

研究报告



耐乙酸乳杆菌的筛选及其产乳酸特性

邱婷^{1,2} 邓永建^{2,3} 陆震鸣^{*2} 柴丽娟² 张晓娟² 李信⁴ 余永建⁴ 史劲松¹ 许正宏^{2,3}

1 江南大学药学院 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 江南大学生物工程学院 江苏 无锡 214122

4 江苏恒顺醋业股份有限公司 江苏 镇江 212143

摘要:【背景】耐受乙酸的乳酸菌是传统谷物醋醋酸发酵过程中产生乳酸及其风味衍生物的重要功能微生物。【目的】从镇江香醋醋醅中分离鉴定具有耐乙酸特性的乳酸菌,并评价不同条件下该菌株的产乳酸能力。【方法】利用4% (体积比)乙酸含量的MRS培养基分离耐乙酸乳酸菌;对其进行16S rRNA基因鉴定、基因组测序、形态观察以及生理生化特性研究;考察不同乙酸浓度、葡萄糖浓度、发酵温度和时间对菌株产乳酸能力的影响。【结果】分离得到一株可耐受6%乙酸的乳杆菌*Lactobacillus* sp. JN500903;在厌氧静置、接种量5%、乙酸浓度5%、葡萄糖浓度40 g/L、发酵温度37 °C、发酵时间10 d条件下,该菌株乳酸产量为16.1 g/L。【结论】乳杆菌JN500903能够耐受6%乙酸浓度,具有在酸性环境下合成乳酸的能力,有一定的应用潜力。

关键词: 耐乙酸, 乳酸菌, 醋醅, 镇江香醋

Screening and lactate-producing ability evaluation of acetic acid-tolerant lactic acid bacteria

QIU Ting^{1,2} DENG Yong-Jian^{2,3} LU Zhen-Ming^{*2} CHAI Li-Juan² ZHANG Xiao-Juan²
LI Xin⁴ YU Yong-Jian⁴ SHI Jin-Song¹ XU Zheng-Hong^{2,3}

1 School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

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

3 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

4 Jiangsu Hengshun Vinegar Industry Co. Ltd., Zhenjiang, Jiangsu 212143, China

Abstract: [Background] Acetic acid-tolerant lactic acid bacteria are important for lactic acid and its derivatives production during acetic acid fermentation in traditional cereal vinegar brewing process. [Objective] To screen acetic acid-tolerant lactic acid bacteria from vinegar *Pei* of Zhenjiang aromatic vinegar, and evaluate its fermentation performance. [Methods] Selective MRS medium containing 4% (volume ratio) acetic acid was used to isolate acetic acid-tolerant lactic acid bacteria. The isolated strain was identified by 16S rRNA gene sequencing, whole genome sequencing and morphological,

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31771967); Postgraduate Research and Practice Innovation Program of Jiangsu Province (SJKY19_1754)

*Corresponding author: Tel: 86-510-85320116; E-mail: zmlu@jiangnan.edu.cn

Received: 13-02-2019; Accepted: 25-03-2019; Published online: 26-04-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31771967); 江苏省研究生科研与实践创新计划(SJKY19_1754)

*通信作者: Tel: 0510-85320116; E-mail: zmlu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2019-02-13; 接受日期: 2019-03-25; 网络首发日期: 2019-04-26

physiological and biochemical analyses. Lactic acid-producing ability of the isolated stain was evaluated under different culture conditions. **[Results]** A lactic acid bacterial strain JN500903 that resisted 6% acetic acid was screened and identified as *Lactobacillus* sp. The optimum conditions for lactic acid production were: anaerobic static culture, inoculum of 5%, acetic acid concentration of 5%, glucose concentration of 40 g/L, fermentation temperature at 37 °C and fermentation period of 10 d, the lactic acid production was 16.1 g/L under these conditions. **[Conclusion]** Strain JN500903 can produce lactic acid under the 6% acetic acid stress, suggesting its potential for industrial application.

