DOI:10.12441/spyswjs.20221212002 [文章编号] 1673-1689(2025)04-0115-09

耐乙醇醋酸菌的选育及其在麦芽醋酿造中的应用

钱 沁[1,2,3,4] 张 明[5] 杨 华[1,2,3,4] 蔡国林[1,2,3,4] 李晓敏[1,2,3,4] 陆 健[1,2,3,4*] 吴殿辉[1,2,3,4]

(1. 江南大学生物工程学院,江苏 无锡 214122; 2. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214122; 3. 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; 4. 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; 5. 江苏省农垦麦芽有限公司,江苏 盐城 224399)

摘要:【目的】旨在选育一株乙醇耐受性优良且适合麦芽醋酿造的醋酸菌,同时提高其原料利用率及醋酸产量,从而改善成品醋品质。【方法】比较了热带醋杆菌 J-22(*Acetobacter tropicalis* J-22)、糖精葡糖醋杆菌 J-15(*Gluconacetobacter saccharivorans* J-15)和沪酿 1.01(*Acetobacter pasteurianus* HN 1.01)在不同乙醇体积分数(6%~10%)啤酒中的发酵能力,以产酸量(以乙酸质量浓度计)、乙醇转化率及感官评价为指标,确定综合评价最高的热带醋杆菌 J-22 为出发菌株,通过常压室温等离子体(atmospheric and room temperature plasma, ARTP)诱变结合高通量筛选(high-throughput screening, HTS)技术,最终选育出 1 株热带醋杆菌 J-2276。通过测定在不同乙醇体积分数下诱变菌株热带醋杆菌 J-2276 和出发菌株热带醋杆菌 J-22 的生长曲线和麦芽醋发酵性能,进一步验证了该诱变菌株的乙醇耐受性和发酵能力。【结果】诱变菌株热带醋杆菌 J-2276 在不同体积分数乙醇胁迫下的生长状况均得到显著改善且能耐受体积分数为 11% 的乙醇,其发酵的麦芽醋中乙酸质量浓度较出发菌株热带醋杆菌 J-22 提高了 65.0%。较高的乙醇耐受性也使诱变菌株热带醋杆菌 J-2276 产生更丰富的风味物质,其发酵的麦芽醋中总有机酸质量浓度和总挥发性物质质量浓度较出发菌株热带醋杆菌 J-22 均提高了 45.3%。【结论】该研究通过采用 ARTP 诱变和 HTS 相结合的方法选育出 1 株耐乙醇热带醋杆菌 J-2276,且其连续传代 7 次后遗传性能稳定,有效提高了麦芽醋发酵的产酸量,改善了麦芽醋产品的滋味和风味,具有广泛的应用前景。

关键词:麦芽醋;醋酸菌;常压室温等离子体诱变;高通量筛选;乙醇耐受性

Breeding of an Ethanol-tolerant Acetic Acid Bacterial Strain and Application of the Strain in Malt Vinegar Brewing

QIAN Qin[1,2,3,4] *ZHANG Ming*[5] *YANG Hua*[1,2,3,4] *CAI Guolin*[1,2,3,4] *LI Xiaomin*[1,2,3,4] *LU Jian*[1,2,3,4*] *WU Dianhui*[1,2,3,4]

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. National Engineering Research Center of Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 4. Jiangsu Provincial Research Center for Bioactive Product Processing Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 5. Jiangsu Nongken Malt Company Limited, Yancheng 224399, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to breed an elite strain of acetic acid bacteria with ethanol tolerance and suitable for malt vinegar brewing, thereby improving the utilization of raw materials, the yield of acetic acid, and the quality of the final vinegar product. [**Method**] The fermentation capacity of *Acetobacter tropicalis* J-22, *Gluconacetobacter saccharivorans* J-15, and *Acetobacter pasteurianus* HN 1.01 in beer with different volume

基金项目:高等学校学科创新引智计划(111 计划)项目(111-206);江苏高校优势学科建设工程资助项目(164320H116)。
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
收稿日期:2022-12-12 **修回日期:**2023-03-09

fractions (6%~10%) of ethanol was compared. Based on the acetic acid yield (acetic acid mass concentration), ethanol conversion rate, and sensory evaluation, *Acetobacter tropicalis* J-22 , which achieved the highest overall assessment, was identified as the original strain. *Acetobacter tropicalis* J-2276 was finally bred through atmospheric and room temperature plasma (ARTP) mutagenesis combined with high-throughput screening (HTS). The growth curves and malt vinegar fermentation performance of the mutant strain *Acetobacter tropicalis* J-2276 and the original strain *Acetobacter tropicalis* J-22 under different volume fractions of ethanol further verified the ethanol tolerance and fermentation capacity of the mutant strain. [**Result**] The mutant strain *Acetobacter tropicalis* J-2276 exhibited significantly improved growth under ethanol stress at various volume fractions and tolerated the ethanol volume fraction up to 11%. Compared with the original strain *Acetobacter tropicalis* J-22, the mutant strain *Acetobacter tropicalis* J-2276 increased the acetic acid mass concentration of malt vinegar by 65.0%. Furthermore, the mutant strain *Acetobacter tropicalis* J-2276 with higher ethanol tolerance produced richer flavor compounds, with the mass concentrations of total organic acids and total volatile compounds increasing by 45.3% compared with the original strain *Acetobacter tropicalis* J-22. [**Conclusion**] This study demonstrates the successful breeding of an ethanol-tolerant strain, *Acetobacter tropicalis* J-2276, by ARTP mutagenesis and HTS. The strain exhibits stable genetic traits after seven successive generations, effectively increases the acid yield in malt vinegar fermentation, and improves the flavor quality of malt vinegar products, demonstrating broad application prospects.

