



洋河浓香型白酒发酵过程酒醅微生物群落结构解析及其与有机酸合成的相关性

刘凡^{1,2}, 周新虎³, 陈翔³, 陈坚^{1,4}, 堵国成^{1,5*}, 方芳^{1,2}

¹ 工业生物技术教育部重点实验室, 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122

² 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

³ 江苏洋河酒厂股份有限公司, 江苏 宿迁 223800

⁴ 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

⁵ 江南大学糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

摘要: 【目的】解析江苏洋河酒厂浓香型白酒窖内发酵过程酒醅微生物群落结构, 建立酒醅微生物与主要有机酸合成的关联性。【方法】通过宏基因组测序获得白酒发酵过程中微生物群落结构变化规律, 利用主成分分析和偏最小二乘回归分析寻找酒醅中影响主要有机酸合成的关键微生物。【结果】根据微生物组成结构变化和有机酸合成变化规律, 可将白酒窖内发酵分为两个时期 (0–14 d 和 15–60 d)。其中窖内发酵 0–15 d 与主要有机酸合成相关的微生物数量显著高于 15–60 d 的。窖内发酵过程与主要有机酸合成相关的微生物包括 7 个菌属, 分别为乳杆菌属(*Lactobacillus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、酵母属(*Saccharomyces*)、*Naumovozyma*、伊萨酵母属(*Issatchenkia*)、嗜冷芽孢杆菌属(*Psychrobacillus*)和根霉属(*Rhizopus*)。【结论】本研究识别了白酒窖内发酵过程中与主要有机酸合成相关的核心和关键微生物, 可为阐明白酒窖内发酵产酸机理和保障白酒品质的稳定性奠定研究基础和理论依据。

关键词: 浓香型白酒, 微生物组成, 有机酸, 偏最小二乘回归, 核心微生物

浓香型白酒窖内发酵过程是一种多菌种参与的固态发酵过程^[1]。来自酒曲、窖池及发酵环境的多种微生物(细菌、酵母菌和霉菌)以酒醅为载体, 在白酒窖内发酵过程中进行复杂的物质能量代谢, 生成各类代谢产物和风味物质^[2-3]。由于白酒

窖内发酵环境的变化, 酒醅微生物群落呈一种动态、有规律的演变过程^[4]。发酵过程中某些因素的改变往往会引起微生物群落结构的改变, 从而引起白酒风味物质的组成和比例发生变化, 进而影响白酒品质^[5-6]。

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFC1600403); 国家自然科学基金(31771955)

*通信作者。Tel/Fax: +86-510-85918307; E-mail: gcdu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2017-12-20; 修回日期: 2018-03-09; 网络出版日期: 2018-03-21

有机酸是浓香型白酒中一类重要的呈味物质。在浓香型白酒中己酸、乙酸、丁酸和乳酸的含量最高,其总和占总有机酸含量的 90%以上,因此被统称为四大酸^[7]。四大酸也是己酸乙酯、乳酸乙酯、乙酸乙酯和丁酸乙酯这四种酯类的主要前体,其中己酸乙酯是浓香型白酒的主体香成分,对浓香型白酒风格的形成有重要作用^[8-9]。以四大酸为主的有机酸是影响白酒酸度的主要因素。有机酸的合成主要由微生物的代谢产生^[10],而窖池中酸度的变化对微生物的生长代谢也有显著影响^[11]。因此,解析白酒发酵过程中酒醅微生物群落结构与四大酸的相互作用,对于揭示酒醅微生物产酸机理、控制窖内发酵和保障白酒品质的稳定性具有重要意义。

目前,随着宏基因组测序技术在传统发酵食品中的广泛应用,微生物群落结构与功能之间的关系成为研究人员关注的热点问题。王宗敏等通过分析镇江香醋发酵过程中微生物群落结构与风味物质的相关性,找到 7 种对风味物质有突出贡献的核心功能微生物^[12];王海燕等利用分子生物学技术解析酱香型白酒中两个发酵轮次的酵母菌群落结构,结合两轮次风味组分变化特点,阐释了酵母群落结构变化对白酒风味物质的影响^[13]。王鹏等利用高通量测序技术确定了白酒发酵过程中的核心微生物,揭示了环境因子与该核心微生物群的相互关系^[14]。然而,在分子生物学水平上对白酒酒醅微生物群落与有机酸合成的相互关系研究较少,目前仅有对可培养微生物与有机酸合成进行关联分析的研究^[15-16]。

本研究利用宏基因组测序技术全面系统地解析浓香型白酒发酵过程酒醅微生物群落结构,通过解析酒醅微生物与四大酸的相互关系,揭示白

酒窖内发酵过程中与四大酸合成相关的微生物,可为阐明酒醅中微生物产酸机理,定向调控白酒生产中的主要有机酸的合成提供理论依据和实践参考。

1 材料和方法

1.1 酒醅样品的获取

酒醅样品取自江苏洋河酒厂浓香型白酒窖池,每个样品分别于窖池的上、中、下三层采集,每层分 3 个点取样,合并混合均匀后作为该时间点的酒醅样品(约 200 g)。在 60 d 的发酵周期内,分别从两个窖池取发酵 0、3、6、15、20、30、45 和 60 d 的样品,总计 16 个样品。样品采集后暂存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$,并及时进行酒醅微生物基因组 DNA 提取和有机酸含量检测。

1.2 有机酸含量分析

1.2.1 样品的预处理:准确称取 10 g 酒醅样品,加入 20 mL 去离子水,冰浴超声均质后离心 5 min ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10000 r/min),取上清液用于后续分析。

1.2.2 乳酸的检测取 1 mL 上述上清液,用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 水系滤膜过滤,利用高效液相色谱法测定乳酸含量^[17]。检测器为紫外检测器,色谱柱为 HPLC organic acid analysis column (300 mm \times 7.8 mm)。

1.2.3 乙酸、己酸和丁酸的检测:利用顶空固相微萃取(HS-SPME)结合气相色谱-质谱(GC-MS)对酒醅中的乙酸、己酸和丁酸进行定量分析。分别取 8 mL 样品上清液、10 μL 的乙酸正戊酯溶液(内标,终浓度为 440 mg/L)和 5 g 氯化钠加入到 15 mL 的顶空瓶中,将 50/30 μm DVB/CAR/PDMS 萃取头插入顶空瓶,50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下萃取 45 min,萃取完毕后将萃取头手动插入气相色谱进样口进行 GC-MS

分析。GC-MS 检测色谱柱为 DB-WAX 石英毛细柱(30 m×0.32 mm×0.25 μm; J & W Scientific), 载气 He 流速 2 mL/min。程序升温 50 °C 保持 3 min, 以 6 °C/min 的速度升温至 230 °C (保持 15 min)。进样口及检测器温度均为 250 °C。质谱条件: 电子电离(electron ionization, EI)源, 离子源温度 230 °C, 电子轰击能量 70 eV, 溶剂延迟时间 3 min, 质谱扫描范围 35–450 m/z ^[18]。

