

## 研究报告

## 液固工艺山西陈醋发酵微生物群落组成、互作网络及溯源分析

寇蓉<sup>1,2</sup>, 冯国杨<sup>1</sup>, 李晨<sup>3</sup>, 董弘毅<sup>\*4</sup>, 范晓军<sup>\*1</sup>

1 太原理工大学环境科学与工程学院, 山西 晋中 030600

2 山西杏花村汾酒集团有限责任公司, 山西 汾阳 032205

3 山西大学生命科学学院, 山西 太原 030006

4 山西转型综合改革示范区管理委员会, 山西 太原 030032

寇蓉, 冯国杨, 李晨, 董弘毅, 范晓军. 液固工艺山西陈醋发酵微生物群落组成、互作网络及溯源分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(6): 2556-2568.

KOU Rong, FENG Guoyang, LI Chen, DONG Hongyi, FAN Xiaojun. The composition, interaction network, and source of microbial community in Shanxi mature vinegar produced by liquid-solid fermentation[J]. Microbiology China, 2023, 50(6): 2556-2568.

**摘要:** 【背景】传统山西陈醋是在开放环境下由多菌种固态发酵酿制而成, 解析酿造过程中微生物群落的组成、互作网络及来源对认识和调控食醋发酵过程都具有重要意义。【目的】揭示山西陈醋酿造微生物群落的组成、演替、互作网络及来源。【方法】基于高通量测序技术揭示山西陈醋酿造过程中微生物群落的组成、演替和多样性; 采用 SPSS 数据统计软件计算物种间的斯皮尔曼相关系数并利用 Gephi 软件对微生物群落互作网络进行可视化分析; 采用快速期望最大化微生物源跟踪(fast expectation-maximization microbial source tracking, FEAST)方法解析发酵微生物群落的来源。【结果】山西陈醋酿造过程中有 6 个优势细菌属和 5 个优势真菌属(平均相对丰度大于 1%); 醋酸杆菌属(*Acetobacter*)、乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)和复膜孢酵母属(*Saccharomycopsis*)的平均相对丰度较高, 分别为 20.76%、30.38%和 46.24%; 醋酸杆菌属(*Acetobacter*)的相对丰度在醋酸发酵阶段逐渐增加, 而乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)在此阶段的趋势则相反。微生物群落互作网络结果显示魏斯氏菌属(*Weissella*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、季也蒙酵母属(*Meyerozyma*)、*Loigolactobacillus*、*Schleiferilactobacillus* 和地杆菌属(*Geobacter*)具有较高的连接度(连接度 $\geq 7$ ); 此外, 醋酸杆菌属(*Acetobacter*)与魏斯氏菌属(*Weissella*)、*Schleiferilactobacillus*、*Loigolactobacillus*、乳球菌属(*Lactococcus*)、季也蒙酵母属(*Meyerozyma*)具有显著的拮抗作用。来源追溯结果显示糖化发酵

资助项目: 山西省 2019 年度留学人员科技活动择优资助项目(201946); 2021 年度山西省科技战略研究专项(202104031402028); 山西省重点研发计划(202102130501008)

This work was supported by the Selected Funding Project of Scientific and Technological Activities for Overseas Students of Shanxi Province in 2019 (201946), the Shanxi Provincial Science and Technology Strategy Research Special Project in 2021 (202104031402028), and the Key Research and Development Program of Shanxi Province (202102130501008).

\*Corresponding authors. E-mail: DONG Hongyi, donghy323@163.com; FAN Xiaojun, fanxiaojun@tyut.edu.cn

Received: 2022-09-20; Accepted: 2022-11-27; Published online: 2023-02-07

第2天样品中有1.02%的细菌群落和77.04%的真菌群落来源于大曲;在醋酸发酵第1天样品中有0.93%的细菌群落和52.82%的真菌群落来源于火醅。【结论】为了解山西陈醋酿造过程中微生物群落的组成、演替、互作网络和解释酿造微生物来源提供了重要的理论数据。

关键词: 高通量测序; 微生物群落; 共现网络; 来源追溯; 山西陈醋

## The composition, interaction network, and source of microbial community in Shanxi mature vinegar produced by liquid-solid fermentation

KOU Rong<sup>1,2</sup>, FENG Guoyang<sup>1</sup>, LI Chen<sup>3</sup>, DONG Hongyi<sup>\*4</sup>, FAN Xiaojun<sup>\*1</sup>

1 College of Environmental Science and Engineering, Taiyuan University of Technology, Jinzhong 030600, Shanxi, China

2 Shanxi Xinghuacun Fenjiu Group Limited Company, Fenyang 032205, Shanxi, China

3 School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, Shanxi, China

4 Shanxi Transformation and Comprehensive Reform Demonstration Zone Management Committee, Taiyuan 030032, Shanxi, China

**Abstract:** [Background] Traditional Shanxi mature vinegar is produced by solid-state fermentation with multiple strains in an open environment. Revealing the composition, interaction network, and source of microbial community facilitates the understanding and regulation of the vinegar fermentation process. [Objective] To reveal the composition, succession, interaction network, and source of microbial community in Shanxi mature vinegar during the fermentation process. [Methods] High-throughput DNA sequencing was performed to reveal the composition, succession, and diversity of the microbial community. SPSS was employed to calculate the Spearman correlation coefficient between species and Gephi was used for the visual analysis of the microbial interaction network. Fast expectation-maximization microbial source tracking (FEAST) was employed to analyze the origin of the microorganisms. [Results] Six bacterial genera and five fungal genera (average relative abundance greater than 1%) were dominant in the fermentation process of Shanxi mature vinegar. The average relative abundance of *Acetobacter*, *Lactobacillus*, and *Saccharomyces* were 20.76%, 30.38%, and 46.24%, respectively. The relative abundance of *Acetobacter* increased gradually during acetic acid fermentation, while the opposite trend was observed for *Lactobacillus*. The microbial community interaction network showed that *Weissella*, *Lactococcus*, *Meyerozyma*, *Loigolactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, and *Geobacter* had high connectivity ( $\geq 7$ ). In addition, *Acetobacter* demonstrated significant antagonism with *Weissella*, *Schleiferilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Lactococcus*, and *Meyerozyma*. The results of source tracking showed that 1.02% of bacteria and 77.04% of fungi were derived from *Daqu* on the second day of saccharification. On the first day of acetic acid fermentation, 0.93% of bacteria and 52.82% of fungi were derived from fermented grains. [Conclusion] This study

provided important theoretical data for understanding the composition, succession, and interaction network of microbial community and tracking the source of microorganisms during the fermentation process of Shanxi mature vinegar.