Keywords: malt vinegar; acetic acid bacteria; atmospheric and room temperature plasma; high-throughput screening; ethanol tolerance

麦芽醋是以大麦芽为原料，经过糖化、乙醇发酵和醋酸发酵制成。目前，麦芽醋发酵多采用粮食醋工业生产中常用的醋酸菌沪酿 1.01[1-2]和醋酸杆菌 AS1.41[3]，缺少专用醋酸菌，导致产品中风味物质种类单一且含量较少，口感单薄。孙欣瑶[1]对沪酿 1.01 发酵的麦芽醋中有机酸进行了检测，只检出草酸、酒石酸、乙酸及琥珀酸 4 种有机酸。其中，除乙酸外，其他有机酸的质量浓度均低于 7.4 g/L。在醋酸菌发酵产酸的过程中，乙醇作为醋酸发酵的底物，为醋酸菌的生长代谢提供能量。但当乙醇体积分数超过 4% 时，其具有一定的抑菌作用[4]，且过高体积分数的乙醇会给醋酸菌带来底物抑制作用，这都抑制了醋酸菌的生长，导致产酸量降低[5]。张涛[6]利用自选醋酸菌 A-4 进行麦芽醋发酵，当初始乙醇体积分数从 3% 增加至 8% 时，产酸量从 50 g/L 减至 27 g/L。因此，选育乙醇耐受性优良且适合麦芽醋发酵的醋酸菌是目前亟待解决的问题。

ARTP 是一种新型诱变育种技术，具有操作简便、突变效率高、环境安全性高等优点[7]。潘红菊[8]利用 ARTP 诱变选育出 1 株巴氏醋杆菌（*Acetobacter pasteurianus*）NF-171.24，其在乙醇体积分数为 10% 的液体培养基中产酸量达到 79.20 g/L，与出发菌株相比提高了约 62%。

作者以热带醋杆菌 J-22、糖精葡糖醋杆菌 J-15、沪酿 1.01 为研究对象，通过将其直接应用于不同乙醇体积分数啤酒中进行麦芽醋发酵，筛选出产酸量、乙醇转化率与感官评价综合最佳的热带醋杆菌 J-22，并以其为出发菌株，利用 ARTP 诱变和 HTS 相结合的方法，进一步筛选耐乙醇突变菌株。通过比较诱变前后菌株的乙醇耐受性及发酵特性，解析了诱变菌株在麦芽醋发酵中的优势，以期为麦芽醋酿造行业提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

葡萄糖、酵母提取物、琼脂粉：国药集团化学试剂有限公司；草酸、酒石酸、苹果酸、2-辛醇等标准品：上海阿拉丁生化科技股份有限公司；Metcalfe 麦芽：江苏省农垦麦芽有限公司；Mosaic 酒花：美国雅基玛联合酒花有限公司；酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）S-04：比利时弗曼迪斯酵母有限公司；热带醋杆菌 J-22、糖精葡糖醋杆菌 J-15：由江南大学粮食发酵与食品生物制造国

家工程研究中心从高酸度水果中筛选获得，具有较好的耐酸性；沪酿1.01：上海保藏生物技术中心。

GY培养基：10 g葡萄糖和10 g酵母粉用蒸馏水溶解并定容至1 000 mL，115 ℃灭菌20 min，冷却后加入质量浓度为30 g/L的无水乙醇（0.22 μm滤膜过滤）；配制固体培养基时加入碳酸钙20 g、琼脂粉15~20 g。

啤酒制备：参照曹春蕾等[9]的方法，制备15 °P麦汁。麦汁冷却后接种1×10^7 CFU/mL的酿酒酵母S-04，20 ℃发酵至质量损失小于0.2 g/d时结束（此时乙醇体积分数为7.5%）。

初筛培养基：利用麦汁和食用乙醇调节啤酒中乙醇体积分数至6%~10%。

1.2　仪器与设备

麦芽标准粉碎机：EBC-LF型，北京德之杰啤酒技术有限公司；自动糖化仪：KY736型，北京凯云仪科技有限公司；等离子诱变系统：ARTP-II型，北京思清源生物技术有限公司；高效液相色谱仪：UltiMate 3000型，美国Dionex公司；顶空-气相色谱-质谱联用（HS-SPME-MS）仪：赛默飞世尔科技（中国）有限公司；多功能酶标仪：SynergyMx型，美国Bio Tek公司。

1.3　研究方法

1.3.1　醋酸菌初步筛选

将热带醋杆菌J-22、糖精葡糖醋杆菌J-15、沪酿1.01分别接种于GY培养基中进行二次活化（30 ℃、220 r/min、36 h），按体积分数10%分别接种至含乙醇体积分数为6%、7%、8%、9%、10%的初筛培养基中，在30 ℃、220 r/min条件下进行摇瓶发酵，每24 h测定产酸量（以乙酸质量浓度计），当产酸量不再变化时结束发酵，按式（1）计算乙醇转化率，并对过滤后的发酵液进行感官评价，挑选产酸量、乙醇转化率和感官评价综合最佳的菌株为目的菌株进行后续试验。