1.3 酒醅微生物基因组 DNA 提取

利用石英砂结合 CTAB (十六烷基三甲基溴化铵)的样品预处理方法提取酒醅微生物基因组 DNA^[19]。称取 5 g 酒醅, 加入 3 g 灭菌石英砂和 10 mL CTAB 抽提液(2% CTAB, 5 mol/L 氯化钠, 1 mol/L 三氨基甲烷(pH 8.0), 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸), 利用 Fast prep 细胞破碎仪破碎细胞(间歇操作, 用冰浴控制样品温度在 4 °C 以下), 离心 10 min (4 °C, 10000 r/min)取上清液, 加入等体积苯酚-氯仿-异戊醇(25 : 4 : 1)抽提后, 离心 20 min (4 °C, 10000 r/min)取上清液, 加入 0.6 倍体积异丙醇沉淀 1 h, 沉淀用 75%乙醇(乙醇 : 水为 3 : 1)洗涤, 提取得到的基因组 DNA 用 TE 溶解, 并于 -20 °C 保存。

1.4 宏基因组测序及序列分析

利用 Illumina HiSeq 测序平台, 分别对酒醅细菌和真菌微生物群落进行分析。细菌选择 16S rRNA 基因的 V3–V4 测序区域, 所用引物为 341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCASCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3'); 真菌测序区域选择 ITS1 区域, 所用引物分别为 ITS5-1737F (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') 和 ITS2-2043R (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3')。根据选定的特定测序区域, 利用带 Barcode

的特异引物进行 PCR, PCR 扩增程序参照文献[20]。然后用 2%的琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测, 根据 PCR 产物的浓度进行等量混样和纯化, 并使用 TruSeq[®] DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 构建文库, 最后通过 HiSeq2500 PE250 平台上机测序。

根据条码序列和 PCR 扩增引物序列将下机数据拆分到各样品数据, 去掉 Barcode 序列和引物序列, 得到有效的序列文件。在此基础上对测序数据的质量进行控制, 去掉测序质量不好的序列, 保留测序长度大于 400 bp (细菌)或 300 bp (真菌)的序列, 并去除嵌合体序列, 得到合格的有效数据。利用 Uparse 软件在 97%的一致性水平将序列聚集为 OTUs (the Operational Taxonomic Units), 细菌利用 Mothur 方法与 SILVA 的 SSU rRNA 数据库进行物种注释分析^[21–22], 真菌利用 Qiime 软件中的 BLAST 方法与 Unit 数据库进行物种注释分析^[23]。使用 Mothur 软件计算样品的 Chao1、Shannon 和 Goods-coverage 指数。

1.5 数据处理及统计学分析

基于属水平相对丰度排名前 100 的酒醅微生物(真菌和细菌), 利用 SPSS 19.0 统计软件对酒醅样品进行 PCA 聚类分析, 利用 R 中的 ggbiplot 进行 PCA 结果的可视化。利用 SIMCA 13.0 软件对所有酒醅样品相对丰度排名前 10 的属(细菌和真菌)与四大酸含量进行偏最小二乘回归分析(partial least squares regression, PLS), PLS 模型的 R^2 和 Q^2 值分别说明自变量对因变量的解释能力和预测能力, $R^2(>0.8)$ 和 $Q^2(>0.5)$ 越大, 说明模型的拟合效果和预测能力越好^[12]。微生物的 VIP 值(variable importance plot)和相关性系数矩阵用于确定与四大酸合成相关的功能微生物。VIP 值大

于 1.0, 表明微生物对四大酸合成有重要作用, 且 VIP 值越大说明重要程度越大^[24]。相关性系数矩阵说明微生物与四大酸合成的相关性, $1 > r > 0$ 代表正相关, $0 > r > -1$ 代表负相关。通过 Cytoscape 3.4.0 软件对微生物与四大酸相关性较高的 ($|r| > 0.6$) 进行可视化。

2 结果和分析

2.1 浓香型白酒窖内发酵过程中四大酸合成规律

通过对浓香型白酒发酵过程中的己酸、丁

酸、乳酸和乙酸的含量进行检测发现, 酒醅中己酸、乙酸和乳酸含量在窖内发酵前期有一个降低的过程。其中以乙酸含量降低幅度最大, 在 0–6 d 降低了 10.82 mg/kg, 降幅为 59.1%。随着发酵的进行, 丁酸合成存在 2 个快速增长阶段: 6–15 d 和 45–60 d; 乙酸含量在 15–20 d 迅速增加, 增加了 2.3 倍; 乳酸含量在发酵第 20–30 d 增加了 43.1%。酒醅中己酸含量在入窖和出窖时没有显著变化, 出窖时丁酸、乳酸和乙酸含量分别比入窖时增加了 54.99、1732.41 和 110.54 mg/kg (图 1)。

