

## 基于 Illumina MiSeq 高通量测序技术解析四川麸醋发酵过程中微生物菌群结构

张雅琳, 刘廷锐, 朱文优\*, 陈静, 刘燕, 许慧

(宜宾学院农林与食品工程学部 固态发酵资源利用四川省重点实验室 四川宜宾 644000)

**摘要** 以四川麸醋为研究对象, 采用高通量测序技术分析四川麸醋发酵过程中微生物群落结构变化和演替规律。结果表明: 细菌菌群和真菌菌群丰度指数均在发酵第 1 天时最大, 而细菌菌群和真菌菌群多样性指数最大值分别在发酵第 1 天和第 23 天。在门水平上对醋醅中细菌菌群结构和真菌菌群结构进行分析, 发现细菌的优势菌门是厚壁菌门, 而真菌的优势菌门是子囊菌门。在种水平上对醋醅中细菌菌群结构和真菌菌群结构进行分析, 发现细菌的优势菌种是耐酸乳杆菌和巴氏醋杆菌, 分别在发酵第 7 天和第 25 天时达到最大占比 54.47% 和 84.54%, 而真菌的优势菌种是酿酒酵母, 在发酵第 5 天时达到最大占比 97.94%。此外, 还在醋醅中检测出曲霉属、链格孢属等。通过对四川麸醋发酵过程中微生物群落结构变化演替规律的研究, 以期能锚定优势菌种, 通过调控发酵环境的微生态结构来提高麸醋的质量。

**关键词** 四川麸醋; 高通量测序; 细菌; 真菌; 微生态结构

**文章编号** 1009-7848(2022)06-0299-08 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.06.031

食醋是我国传统发酵调味品, 在西南地区主要以四川麸醋最为闻名。麸醋的生产主要以生麦麸为原料, 以中草药醋曲为发酵剂, 经“糖化、酒化和醋化”同池发酵而成, 具有降血压、降胆固醇、抗氧化、护肝和防呕吐等功效。

四川麸醋采用传统固态发酵方式, 发酵菌群主要来源于药曲。四川麸醋独特风味和食用安全性与糖化剂药曲有必然联系。药曲为食醋发酵进程提供独特酶系和发酵菌群, 药曲还能抑制发酵环境中部分腐败菌。发酵菌群是食醋品质的保障。在以往研究中, 研究人员较多致力于食醋发酵过程中功能菌群的研究, 发现主要有乳酸菌、酵母、霉菌和醋酸菌等赋予食醋营养成分、功能成分以及独特的风味物质。刘阳等<sup>[1]</sup>从保宁醋中分离出发酵乳酸杆菌 (*Lactobacillus femertum*), 通过产酸率、耐酸以及胞外多糖测定等试验验证发酵乳酸杆菌能提高食醋酸度; 焦玉双<sup>[2]</sup>从山西老陈醋大曲中分离出有较强产酸能力的食窦魏斯氏菌 (*Weis-*

*sella cibaria*) 和戊糖片球菌 (*Pediococcus pentosus*)。乳酸菌在食醋发酵过程中主要产有机酸(乳酸), 乳酸能减轻醋酸刺激气味, 改善醋的口感, 能和醇类物质合成酯类香气物质, 并且通过降低发酵环境 pH 值来抑制杂菌的生长; 乳酸菌还能产生蛋白酶, 分解蛋白质生成多肽和氨基酸<sup>[3]</sup>。钟正丹等<sup>[4]</sup>发现异常威克汉姆酵母 (*Wickerhamyces anomalus*) 和口津假丝酵母 (*Candida melibiosica*) 是保宁醋中产香较强的酵母。酵母主要来源于药曲中, 在发酵过程中, 酵母主要发酵糖类产生乙醇, 还产生食醋的部分风味物质<sup>[5]</sup>。此外, Nie 等<sup>[6]</sup>还在山西老醋中检测出葡萄球菌属 (*Staphylococcus* spp.)、糖多孢菌属 (*Saccharopolyspora* spp.)、芽孢杆菌属 (*Bacillus* spp.)、乳酸杆菌属 (*Lactobacillus* spp.)、魏斯氏菌属 (*Weissella* spp.) 等。王宗敏<sup>[7]</sup>在镇江香醋中检测出乳球菌属 (*Lactococcus* spp.)、葡糖醋杆菌属 (*Gluconacetobacter* spp.)、曲霉属 (*Aspergillus* spp.) 和隐球酵母属 (*Cryptococcus* spp.)。可见, 食醋传统发酵工艺造就复杂的微生物群落结构, 而微生物群落的多样性和演替是食醋独特风味形成的关键点。四川麸醋的传统生产工艺采用开放式多菌种混合发酵模式, 发酵环境中微生物结构复杂, 代谢过程此消彼长。此外, 因微生物检测技术的局限性, 研究者对麸醋发酵过程中微生物菌群结构的研究有一定难度。

