

传统醋曲储存过程中的微生物多样性

张姝¹, 李潇¹, 王爽¹, 张永杰^{*1,2}

1 山西大学生命科学学院, 山西 太原 030031

2 山西大学杏花村学院(山西酿造产业研究院), 山西 太原 030031

张姝, 李潇, 王爽, 张永杰. 传统醋曲储存过程中的微生物多样性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(11): 4954-4965.

ZHANG Shu, LI Xiao, WANG Shuang, ZHANG Yongjie. Microbial diversity of traditional vinegar Daqu during storage[J]. Microbiology China, 2023, 50(11): 4954-4965.

摘要:【背景】醋曲是我国传统谷物醋酿造中的重要微生物来源, 通常一次制备分批使用。【目的】解析传统醋曲储存过程中微生物群落结构变化规律。【方法】从山西晋南一家百年老醋坊分别采集大曲原料、新制醋曲、储存7个月和12个月的醋曲, 利用高通量测序技术分析微生物多样性。【结果】从4组样品中共找到610个真菌可操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)和747个细菌OTU。子囊菌门(*Ascomycota*, 占比95%)和厚壁菌门(*Firmicutes*, 占比81%)分别为优势的真菌和细菌类群。醋曲成品中约1/3的真菌OTU和约95%的细菌OTU可在醋曲原料中找到, 说明原料是醋曲的重要微生物来源。相较于新制醋曲, 储存7个月和12个月醋曲中的真菌和细菌多样性均显著降低。醋曲贮存过程中微生物群落结构发生明显改变, 并且相较于真菌群落结构, 细菌群落结构更易波动。相较于醋曲原料, 醋曲成品中显著富集扣囊复膜孢酵母(*Saccharomycopsis fibuligera*)、东方伊萨酵母(*Issatchenkia orientalis*)等真菌, 以及克罗彭斯特菌属(*Kroppenstedtia*)细菌。功能预测发现, 醋曲中的真菌以腐生营养型为主, 细菌与代谢相关的通路显著富集。【结论】醋曲贮存过程中微生物多样性降低, 微生物群落结构也随之发生变化。研究结果提高了对传统醋曲中微生物来源及其群落结构变化规律的认识, 为稳定大曲品质及其工艺改良提供了科学依据。

关键词: 高通量测序; 醋曲; 真菌; 细菌

资助项目: 山西大学杏花村学院[山西酿造产业研究院(筹)]开放基金(XCSXU-KF-202209)

This work was supported by the Open Project Program of Xinghuacun College of Shanxi University (Shanxi Institute of Brewing Technology and Industry (Preparation)) (XCSXU-KF-202209).

*Corresponding author. E-mail: zhangyj2008@sxu.edu.cn

Received: 2023-05-29; Accepted: 2023-07-14; Published online: 2023-08-17

Microbial diversity of traditional vinegar Daqu during storage

ZHANG Shu¹, LI Xiao¹, WANG Shuang¹, ZHANG Yongjie^{*1,2}

1 School of Life Sciences, Shanxi University, Taiyuan 030031, Shanxi, China

2 Xinghuacun College (Shanxi Institute of Brewing Technology and Industry), Shanxi University, Taiyuan 030031, Shanxi, China

Abstract: [Background] Vinegar Daqu is an important source of microorganisms during the brewing of traditional grain vinegar in China. It is usually prepared once and used in batches. [Objective] To reveal the structural variations of the microbial community in the traditional vinegar Daqu during the long-term storage. [Methods] From a century-old vinegar factory in southern Shanxi, we collected the raw materials of Daqu and the vinegar Daqu products that were newly produced and had been stored for 7 and 12 months, respectively. Microbial diversity was investigated by high-throughput DNA sequencing. [Results] A total of 610 fungal operational taxonomic units (OTUs) and 747 bacterial OTUs were obtained from the four groups of samples. *Ascomycota* (95%) and *Firmicutes* (81%) were dominant among fungi and bacteria, respectively. About one third of fungal OTUs and 95% of bacterial OTUs in vinegar Daqu were detected in the raw materials of Daqu, indicating that raw materials acted as the main source of microorganisms in vinegar Daqu. Compared with that in the newly-produced vinegar Daqu, the diversity of fungi and bacteria decreased significantly in vinegar Daqu samples that have been stored for 7 months and 12 months. Microbial community structure changed during the storage of vinegar Daqu, with the bacterial community structure being more prone to fluctuation than the fungal community. Compared with those in the raw materials, fungi like *Saccharomycopsis fibuligera* and *Issatchenkia orientalis* and bacteria such as *Kroppenstedtia* were significantly enriched in vinegar Daqu products. According to the results of function prediction, the fungi were mainly saprotrophic, and the metabolism pathways of bacteria were enriched significantly. [Conclusion] Vinegar Daqu presented decreased microbial diversity and varied microbial community structure during the long-term storage. This study enriched our understanding of the microorganism source in traditional vinegar Daqu and the variation patterns of microbial community structure in vinegar Daqu during storage, providing a scientific basis for stabilizing Daqu quality and improving the production process.

Keywords: high-throughput sequencing; vinegar Daqu; fungi; bacteria

食醋是用含有淀粉、糖的物料或酒精经微生物发酵酿造或用食用醋酸调制而成的酸性调味品^[1]。国内食醋以谷物醋为主,是采用谷物类为原料,以加入大曲的方式引入多种微生物和酶,通过复杂的发酵过程所制得的产品。大曲是一种天然发酵剂,以大麦、小麦、麸皮和

豌豆等为原料,按照一定的配方,经粉碎、加水调制后压制而成^[2]。大曲原料物质为微生物的生长繁殖提供丰富的营养物质,通过微生物的生长、代谢及分泌多种酶类使大曲具有多种功能;同时原料物质被微生物分解代谢形成相应的代谢产物,构成食醋的风味物质或风味前

体物质,影响食醋品质^[3]。在食醋中发现的大多数风味物质来源于大曲中的微生物,并在发酵过程中产生^[2]。因此,大曲在中国传统食醋酿造中起到非常关键的作用,研究参与大曲发酵的微生物对于保证大曲质量及大曲工艺改良具有重要意义。

传统食醋大曲的生产是我国谷物醋的一大特色,其生产和发酵过程均在开放环境中进行,并未特意接种微生物;生产所用原料、接触的工具以及环境均未进行消毒或灭菌处理^[3]。传统大曲的生产受季节影响较大,且曲块质量还取决于操作者的技能。在实际生产中,虽然近年来大曲制造技术已相对成熟,但大曲品质的不一致性和不稳定性仍然是一个亟须解决的问题,且自然发酵过程中引入的杂菌给食醋生产带来安全隐患。

