸可以促进 *L. casei* 纯培养体系中双乙酰、乙偶姻等风味物质的积累,这和我们的推测一致^[23-24]。

参考文献

- [1] Lu ZM, Wang ZM, Zhang XJ, Mao J, Shi JS, Xu ZH. Microbial ecology of cereal vinegar fermentation: insights for driving the ecosystem function. *Current Opinion in Biotechnology*, 2018(49): 88-93.
- [2] Yu YJ, Lu ZM, Yu NH, Xu W, Li GQ, Shi JS, Xu ZH. HS-SPME/GC-MS and chemometrics for volatile composition of Chinese traditional aromatic vinegar in the Zhenjiang region. *Journal of the Institute of Brewing*, 2012, 118(1): 133-141.
- [3] Tang QX, He GQ, Huang J, Wu CD, Jin Y, Zhou RQ. Characterizing relationship of microbial diversity and metabolite in Sichuan *Xiaoqu*. *Frontiers in Microbiology*, 2019(10): 696.
- [4] Zhu YP, Zhang FF, Zhang CN, Yang L, Fan GS, Xu YQ, Sun BG, Li XT. Dynamic microbial succession of Shanxi aged vinegar and its correlation with flavor metabolites during different stages of acetic acid fermentation. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 8612.
- [5] Wang ZM, Lu ZM, Shi JS, Xu ZH. Exploring flavour-producing core microbiota in multispecies solid-state fermentation of traditional Chinese vinegar. *Scientific Reports*, 2016(6): 26818.
- [6] Nie ZQ, Zheng Y, Xie SK, Zhang XL, Song J, Xia ML, Wang M. Unraveling the correlation between microbiota succession and metabolite changes in traditional Shanxi aged vinegar. *Scientific Reports*, 2017(7): 9240.
- [7] Ai M, Qiu X, Huang J, de Wu C, Jin Y, Zhou RQ.

- Characterizing the microbial diversity and major metabolites of Sichuan bran vinegar augmented by *Monascus purpureus*. *International Journal of Food Microbiology*, 2019(292): 83–90.
- [8] Nie ZQ, Zheng Y, Wang M, Han Y, Wang YN, Luo JM, Niu DD. Exploring microbial succession and diversity during solid-state fermentation of Tianjin duliu mature vinegar. *Bioresource Technology*, 2013(148): 325–333.
- [9] Wu LH, Lu ZM, Zhang XJ, Wang ZM, Yu YJ, Shi JS, Xu ZH. Metagenomics reveals flavour metabolic network of cereal vinegar microbiota. *Food Microbiology*, 2017(62): 23–31.
- [10] Lu ZM, Liu N, Wang LJ, Wu LH, Gong JS, Yu YJ, Li GQ, Shi JS, Xu ZH. Elucidating and regulating the acetoin production role of microbial functional groups in multispecies acetic acid fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(19): 5860–5868.
- [11] Chai LJ, Shen MN, Sun J, Deng YJ, Lu ZM, Zhang XJ, Shi JS, Xu ZH. Deciphering the d-/l-lactate-producing microbiota and manipulating their accumulation during solid-state fermentation of cereal vinegar. *Food Microbiology*, 2020(92): 103559.
- [12] 许伟. 镇江香醋醋酸发酵过程微生物群落及其功能分析. 江南大学博士学位论文, 2011.
- [13] Andrés AD, Benjamin O, Ren D, Tani T, Zachary FH, Zehra TG, William BL, Kerwyn CH. Bacterial interspecies interactions modulate pH-mediated antibiotic tolerance. *eLife*, 2020(9): e51493.
- [14] Xu PX, Chai LJ, Qiu T, Zhang XJ, Lu ZM, Xiao C, Wang ST, Shen CH, Shi JS, Xu ZH. *Clostridium fermenticellae* sp. nov., isolated from the mud in a fermentation cellar for the production of the Chinese liquor, baijiu. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2019, 69(3): 859–865.
- [15] Shen MN, Lu ZM, Zhang XJ, Chai LJ, Yu YJ, Shi JS, Xu ZH. Species-level diversity of lactate-producing bacteria in acetic acid fermentation of Zhenjiang aromatic vinegar. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2019, 25(6): 1434–1440. (in Chinese)
- 沈咪娜, 陆震鸣, 张晓娟, 柴丽娟, 余永建, 史劲松, 许正宏. 镇江香醋醋酸发酵阶段产乳酸功能细菌的物种多样性. *应用与环境生物学报*, 2019, 25(6): 1434–1440.
- [16] Wang ZM, Lu ZM, Yu YJ, Li GQ, Shi JS, Xu ZH. Batch-to-batch uniformity of bacterial community succession and flavor formation in the fermentation of Zhenjiang aromatic vinegar. *Food Microbiology*, 2015(50): 64–69.
- [17] Fernández A, Álvarez-Ordóñez A, López M, Bernardo A. Effects of organic acids on thermal inactivation of acid and cold stressed *Enterococcus faecium*. *Food Microbiology*, 2009, 26(5): 497–503.
- [18] Megee RD, Drake JF, Fredrickson AG, Tsuchiya HM. Studies in intermicrobial symbiosis. *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus casei*. *Canadian Journal of Microbiology*, 1972, 18(11): 1733–1742.
- [19] Little AEF, Robinson CJ, Peterson SB, Raffa KF, Handelsman J. Rules of engagement: interspecies interactions that regulate microbial communities. *Annual Review of Microbiology*, 2008(62): 375–401.
- [20] Xiao ZJ, Zhao L, Tian L, Wang LH, Zhao JY. GC-FID determination of tetramethylpyrazine and acetoin in vinegars and quantifying the dependence of tetramethylpyrazine on acetoin and ammonium. *Food Chemistry*, 2018(239): 726–732.
- [21] Xu W, Xu QP, Chen JH, Lu ZM, Xia R, Li GQ, Xu ZH, Ma YH. Ligustrazine formation in Zhenjiang aromatic vinegar: changes during fermentation and storing process. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2011, 91(9): 1612–1617.
- [22] Peyer LC, Zannini E, Arendt EK. Lactic acid bacteria as sensory biomodulators for fermented cereal-based beverages. *Trends in Food Science & Technology*, 2016(54): 17–25.
- [23] Comasio A, Harth H, Weckx S, De Vuyst L. The addition of citrate stimulates the production of acetoin and diacetyl by a citrate-positive *Lactobacillus crustorum* strain during wheat sourdough fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 2019(289): 88–105.
- [24] Cogan TM, O'Dowd M, Mellerick D. Effects of pH and sugar on acetoin production from citrate by *Leuconostoc lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1981, 41(1): 1–8.

