

# 基于高通量测序的浙江玫瑰醋发酵过程中细菌菌群结构及其动态演替

方冠宇, 黄炳文, 蒋予箭

(浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310018)

**摘 要:** 基于Illumina MiSeq高通量测序对浙江玫瑰醋“冲缸放水”后醋样中的细菌DNA序列的V4区进行测序。在门水平对细菌群落进行分析, 表明浙江玫瑰醋在“冲缸放水”后的发酵过程中主要菌群为变形菌门(Proteobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes), 两者相对丰度一直处于98%以上, 并且变形菌门相对丰度持续升高, 厚壁菌门持续降低。在属水平对细菌进行分析表明, 浙江玫瑰醋发酵过程中主要为醋酸杆菌属(*Acetobacter*)和乳杆菌属(*Lactobacillus*), 并且醋酸杆菌属随着发酵的进行相对丰度呈现持续上升趋势, 乳杆菌属呈现下降趋势。肠球菌属(*Enterococcus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)相对丰度较低, 但存在于整个发酵过程。开始“冲缸放水”时的细菌组成与后期发酵有明显差异。对浙江玫瑰醋发酵过程中乳酸菌进行了分离、鉴定, 得到了4株副干酪乳杆菌(*L. paracasei*), 1株清酒乳杆菌(*L. sakei*), 1株鼠李糖乳杆菌(*L. rhamnosus*), 1株干酪乳杆菌(*L. casei*)。将浙江玫瑰醋发酵过程中细菌组成与其他醋发酵过程细菌组成进行比较, 发现所有醋发酵过程高丰度细菌相同, 都为醋酸杆菌属和乳杆菌属, 但低丰度细菌差异明显。

**关键词:** 浙江玫瑰醋; 高通量测序; 细菌菌群结构; 乳杆菌

## Dynamic Succession of Bacterial Community Structure during the Fermentation Process of Zhejiang Rosy Vinegar Analyzed by High Throughput Sequencing

FANG Guanyu, HUANG Bingwen, JIANG Yujian

(School of Food Science and Biological Engineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** In this study, Illumina MiSeq high-throughput sequencing was used to sequence the V4 region of the bacterial 16S rRNA gene in Zhejiang rosy vinegar at different fermentation times. Analysis of the bacterial community showed that Proteobacteria and Firmicutes were the predominant bacterial phyla during the fermentation process of Zhejiang rosy vinegar. Their relative abundances were always above 98%. The relative abundance of Proteobacteria continued to increase while that of Firmicutes continued to decrease. *Acetobacter* and *Lactobacillus* were the main bacterial genera and the relative abundance of *Acetobacter* showed a continuous increasing trend while that of *Lactobacillus* showed a declining trend. The relative abundances of *Enterococcus*, *Pseudomonas* and *Bacillus* were low but detectable during the whole fermentation process. There was a significant difference in the bacterial community composition between the early and late stages of fermentation. Four strains of *L. paracasei*, one strain of *L. sakei*, one strain of *L. rhamnosus* and one strain of *L. casei* were isolated and identified during the fermentation process. By comparing the bacterial community composition of Zhejiang rosy vinegar with that of other vinegars during the fermentation process, we found that the highly abundant bacteria were *Acetobacter* and *Lactobacillus* for all vinegars whereas the composition of lowly abundant bacteria was quite different.

**Keywords:** Zhejiang rosy vinegar; high throughput sequencing; bacterial community structure; *Lactobacillus*

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190119-234

中图分类号: TS264.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2020)04-0125-09

收稿日期: 2019-01-19

基金项目: 浙江工商大学研究生科研创新基金项目(16020000359)

第一作者简介: 方冠宇(1993—)(ORCID: 0000-0002-8822-2059), 男, 硕士, 研究方向为现代食品制造。

E-mail: fanggy\_4216@163.com

引文格式:

方冠宇, 黄炳文, 蒋予箭. 基于高通量测序的浙江玫瑰醋发酵过程中细菌菌群结构及其动态演替[J]. 食品科学, 2020, 41(4): 125-133. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190119-234. <http://www.spkx.net.cn>

FANG Guanyu, HUANG Bingwen, JIANG Yujian. Dynamic succession of bacterial community structure during the fermentation process of Zhejiang rosy vinegar analyzed by high throughput sequencing[J]. Food Science, 2020, 41(4): 125-133. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190119-234. <http://www.spkx.net.cn>

浙江玫瑰醋是江浙一带的传统调味品, 具有悠久历史。浙江玫瑰醋发酵工艺独特, 为静态表面发酵, 并且在发酵过程中没有添加菌种, 所有发酵微生物都来自于环境。米饭经“发花”后“冲缸放水”, 由于微生物的优胜劣汰, 在微生物达到平衡的同时, 不断使原料进行糖化、乙醇发酵、醋酸发酵从而产生各种风味物质<sup>[1-2]</sup>。

随着生物技术的发展, 变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)<sup>[3-9]</sup>和高通量测序<sup>[10-11]</sup>等技术被应用于食醋发酵过程中微生物群落测定。发酵食品中的微生物群落的组成、发酵过程中的变化<sup>[4,12-14]</sup>以及功能<sup>[15-17]</sup>越来越多的被研究。有研究表明<sup>[18]</sup>韩国食醋酿造主要分为3个阶段: 糖化阶段的主要微生物为*Aspergillus* sp.; 乙醇发酵阶段的微生物为*Saccharomyces* sp.和*Saccharomycodes* sp.; 醋酸发酵阶段微生物为*Acetobacter* sp.。Wu Jiajia等<sup>[3]</sup>对食醋固态发酵过程中醋酸菌的多样性进行研究, 结果表明, 醋酸菌主要是*Acetobacter pasteurianus*。Xu Wei等<sup>[4]</sup>对镇江香醋发酵过程中微生物群落变化采用DGGE、克隆文库和实时定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)等分子生态学技术进行了研究, 发现主要细菌为*Acetobacter*、*Lactobacillus*、*Gluconacetobacter*、*Enterobacter*等, 真菌为*Saccharomyces*。有研究<sup>[8,19]</sup>利用DGGE方法分析了意大利香醋中醋酸菌的多样性, 分析发现其主要的醋酸菌为*A. pasteurianus*和*A. aceti*。Solieri等<sup>[20]</sup>对意大利传统香醋生产过程中的酵母菌群落进行了详细研究, 发现大部分菌株属于*Zygosaccharomyces*属, 其中, *Z. bailii*的丰度占41%。Gullo等<sup>[7]</sup>在意大利香醋发酵阶段添加*A. pasteurianus*和*G. europaeus*, 发现添加菌种后更有利于醋酸发酵。Vegas等<sup>[21]</sup>对葡萄酒醋发酵过程中醋酸菌多样性进行了研究, 发现醋酸菌会随醋酸浓度的改变而发生变化。Ilabaca等<sup>[22]</sup>对智利传统食醋发酵过程中微生物变化进行了研究, 发现食醋在发酵末期仅存的醋酸菌为*A. pasteurianus*。浙江玫瑰醋独特的酿造工艺及微生物群落组成, 造就了其特有的风味。而目前对浙江玫瑰醋发酵过程中微生物群落的组成及变化研究很少。