关于食醋大曲中的微生物多样性已有部分研究。例如,周楠等^[4]研究了季节和制曲工艺对麸醋曲微生物群落结构的影响。陈旭峰等^[5]和张天震等^[6]分别研究了山西老陈醋酿造用大曲中的真菌多样性和细菌多样性。Tang 等^[7]比较了中温和高温醋曲发酵过程中的微生物群落结构。传统大曲制作完成后,通常要放置数月之久,在后续分批酿醋过程中陆续被使用。但是,传统大曲在贮存过程中的微生物群落结构如何变化尚不清楚。

研究微生物多样性的方法主要有传统的分离培养法以及目前常用的高通量测序法。高通量测序法具有通量高、成本低、准确率高、可进行双向测序等优点,可以方便快捷地分析样品中复杂的微生物群落结构,逐渐成为分析微生物多样性的首选技术^[8]。本研究从山西省一家使用传统醋曲进行固态发酵酿醋的百年老醋坊采集样品,采用高通量测序法分析传统大曲中的微生物来源及微生物群落结构变化规

律,以期为提高大曲质量稳定性和安全性提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2018年7月–2019年7月间,从山西省临汾市襄汾县太平食醋酿造厂采集醋曲原料(用YL表示)、新制醋曲(用CP表示)、储存7个月的醋曲(用SP表示)和储存12个月的醋曲(用TP表示)共4组样品,每组采集5份样品,共计20份样品用于本研究。醋曲制作使用的原料包括大麦(25%)、麸皮(20%)、红豆(50%)和小豌豆(5%)。原料粉碎后加水混合、定型,在40℃放置30d完成发酵,随后室温贮藏。醋曲原料(YL)于发酵开始前采样。新制醋曲(CP)于醋曲贮藏第10天时采集。同批醋曲存放7个月和12个月时再分别进行一次样品采集,分别标记为SP和TP。采集醋曲样品时,选取优质曲块,按表层、中层和曲心3个区域取样,均匀混合成为一份样品。采集的样品用便携式冰箱带回实验室。

1.2 高通量测序

DNA提取和PCR扩增体系参考张永杰等^[9]的方法。提取总DNA后,从每份样品中使用引物ITS1F和ITS2R扩增真菌rDNA ITS1区序列^[10],使用引物515FmodF和806RmodR扩增细菌16S rRNA基因V4区序列^[11]。构建Illumina MiSeq测序文库,基于PE300策略进行高通量测序,测序工作由上海美吉生物医药科技有限公司完成。

1.3 数据分析

高通量测序数据的处理参考Zhang等^[12]和张永杰等^[9]的方法。得到真菌和细菌可操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)代表序列后,分别利用ITSx v1.1.3^[13]和Metaxa2 v2.2.3^[14]

去除非靶标序列,同时过滤掉序列数少于10的OTU。真菌和细菌序列分别根据 UNITE r8.0^[15]和 SILVA r138^[16]数据库进行分类学分析。进行 α 多样性和 β 多样性分析时,按照最小样本序列数进行抽平,并在 OTU 水平进行分析比较。另外,在进行 β 多样性分析时,使用 Bray Curtis 算法计算样品间的距离矩阵。采用 Kruskal-Wallis 秩和检验方法进行组间差异显著性检验(只关注组间表现出丰度差异且相对丰度排名前10的分类单元)。对检测到的真菌和细菌 OTU,分别使用 FUNGuild^[17]和 Tax4Fun^[18]进行功能预测分析。

2 结果与分析

2.1 微生物 OTU 数目比较

通过高通量测序,从20份样品中总共获得137.42万条真菌序列(5.49–7.94万/样品)和114.48万条细菌序列(3.21–7.74万/样品)。根据97%的序列相似性阈值,这些序列可划分成693个真菌 OTU 和1237个细菌 OTU,再过滤掉非靶标(如在细菌文库中发现的少数古菌、线粒体和叶绿体来源的序列)及序列数少于10的 OTU 后,最终得到610个真菌 OTU 和747个细菌 OTU。对于真菌,新制醋曲(CP)含有的 OTU 最多(417个),其次为醋曲原料(YL, 294个),该2组样品含有的 OTU 数(去除冗余后共计537个)占到真菌 OTU 总数的88.0%;4组样品共有的 OTU 只有29个(占4.8%)(图1A)。对于细菌,醋曲原料含有的 OTU 最多(710个,占比95.0%),其次为新制醋曲(572个);4组样品共有的 OTU 有146个(占19.5%)(图1B)。

为方便分析醋曲微生物来源,将 CP、SP、TP 这3组合并为醋曲组(用 CQ 表示)。醋曲中存在的真菌 OTU 约1/3 (37.3%)可在醋曲原料中

找到(图1C)。醋曲中存在的细菌 OTU 绝大多数(94.7%)可在醋曲原料中找到(图1D)。

2.2 α 多样性指数比较

比较了4组样品在5个 α 多样性指数上的差异,包括3个反映群落丰富度的指数(Sobs、Chao1 和 ACE)和2个反映群落多样性的指数(Shannon 和 Simpson)。对于真菌,醋曲原料和新制醋曲之间在各多样性指数方面均无显著差异,并且二者的微生物多样性通常显著高于储存7月(SP)和12月(TP)的醋曲样品(表1)。对于细菌,醋曲原料和新制醋曲在部分多样性指数方面(如 Chao1、ACE 和 Simpson)也存在显著差异,但与真菌类似,二者的微生物多样性通常显著高于储存7月(SP)和12月(TP)的醋曲样品(表1)。储存7月(SP)和12月(TP)的醋曲之间,在真菌和细菌多样性方面都无显著差别(表1)。