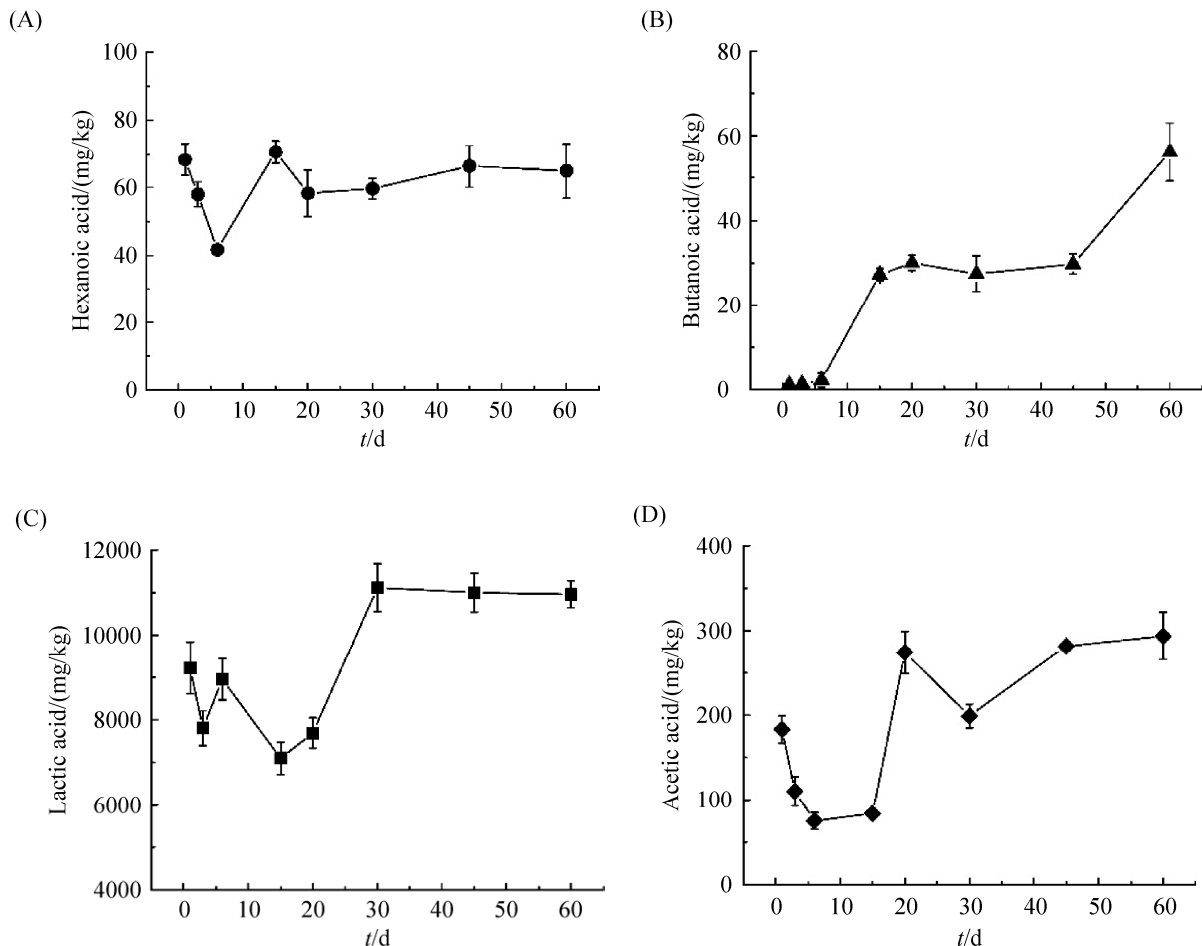


图 1. 白酒发酵过程酒醅中四大酸含量变化

Figure 1. Content of hexanoic acid (A), butanoic acid (B), lactic acid (C) and acetic acid (D) in fermented grains.

2.2 酒醅微生物的 α -多样性分析

本研究利用宏基因组测序技术对浓香型白酒发酵过程酒醅中微生物群落结构进行了解析。经过对测序获得数据的拼接和过滤处理, 16 个酒醅样品共得到 857338 条细菌有效序列和 791098 条真菌有效序列。所有样品的覆盖率指数(Good coverage)均达到 99.61% 以上, 表明样品的测序深度满足反映酒醅微生物全部信息的要求。酒醅中微生物多样性结果如表 1, 在 97% 的相似性水平上, 各样品中细菌 OTUs 为 168–925, 真菌 OTUs 为 173–246, 即细菌种类普遍高于真菌种类。

2.3 酒醅微生物群落结构分析

细菌属水平共得到 496 个属, 其中地芽孢杆菌属(*Geobacillus*)和乳杆菌属的相对丰度在浓香

型白酒窖内发酵整个阶段均占据优势(丰度>1%的菌确定为优势菌)。窖内发酵 0–6 d 阶段地芽孢杆菌在细菌中占绝对优势, 含量为 21.5%–40.3%。窖内发酵 6 d 后地芽孢杆菌相对丰度迅速降低, 逐渐被乳杆菌属替代, 6–15 d 乳杆菌属相对丰度增加了 59.7%, 15 d 后成为绝对优势属(占细菌总数的 79.7%–95.7%)。在窖内发酵前期, 芽孢杆菌属(*Bacillus*)和醋酸杆菌属(*Acetobacter*)也是优势细菌, 芽孢杆菌和醋酸杆菌的相对丰度分别为 8.5%–12.2%和 0.3%–5.1%。这一时期, 高温放线菌属(*Thermoactinomyces*)(18.2%到 3.5%)占据比例则迅速下降。此外, 在白酒窖内发酵前期, 魏斯氏菌属(*Weissella*)、*Kroppenstedtia*、无氧芽孢杆菌属(*Anoxybacillus*)和乳球菌属(*Lactococcus*)也占据一定的比例, 这些微生物均为白酒发酵前期的优势细菌(图 2)。

表 1. 酒醅中细菌和真菌的 α -多样性

Table 1. The α -diversity of bacteria and fungi in fermented grains

Microorganisms	Samples/d	OTUs	Chao1	Shannon	Good coverage/%
Bacteria	0	458±41	531.39±42.02	3.63±0.42	99.71±0.01
	3	925±77	1025.04±97.64	5.64±0.64	99.55±0.01
	6	780±71	885.35±70.64	4.56±0.32	99.61±0.01
	15	369±28	426.57±35.01	1.79±0.85	99.75±0.01
	20	361±57	454.37±45.52	0.95±0.09	99.72±0.02
	30	314±58	409.93±80.77	0.57±0.14	99.75±0.01
	45	288±65	343.24±64.72	0.68±0.16	99.83±0.01
	60	168±17	198.11±24.80	0.91±0.03	99.92±0.02
	Fungi	0	173±27	254.14±56.38	1.85±0.07
3		198±26	234.81±26.43	2.41±0.23	99.85±0.01
6		191±71	235.89±90.53	2.42±0.11	99.85±0.01
15		241±13	316.38±20.33	2.99±0.41	99.81±0.00
20		173±49	225.92±62.31	2.87±0.02	99.85±0.01
30		197±28	220.44±14.09	3.25±0.22	99.93±0.02
45		234±25	301.48±35.83	3.77±0.38	99.91±0.02
60		246±7	276.86±0.51	3.81±0.28	99.83±0.01

真菌属水平共鉴定出 134 个属, 其中嗜热真菌属(*Thermomyces*)、热子囊菌属(*Thermoascus*)和根毛霉属(*Rhizomucor*)在浓香型白酒窖内发酵整个阶段均为优势菌属(相对丰度>1%)。窖内发酵 0–6 d 时嗜热真菌(32.9%–40.9%)和热子囊菌(43.8%–50.2%)所占比例较高, 6 d 后相对丰度降低, 但仍高于 17%; 根毛霉相对丰度在入窖时最低(4.3%), 随后不断升高, 30 d 时所占比例达到 10.8%。与细菌不同的是, 在白酒窖内发酵中后期, 存在多个优势真菌。例如窖内发酵 6–15 d, *Naumovozyma* (2.1%到 30.9%)相

对丰度迅速增加, 在 15–20 d 占据较高比例(21.9%–30.9%), 是白酒窖内发酵整个过程中相对丰度最高的酵母菌。伊萨酵母属在窖内 15–60 d 也是优势菌(相对丰度>1%)。假散囊菌属(*Pseudeurotium*)在窖内发酵 15–30 d 相对丰度由 0.7%增加到 28.3%, 30–45 d 保持较高比例(17.9%–28.3%)。集壶菌属(*Synchytrium*)仅在发酵 45 d 相对丰度较高(8.9%)。此外, 毕赤酵母属(*Pichia*)、毛霉属(*Mucor*)、丝孢菌属(*Scedosporium*)和酵母属在白酒窖内发酵中后期也占据一定比例, 均为窖内发酵酒醅中的优势真菌(图 2)。