收稿日期: 2021-06-21

基金项目: 四川省科技计划应用基础项目(2018JY0217); 四川省科技计划苗子工程项目(2020052); 四川省教育厅重点科研项目(18ZA0541)

作者简介: 张雅琳(1993—), 女, 硕士, 助教

通信作者: 朱文优 E-mail: 330343908@qq.com

本文采用高通量测序技术监控四川麸醋生产过程中微生物菌群结构变化及其演替规律,分析细菌和真菌对麸醋风味和食用安全性的贡献,并从不同水平下锚定麸醋发酵过程中优势菌群,以期对后期提高四川麸醋质量,完善传统工艺和调控发酵环境中微生态结构提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 原材料

四川麸醋醋醅取自四川省宜宾市思坡醋业有限责任公司。

### 1.2 设备与仪器

5810R 台式高速冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;MLS-3780 高压蒸汽灭菌锅,杭州亚旭生物科技有限公司;QT-2A 旋涡混合器,上海琪特分析仪器有限公司;ND-2000C 微量紫外分光光度计,美国 Nano Drop 公司;琼脂糖凝胶电泳仪,美国 Bio-Rad;DYCZ-21 型电泳槽,北京市六一仪器厂。

### 1.3 试验方法

1.3.1 样品的采集 样品的采集:发酵第 1,3,5,7,9,11,13,15,17,19,21,23,25 和 27 天采样。在四川麸醋发酵过程中每个时间点分别对醋醅的上层、中层和下层的中间以及 4 周进行取样,进行混和均匀作为 1 个醋醅样品,随后使用无菌密封袋包装,后置于-80℃冰箱中保藏待测。

1.3.2 DNA 的提取 取 1.3.1 节中待测样品,参照 E.Z.N.A™ Mag-Bind Soil DNA Kit 提取试剂盒中的方法提取四川麸醋醋醅样品中宏基因组 DNA,将提取的 DNA 用乙醇进行沉淀,在 260 nm 和 280 nm 的波长下使用微量紫外分光光度计测定 DNA 的吸光度。

1.3.3 PCR 扩增和测序 分别使用 V43NDF 和 Euk\_V4\_R 作为真菌 18S rRNA 的引物,和 515F、805R 作为细菌 16S rRNA 的引物。分别对细菌和真菌引物进行 PCR 扩增,16S rRNA 基因扩增条件:94℃预变性 3 min,94℃变性 3 min,45℃退火 20 s,65℃延伸 3 min(25 个循环)。18S rRNA 基因扩增条件:95℃预变性 7 min,95℃变性 1 min,45℃退火 30 s,72℃延伸 90 s(33 个循环)。

1.3.4 数据分析 对样品所测高通量数据通过

FASTX-Toolkits 的收集命令行工具([http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/))修剪引物,条形码和适配器<sup>[8-10]</sup>,接着过滤序列数据。采用 Mothur v1.30.0<sup>[11]</sup>将有效序列聚集到截止水平为 3%的 OTU 中。单个样品中的微生物多样性用 QIIME 评估。计算 Shannon 和 Simpson 多样性指数,Chao 1 和 ACE 丰富度指数和 Good's 覆盖度以评估  $\alpha$  多样性<sup>[12]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 四川麸醋发酵过程中微生物群落 $\alpha$ -多样性分析

四川麸醋发酵过程中微生物群落多样性和丰度变化如表 1 所示。对醋醅中细菌群落多样性和丰度进行评价,结果表明,在发酵第 1 天时,醋醅中细菌群落多样性和丰度最高,而在第 23 天时,细菌菌群多样性最低;在第 11 天时,细菌菌群丰度最低。对醋醅中的真菌群落多样性和丰度进行评价,发现在发酵第 1 天时,真菌菌群丰度最高,而在第 23 天时,真菌菌群多样性最高。表 1 结果所示,发酵环境中的细菌群落的多样性和丰度是随着发酵时间在降低,主要原因可能是发酵环境中酒精含量上升和酸度下降,抑制了大量细菌的生长。而真菌群落多样性在发酵第 23 天时最高,主要原因可能是真菌和细菌细胞壁结构之间的差异性,真菌细胞壁对外界环境的变化具有一定的抵抗作用;其次可能是发酵环境中的大分子物质被分解成小分子物质后激活了部分真菌的生长代谢活动。真菌群落丰度随着时间在降低,在第 27 天时,真菌群落丰度达到最低值,可能原因是在接近发酵结束时,发酵环境中的营养物质含量在下降,导致大部分的真菌的自身增长代谢降低;其次可能是因为发酵环境中的部分真菌群落处于消亡期。