2.3 微生物物种组成分析

本研究检测到的610个真菌 OTU 隶属12门37纲77目163科274属391种。其中,相对丰度最高的门是子囊菌门(*Ascomycota*, 平均丰度95.0%),其在每组样品中的丰度都在92.3%以上(图2A)。丰度较高的真菌属依次为曲霉属(*Aspergillus*, 平均丰度25.7%)、红曲属(*Monascus*, 23.3%)、复膜孢酵母属(*Saccharomycopsis*, 14.1%)、伊萨酵母属(*Issatchenkia*, 10.2%)、毛葡孢霉属(*Melanocarpus*, 4.7%)、假丝酵母属(*Candida*, 4.7%)、嗜热子囊菌属(*Thermoascus*, 3.3%)和赤霉属(*Gibberella*, 1.2%)等。约61.8%(377/610)的真菌 OTU 无明确的种名,只能确定到属或更高分类水平,但丰度排名靠前的那些 OTU 大多可确定到种。从物种水平看,丰度较高的真菌有丛毛红曲(*Monascus pilosus*, 在4组样品中的丰度为21.9%–27.5%)、小菌核曲霉(*Aspergillus minisclerotigenes*, 7.6%–28.7%)、扣

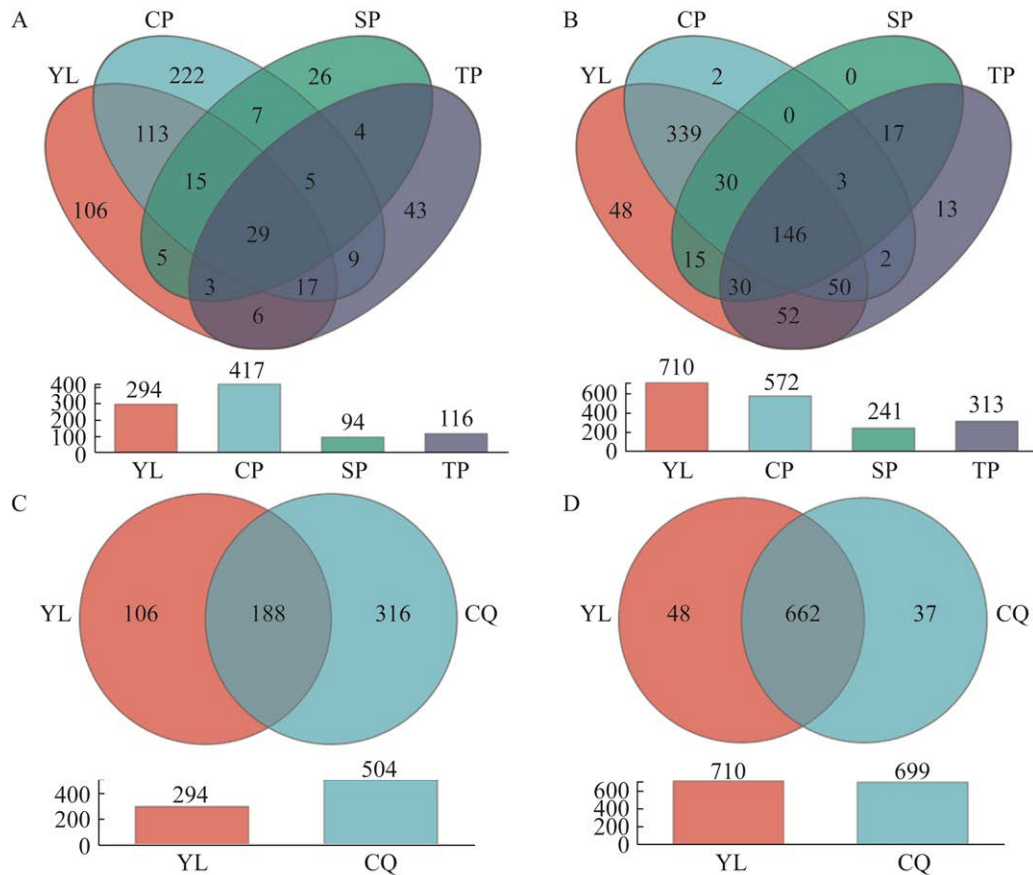


图 1 不同分组间真菌和细菌 OTU 维恩图 A 和 B 为 4 组样品(原料 YL、新制醋曲 CP、储存 7 月醋曲 SP 和储存 12 月醋曲 TP)间的比较. C 和 D 为原料(YL)和醋曲(合并 CP、SP 和 TP)间的比较

Figure 1 Venn diagram of fungal and bacterial OTUs among different groups. Panels A and B are the comparison among four groups of samples, namely raw materials (YL), vinegar Daqu products that were newly made (CP) and had been stored for 7 months (SP) and 12 months (TP). Panels C and D are the comparison between YL and CQ, which combines three groups of CP, SP, and TP.

表 1 醋曲原料、新制醋曲、贮存 7 月和 12 月醋曲的 α 多样性指数比较

Table 1 Comparison of alpha diversity indices for the raw materials of Daqu and the vinegar Daqu products that were newly produced and had been stored for 7 months and 12 months

Item	组别	Sobs 指数	Chao1 指数	ACE 指数	Shannon 指数	Simpson 指数
	Group	Sobs index	Chao1 index	ACE index	Shannon index	Simpson index
真菌 Fungi	YL	96.80±43.21a	102.55±40.42a	111.04±37.60a	2.63±0.50a	0.15±0.05b
	CP	127.60±61.77a	132.54±60.15a	131.37±62.11a	2.32±0.46a	0.22±0.07ab
	SP	39.20±8.87b	39.87±9.08b	40.69±9.06b	1.66±0.12b	0.27±0.02a
	TP	40.80±13.08b	49.00±2.81b	72.19±31.45ab	1.45±0.74b	0.43±0.25a
细菌 Bacteria	YL	475.80±62.66a	555.98±55.83a	555.96±44.11a	3.89±0.49a	0.06±0.02b
	CP	349.00±109.72a	443.55±75.09b	490.78±33.37b	2.92±0.81ab	0.16±0.08a
	SP	138.00±26.29b	190.54±23.06c	182.91±25.49c	2.22±0.35b	0.25±0.09a
	TP	144.00±70.84b	187.80±89.40c	189.68±83.55c	2.33±0.48b	0.18±0.08a

同列不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Different lowercase letters in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$).