细菌亲缘关系的16S基因含有9个可变区, 其中V4区是指第4个可变区, 一般是指515~806 bp区域, 长度约为290 bp。通过对细菌DNA序列的V4区进行测序, 就可以

测出细菌的种属, 并且较为经济。因此本研究采用高通量测序技术对浙江玫瑰醋“冲缸放水”后的发酵过程中细菌V4区进行测序, 对浙江玫瑰醋发酵过程中细菌菌群结构进行检测, 并对乳酸菌进行分离鉴定, 旨在得到浙江玫瑰醋发酵过程中细菌的组成和演替规律。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

中晚籼米来自安徽滁州; RNaseA、蛋白酶K、溶菌酶、溴化十六烷基三甲胺、琼脂糖 生工生物工程(上海)股份有限公司; FastPfu聚合酶、FastPfu缓冲液、dNTPs、乙二醇四乙酸 上海百塞生物技术有限公司; 土壤DNA提取试剂盒 MP Biomedicals生物医疗公司。

### 1.2 仪器与设备

琼脂糖凝胶电泳仪 美国Bio-Rad公司; PCR仪 美国ABI应用生物系统公司; GDS凝胶成像系统 英国UVP公司; DyNA Quant 200浓度测定仪 美国Pharmacia Biotech公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 浙江玫瑰醋酿造工艺

以籼米为原料, 常温浸米7 d(隔天换水), 常压蒸饭(控制出饭率220%); 每缸投入饭220 kg, 搭窝, 常温(5月份)发花16 d; 发花结束时, 按米-水质量比1:3“冲缸放水”, 进行为期4个月左右的发酵, 当总酸质量浓度不再上升时, 添加3%食盐, 进行后熟。

#### 1.3.2 取样方法

每次取样前先对玫瑰醋发酵液进行充分混匀, 并在液面以下取样。取样后, 按照0、10、20、30、40、50、60、70、80、90 d进行编号, 每10 d取1次样, 每次取3个平行。

#### 1.3.3 DNA提取和PCR

按照土壤DNA提取试剂盒说明书对醋样中微生物DNA进行提取。将提取合格的DNA进行PCR, PCR条件为: 1) 样品统一稀释到20 ng/μL, 不足的直接使用原液, 同时会根据样品的实际扩增情况对样本进行一定的稀释调整。2) 扩增体系(25 μL): 5×reaction buffer 5 μL, 5×GC buffer 5 μL, dNTP(2.5 mmol/L) 2 μL, 上游引物(10 μmol/L) 1 μL, 下游引物(10 μmol/L)

1  $\mu\text{L}$ , DNA Template 2  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 8.75  $\mu\text{L}$ , Q5 DNA Polymerase 0.25  $\mu\text{L}$ 。3) 扩增参数: 98  $^{\circ}\text{C}$  预变性2 min, 1 个循环; 98  $^{\circ}\text{C}$  变性15 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  退火30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸30 s, 25 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸5 min, 1 个循环; 于10  $^{\circ}\text{C}$  保持。

### 1.3.4 高通量测序

将扩增成功的产物送上海派森诺生物科技股份有限公司进行高通量测序。测序平台: MiSeq; 测序区域: 细菌V4区。

### 1.4 数据分析

采用Excel等软件对数据进行统计分析, 浙江玫瑰醋发酵过程中理化指标变化曲线、细菌相对丰度柱状图和扇形图采用Origin 8进行绘制, 乳杆菌系统发育树采用MEGA-X进行绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 浙江玫瑰醋发酵过程中理化指标变化

浙江玫瑰醋在发酵过程中理化指标的变化会直接影响其细菌的多样性和菌群结构变化。因此对浙江玫瑰醋发酵过程中还原糖、乙醇体积分数、总酸等理化指标进行了跟踪测定, 结果见图1。

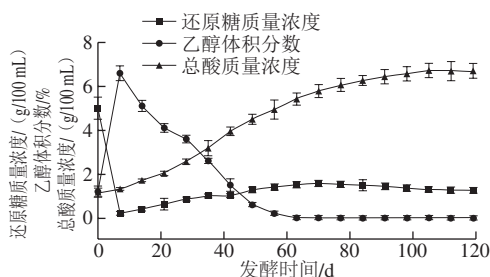


图1 浙江玫瑰醋发酵过程中理化指标变化

Fig. 1 Changes in physicochemical indexes during the fermentation of Zhejiang rosy vinegar

由图1可以看出, 前10 d还原糖含量急剧下降, 乙醇体积分数快速上升, 总酸质量浓度缓慢上升, 这阶段以酵母菌的乙醇发酵作用为主, 还原糖可从4~5 g/100 mL迅速降低到0.5 g/100 mL的水平, 乙醇体积分数可以迅速升高到体积分数6%~7%。饭醋经过16 d时间的“发花”, 已经有较高的糖, 空气中落入饭醋的酵母开始繁殖, “冲缸放水”后酵母菌在厌氧条件下迅速将可发酵糖转变成乙醇, 这个阶段还原糖下降的曲线和乙醇生成的曲线相对应。

10 d后, 醋醅进入“边糖化”、“边酒化”、“边醋化”的多边发酵阶段, 淀粉酶对淀粉的糖化作用仍在不断延续, 还原糖含量表现出缓慢上升, 乙醇体积分数持续下降, 总酸含量持续上升。即10 d后醋醅进入到以醋酸发酵为主的阶段, 这时由于总酸质量浓度的上升, 抑