**Keywords:** high-throughput sequencing; microbial community; co-occurrence network; source tracking; Shanxi mature vinegar

传统山西陈醋采用多菌种固态发酵工艺酿制而成,其酿造过程如图1所示。高粱经粉碎、蒸熟、冷却后加入发酵剂(大曲和快曲),依次进行淀粉糖化(starch saccharification, Sac)、酒精发酵(alcoholic fermentation, AF)和醋酸发酵(acetic acid fermentation, AAF)。根据糖化和酒精发酵阶段原料状态的不同,食醋固态发酵工艺又分为固固发酵和液固发酵,其中液固发酵工艺在糖化和酒精发酵阶段的初始含水率(约72%)高于固固发酵工艺(约60%)。酒精发酵结束后,将酒醅与麸皮混合,并将上一批次醋酸发酵第3天的醋醅(俗称火醅)作为醋酸发酵第1天的种子发酵剂一起引入到陈醋醋酸发酵阶段<sup>[1]</sup>。微生物群落在陈醋酿造过程中发挥着至关重要的作用,学者们也对山西陈醋酿造微生物群落的组成和演替进行

了大量研究。Nie等基于变性梯度凝胶电泳揭示了山西陈醋酿造的酒精发酵阶段有4个优势细菌属和3个优势真菌属,在醋酸发酵阶段有4个优势细菌属和4个优势真菌属<sup>[2]</sup>。Zhu等采用高通量测序技术研究了山西陈醋醋酸发酵阶段细菌群落的组成和演替,并根据其细菌群落演替将醋酸发酵分为3个阶段<sup>[3]</sup>。此外,在镇江香醋微生物的研究中,Wang等发现细菌群落的演替在3个批次间无显著差异<sup>[4]</sup>。以上研究为了解微生物群落在山西陈醋酿造过程中的组成提供了重要的信息。食品发酵微生物间的互作网络和溯源研究也越来越受到科研工作者的关注,此方面的研究可为了解发酵微生物潜在的互作信息和发酵微生物群落的来源提供关键的见解,对指导山西陈醋发酵过程调控具有重要的指导意义。

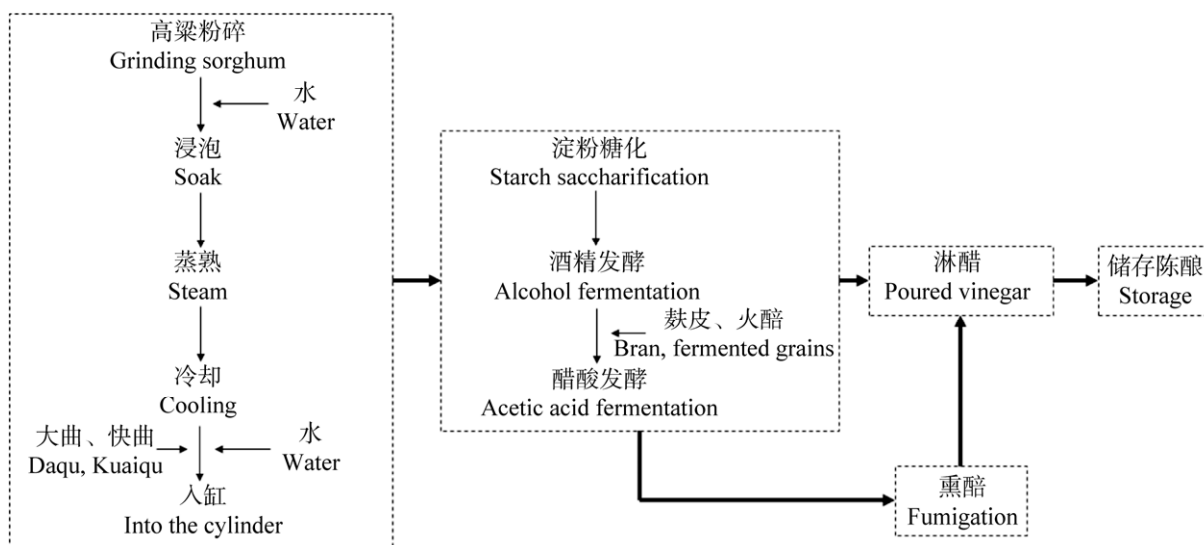


图1 山西陈醋液固发酵工艺

Figure 1 Shanxi mature vinegar brewing process by liquid-solid fermentation craftsmanship.

微生物群落互作网络为研究发酵微生物群落结构和功能提供了新的视角<sup>[5-8]</sup>。目前,在食品发酵系统中微生物群落的互作网络研究已得到了学者的广泛关注<sup>[9-10]</sup>。例如,Fang 等根据斯皮尔曼相关系数确定了浙江玫瑰醋酿造过程中细菌群落的互作网络,其中乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)与大多数细菌属呈正相关,而醋酸杆菌属(*Acetobacter*)则与它们呈负相关<sup>[9]</sup>。Wang 等构建了中国白酒主要微生物属的互作网络,从 11 个优势属中共鉴定出 8 对正相关和 14 对负相关<sup>[11]</sup>。

发酵微生物的来源追踪对于了解微生物的起源、演替和发酵机制具有重要意义。山西传统陈醋酿造采用开放式自然发酵,其酿造微生物除来自发酵剂外,环境微生物、麸皮微生物、火醋微生物均参与到了陈醋发酵过程。目前,SourceTracker<sup>[12]</sup>和 FEAST<sup>[13]</sup>是两种使用最广泛的微生物溯源工具。SourceTracker 是使用贝叶斯方法根据菌属比例预测微生物群落的来源,而 FEAST 是使用快速期望最大化方法,具有更高的精度和更快的速度。微生物溯源工具已经成功应用于白酒酿造微生物群落的溯源,例如,Wang 等采用 SourceTracker 确定了大曲和环境微生物对中国谷物发酵白酒中细菌群落的贡献<sup>[11]</sup>。白酒酿造微生物溯源研究为食醋酿造微生物群落溯源分析提供了可靠的参考方法。

本文采用高通量测序技术结合多元统计分析方法,揭示了液固工艺山西陈醋酿造过程中微生物群落的组成、演替、互作网络和来源,这对理解食醋发酵机理和探索微生物群落互作关系,以及实现食醋发酵过程理性调控将具有重要意义。本研究也将丰富学者和专业技术人员对山西陈醋酿造微生物的认识,对应用强化菌曲策略发展高效食醋酿造工艺具有重要学术价值,也可为进一步拓宽山西陈醋研究方向提供新的