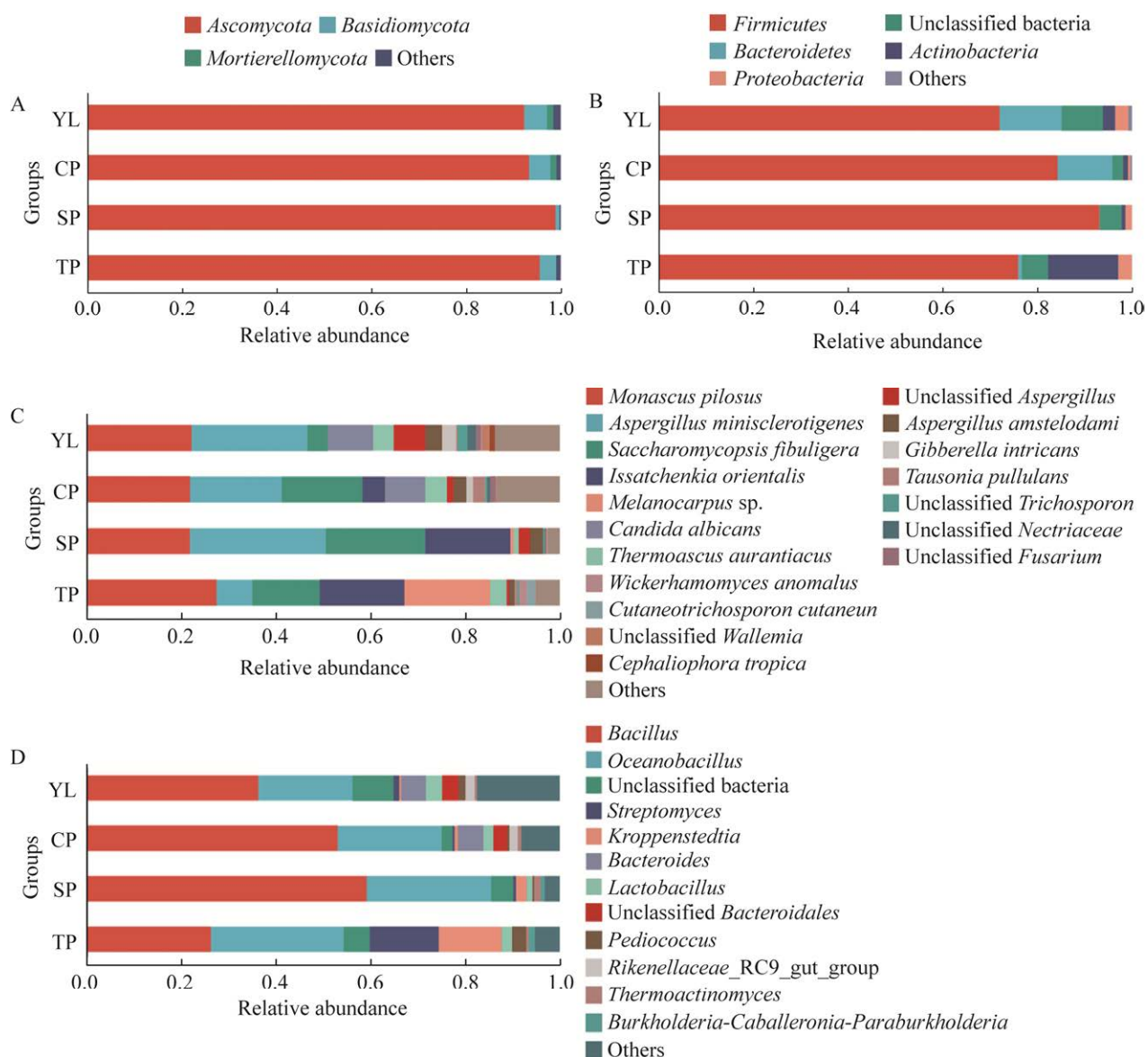


图 2 四组样品中的微生物群落组成柱形图 A: 真菌门水平. B: 细菌门水平. C: 真菌种水平. D: 细菌属水平

Figure 2 Barplot of microbial community composition for the four groups of samples. A: At the phylum level of fungi. B: At the phylum level of bacteria. C: At the species level of fungi. D: At the genus level of bacteria.

囊复膜孢酵母 (*Saccharomycopsis fibuligera*, 4.3%–20.9%) 和东方伊萨酵母 (*Issatchenkia orientalis*, YL 组无, 在其他 3 组中的丰度为 4.9%–18.0%) 等 (图 2C)。

本研究检测到的 747 个细菌 OTU 隶属于

22 门 31 纲 72 目 139 科 327 属 486 种。其中, 相对丰度最高的门是厚壁菌门 (*Firmicutes*, 平均丰度 81.4%), 在每组样品中的丰度都在 72.1% 以上 (图 2B)。丰度较高的细菌属有芽孢杆菌属 (*Bacillus*, 在 4 组样品中的丰度为 26.3%–59.2%)、

大洋芽孢杆菌属(*Oceanobacillus*, 19.9%–28.0%)、链霉菌属(*Streptomyces*, 0.5%–14.6%)、克罗彭斯特菌属(*Kroppenstedtia*, 0.5%–13.3%)等(图 2D)。约 57.7% (431/747)的细菌 OTU 无明确的种名, 只能确定到属或更高分类水平, 即便丰度排名靠前的那些 OTU 多数也不能确定到种。丰度较高且有明确种名的细菌包括淤泥大洋芽孢杆菌(*Oceanobacillus caeni*, 在 4 组样品中的丰度为 17.9%–23.6%)、热乳芽孢杆菌(*Bacillus thermolactis*, 4.5%–7.3%)和白色链霉菌(*Streptomyces albus*, 在 TP 组的丰度为 14.5%, 而在其他 3 组中仅为 0.5%–1.1%)等。

2.4 微生物群落结构比较

当对所有 4 组样品或只对 3 组醋曲样品进行整体比较时, 它们在真菌和细菌群落结构方面都差异显著(表 2)。当醋曲原料(YL)与 3 组醋曲样品分别比较时, 与新制醋曲(CP)在真菌群落结构方面差异不显著, 而其他所有的分组在真菌和细菌群落结构方面均有显著差异(表 2), 说明醋曲制作完成后及后续贮存过程中的微生物群落结构与原材料相比发生了明显改变。另外, 储存 7 月和 12 月的醋曲在真菌群落结构方面差异不明显, 但在细菌群落结构方面差异明显(表 2), 说明在醋曲贮存过程中细菌群落结构相较于真菌更易发生波动。

进一步分析了在不同分组间表现丰度差异的物种(只关注相对丰度排名前 10 的分类单元)。对于真菌, 扣囊复膜孢酵母、东方伊萨酵母等在醋曲成品(包含 CP、SP 和 TP)中富集, 而白假丝酵母(*Candida albicans*)、某曲霉(Unclassified *Aspergillus*)、某节担菌(Unclassified *Wallemia*)和热带头梗霉(*Cephalophora tropica*)等在醋曲原料(YL)中富集(图 3A)。对于细菌, 克罗彭斯特菌属在醋曲成品中逐步得到富集, 而某未知细菌(Unclassified bacteria)、拟杆菌