制了酵母菌的生长, 乙醇发酵速度减慢, 淀粉转化为还原糖的速度大于还原糖转化为乙醇的速度。

70 d后, 玫瑰醋发酵液中已经检测不到乙醇, 但是总酸质量浓度从5 g/100 mL左右继续上升到6 g/100 mL左右, 还原糖含量从1.5 g/100 mL左右迅速降低到1.0 g/100 mL左右, 略呈下降趋势。这是由于此时仍有微弱的乙醇发酵消耗还原糖产生乙醇, 只是醋酸发酵速度不低于乙醇发酵速度, 并且葡萄糖酸属细菌可以利用葡萄糖发酵成葡萄糖酸。因此发酵液中检测不到乙醇, 总酸含量继续上升。

90 d后, 醪液总酸质量浓度不再上升, 呈现下降趋势。这是由于醋酸杆菌属可将醋酸和乳酸氧化成CO<sub>2</sub>和水, 使总酸质量浓度下降<sup>[23]</sup>。此时要加2.3%~3%的食盐终止发酵。后期还原糖与氨基酸类物质会由于美拉德反应导致还原糖含量下降。

### 2.2 浙江玫瑰醋发酵过程中细菌多样性分析

原始数据中, 不同样本的测序量往往不一致, 因此, 在进行数据分析时, 需要考虑不同样本测序量的差异。目前最常用的校正测序深度的方法是, 对可操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU) 丰度矩阵中的全体样本, 根据最低测序深度统一进行随机重抽样, 也就是所谓的“拉平处理”, 从而在一致的测序深度中获得稀疏化OTU丰度矩阵。同时与根据测序量直接换算为相对丰度百分比的方法相比, 拉平处理可以更好地避免测序深度导致的样本间差异, 从而更为客观地反映不同样本间菌群的 $\alpha$ 和 $\beta$ 多样性差异。因此, 在 $\alpha$ 和 $\beta$ 多样性分析时, 都是对经过拉平处理的数据进行分析, 从而最大程度上保证分析的一致性和可靠性。

为比较不同样本的多样性, 首先对OTU丰度矩阵中的全体样本在90%的最低测序深度水平, 统一进行随机重抽样 (即“序列量拉平处理”), 从而校正测序深度引起的多样性差异。随后, 使用QIIME软件分别对每个样本计算上述4种多样性指数。

表1 玫瑰醋中细菌多样性指数  
Table 1 Bacterial diversity indexes in different samples

发酵时间/d	测序量	Simpson指数	Chao1指数	ACE指数	Shannon指数
0	48 568	0.94	224.77	224.80	5.13
10	43 158	0.87	240.71	249.71	3.68
20	38 888	0.71	165.66	171.74	2.67
30	39 199	0.71	193.12	192.61	2.83
40	44 171	0.60	139.75	142.62	2.22
50	31 893	0.70	309.00	309.00	3.33
60	34 204	0.72	315.00	315.00	3.21
70	43 273	0.67	299.89	292.75	2.75
80	40 585	0.79	202.24	206.48	3.14
90	40 423	0.66	174.18	165.70	2.59

Shannon多样性指数综合考虑了群落的丰富度和均匀度。Shannon指数值越高, 表明群落的多样性越高。

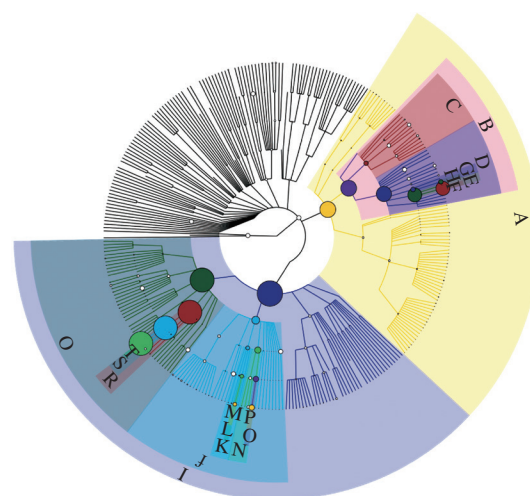


Simpson多样性指数也是评价群落多样性的常用指数之一。Simpson指数值越高,表明群落多样性越高。由表1可以看出,第0天时,醋样中细菌的Simpson指数值最高,说明玫瑰醋在发花过程中积累了大量细菌,有研究表明<sup>[24]</sup>,浙江玫瑰醋生产过程中,米饭在陶缸内“搭窝”进行“发花”,草缸盖以及缸壁上的微生物会迅速在米饭表面进行繁殖,对淀粉进行糖化,非常有利于细菌的生长。在前期发酵过程中,Simpson指数呈现略下降趋势,这是由于浙江玫瑰醋在“冲缸放水”后,其适宜的糖度非常有利于酵母菌的繁殖,利用还原糖发酵醋乙醇,发酵前期乙醇体积分数的上升不利于浙江玫瑰醋中细菌的生长繁殖,因此其细菌多样性降低。乙醇的产生有利于醋酸菌的繁殖,醋酸菌进行醋酸发酵使发酵液的总酸含量持续上升,pH值持续下降,这导致了浙江玫瑰醋在发酵过程中细菌多样性一直呈现下降趋势。在40 d和70 d附近细菌多样性有较大的波动,两个样品中细菌的多样性都出现了下降,这是由于在发酵前期,“冲缸放水”之后,非常适于细菌繁殖,细菌多样性较高,但是随着乙醇发酵和醋酸发酵的进行,发酵液中的乙醇体积分数和总酸含量上升,在40 d附近导致细菌多样性下降。随着总酸质量浓度上升,耐酸细菌会大量繁殖,细菌多样性又呈现出上升趋势,到70 d附近,总酸含量已经很高,导致细菌多样性下降。

**2.3 浙江玫瑰醋发酵过程总体样品中主要细菌菌群分析**

分类等级树展示了样本总体中,从门到属(从内圈到外圈依次排列)所有分类单元(以节点表示)的等级关系,节点大小对应该分类单元的平均相对丰度,相对丰度前20位的分类单元还将在图中以字母标识(从门到属按照从外层到内层依次排列),字母上的阴影颜色同对应节点颜色一致。