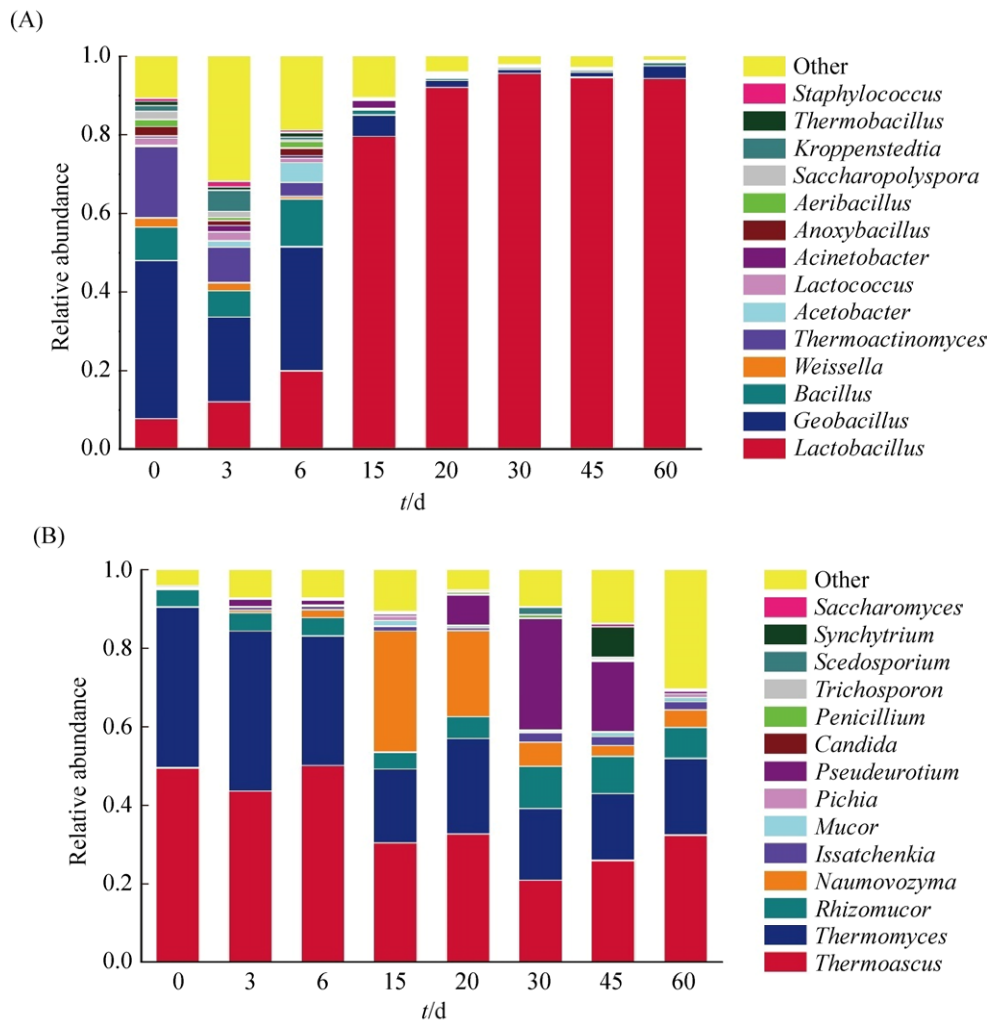


图 2. 浓香型白酒发酵过程中酒醅细菌(A)和真菌(B)属水平微生物群落结构

Figure 2. The microbial community of fermented grains for production of strong-aroma Chinese liquor. A: bacteria; B: fungi. The results were the average values of sequencing data generated from two different batches of fermentation.

2.4 酒醅微生物群落结构与对浓香型白酒窖内发酵进程关联分析

由上述浓香型白酒窖内发酵过程酒醅微生物群落演替规律可知,窖内发酵前期和中后期酒醅微生物群落组成存在明显差异(图 2)。白酒窖内发酵 6–15 d 是酒醅微生物群落结构剧烈变化时期,属水平优势细菌数目显著减少,优势真菌数目显著增多,这与该阶段窖池营养物质快速消耗、氧气含量降低、酸度迅速升高密切相关^[4]。为研究酒醅微生物群落结构变化与白酒窖内发酵进程的关系,基于酒醅属水平相对丰度排名前 100 的细菌和真菌微生物,对酒醅样品进行了 PCA 聚类分析。由图 3 可以看出,在 95% 的置信区间内,代表不同微生物组成的酒醅样品主要分布在第一和第三象限,第 15 天酒醅与其他酒醅在微生物组成上较为不同,是发酵前期(0–14 d)到中后期(16–60 d)的一个转折点。由于窖内发酵是一种可循环的持续发酵过程^[25],在后续研究中,将分 0–15 d 和 15–60 d 两个阶段对酒醅微生物群落结构和它们与四大酸相关性进行研究。

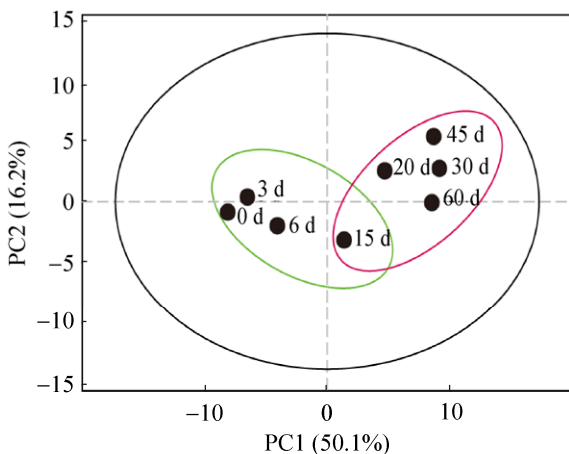


图 3. 基于微生物组成的酒醅样品 PCA 分析
Figure 3. Grouping fermented grains by PCA analysis based on top 100 classified genera of bacteria and fungi.

2.5 白酒窖内发酵过程中与四大酸合成相关的微生物的重要性指标分析

微生物的重要性指标 (variable importance plot, VIP) 分析是评估微生物对风味物质重要程度的有效手段^[24]。本研究利用 SIMCA 13.0 软件对每个酒醅样品相对丰度排名前 10 的细菌 (18 个属) 和真菌 (17 个属) 与四大酸含量进行了偏最小二乘回归分析。其中,白酒窖内发酵 0–15 d, PLS 模型的 R^2 和 Q^2 分别为 0.821 和 0.549, 15–60 d 的 PLS 模型 R^2 和 Q^2 分别为 0.954 和 0.625, 说明构建的 PLS 模型能很好地对白酒发酵过程中酒醅微生物与四大酸的相关性进行解释。在白酒窖内发酵整个过程中 VIP 值大于 1.0 的微生物有 15 种,包括 8 个细菌属和 7 个真菌属(图 4)。窖内发酵 0–15 d (图 4-A), VIP 值大于 1.0 的微生物有 28 个属(16 细菌和 12 真菌),其中 VIP 值最大的细菌属为 *unidentified Chloroplast* (VIP=1.27), 真菌属为伊萨酵母属(VIP=1.25)。窖内发酵 15–60 d (图 4-B), VIP 值大于 1.0 的微生物有 17 个属(9 细菌和 8 真菌),其中细菌 VIP 值最大的为不动杆菌属(*Acinetobacter*) (VIP=1.35), 真菌为 *Naumovozyma* (VIP=1.29)。上述结果表明,白酒窖内发酵 0–15 d (28 属)对四大酸合成有重要作用的微生物数目明显多于 15–60 d (17 属)。