表 2 不同分组间的 β 多样性指数比较

Table 2 Comparison of beta diversity indices among different groups

Item	比较的组别 Groups in comparison	ANOSIM 分析		ADONIS 分析	
		ANOSIM		ADONIS	
		<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i> ²	<i>P</i>
真菌 Fungi	YL, CP, SP, TP	0.409	0.001	0.417	0.001
	CP, SP, TP	0.267	0.013	0.310	0.009
	YL, CP	0.052	0.263	0.143	0.236
	YL, SP	1.000	0.004	0.620	0.004
	YL, TP	0.560	0.004	0.374	0.004
	CP, SP	0.588	0.011	0.386	0.012
	CP, TP	0.264	0.066	0.223	0.062
	SP, TP	0.088	0.194	0.151	0.206
细菌 Bacteria	YL, CP, SP, TP	0.731	0.001	0.578	0.001
	CP, SP, TP	0.748	0.001	0.572	0.001
	YL, CP	0.448	0.010	0.319	0.014
	YL, SP	0.916	0.004	0.558	0.004
	YL, TP	0.796	0.004	0.445	0.004
	CP, SP	0.988	0.004	0.645	0.004
	CP, TP	0.788	0.004	0.499	0.004
	SP, TP	0.532	0.004	0.368	0.004

ANOSIM 为相似性分析; ADONIS 为非参数多变量方差分析

ANOSIM represents analysis of similarities, and ADONIS represents non-parametric multivariate analysis of variance.

属(*Bacteroides*)等在醋曲原料中富集(图 3B)。在醋曲贮存过程中, 芽孢杆菌属的丰度先升高后降低。

2.5 微生物群落功能预测

使用 FUNGuild 对检测到的真菌 OTU 进行功能分类(图 4A)。各组样品均以腐生营养型为主, 其中, 未定义的腐生生物(undefined saprotrophs) 占有真菌 OTU 的 75.7%–97.4%。在醋曲原料和新制醋曲中检测到少量植物病原菌(2.0%–3.9%)和动物病原菌(0.9%–2.7%)。在贮存 12 月醋曲

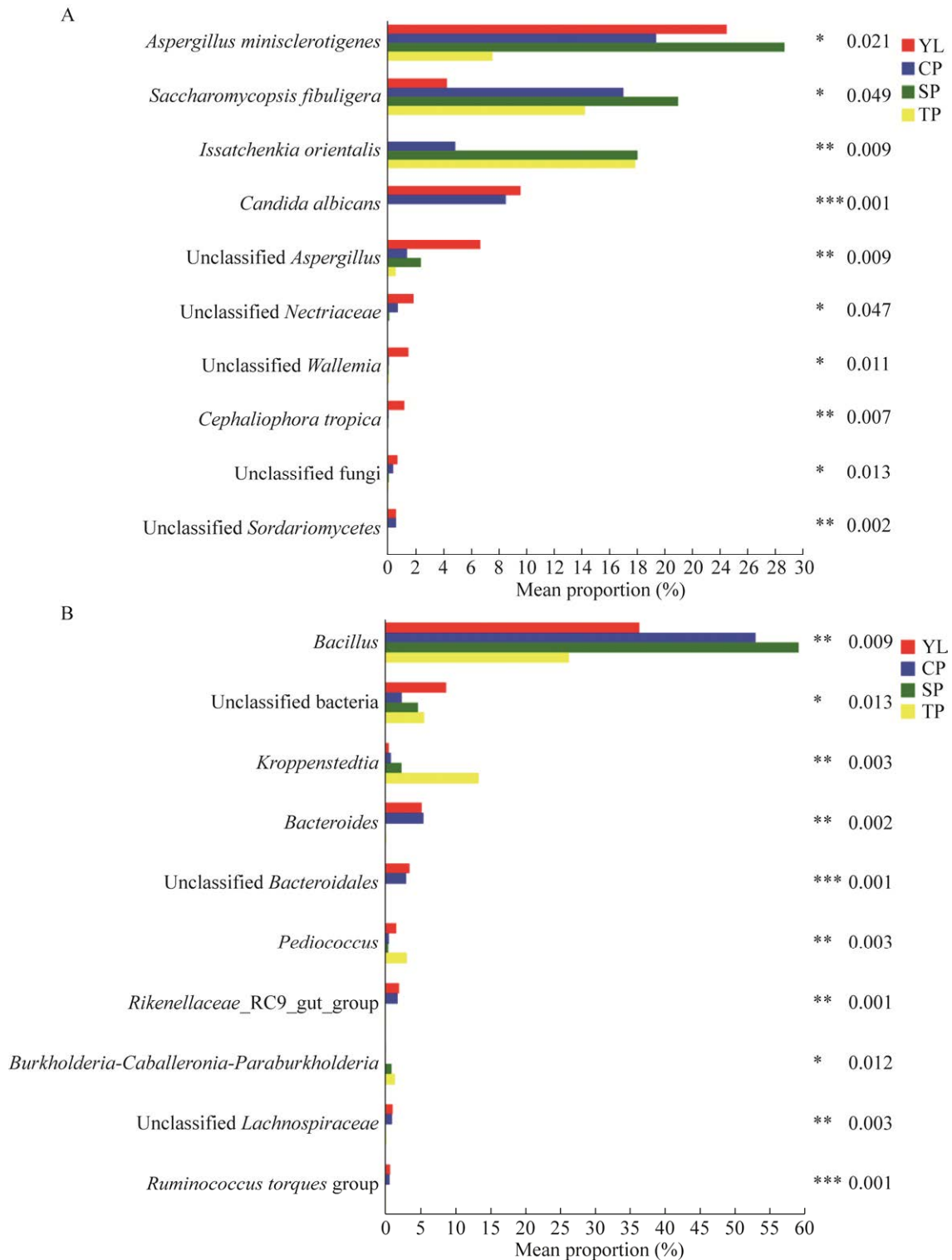


图 3 四组样品的组间差异显著性检验分析 A: 真菌种水平. B: 细菌属水平

Figure 3 Microbial taxa showing significant differences among four groups of samples. A: At the species level of fungi. B: At the genus level of bacteria. *: $0.01 < P \leq 0.05$; **: $0.001 < P \leq 0.01$; ***: $P \leq 0.001$.