思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

发酵剂、麸皮(bran)、醋醅样品和环境样品均取自山西省清徐县某醋厂。发酵剂[大曲(Daqu)、快曲(Kuaiqu)]和麸皮分别取自曲房和辅料室。在山西陈醋酿造过程中,取糖化发酵第 2 天(Sac2),酒精发酵第 12 天(AF12),醋酸发酵第 1 天、第 3 天、第 7 天、第 10 天(AAF1、AAF3、AAF7、AAF10)的样品进行分析。糖化和酒精发酵阶段样品取自发酵池和发酵罐的顶部、中部和底部,混合后得到测试样;醋酸发酵阶段样品在距离发酵池表面 30 cm 的深度进行东、西、南、北、中五点采集,混合均匀后作为醋酸发酵阶段的测试样。将 Quick Take 30 空气微生物采样器放置于发酵车间内,用于采集车间空气中(air)的微生物,工具(tools)表面(如蒸馏设备、摊凉设备、叉车、推车、笤帚、铁锨等)、室内(in ground)地面和室外(out ground)地面的微生物使用 0.1 mol/L PBS 缓冲液浸湿的无菌棉擦拭获取。每个样品设 3 个平行,将采集的各样品放入无菌自封袋中用于基因组 DNA 的提取和后续分析。

### 1.2 主要试剂和仪器

胶回收试剂盒, Thermo Fisher Scientific 公司; TruSeq DNA PCR-Free Library Preparation Kit, Illumina 公司。超微量紫外分光光度计, Cytiva 公司; 梯度 PCR 仪, Bio-Rad 公司; 高通量测序平台, Illumina 公司。

### 1.3 基因组提取、PCR 扩增和高通量测序

采用 CTAB 法<sup>[14]</sup>提取样品基因组 DNA,并用琼脂糖凝胶电泳和超微量紫外分光光度计检测宏基因组的质量。用引物 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3')、806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')和 ITS3-2024F (5'-GCATCG

ATGAAGAACGCAGC-3')、ITS4-2409R (5'-TCC TCCGCTTATTGATATGC-3')分别扩增细菌 16S rRNA 基因 V4 区和真菌 ITS 2 区, PCR 反应体系和反应条件参照文献[15]。PCR 产物使用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 进行回收和纯化的 PCR 产物送至北京诺禾致源科技股份有限公司进行高通量测序。将高通量测序的原始序列提交至 NCBI GenBank 数据库, 登录号为 SRP353362 (细菌)和 SRP353203 (真菌)。

#### 1.4 原始序列的处理

下机数据通过序列拼接、过滤、质量控制、去除嵌合体, 最终得到有效序列 (effective tags)<sup>[16-17]</sup>。利用 UPARSE 算法 (UPARSE V7.0.1001)将所有样本的有效序列以 97%的一致性聚类成为操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU)<sup>[18]</sup>。对于细菌 OTU 序列, 使用 Mothur 方法与 SILVA (V138.1)数据库对 OTU 序列进行物种注释分析; 对于真菌 OTU 序列, 用基本局部比对搜索工具 (basic local alignment search tool, BLAST)与 Unite (V8.2)数据库对 OTU 序列进行物种注释分析, 并分别在门、纲、目、科、属水平上统计样本的群落组成。最后对各样本的数据进行均一化处理用于后续的分析。

#### 1.5 数据分析

各醋醅样本的 Goods-coverage 指数、Shannon 指数和 Chao1 指数通过 QIIME 软件 (Version 1.9.1)完成。醋醅样品的稀释曲线、门水平和属水平物种相对丰度柱状图等通过 Origin 8.5 软件绘制。为揭示山西陈醋酿造微生物群落的互作网络, 首先对所有醋醅样本中平均相对丰度大于 0.5% 的细菌属和真菌属进行斯皮尔曼相关系数 (Spearman's correlation coefficient, SCC) 计算, 得到物种相关系数矩阵后, 设置过滤条件为: 显著性阈值为 0.05; 过滤掉节点自连接; 去除相关性系数绝对值小于 0.8 的连接。利用

Gephi 软件绘图, 以界水平 (细菌: 粉色; 真菌: 绿色)为着色单位可视化山西陈醋酿造过程中微生物群落的共现网络, 其中每个节点为平均相对丰度大于 0.5% 的菌属; 节点的大小与其连接数量成正比; 边的宽度与斯皮尔曼相关系数成比例; 边的颜色对应于正 (红色)相关或负 (蓝色)相关。FEAST 分析通过网站 (<https://github.com/cozygene/FEAST>)<sup>[13]</sup>提供的 R 语言在 RStudio 中运行。本研究分两部分进行溯源分析: (1) 以发酵剂 (大曲和快曲)和环境微生物 (空气、室内地面、室外地面、工具表面)种群为源端、糖化发酵第 2 天微生物种群为接受端进行溯源分析; (2) 以酒精发酵第 12 天的酒醅、麸皮、环境微生物 (空气、室内地面、室外地面、工具表面)和火醅种群为源端、醋酸发酵第 1 天微生物种群为接受端进行溯源分析, 以期获得酒精发酵初期和醋酸发酵初期两个阶段的微生物来源。

## 2 结果与分析

### 2.1 醋醅微生物群落测序结果与多样性

采用 Illumina NovaSeq 测序平台分别对 6 个醋醅样品的细菌 16S rRNA 基因 V4 区和真菌 ITS 2 区测序, 测序序列信息和  $\alpha$  多样性指数如表 1 所示。 $\alpha$  多样性用于分析样品中的微生物群落多样性, 通过样品的  $\alpha$  多样性指数及稀疏曲线可以反映样品中微生物群落的多样性和丰富度。韦恩图用于分析不同样本间共有和特有的 OTUs, 能直观地反映各样本间微生物群落多样性的差异。

#### 2.1.1 醋醅微生物群落测序结果和序列深度验证

六个醋醅样品共产生 375 965 条细菌有效序列和 365 428 条真菌有效序列 (表 1)。Goods-coverage 指数用于表征测序的深度, Goods-coverage 指数越接近 1, 表明测序深度对整个微生物群落的覆盖率越大, 测序结果越可

靠。稀疏曲线可以直接反映测序数据量的合理性, 间接反映样品中物种的丰富度。当曲线趋于平坦时, 说明测序数据量渐进合理, 更多的测序数据量只会产生少量新的 OTU; 反之表明样品中物种多样性较高, 还存在较多未被测序检测到的物种。如表 1 和图 2 所示, 细菌和真菌群落的测序深度都达到 99%以上, 并且两者的稀疏曲线趋于平坦, 表明测序结果可以较全面、准确地反映陈醋酿造过程微生物群落结构组成。