$$A_C=\frac{\rho_a}{\Delta\rho_{al}\times 1.304}\times 100\% \quad (1)$$

式中：

A_C——乙醇转化率，%；

ρ_a——发酵结束后生成的乙酸质量浓度，g/L；

$\Delta\rho_{al}$——发酵过程中消耗的乙醇质量浓度，g/L；

1.304——乙酸与乙醇的质量比，g/g。

1.3.2　ARTP诱变

菌体培养及样品载片的制备和处理参考文献[10]。诱变条件：功率100 W，气流量10 L/min，距离2 mm，诱变时间分别为15、30、45、60、75、90、105、120 s。取100 μL诱变后的稀释液涂布于GY固体培养基，30 ℃倒置培养3 d，以未经ARTP诱变处理的菌悬液作为对照，按式（2）计算菌株的致死率。

$$R_L=\frac{N_0-N_1}{N_0}\times 100\% \quad (2)$$

式中：

R_L——菌株的致死率，%；

N_0——未经诱变处理的菌落数，CFU/mL；

N_1——诱变处理后的菌落数，CFU/mL。

1.3.3　HTS

1）初筛：挑取上述ARTP诱变涂布平板上长出的醋酸菌单菌落，分别接种至装有GY培养基（调节乙醇体积分数为7.5%）的96孔板中，30 ℃、220 r/min培养3 d后用多功能酶标仪测定其OD_{600}值，以OD_{600}值较出发菌株提高20%以上的菌株为正向突变菌株。

2）复筛：将筛选的正向突变菌株按体积分数10%分别接种于啤酒中，装液体积分数为40%，在30 ℃、220 r/min条件下进行摇瓶培养，每24 h测定产酸量，至其不再变化时结束发酵，并计算乙醇转化率，选择产酸量和乙醇转化率高的菌株进行后续试验。

1.3.4　诱变菌株乙醇耐受性验证

诱变菌株热带醋杆菌J-2276和出发菌株热带醋杆菌J-22按体积分数10%分别接种至含乙醇体积分数为7%、8%、9%、10%、11%、12%的GY培养基中，在30 ℃、220 r/min条件下进行摇瓶培养，每12 h测定OD_{600}值，绘制生长曲线。

1.3.5　发酵试验

发酵条件同1.3.3中复筛。将诱变菌株和出发菌株应用于麦芽醋发酵，测定最终发酵液的理化指标并进行感官评价。

1.3.6　正向突变菌株遗传稳定性分析

将诱变菌株热带醋杆菌J-2276应用于麦芽醋发酵，然后以8 000 r/min离心5 min，收集醋酸菌并

接种于GY培养基中，在30 ℃、220 r/min条件下摇瓶培养36 h，再次接种进行麦芽醋发酵，共传代7次。测定每代麦芽醋的产酸量，并计算乙醇转化率，以此判断菌株的遗传稳定性。

1.3.7 麦芽醋中理化指标和风味物质质量浓度测定

麦芽醋中pH、还原糖质量浓度、产酸量、乙醇体积分数的测定参考文献[11]；有机酸质量浓度的测定参考文献[12]；挥发性风味物质质量浓度的测定参考文献[13]。

1.3.8 关键风味物质确定

基于相对气味活度值（relative odor activity value，ROAV）评价麦芽醋中各挥发性物质对其总体香气的贡献[14]，其中ROAV>1为关键风味物质。以贡献最大风味物质的ROAV为100.00，按式（3）计算其他成分的ROAV。

$$V_{ROA}=\frac{\rho T_0}{\rho_0 T}\times 100 \quad (3)$$

式中：

V_{ROA}——其他成分的ROAV；

ρ_0——贡献最大风味物质的质量浓度，μg/L；

T_0——贡献最大风味物质的阈值，μg/L；

ρ——其他风味物质的质量浓度，μg/L；

T——其他风味物质的阈值，μg/L。

1.3.9 麦芽醋感官评价

由10名专业人员分别对麦芽醋的外观、风味、口感和整体印象打分，感官评价标准参考文献[1]。

1.3.10 数据分析

每个试验重复3次，数据以平均值±标准偏差表示，利用SPSS 26.0进行显著性分析和单因素方差分析（P<0.05），利用Origin 2018绘图。

2 结果与讨论

2.1 麦芽醋酿造用醋酸菌的初步筛选结果

热带醋杆菌J-22、糖精葡糖醋杆菌J-15和沪酿1.01在不同乙醇体积分数初筛培养基中发酵结束后的产酸量、乙醇转化率及感官评价结果如图1所示。当乙醇体积分数在6%~8%时，各菌株产酸量随着乙醇体积分数的增加而增加；但当乙醇体积分数高于8%时，热带醋杆菌J-22和糖精葡糖醋杆菌J-15的产酸量随乙醇体积分数的增加呈下降趋势，表明高体积分数乙醇抑制了醋酸菌的生长[15]。热带醋杆菌J-22与沪酿1.01在各乙醇体积分数下的产酸量和乙醇转化率较糖精葡糖醋杆菌J-15有明显优势。尤其是沪酿1.01，随着乙醇体积分数的升高，其产酸量一直保持小幅度增长，但感官评价整体偏低，具有不良风味，而感官特性是评价麦芽醋品质的一项重要指标。因此，选择热带醋杆菌J-22作为出发菌株进行进一步诱变，以提高其在高体积分数乙醇下的耐受性及产酸能力。