由图2可以看出,浙江玫瑰醋发酵过程总体样品中,相对丰度最高的门为变形菌门(Proteobacteria),其次为厚壁菌门(Firmicutes)。在纲水平的主要细菌有: $\alpha$ -变形菌纲(Alphaproteobacteria)、 $\gamma$ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)、芽孢杆菌纲(Bacilli)。在目水平的主要细菌有:红螺菌目(Rhodospirillales)、海洋螺菌目(Oceannospirillales)、假单胞菌目(Pseudomonas)、乳杆菌目(Lactobacillales)、芽孢杆菌目(Bacillales)。在科水平的主要细菌有:醋酸杆菌科(Aceae)、盐单胞菌科(Halomonadaceae)、假单胞菌科(Pseudomonadaceae)、肠球菌科(Enterococcaceae)、乳杆菌科(Lactobacillaceae)。在属水平的细菌主要有:醋酸杆菌属(*Acetobacter*)、盐单胞菌属(*Halomonas*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)。



A. p\_Firmicutes; B. c\_Bacilli; C. o\_Bacillales; D. o\_Lactobacillales; E. f\_Lactobacillaceae; F. g\_Lactobacillus; G. f\_Enterococcaceae; H. g\_Enterococcus; I. p\_Prteobacteria; J. c\_Gammaproteobacteria; K. o\_Oceannospirillales; L. f\_Halomonadaceae; M. g\_Halomonas; N. o\_Pseudomonadales; O. f\_Pseudomonadaceae; P. g\_Pseudomonas; Q. c\_Alphaproteobacteria; R. o\_Rhodospirillales; S. f\_Acetobacteraceae; T. g\_Acetobacter.

图2 浙江玫瑰醋发酵过程中细菌分类等级树

Fig. 2 Classification tree of bacteria in Zhejiang rosy vinegar during fermentation

## 2.4 浙江玫瑰醋发酵过程中门水平细菌群落变化分析<sup>[25]</sup>

### 2.4.1 0 d浙江玫瑰醋中门水平细菌菌群结构分析

由于第0天的样品为玫瑰醋刚“冲缸放水”后的样品,因此0 d样品中的微生物全部来自于玫瑰醋发花过程。其门水平的细菌菌群结构见图3,共检测出5个门。分别为变形菌门(40.65%)、厚壁菌门(55.09%)、放线菌门(Actinobacteria, 4.04%)、拟杆菌门(Bacteroidetes, 0.21%)、梭杆菌门(Fusobacteria, 0.011%)。这些细菌与栾同青<sup>[26]</sup>研究的黄酒中的细菌种类一致,也与浙江玫瑰醋在“冲缸放水”后主要先进行乙醇发酵的实际情况相符。

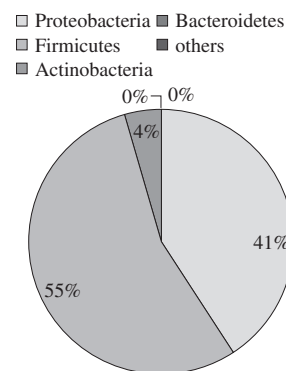


图3 第0天时醋样门水平细菌群落结构

Fig. 3 Bacterial community structure at the phyla level on day 0 of fermentation

## 2.4.2 浙江玫瑰醋发酵过程中门水平细菌菌群结构分析

在玫瑰醋发酵过程中, 总共检测到25个门。由图4可以看出, 变形菌门和厚壁菌门在整个玫瑰醋发酵过程中占绝对优势, 其相对丰度之和大于95%。在发酵过程中, 除早期发酵(0~10 d)变形菌门相对丰度略微降低, 厚壁菌门的丰度略微增加外。其他发酵阶段, 变形菌门相对丰度持续升高, 而厚壁菌门相对丰度持续降低。这是由于玫瑰醋的前期发酵为乙醇发酵, 到发酵第7天左右, 发酵液中的乙醇体积分数达到最高, 后面的发酵以醋酸发酵为主导。直到第80~90天时, 厚壁菌门的相对丰度接近0, 变形菌门的相对丰度达到最高, 两者趋于稳定。说明玫瑰醋在发酵过程中变形菌门起主导作用。在整个发酵过程中放线菌门和拟杆菌门一直存在, 但是相对丰度很低。浙江玫瑰醋发酵过程中门水平细菌群落变化规律与镇江香醋发酵过程中细菌门水平变化相似<sup>[27]</sup>。

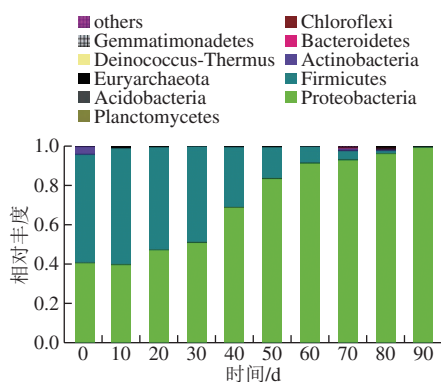


图4 浙江玫瑰醋发酵过程中细菌门水平群落结构

Fig. 4 Changes in relative abundances of major bacterial phyla during Zhejiang rosy vinegar fermentation

## 2.5 浙江玫瑰醋发酵过程中属水平细菌分析<sup>[26]</sup>

### 2.5.1 0 d浙江玫瑰醋中属水平细菌菌群结构分析

0 d样品为“冲缸放水”时的样品, 由于浙江玫瑰醋“发花”过程与后面的主发酵过程有明显不同, 因此第0天时样品中细菌群落组成与其他样品差异显著。从图5可以看出, 第0天时的样品中的主要细菌为: 醋酸杆菌属、肠球菌属、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、链球菌属(*Streptococcus*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)。其中醋酸菌和乳酸细菌的相对丰度最高。但与其他发酵阶段醋样中乳酸细菌不同的是, 其他发酵阶段的乳酸细菌主要为乳杆菌属, 而第0天时醋样中乳杆菌属的相对丰度很低, 主要为肠球菌属、链球菌属和部分芽孢杆菌属。有研究表明, 浙江玫瑰醋在“发花”过程中就会有大量乳酸积累, 说明这些乳酸大部分并不是由乳杆菌属产生, 而是由肠球菌属、链球菌属等乳酸细菌产生。