中, 病理-腐生-共生复合营养型(animal pathogen-dung saprotroph-endophyte-epiphyte-plant saprotroph-wood saprotroph, 占比 18.2%)发生富集。

使用 Tax4Fun 对检测到的细菌 OTU 进行功能分类(图 4B、4C)。代谢相关的通路在各组样品显著富集(占 61.3%–64.2%, 图 4B)。在这些

代谢中, 以碳水化合物代谢(14.3%–14.8%)和氨基酸代谢(11.6%–11.9%)为主, 同时, 还存在辅因子和维生素代谢、能量代谢、核苷酸代谢(前三者占比各自均在 5.6%以上), 以及脂代谢、萜类和聚酮类化合物代谢、外源生物降解和代谢、葡聚糖生物合成与代谢等(图 4C)。

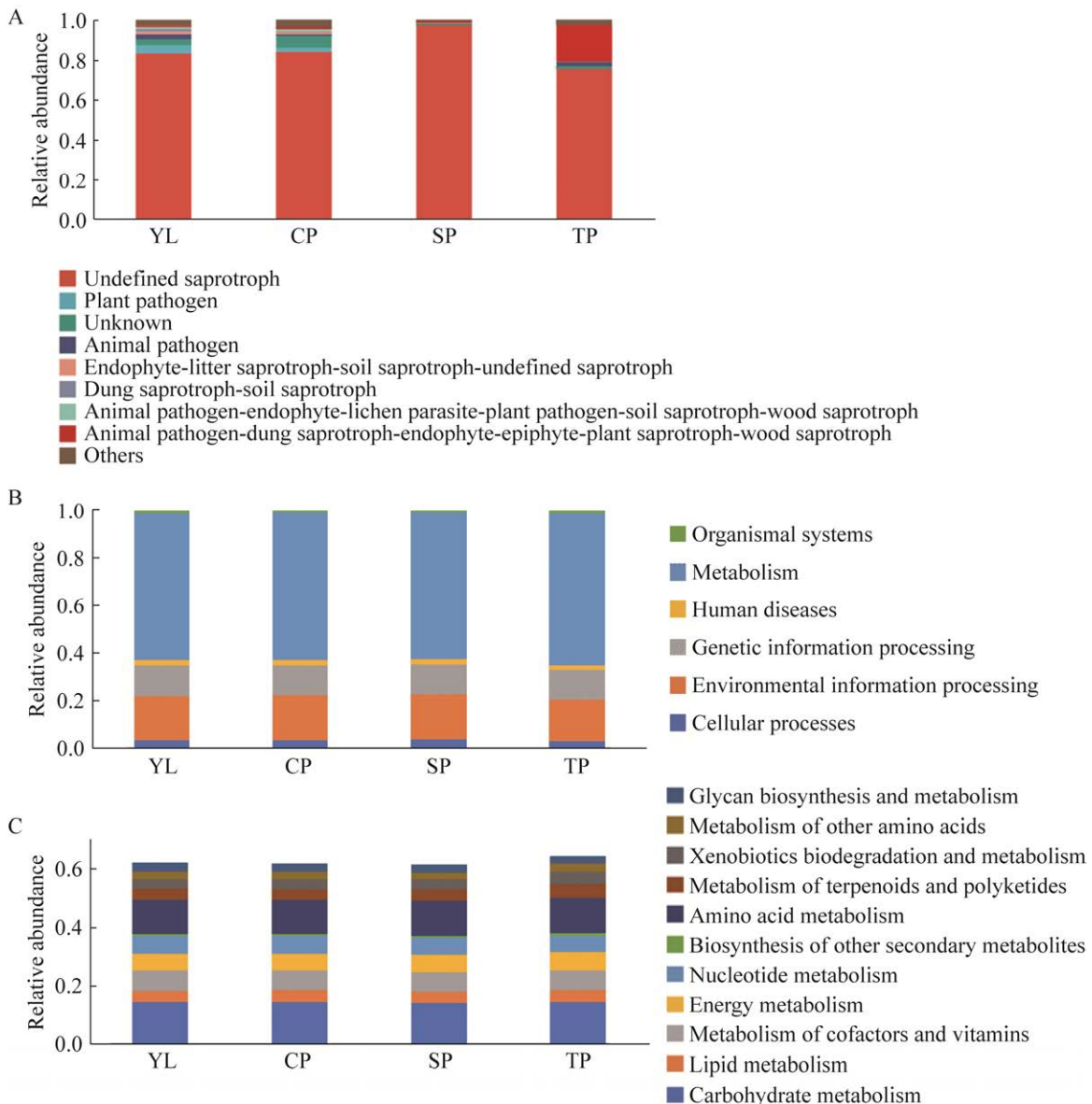


图 4 四组样品中检测到的真菌(A)和细菌(B、C)群落功能预测

Figure 4 Functional prediction of fungal (A) and bacterial (B, C) community detected in four groups of samples.

3 讨论与结论

大曲在食醋酿造过程中常作为糖化剂和发酵剂^[19]。传统醋曲通常由未灭菌的谷物生料在开放环境下生产,其微生物组成复杂,多数难以分离培养,应用高通量测序技术能更全面且高效地获得生物学信息。本研究利用 DNA 高通量测序技术,在传统醋曲的生产原料和贮存不同时间的醋曲成品中共检测到 610 个真菌 OTU 和 747 个细菌 OTU。醋曲成品中约 1/3 的真菌 OTU 和约 95% 的细菌 OTU 可在醋曲原料中找到(图 1)。醋曲原料和醋曲成品之间共有的真菌 OTU 少,部分原因是存在大量低丰度 OTU (在 610 个真菌 OTU 中,序列数少于 100 的 OTU 有 347 个,少于 200 的 OTU 有 457 个)。如果从真菌物种水平看,醋曲原料提供了醋曲成品中约一半的物种。如果只看高丰度真菌 OTU (如丰度排在前 40 的 OTU),醋曲成品中的 OTU 几乎都可在醋曲原料中找到。这说明醋曲原料是醋曲的重要微生物来源(尤其细菌),但其他环境(如工具、厂房和空气等)也可能提供了醋曲中参与发酵的微生物(尤其真菌)。类似的结果在其他研究中也有报道。例如,周天慈等^[20]发现高温大曲的制曲环境(主要是室外地面和室内屋顶)是大曲真菌群落的主要来源,而原材料则是细菌群落的主要来源。明确本研究中醋曲微生物的具体来源,需要今后同时对制曲环境进行采样分析。