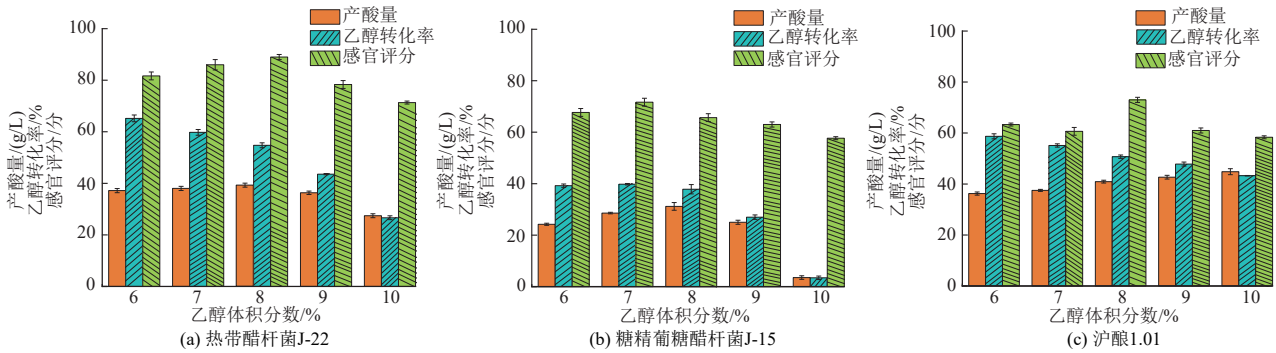


图1 不同醋酸菌在不同乙醇体积分数下的发酵性能

Fig. 1 Fermentation characteristics of different acetic acid bacteria under different volume fractions of ethanol

2.2 耐乙醇醋酸菌的选育

现代育种学认为诱变致死率≥95%时可得最佳突变体，因为在此条件下正突变率最高[16-17]。图2为不同诱变时间下热带醋杆菌J-22的致死率，在诱变时间为105 s时，致死率达到97.3%，而当诱变时间继续延长至120 s时，致死率接近100.0%。因此，选择诱变时间为105 s和120 s。然而，在此条件下非致死的目的表型菌株占比小，因此需经多次诱变以获得最佳菌株[18]。

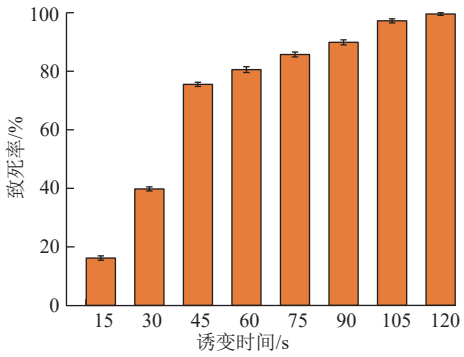


图 2　不同 ARTP 诱变时间下热带醋杆菌 J-22 的致死率

Fig. 2　Lethality rate of *Acetobacter tropicalis* J-22 under different mutagenesis times of ARTP

将 105、120 s 诱变时间下获得的 457 株诱变菌株接入 96 孔板，发酵 72 h 后测定 OD_{600} 值，筛选出 OD_{600} 值较出发菌株热带醋杆菌 J-22 提高 20% 以上的 10 株正向突变菌株，接种于啤酒中进行麦芽醋发酵，发酵结束后麦芽醋中产酸量和乙醇转化率结果如图 3 所示。10 株诱变菌株的产酸量为 34.68~55.18 g/L，乙醇转化率为 50.8%~76.37%，其中诱变菌株热带醋杆菌 J-2276 的产酸量及乙醇转化率最高，分别达到 55.18 g/L 和 76.37%，较出发菌株热带醋杆菌 J-22 分别提高了 47.1% 和 35.0%，表明通过诱变选育出了一株性能优良的菌株。

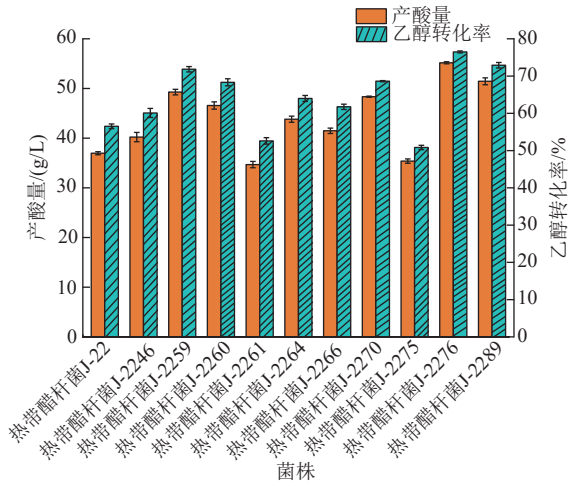


图 3　不同诱变菌株的发酵性能

Fig. 3　Fermentation characteristics of different mutant strains

2.3　诱变菌株的乙醇耐受性及遗传稳定性

高效氧化高体积分数乙醇是获得高酸度食醋的前提。如图 4 所示，随着乙醇体积分数的增加，出发菌株热带醋杆菌 J-22 和诱变菌株热带醋杆菌 J-2276 的生长性能均呈下降趋势。高体积分数乙醇胁迫条件下醋酸菌菌体细胞内的碳代谢、脂代谢与氨基酸代谢会发生一定程度的变化，菌株的 EMP 途径和 TCA 循环被抑制，从而生长也受到抑制[19]。培养 72 h 后，诱变菌株热带醋杆菌 J-2276 在不同乙醇体积分数下（7%、8%、9%、10%、11%）的 OD_{600} 值较出发菌株热带醋杆菌 J-22 分别提高了 31.2%、39.4%、53.5%、82.7%、132.7%，表明 ARTP 诱变显著提高了醋酸菌的乙醇耐受性。另外，当乙醇体积分数为 12% 时，诱变菌株热带醋杆菌 J-2276 生长缓慢，而出发菌株热带醋杆菌 J-22 几乎停止生长，说明其最高可耐受体积分数为 11% 的乙醇。连续传代 7 次后诱变菌株热带醋杆菌 J-2276 的产酸量和乙醇转化率保持相对稳定（见图 5），表明经 ARTP 诱变的菌株仍具有较好的遗传稳定性，这与