2.6 白酒窖内发酵过程中与四大酸相关的微生物分析

为进一步确定与四大酸合成相关的功能微生物,选择白酒窖内发酵两个阶段 VIP 值大于 1.0 的微生物与四大酸含量进行相关性系数矩阵分析,并利用 Cytoscape 软件对 $|r| > 0.6$ 的进行可视化展示。由图 5 可以看出,在浓香型白酒窖内发酵整个过程,乳杆菌属与乳酸合成正相关,酵母

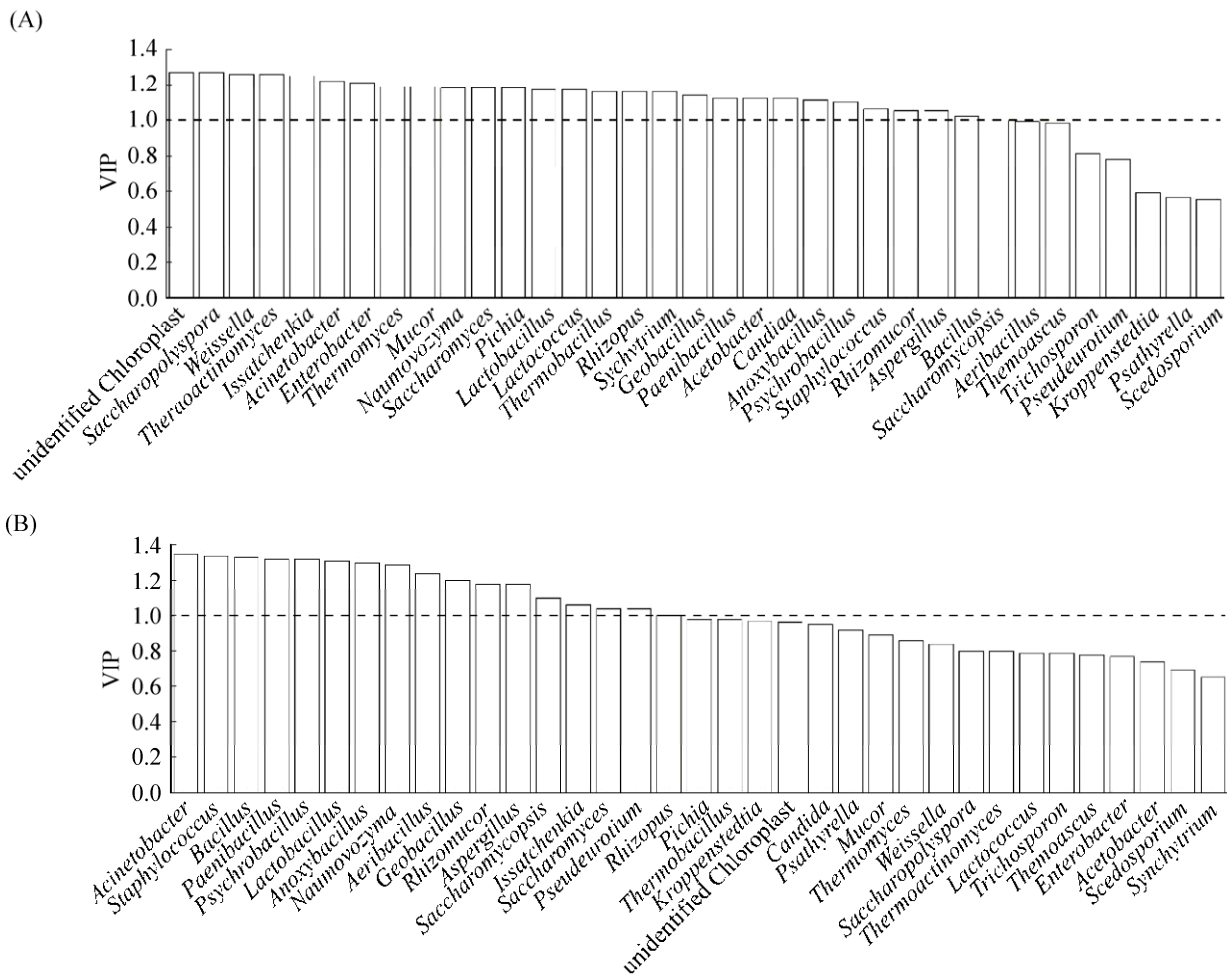


图 4. 与四大酸合成相关的重要微生物

Figure 4. The important microbe correlated with the four main organic acids. A: 0–15 d; B: 15–60 d.

属和 *Naumovozyma* 与乳酸合成负相关；乳杆菌属和伊萨酵母属与乙酸合成正相关，嗜冷芽孢杆菌属与乙酸合成负相关；酵母属与己酸合成正相关；酵母属与丁酸合成正相关，葡萄球菌属和根霉属与丁酸合成负相关。由此，将这些微生物定义为在白酒窖内发酵整个过程中对四大酸合成有重要影响的核心微生物。

窖内发酵 0–15 d，微生物与四大酸有 64 对相关性连接，包括 33 对正相关和 31 对负相关。其中与丁酸相关联的微生物数目最多(20 属)，包括 6 对正相关和 14 对负相关，毕赤酵母、酵母属、毛

霉、*Naumovozyma* 与丁酸合成正相关性最强 ($r > 0.9$)；嗜热真菌、根霉、肠杆菌属(*Enterobacter*)、耐热芽孢杆菌属(*Thermobacillus*)是影响丁酸合成的主要负相关微生物($r < -0.9$)。与乳酸合成相关联的有 16 个属，包括 11 对正相关和 5 对负相关，其中地芽孢杆菌、无氧芽孢杆菌、芽孢杆菌、乳杆菌属、乳球菌与乳酸合成正相关性最强($r > 0.9$)，毕赤酵母与乳酸合成负相关性最强($r < -0.8$)，表明这些微生物是该阶段影响乳酸合成的主要微生物。与乙酸合成相关联的有 14 个属，包括 11 对正相关和 3 对负相关，其中醋酸杆菌、乳杆菌属、