2.1.2 醋醅微生物群落  $\alpha$  多样性分析

Shannon 指数和 Chao1 指数分别用于表征微生物群落内物种分布的多样性和丰富度。微生物群落多样性越高, 物种分布越均匀, Shannon 指数越大; 微生物群落丰富度越高, Chao1 指数越大。如表 1 所示, 细菌群落的 Shannon 指数和 Chao1 指数分别分布在 2.649–4.081 和 345.725–566.510, 真菌群落的 Shannon 指数和 Chao1 指数分别分布在 1.180–3.256 和 92.333–222.909。各个发酵阶段醋醅细菌群落

表 1 醋醅样品的测序序列信息和  $\alpha$  多样性指数

Table 1 Sequencing sequence information and alpha diversity index of vinegar <i>Pei</i> samples						
Class	Samples	Effective tags	OTU	Shannon index	Chao1 index	Goods-coverage
Bacteria	Sac2	51 889	442	4.081	443.494	0.998
	AF12	61 269	392	2.774	423.750	0.998
	AAF1	63 975	576	3.852	566.510	0.997
	AAF3	63 159	513	3.860	520.966	0.997
	AAF7	66 562	329	2.868	345.725	0.998
	AAF10	69 111	411	2.649	392.288	0.998
Fungi	Sac2	66 244	98	1.183	146.000	0.999
	AF12	64 197	94	1.180	92.333	0.999
	AAF1	67 628	197	3.256	205.517	0.999
	AAF3	43 785	152	2.754	171.528	0.999
	AAF7	63 034	230	2.747	222.909	0.999
	AAF10	60 540	199	2.921	198.636	1.000

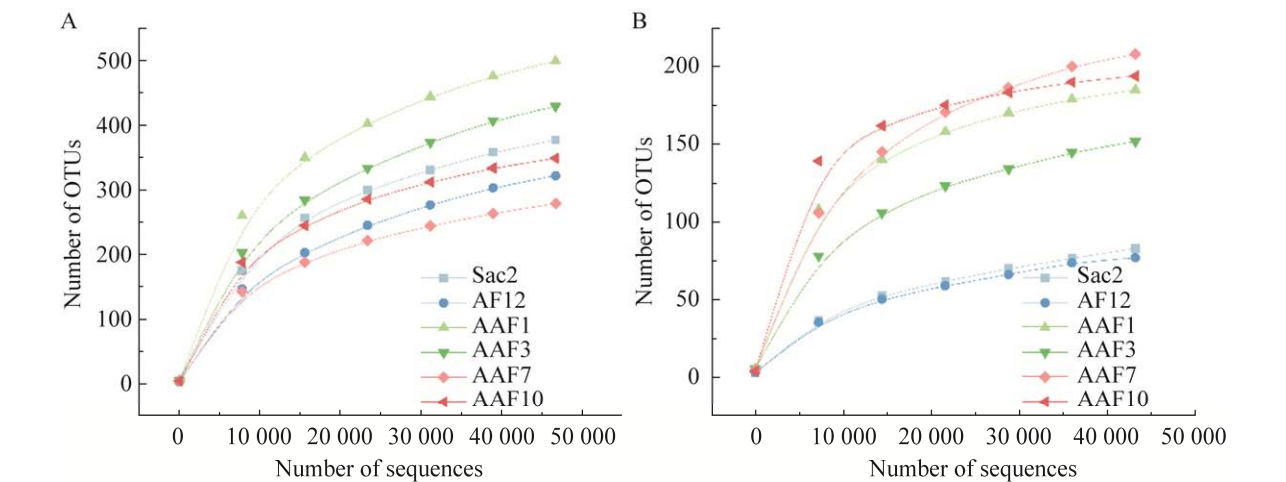


图 2 细菌群落(A)和真菌群落(B)的稀疏曲线

Figure 2 Rarefaction curves of bacterial community (A) and fungal community (B).

的 Shannon 指数和 Chao1 指数均大于真菌群落的 Shannon 指数和 Chao1 指数,说明醋醅中细菌群落多样性和丰富度远高于真菌群落。此外,细菌和真菌群落的 Shannon 指数和 Chao1 指数在醋酸发酵第 1 天都显著增加,这是因为酒精发酵结束后,将麸皮、火醅引入发酵体系中导致醋酸发酵第 1 天中微生物群落的多样性和丰富度显著增加。另外,酒精发酵是缺氧的环境,而醋酸发酵采用开放式发酵,因此在醋酸发酵第 1 天好氧微生物的快速生长和繁殖也是该阶段微生物多样性和丰富度显著增加的重要原因。

### 2.1.3 醋醅微生物群落 OTU 组成分析

将 6 个醋醅样品的有效序列以 97% 的一致性聚类成为 OTU,共得到 1 086 个细菌 OTU 和 455 个真菌 OTU,说明山西陈醋酿造过程细菌群落的多样性高于真菌群落,这与  $\alpha$  多样性指数的结果一致。花瓣图显示了山西陈醋酿造过程中细菌和真菌群落共有和特有的 OTU。如图 3 所示,6 个醋醅样品有 99 个共有细菌 OTU (图 3A)和 19 个共有真菌 OTU (图 3B),分别占总 OTU 的 9.12% 和 4.18%。醋酸发酵第 1 天特有细菌 OTU 最多,占总 OTU 的 12.98%,而醋酸发酵第 10 天特有真菌 OTU 最多,占总 OTU 的 18.02%。

## 2.2 醋醅微生物群落结构组成

为解析山西陈醋酿造微生物群落结构的演替规律,使用 Mothur 方法与 SSUrRNA 数据库进行物种注释分析,所有的细菌序列鉴定为 33 个门 67 个纲 144 个目 222 个科 409 个属;用 BLAST 与 Unite (V8.2)数据库进行物种注释分析,所有的真菌序列鉴定为 7 个门 25 个纲 47 个目 98 个科 161 个属。根据 OTU 分类学注释结果,按照门水平和属水平分别提取序列信息并计算各物种的相对丰度,同时选取平均相对丰度 1% 的物种绘制物种相对丰度柱状图(图 4,图 5)。

### 2.2.1 门水平微生物群落结构组成

山西陈醋酿造过程中微生物群落结构在门水平的分布变化见图 4。由图 4A 可知,厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)和蓝细菌门(*Cyanobacteria*)是主要的细菌门类,平均相对丰度分别为 58.71%、33.01% 和 5.78%。在醋酸发酵中后期,厚壁菌门(*Firmicutes*)的相对丰度逐渐降低,而变形菌门(*Proteobacteria*)的相对丰度逐渐增加。如图 4B 显示,子囊菌门(*Ascomycota*)是主要的真菌门类,其平均相对丰度为 86.27%,在发酵过程中占绝对优势。在醋酸发酵末期,子囊菌门(*Ascomycota*)的相对丰度显著降低。