值得注意的是,四川麸醋发酵过程中,主要依赖于来自于药曲中的微生物菌群,通过“糖化、酒化和醋化”3 个过程,而微生物群落的动态变化说明微生物一直处于和环境的平衡和适应中,可见麸醋发酵过程中,微生态结构动态变化和复杂的代谢过程是形成麸醋特定滋味的原因。

表 1 四川麸醋发酵过程中微生物群落丰度和多样性

Table 1 Microbial community abundance and diversity during fermentation of Sichuan bran vinegar

样品名	香农指数		辛普森指数		ACE 指数		Chao 指数		覆盖率		OUT 数量	
	细菌	真菌	细菌	真菌	细菌	真菌	细菌	真菌	细菌	真菌	细菌	真菌
A-1d	2.07	1.94	0.24	0.38	310.63	212.11	313.66	206.11	1.00	1.00	368	181
A-3d	2.07	0.23	0.21	0.93	221.52	100.72	209.50	77.15	1.00	1.00	295	61
A-5d	1.62	0.15	0.35	0.96	126.15	136.15	126.00	111.14	1.00	1.00	131	61
A-7d	0.99	0.54	0.61	0.83	87.40	109.80	84.60	108.07	1.00	1.00	84	102
A-9d	1.04	1.29	0.61	0.49	76.87	124.52	82.00	122.93	1.00	1.00	89	119
A-11d	0.61	2.14	0.79	0.22	69.13	110.12	66.80	111.14	1.00	1.00	80	106
A-13d	0.70	1.79	0.76	0.32	88.63	69.23	83.30	68.75	1.00	1.00	107	68
A-15d	0.43	0.92	0.87	0.65	129.03	78.52	133.00	80.00	1.00	1.00	144	73
A-17d	0.34	1.80	0.90	0.32	128.73	90.24	137.50	90.00	1.00	1.00	121	90
A-19d	0.53	1.60	0.83	0.31	113.86	75.09	132.00	82.33	1.00	1.00	142	64
A-21d	0.86	2.38	0.68	0.19	235.32	95.47	193.00	94.50	1.00	1.00	137	93
A-23d	0.30	2.69	0.90	0.21	113.27	103.59	97.30	101.25	1.00	1.00	99	96
A-25d	0.35	2.02	0.89	0.23	92.38	80.76	77.43	80.33	1.00	1.00	76	80
A-27d	0.47	2.00	0.83	0.23	73.52	59.04	81.20	58.50	1.00	1.00	116	57

## 2.2 四川麸醋发酵过程中细菌群落在门水平的结构分布以及动态变化

在门的水平对四川麸醋醋醅中细菌群落结构进行分析,结果如图 1 所示。结果表明,在麸醋发酵过程中,厚壁菌门(Firmicutes)是优势菌门,在第 1 天时,厚壁菌门在细菌中占比是 23.73%,在第 23 天时,厚壁菌门在细菌中占比达到最大值 98.88%。此外,在第 1 天时,醋醅中还检测出变形菌门(Proteobacteria)和蓝藻门(Cyanobacteria),在细菌中占比分别为 32.25%和 42.26%。随后,随着优势菌门厚壁菌门的增加,变形菌门和蓝藻门在细菌中占比下降,在第 23 天时,变形菌门和蓝藻门的占比达到最低值,分别为 0.92%和 0.01%。另外在醋醅中还有少量的放线菌门(Actinobacteria)被检测出。

## 2.3 四川麸醋发酵过程中细菌群落在种水平的结构分布以及动态变化

在种的水平对四川麸醋醋醅中细菌结构进行分析,结果如图 2 所示。结果表明,在麸醋发酵过程中,优势菌种是耐酸乳杆菌(*Lactobacillus acetolerans*)和巴氏醋杆菌(*Acetobacter pasteurianus*)。在第 1 天时,耐酸乳杆菌在细菌中占比为 0.62%,耐酸乳杆菌占比随着时间增加,在第 7 天

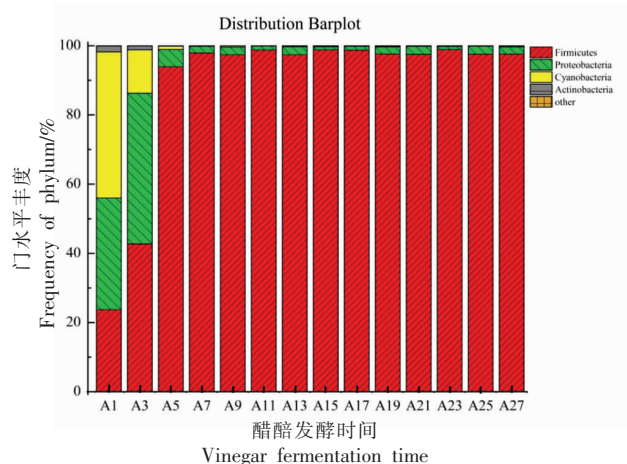


图 1 四川麸醋发酵过程中细菌群落在门水平的分布

Fig.1 Relative abundance of bacteria community proportions at phylum in Sichuan bran vinegar