Keywords: Acetic acid-tolerant, Lactic acid bacteria, Vinegar *Pei*, Zhenjiang aromatic vinegar

传统谷物醋是我国老百姓日常生活中重要的酸性调味品^[1]。乳酸是谷物醋中重要的风味化合物,具有柔和食醋酸感、增加产品风味的作用^[2]。根据国家标准 GB/T 18623-2011 和 GB/T 19777-2013 规定,总酸(以乙酸计)大于 6 g/100 mL 的镇江香醋和山西老陈醋产品中不挥发酸(以乳酸计)含量分别需要超过 1.6 g/100 mL 和 2.0 g/100 mL^[3]。因此,乳酸含量既是谷物醋中主要的不挥发酸,也是衡量产品品质的重要指标。

传统谷物醋具有悠久的酿造生产历史,酿造过程主要分为酒精发酵、醋酸发酵、封醋陈酿等步骤,其中多菌种固态醋酸发酵阶段是形成食醋风味的关键阶段^[4-5]。固态醋酸发酵过程中,栖息在醋醅中的多种乳酸菌在微氧或者无氧状态下能够消耗酒精中糖类等底物形成乳酸,进而部分乳酸又被醋酸菌等其它微生物转化形成乙偶姻等食醋风味成分^[6-7]。在醋酸发酵结束后的封醋阶段,乳酸菌还能继续发酵产生少量乳酸,致使醋醅乳酸含量回升^[8]。因此,在传统谷物醋长期“套醅接种”批次醋酸发酵过程中,酸性醋醅(pH 3.5 左右)里面具有耐受乙酸能力的乳酸菌对于食醋中乳酸、乳酸乙酯、乙偶姻等风味物质的形成具有重要作用。另外,醋醅中耐乙酸乳酸菌不仅能够在酸性醋醅环境下代谢产生乳酸,甚至能够在杀菌不彻底的情况下于食醋产品中继续生长代谢,改变产品风味品质。因此对于食醋酿造过程中耐乙酸乳酸菌的研究具有重要意义。

本研究以镇江香醋醋酸发酵阶段的醋醅为研究对象,分离筛选具有耐乙酸特性的乳酸菌,并对其分子鉴定、形态观察及生理生化试验,同时

对菌株产乳酸能力进行评价。本研究为了解固态醋酸发酵过程中乳酸菌的功能特性提供试验数据,也为获得具有乙酸耐受能力的乳酸菌菌株提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验样品

醋醅样品取自江苏恒顺醋业股份有限公司醋酸发酵车间。

1.1.2 主要试剂与培养基及仪器

乙酸、甲醇、亚铁氰化钾、硫酸锌、磷酸二氢钠和葡萄糖,国药集团化学试剂有限公司; DNA Marker、Premix *ExTaq*, TaKaRa 公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型),上海捷瑞生物有限公司。MRS 培养基^[9], Oxoid 公司。厌氧培养箱, Don Whiteley Scientific 公司; 台式高速冷冻离心机, Eppendorf 公司; 高效液相色谱仪, Waters 公司; 核酸电泳装置, Bio-Rad 公司; 凝胶成像仪, GE Healthcare 公司; 光学显微镜, Leica 仪器公司; 透射电子显微镜, 日立公司; 紫外分光光度计, 尤尼可上海仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 耐乙酸乳酸菌的分离筛选

以乙酸浓度为 4% (体积比)的 MRS 固体培养基(pH 3.92)进行耐乙酸乳酸菌的筛选。称取 10 g 醋醅放入装有玻璃珠的 250 mL 锥形瓶中,加入 90 mL 无菌 PBS 缓冲液, 37 °C、220 r/min 振荡 1 h 后,取 1 mL 菌悬液稀释至不同稀释度(10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5}),取稀释液 100 μ L 涂布于含 4% 乙酸的 MRS 固体培养基上,每个梯度 3 个平行。

于 37 °C 厌氧(N₂:H₂:CO₂=80:10:10, 体积比)培养 8 d。将菌落分离纯化, 获得 6 株菌。将各菌株分别接种于含 4% 乙酸的 MRS 液体培养基中, 于 37 °C 厌氧静置培养 8 d, 比较各菌株产乳酸的能力。乳酸测定按照文献[10]进行。