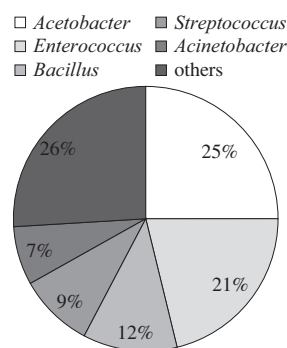


图5 第0天时的浙江玫瑰醋样品中属水平细菌群落结构

Fig. 5 Bacterial community structure at the genus level on day 0 of fermentation

### 2.5.2 浙江玫瑰醋发酵过程中属水平细菌菌群结构分析

浙江玫瑰醋是传统工艺特色保留比较完整的一种调味品, 其纯粹依靠空气中多种微生物在煮熟的米饭中生长、繁殖, 通过菌群的优胜劣汰, 在达到微生物平衡的同时, 使淀粉物质不断液化、糖化、酒化、醋化等过程。由图6可以看出, 玫瑰醋在“冲缸放水”后, 醋醅中的细菌的演替过程。除去第0天的样品, 醋醅中的醋酸杆菌属和乳杆菌属的丰度达到80%以上。说明玫瑰醋在发酵过程中醋酸杆菌属和乳杆菌属起着主导作用。在“冲缸放水”后的1周时间里, 玫瑰醋主要进行乙醇发酵, 在第7天左右, 醋醅的乙醇体积分数就达到最高值, 而后主要进行醋酸发酵, 因此在10 d以后醋酸杆菌的相对丰度呈现持续上升的趋势, 在第60天时其丰度达到最高, 60 d后醋酸杆菌属的相对丰度出现波动, 说明醋酸杆菌属的丰度达到平衡。在发酵过程中乳杆菌属的相对丰度呈现持续下降的趋势。这是由于玫瑰醋在发酵过程中, 不断对发酵液中的糖进行消耗、发酵液的pH值也不断降低, 对醋酸杆菌属产生了抑制作用。玫瑰醋的发酵过程没有人工添加菌种, 由于米饭表面很适宜霉菌生长, 因此“发花”过程中, 大量霉菌在米饭表面生长繁殖使米饭充分糖化。“冲缸放水”后, 随着糖浓度的降低, 细菌会迅速繁殖, 但由于适宜的糖浓度, 乙醇发酵很迅速。因此随着乙醇体积分数的升高, 不耐乙醇的细菌就会消失, 醋酸杆菌属等细菌就会迅速繁殖进行醋酸发酵。玫瑰醋为静态表面发酵, 其主要的发酵过程集中在发酵液表面, 由于发酵产热, 发酵液表面的温度最高可达40℃左右, 这种高温使不耐热的细菌不易生长。玫瑰醋发酵只有液面接触氧气, 液面以下的发酵液隔绝氧气, 适合一些厌氧或兼性厌氧菌的生长, 因此醋醅中乳杆菌属的相对丰度较高。随着发酵的进行, 发酵液中的营养成分消耗以及pH值持续下降, 许多不耐酸细菌就会消失。经过醋醅环境的多重选择, 醋醅中的微生物趋于稳定, 这种现象可以看作微生物的“自我净化”。

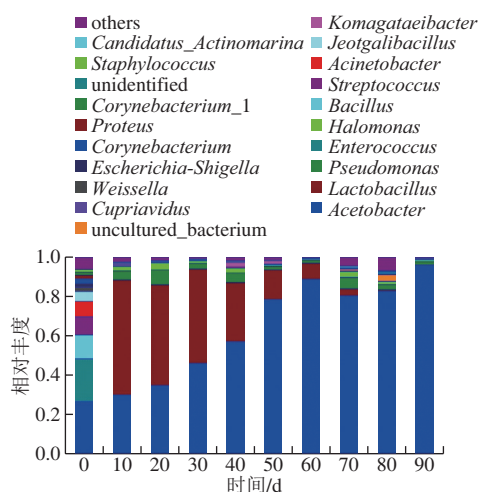


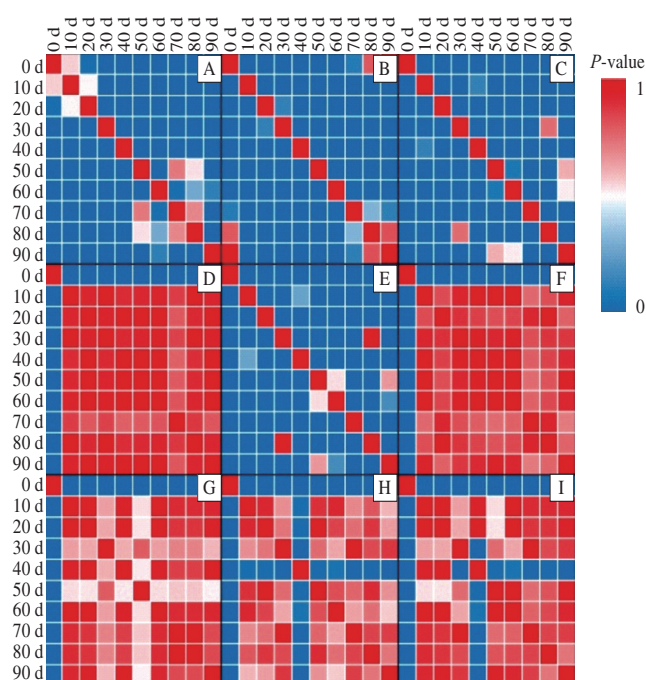
图6 浙江玫瑰醋在发酵过程中属水平细菌的相对丰度

Fig. 6 Changes in relative abundances of major bacterial genera during Zhejiang rosy vinegar fermentation

经过细菌对环境的适应与平衡, 醋醪中的微生物趋于稳定。除相对丰度较高的醋酸杆菌属和乳杆菌属外, 还有一些相对丰度较低的细菌能够适应醋醪环境一直存在于整个发酵过程中, 如: 肠球菌属、假单胞菌属、芽孢杆菌属、盐单胞菌属、链球菌属、不动杆菌属。这与固态发酵醋的细菌种类有所差异, 固态发酵醋发酵过程中, 除醋酸杆菌属和乳杆菌属外, 其他细菌为: 乳球菌属、葡糖醋酸杆菌属、肠球菌属、黄单胞杆菌属和芽孢杆菌属。除醋酸杆菌属和乳杆菌属外, 肠球菌属和芽孢杆菌属在两种醋的发酵过程中都存在。其中, 芽孢杆菌属虽然丰度很低, 但它们对风味物质的形成起着重要的作用<sup>[28]</sup>。假单胞菌属和不动杆菌属在黄酒发酵过程中有检出<sup>[29]</sup>, 这两种菌在玫瑰醋中检出可能是由于玫瑰醋前期发酵主要为乙醇发酵, 类似于黄酒发酵过程。