时,耐酸乳杆菌占比达到最大值 54.47%。耐酸乳杆菌有较强的产乳酸和乙酸能力,但不能代谢氨基酸,对乙醇有一定的耐受性,能利用葡萄糖、苹果酸和丙酮酸等作为生长的营养物质<sup>[13]</sup>。在四川麸醋醋醅中检测出食淀粉乳杆菌(*Lactobacillus amylovorus*),食淀粉乳杆菌在细菌中占比随着发酵时间先升高后降低,在发酵第 3 天时,其在细菌中占比达最大值 38.03%,在发酵第 27 天时,食淀粉乳杆菌在细菌中占比仅为 0.01%。食淀粉乳杆

菌属于嗜酸乳杆菌属 (*Lactobacillus acidophilus* spp.), 是人肠道中常见的重要的有益菌群, 能产生过氧化氢、有机酸、细菌素和多肽等物质来抑制病原微生物的生长, 有研究学者发现, 食淀粉乳杆菌的抗菌能力与其细胞表面的存在的一种 S-层蛋白相关<sup>[14]</sup>。巴氏醋杆菌 (*Acetobacter pasteurianus*) 和欧洲科马加泰杆菌 (*Komagataeibacter europaeus*) 是生产食醋过程中常见的菌种。在醋酸发酵阶段, 巴氏醋杆菌主要产以乙酸为主体的有机酸, 将酒精发酵产物转化成乙酸和乳酸等酸味物质<sup>[15]</sup>; 而欧洲科马加泰杆菌也具有强大的氧化乙醇的功能<sup>[16]</sup>。巴氏醋杆菌是食醋发酵过程中优势菌群, 在发酵环境中巴氏醋杆菌占比随着时间增加, 但是在发酵第 23 天时占比下降, 在发酵第 25 天时, 巴氏醋杆菌在细菌中占比达到最大值 84.54%, 此时发酵环境中的巴氏醋杆菌是优势菌群; 在发酵结束时, 巴氏醋杆菌在细菌中占比为 84.04%, 巴氏醋杆菌主要是将有机酸转化为乙酸, 是食醋发酵过程中乙酸的主要来源。而在第 23 天时, 醋醅中欧洲科马加泰杆菌在细菌中占比为 0.00%。此前研究学者从水中分离出布氏假单胞菌 (*Pseudomonas brenneri*), 发现其没有发酵能力<sup>[17]</sup>,

布氏假单胞菌在发酵环境中整体呈现上升趋势, 在发酵第 27 天时, 在细菌中达到最大占比 1.87%。氧化葡萄糖杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 在细菌中的占比随着时间先升高后降低, 在发酵第 3 天时, 在细菌中占比达到最大值 1.95%, 在第 15 天后, 氧化葡萄糖杆菌在发酵环境中占比降至 0%。氧化葡萄糖杆菌有较好的产酸和耐酸能力, 但是研究发现其并没有转化乙酸的能力, 甚至代谢能力会受环境中乙醇含量的影响<sup>[18]</sup>, 这也可能是后期在醋醅中没有检测到氧化葡萄糖杆菌的原因。在醋醅中, 还发现了对麸醋风味有贡献的干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*), 常被制成益生菌制剂, 并且在食醋制作过程中有显著产酸和产香的能力<sup>[19]</sup>。

在种的水平对醋醅中细菌结构进行分析发现, 在食醋制作过程中, 醋醅中主要是以乳酸杆菌和巴士醋杆菌为主的微生态结构。在糖化阶段和酒精发酵阶段, 乳酸杆菌主要是将大分子物质分解后产生乳酸和风味物质。在醋酸发酵阶段, 主要是醋酸菌将酒精发酵产物转化成乙酸、乳酸以及其它有机酸等酸味物质。可见, 麸醋的品质来源不仅仅依赖于单一的菌群, 而是微生态的动态演替。