1.2.2 耐乙酸乳杆菌的 16S rRNA 基因鉴定及基因组测序

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株 DNA。以细菌通用引物扩增其 16S rRNA 基因^[11]。PCR 反应体系(25 μL): DNA 模板 1.0 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1.0 μL, Premix *ExTaq* 12.5 μL, ddH₂O 9.5 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 90 s, 34 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 将测得的序列与 NCBI 中已知序列进行比对, 初步确定物种的种属信息, 同时应用 MEGA 7.0 软件采用 Neighbor-Joining 法构建菌株的系统发育进化树^[12]。同时将菌株 DNA 通过 Illumina 测序平台进行基因组测序分析。

1.2.3 形态观察和生理生化试验

通过光学显微镜和透射电镜观察菌株形态。生理生化试验参照文献[13-14]进行。

1.2.4 菌株生长过程曲线

菌株活化后, 按照 5% 接种量转入 100 mL 含有 4% 乙酸的 MRS 液体培养基中, 37 °C 厌氧静置培养, 以空白培养基为对照, 测定 OD₆₀₀ 值, 绘制菌株的生长曲线。

1.2.5 产乳酸能力的评价

采用单因素试验考察在不同乙酸浓度 [0 (pH 6.19)、1% (pH 4.68)、2% (pH 4.25)、3% (pH 4.01)、4% (pH 3.92)、5% (pH 3.81)、6% (pH 3.74)、7% (pH 3.69)]、葡萄糖浓度(10、20、30、40、50 g/L)、培养温度(27、30、33、37、40 °C)以及发酵时间(7、8、9、10、11 d)条件下耐乙酸乳杆菌产生乳酸的能力, 确定最优发酵条件。葡萄糖测定按照文献[15]进行。

1.2.6 数据处理

每组试验设置 3 个平行, 结果表示为平均值±标准差。

2 结果与分析

2.1 耐乙酸乳杆菌的筛选

采用 4% 乙酸的 MRS 固体培养基从醋醅中筛选分离了 6 株耐乙酸菌株, 并通过 4% 乙酸的 MRS 液体培养基对 6 株菌的产乳酸性能进行复筛。结果显示, 菌株 JN500905、JN500908 不具备产乳酸的能力, 菌株 JN500903 乳酸产量最大, 可达 6.7 g/L, 因此将其用于后续研究(图 1)。

2.2 耐乙酸乳杆菌的 16S rRNA 基因鉴定及基因组测序结果

菌株 JN500903 的 16S rRNA 基因序列长度为 1 453 bp, 提交 GenBank 后获得登录号为 MH174079。通过 BLAST 比对分析, 发现 JN500903 与多个 Uncultured *Lactobacillus* sp. 的 16S rRNA 基因序列相似度为 98%, 与分离株 *Lactobacillus* sp. HSLZ-75 (KT783533) 的相似度最高(99.16%)。选取与 JN500903 的 16S rRNA 基因序列相似度最高的 *Lactobacillus* 属内 11 个模式菌株构建进化树, 以 *Sharpea azabuensis* JCM 14210^T (LC258136) 和 *Escherichia coli* ATCC 11229^T (GQ340751) 为外群。结果表明, JN500903 与模式菌株 *Lactobacillus caviae* MOZM2^T (KT343143) 具有最近的亲缘关系, 相似值为 89%, 可能为新种(图 2)。JN500903 全基因组测序结果表明, 基因全长为 1 625 955 bp, 基因数量为