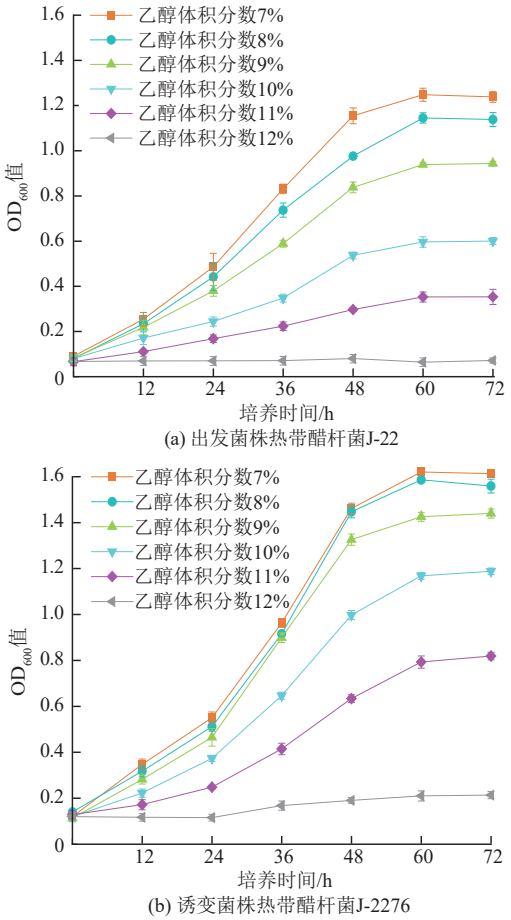
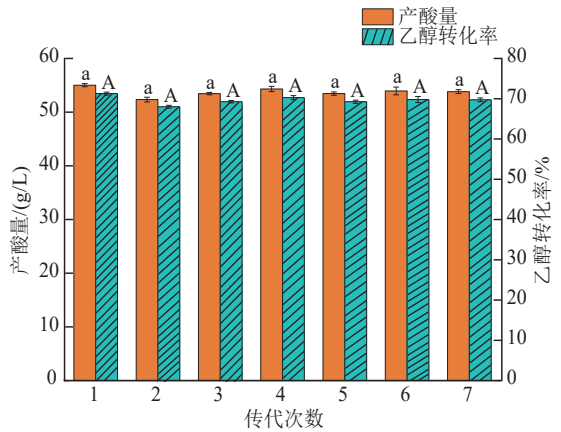


图 4　出发菌株热带醋杆菌 J-22 和诱变菌株热带醋杆菌 J-2276 在不同乙醇体积分数下的生长曲线

Fig. 4　Growth curves of the original strain *Acetobacter tropicalis* J-22 and the mutant strain *Acetobacter tropicalis* J-2276 under different volume fractions of ethanol

黎青华等[20]的研究一致，且该菌株适用于麦芽醋发酵。



相同字母表示不同传代次数的同一指标下无显著差异（P>0.05）。

图 5 诱变菌株热带醋杆菌 J-2276 的遗传稳定性

Fig. 5 Genetic stability of the mutant strain *Acetobacter tropicalis* J-2276

2.4 麦芽醋理化指标及感官评价

将诱变菌株热带醋杆菌 J-2276 和出发菌株热带醋杆菌 J-22 分别进行麦芽醋发酵，发酵液中常规理化指标测定结果和感官评价结果见表 1。诱变菌株热带醋杆菌 J-2276 发酵液中产酸量和乙醇转化率均较高，分别达到 55.18 g/L 和 76.37%，较出发菌株热带醋杆菌 J-22 分别提高了 47.1% 和 35.0%。诱变菌株热带醋杆菌 J-2276 发酵的麦芽醋中乙醇体积分数和还原糖质量浓度均显著降低（P<0.05），可能是由其生长代谢消耗更多的还原糖且发酵过程中底物乙醇发生更多的酯化反应所致。另外，诱变菌株热带醋杆菌 J-2276 进行麦芽醋发酵时起酵快，发酵时间较出发菌株热带醋杆菌 J-22 缩短 1 d，以上结果与吴晓英[10]的研究一致。诱变菌株热带醋杆菌 J-2276 发酵的麦芽醋特征香气突出，无异香，澄清透明，感官评价最高。这说明其适用于麦芽醋发酵。

2.5 麦芽醋中有机酸分析

对诱变菌株热带醋杆菌 J-2276 和出发菌株热带醋杆菌 J-22 发酵的麦芽醋中有机酸质量浓度进行测定，结果见表 2。发酵结束后，诱变菌株热带醋杆菌 J-2276 发酵液中总有机酸质量浓度显著高于出发菌株热带醋杆菌 J-22（P<0.05），提高了 45.3%。麦芽醋中乙酸、琥珀酸及草酸质量浓度较高，其他有机酸质量浓度虽低，但对食醋滋味的形成有重要贡献[21]。诱变菌株热带醋杆菌 J-2276 和出发菌株热带醋杆菌 J-22 发酵液中有机酸种类相对一致，除柠檬酸外，诱变菌株热带醋杆菌 J-2276 发酵液中其他有机酸质量浓度均有所提升，其中草酸、乳酸、乙酸及琥珀酸质量浓度显著提高（P<0.05）。乙酸作为麦芽醋发酵的主要有机酸，是麦芽醋酸味的主体，诱变菌株热带醋杆菌 J-2276 发酵液中乙酸质量浓度较出发菌株热带醋杆菌 J-22 提高了 65.0%。