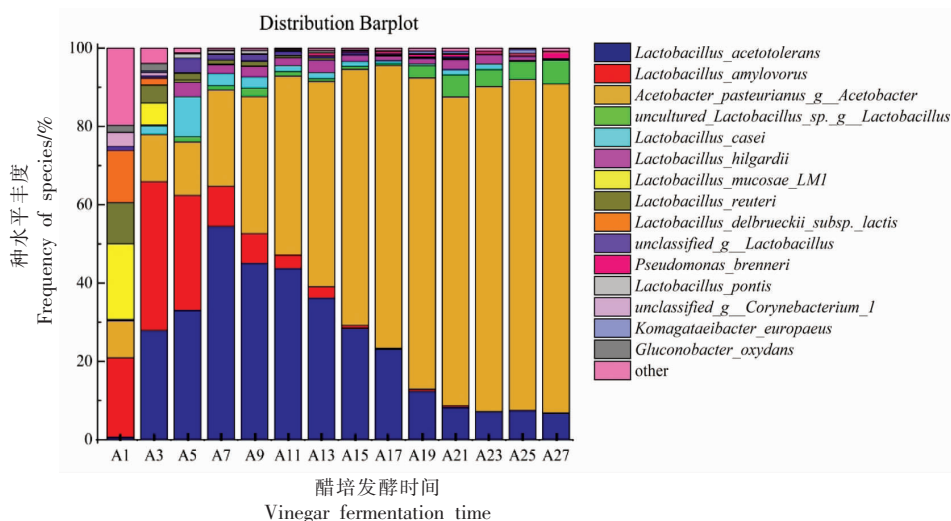


图2 四川麸醋发酵过程中细菌群落在种水平的分布

Fig.2 Relative abundance of bacteria community proportions at species in Sichuan bran vinegar

#### 2.4 四川麸醋发酵过程中真菌群落在门水平的结构分布以及动态变化

在门的水平对四川麸醋醋醅中真菌菌群结构进行分析, 结果如图 3 所示。结果表明, 在麸醋发

酵过程中, 主要是子囊菌门 (Ascomycota) 和担子菌门 (Basidiomycota), 两个门在真菌菌群中总占比始终在 98% 以上。其中子囊菌门是优势菌门, 在第 3 天时, 子囊菌门在真菌中占比达到最大值 99.86%,

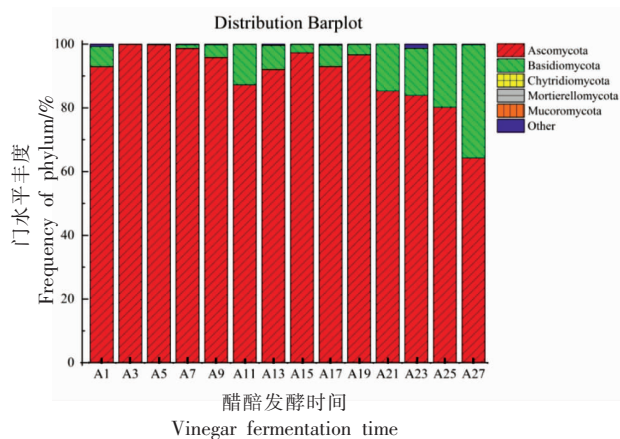


图 3 四川麸醋发酵过程中真菌群落在门水平的分布

Fig.3 Relative abundance of fungal community proportions at phylum in Sichuan bran vinegar

在发酵第 27 天时,子囊菌门在真菌中占比降低至 64.23%。此外,担子菌门在发酵第 1 天时,在真菌菌群中占比 6.29%,在发酵前 17 天,担子菌门的占比有上下的波动,在第 17 天后,担子菌门在真菌菌群中占比逐渐增加,在发酵第 27 天时,担子菌门占比达到最大值 35.55%。在四川麸醋醋醋中还检测出壶菌门(Chytridiomycota)、毛霉门(Mucoromycota)和被孢霉门(Mortierellomycota)。