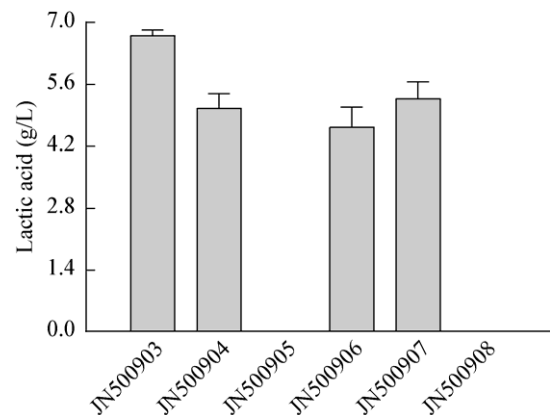


图 1 6 株菌产乳酸结果

Figure 1 Lactic acid-producing ability of six acetic acid-tolerant strains

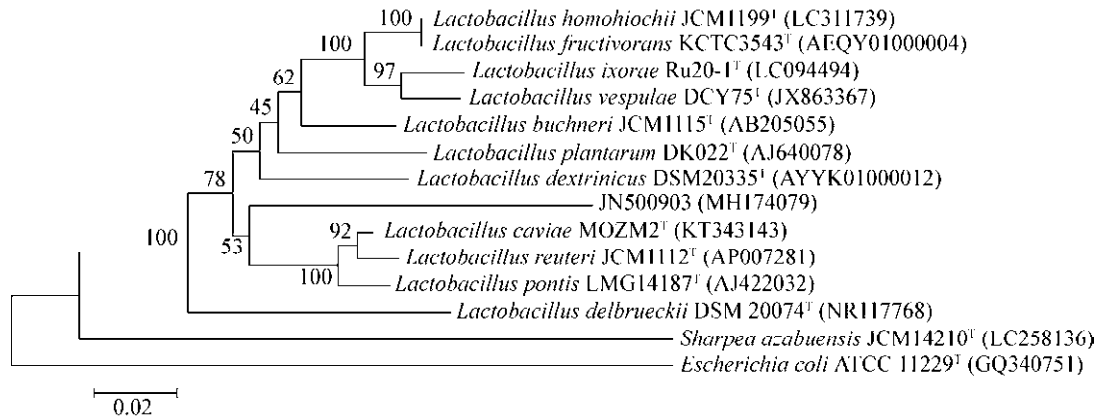


图2 基于16S rRNA基因序列的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences

注：标尺刻度代表2%的序列差异；分支点数值代表计算1000次聚类到一起的几率；括号内序号为菌株GenBank登录号。

Note: The scale bar means 2% sequence difference; The number at the node means the percentage of occurrence in 1000 bootstrap trees; The numbers in parenthesis are GenBank accession number.

1585, 占基因组百分比为86.4%; (G+C)mol%含量为39.7%, 高于模式菌株 *Lactobacillus caviae* MOZM2^T (KT343143) (37.7%)^[14]。

2.3 乳杆菌 JN500903 的形态和生理生化特性

菌株 JN500903 在含4%乙酸的MRS固体培养基上37℃培养8d后, 菌落直径为0.5 mm–3.0 mm, 呈乳白色, 圆形, 中间凸起, 表面湿润光滑, 边缘整齐, 质地均匀(图3A); 革兰氏染色呈阳性(图3B); 菌株呈杆状, 大小为(2.6–4.8) μm×(0.4–0.6) μm, 无鞭毛和荚膜(图3C)。生理生化结果显示, 该菌株可在25–40℃条件下生长, 兼性厌氧, 可耐受6%乙酸、2%乳酸、6%氯化钠以及6%乙醇; 50℃热处理10 min仍可存活, 显示出一定的耐热性; 可利用α-D-葡萄糖、蔗糖、L-海藻糖、L-鼠李糖、

D-果糖等, 不利用麦芽糖、D-甘露醇、α-D-乳糖、D-山梨醇、乙酸等, 属异型乳酸发酵, 细胞脂肪酸组成(>10%)主要为C_{16:0} FAME (34.2%)、Summed Feature 10 (32.9%)、C_{18:1} CIS 9 FAME (18.2%), 与模式菌株 *Lactobacillus caviae* MOZM2^T (KT343143) 的组成 [C_{20:0} (38.9%)、C_{18:2} ω6t (26.1%)、C_{16:1} (13.2%)] 差异较大^[14] (表1)。