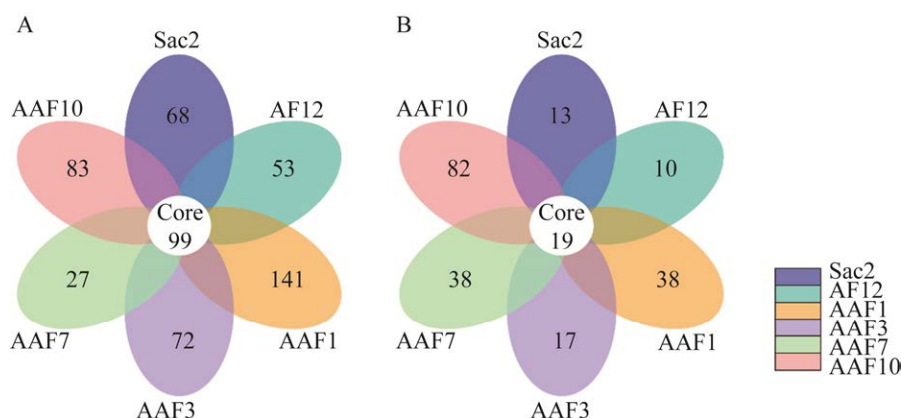


图 3 基于 OTU 的细菌花瓣图(A)和真菌花瓣图(B)

Figure 3 Flower diagram of bacteria (A) and fungi (B) based on OTU.



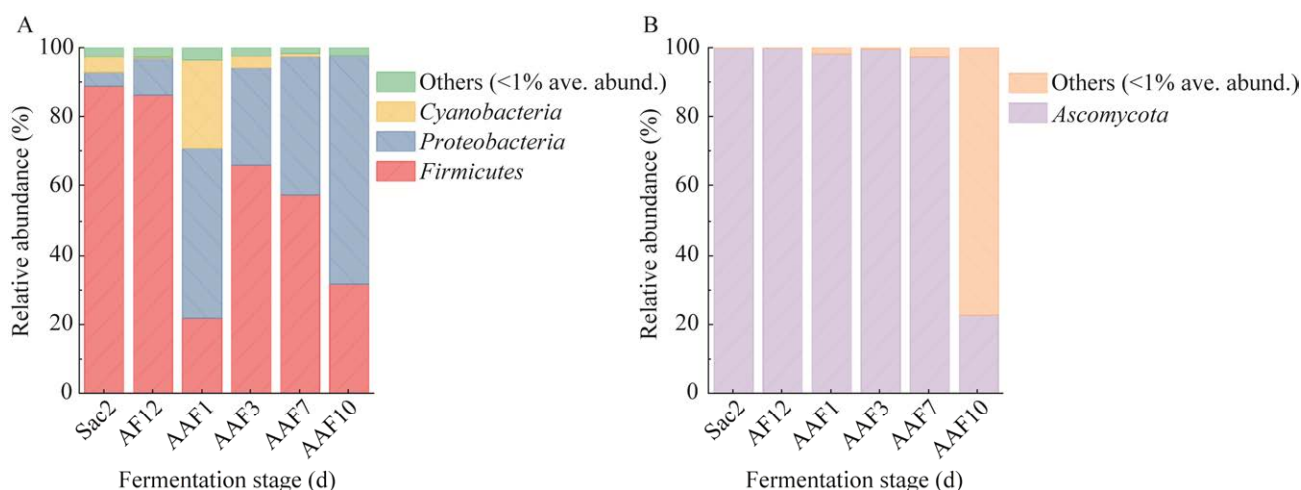


图4 门水平的细菌群落(A)和真菌群落(B)相对丰度柱形图

Figure 4 The bar graph of bacterial community (A) and fungal community (B) relative abundance at phylum level.

### 2.2.2 属水平微生物群落结构组成

在属水平上, 山西陈醋酿造过程共发现 6 个优势细菌属和 5 个优势真菌属(平均相对丰度>1%) (图 5)。醋酸杆菌属(*Acetobacter*)、乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)、*Limosilactobacillus*、魏斯氏菌属(*Weissella*)、泛菌属(*Pantoea*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)是优势细菌属, 平均相对丰度分别为 20.76%、30.38%、2.43%、4.73%、1.18%

和 1.07% (图 5A)。醋酸杆菌属(*Acetobacter*)的相对丰度在醋酸发酵阶段逐渐增加, 在醋酸发酵第 10 天达到 59.99%。乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)在酒精发酵第 12 天的相对丰度达到最高, 为 72.34%, 并且在醋酸发酵后期相对丰度逐渐降低。复膜孢酵母属(*Saccharomycopsis*)、布氏白粉菌属(*Blumeria*)、酵母菌属(*Saccharomyces*)、枝孢属(*Cladosporium*)和季也蒙酵母属

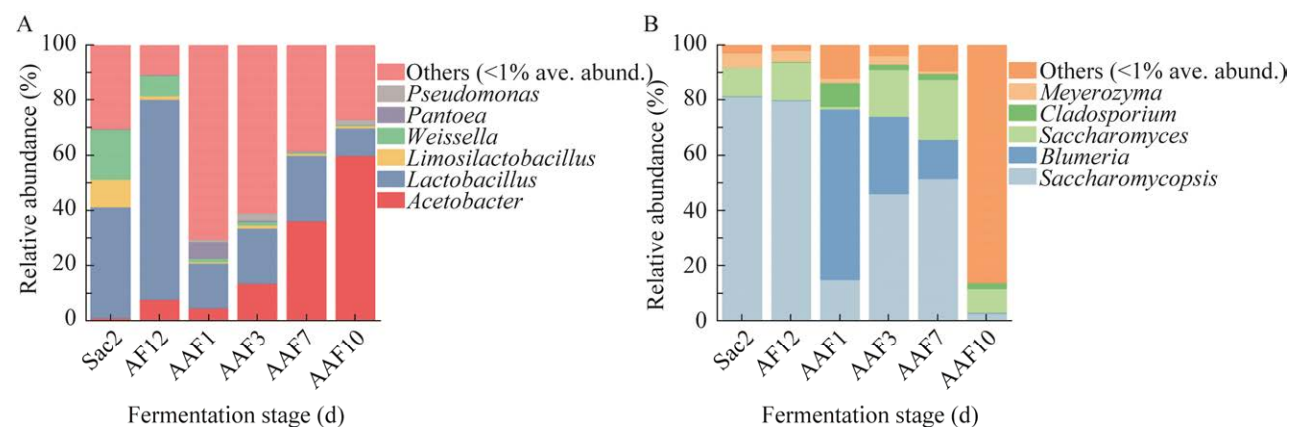


图5 属水平的细菌群落(A)和真菌群落(B)相对丰度柱形图

Figure 5 The bar graph of bacterial community (A) and fungal community (B) relative abundance at genus level.