## 2.5 四川麸醋发酵过程中真菌群落在种水平的结构分布以及动态变化

在种水平对四川麸醋醋醋中真菌菌群结构进行分析,结果如图 4 所示。在发酵过程中,主要有

酵母属 (*Saccharomyces* spp.)、皮状丝孢酵母属 (*Cutaneotrichosporon* spp.)、毕赤酵母属 (*Pichia* spp.)、链格孢属 (*Alternaria* spp.)、双足囊菌属 (*Dipodascus* spp.)、曲霉属 (*Aspergillus* spp.)、节担菌属 (*Wallemia* spp.)等。从图 4 中可知,四川麸醋发酵过程中,优势菌种是酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*),酿酒酵母在发酵第 1 天时,在真菌菌群中占比 1.64%,酿酒酵母在发酵前 5 天,在真菌菌群中占比快速增长,在发酵第 5 天时,在真菌菌群中达到最大占比 97.94%,随后占比开始下降,在发酵第 23 天时,酿酒酵母在真菌菌群中占比下降至 0.10%。研究学者发现,酿酒酵母能快速发酵糖类物质产生乙醇,还能产生多肽物质来抑制非酿酒酵母的生长<sup>[20]</sup>,这可能是酿酒酵母在前 5 天时,能成为优势菌种的原因。曲霉属 (*Aspergillus* spp.)中主要有未分类的曲霉属 (*Unclassified Aspergillus*, 0.02%~2.39%)、黑曲霉 (*Aspergillus subversicolor*, 0.00%~3.14%)、帚状曲霉 (*Aspergillus penicillioides*, 0.01%~2.47%) 和多育曲霉 (*Aspergillus proliferans*, 0.00%~1.58%)。曲霉属在食醋发酵过程中主要是在糖化阶段分泌淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶等,将蛋白质、淀粉等大分子物质水解成多肽、氨基酸等小分子物质,为发酵环境中其它微生物菌群的生长提供营养物质<sup>[21]</sup>。多育曲霉能产生纤维素降解酶,此外常被用于对工业废水中染料进行微生物脱色<sup>[22]</sup>。帚状曲霉在发酵

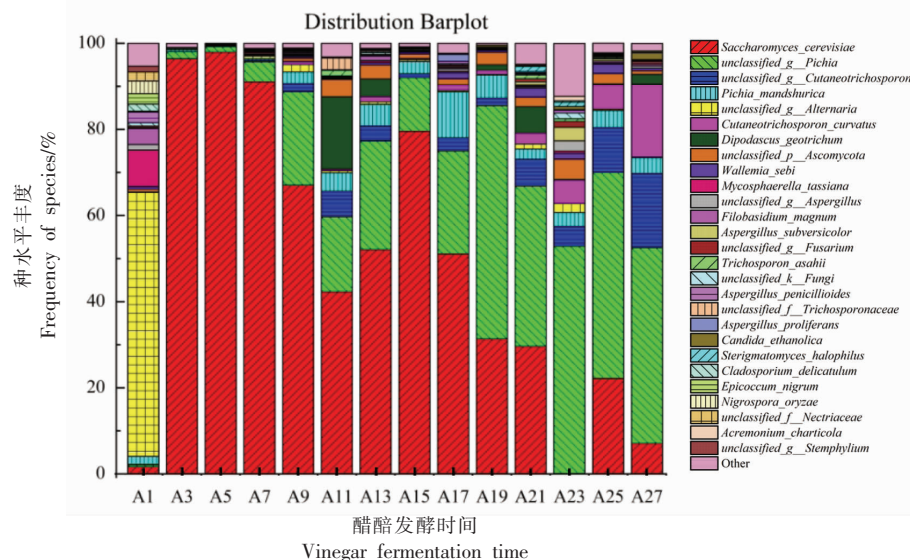


图 4 四川麸醋发酵过程中真菌群落在种水平的分布

Fig.4 Relative abundance of fungal community proportions at species in Sichuan bran vinegar

第1天时,在真菌菌群中占比最大(2.47%),随后开始快速降低,据研究发现帚状曲霉喜生长在水分活度低的环境中<sup>[23]</sup>。皮状丝孢酵母属中主要是未分类皮状丝孢酵母(*unclassified Cutaneotrichosporon*)和弯曲隐球菌(*Cutaneotrichosporon curvatus*)。弯曲隐球菌是一种产油酵母,能利用发酵环境中的不同可再生碳源,比如葡萄糖、蔗糖和乳糖等;此外,还可以利用半纤维素和脂质等<sup>[24]</sup>。毕赤酵母属中主要有未分类的毕赤酵母(*unclassified Pichia*,0.50%~54.17%)和曼陀罗毕赤酵母(*Pichia mandshurica*,0.08%~10.68%)。其中曼陀罗毕赤酵母在发酵前5天在真菌菌群中占比下降,随后占比增大,在发酵第17天时曼陀罗毕赤酵母占比达到最大值。在麸醋发酵过程中,酿酒酵母、未分类的毕赤酵母和曼陀罗毕赤酵母相互竞争,所以在发酵初期时,3种酵母之间占比出现此起彼伏相互竞争的趋势。此外,在醋醅中还检测出链格孢属,链格孢属中主要有未分类的链格孢属(*unclassified Alternaria*,0.12%~61.31%),在发酵的第1天时,未分类的链格孢属是发酵环境中的优势菌种,随后开始降低,在发酵第27天时,未分类的链格孢属在真菌菌群中占比最低。链格孢属是植物性病原菌<sup>[25]</sup>,可见发酵环境中的未分类的链格孢属主要来源于醋醅中,在发酵结束时,发酵环境中的未分类的链格孢属减少至最低,可能和发酵环境中的pH值下降有关。