以上结果初步判定该菌株属于乳杆菌目 (*Lactobacillales*) 乳杆菌科 (*Lactobacillaceae*) 乳杆菌属 (*Lactobacillus*), 为新种的可能性较大。

2.4 菌株生长曲线

菌株 JN500903 的生长周期较长, 其延滞期、对数期、稳定期、衰退期分别为0–1、1–7、7–9、9–11 d (图4)。

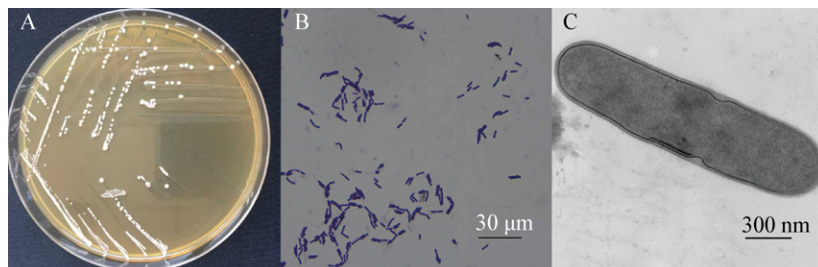


图3 菌株 JN500903 的形态学特征

Figure 3 Morphological characters of strain JN500903

注：A：菌落形态图；B：革兰氏染色图；C：透射电镜图。

Note: A: Colony morphology; B: Gram-staining; C: TEM image.

表 1 菌株 JN500903 生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characters of strain JN500903

| 试验项目 Experiment items | 结果 Results | 试验项目 Experiment items | 结果 Results |
|---|------------------------------|---|---|
| 生长温度范围 Temperature range for growth (°C) | 25-40 | D-甘露醇 D-Mannitol | - |
| 需氧性 Oxygen demand | 兼性厌氧 Facultative anaerobe | L-海藻糖 L-Trehalose | + |
| 耐 6% 乙酸 Growth in 6% acetic acid | + | L-果糖 L-Fructose | - |
| 耐 2% (体积比) 乳酸 Growth in 2% (V/V) lactic acid | + | α-D-乳糖 α-D-Lactose | + |
| 耐 6% (质量体积比) 氯化钠 Growth in 6% (M/V) NaCl | + | L-鼠李糖 L-Rhamnose | + |
| 耐 6% (体积比) 乙醇 Growth in 6% (V/V) ethanol | + | D-山梨醇 D-Sorbitol | - |
| 耐热 10 min (50 °C) Heat treatment at 50 °C for 10 min | + | D-果糖 D-Fructose | + |
| α-D-葡萄糖 α-D-Glucose | + | 乙酸 Acetic acid | - |
| 麦芽糖 Maltose | - | 乳酸发酵 Lactic acid fermentation | 异型 Heterolactic fermentation |
| 蔗糖 Sucrose | + | 细胞脂肪酸组成(>10%) Cellular fatty acids profiles (>10%) | C _{16:0} FAME (34.2%)、 Summed Feature 10 (32.9%)、 C _{18:1} CIS 9 FAME (18.2%) |

注: 表中生理生化试验所用培养基为菌株初筛培养基(MRS+4%乙酸), 耐乳酸试验所用培养基为 MRS; +: 阳性; -: 阴性; Summed Feature 10: C_{18:1} c11/t9/t6 FAME.

Note: The medium used for physiological and biochemical tests was MRS medium containing 4% acetic acid, for the lactic acid tolerance test was MRS; +: Positive; -: Negative; Summed Feature 10: C_{18:1} c11/t9/t6 FAME.