(*Meyerozyma*)是优势真菌属,平均相对丰度分别为 46.24%、17.41%、12.07%、2.49%和 2.47% (图 5B)。这些优势真菌属在醋酸发酵第 10 天的相对丰度显著降低,这可能是醋酸发酵阶段积累的大量乙酸减缓了优势真菌的生长。

### 2.3 醋醅微生物群落互作网络分析

为了解山西陈醋酿造过程微生物群落的互作关系,选取属分类水平平均相对丰度大于 0.5% 的细菌属和真菌属绘制食醋酿造微生物群落间的互作网络。如图 6 所示,在山西陈醋酿造过程中共鉴定出 39 对显著相关的互作关系,其中 18 对正相关,21 对负相关;微生物群落互作网络的平均聚类系数为 0.657,平均度为 2.167,模块化指数为 0.354,网络密度为 0.255,网络直径为 4。互作网络包括 6 个高度连接的属(连接度 $\geq 7$ ),分别是魏斯氏菌属(*Weissella*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、季也蒙酵母属(*Meyerozyma*)、

*Loigolactobacillus*、*Schleiferilactobacillus* 和地杆菌属(*Geobacter*),它们可能对稳定发酵系统发挥着重要作用。在正相关关系中,有 67% 的正相关来自魏斯氏菌属(*Weissella*)、乳球菌属(*Lactococcus*)和季也蒙酵母属(*Meyerozyma*),并且这 3 个菌属之间两两呈正相关关系。在负相关关系中,有 71% 的负相关来自醋酸杆菌属(*Acetobacter*)、地杆菌属(*Geobacter*)和赤霉菌属(*Gibberella*),其中地杆菌属(*Geobacter*)与其他 2 个菌属呈正相关关系。上述 2 个主导协同作用和拮抗作用的菌群之间呈负相关关系。乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)与复膜孢酵母属(*Saccharomycopsis*)呈显著正相关关系,而与 *Bipolaris* 呈显著负相关关系。醋酸杆菌属(*Acetobacter*)和魏斯氏菌属(*Weissella*)、*Schleiferilactobacillus*、*Loigolactobacillus*、乳球菌属(*Lactococcus*)、季也蒙酵母属(*Meyerozyma*)具有显著的拮抗作用。在山西陈醋酿造过程中酵母菌

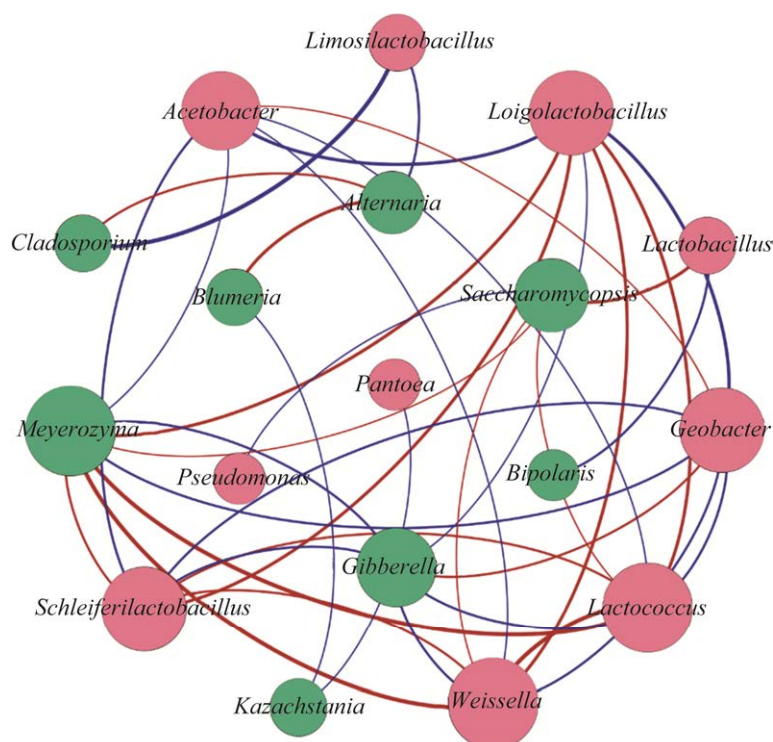


图 6 属水平的微生物群落相关性网络分析

Figure 6 Correlation network analysis of microbial community at genus level.

属(*Saccharomyces*)与其他菌属之间的互作关系不显著。

## 2.4 醋醅微生物溯源分析

我们通过 FEAST 方法定量分析了发酵剂和环境微生物对糖化发酵第 2 天微生物群落的贡献, 以及酒精发酵第 12 天的酒醅、麸皮、环境微生物和火醅对醋酸发酵第 1 天微生物群落的贡献(图 7)。结果显示, 在糖化发酵第 2 天的发酵稀醪中细菌群落主要来源于室内地面、工具表面和大曲, 其贡献比率分别为 6.79%、3.16%和 1.02%; 真菌群落主要来源于大曲、空气和快曲, 其贡献比率分别为 77.04%、2.49%和 0.98% (图 7A)。在醋酸发酵第 1 天, 醋醅中的细菌群落主要来源于工具表面、酒精发酵第 12 天的酒醅和空气, 其贡献比率分别为 15.76%、15.08%和 1.68%, 火醅对醋酸发酵第 1 天细菌群落的贡献仅有 0.92%。真菌群落主要来源于火醅、工具表面和空气, 其贡献比率分别为 52.82%、38.63%和 4.55% (图 7B), 酒精发酵第 12 天的酒醅对醋酸发酵第 1 天真菌群落的贡献仅有 0.04%。

## 3 讨论与结论

山西陈醋酿造多采用传统的开放式多菌种

混合发酵模式, 微生物群落在其发酵过程中发挥重要的作用, 对酿造过程的稳定性和产品的风味、品质起着决定性作用。目前, 高通量测序技术已经广泛应用于酿造微生物群落的结构和组成分析, 本研究中, 通过该技术检测了液固工艺山西陈醋酿造微生物的群落组成, 共发现 6 个优势细菌属和 5 个优势真菌属(平均相对丰度>1%)。与镇江香醋、凉州熏醋和浙江玫瑰醋等谷物醋<sup>[9,19-20]</sup>类似, 醋酸杆菌属(*Acetobacter*)和乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)也是山西陈醋酿造醋酸发酵阶段最主要的细菌属, 并且乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)在醋酸发酵阶段早期占优势而醋酸杆菌属(*Acetobacter*)在后期占主导。Zheng 等在研究醋酸杆菌属(*Acetobacter*)和乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)的发酵动力学时发现, 山西陈醋固态发酵过程中醋酸杆菌属(*Acetobacter*)和乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)的生长呈负相关关系<sup>[21]</sup>。本研究结果显示醋酸杆菌属(*Acetobacter*)和乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)的拮抗作用不显著, 而醋酸杆菌属(*Acetobacter*)和 *Schleiferilactobacillus*、*Loigolactobacillus* 具有显著的拮抗作用, 获得的不同结论与本研究中采用了新的乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)分类方法密切相关<sup>[22]</sup>。复膜孢醇