本研究发现,在醋曲贮存过程中,随着贮存时间的延长,微生物多样性逐渐降低,微生物群落结构也随之发生变化。但是真菌和细菌群落结构的变化程度存在差异,细菌比真菌更易产生波动。例如,贮存 7 个月和 12 个月的醋曲之间在真菌群落结构方面差异不显著,但在细菌群落结构方面仍然差异显著(表 2)。这可能

说明醋曲细菌群落结构易受贮存过程中气候环境变化(如季节、温度和湿度等)的影响。同时,贮存 7 个月和 12 个月的醋曲在真菌群落结构方面无显著变化的事实,也在一定程度上为醋曲长期存放和分批使用提供了理论依据。然而值得注意的是,长时间存放的醋曲是否仍能酿出好醋尚待评价。今后需关注醋曲存放过程中理化指标、感官指标和酿醋酶系活性、核心微生物群落等的变化情况。

本文研究结果与现有研究相比,在醋曲微生物群落结构方面存在一些差异。例如,陈旭峰等^[5]利用高通量测序发现山西老陈醋成熟大曲中的优势真菌属(丰度>1%)为假丝酵母属、曲霉属、威克汉姆酵母属(*Wicherhamomyces*)、链格孢属(*Alternaria*)、酿酒酵母属(*Saccharomyces*)、隐球酵母属(*Cryptococcus*)、横梗霉属(*Lichtheimia*)和根霉属(*Rhizopus*)。本研究虽然也发现子囊菌门真菌丰度最高(>90%),但优势真菌属(丰度>1%)依次为曲霉属、红曲属、复膜孢酵母属、伊萨酵母属、毛霉属、假丝酵母属和嗜热子囊菌属等。周楠等^[4]利用高通量测序研究发现,生产季节和制曲工艺均显著影响了麸醋曲的微生物多样性,而且其有关微生物群落结构的研究结果与本研究的差异较大;在周楠等的研究中,四川阆州醋业有限公司生产的醋曲(L 曲)主要优势真菌属为曲霉属、根霉属(*Rhizomucor*)、毛霉属(*Mucor*)和生丝毕赤酵母属(*Hyphopichia*),而四川千禾味业股份有限公司生产的醋曲(Q 曲)主要优势真菌属为嗜热子囊菌属、曲霉属和嗜热真菌属(*Thermomyces*)。除曲霉属和嗜热子囊菌属外的其他属在本研究中的丰度都很低。综合多项研究结果,曲霉属应该是醋曲发酵中的重要真菌类群。

传统食醋生产中存在一些潜在的危害因子,如致病微生物^[21]或引起食醋变质的微生物^[22-23]。

本研究发现醋曲中的真菌以腐生营养型为主,但在醋曲原料、新制醋曲和贮存 12 个月的醋曲中可检测到少量植物或动物病原菌,如错综赤霉(*Gibberella intricans*)、丝孢酵母属(*Trichosporon*)和皮肤皮状新毛孢子菌(*Cutaneotrichosporon cutaneum*)等。在贮存 7 个月的醋曲中,这些病原菌含量相对最低,相应地,腐生营养型的比例上升至最高(>97%)。在贮存 12 个月的醋曲中,毛葡孢霉属(*Melanocarpus*)的富集导致出现较高比例(约 18%)的病理-腐生-共生复合营养型(图 4A)。4 组样品在细菌功能组成方面具有较高的一致性(图 4B、4C),并且未检测到蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、志贺氏菌(*Shigella*)等典型致病菌。综上所述,从安全角度考虑,贮存 7 个月的醋曲应该是最安全的。另外,通过生物强化技术研究添加曲霉或其他在醋曲中发生富集的微生物对醋曲微生物群落结构及醋曲品质的影响,是今后值得研究的方向之一。已有研究显示,添加复合醋曲可有效缩短食醋的发酵时间、提高原料利用率和出醋率^[24-25]。

REFERENCES

- [1] 张宝善. 食醋酿造学[M]. 北京: 科学出版社, 2014: 1. ZHANG BS. Vinegar Brewing[M]. Beijing: Science Press, 2014: 1 (in Chinese).
- [2] LI P, LI S, CHENG LL, LUO LX. Analyzing the relation between the microbial diversity of DaQu and the turbidity spoilage of traditional Chinese vinegar[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(13): 6073-6084.
- [3] 黄静, 严唯玮, 刘书亮, 刘爱平, 敖晓琳, 王瑞, 杨勇, 杜大钊, 陈福生. 食醋大曲功能微生物菌群与品质解析研究进展[J]. 食品科学, 2020, 41(7): 322-328. HUANG J, YAN WW, LIU SL, LIU AP, AO XL, WANG R, YANG Y, DU DZ, CHEN FS. Recent progress in functional microbial community and quality evaluation of vinegar Daqu[J]. Food Science, 2020, 41(7): 322-328 (in Chinese).
- [4] 周楠, 黄钧, 文平, 何培, 刘记堂, 周荣清. 季节及制曲工艺对麸醋曲微生物群落结构及代谢组分的影响[J]. 食品工业科技, 2022, 43(1): 155-162. ZHOU N, HUANG J, WEN P, HE P, LIU JT, ZHOU RQ. Effects of seasons and Daqu-making process on the microbial community structure and metabolites of bran Cuqu[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(1): 155-162 (in Chinese).
- [5] 陈旭峰, 刘丹彤, 王佳丽, 魏莎莎, 许女. 山西老陈醋大曲真菌群落结构及多样性分析[J]. 中国食品学报, 2021, 21(10): 206-214. CHEN XF, LIU DT, WANG JL, WEI SS, XU N. Analysis of fungal community structure and diversity in Daqu from Shanxi aged vinegar[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(10): 206-214 (in Chinese).
- [6] 张天震, 孙晓琪, 刘丹彤, 王宏霞, 王超敏, 王如福, 许女. 山西老陈醋大曲细菌群落结构及多样性研究[J]. 中国食品学报, 2021, 21(5): 323-330. ZHANG TZ, SUN XQ, LIU DT, WANG HX, WANG CM, WANG RF, XU N. Studies on bacterial community structure and diversity in Daqu from Shanxi aged vinegar[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(5): 323-330 (in Chinese).
- [7] TANG HL, LIANG HB, SONG JK, LIN WF, LUO LX. Comparison of microbial community and metabolites in spontaneous fermentation of two types Daqu starter for traditional Chinese vinegar production[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2019, 128(3): 307-315.
- [8] 陈镜如, 边鑫, 杨杨, 邢童林, 王子轩, 任丽琨, 胡良术, 何林阳, 张娜. 中国传统发酵食品微生物多样性研究进展[J]. 中国调味品, 2022, 47(2): 205-210. CHEN JR, BIAN X, YANG Y, XING TL, WANG ZX, REN LK, HU LS, HE LY, ZHANG N. Research progress on microbial diversity of traditional fermented food in China[J]. China Condiment, 2022, 47(2): 205-210 (in Chinese).
- [9] 张永杰, 崔宁波, 张丽珍, 甄晓君, 柳青山. 基于 DNA 高通量测序分析生料酿醋过程中的真菌多样性[J]. 微生物学报, 2020, 60(7): 1358-1369. ZHANG YJ, CUI NB, ZHANG LZ, ZHEN XJ, LIU QS. Fungal diversity during raw vinegar brewing process as revealed by high-throughput sequencing[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(7): 1358-1369 (in Chinese).
- [10] SMITH DP, PEAY KG. Sequence depth, not PCR replication, improves ecological inference from next generation DNA sequencing[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e90234.