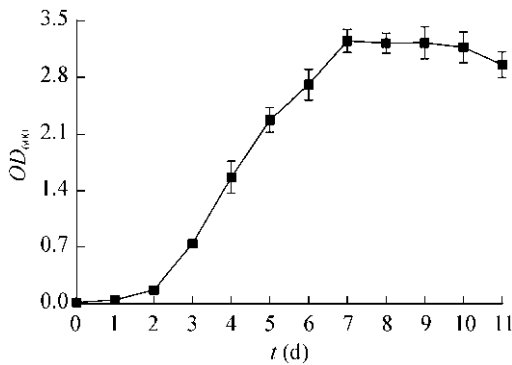


图 4 菌株 JN500903 的生长曲线
Figure 4 Growth curve of strain JN500903

2.5 产乳酸能力评价

2.5.1 乙酸浓度对产乳酸能力的影响

考察乙酸浓度对于菌株 JN500903 产乳酸的影响, 接种量为 5%, 葡萄糖浓度为 20 g/L, 37 °C 厌氧静置发酵 8 d 后, 测定各体系乳酸和葡萄糖含量及菌株生长情况。图 5 结果表明, 乙酸浓度为

5%时, 乳酸产量最大, 为 8.1 g/L, 葡萄糖转化率为 39.0%; 乙酸浓度继续增大时, 菌体生长和葡萄糖消耗受到抑制, 乳酸产量降低; 而乙酸浓度低于 3%时, 菌株未生长, 体系没有乳酸积累, 表明此菌株可能对于酸性环境具有一定的依赖性。确定乙酸浓度为 5%。

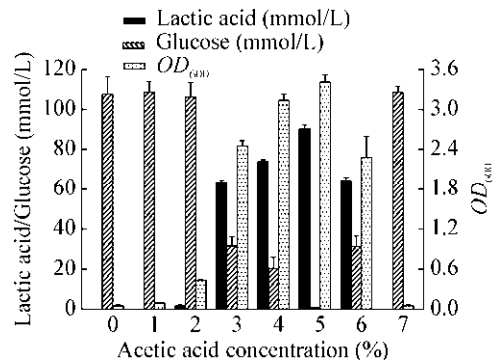


图 5 乙酸浓度对产乳酸能力的影响
Figure 5 Effect of acetic acid concentration on lactic acid production in fermentation broth

2.5.2 发酵温度对产乳酸能力的影响

考察温度对菌株 JN500903 产乳酸的影响, 接种量为 5%, 乙酸浓度为 5%, 葡萄糖浓度为 20 g/L, 厌氧静置发酵 8 d 后, 测定各体系乳酸和葡萄糖含量及菌株生长情况。图 6 结果表明, 发酵温度为 37 °C 时, 乳酸产量最大, 达 8.2 g/L, 温度低于或高于 37 °C, 菌体生长受到抑制, 葡萄糖代谢受阻, 乳酸产量降低。确定发酵温度为 37 °C。

2.5.3 不同葡萄糖浓度对产乳酸能力的影响

考察葡萄糖浓度对菌株 JN500903 产乳酸的影响, 接种量为 5%, 乙酸浓度为 5%, 37 °C 厌氧静置发酵 8 d 后, 测定各体系乳酸和葡萄糖含量及菌株生长情况。图 7 结果表明, 葡萄糖浓度为 40 g/L 时, 乳酸产量最大, 为 14.3 g/L, 葡萄糖转化率为 36.9%; 葡萄糖浓度继续增大时, 菌体生长被抑制, 乳酸产量下降。确定葡萄糖浓度为 40 g/L。

2.5.4 发酵时间对产乳酸能力的影响

考察发酵时间对菌株 JN500903 产乳酸的影响, 接种量为 5%, 乙酸浓度为 5%, 葡萄糖浓度为 40 g/L, 37 °C 厌氧静置发酵后, 测定各体系乳酸和葡萄糖含量及菌株生长情况。图 8 结果表明, 发酵 10 d 时, 葡萄糖耗尽, 乳酸产量最大, 可达 16.1 g/L, 葡萄糖转化率为 41.4%。确定发酵时间为 10 d。