麸醋发酵过程中,真菌菌群中的酵母主要发酵糖类物质,产生乙醇,从结果中发现,在四川麸醋发酵过程中,酵母在真菌菌群中占有绝对优势地位。而曲霉属在糖化阶段有着重要地位,曲霉属为麸醋风味物质的生成、酒精发酵和醋酸发酵过程进行铺垫。在醋醅中检测出链格孢属的存在,说明麸醋醋醅的微生物安全性值得注意。

### 3 结论

对四川麸醋发酵过程中微生物群落结构变化和演替规律进行分析,发现细菌群落多样性和丰度指数在发酵第1天时最高,真菌菌群丰度指数在发酵第1天时最高,而真菌菌群多样性指数在发酵第23天时最高,造成细菌和真菌之间有差别原因可能是细胞壁结构的差异性。在门的水平分

别对醋醅中细菌菌群结构和真菌菌群结构进行分析,结果表明:细菌菌群中的优势菌门是厚壁菌门,而真菌菌群中的优势菌门是子囊菌门。在种的水平分别对醋醅中细菌菌群结构和真菌菌群结构进行分析,结果表明:细菌菌群中的优势菌种是耐酸乳酸杆菌和巴氏醋杆菌,真菌菌群中的优势菌种是酿酒酵母。此外,还在醋醅中检测出对麸醋风味有贡献的曲霉属,意外的检测出植物性病原菌链格孢属。

结果表明,通过高通量测序技术监控四川麸醋发酵过程中微生物群落结构变化,不仅可以锚定优势菌种,也可以对后期调控发酵环境中微生态结构,完善传统工艺,提高四川麸醋的食用安全性奠定理论基础。

### 参 考 文 献

- [1] 刘阳,邓静,姜元华,等. 保宁醋醋曲中产多糖乳酸菌的筛选及其代谢产物分析[J]. 现代食品科技, 2018, 34(3): 184-190.  
LIU Y, DENG J, JIANG Y H, et al. Screening of polysaccharide-producing lactic acid bacteria in Baoning Vinegar Koji and analysis of its metabolites [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(3): 184-190.
- [2] 焦玉双. 山西老陈醋大曲中优良乳酸菌的分离筛选及其发酵应用研究[D]. 太原: 山西农业大学, 2016.  
JIAO Y S, Screening of Quality LAB Strains from Daqu of Shanxi mature vinegar and study on their fermentation application[D]. Taiyuan: Shanxi Agricultural University, 2016.
- [3] 蔡美珠. 应重视乳酸菌在食醋中的作用[J]. 江苏调味副食品, 1992, 11(4): 3-5.  
CAI M Z. Attention should be paid to the role of lactic acid bacteria in vinegar[J]. Jiangsu Condiment and Subsidiary Food, 1992, 11(4): 3-5.
- [4] 钟正丹,吴华昌,邓静,等. 保宁醋醋曲中产香酵母的鉴定及挥发性成分研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(24): 206-210.  
ZHONG Z D, WU H C, DENG J, et al. Identification and study of fermentation metabolites of aroma-producing yeast strains from Baoning vinegar[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(24): 206-210.