2.6 麦芽醋中关键风味物质分析

采用 HS-SPME-MS 方法对诱变菌株热带醋

表 1 麦芽醋理化指标及感官评价

Table 1 Physicochemical indexes and sensory evaluations of malt vinegar

菌株	pH	产酸量/(g/L)	乙醇体积分数/%	还原糖质量浓度/(g/L)	乙醇转化率/%	发酵时间/d	感官评分/分
诱变菌株热带醋杆菌 J-2276	3.10±0.02^{b}	55.18±0.54^{a}	0.48±0.14^{b}	12.55±0.16^{b}	76.37±0.45^{a}	8	94.10±0.23^{a}
出发菌株热带醋杆菌 J-22	3.32±0.02^{a}	37.50±0.48^{b}	1.06±0.21^{a}	15.81±0.44^{a}	56.58±1.21^{b}	9	90.82±0.15^{b}

注：同行不同字母表示差异显著（P<0.05）。

表 2 麦芽醋中有机酸质量浓度

Table 2 Mass concentrations of organic acids in malt vinegar

菌株	质量浓度/(g/L)						
	草酸	酒石酸	苹果酸	乳酸	乙酸	柠檬酸	琥珀酸
诱变菌株热带醋杆菌 J-2276	5.52±0.17^{a}	0.95±0.09^{a}	1.26±0.04^{a}	2.01±0.04^{a}	27.84±0.35^{a}	1.89±0.04^{a}	9.35±0.07^{a}
出发菌株热带醋杆菌 J-22	4.20±0.14^{b}	0.73±0.09^{a}	1.03±0.01^{a}	0.72±0.03^{b}	16.87±0.88^{b}	2.01±0.08^{a}	8.05±0.32^{b}

注：同行不同字母表示差异显著（P<0.05）。

杆菌J-2276和出发菌株热带醋杆菌J-22发酵的麦芽醋中挥发性风味物质进行测定，结果见表3。在2株醋酸菌发酵的麦芽醋中共检测出45种挥发性物质，其中酸类7种、醇类7种、酯类17种、醛酮类12种、其他类2种。较高的乙醇耐受性使诱变菌株热带醋杆菌J-2276产生更丰富的香气物质，其发酵液中总挥发性物质质量浓度较出发菌株热带醋杆菌J-22提高了45.3%，其中酸类、酯类和醛酮类挥发性物质总质量浓度分别提高了46.3%、67.6%、75.7%，而诱变菌株热带醋杆菌J-2276发酵液中醇类物质的减少可能是因为酯化反应产生了相应的酯类物质[22]。另外，诱变菌株热带醋杆菌J-2276发酵液中乙酸乙酯、乙酸异戊酯、乙酸苯乙酯质量浓度较出发菌株热带醋杆菌J-22分别提高了81.8%、77.4%、82.8%，且这3种物质总质量浓度占总酯类的73.7%，而乙酸乙酯和乙酸异戊酯具有果香，乙酸苯乙酯具有玫瑰香，均对麦芽醋的香气具有积极作用。

ROAV能更加准确地表明麦芽醋中关键香气贡献化合物，利用各香气物质的气味阈值进行ROAV分析[23]。如表4所示，在诱变菌株热带醋杆菌J-2276和出发菌株热带醋杆菌J-22发酵的麦芽醋中共检出12种ROAV>1的物质，表明这12种风味物质对麦芽醋风味作出主要贡献，为关键风味物质，诱变菌株热带醋杆菌J-2276与出发菌株热