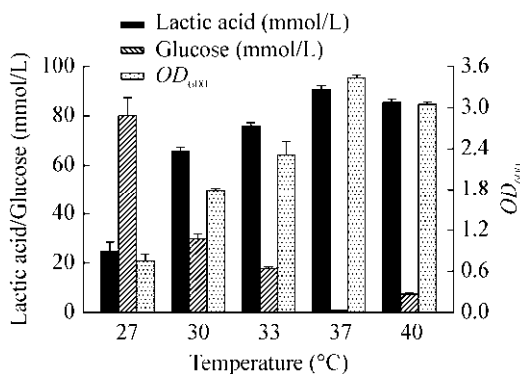


图 6 温度对产乳酸能力的影响

Figure 6 Effect of temperature on lactic acid production in fermentation broth

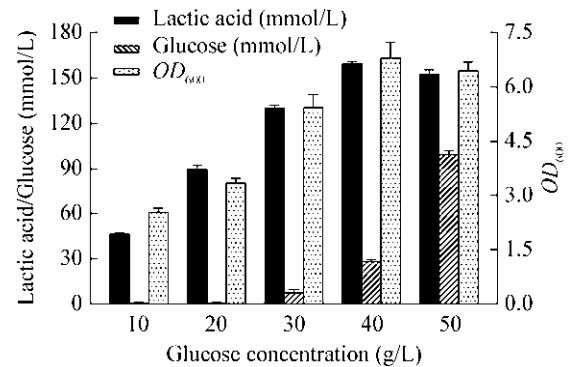


图 7 葡萄糖浓度对产乳酸能力的影响

Figure 7 Effect of glucose concentration on lactic acid production in fermentation broth

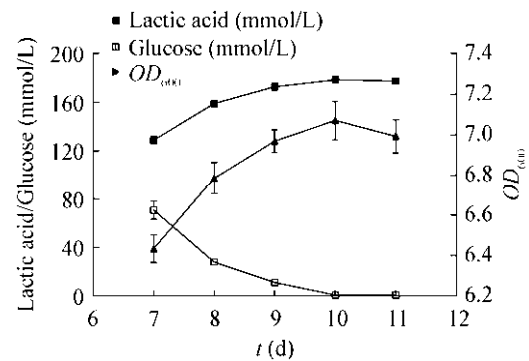


图 8 发酵时间对产乳酸能力的影响

Figure 8 Effect of fermentation time on lactic acid production in fermentation broth

3 讨论与结论

在长期乙酸含量较高的醋醅微环境中进化形成了多种耐乙酸特性的乳酸菌, 它们对谷物醋风味的形成具有重要作用。此前研究报道中分离的 *Lactobacillus helveticus*、*Lactobacillus fermentum*、*Lactobacillus casei* 等乳酸菌对乙酸的耐受性低于 2%, 本研究尝试用更高的乙酸浓度来筛选耐乙酸乳酸菌。

本试验筛选获得了一株可耐受 6% 乙酸的乳酸菌菌株 JN500903, 经 16S rRNA 基因鉴定、基因组测序以及生理生化试验等初步确定该菌属于乳杆菌属 *Lactobacillus*, 其与模式菌株 *Lactobacillus caviae* MOZM2^T (MK287638) 的相似度最高(89%)^[14], 为新种的可能性较大, 需要进一步研究确定。Entani 等从酸度为 6% 的米醋中分离得到 *Lactobacillus*

acetotolerans^[16], Khan 等从生物乙醇发酵残糟中分离到可耐受 6% 乙酸的 *Lactobacillus panis*^[17], 耐乙酸性能均与本研究菌株相当, 后续可以从基因层面上深入挖掘它的耐酸机制。另外, 菌株 JN500903 可在含有 6% 氯化钠条件下生长, 体现出一定的耐盐性, 可能具有在泡菜、干酪等高盐度发酵产品中应用的潜力^[18]。采用单因素法优化了菌株 JN500903 产乳酸的条件, 即厌氧静置、接种量 5%、乙酸浓度 5%、葡萄糖浓度 40 g/L、发酵温度 37 °C、发酵时间 10 d, 乳酸产量为 16.1 g/L。研究表明菌株 JN500903 在乙酸浓度低于 3% 时生长代谢受到严重抑制, 同时在耐乳酸性试验中发现, 菌株仅在乳酸浓度为 1.6%–2.0% 时显示出生长, 但其中最佳生长状况明显不及 5% 乙酸下的生长状态, 说明菌株 JN500903 可能对酸性环境具有依赖性和选择性, 由于该菌株来源于同时含乙酸和乳酸的食醋酿造体系, 后期可以在 MRS 中混合加入一定量的乙酸和乳酸, 探究是否可以进一步促进菌株的生长, 同时还可以挖掘适合菌株生长的其余酸性和非酸性环境。另外, 本研究中菌株 JN500904、JN500906 和 JN500907 也具有耐 4% 乙酸和产乳酸能力, 因此后续可进一步研究这几株菌的生理生化特性及其相互作用, 挖掘它们的工业应用潜力。