- [5] 王俊奇, 黄卫红, 李双彤, 等. 永春老醋不同生产阶段细菌和真菌多样性动态变化特征分析[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(2): 38-44.  
WANG J Q, HUANG W H, LI S T, et al. Dynamic changes of bacterial and fungal diversities in Yongchun aged vinegar during production and storage[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(2): 38-44.
- [6] 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.
- [7] 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, 2016.  
WANG Z M. Correlation between structural shifts of microbiota and compositions of flavors during the stage of acetic acid fermentation of Zhenjiang aromatic vinegar[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2016.
- [8] BASSI D, PUGLISI E, COCCONCELLI P S. Understanding the bacterial communities of hard cheese with blowing defect[J]. Food Microbiology, 2015, 52: 106-118.
- [9] POLKA J, REBECCHI A, PISACANE V, et al. Bacterial diversity in typical Italian salami at different ripening stages as revealed by high-throughput sequencing of 16S rRNA amplicons[J]. Food Microbiology, 2015, 46: 342-356.
- [10] VASILEIADIS S, PUGLISI E, TREVISAN M, et al. Changes in soil bacterial communities and diversity in response to long-term silver exposure[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2015, 91(10): 108-114.
- [11] SCHLOSS P D, WESTCOTT S L, RYABIN T, et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(23): 7537-7541.
- [12] KONG H H, CONLAN S, GRICE E A, et al. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome[J]. Science, 2009, 324(5931): 1190-1192.
- [13] DENG Y, LIU J, LI L, et al. Reduction and restoration of culturability of beer-stressed and low-temperature-stressed *Lactobacillus acetotolerans* strain 2011-8[J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 206: 96-101.
- [14] RYAN L A, ZANNINI E, DAL BELLO F, et al. *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280 as a novel food-grade antifungal agent for bakery products[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 146(3): 276-283.
- [15] QI Z, WANG W, YANG H, et al. Mutation of *Acetobacter pasteurianus* by UV irradiation under acidic stress for high-acidity vinegar fermentation[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2014, 49(2): 468-476.
- [16] DUBEY S, SHARMA R K, AGARWAL P, et al. From rotten grapes to industrial exploitation: *Komagataeibacter europaeus* SGP37, a micro-factory for macroscale production of bacterial nanocellulose[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 96: 52-60.
- [17] BAÍDA N, YAZOURH A, SINGER E, et al. *Pseudomonas brenneri* sp. nov. a new species isolated from natural mineral waters[J]. Research in Microbiology, 2001, 152(5): 493-502.
- [18] PRUST C, HOFFMEISTER M, LIESEGANG H, et al. Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*[J]. Nature Biotechnology, 2005, 23(2): 195-200.
- [19] YADAV H, JAIN S, SINHA P R, et al. Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats[J]. Nutrition, 2007, 23(1): 62-68.
- [20] 彭潇, 邹文静, 邵清清, 等. 石榴酒发酵过程中真菌种群演替及风味物质代谢规律解析[J]. 食品科学: 2021, 42(6): 157-163.  
PENG X, ZOU W J, SHAO Q Q, et al. Fungal community succession and flavor compounds metabolism during pomegranate wine fermentation[J]. Food Science, 2021, 42(6): 157-163.
- [21] 李敏. 夏冬两季食醋微生物群落演替特征及其特征微生物研究[D]. 太原: 太原理工大学, 2019.  
LI M. Succession characteristics of microbiota and characteristic microbes in vinegar brewing during summer and winter[D]. Taiyuan: Taiyuan University of Technology, 2019.
- [22] KANMANI P, R S K, YUVARAJ N, et al. Microbial decolorization of synthetic dyes and reactive dyes of industrial effluents by using a novel fungus *Aspergillus proliferans* [J]. Water Environment Re-

- search, 2011, 83(11): 2099–2106.
- [23] IMRAN A, ALI A, MOHAMMAD A, et al. Purification and characterization of a polyextremophilic  $\alpha$ -amylase from an obligate halophilic *Aspergillus penicillioides* isolate and its potential for souse with detergents[J]. Biomed Research International, 2015, 2015: 1–8.
- [24] HOFMEYER T, HACKENSCHMIDT S, NADLER F, et al. Draft genome sequence of *Cutaneotri-*  
*chosporon curvatus* DSM 101032 (Formerly *Cryptococcus curvatus*), an oleaginous yeast producing polyunsaturated fatty acids [J]. Genome Announc, 2016, 4(3): e00362–16.
- [25] DELLAVALLE P D, CABRERA A, ALEM D, et al. Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria* spp [J]. Chilean Journal of Agricultural Research, 2011, 71 (2): 231–239.

### Analysis of Microbial Community Structure in Sichuan Bran Vinegar Fermentation Based on Illumina MiSeq High-throughput Sequencing Technology

Zhang Yalin, Liu Tingrui, Zhu Wenyong\*, Chen Jing, Liu Yan, Xu Hui

(Solid-state Fermentation Resource Utilization Key Laboratory of Sichuan Province, Department of Agriculture, Forestry and Food Engineering, Yibin University, Yibin 644000, Sichuan)

**Abstract** Microbial community structure and succession law among Sichuan bran vinegar during fermentation were analyzed by high-throughput sequencing technology. The result showed that the abundance indexes of bacterial community and fungal community were the largest on the first day of fermentation, while the diversity indexes of bacterial community and fungal community were the largest on the first day and the 23th day of fermentation, respectively. The structure of bacterial community and fungal community in vinegar was analyzed at the phylum level, the dominant phyla of bacteria was Firmicutes, and the dominant phylum of fungal was Ascomycota. The structure of bacterial community and fungal community in vinegar was analyzed at the species level, the dominant bacterial species was *Lactobacillus acetotolerans* and *Acetobacter pasteurianus*, which reached the maximum proportion of 54.47% and 84.54% on the 7th and 25th days of fermentation, respectively. The dominant species of fungal was *Saccharomyces cerevisiae*, which reached the maximum proportion of 97.94% on the 5th day of fermentation. In addition, *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp., were detected in vinegar. Through the study on microbial community structure and succession law in the fermentation process of Sichuan bran vinegar, it was order to anchor the dominant microbial of Sichuan bran vinegar and the quality of bran vinegar can be improved by regulating the micro-ecological structure of the fermentation environment.

**Keywords** Sichuan bran vinegar; high-throughput sequencing technology; bacterial; fungal; micro-ecological structure