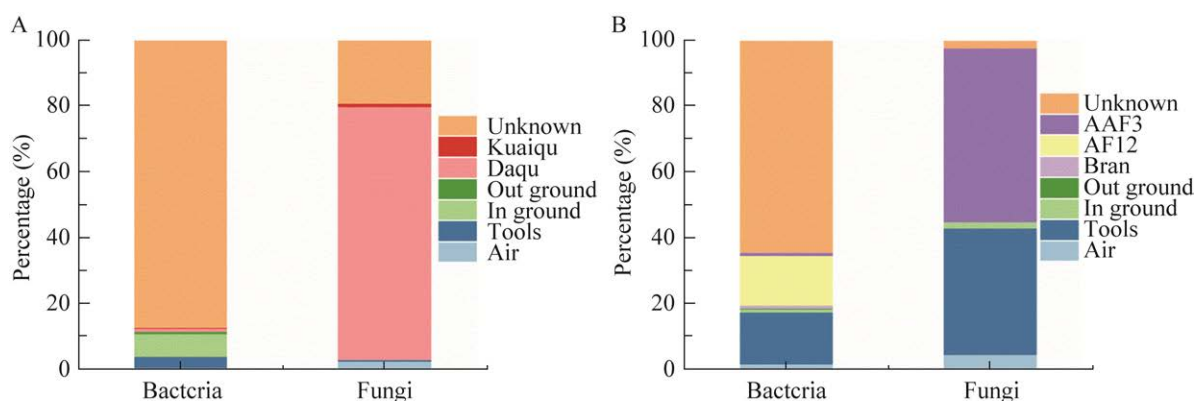


图 7 糖化发酵第 2 天(A)和醋酸发酵第 1 天(B)微生物群落的溯源分析

Figure 7 Source tracking analysis of microbial communities on the second day of saccharification fermentation (A) and first day of acetic acid fermentation (B).

母属(*Saccharomycopsis*)是本研究中最主要的真菌属,与其他研究中山西老陈醋<sup>[2,23]</sup>和镇江香醋<sup>[24]</sup>的优势真菌属多为酵母菌属(*Saccharomyces*),以及凉州熏醋<sup>[19]</sup>的优势真菌属为链格孢属(*Alternaria*)有所不同,该差异可能与酿造环境、原料和制醋工艺等因素都有关联。

在微生物群落互作网络研究中发现,山西陈醋酿造微生物群落中 67%的正相关关系来自魏斯氏菌属(*Weissella*)、乳球菌属(*Lactococcus*)和季也蒙酵母属(*Meyerozyma*),71%的负相关关系来自醋酸杆菌属(*Acetobacter*)、地杆菌属(*Geobacter*)和赤霉菌属(*Gibberella*),这些在互作网络中联系紧密的菌属对食醋稳态发酵的作用值得进一步深入研究,对于人工构建和改善食醋微生态系统也具有指导作用。

在开放式自然发酵的山西陈醋酿造过程中,车间环境中的微生物可能参与其中,为了明确该问题,本研究中采用 FEAST 方法解析了食醋微生物群落来源。研究发现,糖化阶段和醋酸发酵初期大部分真菌群落来源清晰,但仅有少部分细菌群落的来源可追溯。大曲和快曲(含多种微生物和酶类)是重要的山西陈醋发酵剂,本研究关注的制醋工艺中其添加量分别为 25%和 20%,结果显示大曲对糖化发酵第 2 天的真菌群落贡献比率(77.04%)大于对细菌群落的贡献比率(1.02%)。这一趋势与王雪山在对新厂区和老厂区清香类型白酒发酵微生物溯源分析的结果<sup>[25]</sup>一致,该研究发现大曲对老厂区发酵 0 d 酒醅中细菌群落和真菌群落的贡献比率分别为 27.39%和 80.00%,大曲对新厂区发酵 0 d 酒醅中细菌群落和真菌群落的贡献比率分别为 9.10%和 61.06%。这表明酿造微生态对外加微生物具有选择性,真菌群落更易在糖化发酵第 2 天的发酵稀醪中生存,可能与其相对致密的细胞壁结构有关。针对醋酸发酵阶段微生物来源的研究结果显

示火醅主要对醋酸发酵第 1 天样品的真菌群落有贡献,在有关保宁醋发酵过程的研究中也明确了回糟的引入极大地丰富了发酵初期醋醅中微生物的种类<sup>[26]</sup>。此外,相比糖化发酵第 2 天,工具表面的微生物对醋酸发酵第 1 天醋醅微生物的贡献明显增多,应该是由于在醋酸发酵阶段使用工具进行拌料和翻醅作业而引起的微生物组成改变。醋酸发酵第 1 天的细菌群落仅有 15.08%来自酒精发酵第 12 天的酒醅,而真菌群落仅有 0.04%来自酒精发酵第 12 天的酒醅,并且  $\alpha$  多样性指数也显示酒精发酵第 12 天的酒醅中细菌群落的多样性和丰富度大于真菌群落,这表明酒精发酵阶段不断积累的乙醇对细菌群落的抑制作用可能小于真菌群落。醋酸发酵第 1 天的醋醅除继承了酒精发酵阶段引入的微生物外,还吸收了来自工具表面(细菌 15.76%,真菌 38.63%)、空气(细菌 1.68%,真菌 4.55%)和火醅(细菌 0.93%,真菌 52.82%)等环境中的微生物,然而醋醅细菌群落中仅有 1.09%来源于麸皮(以生料形式添加),而麸皮对醋醅真菌群落贡献为 0。

本研究利用 Illumina NovaSeq 测序平台解析了液固发酵工艺山西陈醋酿造过程中醋醅微生物群落的演替及组成,并利用 Gephi 软件和 FEAST 方法探究了醋醅微生物群落互作网络及醋醅微生物的来源,研究对于了解山西陈醋酿造过程的微生物群落演替规律、解析酿造微生物来源和制定陈醋发酵调控策略等都具有重要的实践意义。今后工作中可联合宏转录组、代谢组等方法加强不同区域、不同批次陈醋生产过程中微生物菌群变化规律的研究和比较;大曲、快曲的微生物类群稳定性及与陈醋发酵过程的影响;进一步明确特定分离菌株对大曲和快曲的强化作用及其与最终发酵产品质量的相关性;解析发酵