Effect of co-culture of *Acetobacter* and *Lactobacillus* strains on growth and metabolism of the key functional microbes during Zhenjiang aromatic vinegar fermentation

Hong Sun¹, Lijuan Chai², Zhenming Lu^{2,4}, Xiaojuan Zhang^{2,4}, Jinbo Ji¹, Jinsong Shi³, Zhenghong Xu^{1,2,5*}

¹ Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

² National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

³ School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

⁴ Jiangsu Engineering Research Center for Bioactive Products Processing Technology, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

⁵ National Engineering Research Center of Solid-State Brewing, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Abstract: [Objective] To better explain the metabolic mechanism of microbial community during Zhenjiang vinegar fermentation, we studied the interaction between *Acetobacter* and *Lactobacillus*, the key functional microorganisms during multispecies solid-state acetic acid fermentation. [Methods] Here, two strains of *Acetobacter* and eight strains of *Lactobacillus* isolated from vinegar fermentation culture, namely, *Acetobacter pasteurianus* G3-2, *A. pomorum* G15-6, *Lactobacillus paracasei* E1-1, *L. helveticus* M3-1, *L. reuteri* GE7-1, *L. plantarum* M10-1, *L. fermentum* M10-3, *L. casei* E10-1, *L. pontis* M17-5, *L. hilgardii* M3-4, were selected for microbial growth and metabolism analysis in monoculture and coculture fermentation. We compared the differences of interaction types between *in vitro* fermentation and *in situ* fermentation, then GC-MS was used to analyze the effects of interaction on the flavor of Zhenjiang vinegar. [Results] Synergistic effect between *A. pasteurianus* G3-2 and *L. helveticus* M3-1, *L. plantarum* M10-1, *L. pontis* M17-5 and *L. reuteri* GE7-1 *in vitro* fermentation and *in situ* fermentation was identified. Negative effect between *A. pomorum* G15-6 and *L. paracasei* E1-1, however, *A. pomorum* G15-6 showed different effects on *L. plantarum* M10-1, *L. pontis* M17-5 and *L. reuteri* GE7-1 *in vitro* fermentation and *in situ* fermentation. Coculture of *A. pasteurianus* G3-2 and *L. helveticus* M3-1, *L. reuteri* GE7-1 showed better performance in 2,3-butanedione, valeric acid, ethyl acetate and octyl formate production than monoculture, and the yield of 2,3-butanedione increased from none detected to 9.87 mg/L and 14.28 mg/L. [Conclusion] The interaction between *Lactobacillus* and *Acetobacter* in Cupei can affect the changes of main metabolites and volatile substances. This work provides a theoretical basis for in-depth analysis of the brewing mechanism of Zhenjiang vinegar, lays the foundation for rational regulation of the microbial community and improving the flavor and quality of Zhenjiang vinegar.

Keywords: Zhenjiang vinegar, microbial interaction, *Lactobacillus*, *Acetobacter*, volatile flavor compounds

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31771967) and by the National First Class Subject of Light Industry Technology and Engineering (LITE2018-11)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85918206; E-mail: zhenghuxu@jiangnan.edu.cn

Received: 18 August 2020; Revised: 9 November 2020; Published online: 3 February 2021