REFERENCES

- [1] Mas A, Torija MJ, del Carmen García-Parrilla M, et al. Acetic acid bacteria and the production and quality of wine vinegar[J]. *The Scientific World Journal*, 2014, 2014: 394671
- [2] Jiang YJ, Guo JN, Li YD, et al. Optimisation of lactic acid fermentation for improved vinegar flavour during rosy vinegar brewing[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, 90(8): 1334-1339
- [3] Wang MF, Shen ZY, Xu KH, et al. GB/T 18623-2011 Product of geographical indication — Zhenjiang vinegar[S]. Beijing: China Standard Press, 2011 (in Chinese)
王明法, 沈志远, 许开慧, 等. GB/T 18623-2011 地理标志产品镇江香醋[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011
- [4] Xu W, Xu QP, Chen JH, et al. Ligustrazine formation in Zhenjiang aromatic vinegar: changes during fermentation and storing process[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2011, 91(9): 1612-1617
- [5] Wang ZM, Lu ZM, Shi JS, et al. Exploring flavour-producing core microbiota in multispecies solid-state fermentation of traditional Chinese vinegar[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 26818
- [6] Zheng Y, Mou J, Niu JW, 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
- [7] Wang ZM. Correlation between structural shifts of microbiota and compositions of flavors during the stage of acetic acid fermentation of Zhenjiang aromatic vinegar[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2016 (in Chinese)
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: 江南大学博士学位论文, 2016
- [8] Ni ZF. Research on bioaugmentation of brewing microbes and total DNA extraction during solid-state fermentation of Zhenjiang vinegar[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2009 (in Chinese)
倪峥飞. 镇江香醋固态发酵过程中酿造微生物强化及醋醅总 DNA 提取方法的初步研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2009
- [9] de Man JC, Rogosa M, Sharpe ME. A medium for the cultivation of lactobacilli[J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1960, 23(1): 130-135
- [10] Wu LH, Lu ZM, Zhang XJ, et al. Metagenomics reveals flavour metabolic network of cereal vinegar microbiota[J]. *Food Microbiology*, 2017, 62: 23-31
- [11] Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 55(3): 541-555
- [12] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870-1874
- [13] Zhang G. Foundation, Technology and Application of Lactic Acid Bacteria[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006: 92-93, 434-435 (in Chinese)
张刚. 乳酸细菌——基础、技术和应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 92-93, 434-435
- [14] Killer J, Pechar R, Švec P, et al. *Lactobacillus caviae* sp. nov., an obligately heterofermentative bacterium isolated from the oral cavity of a guinea pig (*Cavia aperea* f. *porcellus*)[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(8): 2903-2909
- [15] Zhang ZH, Liu B, Zhao ZB. Efficient acid-catalyzed hydrolysis of cellulose in organic electrolyte solutions[J]. *Polymer Degradation and Stability*, 2012, 97(4): 573-577
- [16] Entani E, Masai H, Suzuki KI. *Lactobacillus acetotolerans*, a new species from fermented vinegar broth[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1986, 36(4): 544-549
- [17] Khan NH, Kang TS, Grahame DAS, et al. Isolation and characterization of novel 1,3-propanediol-producing *Lactobacillus panis* PM1 from bioethanol thin stillage[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(1): 417-428
- [18] Meng ZX, Zhang LW, Xin L, et al. Technological characterization of *Lactobacillus* in semihard artisanal goat cheeses from different mediterranean areas for potential use as nonstarter lactic acid bacteria[J]. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(4): 2887-2896