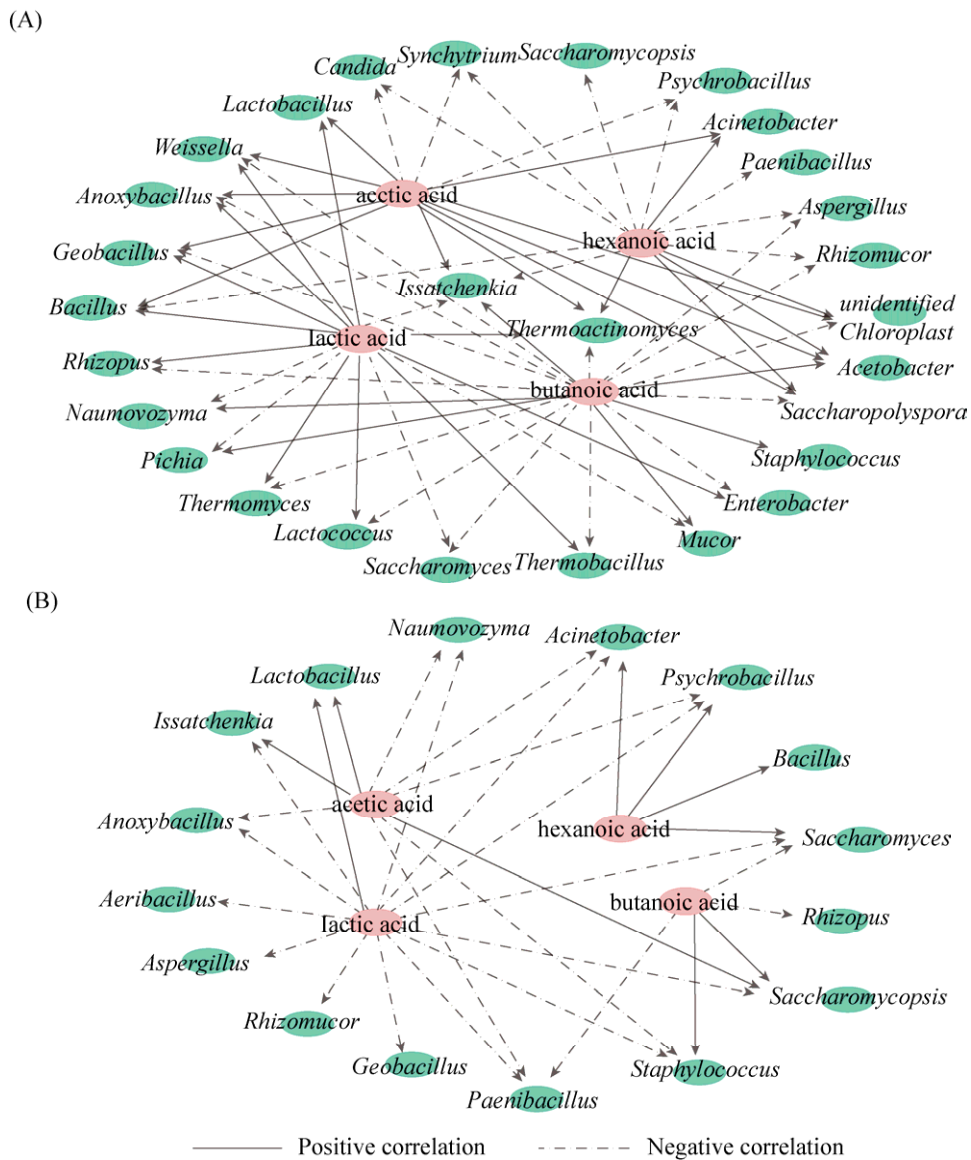


图 5. 酒醅微生物与四大酸的相关性网络图

Figure 5. Network of microbial genera (green) and four main organic acids (pink) constructed by coefficient matrix analysis ($|r| > 0.6$). A: 0–15 d; B: 15–60 d.

不动杆菌、高温放线菌与乙酸合成正相关性最强 ($r > 0.9$)，假丝酵母属(*Candida*)是与乙酸合成负相关性最强的微生物($r < -0.7$)。与己酸合成相关联的微生物最少(14 属)，包括 5 对正相关和 9 对负相关，醋酸杆菌属是与己酸合成正相关性最强的微生物 ($r > 0.9$)，集壶菌、复膜孢酵母属(*Saccharomycopsis*)和己酸合成负相关性最强($r < -0.9$)。此外，窖内发

酵 0–15 d 与两种以上有机酸均正相关的微生物包括细菌魏斯氏菌、unidentified Chloroplast、糖多孢菌属(*Saccharopolyspora*)、乳杆菌属、地芽孢杆菌、芽孢杆菌、无氧芽孢杆菌、不动杆菌、醋酸杆菌属、高温放线菌和真菌伊萨酵母属、酵母属；负相关的包括细菌嗜冷芽孢杆菌和真菌集壶菌、复膜孢酵母、根毛霉、伊萨酵母、假丝酵母、曲霉

属(*Aspergillus*), 这些微生物定义为白酒窖内发酵 0–15 d 与四大酸合成相关的关键微生物。

白酒窖内发酵 15–60 d, 微生物与四大酸有 32 对相关性连接, 包括 14 对正相关和 18 对负相关。与乳酸合成相关联的微生物最多(14 属), 包括 5 对正相关和 9 对负相关, 其中乳杆菌属、根霉菌是影响乳酸合成的主要正相关微生物($r > 0.9$), *Naumovozyma*、地芽孢杆菌、好氧芽孢杆菌属(*Aeribacillus*)与乳酸合成负相关性最强($r < -0.9$)。与乙酸合成相关联的微生物有 9 个属, 其中乳杆菌属、伊萨酵母、复膜孢酵母与乙酸合成正相关, 而嗜冷芽孢杆菌、不动杆菌是与乙酸合成负相关性最强的微生物($r < -0.8$)。与己酸和丁酸相关联的微生物较少(4 属和 5 属), 其中微生物与己酸均为正相关, 与丁酸有 2 对正相关和 3 对负相关。酵母属是影响己酸和丁酸合成正相关性最强的微生物($r > 0.9$), 表明酵母属微生物对己酸和丁酸合成有重要作用^[7]。同时, 该阶段与两种以上有机酸合成均正相关的微生物包括乳杆菌属和真菌中的复膜孢酵母、酵母属、伊萨酵母; 负相关的微生物包括细菌葡萄球菌、嗜冷芽孢杆菌、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、无氧芽孢杆菌、不动杆菌和真菌 *Naumovozyma*, 这些微生物定义为白酒窖内发酵 15–60 d 影响四大酸合成的关键微生物。

本研究中梭状芽孢杆菌属(*Clostridium*)与四大酸合成相关性均较低($|r| < 0.6$), 且在酒醅微生物群落中所占比例也极低(相对丰度 $< 0.01\%$)。浓香型白酒发酵过程中梭状芽孢杆菌是影响己酸、丁酸合成的关键微生物, 通常在窖泥中进行强化^[26]。因此, 探究酒醅微生物中与己酸、丁酸合成相关联的其它微生物, 对于寻找浓香型白酒窖内发酵过程中己酸和丁酸合成的调控方法有一定的参考价值。