- [11] CAPORASO JG, LAUBER CL, WALTERS WA, BERG-LYONS D, HUNTLEY J, FIERER N, OWENS SM, BETLEY J, FRASER L, BAUER M, GORMLEY N, GILBERT JA, SMITH G, KNIGHT R. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(8): 1621-1624.
- [12] ZHANG YJ, SKAAR I, SULYOK M, LIU XZ, RAO MY, TAYLOR JW. The microbiome and metabolites in fermented Pu-erh tea as revealed by high-throughput sequencing and quantitative multiplex metabolite analysis[J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0157847.
- [13] BENGTSOON-PALME J, RYBERG M, HARTMANN M, BRANCO S, WANG Z, GODHE A, de WIT P, SÁNCHEZ-GARCÍA M, EBERSBERGER I, de SOUSA F, AMEND AS, JUMPPONEN A, UNTERSEHER M, KRISTIANSOON E, ABARENKOV K, BERTRAND YJK, SANLI K, ERIKSSON KM, VIK U, VELDRE V, et al. Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data[J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2013, 4: 914-919.
- [14] BENGTSOON-PALME J, HARTMANN M, ERIKSSON KM, PAL C, THORELL K, LARSSON DGJ, NILSSON RH. METAXA2: improved identification and taxonomic classification of small and large subunit rRNA in metagenomic data[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2015, 15(6): 1403-1414.
- [15] NILSSON RH, LARSSON KH, TAYLOR AFS, BENGTSOON-PALME J, JEPPESEN TS, SCHIGEL D, KENNEDY P, PICARD K, GLÖCKNER FO, TEDERSOO L, SAAR I, KÖLJALG U, ABARENKOV K. The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(D1): D259-D264.
- [16] QUAST C, PRUESSE E, YILMAZ P, GERKEN J, SCHWEER T, YARZA P, PEPLIES J, GLÖCKNER FO. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(D1): D590-D596.
- [17] NGUYEN NH, SONG ZW, BATES ST, BRANCO S, TEDERSOO L, MENKE J, SCHILLING JS, KENNEDY PG. FUNGuild: an open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild[J]. *Fungal Ecology*, 2016, 20: 241-248.
- [18] ABHAUER KP, WEMHEUER B, DANIEL R, MEINICKE P. Tax4Fun: predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data[J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(17): 2882-2884.
- [19] 杨宗新. 食醋曲霉的产生与发展[J]. *科学之友*, 2011(2): 84-85.
YANG ZX. Emergence and development of vinegar Daqu[J]. *Friend of Science Amateurs*, 2011(2): 84-85 (in Chinese).
- [20] 周天慈, 何宏魁, 周庆伍, 曹润洁, 马叶胜, 杜海, 徐岩. 基于高通量扩增子测序技术解析中高温大曲微生物来源[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(16): 66-71.
ZHOU TC, HE HK, ZHOU QW, CAO RJ, MA YS, DU H, XU Y. Exploring the source of microbiota in medium-high temperature Daqu based on high-throughput amplicon sequencing[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(16): 66-71 (in Chinese).
- [21] 郑宇, 张强, 刘静, 郭志鹏, 马建芳, 宋佳, 王敏. 我国传统食醋生产过程中潜在危害因子的综述[J]. *天津科技大学学报*, 2019, 34(4): 1-8, 15.
ZHENG Y, ZHANG Q, LIU J, GUO ZP, MA JF, SONG J, WANG M. Potential harmful factors in Chinese traditional vinegar production: a review[J]. *Journal of Tianjin University of Science & Technology*, 2019, 34(4): 1-8, 15 (in Chinese).
- [22] 曹晋宜, 赵红年, 赵凌雁, 惠美星. 食醋中有害微生物的分离与鉴定[J]. *中国酿造*, 2017, 36(2): 115-118.
CAO JY, ZHAO HN, ZHAO LY, HUI MX. Isolation and identification of harmful microorganism from vinegar[J]. *China Brewing*, 2017, 36(2): 115-118 (in Chinese).
- [23] 李盈颖, 高雯, 周帼萍. 山西老陈醋样品的污染微生物分析[J]. *食品科学*, 2016, 37(12): 226-231.
LI YY, GAO W, ZHOU GP. Case analysis of contaminated Shanxi aged vinegar[J]. *Food Science*, 2016, 37(12): 226-231 (in Chinese).
- [24] 宋慧芳. 多菌种复合醋曲对传统山西老陈醋酒精发酵工艺的影响[J]. *食品工程*, 2016(3): 27-31.
SONG HF. Impact of multi-strain vinegar koji's on traditional Shanxi aged vinegar alcohol fermentation process[J]. *Food Engineering*, 2016(3): 27-31 (in Chinese).
- [25] 张锦盛, 刘军, 朱文优, 黄思敏, 原海兵, 韩志双. 固态发酵酿醋中复合麸曲的应用研究[J]. *中国酿造*, 2013, 32(1): 124-126.
ZHANG JS, LIU J, ZHU WY, HUANG SM, YUAN HB, HAN ZS. Application of compound bran-kojis in vinegar production with solid-state fermentation[J]. *China Brewing*, 2013, 32(1): 124-126 (in Chinese).