质量监控的各阶段特征微生物的种类和占比特征。针对酿造微生态开展全面系统的研究势必会取得更深入的研究结果,也有望更加精准地指导酿造行业实际生产。

## REFERENCES

- [1] 寇蓉. 液固发酵山西陈醋酿造微生物溯源与季节演替研究[D]. 太原: 太原理工大学硕士学位论文, 2022.
- KOU R. Study on microbial source tracking and seasonal succession of Shanxi mature vinegar with liquid-solid fermentation craft. [D]. Taiyuan: Master's Thesis of Taiyuan University of Technology, 2022 (in Chinese).
- [2] NIE ZQ, ZHENG Y, DU HF, XIE SK, WANG M. Dynamics and diversity of microbial community succession in traditional fermentation of Shanxi aged vinegar[J]. Food Microbiology, 2015, 47: 62-68.
- [3] 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[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 8612.
- [4] 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[J]. Food Microbiology, 2015, 50: 64-69.
- [5] JIAO S, LIU ZS, LIN YB, YANG J, CHEN WM, WEI GH. Bacterial communities in oil contaminated soils: biogeography and co-occurrence patterns[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2016, 98: 64-73.
- [6] QIN JJ, LI YR, CAI ZM, LI SH, ZHU JF, ZHANG F, LIANG SS, ZHANG WW, GUAN YL, SHEN DQ, PENG YQ, ZHANG DY, JIE ZY, WU WX, QIN YW, XUE WB, LI JH, HAN LC, LU DH, WU PX, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes[J]. Nature, 2012, 490(7418): 55-60.
- [7] 关琼, 马占山. 人类母乳微生物菌群的生态学分析[J]. 科学通报, 2014, 59(22): 2205-2212.
- GUAN Q, MA ZS. Ecological analysis of human milk microbiome[J]. Chinese Science Bulletin, 2014, 59(22): 2205-2212 (in Chinese).
- [8] SHEN CC, WANG J, JING ZW, QIAO NH, XIONG C, GE Y. Plant diversity enhances soil fungal network stability indirectly through the increase of soil carbon and fungal keystone taxa richness[J]. Science of The Total Environment, 2021, 818: 151737.
- [9] FANG GY, CHAI LJ, ZHONG XZ, JIANG YJ. Deciphering the succession patterns of bacterial community and their correlations with environmental factors and flavor compounds during the fermentation of Zhejiang rosy vinegar[J]. International Journal of Food Microbiology, 2021, 341: 109070.
- [10] 戴奕杰. 酱香型白酒酿造过程中微生物群落组成及其与酒品质的关系[D]. 长沙: 湖南农业大学博士学位论文, 2019.
- DAI YJ. The composition of microbial community and its relationship with liquor quality in the brewing process of Maotai-flavor liquor[D]. Changsha: Doctoral Dissertation of Hunan Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [11] WANG XS, DU H, ZHANG Y, XU Y. Environmental microbiota drives microbial succession and metabolic profiles during Chinese liquor fermentation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(4): e02369-e02317.
- [12] KNIGHTS D, KUCZYNSKI J, CHARLSON ES, ZANEVELD J, MOZER MC, COLLMAN RG, BUSHMAN FD, KNIGHT R, KELLEY ST. Bayesian community-wide culture-independent microbial source tracking[J]. Nature Methods, 2011, 8(9): 761-763.
- [13] SHENHAV L, THOMPSON M, JOSEPH TA, BRISCOE L, FURMAN O, BOGUMIL D, MIZRAHI I, ITSIK PE'ER I, HALPERIN E. FEAST: fast expectation-maximization for microbial source tracking[J]. Nature Methods, 2019, 16(7): 627-632.
- [14] ARSENEAU JR, STEEVES R, LAFLAMME M. Modified low-salt CTAB extraction of high-quality DNA from contaminant-rich tissues[J]. Molecular Ecology Resources, 2017, 17(4): 686-693.
- [15] 刘冲冲, 冯声宝, 吴群, 黄和强, 陈占秀, 李善文, 徐岩. 青稞酒发酵过程中的风味功能微生物及其风味代谢特征解析[J]. 微生物学通报, 2020, 47(1): 151-161.
- LIU CC, FENG SB, WU Q, HUANG HQ, CHEN ZX, LI SW, XU Y. Flavor-related microbiota and their flavor metabolism during highland barley Baijiu fermentation[J]. Microbiology China, 2020, 47(1): 151-161 (in Chinese).
- [16] MARTIN M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads[J]. EMBnet Journal, 2011, 17(1): 10-12.
- [17] SCHLOSS PD, GEVERS D, WESTCOTT SL. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies[J]. PLoS One, 2011, 6(12): e27310.

- [18] EDGAR RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 996-998.
- [19] YUN JM, ZHAO FQ, ZHANG WW, YAN HJ, ZHAO FY, AI DY. Monitoring the microbial community succession and diversity of Liangzhou fumigated vinegar during solid-state fermentation with next-generation sequencing[J]. *Annals of Microbiology*, 2019, 69(3): 279-289.
- [20] WANG ZM, LU ZM, SHI JS, XU ZH. Exploring flavour-producing core microbiota in multispecies solid-state fermentation of traditional Chinese vinegar[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 26818.
- [21] ZHENG Y, ZHAO CM, LI XW, XIA ML, WANG XB, ZHANG Q, YAN YF, LANG FF, SONG J, WANG M. Kinetics of predominant microorganisms in the multi-microorganism solid-state fermentation of cereal vinegar[J]. *LWT*, 2022, 159: 113209.
- [22] ZHENG JS, WITTOUCK S, SALVETTI E, FRANZ CMAP, HARRIS HMB, MATTARELLI P, O'TOOLE PW, POT B, VANDAMME P, WALTER J, WATANABE K, WUYTS S, FELIS GE, GANZLE MG, LEBEER S. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel Genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020, 70(4): 2782-2858.
- [23] 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[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 9240.
- [24] XU W, HUANG ZY, ZHANG XJ, LI Q, LU ZM, SHI JS, XU ZH, MA YH. Monitoring the microbial community during solid-state acetic acid fermentation of Zhenjiang aromatic vinegar[J]. *Food Microbiology*, 2011, 28(6): 1175-1181.
- [25] 王雪山. 不同环境清香类型白酒发酵微生物种群结构比较及溯源解析[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2018. WANG XS. Microbial community structure and microbial source tracking of Chinese light-flavor liquor fermentation in different environments[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2018 (in Chinese).
- [26] 潘婉舒. 季节变化对保宁醋发酵过程中细菌菌群及风味物质的影响[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2019. PAN WS. Effects of seasonal variation on bacterial flora and flavor substances in the fermentation of Baoning vinegar[D]. Ya'an: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2019 (in Chinese).