3 讨论

本研究利用高效液相色谱、HS-SPME 结合 GC-MS 分别对浓香型白酒发酵过程酒醅中乳酸和己酸、丁酸、乙酸含量进行了分析, 发现酒醅四大酸含量在白酒发酵过程中均有不同程度的变化, 其中在白酒发酵结束时, 乙酸、乳酸和丁酸含量均明显升高, 己酸含量与发酵 0 d 相比无显著差异。这之前报道的利用生物传感分析仪和高效液相色谱等检测浓香型白酒发酵过程酒醅中乳酸含量, 利用液液萃取结合气相色谱技术分析酒醅中己酸、丁酸和乙酸变化规律的结果基本一致^[27–28]。利用宏基因组测序技术解析了白酒窖内发酵过程中酒醅微生物群落结构, 发现窖内发酵前期细菌组成较丰富, 而窖内发酵中后期真菌种类丰富。通过对酒醅微生物群落进行 PCA 聚类分析, 酒醅中微生物构成被明显区分为 0–15 d 和 15–60 d 两个阶段, 这与白酒发酵前期和中后期窖池环境变化密切相关^[4]。进一步对窖内发酵两个阶段属水平优势微生物(细菌和真菌)与四大酸含量进行偏最小二乘回归分析, 可知发酵 0–15 d (28 属)对四大酸合成有重要影响的微生物数目显著高于 15–60 d (17 属)。根据微生物与四大酸的相关性系数矩阵, 在白酒窖内发酵整个阶段, 共揭示出 7 个与四大酸合成密切相关的属水平核心微生物: 乳杆菌属、伊萨酵母属、酵母属、*Naumovozyma*、葡萄球菌属、嗜冷芽孢杆菌属和根霉属。乳杆菌属是白酒窖内发酵整个过程中的优势细菌, 它们在多种发酵食品中均有生成乙酸、乳酸和其他风味物质的能力^[29–30]。伊萨酵母、酵母属和 *Naumovozyma* 是浓香型白酒酒醅中的优势酵母菌。其中伊萨酵母具有代谢产生乙酸的能力^[31], 酵母属微生物和 *Naumovozyma* 产生的乙醇可与乙酸、乳酸反应产生己酸和丁酸, 在一定程度上抑制

窖内发酵中乳酸及乙酸的合成^[7]。葡萄球菌具有产生多种风味物质的潜力,有促进乙醇、醛类和酯类物质合成的能力^[32];嗜冷芽孢杆菌有较强的抑菌活性,能显著抑制产酸微生物的生长代谢^[33];根霉有产生脂肪酶和酒精的能力,能快速催化有机酸和乙醇生成酯类物质^[34],这些微生物在白酒窖内发酵过程中对有机酸合成均有重要作用。

本研究在分析酒醅主要有机酸含量和微生物群落结构演替规律的基础上,通过多元统计分析手段,全面揭示了白酒窖内发酵过程中与主要有机酸合成相关联的微生物,可为阐明酒醅微生物产酸机理、定向控制白酒窖内发酵过程中有机酸含量提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] Zhang WX, Qiao ZW, Shigematsu T, Tang YQ, Hu C, Morimura S, Kida K. Analysis of the bacterial community in *Zaopei* during production of Chinese *Luzhou-flavor* liquor. *Journal of the Institute of Brewing*, 2005, 111(2): 215–222.
- [2] Hu XL, Du H, Ren C, Xu Y. Illuminating anaerobic microbial community and cooccurrence patterns across a quality gradient in Chinese liquor fermentation pit muds. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(8): 2506–2515.
- [3] Liu J, Wu Q, Wang P, Lin J, Huang L, Xu Y. Synergistic effect in core microbiota associated with sulfur metabolism in spontaneous Chinese liquor fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017. DOI: 10.1128/AEM.01475–17.
- [4] Yan SB, Wang SC, Wei GG, Zhang KG. Investigation of the main parameters during the fermentation of Chinese *Luzhou-flavour* liquor. *Journal of the Institute of Brewing*, 2015, 121(1): 145–154.
- [5] Xiang WL, Li K, Liu S, Xing YG, Li MY, Che ZM. Microbial succession in the traditional Chinese *Luzhou-flavor* liquor fermentation process as evaluated by SSU rRNA profiles. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, 29(3): 559–567.
- [6] Smid EJ, Lacroix C. Microbe-microbe interactions in mixed culture food fermentations. *Current Opinion in Biotechnology*, 2013, 24(2): 148–154.
- [7] Zhang F, Zhang SY, Su ZY, Huang T, Ding HL, Wang C, Li DL, Yang Y, Luo J. Research progress in the effects of organic acids on the quality of *Nongxiang baijiu* and its production process. *Liquor-Making Science & Technology*, 2016(1): 94–97, 102. (in Chinese)
张方, 张宿义, 苏占元, 黄婷, 丁海龙, 王超, 李德林, 杨艳, 罗杰. 有机酸对浓香型白酒品质及其酿造过程影响的研究进展. *酿酒科技*, 2016(1): 94–97, 102.
- [8] Fan WL, Qian MC. Identification of aroma compounds in Chinese “*Yanghe Daqu*” liquor by normal phase chromatography fractionation followed by gas chromatography[sol] olfactometry. *Flavour and Fragrance Journal*, 2006, 21(2): 333–342.
- [9] Fan WL, Qian MC. Headspace solid phase microextraction and gas chromatography-olfactometry dilution analysis of young and aged Chinese “*Yanghe Daqu*” liquors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(20): 7931–7938.
- [10] Jin GY, Zhu Y, Xu Y. Mystery behind Chinese liquor fermentation. *Trends in Food Science & Technology*, 2017, 63: 18–28.
- [11] Li H, He R, Xiong XM, Zhang MC, Yang TY, Jiang ZB, Ma LX, Yi L, Ma XD. Dynamic diversification of bacterial functional groups in the *Baiyunbian* liquor stacking fermentation process. *Annals of Microbiology*, 2016, 66(3): 1229–1237.
- [12] Wang ZM, Lu ZM, Shi JS, Xu ZH. Exploring flavour-producing core microbiota in multispecies solid-state fermentation of traditional Chinese vinegar. *Scientific Reports*, 2016, 6: 26828.
- [13] Shao MK, Wang HY, Xu Y, Nie Y. Yeast community structure and its impact on flavor components during the fermentation process of Chinese *Maotai-flavor* liquor. *Microbiology China*, 2014, 41(12): 2466–2473. (in Chinese)
邵明凯, 王海燕, 徐岩, 聂尧. 酱香型白酒发酵中酵母群落结构及其对风味组分的影响. *微生物学通报*, 2014, 41(12): 2466–2473.
- [14] Wang P, Wu Q, Xu Y. Core microbiota in Chinese liquor fermentation and associations with environmental factors. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(1): 142–153. (in Chinese)
王鹏, 吴群, 徐岩. 中国白酒发酵过程中的核心微生物群及其与环境因子的关系. *微生物学报*, 2018, 58(1): 142–153.
- [15] Wang T, Hu XQ, You L, Wang S, Yu YY, Jian XP. Contribution of yeasts isolated from Chinese strong-flavored liquor to the production of ethanol, major acid and ester in fermentative grain. *Food and Fermentation Industries*, 2015, 41(8): 18–22. (in Chinese)
王涛, 胡先强, 游玲, 王松, 余雨袖, 简晓平. 浓香型白酒酵母对发酵糟醅中乙醇及主要酸、酯生成的影响. *食品与发酵工业*, 2015, 41(8): 18–22.