表3　麦芽醋中挥发性物质半定量分析

Table 3　Semi-quantitative analysis of volatile components in malt vinegar

化合物类别	序号	化合物名称	质量浓度/(μg/L)		化合物类别	序号	化合物名称	质量浓度/(μg/L)	
			诱变菌株热带醋杆菌J-2276	出发菌株热带醋杆菌J-22				诱变菌株热带醋杆菌J-2276	出发菌株热带醋杆菌J-22
酸类	1	乙酸	2 565.02±8.71^{a}	1 609.96±4.12^{b}	酯类	24	苯乙酸乙酯	9.38±2.89^{b}	35.14±3.92^{a}
	2	异戊酸	188.41±10.21^{b}	236.20±2.52^{a}		25	乙酸苯乙酯	240.55±3.26^{a}	131.61±13.21^{b}
	3	己酸	17.52±0.72^{a}	8.50±1.23^{b}		26	肉豆蔻酸异丙酯	13.67±7.35^{a}	—
	4	癸酸	6.35±1.32^{a}	2.13±0.92^{b}		27	邻苯二甲酸二异丁酯	15.13±1.28^{a}	12.55±0.81^{b}
	5	4-酮庚乙酸	4.34±0.23^{a}	3.38±0.58^{a}		28	邻苯二甲酸二丁酯	29.99±3.45^{a}	25.47±1.28^{a}
	6	庚酸	43.01±3.73^{b}	62.93±5.42^{a}		29	2-甲基丁酸乙酯	2.77±0.85^{a}	0.73±0.27^{b}
	7	丁酸	18.93±1.08^{a}	20.93±1.24^{a}		30	乙酸叔戊酯	3.26±0.21^{a}	0.89±0.11^{b}
醇类	8	己醇	2.56±0.23^{a}	—		31	辛酸甲酯	51.35±1.98^{b}	50.53±1.21^{a}
	9	乙醇	65.92±5.37^{b}	206.88±10.37^{a}	醛酮类	32	2-甲基丁醛	7.78±1.35^{a}	1.02±0.37^{b}
	10	异丁醇	32.71±7.72^{a}	—		33	异戊醛	13.35±3.85^{a}	6.69±1.62^{b}
	11	2,3-丁二醇	248.75±12.39^{a}	245.67±5.81^{a}		34	己醛	8.08±2.41^{a}	13.41±3.82^{a}
	12	糠醇	34.16±5.47^{a}	3.10±1.20^{b}		35	3-乙酰基-2-丁酮	320.21±12.51^{a}	48.98±2.10^{b}
	13	桉叶油醇	45.85±1.98^{a}	26.54±2.86^{b}		36	壬醛	18.93±4.78^{a}	9.55±2.31^{b}
	14	异薄荷醇	22.90±3.64^{b}	31.35±0.19^{a}		37	3-羟基-2-丁酮	31.52±0.39^{a}	20.17±1.26^{b}
酯类	15	甲酸辛酯	—	2.54±1.31^{a}		38	月桂醛	5.94±0.40^{a}	3.67±0.53^{b}
	16	乙酸甲酯	1.87±0.28^{b}	11.52±0.37^{a}		39	癸醛	3.28±0.52^{a}	4.16±0.28^{a}
	17	乙酸乙酯	287.86±13.32^{a}	158.37±6.54^{b}		40	苯甲醛	78.91±6.18^{b}	169.70±8.49^{a}
	18	异丁酸乙酯	11.56±2.13^{a}	6.21±2.49^{b}		41	甲基庚烯酮	7.03±0.10^{a}	1.78±0.19^{b}
	19	乙酸仲丁酯	235.64±4.36^{a}	127.58±7.63^{b}		42	香叶基丙酮	4.74±1.25^{a}	1.51±0.29^{b}
	20	异戊酸乙酯	78.33±11.26^{a}	45.71±3.26^{b}		43	3,4-二甲基苯甲醛	39.18±3.48^{a}	26.04±4.41^{b}
	21	乙酸异戊酯	758.02±21.42^{a}	427.40±15.62^{b}	其他类	44	4-乙基苯酚	5.67±1.37^{a}	—
	22	戊酸乙酯	—	3.12±0.91^{a}		45	2,4-二叔丁基苯酚	89.01±7.27^{a}	100.48±5.58^{a}
	23	乳酸乙酯	5.89±1.37^{a}	2.06±0.08^{b}					

注：“—”表示未检出；同行不同字母表示差异显著（P<0.05）。

带醋杆菌 J-22 发酵的麦芽醋中关键风味物质种类几乎相同。在诱变菌株热带醋杆菌 J-2276 发酵的麦芽醋中，异戊酸乙酯的 ROAV 较高，异丁酸乙酯和乙酸异戊酯次之，表明这 3 种物质是麦芽醋发酵风味的主要贡献者[14]，赋予麦芽醋果香、葡萄酒香和奶油香，且诱变菌株热带醋杆菌 J-2276 发酵液中这 3 种物质的质量浓度较出发菌株热带醋杆菌 J-22 分别提高了 71.4%、86.2%、77.4%。以上结果均表明，诱变菌株热带醋杆菌 J-2276 为适用于麦芽醋发酵的优良菌株。

表 4　麦芽醋中关键风味物质的 ROAV 分析

Table 4　ROAV analysis of key flavor compounds of malt vinegar

风味物质	香气描述	阈值/（μg/L）	ROAV	
			诱变菌株热带醋杆菌 J-2276	出发菌株热带醋杆菌 J-22
桉叶油醇	草药香、樟脑香	1.1	5.85	5.81
乙酸乙酯	果香、酒香	5	8.08	7.62
异丁酸乙酯	果香、奶油香	0.02	81.17	74.72
乙酸仲丁酯	果香	6	5.52	5.12
异戊酸乙酯	果香、葡萄酒香	0.11	100.00	100.00
乙酸异戊酯	果香	2	53.22	51.43
乙酸苯乙酯	玫瑰香	19	1.78	1.67
2-甲基丁酸乙酯	果香、酯香	0.063	6.17	2.79
异戊醛	果香	0.4	4.69	4.02
3-乙酰基-2-丁酮	乳香、奶香	40	1.12	0.29
壬醛	玫瑰香、柑橘香	1.1	2.42	2.09
月桂醛	青香、松叶香	0.29	2.88	3.05

3　结论

选育优良的耐乙醇醋酸菌对各种食醋的发酵具有重要意义。作者以发酵性能优良的热带醋杆菌 J-22 为出发菌株，通过 ARTP 诱变和 HTS 相结合进一步对其进行诱变选育，得到 1 株可耐受体积分数为 11% 乙醇的热带醋杆菌 J-2276，将其应用于初始乙醇体积分数为 7.5% 的啤酒中进行麦芽醋发酵，发酵结束后麦芽醋中乙酸质量浓度较出发菌株热带醋杆菌 J-22 提高了 65.0%，且发酵周期缩短 1 d。此外，诱变菌株热带醋杆菌 J-2276 发酵的麦芽醋感官评价较好，总有机酸质量浓度和总挥发性物质质量浓度较出发菌株热带醋杆菌 J-22 均提高了 45.3%，说明较高的乙醇耐受性提高了诱变菌株热带醋杆菌 J-2276 的发酵性能，产生了更丰富的风味物质。ROAV 分析表明，异戊酸乙酯、异丁酸乙酯及乙酸异戊酯对麦芽醋发酵风味的组成有重大贡献。经测定，诱变菌株热带醋杆菌 J-2276 具有较好的遗传稳定性，具有应用于麦芽醋发酵的潜力，为麦芽醋发酵醋酸菌菌种的选育提供了一定的参考。