### 2.5.3 浙江玫瑰醋发酵过程中细菌相对丰度差异显著性分析

对浙江玫瑰醋发酵过程中不同发酵时间的主要细菌属相对丰度之间的差异显著性进行分析, 将 $P$ 值作Heatmap图( $P < 0.05$ , 显著;  $P < 0.01$ , 极显著)。由图7可以看出, 醋酸杆菌属、乳杆菌属、假单胞菌属、盐单胞菌属随着发酵进行, 其相对丰度变化较大, 因此不同发酵时期的样品中相对丰度差异较显著。肠球菌属、芽孢杆菌属、链球菌属、不动细菌属、咸海鲜芽孢杆菌属(*Jeotgalibacillus*)随着发酵进行变化不大, 因此这些细菌在不同发酵时期的相对丰度差异不显著。但是这些细菌对浙江玫瑰醋的风味形成起着重要作用, 肠球菌属存在于大多数发酵食品中, 对乳酸形成起着重要作用; 链球菌属和部分芽孢杆菌属都属于乳酸细菌<sup>[30]</sup>, 对有机酸的产生也起着重要作用。



A. *Acetobacter*; B. *Lactobacillus*; C. *Pseudomonas*; D. *Enterococcus*; E. *Halomonas*; F. *Bacillus*; G. *Streptococcus*; H. *Acinetobacter*; I. *Jeotgalibacillus*.

图7 浙江玫瑰醋发酵过程中细菌相对丰度差异显著性Heatmap

Fig. 7 Heatmap showing significant changes in relative abundance of bacterial genera during Zhejiang rosy vinegar fermentation

样品中醋酸杆菌属在浙江玫瑰醋发酵初期(0~20 d), 相对丰度差异不显著, 这是由于浙江玫瑰醋在发酵初期主要进行乙醇发酵, 醋酸杆菌属生长繁殖速度较慢, 大部分醋酸杆菌都为“发花”过程中积累; 醋酸杆菌属在发酵中期(30~50 d), 相对丰度差异性极显著, 这是由于发酵初期乙醇发酵积累了大量的乙醇, 醋酸杆菌进行醋酸发酵, 生长繁殖速度较快; 醋酸杆菌属在浙江玫瑰醋发酵的过程中的中后期(60~80 d), 相对丰度差异不显著, 这是由于在发酵中后期, 醋酸杆菌属达到了一个动态平衡; 在第90天时的玫瑰醋样品中醋酸杆菌属的相对丰度与其他任何时期的样品都差异极显著, 这是由于浙江玫瑰醋发酵末期, 总酸质量浓度较高, 不适宜其他细菌生长, 因此醋酸杆菌属的相对丰度达到最高。乳杆菌属的相对丰度除在发酵初期和发酵末期3个样品(0、80、90 d)之间差异不显著外, 其他样品差异均极显著。这是由于浙江玫瑰醋发酵初期乳杆菌属相对丰度很低, 并且随着发酵的进行, 发酵液的pH值降低不适宜乳杆菌属的生长, 因此其相对丰度持续下降, 80 d和90 d样品中的乳杆菌属的相对丰度已经降到很低, 因此0、80 d和90 d这3个样品中乳杆菌属的相对丰度差异不显著。



## 2.5.4 浙江玫瑰醋与其他品种醋在发酵过程中细菌群落组成比较分析

浙江玫瑰醋中与其他几个知名醋中的细菌组成进行对比,发现所有品种醋在发酵过程中的高相对丰度的细菌为醋酸杆菌属和乳杆菌属。但浙江玫瑰醋在发酵过程中乳杆菌的相对丰度要比其他品种醋明显偏低,这可能是导致浙江玫瑰醋乳酸含量较低、口感较其他醋刺激的原因。表2显示,不同地域、品牌的低丰度细菌差异明显,其中肠球菌属、链球菌属、盐单胞菌属、不动细菌属、魏斯氏菌属、棒状杆菌属等细菌均在浙江玫瑰醋中首次发现。这说明不同地域、品牌以及酿造工艺酿造的食醋风味差异可能是由于这些低丰度细菌的不同所致。因此在以后的食醋发酵研究中,在保证醋酸杆菌属和乳杆菌属的正常生长之外,还需注重其他低相对丰度的细菌的生长代谢,这些微生物可能对食醋的风味产生以及保健功能起着不可或缺的作用。

表2 浙江玫瑰醋与其他品种醋在发酵过程中细菌群落组成比较  
Table 2 Comparison of bacterial community composition between Zhejiang rosy vinegar and other varieties during fermentation

	浙江玫瑰醋	镇江香醋 <sup>[30]</sup>	山西老陈醋 <sup>[31]</sup>	天津独流老醋 <sup>[32]</sup>
高丰度细菌	<i>Acetobacter</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>
	<i>Lactobacillus</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>Acetobacter</i>
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Gluconacetobacter</i>
	<i>Enterococcus</i>	<i>Gluconacetobacter</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Nostoc</i>
	<i>Halomonas</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Nocardioideis</i>
低丰度细菌	<i>Bacillus</i>	<i>Xanthomonas</i>	<i>Agrobacterium</i>	<i>Propionibacterium</i>
	<i>Streptococcus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Geobacillus</i>	<i>Pediococcus</i>
	<i>Acinetobacter</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Klebsiella</i>
	<i>Jeotgalibacillus</i>	<i>Sphingomonas</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Escherichia</i>
	<i>Komagataeiabacter</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Erwinia</i>
	<i>Cupriavidus</i>	<i>Rhizobium</i>		<i>Serratia</i>
	<i>Weissella</i>	<i>Stenotrophomonas</i>		
	<i>Corynebacterium</i>	<i>Pantoea</i>		

## 2.6 浙江玫瑰醋发酵过程中乳酸菌的分离鉴定

浙江玫瑰醋在发酵过程中乳杆菌属是除醋酸杆菌属之外相对丰度最高的细菌,对浙江玫瑰醋的发酵及风味的产生起着重要作用。但是由于高通量测序存在局限性,一般只对属进行分析,因此对浙江玫瑰醋发酵过程中的乳酸菌进行了培养、分离和鉴定。把革兰氏阳性、过氧化氢酶阴性的细菌,暂定为乳酸细菌。总共分离得到了7株革兰氏阳性、过氧化氢酶阴性的杆菌,分别编号:L1、L2、L3、L4、L5、L6、L7。其中L1、L2、L3、L4、L5的细胞形态都为细长杆状杆菌,L6为弯曲型杆菌,L7为粗短型杆菌。其菌落形态都为凸起、白色、边缘规则、圆形,并且具有酸味。