- [16] Yao WQ, Chen MB, Zhen D, Guo YS. Isolation of lactate-producing microbes from fermented grains of Luzhou-flavor liquor and their effect on simulative solid-state fermentation. *Liquor Making*, 2010, 37(3): 37–41. (in Chinese)
姚惟琦, 陈茂彬, 镇达, 郭艺山. 浓香型白酒酒醅中乳酸菌分离及其对模拟固态发酵的影响. *酿酒*, 2010, 37(3): 37–41.
- [17] Shui GH, Leong LP. Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2002, 977(1): 89–96.
- [18] Mo XL, Fan WL, Xu Y. Changes in volatile compounds of Chinese rice wine wheat qu during fermentation and storage. *Journal of the Institute of Brewing*, 2009, 115(4): 300–307.
- [19] Li DL, Ao ZH, Deng B, Shen XJ, Wang ST. Study on the extraction of total DNA of microbes in fermented grains. *Liquor-Making Science & Technology*, 2014, (1): 33–37. (in Chinese)
李德林, 敖宗华, 邓波, 沈小娟, 王松涛. 酒醅微生物总DNA提取方法研究. *酿酒科技*, 2014, (1): 33–37.
- [20] Youssef N, Sheik CS, Krumholz LR, Najar FZ, Roe BA, Elshahed MS. Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(16): 5227–5236.
- [21] Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5261–5267.
- [22] 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. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(D1): D590–D596.
- [23] Kõljalg U, Nilsson RH, Abarenkov K, Tedersoo L, Taylor AFS, Bahram M, Bates ST, Bruns TD, Bengtsson-Palme J, Callaghan TM, Douglas B, Drenkhan T, Eberhardt U, Dueñas M, Grebenc T, Griffith GW, Hartmann M, Kirk PM, Kohout P, Larsson E, Lindahl BD, Lücking R, Martín MP, Matheny PB, Nguyen NH, Niskanen T, Oja J, Peay KG, Peintner U, Peterson M, Põldmaa K, Saag L, Saar I, Schübler A, Scott JA, Senés C, Smith ME, Suija A, Taylor DL, Telleria MT, Weiss M, Larsson KH. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology*, 2013, 22(21): 5271–5277.
- [24] Kong Y, Wu Q, Zhang Y, Xu Y. *In situ* analysis of metabolic characteristics reveals the key yeast in the spontaneous and solid-state fermentation process of Chinese light-style liquor. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(12): 3667–3676.
- [25] Zhang X, Zhao J, Du X. Barcoded pyrosequencing analysis of the bacterial community of Daqu for light-flavour Chinese liquor. *Letters in Applied Microbiology*, 2014, 58(6): 549–555.
- [26] Hu XL, Du H, Xu Y. Identification and quantification of the caproic acid-producing bacterium *Clostridium kluyveri* in the fermentation of pit mud used for Chinese strong-aroma type liquor production. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 214: 116–122.
- [27] Zhou XH, Chen X, Yang Y, Luo HB, Huang ZG. Study on the change rules of parameters of Luzhou-flavor liquor in pits and their correlations (III): flavoring compositions. *Liquor-Making Science & Technology*, 2012, (6): 47–51. (in Chinese)
周新虎, 陈翔, 杨勇, 罗慧波, 黄志国. 浓香型白酒窖内参数变化规律及相关性研究(III): 风味物质. *酿酒科技*, 2012, (6): 47–51.
- [28] Lu QG, Gan GD, Zhang GS, Feng HY, Li Z, Jiang L. Correlations of fermentation system parameter change of Nongxiang fermented grains. *Liquor-Making Science & Technology*, 2016, (10): 45–47. (in Chinese)
陆其刚, 甘广东, 张广松, 冯海燕, 李喆, 姜雷. 浓香型白酒酒醅发酵体系参数变化相互关系的分析研究. *酿酒科技*, 2016, (10): 45–47.
- [29] Laakso K, Koskeniemi K, Koponen J, Kankainen M, Surakka A, Salusjarvi T, Auvinen P, Savijoki K, Nyman TA, Kalkkinen N, Tynkkynen S, Varmanen P. Growth phase-associated changes in the proteome and transcriptome of *Lactobacillus rhamnosus* GG in industrial-type whey medium. *Microbial Biotechnology*, 2011, 4(6): 746–766.
- [30] de Angelis M, Calasso M, Cavallo N, di Cagno R, Gobbetti M. Functional proteomics within the genus *Lactobacillus*. *Proteomics*, 2016, 16(6): 946–962.
- [31] Wu Q, Xu Y, Chen L. Diversity of yeast species during fermentative process contributing to Chinese Maotai-flavour liquor making. *Letters in Applied Microbiology*, 2012, 55(4): 301–307.
- [32] Udomsil N, Rodtong S, Tanasupawat S, Yongsawatdigul J. Improvement of fish sauce quality by strain CMC5-3-1: a novel species of *Staphylococcus* sp.. *Journal of Food Science*, 2015, 80(9): M2015–M2022.
- [33] Liu G, Zhu Y, Liu B, Che J, Tang J, Pan Z, Chen Z. Diversity of culturable *Bacillus* species from maize (zea mays) rhizosphere soil. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2014, 22(11): 1367–1379. (in Chinese)
刘国红, 朱育菁, 刘波, 车建美, 唐建阳, 潘志针, 陈泽辉. 玉米根际土壤芽胞杆菌的多样性. *农业生物技术学报*, 2014, 22(11): 1367–1379.
- [34] Adak S, Banerjee R. A green approach for starch modification: Esterification by lipase and novel imidazolium surfactant. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 150: 359–368.

Microbial community of fermented grains and its correlation with organic acids biosynthesis during Yanghe strong-aroma liquor manufacturing process

Fan Liu^{1,2}, Xihu Zhou³, Xiang Chen³, Jian Chen^{1,4}, Guocheng Du^{1,5*}, Fang Fang^{1,2}

¹ Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

² State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

³ Jiangsu Yanghe Distillery Co. Ltd., Suqian 223800, Jiangsu Province, China

⁴ National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

⁵ The Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] To analyze the microbial community of fermented grains during Yanghe strong-aroma liquor fermentation process, and to establish the correlation between the microorganisms and the biosynthesis of main organic acids. [Methods] The microbial community of fermented grains was analyzed by metagenome sequencing. Principal component analysis and partial least-squares regression analysis were used to find the key microorganisms correlated with the biosynthesis of main organic acids. [Results] The fermentation process can be divided into two periods (0–14 d and 15–60 d), according to the change of microbial composition and the biosynthesis of organic acids. The number of microbes significantly correlated with the biosynthesis of main organic acids from 0 to 15 d was significantly higher than that from 15 d to 60 d. The core microorganisms involved in the biosynthesis of major organic acids were characterized belonging to seven genera: *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Saccharomyces*, *Naumovozyma*, *Issatchenkia*, *Psychrobacillus* and *Rhizopus*. [Conclusion] The core and key microorganisms involved in the biosynthesis of major organic acids during Chinese strong-aroma liquor fermentation process were identified. The results may laid the practical foundation and theoretical basis for elucidating the mechanism of acid production in Chinese strong-aroma liquor fermentation process and guarantee of the quality control of liquor.

Keywords: Chinese strong-aroma liquor, microbial community, organic acids, partial least squares regression, core microorganisms

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2017YFC1600403) and by the National Natural Science Foundation of China (31771955)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85918307; E-mail: gcdu@jiangnan.edu.cn

Received: 20 December 2017; Revised: 9 March 2018; Published online: 21 March 2018