参考文献

[1] 孙欣瑶．麦芽醋醋酸菌株筛选及发酵工艺条件的优化[D]．哈尔滨：东北农业大学，2013．

[2] 任静．吸附包埋法固定化醋酸菌的制备及其在麦芽醋中的应用[D]．哈尔滨：东北农业大学，2013．

[3] 孙婷婷．麦芽醋的酿造工艺优化研究[D]．广州：华南理工大学，2017．

[4] PITIWITTAYAKUL N，YUKPHAN P，SINTUPRAPA W，et al．Identification of acetic acid bacteria isolated in Thailand and assigned to the genus *Acetobacter* by *groEL* gene sequence analysis[J]．Annals of Microbiology，2015，65(3)：1557-1564．

[5] 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．

[6] 张涛．麦芽醋发酵工艺及其成分分析[D]．大庆：黑龙江八一农垦大学，2013．

[7] SUN W T，LI G，LI H P，et al．Characteristics of atmospheric-pressure，radio-frequency glow discharges operated with argon added ethanol[J]．Journal of Applied Physics，2007，101(12)：123302．

[8] 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．

[9] 曹春蕾，余培斌，吴殿辉，等．几株啤酒酵母的筛选及发酵性能比较[J]．中国生物工程杂志，2022，42(7)：45-53．
CAO C L，YU P B，WU D H，et al．Screening of several strains of brewer’s yeast strains and comparison of their fermentability[J]．China Biotechnology，2022，42(7)：45-53．(in Chinese)

[10] 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．

[11] 邢晓莹．基于山西老陈醋优良菌株在山楂醋酿造中的应

用[D]. 太谷：山西农业大学，2019.

[12] 余永建. 镇江香醋有机酸组成及乳酸合成的生物强化[D]. 无锡：江南大学，2014.

[13] 甘兴. 传统岐山酿造食醋发酵过程中的微生物群落动态演变和风味物质的研究[D]. 广州：华南理工大学，2018.

[14] 杜晓兰，杨文敏，黄永强，等. 基于顶空气相离子迁移谱比较3种加工方式对番鸭肉挥发性风味物质的影响[J]. 食品科学，2021，42(24)：269-275.
DU X L，YANG W M，HUANG Y Q，et al. Effects of three processing methods on volatile flavor compounds of Muscovy duck meat as investigated by headspace-gas chromatography-ion mobility spectrometry[J]. Food Science，2021，42(24)：269-275. (in Chinese)

[15] 李维新，何志刚，林晓姿，等. 枇杷果醋载体吸附式醋化技术研究[J]. 食品与生物技术学报，2010，29(2)：206-210.
LI W X，HE Z G，LIN X Z，et al. Study on loquat vinegar acetification technique with carrier adsorption[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2010，29(2)：206-210. (in Chinese)

[16] AN J，GAO F L，MA Q Y，et al. Screening for enhanced astaxanthin accumulation among *Spirulina platensis* mutants generated by atmospheric and room temperature plasmas[J]. Algal Research，2017，25：464-472.

[17] CAO S，ZHOU X，JIN W B，et al. Improving of lipid productivity of the oleaginous microalgae *Chlorella pyrenoidosa via* atmospheric and room temperature plasma (ARTP) [J]. Bioresource Technology，2017，244(2)：1400-1406.

[18] 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.

[19] 徐泽明. 耐乙醇巴氏醋杆菌的构建及其胞内代谢物研究[D]. 天津：天津科技大学，2016.

[20] 黎青华，堵国成，李江华，等. 红曲色素高产菌的诱变选育与发酵优化[J]. 食品与生物技术学报，2020，39(11)：18-24.
LI Q H，DU G C，LI J H，et al. Mutation breeding and fermentation optimization of the strain with high-yield of *Monascus* red pigment[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2020，39(11)：18-24. (in Chinese)

[21] ZHANG B，XIA T，DUAN W H，et al. Effects of organic acids，amino acids and phenolic compounds on antioxidant characteristic of Zhenjiang aromatic vinegar[J]. Molecules，2019，24(20)：3799.

[22] 谭琰俐，吴泳，刘品，等. 基于HS-SPME-GC-MS的不同醋龄河溪香醋香气成分比较[J]. 食品与机械，2022，38(8)：80-86.
TAN Y L，WU Y，LIU P，et al. HS-SPME-GC-MS analysis of Hexi fragrant vinegar with different vinegar ages comparison of aroma components[J]. Food & Machinery，2022，38(8)：80-86. (in Chinese)

[23] 赵苗苗，赵智慧，董建方，等. 枸杞酒酿酒酵母的选育及其产香性能分析[J]. 食品与发酵工业，2022，48(18)：155-161.
ZHAO M M，ZHAO Z H，DONG J F，et al. Selection and breeding of *Saccharomyces cerevisiae* for wolfberry wine and analysis of its flavor-producing properties[J]. Food and Fermentation Industries，2022，48(18)：155-161. (in Chinese)

（责任编辑：许艳超）