对分离得到的7株菌株进行DNA提取,并进行凝胶电泳(图8),发现7株菌的DNA条带单一,大小理想,质量较好。可以作为PCR扩增的模板。以提取的基因组DNA为模板,采用通用引物(正向5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';反向:5'-ACGGCTACCTTGTTCACGACTT-3')对菌株的16S rDNA进行PCR,并对PCR产物进行凝胶电泳,PCR扩增片段在1 500 bp左右,见图9。

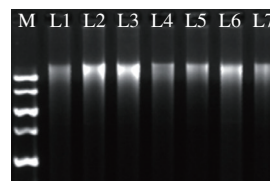


图8 疑似乳酸菌基因组DNA琼脂糖凝胶电泳

Fig. 8 Agarose gel electrophoresis of genomic DNA of suspected lactic acid bacteria

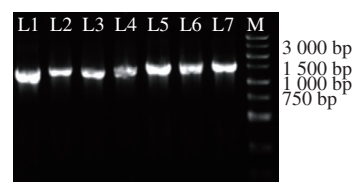


图9 疑似乳酸菌16S rDNA基因PCR扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 9 Agarose gel electrophoresis of 16S rDNA PCR-amplified products from suspected lactic acid bacteria

对PCR产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,然后将16S rDNA序列在NCBI网站上进行BLAST对比,然后做出微生物的系统发育树,见图10。结果显示,L1、L2、L3、L4为副干酪乳杆菌(*L. paracasei*),L5为清酒乳杆菌(*L. sakei*),L6为鼠李糖乳杆菌(*L. rhamnosus*),L7为干酪乳杆菌(*L. casei*)。

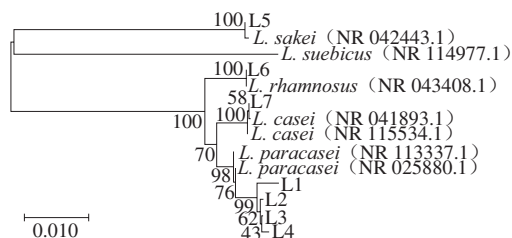


图10 乳酸菌16S rDNA系统发育树

Fig. 10 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of *Lactobacillus* species

## 3 结论

本研究基于Illumina MiSeq高通量测序对浙江玫瑰醋“冲缸放水”后的醋样中细菌DNA序列V4区进行测序。对门水平细菌群落进行分析,表明浙江玫瑰醋在“冲缸

放水”后的发酵过程中主要为变形菌门和厚壁菌门，两者相对丰度一直处于98%以上，并且变形菌门相对丰度持续升高，厚壁菌门持续降低。对属水平细菌进行分析表明，浙江玫瑰醋发酵过程中主要为醋酸杆菌属和乳杆菌属，并且醋酸杆菌属随着发酵的进行，相对丰度呈现持续上升趋势，乳杆菌属呈现下降趋势。肠球菌属、假单胞菌属、芽孢杆菌属相对丰度较低，但存在于整个发酵过程。在浙江玫瑰醋发酵初期，在门和属水平对发酵液中的细菌进行分析发现，浙江玫瑰醋发酵初期细菌组成与黄酒发酵初期一致<sup>[26]</sup>，这是由于浙江玫瑰醋经过“发花”过程，“冲缸放水”之后，主要进行由淀粉转化为糖、糖转化为乙醇，以及进行微量的醋酸发酵，与黄酒初期发酵过程一致。与镇江香醋、山西老陈醋、天津独流老醋等知名固态发酵醋相比<sup>[27,31-32]</sup>，浙江玫瑰醋在发酵过程中乳杆菌属的相对丰度要显著偏低，这导致浙江玫瑰醋中乳酸等非挥发性酸含量显著低于固态发酵醋，因此浙江玫瑰醋口感较刺激，不能被广泛消费者接受。在以后的研究中可以对浙江玫瑰醋发酵过程中进行乳酸菌生物强化，提高浙江玫瑰醋挥发性酸含量，改善口感。朱扬玲<sup>[33]</sup>利用PCR-DGGE对浙江玫瑰醋中微生物的多样性进行研究发现发酵过程中的高丰度细菌为醋酸杆菌属、乳杆菌属和葡糖杆菌属，而本研究玫瑰醋中葡糖杆菌属的相对丰度很低，这可能是浙江玫瑰醋酿造工艺以及酿造时的气候不同造成的。葡糖杆菌属在30℃以上不生长，而本研究浙江玫瑰醋发酵过程中发酵液温度一直处于35℃以上，因此不利于葡糖杆菌属的生长。刚“冲缸放水”时的细菌组成与后期发酵有明显差异。对浙江玫瑰醋发酵过程中乳酸菌进行分离、鉴定，得到4株副干酪乳杆菌、1株清酒乳杆菌、1株鼠李糖乳杆菌，1株干酪乳杆菌。而朱扬玲<sup>[33]</sup>利用PCR-DGGE技术检测出的乳杆菌为罗伊氏乳杆菌、保加利亚乳杆菌和嗜酸乳杆菌。将浙江玫瑰醋发酵过程中细菌组成与其他醋对比发现，所有醋的高丰度细菌相同，都为醋酸杆菌属和乳杆菌属，但低丰度细菌差异明显。本研究为浙江玫瑰醋风味改进以及提高品质提供了理论基础。

#### 参考文献：

- [1] JIANG Y J, LIN S, ZHANG L, et al. Upgrading the fermentation process of Zhejiang rosy vinegar by purebred microorganisms[J]. *Advances in Microbiology*, 2013, 3(3): 297-301. DOI:10.4236/aim.2013.33042.
- [2] JIANG Y J, GUO J N, LI Y D, et al. Optimisation of lactic acid fermentation for improved vinegar flavour during rosy vinegar brewing[J]. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 2010, 90(8): 1334-1339. DOI:10.1002/jsfa.3986.
- [3] WU J J, MA Y K, ZHANG F F, et al. Culture-dependent and culture-independent analysis of lactic acid bacteria from Shanxi aged vinegar[J]. *Annals of Microbiology*, 2012, 62: 1825-1830. DOI:10.1007/s13213-011-0396-1.
- [4] XU W, HUANG Z Y, ZHANG X J, et al. Monitoring the microbial community during solid-state acetic acid fermentation of Zhenjiang aromatic vinegar[J]. *Food Microbiology*, 2011, 28: 1175-1181. DOI:10.1016/j.fm.2011.03.011.
- [5] MAMLOUK D, HIDALGO C, TORIJA M J, et al. Evaluation and optimisation of bacterial genomic DNA extraction for no-culture techniques applied to vinegars[J]. *Food Microbiology*, 2011, 28: 1374-1379. DOI:10.1016/j.fm.2011.06.009.
- [6] HARUTA S, UENO S, EGAWA I, et al. Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 109: 79-87. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.015.
- [7] GULLO M, DE VERO L, GIUDICI P. Succession of selected strains of *Acetobacter pasteurianus* and other acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75: 2585-2589. DOI:10.1128/AEM.02249-08.
- [8] DEVERO L, GALA E, GULLO M, et al. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis to evaluate acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar[J]. *Food Microbiology*, 2006, 23: 809-813. DOI:10.1016/j.fm.2006.01.006.
- [9] 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. DOI:10.1016/j.fm.2014.11.006.
- [10] NIE Z Q, ZHENG Y, WANG M, et al. Exploring microbial succession and diversity during solid-state fermentation of Tianjin duliu mature vinegar[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 148: 325-333. DOI:10.1016/j.biortech.2013.08.152.
- [11] VALERA M J, TORIJA M J, MAS A, et al. Acetic acid bacteria from biofilm of strawberry vinegar visualized by microscopy and detected by complementing culture-dependent and culture-independent techniques[J]. *Food Microbiology*, 2015, 46: 452-462. DOI:10.1016/j.fm.2014.09.006.
- [12] WU J J, MA Y K, ZHANG F F, et al. Biodiversity of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in the fermentation of “Shanxi aged vinegar”, a traditional Chinese vinegar[J]. *Food Microbiology*, 2012, 30: 289-297. DOI:10.1016/j.fm.2011.08.010.
- [13] JUNG J Y, LEE S H, KIM J M, et al. Metagenomic analysis of kimchi, a traditional Korean fermented food[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77: 2264-2274. DOI:10.1128/AEM.02157-10.
- [14] RANDAZZO C L, HEILIG H, RESTUCCIA C, et al. Bacterial population in traditional sourdough evaluated by molecular methods[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 99: 251-258. DOI:10.1111/j.1365-2672.2005.02624.x.
- [15] WECKX S, ALLEMEERSCH J, VAN DER MEULEN R, et al. Metatranscriptome analysis for insight into whole-ecosystem gene expression during spontaneous wheat and spelt sourdough fermentations[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77: 618-626. DOI:10.1128/AEM.02028-10.
- [16] JUNG J Y, LEE S H, JIN H M, et al. Metatranscriptomic analysis of lactic acid bacterial gene expression during kimchi fermentation[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 163: 171-179. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.022.
- [17] BISANZ J E, MACKLAIM J M, GLOOR G B, et al. Bacterial metatranscriptome analysis of a probiotic yogurt using an RNA-



- Seq approach[J]. International Dairy Journal, 2014, 39: 284-292. DOI:10.1016/j.idairyj.2014.07.010.
- [18] SEO H, JEON B Y, YUN A, et al. Effect of glasswort (*Salicornia herbacea* L.) on microbial community variations in the vinegar-making process and vinegar characteristics[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 20(9): 1322-1330. DOI:10.4014/jmb.1003.03041.
- [19] GAROFALO C, SILVESTRI G, AQUILANTI L, et al. PCR-DGGE analysis of lactic acid bacteria and yeast dynamics during the production processes of three varieties of Panettone[J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 205(1): 243-254. DOI:10.1111/j.1365-2672.2008.03768.x.
- [20] SOLIERI L, LANDI S, DE VERO L, et al. Molecular assessment of indigenous yeast population from traditional balsamic vinegar[J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 101(1): 63-71. DOI:10.1111/j.1365-2672.2006.02906.x.
- [21] VEGAS C, MATEO E, GONZALEZ A. Population dynamics of acetic acid bacteria during traditional wine vinegar production[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 138(1/2): 130-136. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.006.
- [22] ILABACA C, NAVARRETE P, MARDONES P, et al. Application of culture culture-independent molecular biology based methods to evaluate acetic acid bacteria diversity during vinegar processing[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 126(1/2): 245-249. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.001.
- [23] 叶陵, 王晶晶, 王蓉蓉, 等. 剁辣椒发酵过程中菌群与有机酸变化规律分析[J]. 食品科学, 2018, 39(6): 116-120. DOI:10.7506/spkx1002-6630-2018060019.
- [24] 蒋予箭, 裘纪莹, 林森, 等. 玫瑰醋草缸盖晾晒前后和醋醅“发花”过程微生物消长规律的研究[J]. 中国食品学报, 2008, 8(2): 42-46. DOI:10.3969/j.issn.1009-7848.2008.02.008.
- [25] 方冠宇, 穆晓静, 蒋予箭. 浙江玫瑰醋发酵过程中细菌菌群结构变化与有机酸形成相关性分析[J]. 食品科学, 2019, 40(22): 177-184. DOI:10.7506/spkx1002-6603-20181012-098.
- [26] 栾同青. 黄酒酿造过程生物胺变化规律及其产生菌株研究[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2013.
- [27] 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: 16-25.
- [28] XU W, XU Q P, CHEN J H, 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. DOI:10.1002/jsfa.4356.
- [29] 牟穰. 清爽型黄酒酿造微生物群落结构及其与风味物质相关性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2015: 23-42.
- [30] 凌代文. 乳酸细菌分类鉴定及实验力法[M]. 北京: 轻工业出版社, 1999: 16-72.
- [31] LI S, LI P, LIU X, et al. Bacterial dynamics and metabolite changes in solid-state acetic acid fermentation of Shanxi aged vinegar[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(10): 4395-4411. DOI:10.1007/s00253-016-7284-3.
- [32] NIE Z Q, ZHENG Y, WANG M, et al. Exploring microbial succession and diversity during solid-state fermentation of Tianjin duliu mature vinegar[J]. Bioresource Technology, 2013, 148(8): 325-333. DOI:10.1016/j.biortech.2013.08.152.
- [33] 朱扬玲. 采用PCR-DGGE方法研究浙江玫瑰醋酿造过程中的微生物多样性[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2009: 50-53.